

Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
**EFEK EKSTRAK ETHANOL CIPLUKAN (*Physalis angulata*)
TERHADAP KADAR TGF- β 1 PADA KULTUR FIBROBLAS
KELOID IN VITRO**
KARYA AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin



Oleh:
Nurul Hidayah
1580714000111001

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS

DERMATOLOGI DAN VENEREOLOGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SAIFUL ANWAR

MALANG

2019



**EFEK EKSTRAK ETHANOL CIPLUKAN (*Physalis angulata*)
TERHADAP KADAR TGF- β 1 PADA KULTUR FIBROBLAS
KELOID IN VITRO**

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin

Oleh:

Nurul Hidayah

1580714000111001

Menyetujui untuk diuji pada tanggal:

2 Mei 2019

Pembimbing I

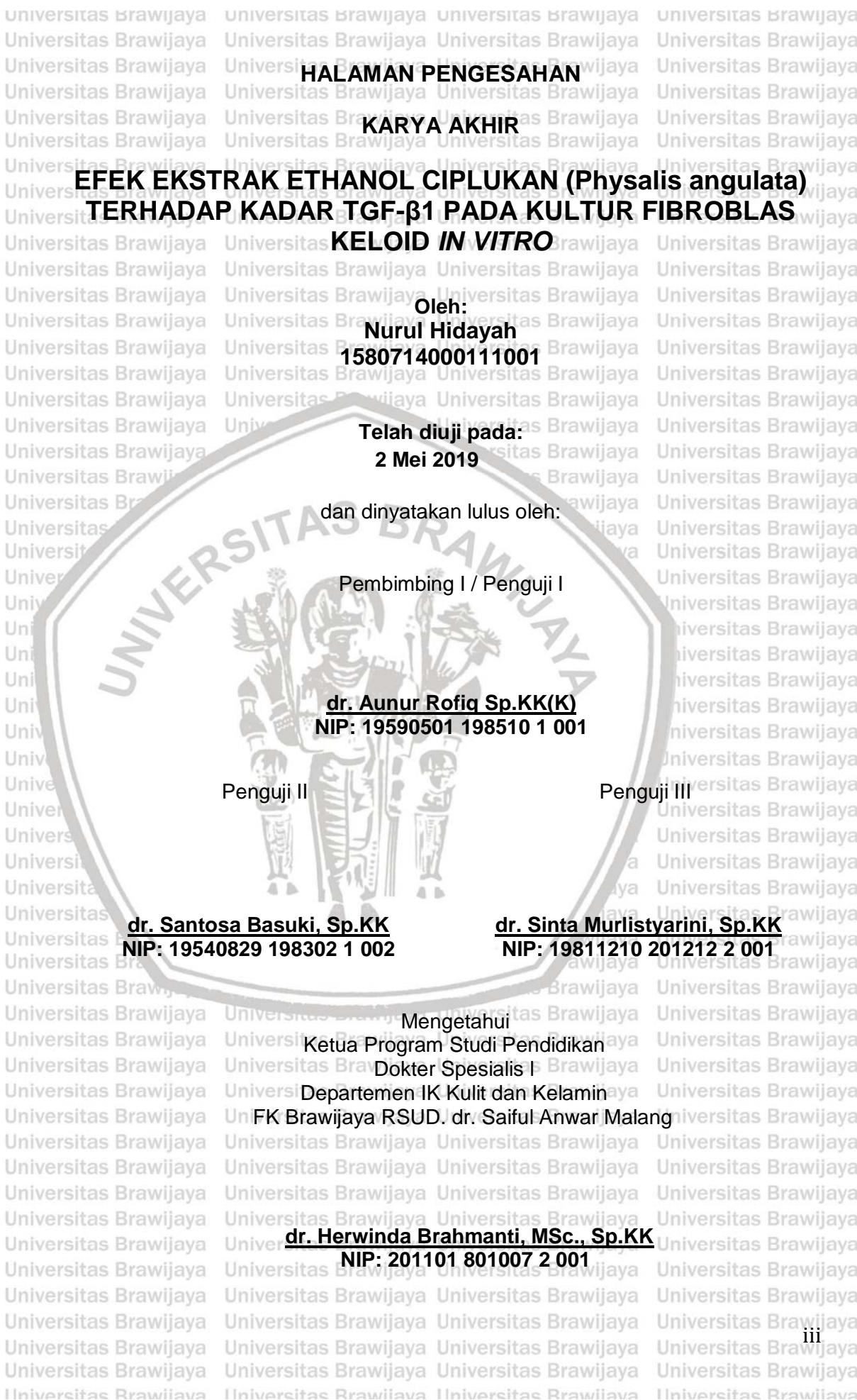
dr. Aunur Rofiq, Sp.KK(K)

NIP. 195905011985101001

Pembimbing II

dr. Arif Widiyatmoko, SpKK

NIP. 197804282009121005





PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Karya Akhir ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa di dalam Karya Akhir ini terdapat unsur-unsur plagiasi maka saya bersedia menerima sanksi dan diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, Mei 2019

Nama : Nurul Hidayah

NIM : 158071400111001

PS : Ilmu Kesehatan Kulit Kelamin

Prog. : Pendidikan Dokter Spesialis I

Fak : Kedokteran UB

KATA PENGANTAR

Alhamdulillaahi Robbil Alamiin. Segala Puji bagi Allah. Syukur yang tak terhingga kepada Allah atas semua berkah dan limpahan karunia sehingga karya akhir saya dapat terselesaikan. Karya akhir saya yang berjudul Efek Ekstrak Ethanol Ciplukan (*Physalis angulata*) Terhadap Kadar TGF- β 1 Pada Kultur Fibroblas Keloid *In Vitro* dibuat untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar spesialis dalam bidang Kulit dan Kelamin.

Penulis menyadari bahwa karya akhir ini tidak akan dapat terlaksana tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar besarnya kepada:

- dr. Aunur Rofiq, Sp.KK (K), dan dr. Arif Widiatmoko, Sp.KK selaku pembimbing I dan pembimbing II pada karya akhir ini. Atas bimbingan, arahan, masukan dan segala bantuannya dari awal hingga akhir penelitian dan penyusunan karya akhir ini.
- dr. Santosa Basuki, Sp.KK, dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK, serta dr. Harun Al Rasyid, MPH sebagai tim pengujian yang telah memberi banyak masukan yang bermanfaat untuk perbaikan karya akhir ini.
- Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dr. Herwinda Brahmanti, MSc., Sp.KK. Terima kasih atas kesempatan yang telah diberikan dan semua dukungan dan motivasi selama masa studi penulis.
- Imam dan suami tercinta Ahmad Ahyani, SE; Orang tua terkasih ibunda Dra. Hj. Mastika dan ayahanda Ir. H. Amir Mahdi, M.Si, kakanda dr. Aisyah Radiyah Sp.P dan adinda dr. Yasmin Musfirah serta ananda tersayang

Ahmad Abbas Rizqiyanur dan si kecil yang ada di dalam kandungan saat ini ; Jazakallah Khairan atas segala doa, dukungan, pengorbanan, inspirasi dan motivasi yang selalu setia kapanpun dalam proses menempuh pendidikan sebagai dokter spesialis. Semoga Allah membalaas semua kebaikan dan melimpahkan rahmatNya kepada kalian semua, bersama-sama kita mencari ridhoNya dan berkumpul di jannah .

- Seluruh staf pengajar lainnya Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Dermatologi dan Venereologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Prof.dr. M.Cholis Sp.KK(K), dr. Taufiq Hidayat, Sp. KK (K), dr. Tantari SHW, Sp.KK(K), Dr. dr. Dhelya Widasmara, Sp.KK, dr. Lita Setyowatie, Sp.KK, dr. Anggun Putri Yuniaswan, Sp.KK, dr. Dhany Prafiti, Sp.KK, dan dr. Suci Prawitasari, Sp.KK serta dr. Boedhy Setyanto, Sp.KK, yang telah memberikan ilmu, bantuan dan motivasi selama masa studi penulis. Semoga ilmu yang diberikan kepada penulis akan selalu bermanfaat bagi semua pihak.
- Seluruh teman-teman sejawat SpKK dan peserta PPDS I Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dr. Sasi Sp.KK, dr. Evawani Sp.KK, dr. Unundy Sp.KK, dr. Krisna Sp.KK, dr. Rizki Sp.KK, dr. Sita Sp.KK, dr. Yusuf Sp.KK, dr. Doni SpKK, dr. Vivi Sp.KK, dr. Martina Sp.KK, dr. Sekar Sp.KK, dr. Prima Sp.KK, dr. Inneke Sp.KK, dr. Boco SpKK, dr. Silfi, dr. Nesa, dr. Rendy, dr. Tantia, dr. Yustian, dr. Aninda, dr. Emy, dr. Vina, dr. Lia, dr. Vidya, dr. Diani, dr. Putri, dr. Sasha, dr. Dayah, dr. Kiko, dr. Bayu, dr. Cacha, dr. Dea, dr. Wuri, dr. Galuh, dr. Fitri, dr. Mazaya, dan dr. Adinda yang telah memberikan bantuan, semangat dan dukungan. Rasa kebersamaan, kekeluargaan dan persahabatan kalian selama ini mewarnai keseharian penulis dalam menjalani masa studi.

- Seluruh tenaga paramedis dan non medis di Instalasi Rawat Jalan dan Inap di Laboratorium Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD. dr. Saiful Anwar Malang. Terima kasih atas segala bantuan, baik selama masa studi maupun selama penyusunan karya akhir.
- Kementerian Kesehatan RI untuk beasiswa BK dan PEMKAB Barito Kuala untuk tugas belajar yang mendukung keberlangsungan studi dari penulis.
- Semua pihak yang telah memberikan bantuan selama masa pendidikan penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Masih banyak kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki oleh penulis sehingga karya akhir ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, saya sebagai penulis mohon maaf apabila masih didapatkan kesalahan dalam penulisan serta menghargai saran dan masukan agar karya ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi banyak pihak.

Malang, Mei 2019

Nurul Hidayah

RINGKASAN

Nurul Hidayah. Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Dermatologi dan Venereologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Efek Ekstrak Ethanol Ciplukan (*Physalis angulata*) Terhadap Kadar TGF- β 1 Pada Kultur Fibroblas Keloid *In Vitro*. Pembimbing: Aunur Rofiq, Arif Widiatmoko.

Keloid adalah tumor jinak sebagai respon hiperproliferasi berupa pertumbuhan berlebihan dari jaringan fibrosa akibat ketidakseimbangan proses reparasi yang dapat berakibat ke gangguan psikogenik yang mempengaruhi kualitas hidup. *Transforming Growth Factor (TGF- β)* memainkan peran utama dalam patofisiologi pembentukan keloid. Tidak ada modalitas terapi tunggal terbaik untuk keloid. Penelitian eksplorasi agen farmakologis untuk keloid terutama yang berasal dari tumbuhan alami semakin diminati dimana senyawa aktif pada tanaman herbal menunjukkan kemampuan antikeloid yang dapat menjadi terapi alternatif potensial tanpa efek samping berat. Senyawa aktif pada ciplukan (*Physalis angulata*) menunjukkan aktivitas biologis yang luas yaitu antiproliferasi, antiinflamasi, antiimmunomodulator, dan lainnya.

Pada keloid terdapat peningkatan selularitas dermal, rasio kolagen tipe I dan II serta ekspresi dermal beberapa matriks ekstraselular. TGF- β 1 sebagai modulator utama fibrosis dimana pensinyalan dihasilkan melalui protein Smad, akan menstimulasi proliferasi fibroblas keloid dan sintesis kolagen, menghambat aktivitas kolagen-degradasi matriks metalloproteinase (MMP) serta menginduksi molekul efektor lainnya. *P.angulata* menunjukkan kandungan flavonoid, alkaloid, phenol, physalin, withanolide, dan lain-lain. Studi terdahulu menunjukkan pemberian senyawa withangulin dari *P.angulata* pada sel stellata berpotensi sebagai anti fibrogenik. Oleh karena itu diperlukan penelitian mengenai efek ekstrak ethanol *P.angulata* dalam mensupresi aktivitas fibroblas keloid melalui jalur sinyal TGF- β / Smad dengan mengukur kadar TGF- β 1 secara *in vitro* dimana penelitian ini tidak dapat dilakukan pada hewan coba.

Penelitian ini bertujuan untuk mengukur kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang diberikan ekstrak ethanol *P.angulata* dengan berbagai konsentrasi secara *in vitro*. Studi eksperimental laboratorik yang dilakukan di Poliklinik Kulit dan kelamin RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan sampel berupa jaringan keloid dari 1 orang pasien yang didiagnosis keloid, memenuhi kriteria eksklusi dan inklusi serta menandatangani inform consent. Kemudian dilakukan bedah eksisi shave terhadap jaringan keloid pasien, selanjutnya jaringan dikultur pada media terkondisi dan dilakukan subkultur sebanyak tiga kali. Ekstrak ethanol seluruh bagian *P.angulata* diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FK Unibraw. Selanjutnya pada kultur fibroblas keloid diberikan 3 macam dosis yang ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu dan disesuaikan hasil MTT assay yaitu 0,25 μ g / mL, 0,5 μ g / mL dan 1 μ g / mL. Setelah inkubasi 24 jam dari supernatan fibroblas keloid kelompok perlakuan dan kontrol negatif dilakukan pengukuran kadar TGF- β 1 dengan metode ELISA Sandwich.

Rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas kontrol $124,34 \pm 3,22$ ng/ml sedangkan rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas dengan tambahan ekstrak ethanol *P.angulata* dosis 0,25 μ g/ml yaitu $150,63 \pm 30,29$ ng/ml, rerata dosis 0,5 μ g/ml yaitu $129,83 \pm 14,59$ ng/ml dan rerata dosis 1 μ g/ml yaitu $154,94 \pm 22,77$ ng/ml. Oleh karena distribusi data tidak normal, analisis data menggunakan uji Kruskal Wallis dan kadar TGF- β 1 tidak berbeda signifikan pada kelompok perlakuan dan kontrol negatif ($p > 0,05$). Hal ini mungkin dapat disebabkan bahwa ekstrak ethanol *P.angulata* memberikan efek anti inflamasi dan imunomodulator terhadap fibroblas keloid. Kemudian perbedaan konsentrasi

pada penelitian fitofarmaka juga dapat menimbulkan efek yang berbeda. Selain itu ekstrak ethanol *P.angulata* juga menghambat ikatan reseptor TGF- β 1 sehingga TGF- β 1 tidak dapat masuk ke intrasel. Kemudian pada patogenesis keloid melibatkan banyak jalur pensinyalan.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah kadar TGF- β 1 pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol. Perlu studi lebih lanjut dengan rentang dosis yang lebih sempit, menggunakan senyawa aktif yang lebih dominan dan spesifik serta berefek anti proliferatif yaitu withangulin dengan metode yang juga dapat menilai kadar TGF- β 1 intraselular. Efek *P.angulata* terhadap fibroblas keloid pada jalur intraselular seperti Smad, PAI-1 dan sintesis kolagen juga dapat dipertimbangkan untuk diteliti lebih lanjut.

Kata kunci : TGF- β 1, fibroblas keloid, ciplukan (*Physalis angulata*)



SUMMARY

Nurul Hidayah. Dermatology and Venereology Specialist Program, Medical Faculty of Universitas Brawijaya. Effect of Ciplukan (*Physalis angulata*) Ethanol Extract towards TGF- β 1 Levels on Keloid Fibroblast Culture In Vitro. Advisors: Aunur Rofiq, Arif Widiatmoko.

Keloid is a benign tumor as a hyperproliferation response in the form of excessive growth of fibrous tissue due to an imbalance of the repair process that can result in psychogenic disorders that affect quality of life. Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) plays a major role in the pathophysiology of the formation of keloid. There is no single therapeutic modality that works best for all types of keloids. There is growing interest in explorative studies on pharmacological agents for keloids, particularly agents from natural plants that contain antioxidant, anti-proliferative, and anti-inflammatory properties. These types of plants can potentially become alternative medication without severe side effects for keloids. The active compounds in ciplukan (*Physalis angulata*) showed extensive biological activity namely anti-proliferation, antiinflammatory, antiimmunomodulatory, and others.

In keloids, there is an increase in dermal cellularity, the ratio of type I and II collagen, and dermal expression of several extracellular matrices. TGF- β 1 as the main modulator of fibrosis where the superfamily member signals are produced through Smad protein, will stimulate proliferation of keloid fibroblasts and collagen synthesis, inhibit collagen-degradation activity of matrix metalloproteinase (MMP) and induce other effector molecules. *P.angulata* show flavonoids, alkaloids, phenols, physalin, and withanolide content as well as other substances. Previous study shows that administration of withanolide from *P.angulata* in stellate cells has antifibrogenic potential. Therefore, there is a need for research on effects of *P.angulata* ethanol extract in suppressing keloid fibroblast activity through the TGF- β /Smad signaling pathway by measuring TGF- β 1 levels in vitro which may not be carried out to animals.

This study aimed to measure the level of TGF- β 1 on keloid fibroblast culture media given various concentrations of *P.angulata* ethanol extract in vitro. This laboratory experimental study was conducted at the Dermatology and Venerology Polyclinic of Dr. Saiful Anwar Malang Hospital and Laboratory of Biomedicine of the Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. The samples were keloid tissue from 1 patient diagnosed with keloid which met the exclusion and inclusion criteria and had signed informed consent. The procedure was to perform shave excision surgery on the keloid tissue of the patient. The tissue was then cultured on conditioned media and subcultures were carried out three times. Ethanol extract from all parts of *P.angulata* was obtained from the Laboratory of Pharmacology, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. Furthermore, keloid fibroblast cultures were given 3 types of dosage determined based on previous studies and MTT assays namely, 0.25 μ g / mL, 0.5 μ g / mL and 1 μ g / mL. After a 24-hour incubation of the keloid fibroblast supernatant in the treatment group and the negative control, TGF- β 1 levels were measured using the ELISA Sandwich method.

Average TGF- β 1 level from the control fibroblast group was 124.34 ± 3.22 ng/ml while mean of TGF- β 1 level from the fibroblast group sample with 0.25 μ g/ml, 0.5 μ g/ml and 1 μ g/ml of ethanol extract *P.angulata* was 150.63 ± 30.29 ng/ml, 129.83 ± 14.59 ng/ml and 154.94 ± 22.77 ng/ml consecutively. Because the data were not distributed normally, the result of Kruskal Wallis test, the data analysis method, did not show significant difference between TGF- β 1 levels of the treatment groups and negative controls ($p > 0.05$). This is probably due to the fact that *P.angulata* ethanol extract provides anti-inflammatory and immunomodulatory effects on keloid fibroblasts. Besides that, the different concentration in the fitopharmacological study can also result in different effects. In addition, the *P.angulata* ethanol extract also inhibits the TGF- β 1 receptor bond so that TGF- β 1 cannot enter the intracellular.

Furthermore, in the pathogenesis, keloids involve many signaling pathways that may cause overlapping between one another.

The conclusion is that level of TGF- β 1 in treatment groups higher than control groups. Future researchers should conduct further study with a narrow range of doses which involves more dominant and specific active compounds and anti-proliferative effects using methods that can assess intracellular TGF- β 1 levels. Future researchers should also conduct further investigation on effect of *P. angulata* on keloid fibroblasts in the intracellular pathways such as Smad, PAI-1 and collagen synthesis.

Keywords : TGF- β 1, keloid fibroblast, ciplukan (*Physalis angulata*)



DAFTAR ISI	
Halaman Sampul Luar	ii
Halaman Sampul Dalam	iii
Halaman Persetujuan	iv
Halaman Pengesahan	v
Pernyataan Keaslian Tulisan	vi
Kata Pengantar	vii
Ringkasan	viii
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xvi
Daftar Gambar	xvii
Daftar Grafik	xviii
Daftar Lampiran	xix
Daftar Singkatan	xx
BAB 1	PENDAHULUAN
1.1	Latar Belakang.....
1.2	Rumusan Masalah.....
1.3	Tujuan Penelitian.....
1.3.1	Tujuan umum.....
1.3.2	Tujuan khusus.....
1.4	Manfaat Penelitian.....
BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA
2.1	Keloid.....
2.1.1	Definisi.....
2.1.2	Epidemiologi.....
2.1.3	Etiologi.....
2.1.3.1	Hipotesis imunologi.....
2.1.3.2	Hipotesis genetik.....

BAB 1	INTRODUKSI	1
1.1	Permasalahan Keloid	1
1.2	Penyebab Keloid	2
1.3	Pengembangan Penelitian	3
1.4	Metode Penelitian	4
1.5	Analisis Data	5
1.6	Kesimpulan	6
1.7	Saran	7
BAB 2	PERILAKU KELOID	8
2.1	Gejala Keloid	8
2.2	Analisis Data	9
2.3	Kesimpulan	10
2.4	Saran	11
BAB 3	PROSES PENELITIAN	12
3.1	Metode Penelitian	12
3.2	Analisis Data	13
3.3	Kesimpulan	14
3.4	Saran	15
BAB 4	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	16
4.1	Hasil Penelitian	16
4.2	Analisis Data	17
4.3	Kultur fibroblast keloid	18
4.4	Pengaruh ekstrak ethanol ciplukan terhadap keloid fibroblas <i>in vitro</i> dengan uji viabilitas dan sitotoksik (MTT assay)	20
4.5	Efek ekstrak ethanol ciplukan pada kadar TGF- β 1 dari supernatan kultur fibroblast keloid dengan metode ELISA Sandwich	22
4.6	Analisis Data	24
4.7	Uji normalitas data	25
4.8	Uji homogenitas ragam	25
4.9	Nilai rerata dan median	26
4.10	Uji Kruskal-Wallis	27
4.11	Ekstraksi ciplukan (<i>Physalis angulata</i>)	28
4.12	Uji viabilitas dan sitotoksi dengan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay)	30
4.13	Pemberian ekstrak ciplukan pada kultur keloid fibroblas	32
4.14	Pengukuran kadar sitokin TGF- β 1	34
4.15	Alur Penelitian	36
4.16	Analisis Data	37
4.17	Kultur fibroblast keloid	38
4.18	Pengaruh ekstrak ethanol ciplukan terhadap keloid fibroblas <i>in vitro</i> dengan uji viabilitas dan sitotoksik (MTT assay)	40
4.19	Efek ekstrak ethanol ciplukan pada kadar TGF- β 1 dari supernatan kultur fibroblast keloid dengan metode ELISA Sandwich	42
4.20	Analisis Data	44
4.21	Uji normalitas data	45
4.22	Uji homogenitas ragam	45
4.23	Nilai rerata dan median	46
4.24	Uji Kruskal-Wallis	47
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	48
5.1	Hasil Penelitian	48
5.2	Analisis Data	50
5.3	Kultur fibroblast keloid	52
5.4	Pengaruh ekstrak ethanol ciplukan terhadap keloid fibroblas <i>in vitro</i> dengan uji viabilitas dan sitotoksik (MTT assay)	54
5.5	Efek ekstrak ethanol ciplukan pada kadar TGF- β 1 dari supernatan kultur fibroblast keloid dengan metode ELISA Sandwich	56
5.6	Analisis Data	58
5.7	Uji normalitas data	59
5.8	Uji homogenitas ragam	59
5.9	Nilai rerata dan median	60
5.10	Uji Kruskal-Wallis	61
BAB 6	PEMBAHASAN	62
6.1	Inflamasi Kronis dan Peranan Nitrit Oksida Pada Keloid	62
6.2	TGF- β 1 Sebagai Sitokin Pleiotropik dan <i>Signalling Pathway</i> Pada Keloid	63
6.3	Morfologi Fibroblas Keloid	64
6.4	Uji Viabilitas dan Sitotoksik dengan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2-5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay Ekstrak Ethanol Ciplukan (<i>Physalis angulata</i>) Terhadap Keloid Fibroblas <i>In Vitro</i>	65
6.5	Bioaktivitas, Senyawa Aktif Sekunder dan Ekstraksi Ciplukan (<i>Physalis Angulata</i>)	66
6.6	Rerata dan Median Kadar TGF- β 1 Fibroblas Keloid	67
6.7	Asumsi dan Keterbatasan Pada Penelitian	68
BAB 7	PENUTUP	69
7.1	Kesimpulan	70
7.2	Saran	70
DAFTAR PUSTAKA		72

LAMPIRAN

86



XV

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1	Komposisi Ciplukan (<i>Physalis angulata</i>).....	30
Tabel 5.1	Optical density dan Kadar Konsentrasi TGF- β 1.....	56
Tabel 5.2	Hasil Uji Normalitas Data Kadar TGF- β 1.....	57
Tabel 5.3	Hasil Uji Homogenitas Ragam Data Kadar TGF- β 1.....	57
Tabel 5.4	Hasil Uji Kruskal-Wallis Kadar TGF- β 1 Berdasarkan Kelompok Perlakuan.....	58



DAFTAR GAMBAR		
Gambar 2.1	Hipotesis yang Berhubungan dengan Formasi Keloid.....	8
Gambar 2.2	Jalur Pensinyalan Fibrosis Pada Keloid.....	15
Gambar 2.3	Manifestasi Klinis Keloid.....	18
Gambar 2.4	Pemeriksaan Histopatologis Pada Keloid.....	19
Gambar 2.5	Protein Smad.....	24
Gambar 2.6	Buah, Daun Bunga dan Biji Buah Ciplukan.....	29
Gambar 4.1	Alur Kerja Penelitian Pemberian Ekstrak Ethanol Ciplukan (<i>Physalis Angulata</i>) Pada Kultur Fibroblast Keloid.....	52
Gambar 5.1	Lesi Keloid.....	52
Gambar 5.2	Morfologi Fibroblas Keloid <i>In Vitro</i>	53
Gambar 5.3	Uji Viabilitas Dan Sitoloksik Dengan MTT Assay.....	54
Gambar 5.4	Supernatan Kultur Fibroblas Keloid yang Akan Diukur Kadar TGF- β 1 dengan ELISA Sandwich.....	55

Grafik 5.1

Beda Rerata Kadar TGF- β 1 dari Beberapa Dosis Ekstrak Ethanol Ciplukan (*Physalis angulata*)

58



Lampiran 1.	Pemilihan Pasien Keloid.....	86
Lampiran 2.	Lembar Penjelasan dan Informasi Penelitian.....	87
Lampiran 3.	Lembar Pernyataan Persetujuan Untuk Berpartisipasi Dalam Penelitian.....	90
Lampiran 4.	Lembar Persetujuan Tindakan Medis.....	91
Lampiran 5.	Lembar Persetujuan Etik.....	92
Lampiran 6.	Lembar Hasil Uji Statistik.....	93
Lampiran 7.	Lembar Bebas Plagiasi.....	100



DAFTAR SINGKATAN	
AgNP	= Argentum Nano Partikel
ATP	= Adenosin Trifosfat
BCG	= <i>Bacillus Calmette Guerin</i>
BMP	= <i>Bone Morphogenic Protein</i>
Chcl3	= Cloroform
CGRP	= <i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>
DNA	= <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECM	= <i>Extracellular Matrix</i>
EFP	= <i>Ethanol Fraction Physalis</i>
ELISA	= <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPCs	= <i>Endothelial Progenitor Cell</i>
ERK	= <i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
EtOH	= Ethanol Hidroksida
DAMPs	= <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DMSO	= Dimetil Sulfoksida
FGF	= <i>Fibroblast Growth Factor</i>
Fn-EDA	= <i>fibronectin extra domain A</i>
5 – FU	= 5 Fluorouracil
GS	= Glycerine Serine
HiF	= <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HLA	= <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HLA – DR	= <i>human Leucocyte Antigen D Related</i>
HSC	= <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
HSP	= <i>Heat Shock Protein</i>
HUVECs	= <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
GDF	= <i>Growth Differentiation Factor</i>
ICAM	= <i>Intercellular Adhesion Molecules</i>
IFN	= <i>Interferon</i>
Ig	= Imunoglobulin
IGF	= <i>Insulin Growth Factor</i>
IL	= <i>Interleukin</i>
JNK	= c-Jun N Terminal Kinases
LAP	= <i>Latency-Associated Protein (LAP)</i>
LC	= <i>Lethal Concentration</i>
LTBP	= <i>Latent TGF-β Binding Protein (LTBP)</i>
MAPK	= <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MIF	= <i>Mullerian Inhibitor Factor</i>
MMP	= Matriks Metalloproteinase
MRna	= <i>Messenger RNA</i>
MTT	= 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2-5-Diphenyltetrazolium Bromide
MSH	= <i>A-Melanocyte-Stimulating Hormone</i>
NKA	= Neurokinin A (NKA),
NGF	= <i>Neural Growth Factor</i>
NO	= <i>Nitric Oxide</i>
iNOS	= <i>Inducible Nitric Oxide</i>
PA	= <i>Plasminogen Activator</i>

PAI-1	= Plasminogen Activator Inhibitor
PDGF	= Platelet-Derived Growth Factor
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PI3K	= Phosphoinositide 3-Kinases
PP2A	= Protein Phosphatase 2
ROS	= Reactive Oxygen Species
SARA	= SMAD Anchor For Receptor Activation
α -Sma	= Alfa Smooth Muscle Actin
SMAD	= Small Mothers Against Decapentaplegic
Co-SMAD	= Common Partner Smads
I-SMAD	= Inhibitory Smads
R-SMAD	= Receptor Regulated Smads
SMURFs	= Smad Ubiquitin-Regulatory Factors
SNP	= Single Nucleotide Polymorphism
SOM	= Somatostatin
SP	= Substansi P
STAP	= Stellate Cell Activation Associated Protein
TGF- β	= Transforming Growth Factor
TGFR	= Transforming Growth Factor Receptor
TLR	= Toll Like Receptor
TNF	= Tumor Necrosis Factor
TSP	= Thrombospondin
TIMP	= Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase
uPA	= Urokinase Plasminogen Activator
VEGF	= Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	= Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)

EFEK EKSTRAK ETHANOL CIPLUKAN (*Physalis angulata*) TERHADAP KADAR TGF- β 1 PADA KULTUR FIBROBLAS KELOID IN VITRO

Nurul Hidayah¹

¹FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr.

SAIFUL ANWAR MALANG

ABSTRAK

Latar Belakang : Keloid adalah tumor jinak sebagai respon hiperproliferasi berupa pertumbuhan berlebihan dari jaringan fibrosa akibat ketidakseimbangan proses reparasi yang dapat berakibat ke gangguan psikogenik yang mempengaruhi kualitas hidup, dimana tidak ada modalitas terapi tunggal yang terbaik untuk keloid.

Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF- β 1) berperan dalam patofisiologi keloid.

Penelitian eksplorasi agen farmakologis untuk keloid semakin diminati dimana senyawa aktif pada tanaman herbal menunjukkan kemampuan anti-keloid yang dapat menjadi terapi alternatif potensial tanpa efek samping berat. Senyawa aktif pada tanaman ciplukan (*Physalis angulata*) telah banyak diteliti dan menunjukkan aktivitas biologis yang luas antara lain anti proliferasi, anti inflamasi, dan anti imunomodulator.

Tujuan : Untuk mengukur kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang diberikan ekstrak ethanol *P. angulata* dengan berbagai konsentrasi secara in vitro.

Metode : Studi eksperimental laboratorik yang dilakukan di Poliklinik Kulit dan kelamin RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan sampel berupa jaringan keloid dari 1 orang pasien yang didiagnosis keloid, memenuhi kriteria eksklusi dan inklusi serta menandatangani inform consent. Pengambilan jaringan keloid dengan bedah eksisi shave, selanjutnya jaringan dikultur pada media terkondisi dan disubkultur 3 kali.

Selanjutnya pada kultur fibroblas keloid diberikan 3 macam dosis ekstrak ethanol ciplukan yang ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu dan MTT assay yaitu 0,25 μg / mL, 0,5 μg / mL dan 1 μg / mL. Setelah inkubasi 24 jam dari supernatan fibroblas keloid kelompok perlakuan dan kontrol negatif dilakukan pengukuran kadar TGF- β 1 dengan metode ELISA Sandwich. Hasil : Rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas kontrol $124,34 \pm 3,22$ ng/ml sedangkan rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas dengan tambahan ekstrak ethanol *P.angulata* dosis 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yaitu $150,63 \pm 30,29$ ng/ml, dosis 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yaitu $129,83 \pm 14,59$ ng/ml dan dosis 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yaitu $154,94 \pm 22,77$ ng/ml. Oleh karena distribusi data tidak normal, analisis data menggunakan uji Kruskal Wallis kadar TGF- β 1 tidak berbeda signifikan pada kelompok perlakuan dan kontrol negatif ($p > 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah kadar TGF- β 1 pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol.

Kata kunci : Keloid, *Transforming Growth Factor-1* (TGF- β 1), ciplukan (*Physalis angulata*)

ABSTRACT

Background : Keloid is a benign tumor as a hyperproliferation response in the form of excessive growth of fibrous tissue due to an imbalance of the repair process that can result in psychogenic disorders that affect quality of life and there is no single therapeutic modality that works best for all types of keloids. Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) plays a role in the pathophysiology of the formation of keloid.

There is growing interest in explorative studies on pharmacological agents for keloids, as active compounds from natural plants can potentially become alternative medication without severe side effects for keloids. The active compounds in ciplukan (*Physalis angulata*) showed extensive biological activity namely anti-proliferation, antiinflammatory, antiimmunomodulatory, and others. *Objective* : This study aimed to measure the level of TGF- β 1 on keloid fibroblast culture media given various

concentrations of *P.angulata* ethanol extract in vitro. *Material and Methods* : This laboratory experimental study was conducted at the Dermatology and Venerology Polyclinic of Dr. Saiful Anwar Malang Hospital and Laboratory of Biomedicine of the Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. The samples were keloid tissue from 1 patient diagnosed with keloid which met the exclusion and inclusion criteria and had signed informed consent. The procedure was to perform shave excision surgery on the keloid tissue of the patient. The tissue was then cultured on conditioned media and subcultures three times. Furthermore, keloid fibroblast cultures were given 3 types of dosage of *P.angulata* ethanol extract, determined based on previous studies and MTT assays 0.25 µg / mL, 0.5 µg / mL and 1 µg / mL. After a 24-hour incubation of the keloid fibroblast supernatant in the treatment group and the negative control, TGF-β1 levels were measured using the ELISA Sandwich method. *Results* : Average TGF-β1 level from the control fibroblast group was 124.34 ± 3.22 ng/ ml while mean of TGF-β1 level from the fibroblast group sample with 0.25 µg/ ml, 0.5 µg/ ml and 1 µg/ ml of ethanol extract *P.angulata* was 150.63 ± 30.29 ng/ ml, 129.83 ± 14.59 ng/ ml and 154.94 ± 22.77 ng/ ml consecutively. Because the data were not distributed normally, the result of Kruskal Wallis test, the data analysis method, did not show significant difference between TGF-β1 levels of the treatment groups and negative controls ($p > 0.05$). The conclusion is that level of TGF-β1 in treatment groups higher than control groups.

Keywords : TGF-β1, keloid fibroblast, ciplukan (*Physalis angulata*)

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keloid adalah tumor jinak, berbatas tegas, konsistensi padat kenyal sebagai respon hiperproliferasi dan merupakan pertumbuhan berlebihan dari jaringan fibrosa yang meluas melampaui defek asli serta sering terjadi pada area dengan regangan tinggi yaitu bahu, dada, leher, dan lengan atas. Konsekuensi kosmetik sering terjadi dan berakibat ke gangguan psikogenik dan depresi (Kakar *et al.*, 2006; Baldwin, 2010). Selain itu rasa gatal dan nyeri akan mempengaruhi kualitas hidup (Shaheen A.A., 2017).

Kulit yang mengalami luka akan memicu kaskade yang sangat kompleks baik lokal maupun sistemik yang mengikuti urutan waktu tertentu dan dikategorikan ke dalam empat fase yaitu hemostasis, peradangan, proliferasi dan remodeling. Ketidakseimbangan proses reparasi menyebabkan penyembuhan luka terganggu dan mengakibatkan penyembuhan berlebihan akibat deposisi berlebihan jaringan ikat yang dikenal sebagai keloid (Bran *et al.*, 2009).

Insiden keloid di Inggris dilaporkan kurang dari 1% dimana insidennya paling sering terjadi di antara 15-20% kulit hitam, Hispanik dan Timur dan Kurang umum pada ras Kaukasia (Seifert, 2006; Bran *et al.*, 2009). Jumlah kasus keloid di poli kulit dan kelamin RSUD Dr. Saiful Anwar Malang pada tahun 2013 sampai dengan 2017 yaitu 163 kasus baru dan 479 kasus lama (Tidak dipublikasikan).

Lesi kulit yang bersifat kronis seperti keloid berhubungan dengan interaksi psikososial yang dapat menginduksi stigmatisasi, menimbulkan stress mental dan menjadi hal yang negatif. Pasien yang mengalami skar patologis tidak hanya

menyadari kelainan kulitnya tetapi juga merasakan konsekuensi psikologis. Studi *Quality of Life* oleh Bock *et al.*, (2006) menunjukkan keloid terjadi pada usia produktif dan berlangsung lama serta sering terjadi pada area dada sehingga timbul reaksi menutup diri atau menghindari tempat umum. Gangguan secara fisik berupa rasa gatal dan nyeri juga mengganggu sehingga membatasi mobilitas. Semua hal tersebut ternyata menurunkan *Quality of Life* sehingga pasien keloid seringkali merasa ditolak dan kehilangan kepercayaan diri (Bock *et al.*, 2006). *Transforming Growth Factor* ($TGF-\beta$) adalah salah satu faktor pertumbuhan yang memainkan peran utama dalam patofisiologi pembentukan bekas luka yang berlebihan seperti keloid (Bran *et al.*, 2009). Shah *et al.*, (1992) menunjukkan aplikasi antibodi penetralisir $TGF-\beta$ menyebabkan peningkatan kualitas penyembuhan luka dan kurangnya pembentukan jaringan parut. Namun penelitian Campaner *et al.*, (2006) menunjukkan ekspresi berlebihan $TGF-\beta 1$ merupakan komponen penting bukan faktor independen, membuktikan keloid adalah proses multifaktorial.

Fibroblas keloid lebih sensitif terhadap rangsangan $TGF-\beta$ serta merespon konsentrasi rendah dibanding dengan fibroblas normal. Isoform $TGF-\beta 1$ dan $\beta 2$ diekspresikan berlebihan pada fibroblas keloid, disertai peningkatan ekspresi reseptor $TGF-\beta 1$ dan $\beta 2$ dan fosforilasi Smad3 (Wang *et al.*, 2007; Bran *et al.*, 2009). Studi Seifert (2007) menunjukkan kultur fibroblas keloid mengekspresikan peningkatan $TGF-\beta 1$ mRNA, penurunan tingkat $TGF-\beta 3$ mRNA, ekspresi Smad3 mRNA rendah dan penurunan rasio Smad2/3 mRNA, mengimplikasikan sinyal Smad yang terganggu.

Tidak ada modalitas terapi tunggal yang terbaik untuk semua keloid antara

lain bedah eksisi, injeksi kortikosteroid, terapi kompresi dan terapi laser. Lokasi,

ukuran, kedalaman lesi, usia pasien dan respons terhadap pengobatan terdahulu menentukan jenis terapi yang digunakan (Shaheen A., 2017). Penelitian eksplorasi agen farmakologis untuk keloid terutama yang berasal dari tumbuhan alami semakin diminati. Dalam beberapa tahun terakhir, ada lebih banyak penelitian yang mengeksplorasi sifat antikeloid dari senyawa fitokimia dan ekstrak herbal. Senyawa dengan sifat antioksidan, antiproliferatif, dan antiinflamasi pada tanaman herbal menunjukkan kemampuan antikeloid yang dapat menjadi terapi alternatif potensial tanpa efek samping berat (Unahabokha *et al.*, 2011).

Tanaman ciplukan (*Physalis angulata*) berasal dari Amerika Selatan dan Utara merupakan salah satu tanaman familia solanaceae yang banyak tumbuh di Jawa. Ciplukan mengandung banyak senyawa aktif yaitu physalin, withanolides atau withangulin, physagulin dan physanolide, carotenoid, myrecetine phygerine dan asam oleanolik. Senyawa aktif pada ciplukan telah banyak diteliti dan menunjukkan aktivitas biologis yang sangat luas antara lain aktivitas sitotoksik, antiproliferasi, antiinflamasi, antinosiseptik, analgetik, antialergi, efek imunosupresi dan imunomodulator, antikanker, dan lain lain (Mahalaksmi dan Nidavani, 2014; Salgado dan Varagas-Arana, 2013).

Studi El-Gengahihi *et al.*, (2013) menunjukkan kemampuan proteksi ekstrak akar *Physalis peruviana* terhadap fibrosis organ liver dan ginjal tikus. Studi Liu *et al.*, (2010) menunjukkan pemberian senyawa withangulin *Physalis angulata* pada sel stelata menurunkan fosforilasi jalur Akt/mTOR/p70S6K yang mengontrol proliferasi sel, serta mensupresi TGF- β dan fosforilasi Smad2 serta Smad3, sehingga disimpulkan bahan ini berpotensi sebagai antifibrogenik.

Studi lain oleh Hseu *et al.*, (2011) dimana pada pemberian ekstrak ethanol ciplukan terhadap sel karsinoma skuamosa oral manusia (HSC-3) dan sel endotel

vena umbilicus manusia (HUVECs) *in vitro* didapatkan supresi aktivitas dan ekspresi matrix metalloproteinase (MMP)-9 dan -2 serta aktivator plasminogen urokinase (u-PA) serta meningkatkan ekspresi endogen inhibitor dari MMP yaitu TIMP-1 dan -2 dan inhibitor aktivator plasminogen (PAI-1 dan -2). Serta aktivitas penghambatan *vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced proliferation*. Selain itu studi oleh Lestari *et al.*, (2016) menunjukkan ekstrak methanol daun ciplukan menurunkan fibrosis ventricular melalui inhibisi kadar TNF- α ventricular pada tikus yang mengalami ovariektomi.

Berdasarkan uraian di atas, maka penulis tertarik untuk meneliti efek ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dalam mensupresi aktivitas fibroblas keloid melalui jalur sinyal TGF- β / Smad dengan mengukur kadar TGF- β 1 secara *in vitro*. Sebatas pengetahuan penulis belum didapatkan penelitian efek ekstrak ethanol ciplukan dalam mensupresi aktivitas fibroblas keloid dengan mengukur kadar TGF- β 1 secara *in vitro* dimana penelitian *in vivo* pada hewan coba tidak dapat dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap kadar TGF- β 1 dari kultur sel fibroblas keloid secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap kadar TGF- β 1 dari kultur sel fibroblas keloid.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengukur kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang diberikan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ secara *in vitro*.
2. Untuk mengukur kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang diberikan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ secara *in vitro*.
3. Untuk mengukur kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang diberikan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dengan konsentrasi 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ secara *in vitro*.
4. Untuk mengukur kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang tidak diberikan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) secara *in vitro*.
5. Untuk menguji perbedaan kadar TGF- β 1 pada media kultur fibroblas keloid yang diberikan berbagai konsentrasi ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dengan yang tidak diberikan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*).

1.4 Manfaat Penelitian

Apabila ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terbukti dapat mensupresi aktivitas fibroblas keloid secara *in vitro*, maka penelitian ini akan memiliki manfaat yaitu :

1. Menghasilkan karya ilmiah dan produk hasil penelitian yang dapat menjadi dasar informasi bagi penelitian berikutnya



2. Menambah khazanah ilmu pengetahuan dalam pengembangan tanaman obat sebagai antifibrosis alami demi kemajuan ilmu pengetahuan di bidang dermatovenereologi
3. Memberikan dasar ilmiah untuk pengembangan dan penggunaan biji ciplukan (*Physalis angulata*) sebagai pengobatan keloid di Indonesia

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Keloid

2.1.1 Definisi

Keloid adalah pertumbuhan jaringan fibrotik yang berlebihan dan jinak yang membentang di luar batas defek asli dan sering mengalami prolongasi menyerupai *clawlike* (cleloid) (Lovell, 2010; James *et al.*, 2010). Istilah keloid berasal dari bahasa Yunani *khele* atau cakar kepiting (Ladin *et al.*, 1995). Deskripsi lesi keloid ditemukan pada papyrus Smith sekitar 3000 SM (Breasted, 1992). Keloid merupakan jaringan parut hasil dari penyembuhan luka yang tidak teratur (James *et al.*, 2010; Naylor dan Brisset, 2012). Keloid dapat berkembang dalam waktu 3 bulan hingga beberapa tahun setelah cedera ringan dan bahkan dapat terbentuk secara spontan pada dada tanpa adanya cedera sebelumnya (Murray, 1994).

2.1.2 Epidemiologi

Prevalensi keloid bervariasi dari 0,009% di Inggris menjadi 16% di Kongo (Huang *et al.*, 2016). Sebuah survei terhadap anak-anak Taiwan melaporkan prevalensi keloid 0,3-0,6% (Lovell, 2010). Keloid paling sering terjadi pada 15-20% kulit hitam, Hispanik dan Timur dan jarang pada Kaukasia menunjukkan kecenderungan genetik pada kulit yang lebih gelap (Al Attar, 2007; Robles *et al.*, 2008). Bekas luka keloid terjadi 3 hingga 18 kali lebih sedikit pada pasien kulit putih dibandingkan pada kulit hitam (Shaffer *et al.*, 2002).

Keloid paling sering terjadi pada usia antara 10 dan 30 tahun dimana insidennya lebih tinggi pada wanita serta juga meningkat pada kehamilan dan

pubertas (Kakar *et al.*, 2006; Seifert, 2008; Shaheen A., 2017). Keloid umumnya muncul di situs anatomi dengan regangan tinggi seperti dada, bahu, belakang leher dan kulit kepala (Shaheen A.A., 2017).

2.1.3 Etiologi

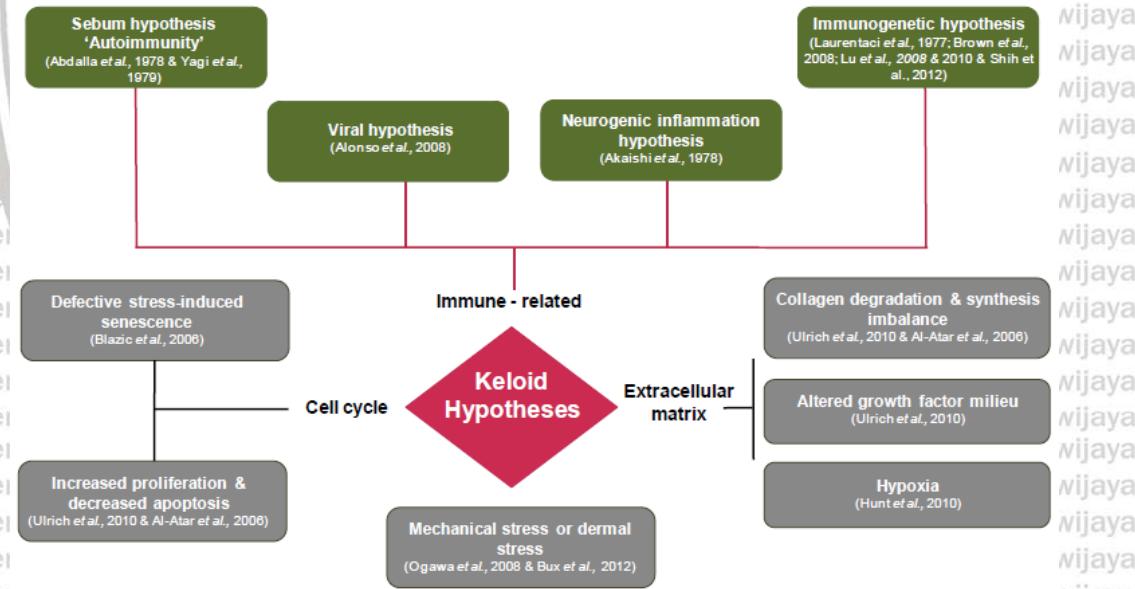
Keloid dapat berkembang setelah jejas kulit non inflamasi seperti luka

vulgaris, folikulitis, infeksi varicella, atau vaksinasi (terutama vaksinasi BCG)

dimana prevalensi keloid tunggal lebih tinggi daripada keloid multipel dan keloid

yang disebabkan oleh dua penyebab berbeda sangat jarang (Perdanakusuma, Universitas Brawijaya, 2010).

2006). Keloid dapat muncul berkembang secara spontan (Lovell, 2010).



Gambar 2.1. Hipotesis yang Berhubungan dengan Formasi Keloid. Terdapat 4 kategori yaitu matriks ekstraselular, siklus sel, stress mekanik dan imunitas (Bagabir, 2013)

Ada beberapa teori etiologi keloid, yang sebagian besar terkait dengan disfungsi fibroblas seperti lokus genetik potensial (Marneros *et al.*, 2004), teori tegangan luka (Ogawa, 2008), hipotesis sebum (Mowlem *et al.*, 1951; Akaishi *et*

al., 2008) dan hipotesis peradangan neurogenik (*Akaishi et al., 2008*), serta keterlibatan oksida nitrat (*Cobbold, 2001*).

2.1.3.1 Hipotesis imunologi

Peningkatan konsentrasi IgG yang signifikan pada lesi keloid diikuti IgA dan IgM. Infiltrasi sel imun di keloid termasuk limfosit T dan sel dendritik serta peningkatan jumlah makrofag, sel Langerhans epidermal dan sel mast (*Seifert, 2008*). Pelepasan sitokin, terutama interleukin dan TGF- β , menstimulasi kemotaksis sel mast dan produksi fibroblas (*Bran et al., 2009*). Lesi fibrotik sering dikaitkan dengan peningkatan kepadatan sel mast dimana pada degranulasi akan dilepaskan histamine, serotonin, asam hidrolase, netral protease serta heparin yang menyebabkan proliferasi sel endotel mikrovaskular dan pruritus (*Butler et al., 2008; Arbi et al., 2015*). Peningkatan aktivitas chymase mempromosikan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen melalui aktivasi TGF- β dan induksi pensinyalan Smad (*Dong et al., 2014*). Kadar histamin meningkat dalam jaringan keloid akan meningkatkan pembentukan kolagen oleh fibroblas. *Lysyl oxidase* menghasilkan hubungan silang kolagen yang abnormal dan berkontribusi pada peningkatan jumlah kolagen larut dalam keloid (*Placik dan Lewis, 1992*).

2.1.3.2 Hipotesis genetik

Studi familial menunjukkan pewarisan autosomal dominan dan didapatkan lokus potensial keloid terkait di Jepang, Afrika-Amerika, Cina telah diidentifikasi pada kromosom 2q23, 7p11, dan 10q23 (*Lovell, 2010; Ong et al., 2010*). Pada populasi Jepang, didapatkan 4 SNP (*single nucleotide polymorphism*) loci (rs873549, rs1511412, rs940187, dan rs8032158) di 3 daerah kromosom (1q41,

3q22.3-23, dan 15q21.3) yang berhubungan dengan keloid (Nakashima *et al.*, 2010). Hubungan yang relevan ditemukan pada tipe HLA-DR5, HLADQw3, HLA-DQA1, HLA-DQB1 dengan potensi perkembangan fenotip dan formasi keloid (Lu *et al.*, 2008). Banyak gen telah ditemukan terkait dengan generasi keloid / HSs, termasuk TGF- β (Niessen *et al.*, 2001; Campaner *et al.*, 2006), PDGF (Haisa *et al.*, 1994; Niessen *et al.*, 2001), VEGF (Steinbrech, 1999), p53 (Ladin *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2004), dan HSP47 (Naitoh *et al.*, 2001).

2.1.3.3 Hipotesis mekanik (teori regangan *injury-wound*)

Stres mekanik karena peregangan kulit dari gerakan tubuh dapat menstimulasi proliferasi fibroblast, sintesis kolagen dan remodeling vascular serta dermal (Al-Attar, 2006; Wang *et al.*, 2006). Kekuatan mekanik menghasilkan dan mendorong pertumbuhan keloid / skar hipertrofi menunjukkan adanya proses seluler atau neurologis yang mendeteksi kekuatan mekanik yang hiperresponsif.

Kekuatan mekanik dapat dirasakan oleh dua jenis reseptor yaitu mechanoreceptor seluler (mekanosensor) dan reseptor pada serabut saraf (nosiseptor mekanosensitif) (Yamada *et al.*, 2000; Sasamoto *et al.*, 2005). Sensasi somatik kekuatan mekanik yang dihasilkan akan ditanggung saluran mekanosensitif, terutama filamen aktin dan desmosome (Furuichi *et al.*, 2008; Hayakawa *et al.*, 2008). Penelitian menunjukkan tegangan kulit yang tinggi pada tepi keloid (Akaishi *et al.*, 2008; Ogawa, 2008).

2.1.3.4 Hipotesis inflamasi neurogenik

Peradangan neurogenik adalah vasodilatasi antidromik kulit dan ekstravasasi plasma, dimediasi oleh pelepasan neuropeptida dari ujung sensoris

(Zegarska *et al.*, 2006). Nosiseptor mekanosensitif dengan akson tanpa myelin (*C-fibers* dan *Ad-fibers*) dapat dirangsang saat kulit direntangkan (Zheng *et al.*, 2002).

Eritema lokal dihasilkan refleks aksonal dan stimulasi antidromik saraf sensorik yang diinduksi dari faktor vasodilatif yaitu neuropeptida seperti substansi P (*SP*) dan peptida terkait gen kalsitonin (*CGRP*) (Zegarska *et al.*, 2006).

Neuropeptida dapat memodulasi fungsi keratinosit, sel Langerhans, sel mast, sel endotel mikrovaskular dermal, fibroblas, dan sel imun yang menginfiltrasi

(Yamaoka *et al.*, 2007). Neuropeptida antara lain *substance P (SP)*, *calcitonin generelated peptide (CGRP)*, *neurokinin A (NKA)*, *vasoactive intestinal peptide (VIP)*, dan somatostatin (*SOM*) secara efektif memodulasi fungsi sel kulit dan kekebalan, seperti proliferasi sel, produksi sitokin, presentasi antigen, neurotransmisi sensorik, degradasi sel mast, vasodilatasi, dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah di bawah kondisi fisiologis atau patofisiologis.

Reseptor neuropeptida (*SP-NK1R* dan *CGRPCGRP1R*) berada pada berbagai sel di kulit, termasuk keratinosit, fibroblas, sel mast, dan sel endotel (Akaishi *et al.*, 2008). *Neural Growth Factor (NGF)* berlebih dapat menyebabkan pelepasan

berlebihan neuropeptida dari serat sensorik, sehingga akumulasi neuropeptida dapat berlanjut tanpa tekanan mekanik (Yamaoka *et al.*, 2007). SP juga secara langsung menginduksi pelepasan sitokin *TNF α* dan *IL-6*, dari subpopulasi leukosit (Okabe *et al.*, 2000; Delgado dan Mcmanus, 2003).

2.1.3.5 Hipotesis sebum

Distribusi fenomena keloid spontan di punggung, dada, bahu dan wajah lagi menunjukkan peran kelenjar sebasea (Fong dan Bay, 2002). Keratin dari folikel rambut atau kelenjar sebasea menjadi stimulus awal dimana gangguan awal pada struktur pilosebaceous, menyebabkan kebocoran sebum. Stimulan antigenik

pada individu yang sensitif memicu pengenalan dan proliferasi limfosit T spesifik-antigen yang mirip dengan reaksi *hipersensitivitas delayed type*. Hasilnya adalah ekspansi klonal limfosit T ber migrasi ke situs stimulasi. Limfosit T yang teraktifasi mensekresi TGF β , selain sitokin lain yang merangsang respon inflamasi. Sebagian progeni berkembang menjadi sel T-memori spesifik antigen, yang memulai respon imun sekunder yang lebih besar setelah terpapar antigen. Perkembangan tepi keloid menjerat dan mengganggu unit pilosebaseus yang berdekatan, dan setiap pertemuan dengan antigen memicu kaskade yang menyebabkan fitur periodik dari aktivitas dan pruritis pada keloid (Fong dan Bay, 2002).

2.1.3.6 Hipotesis melanin

Ketika luka terjadi, jaringan epidermis yang rusak merubah lingkungan mikro kulit lokal, mendorong proliferasi melanosit dan pembentukan melanin (Zheng *et al.*, 2002). Setelah tahap eksudasi inflamasi fibroblas bisa bersentuhan dengan melanosit dari lapisan basal dari area yang tidak rusak, dan saling mempengaruhi satu sama lain. Tingkat melanin yang tinggi menyebabkan penurunan histologis pH, menghambat kolagenase, dan mengganggu degradasi kolagen (Perdanakusuma, 2006; Gao *et al.*, 2013). Taylor *et al.*, (2000) menemukan bahwa α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), yang diproduksi oleh melanosit di kulit, dapat meningkatkan sekresi TGF- β dan menghambat produksi IFN- α dengan mengaktifkan sel T, sehingga menstimulasi multiplikasi fibroblas. Studi Gao *et al.*, (2013) dengan kultur melanosit dan fibroblas *in vitro* membuktikan bahwa melanosit dapat merangsang pertumbuhan dan proliferasi fibroblas, meningkatkan sintesis kolagen dan deposisi matriks ekstraseluler, mengaktifkan jalur sinyal TGF- β , dan meningkatkan perkembangan jaringan parut

patologis, tergantung pada jumlah melanosit, distribusi di kulit, status aktivasi, dan faktor lainnya.

2.1.4 Patogenesis

Proses bagaimana keloid berkembang sulit dipahami karena hanya dapat diamati pada manusia (Chike-Obi *et al.*, 2015). Terganggunya regulasi pada setiap fase penyembuhan luka telah dilaporkan sebagai asal pembentukan bekas luka abnormal (Bran *et al.*, 2009). Faktor pertumbuhan dan sitokin dilepaskan dari fase inflamasi memicu migrasi dan proliferasi sel-sel kulit termasuk keratinosit dan fibroblas. Fibroblas keloid ditemukan lebih responsif terhadap beberapa faktor pertumbuhan fibrogenik dibandingkan dengan fibroblas normal, misalnya, faktor pertumbuhan yang berasal dari *platelet derived growth factor (PDGF)*, *vascular endothelial growth factor*, *fibroblast growth factor β (FGF-β)* dan *insulin-like growth factor I* dan protein lain yang berhubungan dengan ECM (Babu *et al.*, 1992; Bettinger *et al.*, 1996; Brown dan Bayat, 2009). Fibroblas keloid juga mengekspresikan peningkatan kadar *heat shock protein (HSP)*, stimulus lain untuk sintesis kolagen (Lovell, 2010).

Regulasi abnormal jalur apoptosis telah diklaim sebagai penyebab utama pembentukan keloid (Brown dan Bayat, 2009). Sel fibroblas keloid memiliki tingkat apoptosis yang lebih rendah dan menunjukkan penurunan regulasi gen terkait apoptosis termasuk p53 (Chike-Obi *et al.*, 2015). Resistensi terhadap apoptosis, menyebabkan fibroblas keloid tidak memiliki kemampuan untuk menghentikan proliferasi dan produksi kolagen berakibat ketidakseimbangan akumulasi dan degradasi kolagen berkontribusi pada deposisi kolagen-matriks (Chodon *et al.*, 2000; Al-Attar, 2006; Diao *et al.*, 2011). Jika keseimbangan penyembuhan luka

terjadi pergeseran ke arah peningkatan produksi ECM atau penurunan degradasi keloid dapat terjadi (Seifert, 2008).

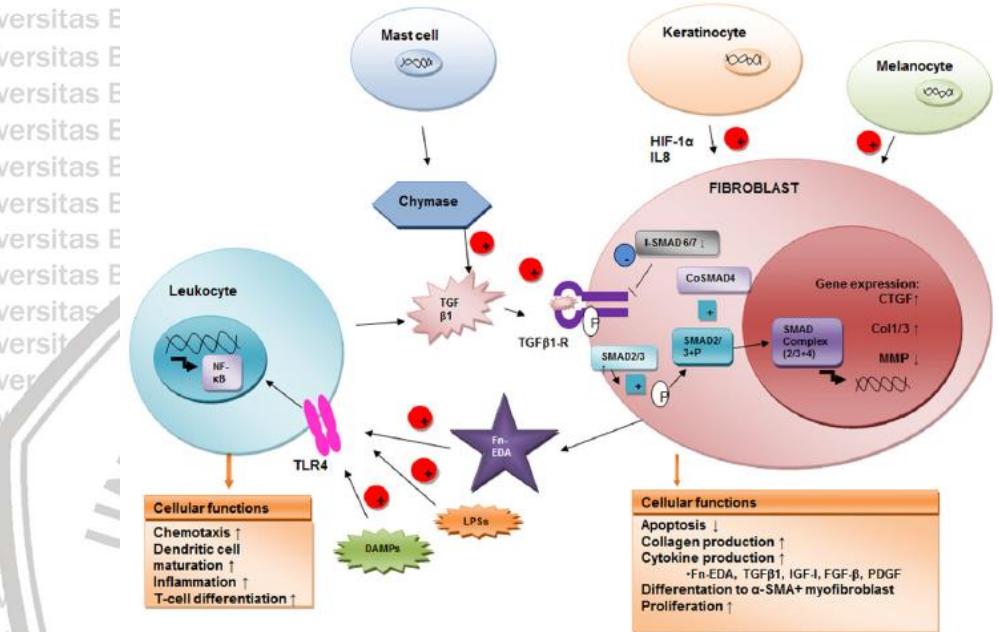
Keloid berbeda dari kulit yang sehat karena adanya peningkatan selularitas dermal, rasio tipe I hingga tipe III kolagen meningkat dan ada ekspresi dermal yang lebih besar dari beberapa protein matriks ekstraseluler termasuk fibronektin, versikan, elastin dan tenascin; sebaliknya, ada penurunan ekspresi fibrillin 1 dan decorin serta periostin yang diekspresikan oleh fibroblas keloid dalam kondisi hipoksia dan menstimulasi sintesis kolagen (Lovell, 2010). Pada keloid bisa didapatkan bentuk fibroblas yang terdiferensiasi, myofibroblas (Slemp dan Kirschner, 2006; Gauglitz *et al.*, 2011). Karakteristik penanda sel dari myofibroblas yang aktif, seperti transglein, cytoglobin / STAP, dan prolyl 4-hydroxylase β dan adanya α -smooth muscle actin (α SMA)-positif myofibroblas, semuanya terlibat dalam kondisi fibrotik, dalam jaringan keloid, menunjukkan peran potensial dalam patogenesis (Luo *et al.*, 2013).

Formasi keloid diatur oleh beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan. Selain

langsung, efek Smad memediasi ekspresi gen, TGF- β menstimulasi akumulasi ECM secara tidak langsung melalui *up-regulasi* PDGF, dimana PDGF menginduksi mitogenesis kemotaksis sel otot polos dan fibroblas ke dasar luka, proliferasi dan migrasi, serta percepatan pembentukan jaringan granulasi dan merangsang produksi kolagen (Niessen *et al.*, 1999). *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) adalah mitogen yang sangat spesifik untuk sel-sel endotel yang mempromosikan angiogenesis fisik dan patologis dengan cara yang bergantung pada dosis (Ferrara *et al.*, 2003; Hoeben *et al.*, 2004). Progenitor sel pro-angiogenik (EPCs) disirkuler didapatkan pada tingkat yang lebih tinggi pada pasien

dengan keloid (Dong *et al.*, 2014). *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

berikan dengan reseptor spesifik, VEGFR, pada EPC, yang mengarah ke mobilisasi dan pematangan EPC ke sel-sel endotel. Dengan peningkatan aktivitas angiogenik, VEGF membantu dalam penyembuhan luka dan aktivitasnya yang berlebihan dapat meningkatkan pembentukan keloid (Fujiwara *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Jalur Pensinyalan Fibrosis Pada Keloid (Andrews *Et Al.*, 2016)

Pada fibrosis TGF- β menyebabkan akumulasi kolagen yang berlebihan

dan terbukti bertindak sebagai modulator utama fibrosis dengan menstimulasi proliferasi fibroblas keloid dan sintesis kolagen serta menghambat aktivitas kolagen-degradasi matriks metalloproteinase (MMP). Selain itu, pensinyalan TGF- β menginduksi banyak molekul efektor lainnya, seperti Fn-EDA, VEGF dan PDGF, lebih lanjut mempromosikan sintesis kolagen dan angiogenesis jaringan. Pada keloid, konsentrasi IL-6, TNF α dan IFN- β meningkat, semua yang mempromosikan migrasi sel dan proliferasi dan sinyal respon inflamasi untuk merekrut sel T ke situs luka. Sebaliknya, konsentrasi IFN- α , IFN- disirkulasi, TNF- β , yang berperan pada

regulasi sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas, berkurang menyebabkan

hilangnya inhibisi dan promosi berikutnya dari produksi kolagen yang tidak terkontrol (Andrews *et al.*, 2015).

Aktivitas enzim proteolitik meningkat di tepi perifer lesi keloid, tepi awal luka asli, sehingga terjadi peningkatan *remodelling* luka. Secara khusus, MMP-1, -2, -3, dan -9 terbukti meningkat pada fibroblas yang berasal dari keloid, ketika diisolasi dari pinggiran superfisial dan pusat lesi. Sintesis dan aktivasi protease serta MMP, khususnya adalah proses kompleks yang sebagian besar diatur oleh TGF- β 1 dan

Smad 3 serta 4 (Wall *et al.*, 2002; Sadick *et al.*, 2008). *Epithelial-mesenchymal*

cross-talk juga terlibat diantara keratinosit dan fibroblas dermal (Huang *et al.*,

2016). Keratinosit yang diisolasi dari jaringan keloid telah terbukti menginduksi karakter seperti keloid di fibroblas normal, dan ko-kultur keratinosit dan fibroblas menghasilkan peningkatan tingkat proliferasi baik dalam fibroblas normal dan keloid-turunan (Lim *et al.*, 2001). Efek ini ditemukan dimediasi melalui sekresi beberapa faktor pertumbuhan, *hypoxia-inducible factor-1α* (HIF-1 α) dan pelepasan IL-1 (Hahn *et al.*, 2013). Keratinosit juga telah terbukti berkontribusi pada penurunan tingkat fibroblas apoptosis melalui paracrine dan pensinyalan parakrin ganda (Chen *et al.*, 2015).

Toll Like Receptor (TLR) juga merupakan faktor penting dalam patogenesis fibrosis. Setelah jejas kulit, pola molekuler ligan endogen TLR4, biasanya tidak dapat diakses ke sistem inate, dilepaskan secara pasif ke dalam ruang ekstraseluler. Ligan ini dikelompokkan bersama sebagai *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), memungkinkan sistem imun bawaan untuk

merespon kerusakan jaringan steril (Beutler, 2007). Konsentrasi beberapa sitokin pro-inflamasi dan pro-fibrotik meningkat sebagai respons terhadap rangsangan

TLR di makrofag, perubahan ekspresi gen fibroblas dan respons TGF- β yang

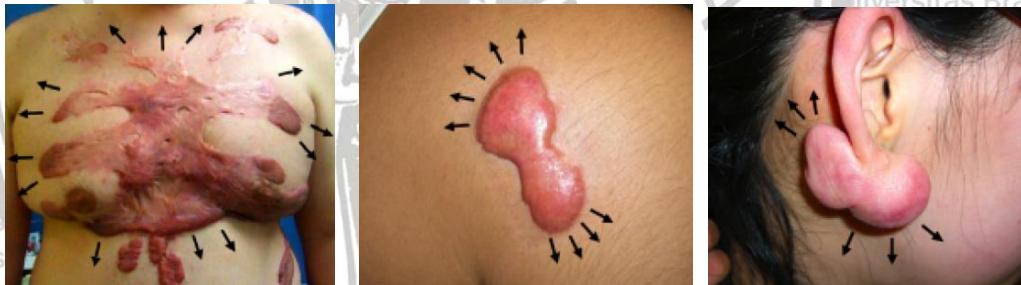
terjadi mengarah ke peningkatan produksi kolagen (Maung *et al.*, 2005; Bhattacharyya *et al.*, 2014). Pada keloid efek auto aktivasi fibronektin EDA (FnEDA) berperan melalui TLR4- dan *integrin-mediated pathways* (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Juga telah ditunjukkan bahwa penurunan ekspresi TLR7 dikaitkan dengan pembentukan keloid (Andrews *et al.*, 2015).

Fibronektin atau Fn-EDA adalah komponen struktural ECM serta molekul sinyal yang mengatur proses seluler adhesi, proliferasi dan migrasi diketahui didapatkan pada keloid (To dan Midwood, 2011). Selain itu Fn-EDA muncul sebagai ligan endogen untuk TLR4, dimana ikatan menstimulasi produksi TGF- β 1 downstream, yang pada gilirannya akan mengatur lebih lanjut Fn-EDA, yang mengarah ke lingkaran setan fibrosis (Andrews *et al.*, 2015; Shinde *et al.*, 2015).

Interaksi fibroblas dengan ECM di sekitarnya ditetapkan oleh reseptor integrin dimana ekspresinya dipengaruhi oleh sitokin seperti TGF- β . Integrin $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ dan $\alpha 3\beta 1$ mengikat kolagen, dengan beberapa anggota seperti laminin ($\alpha 1\beta 1$) atau fibronektin ($\alpha 3\beta 1$) juga mengikat komponen ECM lainnya. Reseptor fibronektin utama adalah integrin $\alpha 5\beta 1$ yang juga dikenal oleh fibroblas. Ekspresi integrin diatur oleh sitokin dan faktor pertumbuhan yang dilepaskan dari ECM melalui proteolisis terbatas atau dari sel yang berdekatan dengan mekanisme autokrin dan parakrin. Kolagen dikenali oleh integrin $\alpha 1\beta 1$ dan $\alpha 2\beta 1$. Pengikatan $\alpha 1\beta 1$ integrin ke kolagen I merupakan pengaturan umpan balik negatif. Reduksi abnormal dalam ekspresi $\alpha 1\beta 1$ dapat menyebabkan gangguan pada umpan balik negatif yang bisa menjelaskan peningkatan sintesis kolagen dalam jaringan keloid (Bran *et al.*, 2009).

2.1.5 Manifestasi klinis

Secara klinis, keloid berupa massa lobular, permukaan menonjol, yang bervariasi dalam warna dari merah muda keunguan ke lesi kulit hiperpigmentasi (Al Attar, 2006; Gauglitz *et al.*, 2011). Permukaan keloid biasanya halus, tetapi dapat nodular dan batas halus, tetapi bisa tidak teratur dengan ukuran bervariasi dari 2 hingga 3 mm berupa papula hingga tumor besar yang berjumbai. Bentuknya bervariasi dari tonjolan simetris yang rata berkонтur dengan margin biasa hingga proyeksi seperti cakar yang tidak teratur (Kakar *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2012). Margin keloid perilesi dapat merupakan pinggiran peradangan yang belum matur dengan eritema yang gatal dan nyeri, sedangkan inti atau pertengahan keloid (intralesi) sering merupakan bekas luka matur dengan rasa gatal yang minimal dan peningkatan rasa sakit (Bayat, 2004; Lee, 2004; Akaishi *et al.*, 2010).



Gambar 2.3. Manifestasi Klinis Keloid. A. Keloid khas pada dada anterior

dengan gambaran *crab's claw shape* menunjukkan pertumbuhan vertikal dan horizontal;

B. Keloid khas pada bahu dengan gambaran *butterfly shape* karena regangan dari

pergerakan anggota gerak atas fleksibilitas tubuh; C. Keloid khas pada daun telinga

(Ogawa, 2008)

Predileksi perkembangannya yaitu tempat regangan yang tinggi,

seperti bahu, tulang dada, rahang bawah, dan lengan serta mempengaruhi daun

telinga, dengan ulserasi. Keloid dapat didiagnosis banding dengan lobomycosis,

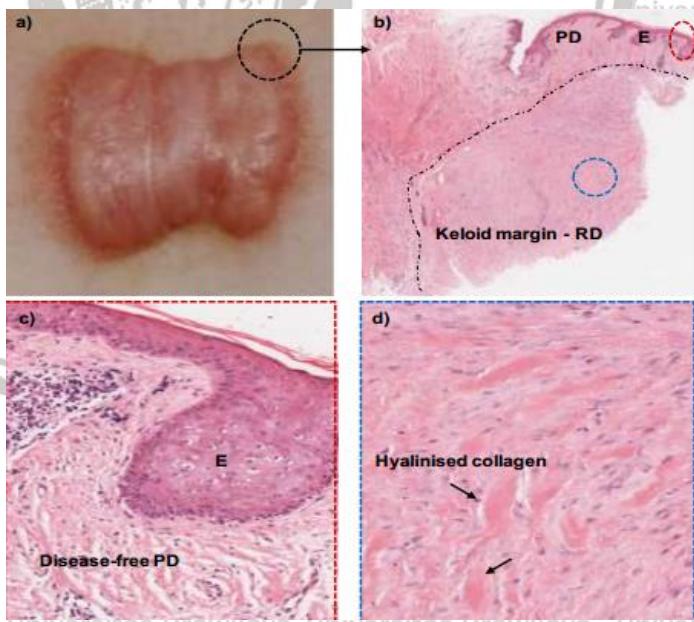
keloidal scleroderma / morphea dan histiositosis sel non-Langerhans (Ko *et al.*,

2012). Keloid tumbuh dan menyebar tidak hanya secara vertikal tetapi juga secara

horizontal, seperti tumor ganas. Arah pertumbuhan horisontalnya menghasilkan bentuk-bentuk karakteristik yang bergantung pada lokasi (Ogawa, 2008).

2.1.6 Histologi

Keloid pada tahap inflamasi awal berupa fibroplasia dengan peningkatan vaskularisasi dan infiltrasi mononuklear perivaskular moderat bersama dengan produksi awal proteoglycan dan bundel serat kolagen. Infiltrasi seluler ditandai oleh sejumlah sel mast, sel plasma dan limfosit. Dalam pembentukan keloid, fibroplasia berlangsung dan gagal mencapai puncaknya pada minggu ke-3 dari waktu penyembuhan luka. Proliferasi vaskular dengan fibroblas yang membesar dan berubah menjadi massa kolagen dan proteoglikan yang tebal. Transformasi yang terus-menerus dari gugus fibroblas seperti pusaran ke dalam bundel kolagen ini penting untuk perkembangan keloid (Kakar *et al.*, 2006).



Gambar 2.4 Pemeriksaan Histopatologis Pada Keloid. **A.** Gambaran makroskopik keloid dengan margin yang meradang. **B.** Margin dari keloid & kulit normal yang berdekatan dengan keloid (Pewarnaan Haematoxylin & eosin dengan perbesaran 3.3). **C.** Papilaris dermis tanpa kelainan (Pewarnaan Haematoxylin & eosin dengan perbesaran 26.3). **D.** Kolagen hialiniasi eosinofilik pada dermis retikularis keloid (Pewarnaan Haematoxylin & eosin dengan perbesaran 26.3) (Bagabir, 2013)

Epidermis di atas lesi keloid biasanya lebih tebal daripada kulit normal dan ditandai oleh rete ridges rata. Serat kolagen terorganisir secara acak dan heterogen. Vaskularisasi minimal dan tidak adanya pembuluh darah yang berorientasi vertikal. Perbedaan bisa disebabkan oleh heterogenitas zona yang berbeda dari keloid (Lee *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2004).

2.1.7 Terapi

Tidak ada modalitas terapi tunggal yang terbaik untuk semua keloid. Lokasinya, ukuran, dan kedalaman lesi; usia pasien dan respon masa lampau terhadap pengobatan menentukan jenis terapi yang digunakan. Ada beberapa pilihan dalam perawatan keloid antara lain dressing oklusif, terapi kompresi, dan suntikan kortikosteroid intralesi (Shaheen A.A., 2017).

Kortikosteroid, terutama injeksi kortikosteroid intralesi, telah menjadi terapi andalan dengan mereduksi jaringan parut yang berlebihan dengan mengurangi sintesis kolagen, dan mengurangi produksi mediator inflamasi dan proliferasi fibroblas selama penyembuhan luka. Injeksi kortikosteroid intralesi sebagai modalitas tunggal dan sebagai tambahan untuk eksisi telah terbukti dalam berbagai penelitian dan dapat mencegah tingkat kekambuhan hingga 80% dengan mengurangi pruritus dan nyeri (Wang *et al.*, 2009). Kortikosteroid dapat dikombinasi dengan modalitas terapi lain untuk meningkatkan perbaikan. Reduksi tingkat rekurensi didapatkan pada bedah eksisi dengan tambahan kortikosteroid post operatif. Teknik bedah bervariasi sesuai dengan ukuran, lokasi dan bentuk keloid. Keloid pedunkuler dengan dasar yang kecil dapat dieksisi dan ditutup secara primer dengan regangan minimal. Terapi bedah harus ditambah dengan teknik lain antara lain steroid, radioterapi dan interferon (Lawrence, 1991).

Dalam beberapa tahun terakhir, ada lebih banyak penelitian yang mengeksplorasi sifat anti-keloid dari senyawa fitokimia dan ekstrak herbal. Terapi senyawa herbal memiliki efek yang menjanjikan dalam pentargetan jalur sinyal molekuler dalam terjadinya keloid dan mampu menekan perkembangan jaringan parut. Senyawa dengan sifat antioksidan, antiproliferatif, dan antiinflamasi seperti quercetin, asiaticoside, *Astragalus membranaceus* Bunge (Leguminosae), dan *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Ekstrak (Lamiaceae) curcuminoids dan oxymatrine menunjukkan aktivitas antikeloid (Unahabokha *et al.*, 2014).

2.2 TGF- β

2.2.1 TGF- β superfamili dan fungsi biologis

Transforming growth factor- β (*TGF- β*) merupakan sekelompok sitokin yang secara kolektif disebut superfamili *TGF- β* yang mengatur pertumbuhan sel epitel, diferensiasi, motilitas, organisasi, apoptosis dan tumorogenesis dan sebagai protein ekstraseluler yang terutama dihasilkan oleh subset T-sel dan diekspresikan hampir oleh semua sel. Sumber utama *TGF- β* yaitu trombosit, makrofag, neutrofil, tulang dan jaringan lunak seperti plasenta, ginjal, endometrium dan sel malignansi yang menghasilkan efek autokrin dan parakrin dengan tiga isoform yaitu *TGF- β 1*, *TGF- β 2* dan *TGF- β 3* (Chin *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2003). *TGF- β* dilepaskan oleh alfa granula dari trombosit setelah digranulasi oleh thrombin (Khalil, 1991).

Transforming growth factor- β (*TGF- β*) adalah stimulator dan penghambat replikasi seluler dan mengontrol produksi matriks ekstraseluler (Streuli *et al.*, 1997). *TGF- β* menstimulasi sintesis kolagen, fibronektin, proteoglikan, tenascins, thrombospondin, *plasminogen activator inhibitor-1* (*PAI-1*), *tissue inhibitor metalloprotease-1* (*TIMP-1*). *TGF- β* menginduksi apoptosis dan mengontrol

morfogenesis dengan memediasi deposisi matriks ekstraseluler dan remodeling.

(Chin *et al.*, 2004). Studi oleh Locci *et al.*, (2001) membuktikan bahwa *Human Desmoid Fibroblast Cell Line* memproduksi TGF- β , mengekspresikan dari mRNA

TGF- β dan didapatkan jumlah reseptornya yang banyak. Benson *et al.*, (1996)

menunjukkan sekresi TGF- β oleh sel fibroblas kultur tumor payudara *in vitro*. TGF-

β yang dihasilkan sel fibroblas terdapat dalam bentuk yang disekresi (*secretory form*) yang beraksi ekstrasel melalui reseptor membran dan bentuk yang

terlokalisir atau ditranslokasi di nucleus (*nuclear form*) dimana kontrol jumlahnya

ada di tingkat molekul mRNA TGF- β 1. TGF- β 1 baik dalam bentuk yang

disekresikan atau ditranslokasi dalam nucleus dapat dikode oleh single mRNA

molekul sebagai *2nd in phase initiation codon* yang ada didalam wilayah *coding* dari

molekul mRNA TGF- β 1 yang akan mengalami sekuensing untuk inisiasi translasi

(Benson *et al.*, 1996).

2.2.2 Aktivasi TGF- β

Transforming growth factor- β (TGF- β) disintesis dalam bentuk precursor, pembelahan di dekat N-terminus melepaskan *latency associated peptide (LAP)*, yang mengikat TGF- β homodimer matur dan memfasilitasi penambahan *LTBP* (Robertson *et al.*, 2015). *Latent TGF- β binding protein (LTGF- β)* biasanya dikomplekskan dengan protein pengikat TGF- β -laten (LTBP), membutuhkan aktivasi menjadi bentuk matur untuk berikatan dengan reseptor dan aktivasi berikutnya dari jalur transduksi sinyal. Kompleks TGF- β / LAP / LTBP laten menyimpan TGF- β dalam bentuk tidak aktif, yang tidak dapat berinteraksi dengan TGFR1 atau TGFR2. Sehingga TGF- β diaktifkan ketika kompleks TGF- β laten dihilangkan LTBP secara ekstrasel melalui pembelahan proteolitik pada bagian

amino-terminal dari protein. Pada ruang ekstraseluler, kompleks TGF- β laten dapat dipecah oleh berbagai protease termasuk plasmin, matriks metalloproteinase (MMP) 2 dan MMP9, thrombospondin, untuk melepaskan TGF- β aktif. Protease plasmin MMP-2 dan -9, yang mempromosikan degradasi matriks, mengaktifkan TGF- β . Thrombospondin-1 (TSP-1), memodulasi adhesi sel, promosi angiogenesis, dan rekonstruksi matriks. Aktivator integrin, biasanya kadarnya rendah hanya di epitel, diinduksi selama luka atau peradangan (Leask dan Abraham, 2004)

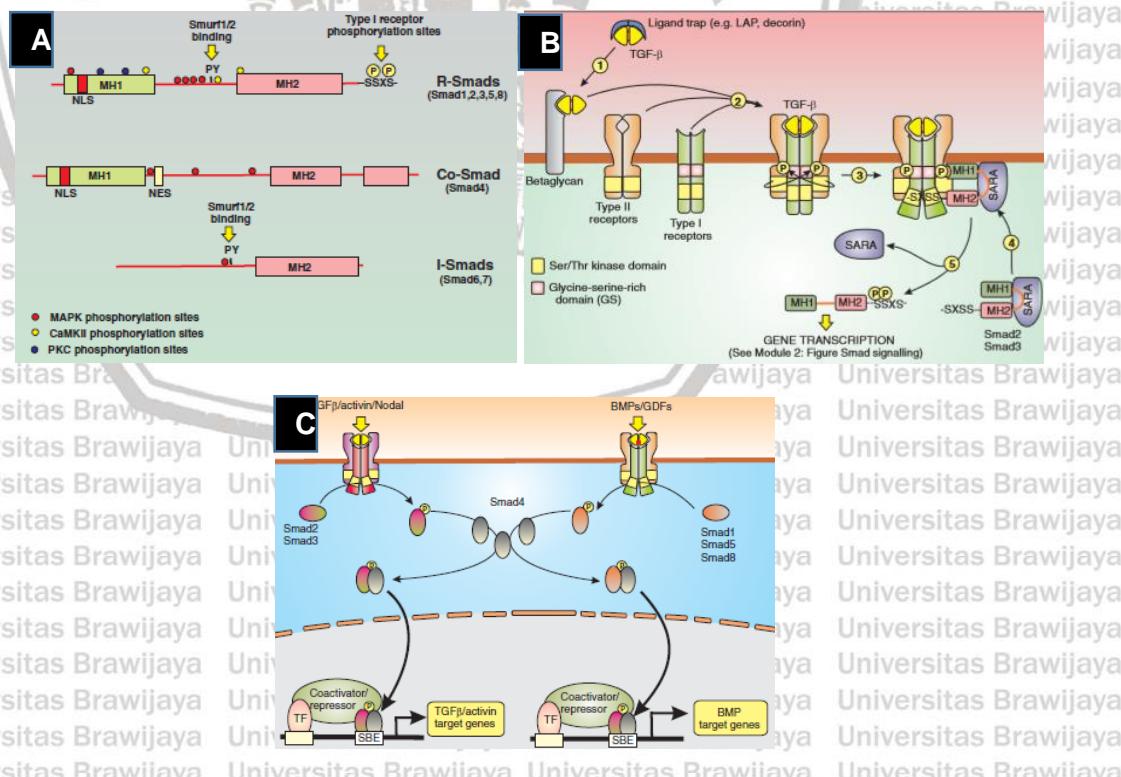
2.2.3 TGF- β reseptör

Hampir semua sel dalam tubuh manusia memiliki reseptör *Transforming Growth Factor-B* (TGF- β) (Massague, 1992). Kehilangan T β R I dan T β R II berkorelasi dengan hilangnya respon seluler terhadap TGF- β (Wu, 2000). Reseptör famili TGF- β semuanya memiliki aktivitas intrinsik serin / threonin kinase dan oleh karena itu, menginduksi kaskade sinyal transduksi yang berbeda (Wells, 1997). Reseptör tipe I memiliki Gly / Ser-rich yang dikonservasi (kotak GS) di upstream dari domain kinase. Tanpa ligan, T β R I dan T β R II hadir sebagai homodimer di membran plasma (Gilboa et al., 1998). Ikatan ligan menginduksi perakitan reseptör tipe I dan tipe II menjadi kompleks, di mana T β R II memfosforilasi dan mengaktifkan T β R I. Peristiwa fosforilasi ini terkait dengan aktivasi T β R I kinase dan selanjutnya downstream pensinyalan (Ten Dijke dan Hill, 2004).

2.2.4 Sinyal TGF- β dan protein SMAD

Semua sinyal anggota superfamili *Transforming Growth Factor-B (TGF- β)*

dihadarkan melalui protein Smad (Liu *et al.*, 1996). Transformasi jalur pensinalan TGF- β terutama diaktifkan dengan mengubah faktor pertumbuhan Subunit β dan Serin / Threonine Kinase reseptor I dan II bentuk ligan stabil - kompleks yang aktivitasnya dengan *downstream* Smad dan mengaktifkan reseptornya (Lopez *et al.*, 1993). Pembentukan sinyal Smad dan interaksinya adalah kompleks yang mengakibatkan sinyal diangkat dengan cepat ke dalam nukleus dari sitoplasma dan terlibat dalam mekanisme kompleks regulasi gen dalam hubungan dengan kromatin dan faktor transkripsi serta regulasi proliferasi fibroblas, diferensiasi dan sintesis matriks ekstraseluler. Protein Smad kemudian terdegradasi di sitoplasma (Miyazono, 2000; Massague, 2000).



Gambar 2.5. Protein Smad. A. Struktur domain dari tiga anggota famili Smad; B. Aktivasi dari reseptor superfamili TGF- β ; (C) Jalur pensinalan Smad menghubungkan reseptor permukaan sampai transkripsi gen (Berridge, 2012)

Daerah GS terfosforilasi pada reseptor tipe I menyediakan situs dok untuk domain homologi MAD 1 (MH1) domain Smad2 atau Smad3 (Chin *et al.*, 2004; Berridge, 2012). Ketika dipisahkan dari *ligand trap*, TGF- β dapat diambil oleh salah satu reseptor aksesoris seperti betaglycan dan kemudian berikatan dengan dua komponen reseptor TGF- β untuk membentuk kompleks agonis / reseptor. Ketika dua tipe reseptor telah dikomplekskan oleh TGF- β , domain kinase serin / treonin pada reseptor Tipe II memfosforilasi residu serin pada daerah glycine / serine-rich (GS) dari reseptor Tipe I (Berridge, 2012; Chin *et al.*, 2004).

Rekrutmen Smad ke membran difasilitasi oleh Smad anchor untuk aktivasi reseptor (SARA). Setelah melekat pada reseptor, SSXSmotif dibawa ke dalam kontak dengan serine / threonine kinase domain dalam Smotif-SS (M / V) pada ekstrem C terminus, dan dua residu serin terfosforilasi. Setelah Smad2 / 3 telah terfosforilasi, afinitasnya untuk kedua kompleks reseptor dan SARA berkurang, serta dua protein masuk ke sitoplasma (Chin *et al.*, 2004; Berridge, 2012). Setelah R-Smad terfosforilasi pada motif SSXS C-terminal, R-Smad meninggalkan reseptor, dan bergabung dengan Smad4 untuk membentuk dimer yang kemudian mentranslokasi ke dalam nukleus. Setelah dimer memasuki nukleus, dimer mengenali dan berikatan dengan motif DNA tertentu. Aktivitas transkripsi Smad difasilitasi dengan menghubungkan dengan faktor transkripsi spesifik wilayah lainnya. Aktivitasnya juga dimodulasi oleh koaktivator dan represor. Smad4 mengikat langsung ke coaktivator p300. Smad4 digunakan sebagai mitra untuk proses translokasi, dan proses transkripsi (Chin *et al.*, 2004; Berridge, 2012).

Modulasi jalur sinyal Smad adalah dengan peningkatan ekspresi I-Smad, yang menargetkan reseptor permukaan sel untuk degradasi, dimediasi oleh Smad ubiquitin-regulatory factors (Smurfs), yang merupakan famili ubiquitin E3 ligases

yang berikatan pada motif PY di daerah penghubung I-Smad. I-Smad bersaing dengan R-Smad untuk mengikat T β RI yang diaktifkan dan dengan demikian menghambat fosforilasi R-Smad dan / atau merekrut ligase E3-ubiquitin untuk mengaktifkan T β RI, menghasilkan degradasi reseptor (Verrecchia *et al.*, 2007).

2.2.5 TGF- β regulator ekspresi gen matriks ekstraselular

Transforming Growth Factor-B (TGF- β) telah terbukti meningkatkan ekspresi kolagen tipe I, III VI, VII, dan X, fibronektin, dan proteoglikan. Stimulasi produksi ECM oleh TGF- β ditingkatkan melalui inhibisi degradasi matriks, pengurangan sintesis protease dan peningkatan protease inhibitor (Bonniaud *et al.*, 2004). Kolagen tipe I merupakan komponen utama ECM terdiri dari dua rantai α 1 (I) dan satu rantai α 2 (I) yang merupakan produk dari dua gen, COL1A1 dan COL1A2. Setelah translasi, rantai polipeptida pro- α 1 (I) dan pro- α 2 (I) masuk ke dalam reticulum endoplasma di mana proline spesifik dan residu lisin dihidroksilasi untuk membentuk hidroksiprolin dan hidroksisin. Kejadian ini memungkinkan rantai pro- α untuk bergabung dengan rantai lain dengan ikatan hidrogen dan membentuk struktur prokolagen triple helix. Prokolagen kemudian disekresikan melalui aparatus golgi di ruang ekstraseluler, di mana propeptida N-terminal dan C-terminal dibelah oleh protease spesifik. Agregat kolagen yang diproses secara matang membentuk kolagen yang lebih besar (Verrecchia *et al.*, 2007). Penumpukan jaringan berlebihan dari kolagen tipe I selama proses fibrotik sebagian besar disebabkan oleh peningkatan laju transkripsi gen (Trojanowska *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 2002).

Rangkaian responsif *Transforming Growth Factor-B (TGF- β)* mengenai promotor COL1A1 terletak antara 174 dan 84 bp dari wilayah awal transkripsi, yang

wilayahnya berisi wilayah pengikatan untuk Sp1 dan elemen dengan motif ikatan NF-1 kanonik (Jimenez *et al.*, 1994). Promotor COL1A2 menunjukkan bahwa wilayah promotor 135-bp dalam 330-bp dari wilayah awal transkripsi dapat memberikan respon terhadap TGF- β (Inagaki *et al.*, 1994). Respons TGF- β menjadi lebih baik pada wilayah antara nukleotida -271 dan -235. Selanjutnya pada wilayah potensial cis-elemen yang tumpang tindih untuk Smad dan AP-1, keduanya terlibat dalam transaktivasi COL1A2 oleh TGF- β (Verrechia *et al.*, 2007).

Smad yang diaktifkan TGF- β berikatan secara langsung ke SBE dan TFE (*transcription factor*) yaitu promotor gen yang mengkode PAI (Miyazono, 2000).

Kerjasama antara Smad3 dan Sp1 untuk melakukan transaktivasi promotor COL1A2 menunjukkan interaksi Smad-p300 / CBP sangat penting untuk *TGF- β driven COL1A2 gene transactivation*. Koaktivator transkripsi lainnya seperti SRC-1 juga dapat berpartisipasi dalam efek TGF- β . Semua target gen Smad mengidentifikasi *downstream* TGF- β yaitu *Smad3-dependent* termasuk COL7A1, PAI-1, dan COL1A2 (Verrechia *et al.*, 2007; Denton dan Abraham, 2001). Jalur pensinyalan Smad sangat penting untuk aktivasi simultan gen kolagen fibrillar kulit (COL1A1, COL1A2, COL3A1 dan COL5A2) oleh TGF- β (Mori *et al.*, 2003).

2.2.6 TGF- β dan keloid

Transforming Growth Factor-B (TGF- β) memainkan peran penting dalam patogenesis keloid dan jaringan parut hipertrofik melalui mekanisme molekuler yang berbeda. TGF- β 1 dan TGF- β 2 diyakini untuk mempromosikan fibrosis dan pembentukan bekas luka, sedangkan TGF- β 3 bukan menginduksi ataupun mengurangi bekas luka. Konsentrasi protein TGF- β 1 dan TGF- β 2 lebih tinggi pada biakan fibroblas keloid dibandingkan dengan kultur fibroblas dermal manusia

normal (Polo *et al.*, 1993). Studi Kurniawati *et al.*, (2016) menunjukkan peningkatan lebih dari 2 kali lipat kadar TGF- β 1 pada kultur keloid fibroblast dibandingkan normal fibroblas. Peningkatan ekspresi protein TGF- β 1 dan TGF- β 2 ditemukan dalam keloid dibandingkan dengan fibroblas dermal manusia normal. Adalah bukti peran TGF- β 1 dan TGF- β 2 sebagai sitokin yang menginduksi fibrosis. TGF- β 1 meningkatkan sintesis kolagen dalam fibroblas yang berasal dari keloid dibandingkan dengan fibroblas yang berasal dari dermis normal (Lee *et al.*, 1999). Peningkatan sintesis kolagen oleh fibroblas yang berasal dari keloid yang diterapi dengan TGF- β 1 diikuti oleh peningkatan yang terkait pada kadar mRNA tipe I pada prokolagen (Bettinger *et al.*, 1996). Sebaliknya ketika digunakan antisense TGF- β 1, apoptosis dan inhibisi dari proliferasi fibroblas keloid terjadi (Shang *et al.*, 2001). Hasil ini menunjukkan sensitivitas unik fibroblas keloid terhadap TGF- β 1 dan peran yang mungkin untuk mediator ini dalam patogenesis keloid membuktikan keloid dapat dimediasi oleh aktivitas faktor pertumbuhan abnormal termasuk dari target TGF- β 1 dan *down stream* (Chin *et al.*, 2004). Selain itu, peningkatan ekspresi TBRI dan TBR II, dan peningkatan fosforilasi Smad3 di fibroblas keloid, juga telah dilaporkan. Aktivasi sinyal Smad, yang penting dari Smad3, tampaknya menjadi salah satu faktor interaksi epitelial-mesenkimal kompleks dalam patogenesis keloid, menghasilkan proliferasi keratinosit aktif dan produksi kolagen oleh fibroblas (Verrechia *et al.*, 2007).

2.3 Ciplukan (*Physalis angulata*)

2.3.1 Nama dan klasifikasi ciplukan (*Physalis angulata*)

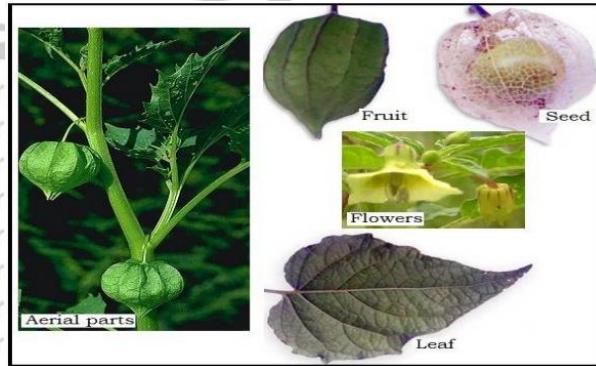
Ciplukan memiliki nama ilmiah *Physalis angulata*. Ciplukan di Indonesia dikenal dengan nama yang berbeda yaitu ceplukan (Jawa), cecendet (Sunda), yor-

yoran (Madura) dan keceplukan (Bali). Sedangkan nama asing ciplukan yaitu Morel berry (Inggris), deng lao cao (Cina) (Santoso, 2008). Klasifikasi *Physalis angulata* yaitu divisi Spermatophyta, sub divisi Angiospermae, klas Asteridae / dicotyledonae, bangsa Solanales, suku Solanaceae, marga *Physalis* dan spesies *Angulata* (Mahalaksmi dan Nidavani, 2014).

2.3.2 Karakter fisik ciplukan (*Physalis angulata*)

Ciplukan (*Physalis angulata*) tumbuh di tepi hutan, tegalan kering, tepi jalan, sawah, di tanah yang subur dan gembur, tidak tergenang air, dapat hidup di dataran rendah hingga dataran tinggi dengan ketinggian sekitar 1500 m dari permukaan laut. Tanaman ini mudah dan banyak ditemukan pada musim hujan (Pitojo, 2002).

Bentuk daun lonjong dengan panjang 8 – 11 cm, lebar 5 – 7 cm, tepi bergelombang. Tanaman ciplukan berbentuk semak berakar tunggang dengan tinggi sekitar 90 cm. Batangnya tegak, berbentuk segi empat, berkayu lunak, dan berwarna hijau pucat. Daunnya tunggal, letaknya berseling, dengan panjang tangkai daun 3 – 6 cm., ujung runcing, pangkal tumpul, pertulangan menyirip, dan berwarna hijau (Santoso, 2008).



Gambar 2.6 Tanaman, Buah, Daun Bunga dan Biji Buah Ciplukan (Santoso, 2008; Mahalaksmi dan Nidavani, 2014)

Bunga ciplukan termasuk bunga tunggal, berbentuk corong yang terletak di ketiak daun. Kelopak daun berwarna hijau berlekatkan terdiri dari 5 helai. Putik hanya 1, benang sari 5 dengan tangkai sari berwarna kuning dan kepala sari berwarna biru. Panjang mahkota bunga 1 – 2,3 cm, berbulu, berwarna kuning pucat. Buahnya lonjong terbungkus kelopak, ketika muda berwarna hijau, dan setelah tua berwarna kuning pucat. Bijinya berbentuk bulat pipih, ketika muda berwarna hijau kekuningan, dan menjadi coklat setelah tua (Santoso, 2008).

2.3.3 Kandungan Fitokimia

Studi fitofarmaka pada *Physalis angulata* menunjukkan kandungan flavonoid, alkaloid dan berbagai jenis senyawa aktif lainnya. Komposisi yang terkandung pada ciplukan (*Physalis angulata*) disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Ciplukan (*Physalis angulata*)

Komposisi umum	
Lemak total 2%	Total karbohidrat 13,22
Kelembaban $80,97 \pm 1,65$	Karbon $0,80 \pm 0,03$
Total lipid $3,16 \pm 0,32$	Energi 88,72 kkal / 372,62 kJ
Protein $1,85 \pm 0,31$	Sukrosa diikuti glukosa & fruktosa
Asam Lemak	
Asam linoleat sebesar 70,5%,	Asam lemak jenuh mewakili 12,87%
Asam oleat sebesar 13%,	Triena sekitar 22,7%
Asam palmitat, asam γ -linolenat, asam palmitoleat	Gamma-linolenat (18,8% dari total methylesters), ω -3 asam lemak (asam α -linolenat) & dihomo- γ -linolenat
Asam gadoleat, dihomo- γ -linolenat, erusat, lignoserat dan asam nervonic 0,2% minyak,	Fitosterol ($\Delta 5$ -avenasterol dan campesterol)
	Asam stearat sebesar 2,57%
Mineral	
Besi 1,47 mg / 100 g	Natrium 1,1 mg / 100 g
Motassium 347,00 mg / 100 g	Mangan 0,26 mg / 100 g
Kalium, Magnesium, Zink, Fe	
Caretinoid	
All trans β carotene 76,8%	All-trans- α cryptoxanthin 3,4-3,6%
Fenol dan Flavonoid	
Fenol 6,09 -6,30 mg / 100 g (Quercetin, myricetin dan kaempferol)	Fenol 6,09 -6,30 mg / 100 g (Quercetin, myricetin dan kaempferol)
Vitamin	
Asam askorbat 46 mg/100 gr	Vitamin E (α dan λ tokoferol)
	(Ramadhan dan Mörsel, 2003; Zheng, 2013)

Physalins

Serangkaian pseudo-steroid yang dikenal sebagai physalins, diisolasi dan hanya didapat dari *Physalis sp.* (Soares et al., 2006). Physalins adalah lactone steroid berdekatan dengan famili Solanaceae. Physalins secara biogenetis berhubungan dengan withanolides. Dari batang dan daun diplukan, isolasi 5 physalins baru E, F, H, I dan K, bersama dengan physalins B, G dan D. Dua physalin baru, physalin U dan V, bersama dengan 7 senyawa steroid tipe ergostane diisolasi dari ekstrak metanol *P. angulata*. Dilaporkan isolasi dari physalin minor baru, physalin W (Rengifo-Salgado dan Vargas-Arana, 2013). Konstituen aktif utama *P. peruviana* L. adalah physalins A, B, D, F dan glikosida dengan aktivitas antikanker, antioksidan dan antiinflamasi (Wu et al., 2004).

Withanolides

Withanolides adalah kelompok steroid alami yang dibangun di atas rangka ergostane, di mana C-22 dan C-26 dioksidasi untuk membentuk cincin lakton.

Senyawa khusus untuk keluarga Solanaceae, dan, khususnya, untuk genera *Withania*, *Acnistus*, *Dunalia*, *Physalis*, *Datura*, *Lycium* dan *Jaborosa*. Aktivitas dari withanolides, termasuk antikanker, antikonvulsan, imunosupresif, antioksidan, antimikroba, antitumor, antiinflamasi, hepatoprotektif, atau aktivitas imunomodulator dan *antifeedent* serangga (Zheng et al., 2013). Banyak glikosida withanolide telah diisolasi dari bagian aerial *P. peruviana*, seperti perulactone, perulactone B, blumenol A, dan (β)-(S)-dehydromifolol. Kemudian 2 tipe-perulactone baru yaitu perulactone C dan perulactone D. Dalam beberapa tahun terakhir 7 withanolides baru yaitu phyperunolide A, phyperunolide B, phyperunolide C, phyperunolide D, phyperunolide E, phyperunolide F, dan

peruvianoxide, dari ekstrak *P. peruviana* (Lan et al., 2009). Physagulin A, B, C dan

D, diperoleh dari ekstrak metanol dari daun segar dan batang *P. angulata* (Shingu *et al.*, 1991; Shingu *et al.*, 1992). Isolasi dari seluruh bahan tanaman *P.peruviana* didapatkan withaphysanolide dan viscosalactone B (Zheng *et al.*, 2013). Bagian aerial *P.angulata* didapatkan physagulins A, B, C, dan F, withangulatin A, whitaminimin dan empat physagulins baru H, I, J dan K. Ekstrak metanol bagian aerial *P.angulata* menghasilkan isolasi baru physalin L, M dan N (Abe *et al.*, 2006). He *et al.*, (2007) melaporkan isolasi dari 4 senyawa baru, physagulins L, M, N dan O; dan 7 withanolide yang diidentifikasi sebagai withangulatin A, physagulin K, whitaminimin, physagulin J, physagulin B, pubesenolide dan physagulin D. Uji sitotoksik fraksinasi ekstrak metanol *P. angulata* menghasilkan isolasi novel withaniloide, physanolide A, dengan kerangka yang belum pernah terjadi sebelumnya (Kuo *et al.*, 2006). Fraksinasi CHCl₃ dan n-BuOH larut ekstrak MeOH dari seluruh tanaman dengan uji aktivitas sitotoksik *in vitro* menggunakan kultur HONE-1 dan sel NUGC menunjukkan isolasi 7 withanolide baru yaitu withangulatins B, C, D, E, F, G dan H (Damu *et al.*, 2007). Lee *et al.*, (2008) melaporkan isolasi dengan struktur minor withanolides yaitu withangulatin I dari *P.angulata*. Jin *et al.*, (2012) melaporkan penemuan tiga antiproliferatif withanolides dengan kerangka karbon yang tidak biasa, yaitu, physangulidines A, B dan C, isolat dari *P. angulata* (Rengifo-Salgado dan Vargas-Arana, 2013).

Lain – lain
Glikosida flavonol, myricetin 3-O-neohesperidoside diisolasi dari ekstrak MeOH sitotoksik daun *P. angulata* (Ismail dan Alam, 2001). Isolasi dan identifikasi asam oleanolic dari *P. angulata*, menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap

patogen oral. Phygrine adalah alkaloid yang hadir dalam spesies *Physalis*, termasuk *P. angulata* (Rengifo-Salgado dan Vargas-Arana, 2013).

2.3.4 Bioaktivitas

P. angulata L. menunjukkan cakupan aktivitas farmakologik yang luas dengan korelasinya terhadap kemungkinan mekanisme suatu kelainan dan aktivitas farmakologis. Aktivitas sitotoksik ditunjukkan oleh senyawa aktif myrecetine 3-heohesperidoside dan Physalin B yang bisa diekstrak baik dengan methanol ataupun ethanol dari daun atau seluruh tanaman ciplukan. Aktivitas sitotoksik kuat dari ekstrak daun pada sel kultur sel leukemia murine, karsinoma epidermoid nasofaring sel dan adenocarcinoma paru. Physalin B juga memiliki kemampuan kemoterapi yang potensial dan efektif untuk pengobatan melanoma maligna, juga mengganggu fungsi proteasome dengan menginduksi peningkatan kadar protein NOXA proapoptosis, yang diidentifikasi sebagai komponen keseluruhan mekanisme kematian inhibitor sel proteasome (Zheng et al., 2013).

Ekstrak methanol seluruh tanaman ciplukan menunjukkan aktivitas induksi arrest fase G2/M dan apoptosis pada kultur sel kanker mammae manusia. Ekstrak etil asetat seluruh tanaman menunjukkan aktivitas antimetastasis dan antiangiogenik *in vitro* dan *invivo*. Ekstrak aqueous akar ciplukan menunjukkan aktivitas antinflamasi dengan mengganggu jalur COX, proliferasi limfosit, dan produksi NO dan TGF- α . Aerial parts yang diekstraksi dengan ekstrak ethanol dan fraksi kloroform menunjukkan penurunan produksi yang signifikan dari NO, iNOS, COX-2, TNF- α , dan IL-6. Aktivitas antiproliferasi ditunjukkan oleh ekstrak etil asetat seluruh tanaman ciplukan pada hematopoietic stem cell dan HUVECs (Rengifo-Salgado dan Vargas-Arana, 2013; Zheng et al., 2013).

Aktivitas lain yaitu imunomodulator dari senyawa aktif ethanol, physalin B/D/F/G/ secosteroid dari batang ciplukan. Aktivitas imunosupresi dari senyawa aktif withangulin A dari *aerial parts* ciplukan dan Physalin H dari seluruh tanaman. Aktivitas antinosiseptik dari akar ciplukan, aktivitas analgetik dari bunga ciplukan. Aktivitas antiinflamasi dari *aerial parts*, bunga, akar dari senyawa aktif Physalin E – secosteroid dan senyawa campuran. Selain itu juga didapatkan aktivitas antiasma, antialergi, antibakterial, antimikobakterial, antileismanisasis, dan antimalaria (Rengifo-Salgado dan Vargas-Arana, 2013; Zheng *et al.*, 2013).

Studi El-Gengahih *et al.*, (2013) yaitu ekstrak akar *Physalis peruviana* menunjukkan kemampuan proteksi terhadap fibrosis pada organ liver dan ginjal tikus. Studi Liu *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa pemberian senyawa withangulin *P. angulata* pada sel stellata berpotensi sebagai antifibrogenik. Selain itu studi oleh Lestari *et al.*, (2016) menunjukkan ekstrak methanol daun ciplukan menurunkan fibrosis ventricular melalui inhibisi kadar TNF- α ventricular pada tikus yang mengalami ovariektomi. Studi oleh Hseu *et al.*, (2011) menggunakan ekstrak ethanol *Physalis angulata* terhadap *Human Oral Squamous Carcinoma 3* (HSC-3) dan HUVECS *in vitro* dengan dosis 5, 10, 15 dan 20 μ g/ml. Dosis 20 μ g/ml bersifat sitotoksik, sedangkan dosis 5-15 μ g/ml terhadap sel HSC3 bersifat non atau subtoksik. Dosis 5-15 μ g/ml menurunkan invasi, aktivitas MMP9/ MMP2 /u-PA /TIMP1 /TIMP2 /PAI 1 /PAI 2, ekspresi protein MMP 2/u-PA, dan pelepasan VEGF dimana signifikan secara statistik ($p<0.05$). Dosis 5-15 μ g/ml terhadap sel HUVECs menurunkan VEGF menginduksi proliferasi, migrasi dan menghambat sekresi MMP 9 serta menghambat formasi neovaskasi *in vivo*.

Penelitian mengenai efek ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap keloid belum pernah dilaporkan sebelumnya, namun dengan adanya aktifitas antifibrosis

maka diharapkan fitofarmaka ini dapat menjadi salah satu terapi baru dalam manajemen penatalaksanaan keloid.

2.3.5 Toksikologi

Studi toksisitas akut, ekstrak metanol daun *Physalis angulata* tidak menunjukkan mortalitas pada 2000 mg / kg, sehingga aman pada penelitian in vivo (Rathore *et al.*, 2011). Nilai LD50 jus buah lebih dari 5000 mg / kg dan diperoleh

kadar kalium yang tinggi pada periode akut dan subkronik (Perk *et al.*, 2013).

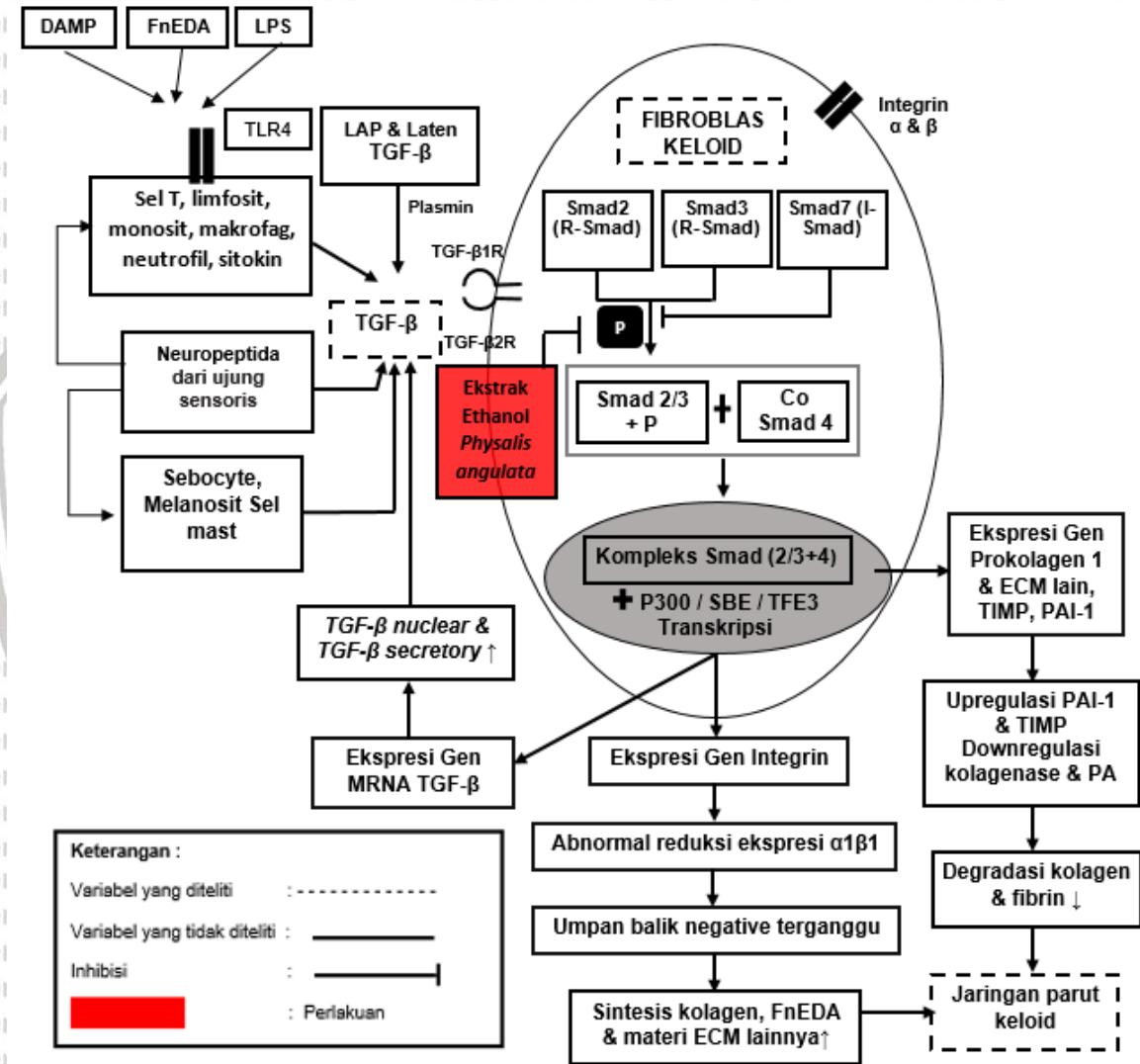
Pengobatan tikus dengan ekstrak air yang diperoleh dari akar ciplukan (10-60mg / kg) tidak menunjukkan perubahan perilaku, munculnya gerakan tak sadar, piloereksi, efek stimulasi atau sedatif, depresi pernapasan pada 4, 24 atau 48 jam setelah pemberian ekstrak air sehingga ekstrak aqueous *P. angulata* menunjukkan toksisitas akut yang rendah (Bastos *et al.*, 2006).

Alves *et al.*, (2008) menunjukkan efek genotoksik ekstrak air *Physalis angulata* pada limfosit manusia *in vitro*. Berbeda dengan penelitian oleh Perk *et al.*, (2013) jus buah *Iyophilized Physalis peruvialis* tidak menunjukkan efek genotoksik pada hewan coba dan tidak ada efek hematologi, hati, dan atau toksisitas ginjal.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1as Kerangka Konseptual Penelitian



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Etiopatogenesis keloid bersifat multifaktorial. Ligand yang berikanan dengan TLR4 antara lain DAMPS, LPS dan fibronektin (ligand endogen TLR4) akan

mengaktifkan sistem imun terhadap kerusakan jaringan steril. Makrofag, limfosit, monosit dan neutrofil yang teraktivasi akan mensekresikan TGF β . Beberapa sitokin proinflamasi dan profibrotik meningkat sebagai respons terhadap stimulasi TLR di makrofag. Tanggapan proinflamasi juga menyebabkan peradangan neurogenik. Neuropeptida dilepaskan dari ujung sensoris karena proses regangan mekanis, dimana secara langsung menginduksi pelepasan sitokin, subpopulasi leukosit. Neuropeptida memodulasi fungsi sel mast, fibroblas dan meregulasi ekspresi gen faktor pertumbuhan seperti TGF- β dan NGF dalam berbagai sel di dermis termasuk fibroblas. Stimulasi sebosit sebagai antigen memicu limfosit T dan mengaktifkan sel T sehingga mensekresi TGF β , begitupula dengan α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) yang diproduksi melanosit. Degranulasi sel mast menyebabkan proliferasi sel endotel mikrovaskular serta aktivasi TGF- β serta induksi *signaling Smad*.

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) dihasilkan antara lain oleh neutrofil, limfosit, monosit, makrofag, trombosit, fibroblas dan organ lain. TGF- β berikatan dengan dua komponen reseptor TGF- β untuk membentuk kompleks agonis/reseptor. Fosforilasi T β RII akan mengaktifkan T β RI sehingga setelahnya Smad2/3 terfosforilasi, R-Smads bergabung dengan Smad4 untuk membentuk dimer yang kemudian mentranslokasi ke dalam nukleus. Setelah dimer memasuki nukleus, dimer akan mengenali dan berikatan dengan motif DNA tertentu. Smad4 mengikat langsung ke koaktivator p300, selanjutnya terjadi regulasi gen dengan kromatin dan mengaktifkan transkripsi sehingga terjadi ekspresi dari gen prokolagen I dan materi matriks ekstraselular lainnya. Begitupula sintesis PAI-1 dan TIMP serta integrin. Upregulasi dari sintesis faktor inhibitor yaitu PAI-1 dan TIMP dan downregulasi dari kolagenase serta PA sehingga terjadi reduksi degradasi kolagen.

dan fibrin menyebabkan akumulasi ECM. Terjadi reduksi dari ekspresi reseptor integrin $\alpha 1\beta 1$ yang memegang peranan pada interaksi antara fibroblas dan ECM sehingga umpan balik negatif terganggu dan terjadi peningkatan sintesis kolagen. TGF- β yang dihasilkan sel fibroblas dalam bentuk yang disekresi (*secretory form*) yang beraksi ekstrasel melalui reseptor membran dan bentuk yang terlokalisir atau ditranslokasi di nucleus (*nuclear form*) dimana kontrol jumlahnya ada di tingkat molekul mRNA TGF- β .

Ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) menghambat fosforilasi Smad 2 dan 3 sehingga tidak terjadi proses transkripsi dengan hasil akhir penurunan kadar TGF- $\beta 1$ pada fibroblas keloid.

3.3 Hipotesis Penelitian

Kadar TGF- $\beta 1$ akan lebih rendah pada kelompok yang mendapat ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) pada kultur fibroblas keloid *in vitro* dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapat perlakuan.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Pengukuran TGF- β 1 dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak ciplukan (*Phyallis angulata*) pada kultur fibroblas keloid. Pada penelitian ini dibuat dua kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan (kontrol negatif). Kelompok perlakuan yaitu kelompok kultur fibroblas yang direncanakan diberi ekstrak ethanol ciplukan dengan 3 konsentrasi yaitu 5, 10 dan 15 μ g / mL dari hasil penelitian Hseu *et al.*, (2011).

4.2 Sampel Penelitian

Jaringan fibroblas keloid diperoleh dari 1 buah jaringan keloid aktif dari orang pasien yang menjalani pembedahan eksisi shave keloid di Divisi Tumor Instalasi Rawat Jalan Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Saiful Anwar Malang sesuai dengan PPK PERDOSKI 2017 (PERDOSKI, 2017) dan memenuhi kriteria inklusi dan ekslusi. Jaringan keloid diambil setelah disetujui komite etik RSUD Dr Saiful Anwar Malang.

4.2.1 Kriteria inklusi

1. Subjek laki - laki / perempuan usia 17 – 32 tahun (Tang *et al.*, 2011)
2. Subjek didiagnosis keloid berdasarkan anamnesis dan gambaran klinis
3. Keloid aktif (masih mengalami pertumbuhan, hiperemi, gatal atau nyeri) (Viegas *et al.*, 2010)

4. Keloid yang tidak mendapat terapi keloid apapun (injeksi atau steroid topikal selama 1 tahun terakhir)

5. Bersedia menjadi subyek penelitian serta menandatangani *informed consent*

4.2.2 Kriteria eksklusi

1. Subyek yang menderita penyakit yang dapat mengkontaminasi kultur sel fibroblas atau berisiko bagi lingkungan dan petugas kesehatan :

a. HIV (+) yang dikonfirmasi dengan hasil *rapid test* positif

b. Hepatitis B yang dikonfirmasi dengan pemeriksaan HbsAg (+)

c. Hepatitis C yang dikonfirmasi dengan pemeriksaan HCV (+)

(Uphoff, 2010; Shioda, 2018)

2. Subyek yang menderita penyakit kulit fibrosis yang mempengaruhi kadar TGF- β jaringan kulit yang dikonfirmasi dengan anamnesis dan pemeriksaan fisik yaitu :

a. Scleroderma sistemik dan *localized (morphea)*

b. *Nephrogenic fibrosing dermatopathy*

c. *Eosinophilic fasciitis*

d. Scleromyxedema (Firestein, 2012)

3. Subjek yang tidak dapat menjalani tindakan bedah eksisi

a. Mengalami gangguan faal hemostasis yang dikonfirmasi dengan hasil pemeriksaan faal hemostasis yang memanjang

b. Riwayat alergi obat bius lolal (pehacain injeksi) yang dikonfirmasi dengan anamnesis.

4.2.3 Estimasi Besar Sampel (Pengulangan)

Pada penelitian ini, digunakan 3 macam konsentrasi perlakuan berbeda dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan dihitung dengan Estimasi Besar Sampel berdasarkan rumus Federer.

$$P(n-1) \geq 15$$
$$4n - 4 \geq 15$$
$$4n \geq 19$$
$$n \geq 4,75 \approx 5$$
(Solimun, 2001)

Keterangan : n = jumlah pengulangan P = jumlah perlakuan

Jadi pada masing – masing perlakuan pada penelitian ini akan dilakukan 6 kali pengulangan.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian yaitu variabel tergantung dan variabel bebas.

4.3.1 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar TGF- β 1 dari supernatan kultur sel fibroblas keloid.

4.3.2 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dengan konsentrasi 5, 10 dan 15 μ g / mL. Konsentrasi perlakuan ditentukan berdasarkan hasil penelitian Hseu *et al.*, (2011).

4.4 Lokasi dan waktu penelitian

Pengambilan sampel jaringan keloid dilakukan di Poli Kulit dan Kelamin Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Penelitian kultur fibroblas dilakukan di

laboratorium Biomed Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dilakukan pada bulan Januari 2019 sampai dengan April 2019.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Alat

Alat yang digunakan untuk mengambil jaringan keloid adalah scalpel no.15, alkohol swab, kassa steril, spuit 1 cc. Alat pembuatan ekstrak ethanol ciplukan adalah pisau, mortar dan pestle, neraca analitik, kertas saring, gelas Erlenmeyer, gelas beaker 250 mL, tabung ekstraktor soxhlet, dan *rotary evaporator vacuum*.

Alat untuk kultur fibroblas dan pengukuran TGF- β 1 adalah tabung sentrifuge, cawan petri, gunting steril, scalpel steril, *culture dish*, *glass cover slip*, inkubator, mikropipet, filter, *TC plate*, *culture flask*, hemosimeter dan kamera.

4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk mengambil jaringan keloid adalah pehacain injeksi, salep gentamicin. Bahan pembuatan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) adalah ethanol 96%, aquades murni, seluruh bagian ciplukan. Bahan yang digunakan untuk kultur dan pengukuran TGF- β adalah fosfat-buffered saline, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, tripsin 0,25 %, fetal bovine serum, penstrep 0.1%, *Human TGF- β 1 ELISA kit*.

4.6 Definisi Operasional

1. Keloid adalah tumor jinak, berbatas tegas, konsistensi padat kenyal yang meluas melampaui defek asli serta sering terjadi pada area dengan regangan tinggi (Baldwin, 2010). Keloid yang diambil pada penelitian ini

adalah keloid yang aktif dan dari bagian sentral (Tsujita-Kyutoku *et al.*, 2005; Jumper *et al.*, 2017)

2. Ciplukan (*Physalis angulata*) yaitu spesies tanaman herbal tahunan dari genus *Physalis* dan famili *Solanaceae*(Mahalaksma *et al.*, 2014). Serbuk kering ciplukan yang digunakan pada penelitian ini berasal dari seluruh bagian tanaman ciplukan yang didapat dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Serbuk kering diekstraksi dengan pelarut ethanol 96% menggunakan metode maserasi. Ekstrak yang dihasilkan dianggap sebagai 100%.
3. Kultur fibroblas adalah kultur dari jaringan keloid aktif yang dieksisi *shave* dan diambil pada bagian sentral dari pasien keloid kemudian diisolasi dan selnya ditumbuhkan pada *Dulbecco's Modified Eagle Medium* sehingga didapatkan sel fibroblas keloid dan dilakukan subkultur sebanyak 3 kali (Kurniawati *et al.*, 2015).
4. Pengukuran sitokin TGF- β 1 dari supernatan sel subkultur fibroblas keloid subkultur ke 3, diukur dari supernatan kelompok yang tidak mendapat perlakuan dan kelompok yang mendapat perlakuan dengan 3 konsentrasi ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dengan metode ELISA dan satuan ng/ml dengan nilai *cut off* TGF- β 1 fibroblas keloid 30,98 – 51,18 serta dilakukan pengukuran masing – masing 2 kali (Hseu *et al.*, 2011; Kurniawati dkk., 2016)
5. Kontrol negatif adalah kelompok kontrol yaitu subkultur fibroblas keloid tanpa penambahan ekstrak ethanol ciplukan

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemilihan subjek penelitian

Pasien yang datang ke Divisi Tumor Poliklinik Kulit dan RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dilakukan pemeriksaan melalui proses anamnesis dan pemeriksaan fisik. Pasien yang terdiagnosis keloid akan dilakukan penilaian untuk kriteria inklusi dan eksklusi. Pasien akan diperiksa rapid test, HbsAg, HCV dan faal hemostasis. Pasien keloid yang memenuhi kriteria, diberi penjelasan mengenai tujuan dan manfaat penelitian serta keuntungan dan kerugian turut serta dalam penelitian ini. Pasien yang setuju mengikuti penelitian dijadikan sebagai subjek penelitian, dan menandatangani persetujuan secara tertulis berupa penandatanganan lembar *informed consent*. Selanjutnya dilakukan dokumentasi menggunakan kamera.

4.7.2 Pengambilan jaringan keloid dengan bedah eksisi shave

Bedah eksisi shave pada jaringan keloid setelah dilakukan KIE, *informed consent*, *assessment* pra-operasi termasuk riwayat alergi terhadap obat bius dan gangguan perdarahan. Prosedur operasi dilakukan dengan tahap desinfeksi area operasi kemudian meletakkan duk lubang yang steril. Dilakukan injeksi bius lokal pehacain, selanjutnya dilakukan eksisi shave pada daerah dasar lesi keloid dengan menggunakan pisau ukuran 15 dari satu tepi yang satu ke tepi yang lain se bisa mungkin tidak melukai area kulit yang sehat sampai semua jaringan fibrous terangkat. Kemudian luka eksisi diberikan salep gentamicin selanjutnya luka ditutup dengan *dressing* beberapa lapis kasa, penyembuhan luka secara sekunder.

Jaringan keloid yang dari hasil eksisi langsung dimasukan kedalam tabung sentrifuge 50 ml berisi media DMEM, penstrep 1% dan amfoterisin F.

Pada pasien diberikan cefadroxil tablet 2x500 mg, asam mefenamat tablet 3x500 mg serta salep gentamicin 2xsehari selama 1 minggu. Setelah hari ke 7 pasien akan dilakukan injeksi kortikosteroid intralesi dan secara rutin setiap 1-2 minggu sekali serta *silicone sheet* sampai sisa jaringan keloid tipis dan hampir rata dengan sekitarnya. Terapi keloid berdasarkan Panduan Praktik Klinis PERDOSKI 2017 (PERDOSKI, 2017).

4.7.3 Isolasi dan kultur fibroblas keloid metode *skin explant*

Jaringan keloid yang dari hasil eksisi *shave* yang dimasukan kedalam tabung sentrifuge 50 ml berisi media DMEM, penstrep 1% dan amfoterisin F dicuci dengan cara menggoyangkan tabung secara perlahan, pencucian dilakukan minimal 3 kali masing-masing selama 10 menit. Sampel diambil dari bagian sentral jaringan keloid, kemudian sampel diletakkan dalam cawan *petridisk* dan dibuang bagian epidermis dengan menggunakan gunting dan skapel steril, sehingga jaringan fibrosa saja yang diambil lalu cuci kembali dengan PBS steril. Sampel diletakkan dalam *lid of a 100 mm tissue culture dish* lalu potong kecil-kecil sebesar 2-3 mm². Potongan sampel 5-10 diletakkan pada 35 mm tissue *culture dish* yang ditutup dengan 22 mm *glass coverslip*. Beberapa tetes media kultur DMEM 4°C ditambahkan dibawah *cover glass*, tetaskan perlahan dari bagian tepi, lalu tambahkan kembali 1-2 ml DMEM perlahan tanpa terendam. Kultur diletakkan dalam inkubator dengan kelembapan suhu 37 °C dan tekanan CO₂ 5% atmosfir.

Dalam 24 – 74 jam setelah isolasi sel fibroblas akan menjadi sel fibroblas utuh dengan morfologi berbentuk spindel dan tumbuh pada tepi *explant*. Pengecekan pertumbuhan fibroblas setiap 3-4 hari dan ganti medium. Jika pertumbuhan

fibroblas sudah merata sampai dasar *dish* kurang lebih 80-90% dapat dilakukan panen (subkultur) (Kim et al., 2015; Kurniawati dkk., 2015).

4.7.4 Subkultur fibroblas keloid

Panen sel atau subkultur dilakukan dengan menyedot semua medium pada *petridesk*, cuci *dish* dengan PBS steril, tambahkan tripsin 0,25 % dimasukkan

sebanyak 1 ml kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C selama 3-5 menit akan terjadi perubahan bentuk sel dari bentuk kumparan menjadi bentuk bulat.

Selanjutnya, masukkan medium lengkap sebanyak 3 ml, dan dilakukan *pipetting* sampai sampai semua sel lepas dari dasar *dish* dan membentuk suspensi sel.

Suspensi sel diisap lalu dipindahkan kedalam tabung setrifuge steril untuk dilakukan sentrifugasi 150 G selama 10 menit, setelah itu supernatan dibuang.

Pellet dari tabung diambil dan ditambahkan 100-200 µl medium kultur *fresh* 4°C, lalu campurkan 10-20 µl suspensi sel dengan jumlah yang sama 0,4% trypan

blue/PBS dalam tabung sentrifuge 50 ml. Hitung sel menggunakan hemositometer, untuk dilakukan subkultur maka sel yang hidup harus lebih dari 90%. Setelah

dilakukan penghitungan sel, masukkan sejumlah sel yang hidup ke dalam 5 ml medium dalam 25cm² *tissue culture flask*. Medium diganti setiap 3-4 hari sampai

pertumbuhan sel 60-80% untuk dapat dilakukan subkultur lagi dan digunakan setelah *splitting / passage* 3 kali (Keira et al., 2014; Kurniawati dkk., 2015).

4.7.5 Ekstraksi ciplukan (*Physalis angulata*)

Bubuk kering (simplisia) ciplukan (*Physalis angulata*) diperoleh dari bali tanaman obat Laboratorium Farmakologi FK Unibraw. Bubuk kering (simplisia) 100 gram dibungkus dengan kertas saring, kemudian dimasukkan corong ekstraksi

dan direndam sehari semalam dengan etanol absolut. Larutan dari hasil rendaman kemudian dikumpulkan dan diendapkan serta dimasukkan ke dalam sokhlet 250 ml, di bagian bawah sokhlet dipasang labu pelarut yang telah diisi beberapa butir porselen sebagai isolator panas. Setelah pendingin dipasang, air dialirkan ke pendingin tersebut melalui kran lalu *water bath* dinyalakan agar labu menjadi panas. Saat etanol mendidih akan terjadi kondensasi uap etanol ke dalam pendingin. Tetesan etanol akan memenuhi sokhlet sehingga mencapai ketinggian tertentu kemudian destilat etanol akan turun ke dalam labu. Jika cairan dalam sokhlet ini sudah jernih, proses ekstraksi dihentikan. Setelah dingin, destilat etanol dimasukkan ke dalam *rotary evaporator vacuum* dan dilakukan penguapan hingga pelarut etanol terpisah dari minyak ciplukan. Setelah diuapkan, minyak ciplukan murni dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut etanol yang mungkin masih tertinggal di dalam minyak ciplukan (Lestari *et al.*, 2016; Tarannita *et al.*, 2010). Dari ekstraksi simplisia ciplukan sebanyak 100 gr akan diperoleh hasil 5 – 7 gr pasta pekat berwarna hijau tua kehitaman.

4.7.6 Uji viabilitas dan sitotoksik dengan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay)

Pengujian viabilitas fibroblas keloid terhadap ekstrak ciplukan sesuai standar protokol MTT assay. Setelah subkultur ke 3, pada setiap sumur dimasukkan 80 µl media yang berisi fibroblas dengan kepadatan 10.000 sel / sumur, kemudian dimasukkan ekstrak ethanol ciplukan dengan dosis 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml dan 40 µg/ml pada masing-masing 4 sumur dan pada 4 sumur lainnya sebagai kontrol negatif. Kemudian lempeng sumur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36,8° C. Setelah itu, pada setiap sumur dimasukkan 15

μl MTT yang telah dilarutkan dalam PBS, diinkubasi kembali selama 1,5 jam dan suhu 36,8° C. Selanjutnya media diambil dari setiap sumur, dan pada setiap sumur ditambahkan 100 μl DMSO dan dipipet naik turun. Setelah terjadi reduksi menjadi purple formazan oleh NADH dilakukan pembacaan dengan spektofotometer dengan panjang gelombang 560 nm. Kemudian dilakukan analisis data *Lethal Concentration* 50 (LC₅₀) dengan menggunakan program software EPA probit. Nilai LC₅₀ digunakan untuk menyesuaikan dan menentukan dosis yang akan diberikan yang tidak bersifat sitotoksik kepada sel fibroblas keloid.

4.7.7 Pemberian ekstrak ciplukan pada kultur fibroblas keloid

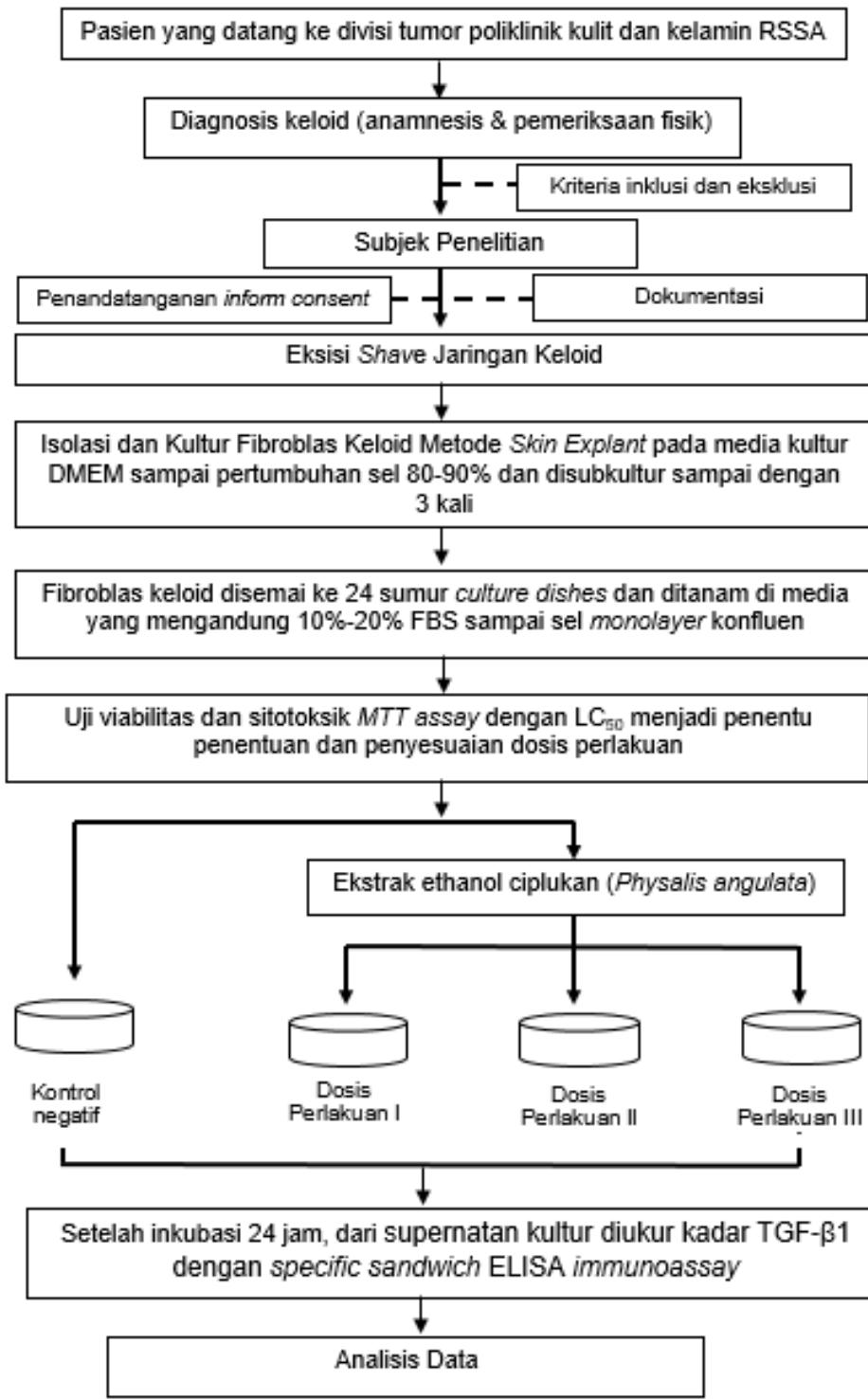
Untuk menentukan efek ekstrak ciplukan (*Physalis angulata*) pada keloid fibroblas, sel keloid fibroblas disemaikan ke dalam 24 sumur *culture dishes* dan ditanam di media yang mengandung 10-20% FBS ke dalam sel *monolayer* yang hampir konfluen. Ketika sudah konfluen, *monolayer* diambil dengan menggunakan tip mikropipet 200 L, dicuci dua kali dengan PBS, dan diinkubasi dengan berbagai konsentrasi ekstrak PA dalam media FBS 1% dengan atau tanpa VEGF (20 ng / mL) selama 24 jam (Hseu *et al*, 2011). Sel kontrol ditumbuhkan di DMEM/10% FBS tanpa tambahan ekstrak ciplukan.

4.7.8 Pengukuran sitokin TGF-β1

Pengukuran sitokin TGF-β1 dilakukan yaitu dengan mengambil supernatan kultur sebanyak 100μl diambil dan diukur dengan *Human TGF-β1 ELISA sandwich immunoassay*. Pada setiap well dimasukkan 100 μl standar protein solusio dan supernatan, tutup well dan inkubasi selama 2,5 jam pada suhu ruangan. Kemudian

cairan dibuang dan dicuci 4 kali dengan *wash solution*, dicuci dengan 300 μl *wash buffer/well* dengan pipet. Setelah dicuci, buang *wash buffer* dengan mengaspirasi, balik *plate* dan keringkan. Selanjutnya *biotinylated antibody* 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ditambahkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Ulangi proses pencucian. Kemudian streptavidin 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ditambahkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 45 menit. Cairan dibuang dan ulangi kembali proses pencucian. Selanjutnya Reagen *TMB One-Step Substrate* 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ ditambahkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit pada kondisi gelap. Terakhir, ditambahkan 100 μl *stop solution per well*. Selanjutnya dibaca pada λ 450 nm dengan ELISA reader. Pada semua kelompok dilakukan pengukuran. Data yang didapat kemudian disajikan dalam bentuk tabel.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian Pemberian Ekstrak Ethanolk Ciplukan (*Physalis angulata*) pada Kultur Fibroblas Keloid

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah data yang bersifat kuantitatif yaitu kadar TGF- β 1 dari supernatan subkultur sel fibroblas keloid setelah *splitting* / passage 3 kali dan diinkubasi pada media FBS 1% selama 24 jam tanpa diberi perlakuan dan setelah diberi perlakuan 3 macam konsentrasi ciplukan (*Physalis angulata*). Data kuantitatif diolah kemudian dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk*. Apabila data terdistribusi normal akan dilanjutkan dengan one way ANOVA untuk menganalisa perbedaan diantara keempat grup. Apabila distribusi data tidak normal menggunakan uji Kruskal-Wallis. Dalam penelitian ini, besar kepercayaan yang akan dipakai adalah 0,95 untuk tingkat signifikansi (α) = 0,05.



BAB 5 **HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

5.1 Hasil Penelitian

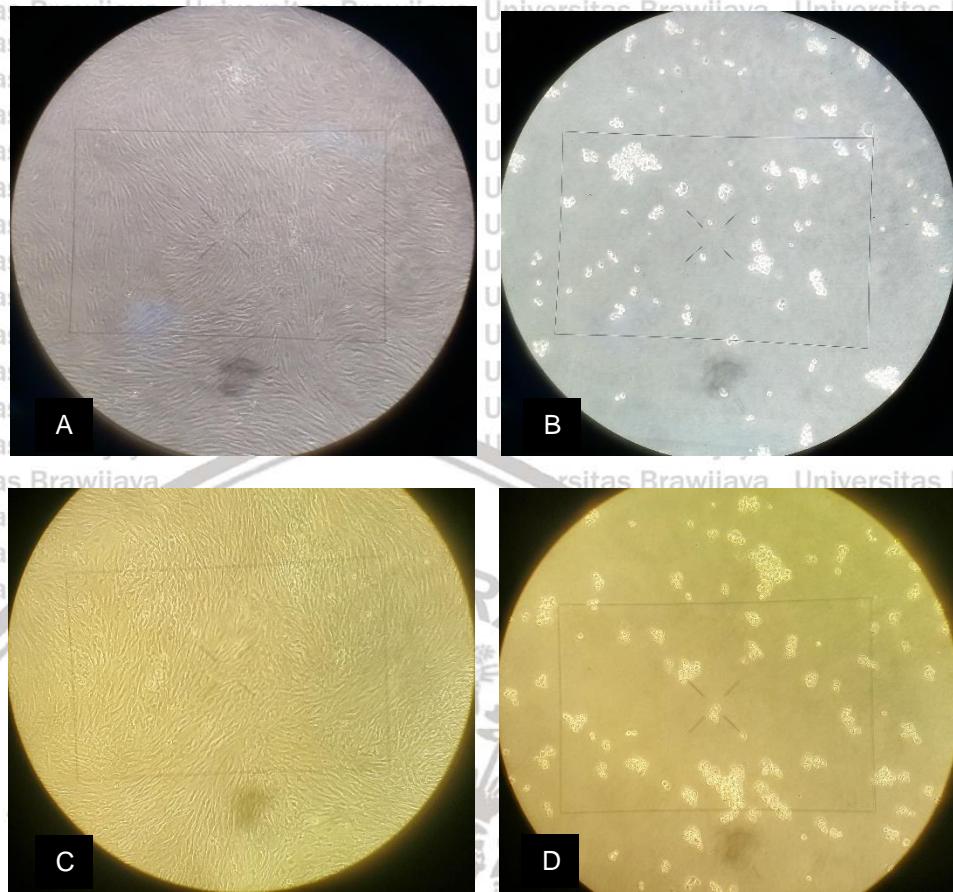
Kultur fibroblas keloid pada penelitian ini didapatkan dari lesi keloid seorang laki-laki berusia 23 tahun. Jaringan keloid yang diambil berasal dari area di lengan kanan atas. Keloid yang muncul terjadi secara spontan.



Gambar 5.1. Lesi Keloid. Lesi keloid pada area lengan kanan atas

5.1.1 Kultur fibroblas keloid

Kultur fibroblas keloid dilakukan dengan metode *skin explant*. Subkultur dilakukan saat fibroblas sudah merata sampai dasar dish lebih kurang 80%. Subkultur dilakukan sebanyak 3 kali dimana dari hasil kultur didapatkan sel dengan morfologi spindel, aderen dan tumbuh dari tepi *explant*.



Gambar 5.2. Morfologi Fibroblas Keloid *In Vitro*. **A-B.** Fibroblas keloid *in vitro* pada subkultur kedua. **C-D.** Fibroblas keloid *in vitro* pada subkultur ketiga.

5.1.2 Pengaruh ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap keloid fibroblas *in vitro* dengan uji viabilitas dan sitotoksik dengan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Pengujian viabilitas fibroblas keloid terhadap ekstrak ciplukan sesuai standar protokol untuk MTT assay. Pada setiap sumur dimasukkan 80 μ l media yang berisi sel dengan kepadatan 10.000 sel / sumur, kemudian dimasukkan ekstrak ethanol ciplukan dengan dosis 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml dan 40 μ g/ml pada masing-masing 4 sumur dan pada 4 sumur lainnya sebagai kontrol negatif. Kemudian lempeng sumur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36,8° C.

Setelah itu, pada setiap sumur dimasukkan 20 μl MTT yang telah dilarutkan dalam PBS, diinkubasi kembali selama 1,5 jam dan suhu 36,8°C. Selanjutnya media diambil dari setiap sumur, dan pada setiap sumur ditambahkan 200 μl DMSO dan dipipet naik turun.



Gambar 5.3. Uji Viabilitas dan Sitosoksik MTT Assay

Reduksi menjadi *purple formazan* oleh NADH menunjukkan determinasi fungsi mitokondria dan pembacaan pada spektfotometer dengan panjang gelombang 450 nm menunjukkan jumlah sel yang viabel yaitu pada kontrol negatif dan dosis ekstrak ethanol ciplukan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hasil MTT assay didapatkan hasil LC₅₀ yaitu LC₅₀ = 3,541 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sehingga ditentukan dosis perlakuan ekstrak ethanol ciplukan pada penelitian ini menjadi 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.1.3 Efek ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) pada kadar TGF- β 1 dari supernatan kultur fibroblas keloid dengan metode ELISA Sandwich

Inkubasi masing-masing dosis ekstrak ethanol ciplukan dan kontrol negatif pada 3 sumur kultur keloid fibroblas selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 36,8°C. Pengukuran kadar TGF- β 1 pada supernatan kultur fibroblas keloid setelah 24 jam inkubasi dimana pada masing-masing sumur diambil 2 sampel supernatan

untuk diukur kadar TGF- β 1. Selanjutnya diperoleh 6 hasil TGF- β 1 untuk setiap dosis ekstrak ethanol ciplukan.



Gambar 5.4. Supernatan Kultur Fibroblas Keloid yang Akan Diukur Kadar TGF- β 1 dengan ELISA Sandwich

Pengukuran kadar *Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)* pada sel kultur fibroblas keloid pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan metode ELISA Sandwich dilakukan berdasarkan *optical density* (absorben) dan dengan menggunakan *Cuve Expert 1.4* sehingga dapat menentukan kadar konsentrasi TGF- β 1. Tabel hasil pengukuran *optical density* (absorben) dan kadar konsentrasi TGF- β 1 yang dihasilkan setiap sumur adalah sebagai berikut.

**Tabel 5.1.** Optical Density dan Kadar Konsentrasi TGF-B1

Sampel	Optical Density	Konsentrasi (ng/l)
Kontrol	0,334	122,856
Dosis 0,25 µg/ml	0,333	122,174
	0,338	125,589
	0,339	126,273
	0,343	129,008
	0,330	120,126
	0,327	118,079
	0,351	134,486
	0,333	122,174
	0,391	162,012
	0,435	192,558
	0,409	174,474
Dosis 0,5 µg/ml	0,336	124,223
	0,375	150,974
	0,355	137,229
	0,314	109,226
	0,332	121,491
	0,353	135,857
Dosis 1 µg/ml	0,337	124,906
	0,384	157,179
	0,347	131,746
	0,425	185,591
	0,395	164,777
	0,396	165,469

5.2 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif yang kemudian diolah dan

dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk*. Apabila data terdistribusi normal akan

dilanjutkan dengan *one way ANOVA* untuk menganalisa perbedaan diantara

keempat grup. Apabila distribusi data tidak normal menggunakan uji *Kruskal-*

Wallis. Homogenitas ragam data diuji dengan Uji Levene. Besar kepercayaan yang akan dipakai adalah 0,95 untuk tingkat signifikansi (α) = 0,05.

5.2.1 Uji normalitas data

Uji normalitas data dilakukan dengan uji *Shapiro Wilk*, dimana apabila nilai signifikansi $>0,05$ maka sebaran data normal. Data kadar TGF- $\beta 1$ mempunyai nilai signifikansi 0,006 ($<0,05$), dan disimpulkan sebaran data tidak normal sehingga dilakukan uji beda dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil uji normalitas disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil Uji Normalitas Data Kadar TGF- $\beta 1$

Variabel	Shapiro Wilk	Nilai p
Kadar TGF- $\beta 1$ (ng/ml)	0,875	0,006*

* $p<0,05$: data tidak berdistribusi normal berdasar uji *Shapiro Wilk*

5.2.2 Uji homogenitas ragam

Uji homogenitas dilakukan dengan uji *Levene* dimana apabila nilai signifikansi $>0,05$ maka ragam data antara kelompok homogen. Data kadar TGF- $\beta 1$ mempunyai nilai signifikansi 0,002 ($<0,05$), dan disimpulkan bahwa data antar kelompok tidak memiliki ragam yang homogen. Hasil uji homogenitas ragam disajikan pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Hasil Uji Homogenitas Ragam Data Kadar TGF- $\beta 1$

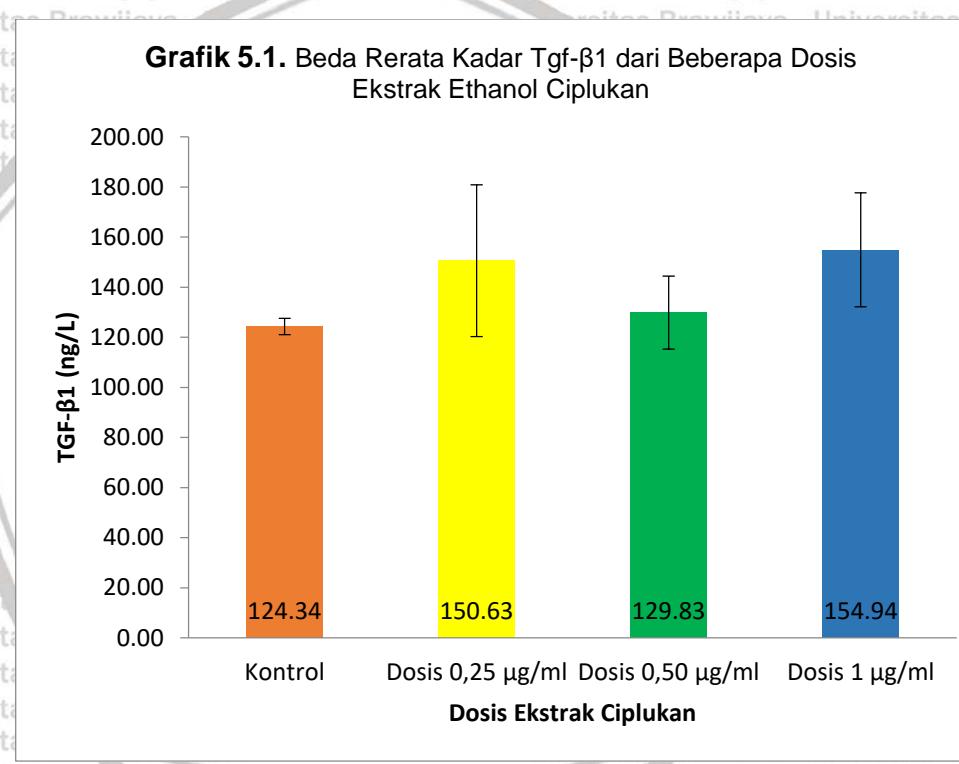
Levene Statistics	Nilai p
7,167	0,002*

* $p<0,05$: data tidak memiliki ragam yang homogen berdasar uji *Levene*

5.2.3 Nilai rerata dan median

Rerata kadar TGF- $\beta 1$ dari sampel kelompok fibroblas kontrol (tanpa perlakuan) adalah $124,34 \pm 3,22$ ng/ml dengan median $124,22 \pm 3,76$ ng/ml,

sedangkan rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas dengan tambahan ekstrak ciplukan (*Physalis angulata*) dosis 0,25 $\mu\text{g/ml}$ adalah $150,63 \pm 30,29 \text{ ng/ml}$ dengan median $148,25 \pm 46,11 \text{ ng/ml}$, rerata dosis 0,5 $\mu\text{g/ml}$ adalah $129,83 \pm 14,59 \text{ ng/ml}$ dengan median $130,04 \pm 14,71 \text{ ng/ml}$, dan rerata dosis 1 $\mu\text{g/ml}$ adalah $154,94 \pm 22,77 \text{ ng/ml}$ dengan median $160,98 \pm 27,19 \text{ ng/ml}$. Beda rerata kadar TGF- β 1 dari masing-masing dosis ekstrak ethanol ciplukan disajikan pada Grafik 5.1.



5.2.4 Uji Kruskal-Wallis

Hasil uji normalitas data tidak memenuhi asumsi normalitas, terdapat 4 kelompok dan variabel bebas pada penelitian ini bersifat tidak berpasangan sehingga uji hipotesis komparatif yang digunakan adalah uji non parametrik

Kruskal-Wallis.

Berdasarkan uji Kruskal-Wallis didapatkan bahwa rerata kadar kadar TGF- β 1 antar 4 kelompok tidak berbeda bermakna secara statistik, ditunjukkan dengan nilai signifikansi $0,100 > 0,05$. Hasil uji Kruskal Wallis disajikan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil Uji Kruskal Wallis Kadar TGF- β 1 Berdasarkan Kelompok Perlakuan

Sampel	Kadar TGF-β1 (ng/ml)			Nilai p
	Rerata ± SD	Median ± IQR		
Kontrol	124,34 ±3,22	124,22 ±3,76		
Dosis 0,25 μ g/ml	150,63 ±30,29	148,25 ±46,11		0,100*
Dosis 0,50 μ g/ml	129,83 ±14,59	130,04 ±14,71		
Dosis 1 μ g/ml	154,94 ±22,77	160,98 ±27,19		

* $p>0,05$: data tidak bermakna secara statistik berdasar uji Kruskal-Wallis

BAB 6

PEMBAHASAN

Upaya pemahaman mengenai patofisiologi yang tepat dan abnormalitas molekular pada keloid yang merupakan produk akhir penyimpangan penyembuhan luka telah banyak dilakukan, namun sampai dengan sekarang patogenesisnya pasti masih belum dapat ditentukan (Mari, 2016; Shaheen, 2017).

Patogenesis keloid dapat terjadi karena durasi inflamasi yang lebih lama dan peningkatan produksi beberapa faktor seperti TGF- β 1 yang menyebabkan peningkatan proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen (Kurniawati *et al.*, 2016).

Kerumitan tambahan dari jalur pensinyalan TGF- β 1 adalah kemampuan untuk bersinggungan atau berhubungan dengan kaskade pensinyalan lainnya (Javelaud dan Mauviel, 2005). Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek antiproliferasi dari berbagai dosis ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap fibroblas keloid *in vitro* dengan pengukuran kadar TGF- β 1 dengan metode ELISA Sandwich dimana sebelumnya belum pernah dilakukan penelitian yang serupa.

6.1 Inflamasi Kronis dan Peranan Nitrit Oksida Pada Keloid

Lapisan retikular pada keloid dan eksar希pertrifik mengandung sel inflamasi, peningkatan jumlah fibroblas, neovaskularisasi, dan deposit kolagen. Berbagai faktor lokal meningkatkan dan atau memperpanjang inflamasi pada

dermis retikular selama penyembuhan luka, dipengaruhi kekuatan mekanik lokal dan faktor lain (Ogawa, 2017). Gen proinflamasi pada pasien keloid sensitif terhadap trauma, yaitu lebih siap diregulasi karena cedera pada dermis dan lebih cenderung mempertahankan peningkatan regulasi tersebut (Dong *et al.*, 2013).

Peningkatan faktor proinflamasi pada keloid juga menunjukkan, alih-alih menjadi tumor kulit, keloid adalah gangguan inflamasi kulit, khususnya pada dermis retikular (Ogawa, 2017). Nitrit oksida (NO) berperan penting dalam tahap inflamasi penyembuhan luka. NO eksogen meningkatkan ekspresi kolagen dan meningkatkan level seluler cGMP dimana jalur NO / Cgmp secara positif mempengaruhi perkembangan pembentukan keloid melalui ekspresi TGF- β 1 dalam fibroblas keloid. Peningkatan kadar cGMP menginduksi produksi TGF- β 1 autokrin pada fibroblas keloid (Hsu *et al.*, 2007). Paparan NO eksogen pada fibroblas keloid menunjukkan sintesis kolagen diaktivasi oleh NO dan peningkatan ekspresi kolagen tipe I tergantung dosis pada fibroblas keloid. Ekspresi iNOS dan produksi NO juga meningkat pada jaringan keloid (Hsu *et al.*, 2006).

6.2 TGF- β 1 Sebagai Sitokin Pleiotropik dan *Signalling Pathway* Pada Keloid

Transforming growth factor (TGF- β 1) melalui reseptor serin / treonin kinase merupakan sitokin pleiotropik yang mengatur berbagai proses seluler seperti pertumbuhan, migrasi, adhesi sel, dan respons imun dimana TGF- β 1 termasuk jalur pensinyalan yang mendasari progresivitas keloid beserta *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), dan integrin (Shi dan Massagué, 2003; Javelaud dan Mauviel, 2005; Yan *et al.*, 2009).

Mekanisme TGF- β 1/Smad dikelompokkan menjadi tiga jalur pensinyalan yang berbeda namun saling terkait yaitu jalur pensinyalan non-Smad yang secara langsung memodifikasi fungsi Smad, protein non-Smad yang fungsinya secara langsung dimodulasi oleh Smad dan yang mentransmisikan sinyal ke jalur lain;

dan protein non-Smad yang secara langsung berinteraksi dengan atau menjadi terfosforilasi oleh reseptor TGF- β 1 dan tidak serta merta mempengaruhi fungsi Smads (Moustakas dan Heldin, 2005). Werner *et al.*, (2000) melaporkan bahwa Smad3 adalah efektor penting yang bertanggung jawab atas penghambatan aktivasi gen makrofag termasuk iNOS oleh TGF- β 1, dan persaingan untuk koaktivator esensial seperti p300 mungkin merupakan penentu penting dalam mengatur tingkat aktivasi makrofag dan penghambatan oleh TGF- β 1. TGF- β 1 juga dapat mengaktifkan pensinyalan MAPK melalui PI3K, PP2A, Par6, Rho GTPases independen dari pensinyalan Smad, serta Smad7 dapat bertindak sebagai protein peranakan. Plastisitas pensinyalan TGF- β 1 ini memungkinkan pensinyalan dengan pengaruh pleiotropik (Yan *et al.*, 2009).

6.3 Morfologi Fibroblas Keloid

Penelitian Kim *et al.*, (2015) menunjukkan morfologi fibroblas pada kultur fibroblas keloid berupa bentukan spindel dan berukuran besar, menempati lebih banyak ruang dan membentuk matriks ekstraselular yang melimpah. Fibroblas keloid yang digunakan pada penelitian ini berasal dari jaringan keloid dari 1 orang pasien keloid dan kemudian dilakukan eksisi shave. Sampel selanjutnya diproses di media sementara dan diinkubasi di media komplit, setelah beberapa hari didapatkan pertumbuhan sel dengan karakter spindel, aderen dan tumbuh dari tepi yang diidentifikasi sebagai fibroblas.

6.4 Uji Viabilitas dan Sitotoksik dengan 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2-

Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Assay Ekstrak Ethanol Ciplukan

(*Physalis Angulata*) Terhadap Keloid Fibroblas *In Vitro*

Agen fisik seperti ekstrak ciplukan (*Physalis angulata*) dapat menyebabkan toksisitas pada sel dengan mekanisme destruksi membran sel, ikatan ireversibel dengan reseptor, mencegah sintesis protein, menghambat elongasi polideoksinucleotida dan reaksi enzimatik (Riss, 2017).

Pada penelitian ini MTT assay menggunakan kelipatan 2 dari dosis terendah penelitian terdahulu yaitu 5 µg/ml, 10 µg/ml dan 15 µg/ml dan dosis dibawahnya sehingga dosis perlakuan pada MTT assay adalah 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml dan 40 µg/ml. Kemudian berdasarkan hasil MTT assay didapatkan hanya grup kontrol dan dosis 1 µg/ml yang menunjukkan sel yang viabel. Berdasarkan hasil LC₅₀ sebesar 3.541 µg/ml sehingga dilakukan penyesuaian dosis perlakuan ekstrak ethanol ciplukan pada penelitian ini menjadi 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml dan 1 µg/ml.

Pada suatu uji toksisitas oleh Sari (2010) serial dosis yang digunakan dapat merupakan kelipatan tetap dari dosis terendah dosis penelitian terdahulunya. Sehingga peneliti menggunakan kelipatan dosis 2 kali dari dosis terendah penelitian terdahulu dan ditambahkan dosis dibawahnya menjadi 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml dan 40 µg/ml. Dari uji sitotoksitas dapat diperoleh LC₅₀ yang merupakan parameter ketoksikan sehingga dapat diketahui kisaran kadar yang ber efek toksik terhadap suatu sel yang memerlukan pengurangan dosis dimana dosis yang diujikan dibawah kadar LC₅₀ agar sel dapat diamati pertumbuhan dan morfologinya karena sel tidak terlalu banyak yang mati (Zhang et al., 2007; Rahma

dona et al., 2014). Oleh karena itu pada penyesuaian dosis peneliti menggunakan dosis viabel yang sudah diuji dan dibagi 2 yaitu 0.25 µg/ml, 0.5 µg/ml dan 1 µg/ml.

6.5 Bioaktivitas, Senyawa Aktif Sekunder dan Ekstraksi Ciplukan (Physalis angulata)

Ekstrak atau infus dari ciplukan (*Physalis angulata*) telah digunakan untuk pengobatan berbagai kondisi patologis antara lain antiinflamasi dan imunomodulator,

sitotoksik, menghambat aktivitas makrofag, antifibrosis, dan lain lain (Sutrisna,

2012; Soares et al., 2003). Beberapa senyawa aktif dari ciplukan telah diisolasi dimana didapatkan sekelompok secosteroid dan pseudosteroid, yang dikenal sebagai physalins, withanolide, dan withagulatin serta senyawa dengan kemampuan antioksidan yang tinggi terutama phenol, asam gallik, flavonoid, asam phenol dan quercitrin (Puente et al., 2011, Medina-Medrano et al., 2015).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak seluruh bagian

tanaman ciplukan, sehingga digunakan pelarut ethanol yang bersifat polar pada proses ekstraksi. Agar mendapatkan senyawa aktif sekunder campuran seperti

flavonoid, physalin dan withagulin dari seluruh bagian tanaman ciplukan dilakukan proses ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut ethanol 96%. Meskipun menggunakan ethanol, efek antiproliferasi, antiinflamasi dan imunomodulator

ekstrak ciplukan terhadap fibroblas keloid bukan disebabkan pelarut, karena dalam proses pembuatannya ethanol telah dievaporasi pada suhu 80°C sedangkan titik

didih ethanol adalah 78°C. Melalui metode tersebut dapat diasumsikan bahwa seluruh pelarut ethanol sudah menguap. Hasil ekstrak yang didapatkan dari proses

ekstraksi dan evaporasi berupa pasta pekat berwarna hijau tua kehitaman.

Metode ekstraksi yang berbeda banyak digunakan untuk mendapatkan ekstrak kasar dari bahan tanaman. Namun, tidak ada protokol ekstraksi universal karena setiap tanaman atau metabolit memerlukan kondisi ekstraksi spesifik untuk pemulihannya yang optimal, terutama yang bertanggung jawab untuk aktivitas biologis. Efek dari proses ekstraksi sangat penting untuk mempertahankan dan bahkan meningkatkan efek fisiologis (Cardona *et al.*, 2017). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi biomolekul dari tanaman dipilih berdasarkan polaritas zat terlarut. Suatu pelarut dengan polaritas yang mirip dengan zat terlarut akan dengan baik melarutkan zat terlarut (Altemimi *et al.*, 2017). Ciplukan (*Physalis angulata*) mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula, dan flavonoid merupakan senyawa polar yang umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetil-sulfoksida, dimetilformamida, serta air (Markham, 1988). Penelitian oleh Cardona *et al.*, (2017) menunjukkan polaritas ethanol 70% adalah yang paling mirip dengan senyawa aktif fenol yang terkandung pada calyx dari ciplukan. Senyawa aktif withagulin yang diekstraksi dengan ethanol 70% menunjukkan kemampuan anti proliferatif terhadap fibrosis liver (Liu *et al.*, 2010).

Suatu tanaman menghasilkan beragam senyawa aktif sekunder dengan sifat biologis dan farmakologis serta spektrum bioaktivitas yang luas dimana bioaktivitasnya dapat disebabkan oleh bagian tanaman mengandung senyawa aktif sekunder dan interaksi sinergisnya. Senyawa aktif sekunder dapat bekerja pada target utama sel atau pada beberapa target molekul, dimana mekanisme utamanya diperankan oleh senyawa utama (Wink, 2015) Kandungan senyawa fitokimia pada tanaman tergantung pada pelarut ekstraksi, waktu panen,

tempat tumbuh, bagian tanaman dan proses pengeringannya (Iswahyudi dkk., 2015).

Studi oleh Iswahyudi dkk., (2015) menunjukkan bahwa sampel pengeringan ciplukan memiliki kandungan alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, steroid/terpenoid dan tanin. Withangulin sebagai bagian dari withanolide merupakan grup steroid yang diisolasi dari ciplukan dimana pada studi menunjukkan aktivitas anti proliferasi terhadap suatu fibrosis liver (Liu et al., 2010).

Ekstraksi metabolit sekunder memerlukan proses yang lebih kompleks yaitu dengan teknik kromatografi antara lain dengan lapis tipis kromatografi, Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) dan Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) dimana metabolit campuran yang kompleks akan lebih mudah dipisahkan (Bertoli et al., 2011; Dewi et al., 2017).

Pada penelitian fitofarmaka dapat terjadi suatu perbedaan konsentrasi menimbulkan efek yang berbeda. Timoteo et al., (2019) menunjukkan efek nanopartikel perak (AgNPs) pada kultur *in vitro* *P.peruviana*, pada konsentrasi rendah dapat meningkatkan biomassa benih sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi menyebabkan pengurangan ukuran benih dan sistem akar. Studi Shu et al., (2015) menunjukkan bahwa fraksi EtOH 50% dari fraksinasi resin makropor AB-8 dari ekstrak EtOH 70% dari *P. Alkekengi* (50-EFP) dimana physalin dan flavonoid mungkin memiliki aktivitas antibakteri dan / atau anti-inflamasi baik pada *in vivo* dan *in vitro*.

Eukariota serine/threonine-specific protein kinases dihambat oleh berbagai metabolit sekunder bioaktif yang dihasilkan dari tanaman termasuk flavonoid seperti quercetin dan genistein, kumarin, xanthones, antrakuinon, tanin, triterpenoid asam, alkaloida isoquinoline, dan stilbene piceatannol turunan

senyawa fenolik (Akiyama et al., 1987; Geahlen and McLaughlin, 1989; Wang et al., 1997). Penelitian Wang et al., (1997) menunjukkan minimnya atau tidak adanya kandungan fenol menurunkan kemampuan inhibisi dimana kemampuannya tergantung sifat alami, jumlah dan disposisi dari hidroksi-fenol. Senyawa aktif yang terkandung di dalam ciplukan antara lain flavonoid dan fenol yang menginhibisi serine/threonine-specific protein kinases sehingga tidak ada ikatan dengan reseptor dan kadar TGF- β 1 intrasel lebih rendah daripada yang diekstrasi ataupun dimedia.

6.6 Rerata dan Median Kadar TGF- β 1 Fibroblas Keloid

Rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas kontrol (tanpa perlakuan) adalah $124,34 \pm 3,22$ ng/ml dengan median $124,22 \pm 3,76$ ng/ml, sedangkan rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas dengan tambahan ekstrak ciplukan (*Physalis angulata*) dosis $0,25$ μ g/ml adalah $150,63 \pm 30,29$ ng/ml dengan median $148,25 \pm 46,11$ ng/ml, rerata dosis $0,5$ μ g/ml adalah $129,83 \pm 14,59$ ng/ml dengan median $130,04 \pm 14,71$ ng/ml, dan rerata dosis 1 μ g/ml adalah $154,94 \pm 22,77$ ng/ml dengan median $160,98 \pm 27,19$ ng/ml.

Didapatkan data rerata yang tidak linier walaupun semua rerata dari kelompok perlakuan semuanya berada di atas kontrol. Hal tersebut diperkirakan dari respon ekspresi TGF- β 1 yang distimulasi oleh ciplukan sesuai dosis yang diberikan, walaupun dosis dan ekspresi tidak teratur. Studi oleh Lutz., (1990) menunjukkan beberapa hal diperkirakan mempengaruhi hubungan dosis dengan efek suatu terapi pada karsinogenesis dapat dipengaruhi dosis, tingkat penambahan DNA, induksi perubahan genetik, dan insiden. Pada populasi yang homogen, non linieritas dapat disebabkan fenomena induksi atau saturasi aktivitas

enzimatik terutama pada dosis yang lebih tinggi dan sifat karsinogenesis. Selain itu kurva yang sangat non linier yang terlihat pada penelitian pada hewan dapat disebabkan oleh heterogenitas populasi, jika sensitivitas individu terhadap pajanan karsinogen diatur oleh sejumlah besar faktor genetik dan gaya hidup. Berdasarkan uji komparasi, dapat diketahui bahwa kadar TGF- β 1 berbagai dosis menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,100 ($p>0,005$) sehingga kadar TGF- β 1 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Pada penelitian ini dosis yang diperkirakan dapat memberikan efek anti proliferasi terhadap fibroblas melalui penurunan kadar TGF- β 1 ternyata meningkatkan kadar sitokin tersebut, dimana diperkirakan pada konsentrasi 0,25 μ g/ml, 0,5 μ g/ml dan 1 μ g/ml terjadi efek imunomodulator dan antiinflamasi yang ditandai dengan peningkatan kadar TGF- β 1. Dosis yang digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu kemampuan antiproliferasi ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap fibrosis liver dan hasil uji viabilitas dan sitotoksitas dengan MTT assay.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Bastos *et al.*, (2008) yaitu ekstrak aquos lipofilik akar ciplukan (*Physalis angulata*) meningkatkan kadar TGF- β 1 dimana hasil tersebut menunjukkan efek anti inflamasi dan imunomodulator dengan mempengaruhi produksi dari PGE2 dan meningkatkan kadar TGF- β 1 yang akan menghambat iNOS dan mereduksi kadar nitrit yang diproduksi dari makrofag yang teraktivasi. Penelitian Vodovotz *et al.*, (1993) pada makrofag peritoneal tikus yang teraktivasi dan diberikan terapi dengan TGF- β 1 didapatkan penurunan stabilitas dan translasi iNOS mRNA serta degradasi protein iNOS. Matsuno *et al.*, (2001) juga menunjukkan bahwa TGF- β 1 mensupresi produksi NO dengan *up stream* transkripsi mRNA iNOS. Sehingga disimpulkan kemampuan imunomodulator dari TGF- β 1 dengan mensupresi produksi NO oleh makrofag.

6.7 Asumsi dan Keterbatasan Pada Penelitian

Hasil dari berbagai penelitian tersebut dapat mendukung adanya asumsi bahwa ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) memberikan efek antiinflamasi dan imunomodulator terhadap fibroblas keloid. Perbedaan konsentrasi pada penelitian fitofarmaka juga dapat menimbulkan efek yang berbeda. Selain itu ekstrak ethanol ciplukan juga menghambat ikatan reseptor TGF- β 1 sehingga TGF- β 1 tidak dapat masuk ke intrasel. Kemudian patogenesis keloid melibatkan banyak jalur pensinyalan yang dapat bersinggungan atau *overlapping* satu dengan lainnya.

Pada penelitian ini terdapat beberapa keterbatasan antara lain jumlah dosis pada kelompok perlakuan hanya 3 dosis dan pada uji sitotoksik dan viabilitas yang digunakan hanya 5 dosis. Selain itu kadar TGF- β 1 yang diukur tidak bisa dibedakan apakah bebas atau terikat di reseptor atau merupakan TGF- β 1 aktif atau inaktif. Serta pemeriksaan ELISA *sandwich* yang dilakukan diperkirakan hanya dapat mengukur kadar TGF- β 1 yang disekresikan di media kultur bukan intrasel.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Hasil penelitian eksperimental laboratorik yang dilakukan terhadap kultur fibroblas keloid *in vitro* adalah sebagai berikut:

1. Pada penelitian ini didapatkan rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas kontrol $124,34 \pm 3,22$ ng/ml sedangkan rerata kadar TGF- β 1 dari sampel kelompok fibroblas dengan tambahan ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) dosis $0,25$ μ g/ml yaitu $150,63 \pm 30,29$ ng/ml, rerata dosis $0,5$ μ g/ml yaitu $129,83 \pm 14,59$ ng/ml dan rerata dosis 1 μ g/ml yaitu $154,94 \pm 22,77$ ng/ml.
2. Tidak terdapat perbedaan bermakna pada rerata kadar kadar TGF- β 1 antar 4 kelompok ditunjukkan dengan nilai $p = 0,100$

Pada hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kadar TGF- β 1 pada kelompok yang mendapat ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) pada kultur fibroblas keloid *in vitro* lebih tinggi dibandingkan kontrol meskipun tidak didapatkan perbedaan bermakna secara statistik (nilai $p = 0,100$).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap fibroblas keloid dengan rentang dosis yang lebih sempit.

2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan senyawa aktif ciplukan (*Physalis angulata*) yang lebih dominan dan spesifik yaitu withangulin agar mendapatkan

efek antiproliferasi terhadap fibroblas keloid.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek antiproliferasi, antiinflamasi dan imunomodulator dari ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap fibroblas keloid yang dinilai dari kadar TGF- β 1 intraselular.

4. Perlu dilakukan pengembangan penelitian efek ekstrak ethanol ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap fibroblas keloid pada ekspresi protein efektor TGF- β 1 jalur intraselular seperti protein Smad, PAI-I, TIMP, prokolagen, COL1 dan lain-lain.



- DAFTAR PUSTAKA**
- Abe F, Nagafuji S, Okawa M, and Kinjo J. 2006, Tripanocidal Constituents in Plants Minor whitanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*, *Chem Pharm Bull* 54: 1226 - 1228.
- Akaishi, S., Ogawa, R., and Hyakusoku, H. 2008, Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses, *Medical hypotheses*, 711, 32-38.
- Akiyama T., Ishida J., Nakagawa H., Ogawara S., Watanabe S., koh N., et al. 1987, Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262, 5592-5595.
- Al-Attar, A. 2006, Keloid pathogenesis and treatment, *Plastic and reconstructive surgery*, 117.1 : 286-300.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. 2017, Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4): 42.
- Alves R, Cabral TR, Cabral IR, Greggi LM, Pontes C, dos Santos PC, et al. 2008, Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro, *Biocell* 32: 195 - 200.
- Andrews, J. P., Marttala, J., Macarak, E., Rosenbloom, J., and Uitto, J. 2016, Keloids: The paradigm of skin fibrosis—Pathomechanisms and treatment, *Matrix Biology*, 51, 37-46.
- Arbi, S., Eksteen, E. C., Oberholzer, H. M., Taute, H., and Bester, M. J. 2015, Premature collagen fibril formation, fibroblast-mast cell interactions and mast cell-mediated phagocytosis of collagen in keloids, *Ultrastructural pathology*, 392, 95-103.
- Aslantürk, Ö. S. 2018, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity: A Predictable Risk to Our Actual World*, 1.
- Babu, M., Diegelmann, R., and Oliver, N. 1992, Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF-beta, *J. Invest. Dermatol*, 99, 650–655.
- Bagabir, R. 2013, 'Immune profiling of keloid disease', *Doctoral dissertation*, University of Manchester.
- Baldwin, H. 2010, 'Keloid Management', In : June K Robinson, C William Hanke, Daniel M Siegel, Alina Fratila editor, *Surgery of The Skin* 2nd ed, Mosby Elsevier, Chapter 41, p669-679.
- Bastos, G. N. T., Silveira, A. J. A., Salgado, C. G., Picanço-Diniz, D. L. W., & Do Nascimento, J. L. M. 2008, *Physalis angulata* extract exerts anti-

- Bastos, G. N. T., Santos, A. R. S., Ferreira, V. M. M., Costa, A. M. R., Bispo, C. I., Silveira, A. J. A., and Do Nascimento, J. L. M. 2006, Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice, *Journal of ethnopharmacology*, 103(2), 241-245.
- Bayat A, Arscott G, Ollier WER, Ferguson MWJ, McGrouther DA. 2004, Description of site-specific morphology of keloid phenotypes in an Afrocaribbean population, *Br J Plast Surg*;57:122e33.
- Benson, J. R., Wakefield, L. M., Baum, M., and Colletta, A. A. 1996, Synthesis and secretion of transforming growth factor beta isoforms by primary cultures of human breast tumour fibroblasts in vitro and their modulation by tamoxifen, *British journal of cancer*, 74(3), 352.
- Bertoli, A., Ruffoni, B., Pistelli, L., & Pistelli, L. 2010, Analytical methods for the extraction and identification of secondary metabolite production in 'in vitro' plant cell cultures. In *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 250-266). Springer, Boston, MA.
- Beutler, B. 2007, Neo-ligands for innate immune receptors and the etiology of sterile inflammatory disease, *Immunol. Rev.* 220 : p113–128.
- Berridge, M. J. 2012, Cell Signalling Pathways, *Cells Signaling Biology*, Portland Press, Module 2, 103-106.
- Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. 1996, The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis, *Plast Reconstr Surg*, 98:827—33.
- Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, et al. 2005, Progressive transforming growth factor beta 1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor, *Am J Respir Crit Care Med* ;171:889
- Bran, G. M., Goessler, U. R., Hormann, K., Riedel, F., and Sadick, H. 2009, Keloids: current concepts of pathogenesis. *International journal of molecular medicine*, 243, 283-293.
- Breasted, J.H. 1930, The Edwin Smith surgical papyrus, vol I: hieroglyphic translation and commentary, *Chicago: University of chicago Press*: 403-406.
- Brown, J. J., and Bayat, A. 2009, Genetic susceptibility to raised dermal scarring, *British Journal of Dermatology*, 161, 8-18.
- Butler, P. D., Longaker, M. T., Yang, G. P. 2008, Current progress in keloid research and treatment, *Journal of the American College of Surgeons*, 2064, 731-741.

- Bhattacharyya, S., Kelley, K., Melichian, D.S., Tamaki, Z., Fang, F., Su, Y., et al. 2013, Toll like receptor 4 signaling augments transforming growth factor-beta responses: a novel mechanism for maintaining and amplifying fibrosis in scleroderma, *Am. J. Pathol.*, 182:192–205.
- Bock, O., Schmid-Ott, G., Malewski, P. and Mworitez, U. 2006, Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring, *Arch Dermatol Res.* 297: 433–438.
- Campaner, A. B., Ferreira, L. M., Gragnani, A., Bruder, J. M., Cusick, J. L., and Morgan, J. R. 2006, Upregulation of TGF- β 1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring, *Journal of investigative dermatology*, 1265, 1168-1176.
- Cardona, M. I., Toro, R. M., Costa, G. M., Ospina, L. F., Castellanos, L., Ramos, F. A., et al. 2017, Influence of extraction process on antioxidant activity and rutin content in Physalis peruviana calyces extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(06): 164-168.
- Chen, J., Ma, X., Xu, B., Long, X., Qin, H., Zhao, R. C., and Wang, X. 2015, Keloid-derived keratinocytes acquire a fibroblast-like appearance and an enhanced invasive capacity in a hypoxic microenvironment in vitro, *International journal of molecular medicine*, 355, 1246-1256.
- Chike-Obi, C. J., Cole, P. D., and Brissett, A. E. 2009, Keloids: pathogenesis, clinical features, and management, In *Seminars in plastic surgery* Vol. 23, No. 3, p. 178. Thieme Medical Publishers.
- Chin, D., Boyle, G.M., Parsons, P.G., and Coman, W.B. 2004, What is transforming growth factor beta TGF β ? *Br J Plast Surg*; 57:215e21.
- Chodon, T., Sugihara, T., Igawa, H. H., Funayama, E., and Furukawa, H. 2000, Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor- β 1 can abrogate this resistance, *The American journal of pathology*, 1575, 1661-1669.
- Cobbold, C.A. 2001, The role of nitric oxide in the formation of keloid and hypertrophic lesions, *Med Hypotheses*, 57:497–502.
- Damu AG, Kuo P, Su C, kuo T, Chen T, Bastow KF, et al. 2007, Isolation, structures, and structure-cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from Physalis angulata. *J Nat Prod* 70: 1146 – 1152
- Delgado, A.V and McManus, A.T. 2003, Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P, *Neuropeptides*. 37:355–61.

- Denton, C.P and Abraham, D.J. 2001, Transforming growth factor beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis, *Curr Opin Rheumatol*; 13: 505-511
- Dewi, L. K., Ghulfron, M., & Kristin, N. 2017, Effectivity Method Of Chromatography To Isolate Compound Of A Metabolite Secunder At Peperomia Pellucida L. Plant With Methanol Solvent. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional*.
- de Oliveira Timoteo, C., Paiva, R., dos Reis, M. V., Claro, P. I. C., Ferraz, L. M., Marconcini, J. M., et al. 2019, In vitro growth of Physalis peruviana L. affected by silver nanoparticles. *3 Biotech*, 9(4), 145.
- Diao, J. S., Xia, W. S., Yi, C. G., Wang, Y. M., Li, B., Xia, W., et al. 2011, Trichostatin A inhibits collagen synthesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts, *Archives of dermatological research*, 3038, 573-580.
- Dona R., Sulistyani N., Nurani L.H. 2016, Uji Sitotoksitas dan Anti Proliferatif Ekstrak Etanol Dauen Leunca (*Solanum nigrum*, L) Terhadap Sel Raji, *Jurnal Kefarmasan Pharmaciana Univ Ahmad Dahlan*, Vol 6, No 2
- Dong,X., Mao,S., Wen,H. 2013, Up regulation of proinflammatory genes in skin lesions may be the cause of keloid formation, *Biomed. Rep* 1, 833–836.
- El-Gengaihi, S. E., Hassan, E. E., Hamed, M. A., Zahran, H. G., and Mohammed, M. A. 2013, Chemical composition and biological evaluation of Physalis peruviana root as hepato-renal protective agent, *Journal of dietary supplements*, 10(1), 39-53.
- Firestein, G.S., Budd, R., Gabriel, S.E., McInnes, I.B., O'Dell, J.R. 2012, *Kelley's Textbook of Rheumatology E-Book*, Elsevier Health Sciences, 607-608.
- Fong, E. P., and Bay, B. H. 2002, Keloids—the sebum hypothesis revisited, *Medical hypotheses*, 584, 264-269.
- Fujiwara, M., Muragaki, Y., Ooshima, A. 2005, Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration, *British journal of dermatology*, 1532, 295-300.
- Furuichi T, Tatsumi H, and Sokabe M. 2008, Mechano-sensitive channels regulate the stomatal aperture in *Vicia faba*, *Biochem Biophys Res Commun*, 3663:758
- Gao, F. L., Jin, R., Zhang, L., and Zhang, Y. G. 2013, The contribution of melanocytes to pathological scar formation during wound healing, *International journal of clinical and experimental medicine*, 67, 609.
- Gauglitz, G. G., Korting, H. C., Pavicic, T., Ruzicka, T., Jeschke, M. G. 2011, Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies, *Molecular medicine*, 171-2, 113.

- Gehalen, R. L., & McLaughlin, J. L. 1989, Piceatannol (3, 4, 3', 5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*, 165(1), 241-245.
- Ghosh, A. K., Yuan, W., Mori, Y., Chen, S. J., Varga, J. 2001, Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor beta Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators, *J. Biol. Chem.* 276, 11041–11048
- Gilboa, L., Wells, R.G., Lodish, H.F, Henis, Y.I. 1998, Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane, *J Cell Biol*, 40: 767-777
- Hahn, J. M., Glaser, K., McFarland, K. L., Aronow, B. J., Boyce, S. T., Supp, D. M. 2013, Keloid-derived keratinocytes exhibit an abnormal gene expression profile consistent with a distinct causal role in keloid pathology, *Wound Repair and Regeneration*, 214, 530-544.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E., and Iwata, K. 1992, Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 TIMP-1 for a wide range of cells A possible new growth factor in serum, *FEBS letters*, 2981, 29-32.
- Haisa, M., Okochi, H., Grotendorst, G.R. 1994, Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF, *J. Invest. Dermatol.* 103 : 560–563.
- He QP, Ma L, Luo JY, He FY, Lou LG, Hu LH. 2007, Cytotoxic withanolides from Physalis angulata L. *Chem Biodivers* 4: 443 - 449
- Hoeben, A. N. N., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., De Bruijn, E. A. 2004, Vascular endothelial growth factor and angiogenesis, *Pharmacological reviews*, 564, 549-580.
- Hseu, Y. C., Wu, C. R., Chang, H. W., Kumar, K. S., Lin, M. K., Chen, C. S., et al. 2011, Inhibitory effects of Physalis angulata on tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of ethnopharmacology*, 135(3), 762-771.
- Hsu, Y. C., Hsiao, M., Wang, L. F., Chien, Y. W., & Lee, W. R. 2006, Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. *Nitric Oxide*, 14(4), 327-334.
- Hsu, Y. C., Hsiao, M., Chien, Y. W., & Lee, W. R. 2007, Exogenous nitric oxide stimulated collagen type I expression and TGF- β 1 production in keloid fibroblasts by a cGMP-dependent manner. *Nitric Oxide*, 16(2), 258-265.
- Huang, C.; Liu, L.; You, Z.; Wang, B.; Du, Y.; and Ogawa, R. 2016, Keloid progression: A stiffness gap hypothesis, *Int. Wound J*, 14(5), 764-771.

- Inagaki Y, Truter S, Tanaka S, Di Liberto M, and Ramirez F. 1994, Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta on alpha 2I collagen gene transcription, *J Biol Chem*, 270: 3353-3358
- Ismail N, Alam M. 2001, A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* 72: 676 - 679.
- Iswahyudi, I. 2015, Analisis Fitokimia Dan Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Ciplukan (*Physalis Angulata L.*) Dengan Berbagai Metode Pengeringan Simplisia. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran Untan*, Vol 3(1)
- Javelaud D, Mauviel A. 2005, Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF- β : Implications for carcinogenesis. *Oncogene* 24:5742–50.
- James D.W., Berger T.G., and Elston D.M. 2010, *Dermal and Subcutaneous Tumor in Andrews' Disease Of The Skin Clinical Dermatology*, Saunders Elsevier, 10th Edition p. 593-594
- Jimenez, S. A., Varga, J., Olsen, A., Li, L., Diaz, A., Herhal, J., and Koch, J. 1994, Functional analysis of human alpha 1 I procollagen gene promoter. Differential activity in collagen-producing and nonproducing cells and response to transforming growth factor beta 1, *Journal of Biological Chemistry*, 26917, 12684-12691.
- Jin, Z., Mashuta, M.S., Stolowich, N.J., Vaisberg, A.J., Stivers, N.S., Bates, P.J., et al. 2012, Physangulidines A, B and C: Three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L, *Org Lett* 14: 1230 – 1233
- Jumper, N., Hodgkinson, T., Paus, R., and Bayat, A. 2017, Site-specific gene expression profiling as a novel strategy for unravelling keloid disease pathobiology, *PloS one*, 12(3), e0172955.
- Kakar, A. K., Shahzad, M., and Haroon, T. S. 2006, Keloids: clinical features and management Part II, *Journal of Pakistan Association of Dermatology*, 163, 162-172.
- Keira S.M., Ferreira, L.M., Gragnani, A., Duarte, I.S., Santos, I.A.N. 2004, Experimental model for fibroblast culture, *Acta Cir Bras Vol 19 Special Edition*, 11-16
- Khalil, N. 1999, Transforming growth factor β : from latent to active, *Microbes Infect*, 1:1255e63.
- Kim, S.W., Kim, K.J., Rhie, J.W., and Ahn, S.T. 2015, Effects of adipose-derived stem cells on keloid fibroblasts based on paracrine function, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 126, 435-441

- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3173-3178.

Ko, J. H., Kim, P. S., Zhao, Y., Hong, S.J., and Mustoe, T.A. 2012, HMG-CoA reductase inhibitors statins reduce hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1292, 252e-261e.

Kuo PQ, Kuo TH, Damu AG, Su CR, Lee E, Wu T, et al. 2006. Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotox principles from *Physalis angulata*. *Org Lett* 8: 2953 - 2956

Kurniawati, Y., Adi, S., Achadiyani, A., Suwarsa, O., Erlangga, D., dan Putri, T. 2015, Kultur Primer Fibroblas: Penelitian Pendahuluan, *Majalah Kedokteran Andalas*, 381, 33-40.

Kurniawati, Y., Suwarsa, O., Agung, A., and Adi, S. 2016, The Comparison of the Levels of Leukotriene B4, TGF- β 1, Collagen in Keloid Fibroblasts and Normal Skin Fibroblast, *Open Access Library Journal*, 3(07), 1.

Ladin, D. A., Garner, W. L., and Smith Jr, D. J. 1995, Excessive scarring as a consequence of healing, *Wound Repair and Regeneration*, 31, 6-14.

Lan, Y. H., Chang, F. R., Pan, M. J., Wu, C. C., Wu, S. J., Chen, S. L., et al. 2009, New cytotoxic withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chem.*, 116: 462469.

Lawrence W. In search of the optimal treatment of keloids: report of a series and a review of the literature. *Ann Plast Surg* 1991;27:164–178.

Leask, A., and Abraham, D.J. 2004, TGF-beta signalling and the fibrotic response, *FASEB* , 187:816e27.

Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, and Longaker MT. 1999, Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids, *Ann Plast Surg*, 432:179e84.

Lee, S. S., Yosipovitch, G., Chan, Y. H., and Goh, C. L. 2004, Pruritus, pain, and small nerve fiber function in keloids: a controlled study, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 516, 1002-1006.

Lee SW, Pan MH, Chen CM, Chen ZT. 2008, Whitangulatin I, a new cytotoxic whitanolide from *Physalis angulata*. *Chem Pharm Bull* 56: 234 - 236.

Lestari, B., Permatasari, N., Rohman, M.S. 2016, Methanolic Extract of Ceplukan Leaf (*Physalis minima L.*) Attenuates Venticular Fibrosis through Inhibition of TNF- α in Ovariectomized Rats, *Advances In Pharmacological Sciences*, 1-7

- Lim, I. J., Phan, T. T., Song, C., Tan, W. T., and Longaker, M. T. 2001, Investigation of the influence of keloid-derived keratinocytes on fibroblast growth and proliferation in vitro, *Plastic and reconstructive surgery*, 1073, 797-808.
- Liu, Q., Chen, J., Wang, X., Yu, L., Hu, L. H., and Shen, X. 2010, Withagulatin A inhibits hepatic stellate cell viability and procollagen I production through Akt and Smad signaling pathways, *Acta Pharmacologica Sinica*, 318, 944.
- Liu, F., Hata, A., and Baker, J.C. 1996, A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator, *Nature*, 381: 620—3.
- Locci, P., Bellocchio, S., Lilli, C., Marinucci, L., Cagini, L., Baroni, T., and Beccetti, E. 2001, Synthesis and secretion of transforming growth factor- β 1 by human desmoid fibroblast cell line and its modulation by tamoxifen, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 21(11), 961-970.
- Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. 1990. Betaglycan presents ligand to the TGF-beta signaling receptor, *Cell*, 73: 1435—44.
- Lovell, C.F. 2010, 'Acquired Disorder of Dermal Connective Tissue', In : Burns Tony, Breathnach Stephen, Cox Neil, Griffiths Christopher editor, *Rook's Textbook of Dermatology*, London Willey Blackwell; Chapter 96.
- Luo, L.F., Shi, Y., Zhou, Q., Xu, S.J., and Lei T.C. 2013, Insufficient expression of the melanocortin-1 receptor by human dermal fibroblasts contributes to excess collagen synthesis in keloid scars, *Exp. Dermatol.*, 22 : 764–766.
- Lutz, W. K. 1990, Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(8), 1243-1247.
- Mahalakshmi, A. M., and Nidavani, R. B. 2014, Physalis angulata L.: An ethanopharmacological review, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*.
- Mari, W., Alsabri, S. G., Tabal, N., Younes, S., Sherif, A., & Simman, R. (2015). Novel insights on understanding of keloid scar: article review. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 7(1-3), 1-7.
- Marneros, A.G., Norris, J.E., Watanabe, S., Reichenberger, E., and Olsen, B.R. 2004, Genome scans provide evidence for keloid susceptibility loci on chromosomes 2q23 and 7p11, *J. Investig. Dermatol.* 122, 1126–1132.
- Massague, J. 1992, TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 753–791.
- Matsuno, R., Aramaki, Y., & Tsuchiya, S. 2001, Involvement of TGF- β in inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production by macrophages stimulated with LPS. *Biochemical and biophysical research communications*, 281(3), 614-620.

- Moustakas, A., & Heldin, C. H. 2005, Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci*, 118(16), 3573-3584.
- Maung, A.A., Fujimi, S., Miller, M.L., MacComara, M.P., Mannick, J.A., and Lederer, J.A. 2005, Enhanced TLR4 reactivity following injury is mediated by increased p38 activation, *J. Leukoc. Biol.* 78 : 565-573.
- Medina-Medrano, J. R., Almaraz-Abarca, N., González-Elizondo, M. S., Uribe-Soto, J. N., González-Valdez, L. S., & Herrera-Arrieta, Y. (2015). Phenolic constituents and antioxidant properties of five wild species of Physalis (Solanaceae). *Botanical studies*, 56(1), 24.
- Miyazono K, ten Dijke P, and Heldin CH. 2000, TGF-beta signaling by Smad proteins, *Adv Immunol*, 75:115—57.
- Miyazono, K. 2000, Positive and negative regulation of TGF-beta signaling, *J Cell Sci*, 113(7), 1101-1109.
- Mori Y, Chen SJ, and Varga J. 2003, Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts, *Arthritis Rheum*, 48:1964—78.
- Murray, J. C. 1994, Keloids and hypertrophic scars, *Clinics in dermatology*, 121,27-37.
- Naitoh, M., Hosokawa, N., Kubota, H., Tanaka, T., Shirane, H., Sawada, M., et al. 2001, Upregulation of HSP47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease keloid, *Biochemical and biophysical research communications*, 2805, 1316-1322.
- Nakashima, M., Chung, S., Takahashi, A., Kamatani, N., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., et al. 2010, A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population, *Nature genetics*, 429, 768.
- Naylor, M. C., Brissett, A. E. 2012, Current concepts in the etiology and treatment of keloids, *Facial Plastic Surgery*, 2805, 504-512.
- Niessen, F. B., Spauwen, P. H., Schalkwijk, J., Kon, M. 1999, On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review, *Plastic and reconstructive surgery*, 1045, 1435-1458.
- Ogawa, R. 2008, Keloid and hypertrophic scarring may result from a mechanoreceptor or mechanosensitive nociceptor disorder, *Medical hypotheses*, 714, 493-500.
- Okabe T, Hide M, Koro O, and Yamamoto S. 2000, Substance P induces tumor necrosis factor-alpha release from human skin via mitogen-activated protein kinase, *Eur J Pharmacol*, 398:309–15.

- Ong, C. T., Khoo, Y. T., Mukhopadhyay, A., Masilamani, J., Do, D. V., Lim, I., et al. 2010, Comparative proteomic analysis between normal skin and keloid scar, *British Journal of Dermatology*, 1626, 1302-1315.
- Perdanakusuma DS. 2006, The effect of melanin concentration on collagen accumulation in keloid, *Folia Medica Indonesiana*. ; 42: 218- 227
- PERDOSKI. 2017, *Panduan Praktik Klinis Bagi Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin di Indonesia*, PP PERDOSKI, Jakarta.
- Perk, B. O., Ilgin, S., Atli, O., Duymus, H. G., and Sirmagul, B. 2013, Acute and Subchronic Toxic Effects of the Fruits of Physalis peruviana L, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Placik, O. J., and Lewis, J. V. 1992, Immunologic associations of keloids, *Surgery, gynecology & obstetrics*, 1752, 185-193.
- Polo M, Smith PD, Kim YJ. 1993, Effect of TGF-beta2 on proliferative scar fibroblast cell kinetics, *Ann Plast Surg*, 43:185—90.
- Pitojo, S., 2002. Cemplukan-Herba Berkhasiat Obat, Kanisius, Yogyakarta.
- Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. 2011. Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7): 1733-1740.
- Ramadan, M. F., and Moersel, J. T. 2009, Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (Physalis peruviana L.) pomace: Range of operational variables. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44: 435444
- Rathore, C., Dutt, K. R., Sahu, S., & Deb, L. 2011, Antiasthmatic activity of the methanolic extract of Physalis angulata Linn. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5351-5355.
- Rengifo-Salgado, E., and Vargas-Arana, G. 2013, Physalis angulata L.Bolsa de Mullaca: a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 125.
- Riss, T. 2017, Is your MTT assay really the best choice. *Promega Corporation website* <http://www.promega.in/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/> (Accessed March 19 2018).
- Robles DT, Moore E, Draznin M, and Berg D. 2007, Keloids: Pathophysiology and management, *Dermatology Online Journal*, 13: 9. 20.
- Sadick, H., Herberger, A., Riedel, K., Bran, G., Goessler, U., Hoermann, K., et al. 2008, TGF- β 1 antisense therapy modulates expression of matrix metalloproteinases in keloid-derived fibroblasts, *International journal of molecular medicine*, 221, 55-60.

- Santoso H.B. 2008, *Ragam dan Khasiat Tanaman Obat : Halaman Asri*. Jakarta, PT. Agromedia Pustaka.
- Sari, W. P. 2010. Uji toksisitas akut campuran ekstrak etanol daun sirih (*piper betle* L.) dan ekstrak kering gambir (*uncaria gambir* R.) terhadap mencit putih jantan.
- Sasamoto A, Nagino M, Kobayashi S, Naruse K, Nimura Y, Sokabe M. 2005, Mechanotransduction by integrin is essential for IL-6 secretion from endothelial cells in response to uniaxial continuous stretch, *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(5): C1012–22.
- Seifert, O. 2008, 'Keloids: A Fibroproliferative Disease', *Doctoral dissertation*, Linköping University Electronic Press.
- Shaffer, J. J., Taylor, S. C., Cook-Bolden, F. 2002, Keloidal scars: a review with a critical look at therapeutic options. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 46(2), S63-S97.
- Shah, M., Foreman, D.M., Ferguson, M.W. 1992, Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet*, 339: 213-214.
- Shang Q, Yuan R, Wang W. 2001, An experimental study of antisense TGF-beta 1 inhibiting keloid fibroblast proliferation in vitro, *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 17: 325—7.
- Shaheen, A. 2017, Comprehensive Review of Keloid Formation, *Clin Res Dermatol Open Access*, 4(5): 1-18.
- Shaheen AA. 2017, Risk Factors of Keloids: A Mini Review, *Austin J Dermatolog*. 42: 1074.
- Shinde, A.V., Kelsh, R., Peters, J.H., Sekiguchi K., Van De Water, L. McKeown-Longo, P.J. 2015, The alpha4 beta1 integrin and the EDA domain of fibronectin regulate a profibrotic phenotype in dermal fibroblasts, *Matrix Biol*, 41:26–35.
- Shingu K, Marubayashi N, Ueda I, Yahara S, Nohara T. 1991, Physagulin C, a new withanolide from *Physalis angulata* L. *Chem Pharm Bull* 39; 1591 - 1593.
- Shingu K, Yahara S, Nohara T, Okabe H. 1992. Three new withanolides, physagulins A, B, and D from *Physalis angulata* L. *Chem Pharm Bull* 40: 2088 - 2091.
- Shingu K, Yahara S, Nohara T, Okabe H. 1992, Three new withanolides, physagulins A, B, and D from *Physalis angulata* L. *Chem Pharm Bull* 40: 2088 – 2091.

- Shu, Z., Xing, N., Wang, Q., Li, X., Xu, B., Li, Z., Kuang, H. 2015, Antibacterial and anti-Inflammatory activities of Physalis alkekengi var. franchetii and its main constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4359394:1-11.
- Slemp, A.E., and Kirschner, R.E. 2006, Keloids and scars: A review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management, *Curr Opin Pediatr* 18:396–402.
- Soares, M. B., Bellintani, M. C., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. C., dos Santos, R. R. 2003, Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from Physalis angulata L. *European journal of pharmacology*, 459(1): 107-112.
- Sutrisna, E. M. 2012, The Ethanol Extract of Physalis angulata Linn Inhibits COX-2 Activity in MCF-7 Cell In Vitro. *International Conference: Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM)* June, 22nd-23rd 2012 Surakarta Indonesia: 12-17.
- Steinbrech, D. S., Mehrara, B. J., Chau, D., Rowe, N. M., Chin, G., Lee, T., et al. 1999, Hypoxia upregulates VEGF production in keloid fibroblasts. *Annals of plastic surgery*, 425, 514-9.
- Tanaka A, Hatoko M, Tada H, Iioka H, Niitsuma K, Miyagawa S. 2004, Expression of p53 family in scars, *J Dermatol Sci*, 34:17–24.
- Tang, B., Zhu, B., Liang, Y., Bi, L., Hu, Z., Chen, B., et al. 2011, Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF- β /Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF- β RI and TGF- β RII in keloid fibroblasts, *Archives of dermatological research*, 3038, 563-572.
- Tarannita, C., Permatasari, N., Sudiarto, S. 2013, Efek Hambatan Ekstrak Daun Ceplukan (Physalis minima L) Terhadap Kontraktilitas Otot Polos Usus Halus Terpisah Marmet Dengan Stimulasi Metakolin Eksogen, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 22(1), 18-22.
- Taylor, A. W., Yee, D. G., Nishida, T., Namba, K. 2000, Neuropeptide Regulation of Immunity: The Immunosuppressive Activity of Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone α -MSH. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 239-47.
- Ten-Dijke, P. and Hill, C.S. 2004, New insights into TGF-beta-Smad signaling, *Trends Biochem Sci*. 29:265–73.
- To, W. S., and Midwood, K. S. 2011, Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair, *Fibrogenesis & tissue repair*, 41, 21.
- Trojanowska, M., LeRoy, E. C., Eckes, B., Krieg, T. 1998, Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin, *Journal of molecular medicine*, 76(3-4), 266-

- 274.
- Tsujita-Kyutoku, M., Uehara, N., Matsuoka, Y., Kyutoku, S., Ogawa, Y., Tsubura, A. 2005, Comparison of transforming growth factor- β /Smad signaling between normal dermal fibroblasts and fibroblasts derived from central and peripheral areas of keloid lesions, *in vivo*, 19(6), 959-963.
- Tucci-Viegas, V. M., Hochman, B., França, J. P., Ferreira, L. M. 2010. Keloid explant culture: a model for keloid fibroblasts isolation and cultivation based on the biological differences of its specific regions. *International wound journal*, 7(5), 339-48.
- Ueda, K., Yasuda, Y., Furuya, E., Oba, S. 2004, Inadequate blood supply persists in keloids. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, 385, 267-271.
- Unahabokha, T., Sucontphunt, A., Nimmannit, U., Chanvorachote, P., Yongsanguanchai, N., Pongrakhananon, V. 2015, Molecular signalings in keloid disease and current therapeutic approaches from natural based compounds, *Pharmaceutical biology*, 533, 457-463.
- Uphoff, C. C., Denkmann, S. A., Steube, K. G., and Drexler, H. G. 2010, Detection of EBV, HBV, HCV, HIV-1, HTLV-I and-II, and SMRV in human and other primate cell lines, *BioMed Research International*, 2010.
- Yamaoka J, Di ZH, Sun W, and Kawana S. 2007, Erratum to 'changes in cutaneous sensory nerve fibers induced by skin-scratching in mice, *J Dermatol Sci*;472:172–82.
- Yamada, R., Taguchi, T., and Igawa, N. 2000, Mechanical and thermal properties of 2D and 3D SiC/SiC composites. *Journal of nuclear materials*, 283, 574-578.
- Yan, X., Liu, Z., & Chen, Y. 2009, Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 41(4), 263-272.
- Yu, L., Border, W. A., Huang, Y., and Noble, N. A. 2003, TGF- β isoforms in renal fibrogenesis, *Kidney international*, 643, 844-856.
- Verrecchia, F., Mauviel, A., and Farge, D. 2006, Transforming growth factor- β signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis, *Autoimmunity reviews*, 58, 563-569.
- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q. W., & Nathan, C. 1993, Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *Journal of experimental medicine*, 178(2), 605-613.
- Wall, S.J., Bevan, D., Thomas, D.W., Harding K.G., Edwards, D.R., and Murphy, G. 2002, Differential expression of matrix metalloproteinases during

- impaired wound healing of the diabetes mouse, *J. Invest. Dermatol.*, 119, 91–98.

Wang, Z., Fong, K.D., Phan, T.T., Lim, I.J., Longaker, M.T., and Yang, G.P. 2006, Increased transcriptional response to mechanical strain in keloid fibroblasts due to increased focal adhesion complex formation, *J Cell Physiol*, 2062:510–7.

Wang, A., Davison, S. P., Dayan, J. H., Clemens, M. W., Sonni, S., and Crane, A. 2009, Efficacy of intralesional 5-fluorouracil and triamcinolone in the treatment of keloids, *Aesthetic surgery journal*, 291, 40-46.

Wang, B. H., Lu, Z. X., Polya, G. M. 1997, Inhibition of eukaryote serine/threonine-specific protein kinases by piceatannol. *Planta medica*, 64(03), 195-199.

Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., Pellacani, A., Wiesel, P., Lee, M. E. 2000, Transforming growth factor- β 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36653-36658.

Wu G, Chen YG, Ozdamar B. 2000, Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation, *Science*, 287:92—7.

Wu, S. J., Ng, L. T., Lin, D. L., Huang, S. N., Wang, S. S., Lin, C. C. 2004, Physalis peruviana extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Lett.*, 215: 199-208.

Wink, M. 2015, Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251-286.

Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P., Gopalakrishnan, V., & Wolff, J. 2007, Measuring cytotoxicity: a new perspective on LC50. *Anticancer research*, 27(1A), 35-38.

Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T. 2006, Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation, *Pharmacol Rep.* 581:13–21.

Zheng Z, Lamotte RH, Grigg P. 2002, Comparison of responses to tensile and compressive stimuli in C-mechanosensitive nociceptors in rat hairy skin. *Somatosens Mot Rest*, 192:109–13.

Lampiran 1

PEMILIHAN PASIEN KELOID	
Nomor RM	: Universitas Brawijaya
Nama	: Bapak/Ibu/Saudara/Saudari
Pekerjaan	: Universitas Brawijaya
Alamat	: Universitas Brawijaya
Nomor Telepon	: Universitas Brawijaya
Umur	: Universitas Brawijaya
Jenis Kelamin	: Universitas Brawijaya
Tanggal Periksa	: Universitas Brawijaya
1. Apakah berusia lebih dari 17 tahun dan kurang dari 32	Ya / Tidak
2. Diagnosis Keloid (Anamnesis dan Pemeriksaan Fisik)	Ya / Tidak
3. HIV (konfirmasi rapid test)	Ya / Tidak
4. Hepatitis B (konfirmasi HbsAg)	Ya / Tidak
5. Hepatitis C (konfirmasi HCV)	Ya / Tidak
6. Menggunakan terapi keloid berupa injeksi steroid atau topical steroid selama 1 tahun terakhir	Ya / Tidak
7. Penyakit kulit lainnya: scleroderma sistemik, morphea, nephrogenic fibrosing dermatopathy, eosinophilic fasciitis, scleromyxedema	Ya / Tidak
8. Mengalami gangguan faal hemostasis (konfirmasi faal hemostasis)	Ya / Tidak
9. Riwayat alergi obat bius local (pehacain injeksi)	Ya / Tidak

Bila Ada Satu Jawaban Ya, Pasien Tidak Bisa Diikutkan Dalam Penelitian Ini

Lampiran 2**PENJELASAN DAN INFORMASI PENELITIAN****(Information for Informed Consent)**

Saya, dr. Nurul Hidayah akan melakukan penelitian untuk mengetahui kadar TGF- β 1 pada sel kultur fibroblas keloid yang diberikan ekstrak ethanol ciplukan, maka saya akan jelaskan sebagai berikut :

1. Keloid adalah pertumbuhan jaringan fibrotik yang berlebihan dan jinak yang membentang di luar batas defek asli, tidak regresi spontan dan dapat merupakan jaringan parut hasil penyembuhan luka yang tidak teratur.
2. Manfaat subyek dari keikutsertaan dalam penelitian ini adalah akan diterapi keloidnya yaitu dengan bedah eksisi jaringan keloid dan diteruskan dengan terapi injeksi intralesi pada sisa jaringan sampai dengan tipis dan rata dengan jaringan kulit sekitar. Jaringan keloid yang diambil akan diproses dan dikultur, kultur sel fibroblas keloid akan diberikan ekstrak ethanol ciplukan kemudian diukur kadar sitokin TGF- β 1. Sehingga dapat diketahui pengaruh ekstrak ciplukan terhadap keloid dan menjadi salah satu pengobatan keloid yang tidak invasif; biaya pemeriksaan tidak dibebankan pada subyek penelitian; hasil penelitian akan disampaikan kepada pasien.
3. Bapak/Ibu/Saudara/Saudari telah memenuhi kriteria yang telah ditentukan dan dapat ikut serta dalam penelitian ini tanpa dikenakan biaya tambahan apapun yang berkaitan dengan pelaksanaan penelitian.
4. Pada penelitian ini akan dilakukan pemeriksaan pada kulit, pengisian kuesioner, pemeriksaan darah dan bedah eksisi jaringan keloid. Pemeriksaan pada kulit dan pengisian kuesioner dilakukan dengan cara pemeriksaan kulit secara langsung dengan dilihat dengan mata, kemudian wawancara. Kemudian akan dilakukan bedah eksisi pada jaringan keloid setelah dilakukan KIE, *inform consent*, assessment pra-operasi termasuk riwayat alergi terhadap obat bius dan gangguan perdarahan. Prosedur operasi dilakukan dengan tahap desinfeksi area operasi kemudian meletakkan duk lubang yang steril. Dilakukan injeksi anestesi lokal pehacain, selanjutnya dilakukan eksisi shave pada daerah dasar lesi keloid dengan menggunakan pisau ukuran 15 dari satu tepi yang satu ke tepi yang lain se bisa mungkin tidak melukai area kulit yang sehat sampai

- semua jaringan fibrous terangkat. Kemudian luka eksisi diberikan salep gentamicin selanjutnya luka di tutup dengan dressing beberapa lapis kasa. Jaringan keloid yang dari hasil eksisi langsung dimasukan kedalam tabung centrifuge 50 ml yang telah di isi fosfat-buffered saline (PBS) dan dikirim ke laboratorium Biomed FK UB.
5. Pada pasien diberikan cefadroxil tab 2x500mg dan asam mefenamat tablet 3x500mg serta salep gentamicin 2xsehari selama 1 minggu. Pasien selanjutnya akan dilakukan injeksi kortikosteroid intralesi secara rutin setelah 7 hari setiap 1-2 minggu sekali dan *silicone sheet* sampai dengan sisa jaringan keloid tipis dan hampir rata dengan jaringan kulit sekitarnya.
 6. Efek samping bedah eksisi jaringan keloid kemungkinan menyebabkan rasa nyeri dan infeksi pada tempat bekas eksisi. Namun karena proses ini dilakukan oleh tenaga yang professional (Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin Divisi Tumor) serta dilakukan secara steril sehingga kemungkinan terjadinya efek samping tersebut kecil, dan efek samping tersebut bersifat sementara serta dapat disembuhkan dengan cara dikompres dan minum obat penghilang rasa sakit serta obat antibiotik.
 7. Walaupun jaringan sudah diangkat dan diterapi tetap akan ada kemungkinan untuk kambuh dan tumbuh kembali. Hal ini disebabkan banyaknya faktor yang dapat mencetuskan keloid dan kekambuhan keloid.
 8. Semua data dan informasi yang diperoleh dalam penelitian ini bersifat RAHASIA dan hanya dapat diketahui oleh peneliti. Hasil penelitian ini mungkin akan dipublikasikan TANPA memaparkan identitas. Hal-hal yang ingin diketahui sehubungan dengan penelitian ini dapat ditanyakan langsung kepada peneliti.
 9. Bapak/Ibu/Saudara/Saudari dapat mengundurkan diri dari keikutsertaan penelitian setiap saat dengan memberitahukan kepada dokter yang merawat atau peneliti, tanpa syarat, dan tidak akan mengurangi kualitas pelayanan terhadap Anda.
 10. Jika setuju untuk ikut serta, maka Bapak/Ibu/Saudara/Saudari dimohon untuk menandatangani lembar persetujuan mengikuti penelitian dan lembar persetujuan tindakan khusus yang telah dipersiapkan untuk penelitian ini.

11. Sebagai tanda terimakasih karena telah berpartisipasi dalam penelitian ini, pelembab diberikan tanpa biaya untuk perawatan bekas luka dan kulit harian.

PENELITI

dr. Nurul Hidayah

NIM. 158071400111001



Lampiran 3

PERNYATAAN PERSETUJUAN UNTUK BERPARTISIPASI DALAM

PENELITIAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar penjelasan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia untuk ikut serta menjadi subyek penelitian yang berjudul **EFEK EKSTRAK ETHANOL CIPLUKAN (Physalis angulata) TERHADAP KADAR TGF- β 1 PADA KULTUR FIBROBLAS KELOID IN VITRO**

Malang, , 2019

Yang membuat pernyataan

(.....)

Saksi II

dr. Nurul Hidayah
NIM 158071400111001

Saksi I



Lampiran 4

PERNYATAAN PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIS

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa :

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar penjelasan dan memberikan PERSETUJUAN untuk dilakukan tindakan medis berupa pengambilan darah dan pengambilan jaringan keloid dengan bedah eksisi shave dengan prosedur pembedahan secara steril dengan didahului anestesi lokal.
2. Yang tujuan, sifat dan perlunya tindakan medis tersebut diatas serta resiko yang ditimbulkan cukup dijelaskan oleh dokter dan saya mengerti sepenuhnya, serta tidak akan melakukan tuntutan apapun berkaitan dengan penelitian ini

Malang, , 2019

Yang membuat pernyataan

(.....)

Peneliti

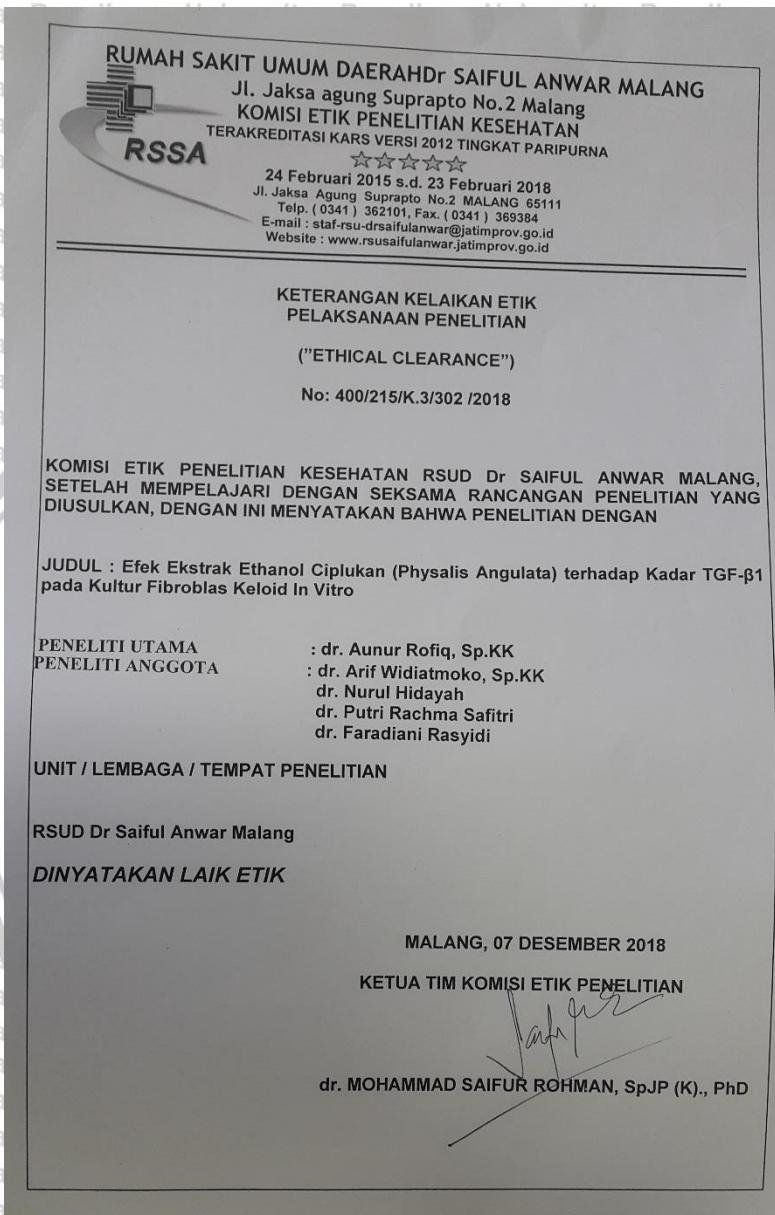
dr. Nurul Hidayah
NIM 158071400111001

Saksi I

Saksi II

Lampiran 5

SURAT KETERANGAN LAIK ETIK PENELITIAN



Lampiran 6**HASIL UJI STATISTIK****Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
TGF beta (ng/L)	24	100.0%	0	0.0%	24	100.0%

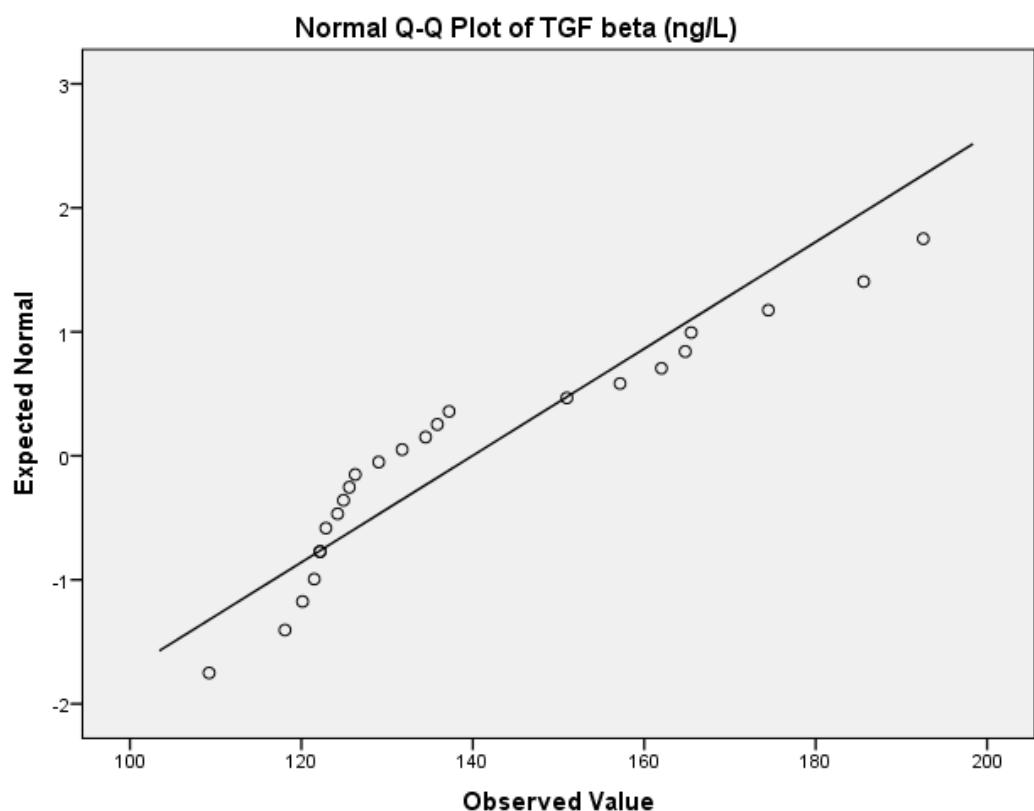
Descriptives

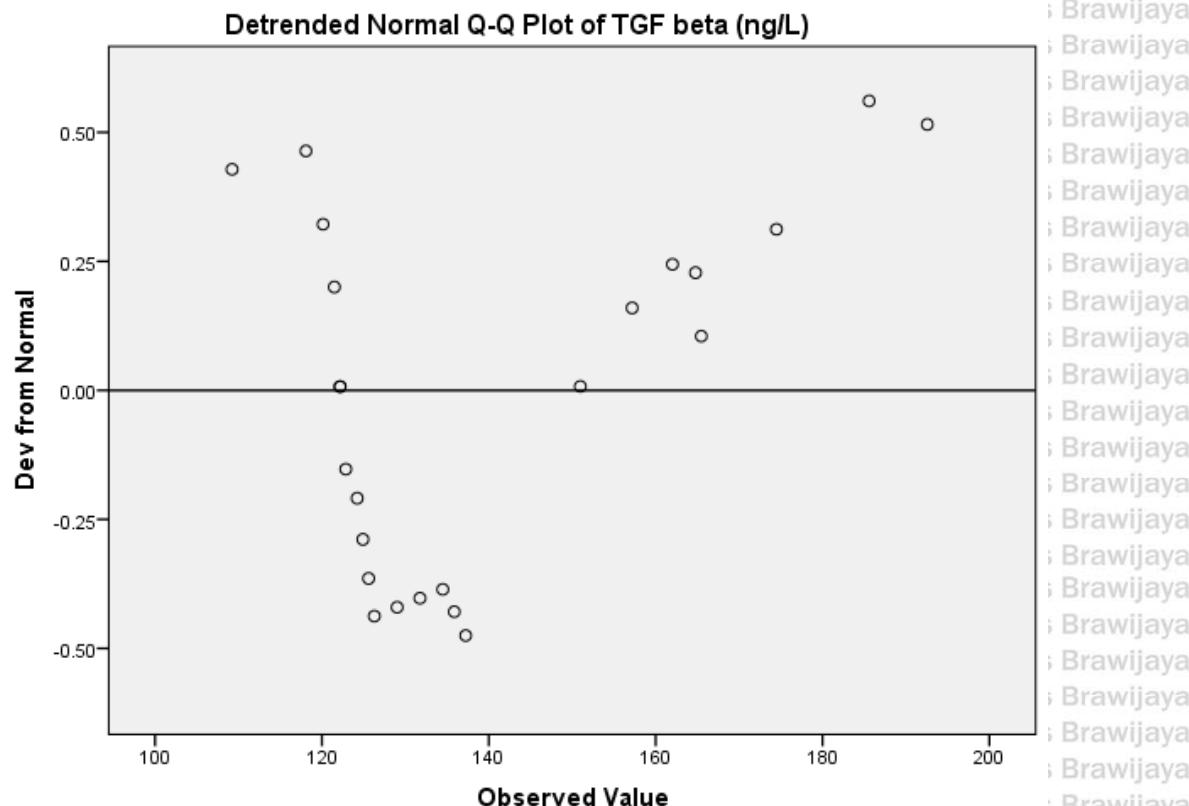
		Statistic	Std. Error
		139.93654	4.740267
TGF beta (ng/L)	Mean	139.93654	4.740267
	95% Confidence Interval for Lower Bound	130.13055	
	Mean Upper Bound	149.74253	
	5% Trimmed Mean	138.70181	
	Median	130.37700	
	Variance	539.283	
	Std. Deviation	23.222473	
	Minimum	109.226	
	Maximum	192.558	
	Range	83.332	
	Interquartile Range	38.459	
	Skewness	.934	.472
	Kurtosis	-.239	.918
	Range	8.563	
	Interquartile Range	3.508	
	Skewness	.032	.472
	Kurtosis	-.859	.918

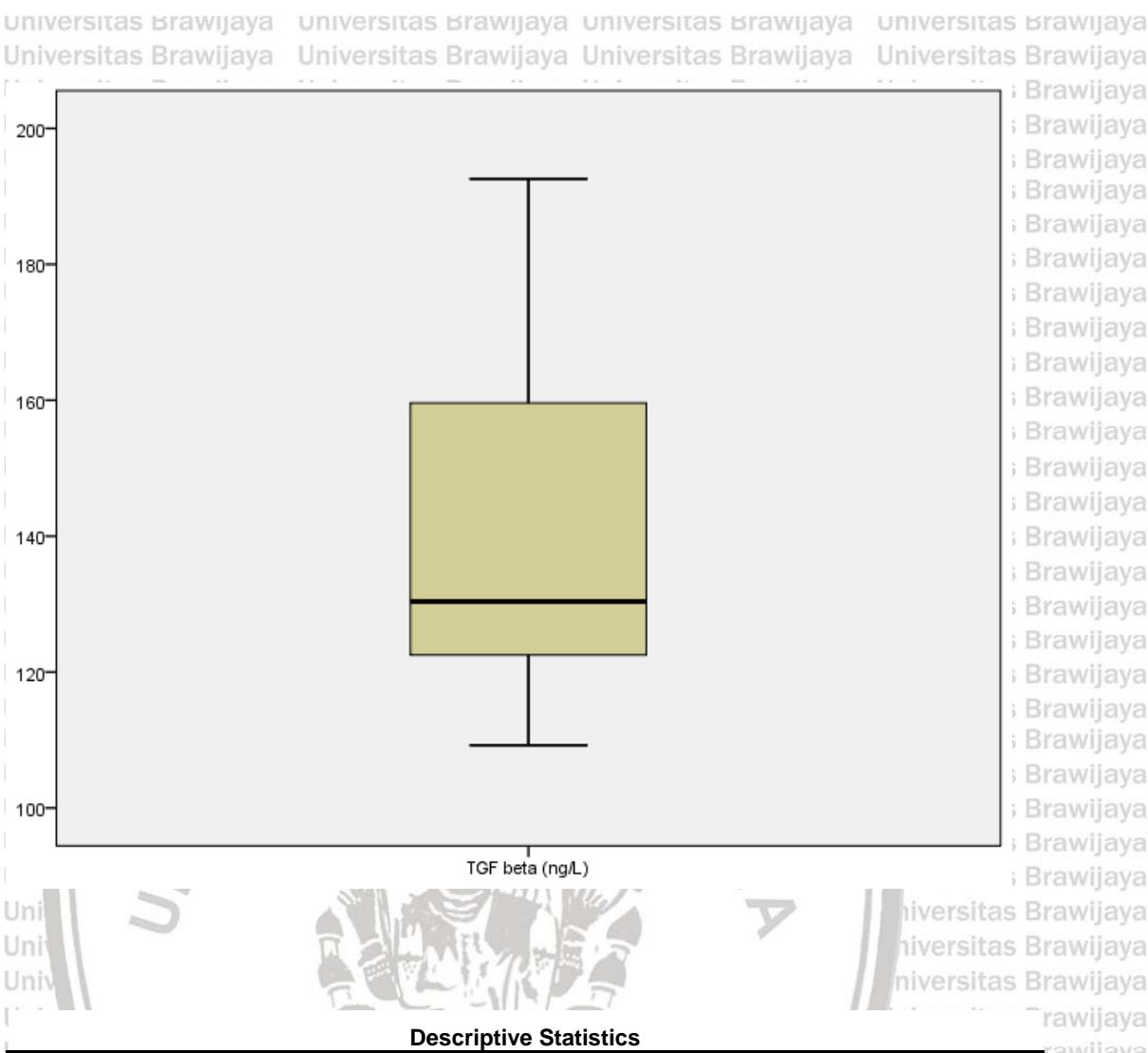
Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TGF beta (ng/L)	.213	24	.006	.875	24	.006

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction







Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Dosis	N	Mean Rank
TGF beta (ng/L)	Kontrol	6	8.08
	0.25 ug/L	6	14.42
	0.5 ug/L	6	10.17
	1 ug/L	6	17.33
	Total	24	

Test Statistics ^{a,b}	
Chi-Square	6.241
df	3
Asymp. Sig.	.100

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Dosis

Hypothesis Test Summary

Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
The distribution of TGF_b_1 is the same across categories of Kelompok_Perlakuan.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.100	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.



Descriptives

Descriptives								
TGF beta (ng/L)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	124.33767	3.216778	1.313244	120.96187	127.71347	120.126	129.008
0.25 ug/L	6	150.63050	30.285256	12.363904	118.84807	182.41293	118.079	192.558
0.5 ug/L	6	129.83333	14.585203	5.954384	114.52710	145.13957	109.226	150.974
1 ug/L	6	154.94467	22.768953	9.295386	131.05012	178.83922	124.906	185.591
Total	24	139.93654	23.222473	4.740267	130.13055	149.74253	109.226	192.558



Test of Homogeneity of Variances

TGF beta (ng/L)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.167	3	20	.002

ANOVA

TGF beta (ng/L)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4110.026	3	1370.009	3.304	.041
Within Groups	8293.489	20	414.674		
Total	12403.514	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TGF beta (ng/L)

LSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	0.25 ug/L	-26.292833*	11.756905	.037	-50.81731	-1.76836
	0.5 ug/L	-5.495667	11.756905	.645	-30.02014	19.02881
	1 ug/L	-30.607000*	11.756905	.017	-55.13147	-6.08253
0.25 ug/L	Kontrol	26.292833*	11.756905	.037	1.76836	50.81731
	0.5 ug/L	20.797167	11.756905	.092	-3.72731	45.32164
	1 ug/L	-4.314167	11.756905	.718	-28.83864	20.21031
0.5 ug/L	Kontrol	5.495667	11.756905	.645	-19.02881	30.02014
	0.25 ug/L	-20.797167	11.756905	.092	-45.32164	3.72731
	1 ug/L	-25.111333*	11.756905	.045	-49.63581	-.58686
1 ug/L	Kontrol	30.607000*	11.756905	.017	6.08253	55.13147
	0.25 ug/L	4.314167	11.756905	.718	-20.21031	28.83864
	0.5 ug/L	25.111333*	11.756905	.045	.58686	49.63581

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 7.

