

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Uji secara *in vivo* adanya kandungan asam oleanolat pada pemberian secara topikal dengan dosis 2.5, 5, dan 10% selama 28 hari memberikan efek penghambatan jaringan parut hipertrofik yang menyerupai keloid, selain itu dapat menginduksi apoptosis dan mereduksi bekas luka (Ye *et al.*, 2015). Menurut Mehta *et al* (2016) asam oleanolat telah terbukti dapat mengurangi proliferasi sel fibroblas dengan menghambat G1 pada siklus sel, dengan mekanisme menurunkan ekspresi mRNA kolagen tipe I dan III dan mampu menurunkan TGF- β 1, kolagen tipe 1. Senyawa 5 α -oleandrin merupakan salah satu senyawa terpenoid yang dilaporkan dapat menghambat proliferasi, menurunkan aktivitas migrasi dan menurunkan timbunan kolagen dan menurunkan sintesis TGF- β pada fibroblas keloid (Dachlan, 2015).

Esktrak etanol rumput mutiara memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tulang menggunakan metode pengukuran LDH (Laktat dehidrogenase), hasil IC₅₀ sebesar 445,683 μ g/ml pada konsentrasi 5000 sel/ 50 μ l, dan 514,210 μ g/ml pada konsentrasi 10000 sel/ 50 μ l. Esktrak rumput mutiara tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker tulang karena memiliki IC₅₀ > 20 μ g/ml (Lidia, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Hsu *et al* (2004) menunjukkan bahwa ekstrak rumput mutiara berpotensi sebagai agen antiproliferasi sel. Ekstrak etanolik rumput mutiara kemungkinan menghambat proliferasi dengan cara menghambat protein Era (Mutiara *et al.*, 2008). Senyawa terpenoid dapat memblok sel pada fase G2-M dengan menstabilkan benang-benang spindle pada fase mitosis sehingga menyebabkan fase mitosis (Setiawati *et al.*, 2007).

Perbedaan penelitian ini dengan peneliti terdahulu yaitu pada penelitian ini menggunakan sampel uji berupa ekstrak etanol rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa L*) dan tidak melihat kepadatan kolagen, hanya mengetahui pertumbuhan sel, hambatan proliferasi dan akumulasi sel pada fase dalam silus sel saja.

B. Landasan Teori

1. Rumput mutiara



Gambar 2.1. Rumput Mutiara di Daerah Purwokerto (dokumentasi pribadi, 2016)

Tanaman rumput mutiara berasal dari Afrika tropis, termasuk Madagaskar dan India. Habitus tanaman ini berupa herba tahunan dengan tinggi 15-50 cm dan mempunyai banyak percabangan. Batang berwarna hijau kemerahan, tegak, lunak, berbuku-buku, dan bersegi empat. Daun berupa daun tunggal berwarna hijau, letak daun berhadapan bersilang, bangun daun memanjang hingga lanset, ujung dan pangkal daun runcing, panjang daun 2-5 cm dan lebar ± 1 cm, ibu tulang daun menonjol, tangkai daun pendek ± 1 mm. Bunga keluar dari ketiak daun, bentuknya seperti payung berwarna putih, berupa bunga majemuk dengan 2-5 bunga, ibu tangkai bunga keras seperti kawat panjangnya 5-10 mm, kelopak berwarna hijau kemerahan. Buah termasuk buah kotak berbentuk bulat, berwarna coklat. Biji berwarna coklat. Sistem perakaran berakar tunggang, berwarna putih kotor (Iptenik, 2005; PIER, 2006; Sudewo, 2004; Anam, 2010).

Bagian yang digunakan adalah seluruh tanaman, sifat fisika kimia rumput mutiara yaitumanis, tawar, sedikit pahit, netral, lembut, sejuk agak dingin (Soemardjiet *al.*, 2015).

Sistematika tumbuhan rumput mutiara adalah sebagai berikut:

Genus : Plantae
Family : Spermatophyta
Ordo : Rubiales

Class : Dicotyledoneae
Sub – division : Angiospermae
Division : Spermatophyta
Spesies : *Hedyotis corymbosa* L.

Sinonim *Hedyotis corymbosa* L. Adalah *Oldenlandia corymbosa* Linn. (Khare,2007). Nama daerah tumbuhan ini sebagai berikut: rumput siku-siku, bunga telur belungkas, daun mutiara, keterpan, urek-urek polo (BPOM RI, 2013).

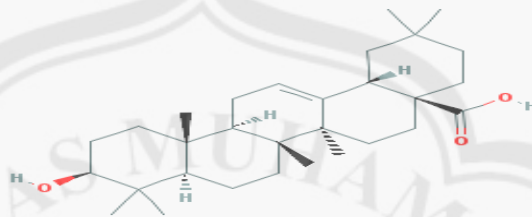
Rumput mutiara dapat digunakan untuk berbagai penyakit. Daun biasanya digunakan untuk mengobati luka dan sakit mata, seluruh tanaman dapat digunakan dalam rebusan sebagai penurun panas dan obat perut. Manfaat lainnya yaitu digunakan untuk infeksi virus, kanker, jerawat, bisul, penyakit kulit, radang usus buntu, hepatitis, penyakit mata, pendarahan, obat cacing, diuretik, pusing, dispepsia, sembelit, bronkitis dan nekrosis (Rathi *et al.*, 2010).

Efek farmakologi rumput mutiara yaitu dapat menyembuhkan infeksi virus, kanker, hepatitis, jerawat, bronkhitis, nekrosis, antelmintik, diuretik, ekspektoran, dan dispepsia (Sasikumar, 2010). Pada penelitian lain menyebutkan efek farmakologi dari tanaman rumput mutiara yaitu sebagai hepatoprotektif, antiinflamasi dan antioksidan (Chimkode *et al.*,2009). Ekstrak etanol rumput mutiara memberikan efek antikanker (BPOM RI, 2013).

Rumput mutiara memiliki kandungan zat aktif, diantaranya alkaloid, terpenoid, asam oleanolat, steroid dan saponin (Fatema dan Hossain, 2014), asam ursalat, dhentriacontane, stigmasterol, β - sitosterol, γ - sitosterol, sitisterol-D-glucosida, asam p -kumarat dan glikosida flavonoid (Sukamdi, 2010). Konsentrasi asam oleanic pada rumput mutiara $1,892 \mu\text{g g}^{-1}$ (Baneerje *et al.*, 2006).

Asam oleanik merupakan triterpen pentasiklik yang banyak ditemukan pada tanaman sebagai asam bebas atau aglycon pada saponin (Singgono *et al.*, 2014). Asam oleanik merupakan suatu zat yang non

toksik dan telah digunakan untuk produk kosmetik dan produk-produk kesehatan (Jie Liu, 1995). Asam oleanik memiliki efek menghambat hypertropic scarring, menghambat pembentukan kolagen ripe I dan III , meregulasi *MMP1*, *MMP-2*, *TIMP-1*, *TGF-β1*, *P311*, *Caspase-3*, dan *Caspase-9*(Yeet *al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012).



Gambar 2.2. Struktur kimia asam oleanik (Pubchem, ncbi)

2. Definisi Keloid

Deskripsi keloid pada tulisan Mesir tahun 1800 yaitu cheloid yang berasal dari kata Yunani chele atau kuku ketam. Keloid merupakan pertumbuhan berlebih dari jaringan fibrosa, padat, biasanya terbentuk setelah penyembuhan luka (Putra, 2008), terjadi akibat sintesa yang tidak terkendali dan penimbunan berlebih dari kolagen (Ghanie, 2010). Gambaran klinis keloid adalah jaringan parut meluas secara progresif meliputi daerah kulit normal disekitarnya yang mengakibatkan jaringan parut terlihat tidak teratur dan menggantung (Sukasah, 2007). Karakteristik keloid berupa peningkatan selularitas, vaskularisasi, dan jaringan konektif. Gambaran umum histologi dari keloid yaitu *keloidal-hyatinilized collagen, a tongue-like advancing edge* yang muncul pada epidermis dan *papillary dermis, horizontal cellular fibrousband* pada retikuler dermis bagian atas dan *prominent fascia-likefibrous bands* (Ghanie, 2010).

Kulit yang berpigmen gelap lebih beresiko tinggi terjadinya keloid dengan insiden 15%. Keloid sering terjadi pada pasien berusia 10-30 tahun dan terbanyak pada wanita (Raeiza, 2014).

Mekanisme pembentukan keloid ini melibatkan inflamasi, fibroplasia, pembentukan jaringan granulasi dan pematangan parut. Fase inflamasi terjadi hampir bersamaan dengan hemostasis, ketika terjadi luka pada jaringan maka sel-sel inflamasi akan dibawa ke area jaringan yang terluka sebagai tindakan respon inflamasi yang dikeluarkan oleh tubuh. Proses respon inflamasi terjadi dengan diikuti proliferasi fibroblas, sel-sel yang bertanggungjawab untuk sintesis berbagai komponen jaringan, termasuk kolagen dan fibrin. Sel-sel progenitor berpindah ke jaringan yang cedera selama fase inflamasi akut.

Hasil dari proliferasi sel yang cepat yaitu pembentukan pembuluh darah baru dan epitel. Fibrin selanjutnya berdiferensiasi menjadi sel fibroblas yang merupakan sel yang bertanggungjawab dalam deposisi kolagen dan kontraksi luka. Akibat terjadinya proses inflamasi yaitu komponen intraseluler seperti adenosin trifosfat dan ion K⁺ akan merangsang nosiseptor dan komponen lain akan menyebabkan nosiseptor hipersensitif terhadap rangsang berikutnya (*nociceptor sensitizer*). Sensitisasi berlangsung tanpa menimbulkan nyeri akibat adanya prostaglandin E₂ yang merupakan sebuah bentuk prostanoid yang berikatan pada reseptor prostaglandin E dan tirosin kinase A. Bradikinin mengaktifkan dan mensensitisasi nosiseptor dengan berikatan pada reseptor B₂. Komponen utama reaksi inflamasi yaitu produksi prostanoid pada tempat cedera (Nathania dan Yuliani, 2015).

Menurut Imam (2008), faktor yang berperan penting pada timbulnya keloid adalah trauma dan proses peradangan pada dermis. Ada juga faktor lain yaitu:

a. Umur dan faktor endokrin

Keloid sering terjadi pada usia muda dan sering terjadi pada wanita.

b. Jenis luka

Keloid terjadi setelah terjadi luka trauma karena panas atau bahan kimia.

c. Herediter dan ras

Pada bangsa Negro dan ras berkulit hitam sering terjadi keloid.

d. Lokasi trauma

Luka dan peradangan biasanya terjadi pada daerah presternal, kepala, leher, bahu dan tungkai bawah lebih mudah terkena keloid.

Penatalaksanaan terapi keloid sering menjadi tantangan karena rekuren, untuk mengurangi rekurensi dan meningkatkan respon maka dianjurkan terapi kombinasi. Terapi yang digunakan secara umum: injeksi steroid, operasi eksisi, krioterapi, laser, radioterapi, dan gel silicon (Ghanie, 2010).

3. Kolagen

Kolagen merupakan kelompok protein yang tidak larut air, dengan total mencapai 30% dari protein penyusun tubuh manusia (Alhana, 2015). Kolagen merupakan komponen utama lapisan dermis yang dibuat oleh sel fibroblast. Kolagen termasuk senyawa protein rantai panjang yang tersusun lagi asam amino alanin, arginin, lisin, glisin, prolin, serta hidroksiprolin (Hartati dan Kurniasari, 2010). Kolagen berperan sebagai struktur organik pembangun tulang, gigi, sendi, otot, dan kulit. Dengan bertambahnya usia kandungan kolagen dalam tubuh manusia semakin berkurang. Kerusakan kolagen pada kulit dapat disebabkan oleh paparan radiasi UV-A dan UV-B dari matahari (Alhana, 2015).

Sekitar 30 bentuk rantai alfa terdapat pada 14 tipe kolagen. Kolagen tipe I, II, dan III merupakan kolagen interstisiil atau kolagen fibriler. Tipe IV, V dan VI merupakan kolagen non fibriler, terletak pada jaringan interstisiil dan membran basalis. Tipe VII merupakan kolagen yang memiliki rantai panjang 467 nm atau lebih, terletak pada lamina basalis dan dermal- epidermal junction (Bambang, 2005).

Proses pembentukan kolagen dibagi menjadi tahap intraseluler, sekresi prokolagen dari intraseluler ke ekstra seluler dan tahap ekstra seluler (Vitto *et al.*, 2005)

a. Tahap intraseluler

- 1) Terjadinya transkripsi yaitu proses dimana asam deoksiribonukleat (DNA) terbuka dari satu untai ganda menjadi dua untai tunggal untuk memungkinkan salinan dari kode kolagen. Rantai polipeptida α dibentuk poliribosome, kemudian dibawa ke retikulum endoplasma kasar oleh fibroblas. Dari *rough endoplasmic retikulum* (RER) masuk ke dalam sistem sebagai preprokolagen. Hasil translasi awal ini preprokolagen mengandung sekuen signal
- 2) Pemotongan signal peptide berasal dari *messenger fibronuclei acid* (mRNA)
- 3) Proses hidrosilasi residu prolin dan lisin.

Hidrosilasi sisa-sisa prolin menjadi hidroksi prolin di katalisis oleh enzim prolin hidrosilase dan membutuhkan vitamin c sebagai kofaktor-nya. Hidroksiprolin dibutuhkan untuk mengikat rantai-rantai α membentuk *triple helix*. Tanpa adanya hidroksiprolin polipeptida kolagen tidak akan membentuk struktur *triple helix* pada kondisi fisiologi, dan tidak akan dihasilkan serat kolagen pada ruang ekstraseluler. Enzim lisil hidrosilasi berperan dalam hidrosilasi lisin menjadi hidroksilisin dan memerlukan vitamin c sebagai kofaktor. Hidroksilisin berperan sebagai perlekatan untuk ke residu gula dan penting untuk pembentukan *cross link* yang menstabilisasi matriks kolagen ekstraseluler.

- 4) Proses glikosilasi

Pada proses ini terjadi perlekatan sisa-sisa galaktosil dan glukosil pada sisa hidroksilisin yang spesifik.

- 5) Pengaturan rantai dan ikatan disulfida

Tahap ini berfungsi untuk memfasilitasi pembentukan *tripe helix*.

6) Pembentukan *tripe helix*.

Langkah penting pada biosintesis prokolagen intraseluler adalah gabungan tiga rantai α yang saling melingkar membentuk *triple helix*(prokolagen). Hidrosiprolin pada proses ini berperan menstabilisasi ikatan *triple helix* yang terbentuk.

b. Tahap sekresi prokolagen dari intraseluler ke ekstraseluler

c. Tahap ekstraseluler

1) Pemutusan peptida non-helix oleh spesifik protease (prokolagen peptidase) sehingga menghasilkan tropokolagen.

2) Pembentukan fibril

Tropokolagen yang terbentuk bergabung menjadi fibril kolagen

3) Pembentukan *cross link*

Struktur fibril diperkuat dengan cara membentuk kovalen *cross link* antar molekul tropokolagen yang telah terbentuk. Proses ini dikatalisa oleh enzim lisin oksidase dengan melibatkan hidroksilisin. Fibril-fibril kolagen yang telah diperkuat dengan cara membuat *cross link* kemudian akan membentuk serat kolagen.

4. Sel Fibroblas NIHT3T

Sel fibroblas merupakan sel yang paling umum di temui pada jaringan ikat dan mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler (kolagen, retikuler, elastin), beberapa makromolekuler anionik (glikosaminoglikans, proteoglikans) serta glikoprotein multiadesif (laminin dan fibronektin) yang dapat mendorong perlekatan sel pada substrat. Sel fibroblas mengsekresikan sitokin dan beberapa *growt factors*, diantaranya yang dapat mengstimulasi proliferasi sel dan menghambat proses diferensiasi (Djuwita *et al.*, 2010).

Fibroblas berperan dalam produksi struktur protein yang digunakan selama rekonstruksi jaringan. Fibroblas secara khusus merupakan bahan dasar serat kolagen yang mempertautkan tepi luka (Purnasari *et al*, 2012) dan berperan penting dalam fase proliferasi

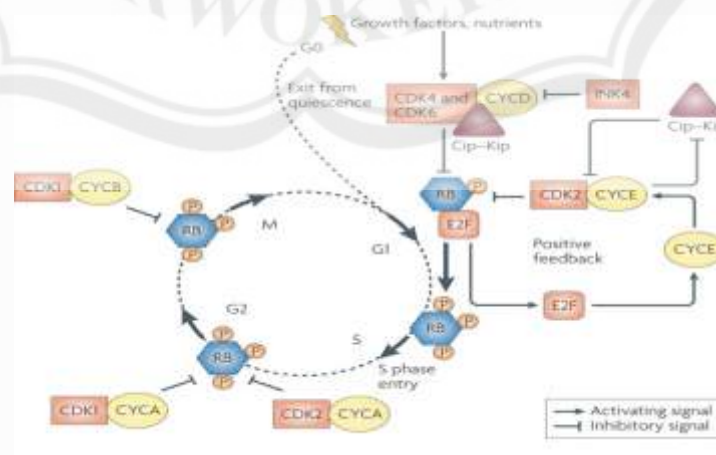
(Rinastiti, 2003). Fibroblas termasuk sel yang tidak aktif dengan laju proliferasi dan aktifitas metabolisme yang lambat, namun setelah terjadi luka fibroblas menjadi sel yang aktif dan mampu untuk berproliferasi dengan cepat dan bermigrasi (Rinastiti, 2003)

Fibroblas menghasilkan serat-serat retikulen, elastin, glikosamin, dan glikoprotein dari substansi amorf. Fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas jaringan pendukung dengan cara mengatur perubahan umur matriks ekstraseluler secara berkesinambungan (Kurniawati *et al.*, 2015).

Fibroblas NIH3T3 merupakan sel yang bersal dari embrio NIH/Swiss tikus yang umumnya dikultur pada Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Zhou *et al.*, 2011). Fibroblast NIH3T3 biasa digunakan untuk investigasi obat antifibrotik (Liu *et al.*, 2000).

5. Siklus Sel

Siklus sel adalah perkembangan perubahan seluler yang teratur sampai memasuki tahap pembelahan. Masuk dan berkembangnya siklus sel dikendalikan melalui perubahan kadar aktivitas suatu kelompok protein disebut siklin. Pada tahap tertentu siklus sel, siklin meningkat kemudian di degradasi dengan cepat saat sel bergerak melalui siklus tersebut. Siklin menjalankan fungsi regulasinya melalui pembentukan kompleks dengan suatu protein yang disintesis secara konstitutif yaitu *cyclin dependentkinase* (CDK)(Khairinal, 2012).



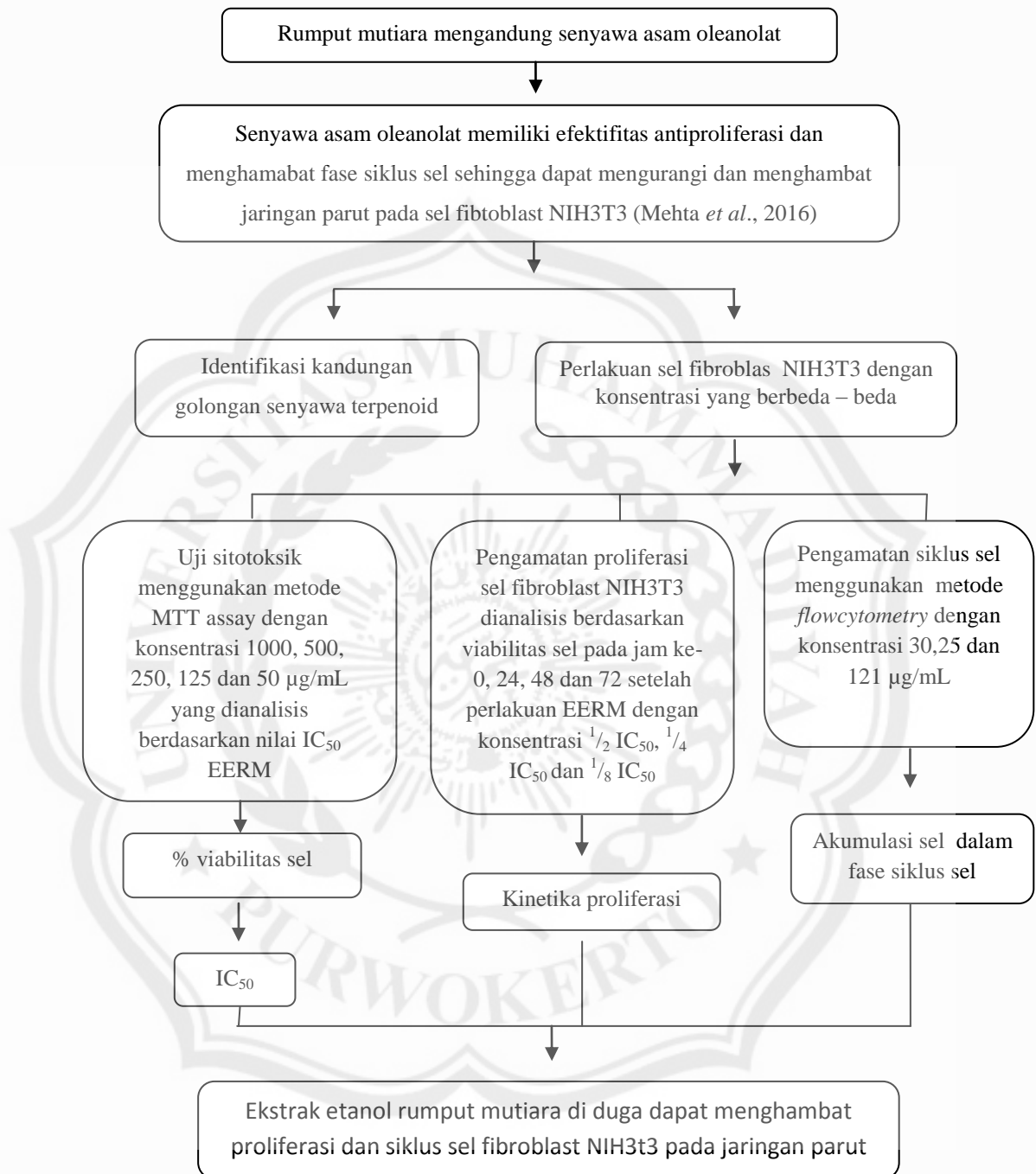
Gambar 2.3. Siklus Sel (Lapenna dan Giordano, 2009)

Siklus sel memiliki 4 tahap yaitu, G₁ (Gap 1), S (Sintesis), G₂ (Gap2) dan M (Mitosis). Tahap G₁ merupakan selang antara tahapan M dengan S, pada tahap ini sel akan mulai mempersiapkan untuk melakukan sintesis DNA. Tahap S akan melakukan sintesis DNA dan terjadi proses replikasi kromosom. Tahap G₂ sel yang telah mereplikasi kromosom akan menduplikasi keseluruhan komponen seluler lainnya dan berlangsung sintesis RNA dan protein (Murti *et al.*, 2007). Selain 4 tahap tersebut juga terdapat tahap istirahat G₀, sel dalam fase G₀ masih potensial untuk berproliferasi disebut sel kolinergik atau sel induk (*stem cell*) (Soetamto, 2004).

Siklus sel pada sel normal manusia sekitar 20-24 jam, sedangkan pada tahap G₁ membutuhkan waktu 8-10 jam, tahap S 6-8 jam, tahap G₂ 5 jam dan fase M 1 jam. Waktu generasi untuk kultur sel pada umumnya sama dengan sel normal (Freshney, 2000)

Flowcytometry merupakan tehnik yang digunakan untuk menghitung dan menganalisa partikel mikroskop yang tersuspensi dalam aliran fluida (Cytopathol, 2009). Metode *flowcytometry* menggunakan reagen pewarna fluoresen propidium iodide (PI) yang akan mengidentifikasi kandungan DNA dalam sel, sehingga *flowcytometer* dapat membedakan berdasarkan intensitas fluoresensi sel. Dimana kandungan intensitas warna yang dihasilkan sebanding dengan jumlah DNA sel (Nunez, 2001).

B. Kerangka Konsep



Gambar 2.4. Kerangka Konsep Penelitian

C. Hipotesis

1. Ekstrak etanol rumput mutiara di duga berpengaruh terhadap pertumbuhan sel fibroblas NIH3T3
2. Esktrak etanol rumput mutiara di duga dapat berpengaruh terhadap proliferasi sel fibroblas NIH3T3
3. Ekstrak etanol rumput mutiara di duga dapat berpengaruh terhadap siklus sel fibroblas NIH3T3

