Efek pegagan (*Centella asiatica* L) terhadap proliferasi *mesenchymal stem cell* (Effect of pegagan (*Centella asiatica* L) to *mesenchymal stem cell* proliferation)

¹Ira Arundina, ²Ketut Suardita

¹Department of Oral Biology,

²Department of Dental Conservative

Faculty of Dentistry, Airlangga University

Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Stem cells provide new hope to fasten the healing process of various oral diseases including periodontal tissue (periodontitis). At present time, there is not yet found a material that can fix the teeth perfectly. Adult stem cells from bone marrow widely used for treatment. Numbers of stem cell are limited so growth factor is necessary to promote proliferation of stem cells. Growth factor that has been used is expensive and difficult to get. Because of these constraints, it is necessary to develop alternative uses of medicinal plants as growth factor that accelerates wound healing process. This study is aimed to proven what extent the potential Pegagan (Centella asiatica L) as a natural growth factors to stem cells. The ability of proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells (MSC) was analyzed by adding terpenoid fraction of Centella asiatica. MTT assay data showed that the addition of Pegagan on cultured MSCs can increase stem cell proliferation. Pegagan increases the ability of MSC proliferation and differentiate into osteoblasts. It is concluded that pegagan increase the ability of MSC proliferation and differentiate into osteoblasts.

Key words: pegagan (*Centella asiatica* L), growth factor, mesenchymal stem cell

ABSTRACT

Stem cell memberi harapan baru untuk mempercepat penyembuhan dan dapat dimanfaatkan untuk terapi berbagai penyakit, termasuk periodontitis karena belum didapatkan bahan yang dapat mencekatkan kembali secara sempurna gigi yang goyang. Stem cell dewasa umumnya berasal dari sumsum tulang, namun jumlahnya terbatas sehingga diperlukan growth factor untuk meningkatkan proliferasi stem cell. Growth factor yang selama ini digunakan mahal harganya dan sulit diperoleh, oleh karenanya perlu dikembangkan penggunaan growth factor alternatif dari tanaman obat yang berpotensi mempercepat penyembuhan luka. Pegagan (*Centella asiatica* L) memiliki kandungan zat aktif golongan terpenoid, yaitu Asiaticoside, Asiatic acid dan madecassic acid yang berperan menstimulasi fibroblas agar berproliferasi dan menstimulasi sintesis kolagen untuk mempercepat penyembuhan luka. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui potensi pegagan sebagai growth factor alami terhadap stem cell. Untuk maksud tersebut dilakukan analisis kemampuan proliferasi pada mesenchymal stem cell (MSC) dengan penambahan fraksi terpenoid dari pegagan. Hasilnya menunjukkan bahwa pada MTT assay, dengan penambahan pegagan pada kultur MSC meningkatkan proliferasi stem cell. Disimpulkan bahwa penambahan pegagan pada mesenchymal stem cell dapat meningkatkan kemampuan proliferasinya.

Key words: pegagan (*Centella asiatica* L), proliferasi, mesenchymal stem cell

Koresponden: Ira Arundina, Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jln Mayjend Prof Dr Moestopo no. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: arundinafkg@yahoo.com

PENDAHULUAN

Periodontitis merupakan infeksi pada jaringan penyangga gigi-geligi yang menyebabkan hilangnya perlekatan jaringan gigi sehingga gigi goyah dan tanggal sebelum waktunya. Hal tersebut merupakan masalah besar di bidang Kedokteran gigi. Saat ini prevalensi penyakit periodontitis di Indonesia cukup tinggi dan masih belum menunjukkan penurunan. Usaha penanggulangan terhadap penyakit ini telah banyak dilakukan, baik dengan cara operasi maupun non-operasi. Namun sampai saat ini masih belum diketemukan suatu bahan yang dapat mencekatkan kembali gigi goyah secara sempurna. Oleh karena itu besar harapan bahwa *stem cell* dapat mengatasi masalah tersebut.

Adanya *stem cell* memberi harapan baru untuk mempercepat penyembuhan dan dapat dimanfaatkan untuk terapi berbagai penyakit infeksi, termasuk periodontitis. *Stem cell* yaitu *unspecialized cell*, memiliki 2 komponen, yaitu mampu berdiferensiasi menjadi berbagai sel dan mampu beregenerasi. Penggunaan *stem cell* embrionik masih dilarang di berbagai negara seperti AS, Jerman dan Prancis. Untuk mencegah kontroversi maka akhir-akhir ini, digunakan *stem cell* dewasa, yaitu dari sumsum tulang. Namun jumlah *stem cell* terbatas sehingga diperlukan suatu *growth factor* untuk meningkatkan proliferasi *stem cell*.¹ *Growth factor* yang selama ini digunakan masih mahal harganya dan sulit didapat. Karena banyak ditemui kendala untuk penyediaannya,

maka perlu dikembangkan penggunaan *growth factor* alternatif dari tanaman obat yang berpotensi untuk mempercepat penyembuhan luka.

Pegagan (*Centella asiatica L*) memenuhi kriteria persyaratan tersebut dan kandungan zat aktifnya, golongan terpenoid yaitu *Asiaticoside*, *Asiatic acid* dan *madecassic acid* berperan untuk menstimulasi fibroblas agar berproliferasi dan menstimulasi sintesis kolagen untuk mempercepat penyembuhan luka.² Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui potensi pegagan sebagai *growth factor* alami terhadap *stem cell*.

BAHAN DAN METODE

Dilakukan pengecekan kemampuan proliferasi dari *mesenchymal stem cell* (MSC) yang terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok *mesenchymal stem cell* yang diberi terpenoid dari pegagan sebagai *growth factor*, serta kelompok yang tidak diberi terpenoid dari pegagan. Sel dibiakkan dalam 96/*well plate* dalam media DME. Dilakukan penambahan terpenoid pegagan dosis 320 µg/mL sebanyak 100 µL pada kelompok yang diberi dan yang tidak diberi

tidak dilakukan penambahan zat terpenoid pegagan; sel dibiakkan selama 4 hari. Selanjutnya dilakukan *MTT assay* menggunakan *MTT assay kit*, lalu diukur absorbansi dari supernatan menggunakan kolorimetri (Elisa reader) dengan panjang gelombang 550 nm.³

Dilakukan pengecekan kemampuan *osteogenic differentiation* dari MSC, yang terbagi dua menjadi kelompok sel kombinasi MSC dan terpenoid dari pegagan. Kelompok yang tanpa kombinasi terpenoid pegagan dan kontrol dibiakkan selama 21-28 hari di dalam media DME dengan ditambahkan 10 mM beta-glycerophosphate, 100 nM dexamethasone, dan 50 µg/ml ascorbic acid-2-phosphate (media A). Namun Kelompok kontrol tidak diberi media A tetapi hanya dibiakkan dalam media DME. Dilakukan pewarnaan dengan *Alizarin red staining*.³

HASIL

Pada gambar 1 dan 2 terlihat hasil pengecekan kemampuan proliferasi dari MSC pasca penambahan pegagan. Sedangkan pada gambar 3 terlihat hasil *MTT assay* bahwa penambahan pegagan pada kultur MSC dapat meningkatkan proliferasi *stem cell*.

Gambar 1 Kultur MSC dan pegagan pada **A** hari ke-2; **B** pada hari ke-4

Gambar 4

(-) induction medium:

(+) induction medium:

Gambar 4 Osteogenic differentiation

Hasil pengecekan kemampuan dari *osteogenic differentiation* dari *mesenchymal stem cell* setelah penambahan pegagan yang di kultur selama 28 hari dan ditambahkan *osteogenic induction* media terlihat pada gambar 4, yaitu adanya mineralisasi pada kultur setelah dilakukan pengecatan dengan *alizarin red*.

PEMBAHASAN

Stem cell adalah sel *immature* atau sel yang belum berdiferensiasi yang mempunyai kemampuan untuk memproduksi sel yang sama jenis dengan sel itu sendiri, serta mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi paling sedikit satu tipe sel. *Stem cell* berbeda dengan *progenitor cell* yaitu sel yang hanya bisa berdiferensiasi menjadi satu jenis sel lain. *Stem cell* dapat membelah dan mempunyai sifat *self-renewing* untuk jangka waktu yang lama. *Stem cell* juga bersifat *unspecialized*, yaitu tidak mempunyai fungsi yang spesifik serta mempunyai kemampuan untuk berubah menjadi *specialized cell*.¹ *Stem cell* juga bisa didapatkan pada jaringan pulpa gigi yang berfungsi untuk memproduksi odontoblas, sel ini berperan dalam pembentukan *reparative dentin*.⁴

Mesenchymal stem cell didefinisikan sebagai *adult stem cell* yang bersifat multipotensial yaitu mempunyai kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel seperti *osteoblast*, *chondrocyte*, *adipocyte*, *fibroblast*, *muscle cell*, dan *neural cell*.⁵ Sel MSC dapat ditemukan dalam berbagai macam jaringan tubuh dewasa, misalnya *adipose tissue*, *periosteum*, *synovial membrane*, *muscle*, *dermis*, *pericyte*, *blood*, *trabecular bone* serta *bone marrow*. *Bone marrow* merupakan sumber MSC yang terbanyak serta paling *accessible*.⁶

Jumlah MSC yang terdapat dalam *bone marrow* hanya 0,01 sampai 0,0001% dari *total nucleated cell bone marrow*.⁷ *Growth factor* memegang peranan penting dalam memperbanyak jumlah MSC. MSC adalah stem cell yang bereaksi positif terhadap *Stro-1 monoclonal antibody* dan bereaksi negatif terhadap *CD34 antigen*. Selain adanya usaha untuk memperbanyak jumlah sel, usaha untuk mengatur proses diferensiasi MSC juga merupakan faktor

yang sangat penting. Secara invitro, MSC dapat diarahkan untuk berdiferensiasi yang sesuai dengan kehendak kita misalnya untuk dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, MSC harus dibiakkan dalam *osteogenic medium* yang mengandung zat *beta-glycerophosphate*, *ascorbic acid*, dan *dexamethason*. Untuk proses diferensiasi MSC, beberapa *growth factor* memegang peranan penting. Kombinasi antara bFGF dan BMP2 secara *in vivo* dapat meningkatkan kemampuan MSC untuk membentuk jaringan tulang. BMP serta reseptor BMP dapat mempengaruhi kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi jaringan tulang atau jaringan lemak.⁸

Pada proses *healing*, adanya *stem/progenitor cell* merupakan faktor penting. Sel-sel ini akan berproliferasi dan bermigrasi ke arah luka dan berdiferensiasi menjadi *specific cells* yang akan mengganti sel yang mati akibat adanya *injury*. Pada penderita usia tua, jumlah *stem cell* akan berkurang sehingga penambahan *exogenous stem cell* sangatlah berguna. Untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup, *stem cell* dapat diperbanyak di luar tubuh, dan setelah itu sel tersebut dapat diaplikasikan pada kavitas dengan menggunakan *scaffold* yang sesuai. Perlu diperhatikan bahwa usaha memperbanyak jumlah *stem cell* tidak boleh menghilangkan kemampuan sel tersebut untuk berdiferensiasi. *Growth factor* merupakan bahan yang dapat membantu proses proliferasi dan diferensiasi dari stem cell. *Growth factor* yang sering digunakan di dalam proses ini diantaranya *transforming growth factors-beta* (TGF-beta), *bone morphogenetic proteins* (BMP), *platelet derived growth factor* (PDGF), dan *fibroblast growth factors* (FGF).⁵

Sel MSC yang berasal dari *bone marrow* akan melekat pada dasar *cell culture dish* sedangkan sel lainnya tidak akan menempel pada permukaan dan akan hilang selama pergantian media kultur. Secara morfologi, MSC adalah sel yang serupa dengan sel fibroblas. Sel MSC mulai terlihat menempel pada permukaan *dish* pada hari ke-7 dan sel akan cepat membentuk koloni dan memperbanyak diri. Sel MSC adalah sel yang mempunyai kemampuan untuk menduplikasikan dirinya menjadi sel yang sama

dengan dirinya (*self renewal capacity*), akan tetapi kemampuan proliferasi sel MSC akan berkurang seiring dengan jumlah *passage* yang dilakukannya. Selain itu faktor usia *host* juga akan mempengaruhi kemampuan proliferasi MSC.

Pada penelitian ini pegagan dengan dosis 320 µg/mL sebanyak 100 µL mampu meningkatkan proliferasi MSC. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian dari ⁹Tsutsumi dkk, yang menyatakan bahwa FGF-2 dapat meningkatkan *growth rate* dan *life span* MSC yang berasal dari tulang ilium dan tibia hewan kelinci serta manusia. Diferensiasi osteogenik MSC yang berasal dari *bone marrow* tulang femur tikus akan meningkat dengan penambahan pegagan; terlihat dari lebih pekatnya hasil pengecatan dengan *alizarin red*. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Tsutsumi dkk⁹ yang tidak memperoleh peningkatan level dari PPAR-gama2 mRNA pada kultur MSC kelinci yang ditambahkan FGF-2. PPAR-gama2 adalah salah satu *marker* dari diferensiasi adiposit.¹⁰ Dari hasil penelitian ini, diketahui pegagan mempunyai fungsi seperti FGF2 yaitu sebagai *growth factor* alami. Mekanisme dari kemampuan FGF-2 untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi MSC sebenarnya belum diketahui dengan pasti. FGF-2 adalah *growth factor* yang akan berinteraksi dengan reseptor yang ada di permukaan sel. Reseptor dari FGF-2 digolongkan ke dalam reseptor tipe I karena polipeptida reseptor FGF-2 hanya menembus transmembran sel sebanyak satu kali saja; *signaling pathway* dari FGF-2 sehingga meningkatkan proliferasi sel mungkin berdasarkan atas *ras pathway*.

Pada fraksi terpenoid tanaman pegagan terdapat kandungan *asiaticoside* yang dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan sintesis matriks ekstra sel pada *human dermal fibroblast culture* dalam proses penyembuhan luka. *Asiaticoside* dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan sintesis matriks ekstra sel melalui mRNA dan produksi protein pada sel target.² Penelitian membuktikan bahwa *asiaticoside* menginduksi sintesis kolagen tipe I pada sel fibroblas manusia melalui aktivasi *TGF- β reseptor* *I kinase-independent Smad pathway*.^{11,12} Kandungan *asiaticoside* diketahui dapat mensintesis fibronectin. Fibronectin merupakan grup keluarga glikoprotein (termasuk dalam kompleks matriks ekstra sel) yang adesif dengan berat molekul tinggi, melapisi serat fibrin dalam bekuan darah pada proses penyembuhan

luka, bersifat adesif, serta memudahkan migrasi sel endotel dan regulasi formasi kapiler. Fibronectin memiliki kemampuan merangsang makrofag dalam mengaktifkan *growth factor*. *Growth factor* berperan penting dalam proliferasi fibroblas yang nantinya menghasilkan kolagen. *Asiaticoside* diketahui juga mampu meningkatkan produksi antioksidan secara enzimatis dan non-enzimatis (*superoxide dismutase*, *katalase*, *glutathion peroxidase*, Vitamin E, dan asam askorbat) serta dapat meningkatkan sintesis matriks ekstra sel pada proses penyembuhan luka.¹³ *Asiaticoside* juga dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblas melalui TGF- β . TGF- β menstimulasi makrofag untuk mensekresi sitokin TNF- α dan IL-1 serta FGF dan PDGF. Lebih jauh lagi, TGF- β akan meningkatkan kemotaksis fibroblas dan sel-sel otot polos, serta memodulasi ekspresi kolagen dan kolagenase. FGF bertugas mengontrol sel serta berperan dalam angiogenesis (proses pembentukan pembuluh darah baru), dalam penyembuhan luka berperan dalam migrasi makrofag, sel fibroblas dan sel endotel, serta migrasi epitel untuk membentuk epidermis baru. Selanjutnya sel akan merespon dengan memproduksi matriks agar terjadi deposisi jaringan ikat yang baru saat fase proliferasi.¹⁴ Salah satu dari triterpenoid ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yaitu *asiatic acid* juga dapat menstimulasi sintesis kolagen pada penyembuhan luka tikus.¹⁵ Selain itu, *asiatic acid* dan *madecassic acid* dapat mempengaruhi proliferasi fibroblas dengan cara merangsang TNF- α .¹⁰ TNF- α pada dasarnya diketahui dapat menstimulasi sintesis DNA dan proliferasi sel fibroblas baik secara langsung maupun dengan cara menginduksi PDGF. PDGF bersama dengan TGF- β berperan dalam tahap inflamasi dan tahap proliferasi. PDGF yang menginisiasi kemotaksis dari neutrofil, makrofag, sel otot polos, dan fibroblas, serta menstimulasi mitogenesis fibroblas.^{14,16}

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa penambahan pegagan pada *mesenchymal stem cell* meningkatkan kemampuan proliferasi MSC. Selain itu, penambahan pegagan meningkatkan kemampuan MSC untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas. Untuk itu disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan pegagan untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi MSC secara *in vivo* pada binatang coba. Selanjutnya bisa diaplikasikan sebagai terapi periodontitis pada hewan coba untuk menjadi dasar terapi pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pelled G, Turgeman G, Aslan H, Gazit Z, Gazit D. Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and tissue engineering. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8: 1917-28

2. Lu L, Ying K, Wei S, Fang Y, Liu Y, Lin H, Ma L. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblas. *Int J Dermatol* 2004; 43(11):801-7.
3. Freshney RI. Culture of animal cells a manual of basic technique. 4 Ed. Wiley Liss.; 2000. Pp. 329-43.
4. Gronthos S, Barthold PM, Shi S. Stem cell and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 2006; 40:164-72
5. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: The first decade and beyond. *J Cell Biochem* 1998; Supp. 30/31: 297-303.
6. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells:building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; 7: 259-64.
7. Bluteau G, Luder HU, Debari C, Mitsiadis TA. Stem cell for tooth engineering. *Eur Cell Mater* 2008; 16:1-9
8. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003;5: 32-45.
9. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Comm* 2001; 288: 413-9.
10. Coldren CD, Hashim P, Ali JM, Oh SK, Sinskey AJ, Rha CK. Gene expression changes in the human fibroblast induced by Centella asiatica triterpenoid. *Planta Med* 2003; 69(8):725-32
11. Lee J, Jung E, Kim Y, Park J, Park J, Hong S, Kim J. Asiaticoside induces human collagen I synthesis through TGFbeta receptor I kinase (TbetaRI kinase)-independent Smad signaling. *Planta Med* 2006; 72(4):324-8
12. Zheng CJ, Qin LP. Chemical components of Centella asiatica l urban and their bioactives. *J Chinese Integrative Medicine* 2007; 5(3):348-51
13. Shukla A, Dhawan BN. Asiaticoside induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytother Res* 1999; 13(1) : 4-50.
14. Diegelmann, Evans RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic, and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9:283-9
15. Shetty BS, Udupa SL, Udupa AL, Somayaji SN. Effect of Centella asiatica on normal and dexamethazone-suppressed wound healing in wistar albino rats. *Int J Lower Extremity Wounds* 2006; 5(3):137-43
16. Mercandetti M, Cohen AJ. Wound healing, healing and repair. [serial online] 2009 [cited 2009 Sept 4th]; Available from: URL: emedicine.medscape.com