

## Kesan Rawatan Krim Ekstrak Air Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) terhadap Analisis Gen yang Terlibat dengan Proses Penyembuhan Luka melalui Kajian *in vitro* Model Kulit Manusia 3D dan *in vivo* Model Tikus

(Effects of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) Water Extract Cream on Gene Analysis Involved in Wound Healing Process Through the Study of *in vitro* 3D Human Skin Model and *in vivo* Rat Model)

SITI MUNEERAH MOHD ABD RAHMAN<sup>1</sup>, AFIQAH SHAFIFY AMRAN<sup>1</sup>, NUR SHAZWANI MOHD PILUS<sup>1</sup>, ISA NAINA MOHAMED<sup>2</sup> & NURUL YUZIANA MOHD YUSOF<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jabatan Sains Bumi dan Alam Sekitar, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

<sup>2</sup>Jabatan Farmakologi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan, Malaysia

Diserahkan: 10 Disember 2021/Diterima: 17 Februari 2022

### ABSTRAK

Kajian ini melaporkan kesan rawatan bagi dua sediaan krim yang masing-masing mengandungi 1% ekstrak air bagi dua varieti *L. pumila* iaitu var. *alata* dan var. *pumila* terhadap penyembuhan luka melalui uji kaji menggunakan model tikus dan model kulit manusia 3D EpidermFull Thickness (Mat Tek, USA) melalui penentuan penutupan luka dan analisis pengekspresan gen terpilih bagi mekanisme penyembuhan luka tisu kulit (gen TGF-1, IL-6, EGF, CBL dan COL3A1 untuk tikus; gen IL-10, TGFβ-1 dan COL3A1 untuk manusia) menggunakan pendekatan tindak balas berantai polimerase kuantitatif (qPCR). Selepas rawatan, kawasan luka pada kulit bahagian atas badan tikus diukur pada hari ke-2, ke-5 dan ke-8, serta disampel untuk analisis pengekspresan gen. Bagi uji kaji *in vitro* tisu binaan kulit manusia, perubahan terhadap setiap lapisan luka yang dibuat pada binaan tisu kulit tersebut dicerap melalui pemerhatian histologi dan dianalisis bagi profil pengekspresan gen berdasarkan sela hari ke-2, ke-5 dan ke-6. Rawatan krim ekstrak air *L. pumila* kedua-dua varieti didapati hanya berkesan membantu penutupan luka bagi tikus betina iaitu 79.58% bagi var. *alata* pada hari ke-5 rawatan dan 75.97 dan 95.04% bagi var. *pumila* masing-masing pada hari ke-5 dan ke-8 rawatan tetapi tidak berkesan kepada tikus jantan. Namun begitu, dari segi tempoh penutupan luka lengkap, didapati kesemua rawatan menunjukkan luka ditutup lebih cepat berbanding kawalan (17 hari) iaitu di antara 12 sehingga 13 hari. Analisis gen bagi sampel luka tikus menunjukkan peningkatan aras gen hanya melibatkan gen IL-6 untuk tikus jantan yang dirawat dengan *L. pumila* var. *alata* iaitu sebanyak 1722784 salinan mRNA pada hari ke-2 rawatan, gen CBL untuk tikus betina yang dirawat dengan *L. pumila* var. *alata* berjumlah 46137 salinan mRNA pada hari ke-5, dan gen COL3A1 bagi rawatan *L. pumila* var. *alata* untuk kedua-dua kumpulan jantina, iaitu masing-masing  $2.44 \times 10^8$  salinan mRNA (betina) dan  $3.91 \times 10^8$  salinan mRNA (jantan). Berdasarkan pemerhatian histologi sampel luka model kulit manusia 3D, rawatan kedua-dua varieti *L. pumila* menunjukkan kesan pengunjuran sel daripada kawasan luka pertumbuhan tetapi analisis gen tidak menunjukkan perubahan yang tidak signifikan terhadap gen kajian. Secara keseluruhannya, hasil kajian ini dapat menunjukkan potensi *L. pumila* dalam penyembuhan luka tetapi perlu dimantapkan lagi pada masa hadapan melalui strategi uji kaji *in vivo* dan *in vitro* yang lebih optimum.

Kata kunci: Asai penyembuhan luka; ekstrak air *Labisia pumila*; model tisu bersamaan kulit manusia

### ABSTRACT

This study reported the treatment effects of two cream preparations each containing 1% water extract for two variations of *L. pumila* namely var. *alata* dan var. *pumila* on wound healing based on experiments using rat model and three dimensional (3D) human skin model, Epiderm Full Thickness (Mat Tek Corporation, USA) through wound closure assessment and analysis of selected gene expression for skin tissue wound healing mechanism (TGF-1, IL-6, EGF, CBL genes and COL3A1 for rats; the genes IL-10, TGFβ-1 and COL3A1 for humans) using a quantitative polymerase chain

reaction (qPCR) approach. After treatment, the lesion area on the skin of the upper body of the rats was measured on days 2, 5 and 8, as well as sampled for gene expression analysis. For *in vitro* experiments of human skin tissue, changes to each layer of lesion made on the skin tissue were observed through histological observations and analyzed for gene expression profiles based on 2nd, 4th, and 6th day intervals. Water extract treatments of *L. pumila* of both variations was found to be only effective in helping wound closure for female rats at 79.58% for var. *alata* on the 5th day of treatment and 75.97 and 95.04% for var. *pumila* on the 5th and 8th day of treatment, respectively, but was ineffective in male rats. However, in terms of the period of complete wound closure, it was found that all treatments showed that the wound closed faster than the control (17 days), which is between 12 and 13 days. Gene analysis for rat wound samples showed increased gene levels involving only the IL-6 gene for male rats treated with *L. pumila* var. *alata* with a total of 1722784 messenger ribonucleic acid (mRNA) copy number on day 2 of treatment, the CBL gene for female mice treated with *L. pumila* var. *alata* totaled 46137 mRNA copy number on day 5, and the COL3A1 gene for the treatments of *L. pumila* var. *alata* for both sex groups, with total of  $2.44 \times 10^8$  mRNA copy number (females) and  $3.91 \times 10^8$  mRNA copy number (males), respectively. Based on histological observation of human skin tissue-constructed wound samples, treatments of both variants of *L. pumila* showed a cell projection effect from the growth wound area but gene analysis showed insignificant changes to the study genes. Overall, the results of this study can indicate the potential of *L. pumila* in wound healing but needs to be further strengthened in the future through more optimal *in vivo* and *in vitro* experimental strategies.

Keywords: Human skin equivalent tissue model; *Labisia pumila* water extract; wound healing assay

## PENDAHULUAN

Selama berabad-abad, *Labisia pumila* atau dikenali sebagai kacip Fatimah telah digunakan sebagai ubat tradisi untuk mengatur kitaran haid, rawatan untuk penjagaan sebelum dan selepas bersalin di samping menjadi penggalak tenaga bagi wanita (Burkill 1966; Singh et al. 2009). Ia juga digunakan untuk rawatan masalah kesihatan berkaitan wanita termasuk senggugut dan penyakit kelamin (Burkill 1966; Indubala & Ng 2000; Jamal et al. 200; Wiart 2002). Selama ini, dipercayai ramuan berasaskan *L. pumila* ini bermanfaat bagi wanita kerana ia mempunyai aktiviti fitoestrogen (Mukrish et al. 2013; Nadia et al. 2012).

Aktiviti fitoestrogen oleh *L. pumila* dikesan melalui penemuan daripada beberapa penyelidikan lepas yang mengkaji rawatan ekstrak spesies herba ini ke atas tikus betina yang dibuang ovari dan didapati mempunyai kesan yang serupa dibandingkan dengan tikus yang diberi rawatan terapi penggantian estrogen (Al-Wahaibi et al. 2008; Ma et al. 2010). Walau bagaimanapun, masih kurang bukti dan maklumat farmakologi yang cukup kuat untuk menyokong potensi *L. pumila* sebagai bahan fitoestrogen. Malah, aktiviti fitoestrogen mungkin tidak menyamai estrogen dan mungkin melibatkan mekanisme yang kompleks melalui tapak jalan sama ada bergantung hormon atau tidak. Ini hanya boleh terjawab dengan analisis fitokimia untuk mengenal pasti sebatian aktif dan melalui kajian biologi molekul melalui model haiwan atau sel bagi mendapatkan maklumat tapak jalan yang mungkin terlibat dalam aktiviti fitoestrogen akibat kesan rawatan *L. pumila* (Poh et al. 2012).

Selain diketahui mempunyai potensi dalam rawatan tradisi, *L. pumila* juga digunakan secara meluas oleh para wanita daripada kalangan etnik Melayu sebagai makanan tambahan (Hussain & Kadir 2013). Menurut Abdullah et al. (2013), kandungan ekstrak daun dan akar *L. pumila* mempunyai sebatian bioaktif yang tinggi seperti sebatian alkil, saponins, flavonoid, terbitan benzokuinon, isoflavonoid dan asid fenol. Kandungan bioaktif ini mempunyai potensi daripada aspek bioperubatan dan farmakologi yang lain seperti anti-radang, anti kanser (Azimahtol et al. 2011; Karimi & Jaafar 2011), serta dapat memberi perlindungan daripada cahaya ultra-lembayung (Choi et al. 2010).

*Labisia pumila* adalah herba daripada keluarga *Myrsinaceae*. Di Malaysia, terdapat tiga varieti spesies tumbuhan ini yang utama, iaitu (i) var. *pumila*; (ii) var. *alata*; dan (iii) var. *Lanceolata* (Stone 1988) dengan ketiga-tiganya berbeza dari segi ciri fizikal dan kimia. Kajian ini hanya tertumpu pada dua jenis *L. pumila* iaitu var. *alata* dan var. *pumila* yang dipilih berdasarkan dua varieti yang paling banyak digunakan sebagai tanaman perubatan (Azidah et al. 2012). Berdasarkan kegunaan *L. pumila* dalam rawatan selepas bersalin, kemungkinan besar ia juga mempunyai potensi dalam penyembuhan luka akibat kecederaan pada kawasan perineum semasa proses bersalin. Walaupun terdapat banyak penyelidikan yang dilakukan untuk mengaitkan spesies tumbuhan ini dengan pelbagai manfaat kesihatan dan perubatan, potensi *L. pumila* untuk penyembuhan luka masih belum diterokai.

Bagi proses penyembuhan luka pada tisu kulit, ia melibatkan empat fasa peringkat sel yang utama, iaitu: (i) hemostasis, (ii) inflamasi, (iii) proliferasi dan (iv) pembentukan semula tisu (Gurtner et al. 2008). Oleh itu, dalam kajian ini, kesan penggunaan krim ekstrak air *L. pumila* terhadap penyembuhan luka telah ditentukan melalui analisis penutupan luka dan profil mRNA bagi gen yang terlibat dengan fasa dalam mekanisme penyembuhan luka menggunakan kedua-dua pendekatan uji kaji secara *in vivo* dan *in vitro*. Bagi mendapatkan bukti fizikal mengenai kesan penyembuhan luka pada tisu kulit, penutupan luka diukur pada model tikus dan perubahan histologi diperhatikan pada model kulit manusia 3D EpiDerm Full Thickness (MatTek Corporation, Amerika Syarikat). Pengekspresan gen berdasarkan bilangan salinan mRNA ditentukan melalui analisis qPCR untuk mengenal pasti kesan rawatan *L. pumila* terhadap mekanisme penyembuhan luka pada peringkat molekul, iaitu gen interleukin 10 (IL-10), interleukin 6 (IL-6) untuk fasa inflamasi dan faktor tumbesaran tumor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) untuk kedua-dua fasa inflamasi dan fasa proliferasi; gen faktor tumbesaran epidermis (EGF) dan *casitas B-lineage lymphoma* (CBL) mewakili fasa proliferasi; serta gen kolagen jenis 3 rantai alfa 1 (COL3A1) dipilih untuk fasa pembentukan semula tisu. Strategi menggunakan kedua-dua uji kaji *in vivo* dan *in vitro* ini dapat memberikan gambaran yang lebih baik terhadap kemungkinan potensi penggunaan krim ekstrak air daripada *L. pumila* ini daripada aspek etnofarmakologi iaitu bidang kajian berkaitan kosmetik serta penyembuhan terhadap kulit bermasalah menggunakan herba tradisi dan ekstrak tumbuhan (Aburjai & Natsheh 2003; Agyare et al. 2009).

## BAHAN DAN KAEDAH

### SAMPEL *L. pumila*

Daun *L. pumila* var. *alata* dan var. *pumila* diperoleh daripada hutan hujan di Taiping, Perak. Spesimen baucar dimasukkan ke Herbarium UKM di Fakulti Sains dan Teknologi. Nombor spesimen baucar untuk var. *alata* adalah UKMB 30006/SM 2622 dan var. *pumila* ialah UKMB 30007/SM s.n. Sampel dikeringkan pada suhu 60 °C di dalam oven dan diproses menggunakan pengisar. Serbuk *L. pumila* yang diperoleh disimpan di dalam peti sejuk -20 °C.

PENYEDIAAN KRIM EKSTRAK AIR DAUN *L. pumila* var. *alata* DAN var. *pumila*

Proses pengestrakan akueus menggunakan air

dilakukan oleh Prof. Madya Dr. Jamia Azdina Jamal daripada Fakulti Farmasi, UKM berdasarkan kaedah refluks terpiawai oleh Jamal et al. (2013). Krim bagi kedua-dua *L. pumila* var. *alata* dan *L. pumila* var. *pumila* untuk tujuan rawatan uji kaji disediakan pada formulasi 1% dengan mencampurkan 1 g serbuk ekstrak daun ke dalam 100 g pengemulsi setamakrogol berdasarkan kajian lepas oleh Ahmad et al. (2018).

### ASAI PENYEMBUHAN LUKA MENGGUNAKAN MODEL TIKUS

Penggunaan tikus untuk penyelidikan ini telah mendapat kelulusan Jawatankuasa Etika haiwan UKM (FST/2016/NURUL/23-MAR./745-APR.-2016-DEC.-2016). Sejumlah 48 ekor tikus Sprague-Dawley dewasa betina dan 48 ekor tikus jantan berusia 2-3 bulan dengan berat tubuh antara 200-300 g yang diperoleh dari Rumah Haiwan UKM, UKM Bangi, digunakan dalam penyelidikan ini. Untuk prosedur anestesia sepanjang uji kaji, tikus disuntik dengan campuran ketamin, xilazina dan zoletil 50 (1: 1: 1, v/v/v) yang mana 0.1 mL disuntikkan untuk setiap 100 g berat badan tikus. Untuk pengsankan tikus, dietil eter digunakan. Manakala untuk mematikan tikus, kebuk karbon dioksida CO<sub>2</sub> digunakan.

Selepas dibius secara sistemik supaya tikus tidak sedar sepenuhnya, empat luka berdiameter 6 mm dibuat menggunakan alat penebuk biopsi 6 mm pada permukaan dorsal setiap badan tikus yang telah dicukur. Kemudiannya, kedua-dua tikus betina dan jantan dibahagikan kepada tiga kumpulan yang terdiri daripada dua belas setiannya: iaitu (i) kawalan negatif iaitu tikus dengan luka yang tidak diberikan sebarang rawatan; (ii) tikus dengan luka yang dirawat dengan krim 1% ekstrak air daun *L. pumila* var. *pumila*; dan (iii) tikus dengan luka yang dirawat dengan krim 1% ekstrak air daun *L. pumila* var. *alata*.

Pada hari ke-2, ke-5 dan ke-8, tiga ekor daripada setiap kumpulan uji kaji dikorbankan bagi pencerapan kawasan luka dan pengestrakan RNA jumlah untuk analisis pengekspresan gen. Baki tiga ekor bagi setiap kumpulan dibiarkan sehingga luka tertutup sepenuhnya. Untuk mengukur kawasan luka, helaian plastik ditekup di atas permukaan luka dan dengan perlahan-lahan pinggiran kawasan luka disurih. Kemudiannya, kepingan plastik tersebut diimbas bersebelahan pembaris sebagai rujukan untuk penskalaan dan dengan menggunakan perisian ImageJ Versi 2.0 (National Institute of Health, USA), luas kawasan luka ditentukan ( $x$ ). Luka asal dibuat oleh penebuk biopsi berdiameter 6 mm. Oleh itu, kawasan luka asal tersebut adalah bersamaan dengan  $A=\pi r^2$ ,

dengan radius penebuk biopsi,  $r = 3$  mm, menghasilkan luas kawasan luka awal bersamaan dengan  $28.27 \text{ mm}^2$ . Pengiraan peratus penyembuhan luka adalah seperti persamaan yang berikut:

Peratus penyembuhan luka (%)

$$= \frac{\text{saiz luka asal (mm}^2) - \text{saiz luka semasa (mm}^2)}{\text{saiz luka asal (mm}^2)} \times 100\%$$

Bagi tujuan perbandingan antara kumpulan rawatan berbeza dalam kalangan jantina yang sama, analisis statistik ANOVA sehala diikuti dengan ujian perbandingan LSD *post-hoc* dengan aras signifikan  $p < 0.05$  dilakukan menggunakan pakej perisian SPSS Statistic Versi 22 (International Business Machines Corporation, USA). Data dinyatakan sebagai purata peratus  $\pm$  sisihan (SEM).

#### ASAI PENYEMBUHAN LUKA MENGGUNAKAN BINAAN TISU KULIT MANUSIA

Setibanya binaan tisu EpiDerm FT yang dibeli daripada MatTek (USA) di makmal, media asal tisu ditukar dengan media Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) yang baru. Gel agarosa pada bahagian bawah *well insert* dibuang dan pemeriksaan visual dilakukan bagi mengenal pasti jika terdapat kerosakan tisu, kontaminasi atau kelembapan. Tompok kekuningan yang disebabkan oleh perubahan metabolik yang mengakibatkan perubahan pH media adalah normal. Kemudian, tisu dieram selama 1 jam untuk membuang metabolit yang terkumpul semasa proses penghantaran yang seterusnya membersihkan membran mikroporous, sebelum dipindahkan ke dalam piring kultur 6-telaga yang mengandungi media baru. Piring kultur dieram selama 18 - 24 jam ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ,  $95\% \text{ RH}$ ). Pra-pengeraman semalaman ini dilakukan untuk menyegarkan kembali tisu untuk asai penyembuhan luka. Semua langkah pengeraman kultur tisu manusia dalam uji kaji adalah pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dengan kandungan  $\text{CO}_2$   $5\%$  dan kelembapan  $95\%$ .

Bagi menghasilkan luka, sebanyak 24 sampel tisu epidermis manusia EpiDerm-FT™ telah ditebuk menggunakan penebuk biopsi bersaiz 3 mm (Kai Medical, Jepun). Bagi sampel tisu rawatan, kawasan luka biopsi disapu dengan selapis krim ekstrak air  $1\%$  *Labisia pumila* var. *alata* dan  $1\%$  *Labisia pumila* var. *pumila*, manakala tiada apa-apa rawatan bagi sampel tisu kawalan negatif. Semua sampel dieram dan setiap set duplikasi sampel tisu bagi rawatan dan kawalan

negatif diproses berdasarkan sela masa 2, 4 dan 6 hari untuk melihat kesan penyembuhan luka. Media kultur tisu ditukar setiap hari sehingga tamat uji kaji. Setiap binaan tisu kulit dipotong dua secara keratan rentas yang mana satu bahagian disimpan di dalam formalin dan satu bahagian lagi digunakan untuk pengekstrakan RNA. Selepas dikeluarkan daripada bekas rendaman formalin, struktur tisu diproses bagi penyediaan slaid histologi dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin (H & E) untuk pemerhatian struktur mikroskopik sel dalam binaan tisu kulit menggunakan mikroskop cahaya.

#### ANALISIS PENGEKSPRESAN GEN

Setelah penyurihan kawasan luka, setiap ekor tikus yang sama digunakan untuk pengekstrakan RNA dengan setiap dua daripada empat kesan luka dipotong keluar. Begitu juga dengan hasil uji kaji menggunakan binaan tisu kulit manusia, separuh lagi sampel tisu digunakan. Kedua-dua jenis tisu tersebut dihancurkan dalam larutan reagen 1 mL TRIZOL® menggunakan alat penghomogenasi tisu dan seterusnya pengekstrakan RNA jumlah dilakukan berdasarkan protokol oleh pengeluar reagen TRIZOL®. Sintesis DNA komplementari (cDNA) dilakukan menggunakan ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix dengan penyingkir DNA genom (gDNA) mengikut protokol pengeluar. Sebanyak 500 ng RNA digunakan sebagai templat dan dipanaskan pada suhu  $65^\circ\text{C}$  selama minit untuk penyahaslian struktur RNA. Sebarang kehadiran DNA genom disingkirkan dengan penambahan DN Master Mix ke dalam templat RNA dan dieram pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 5 minit. Tindak balas transkripsi berbalik dilakukan dengan penambahan RT Master Mix II dengan eraman pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 15 minit, diikuti dengan suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 5 minit dan akhirnya pada suhu  $98^\circ\text{C}$  selama 5 minit untuk menyahaktifkan enzim. Sejumlah  $20 \mu\text{L}$  air bebas nuklease ditambahkan ke dalam campuran untuk menghasilkan templat cDNA dengan kepekatan akhir  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Tahap pengekspresan gen ditentukan melalui kaedah pengukuran kuantiti mutlak berdasarkan lengkung piawai bagi sampel DNA plasmid yang diketahui dengan siri pencairan:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  dan  $10^8$  bilangan salinan. Sebanyak 20 ng templat cDNA digunakan untuk setiap tindak balas qPCR menggunakan kit THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Master Mix (Toyobo, Jepun) bagi setiap set pencetus untuk gen terpilih dalam kajian ini (Jadual 1).

Analisis qPCR dilakukan dengan menggunakan CFX384 *Touch Real-Time PCR Detection System*

(Bio-Rad, USA) berdasarkan program PCR berikut: penyahasilan awal pada suhu 94 °C selama 30 s; diikuti oleh 40 kitaran yang merangkumi penyahasilan pada suhu 94 °C selama 5 s, penyepuhan pada suhu 55 °C selama 10 s dan pemanjangan pada suhu 72 °C selama 10 s. Perbandingan pengekspresan gen antara kumpulan rawatan bagi setiap jantina yang sama dilakukan dengan menggunakan ANOVA sehalu diikuti dengan ujian perbandingan LSD *post-hoc* dengan aras signifikan  $p < 0.05$  menggunakan pakej perisian statistik SPSS Versi 22. Data dinyatakan sebagai purata bilangan salinan mRNA  $\pm$  sisihan (SEM).

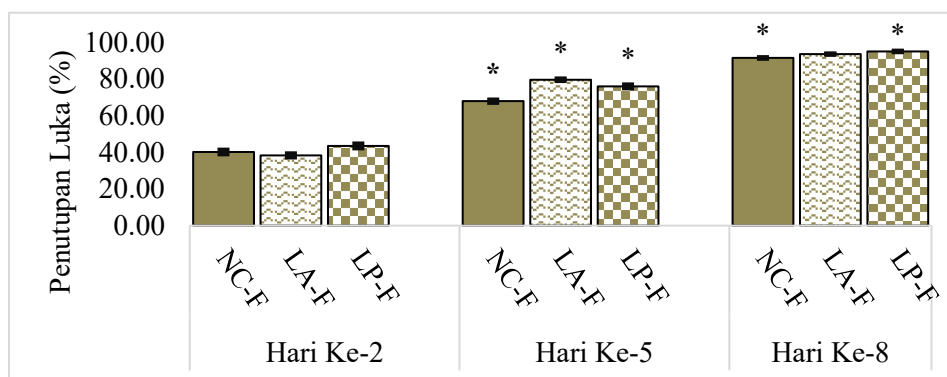
## HASIL

### KESAN RAWATAN KRIM EKSTRAK AIR *L. pumila* TERHADAP PROSES PENYEMBUHAN LUKA TIKUS

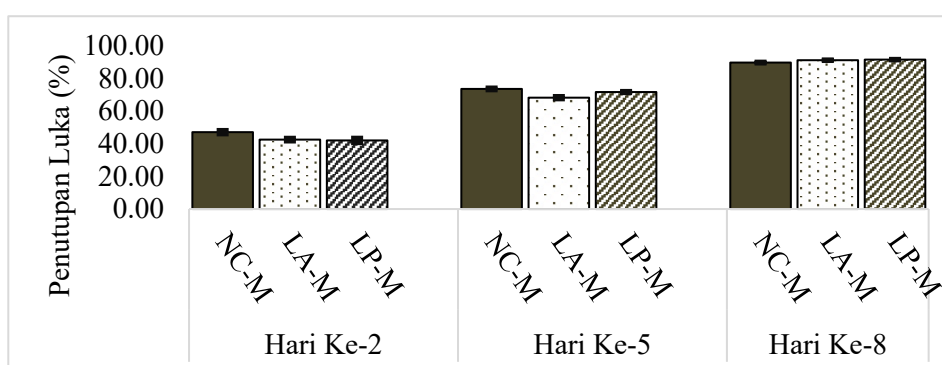
Untuk menguji keberkesanan *L. pumila* dalam

penyembuhan luka, krim ekstrak air *L. pumila* digunakan pada luka kulit model tikus. Kawasan penutupan luka diukur dan peratusan penyembuhan luka antara kumpulan rawatan dan kawalan dibandingkan. Analisis statistik dilakukan untuk mengkaji apakah terdapat perbezaan yang signifikan antara kumpulan ( $p < 0.05$ ).

Seperti yang dilihat pada Rajah 1(a), tidak ada perbezaan yang signifikan yang diperhatikan pada hari ke-2 bagi kumpulan rawatan betina. Pada hari ke-5, kedua-dua rawatan *L. pumila* var. *alata* (LA-F) dan var. *pumila* (LP-F) mempunyai peratusan penyembuhan yang jauh lebih tinggi iaitu masing-masing sebanyak 79.58% dan 75.97% berbanding dengan kawalan negatif (67.8%). Manakala, pada hari ke-8, hanya rawatan *L. pumila* var. *pumila* menunjukkan peningkatan yang signifikan iaitu 95.04 % berbanding kawalan (67.8 %). Bagi kumpulan rawatan jantan pula, tidak ada perbezaan yang signifikan yang diperhatikan pada ketiga-tiga sela



(a)



(b)

RAJAH 1. Perbandingan peratusan penyembuhan luka pada (a) kumpulan tikus betina dan (b) kumpulan tikus jantan pada hari kedua, kelima dan kelapan.

\*Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan dengan nilai  $p < 0.05$

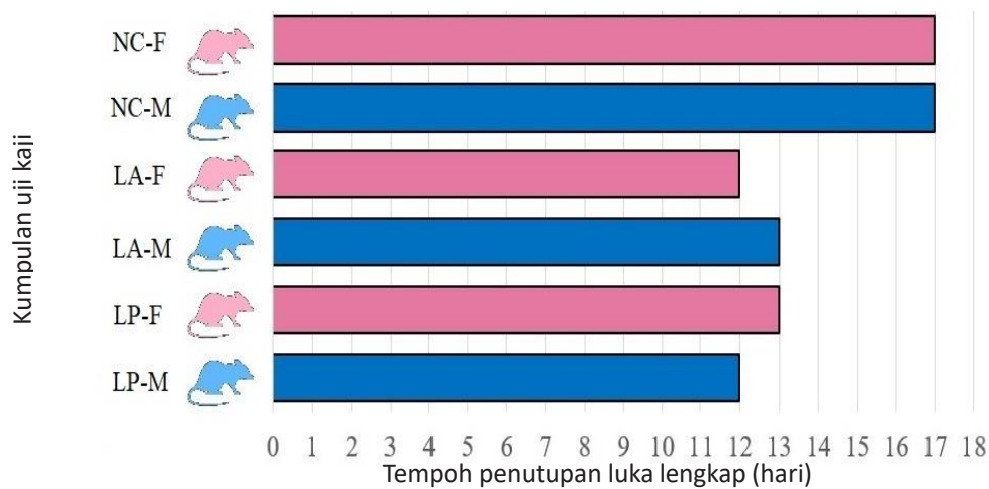
(NC-F: kawalan negatif tikus betina; NC-M: kawalan negatif tikus jantan; LA-F & LA-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* bagi jantan dan betina; LP-F & LP-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *pumila* bagi jantan dan betina)

hari ke-2, ke-5 dan ke-8 bagi kedua-dua rawatan *L. pumila* var. *alata* (LA-M) dan var. *pumila* (LP-M) seperti dalam Rajah 1(b).

KESAN RAWATAN KRIM EKSTRAK AIR *L. pumila*  
TERHADAP TEMPOH PENUTUPAN LUKA LENGKAP  
KULIT TIKUS

Untuk pemerhatian fizikal, tikus kumpulan rawatan jantan dan betina dirawat dengan *L. pumila* var. *alata* (LA) dan var. *pumila* (LP), serta satu kumpulan untuk setiap

jantina tidak dirawat (NC). Tiga tikus nombor terakhir daripada semua rawatan dibiarkan hidup sehingga keempat-empat luka mereka ditutup sepenuhnya dan hari-hari yang diambil direkodkan seperti yang ditunjukkan pada Rajah 2. Pada kumpulan rawatan jantan yang dilabel sebagai rawatan-M, kumpulan rawatan LP-M mempunyai masa penyembuhan terpantas diikuti oleh LA-M sementara NC-M mengalami penyembuhan paling lambat. Pada tikus betina yang dilabel sebagai rawatan-F, LA-F mengalami penyembuhan paling cepat diikuti oleh LP-F dan NC-F. Antara jantan dan betina dengan rawatan



RAJAH 2. Tempoh penutupan luka yang lengkap bagi uji kaji asai penyembuhan luka

(NC-F: kawalan negatif tikus betina; NC-M: kawalan negatif tikus jantan; LA-F & LA-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* bagi jantan dan betina; LP-F & LP-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *pumila* bagi jantan dan betina)

yang sama, masa penyembuhan adalah lebih kurang sama ( $\pm 1$  hari). Ini menunjukkan rawatan mempercepatkan penyembuhan luka berbanding kawalan. Tiada perbezaan bagi tempoh penyembuhan berdasarkan sediaan krim varian tumbuhan yang berbeza dan jantina.

KESAN RAWATAN KRIM EKSTRAK AIR *L. pumila*  
TERHADAP PENGEKSPRESAN GEN TERLIBAT DALAM  
FASA PENYEMBUHAN LUKA KULIT TIKUS

Bagi mendapatkan maklumat berkenaan kesan rawatan ekstrak terhadap proses penyembuhan luka tikus, tahap pengekspressan gen yang mewakili setiap tiga fasa keradangan (TGF- $\beta$ 1 dan IL-6), proliferasi (EGF dan CBL), serta pembentukan semula tisu (Col3AI) ditentukan melalui bilangan salinan mRNA yang diperolehi daripada analisis PCR kuantitatif.

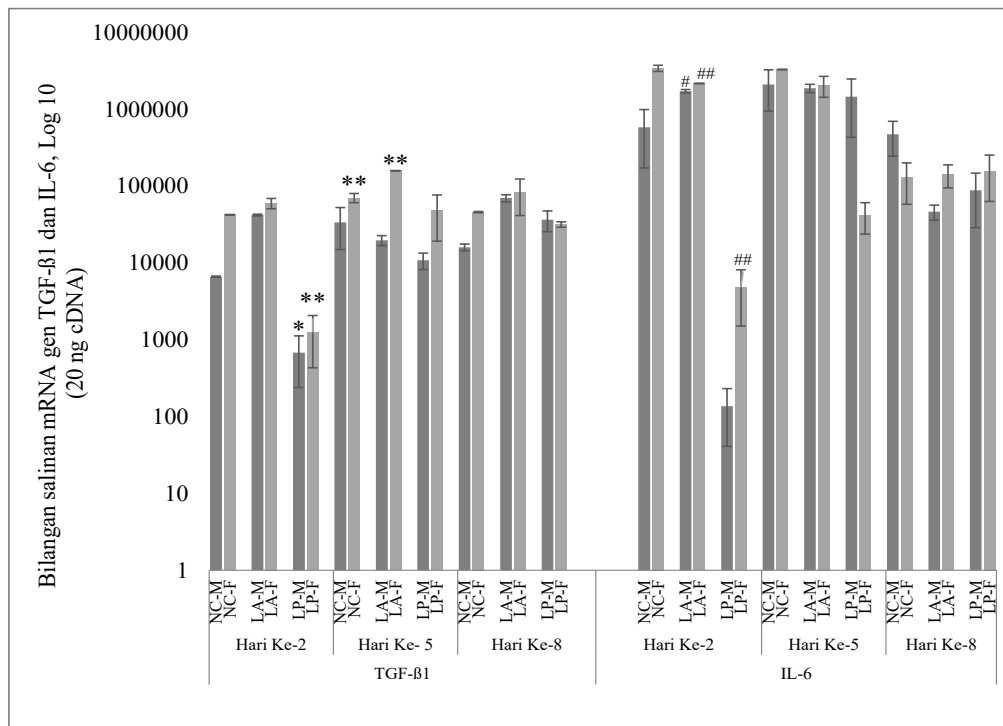
Seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 3(a) untuk uji kaji bagi tikus betina pada hari ke-2, rawatan *L. pumila* var. *alata* menunjukkan penurunan bilangan salinan mRNA bagi gen IL-6 iaitu sebanyak 2171418 salinan mRNA berbanding kawalan, manakala rawatan *L. pumila* var. *pumila* memberi kesan penurunan bilangan salinan mRNA bagi kedua-dua gen TGF- $\beta$ 1 dan IL-6, masing-masing sebanyak 1251 dan 4824 salinan mRNA. Pada hari ke-5, bilangan salinan mRNA gen TGF- $\beta$ 1 didapati meningkat bagi tikus betina terawat *L. pumila* var. *alata* iaitu pada jumlah 159093. Berbeza tikus jantan pula (Rajah 3(b)), bilangan salinan mRNA gen IL-6 sahaja didapati meningkat dengan rawatan *L. pumila* var. *alata* (582591 salinan mRNA) tetapi menurun bagi kedua-dua gen TGF- $\beta$ 1 (6624 salinan mRNA) dan IL-6 (582591 salinan mRNA) dengan rawatan *L. pumila* var. *pumila*

bagi pada hari ke-2. Tiada kesan terhadap kedua-dua gen pada hari ke-5 untuk kumpulan uji kaji tikus jantan. Kedua-dua rawatan varieti *L. pumila* tidak mempengaruhi kedua-dua gen pada hari ke-8.

Bagi gen yang terlibat dengan fasa proliferasi sel, rawatan *L. pumila* var. *alata* bagi tikus betina meningkatkan bilangan salinan mRNA bagi gen EGF pada hari ke-2 (1512 salinan mRNA) dan gen CBL pada hari ke-5 (46137 salinan mRNA) seperti yang ditunjukkan di dalam Rajah 4(a). Rawatan *L. pumila* var. *pumila* pula didapati menurunkan bilangan salinan mRNA sebanyak 425 bagi gen EGF dan 2457 bagi gen CBL pada hari ke-5. Tikus jantan terawat *L. pumila* var. *pumila* didapati menunjukkan penurunan aras gen EGF sebanyak 248 salinan mRNA pada hari ke-2. Begitu juga dengan gen CBL yang menunjukkan penurunan aras gen pada hari ke-5 dan ke-8 bagi kedua-dua jenis rawatan varieti *L. pumila* terhadap tikus jantan, iaitu masing-masing 11307

salinan mRNA dan 18101 salinan mRNA bagi var. *pumila* dan 24239 salinan mRNA dan 30564 salinan mRNA bagi var. *alata*.

Disebabkan protein kolagen penting dalam pembentukan semula tisu kulit semasa proses penyembuhan luka, gen COL3A1 dipilih untuk mewakili fasa tersebut dalam kajian ini. Kedua-dua kumpulan jantan dan betina yang dirawat dengan *L. pumila* var. *alata* menunjukkan kesan peningkatan bilangan salinan mRNA gen COL3A1 pada hari ke-8, masing-masing sejumlah  $3.91 \times 10^8$  salinan mRNA dan  $2.44 \times 10^8$  salinan mRNA berbanding kawalan (Rajah 5). Sebaliknya, rawatan dengan *L. pumila* var. *pumila* didapati tidak memberi kesan ke atas pengekspresan COL3A1 pada hari ke-8. Malah pada hari ke-2 dan ke-5 didapati berlaku penurunan bilangan salinan mRNA gen COL3A1 yang jelas bagi kedua-dua kumpulan tikus jantan dan betina terawat dengan varieti yang sama, iaitu masing-masing



RAJAH 3. Kesan rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* dan *L. pumila* var. *pumila* terhadap bilangan salinan mRNA  $\pm$  SEM (n = 4) bagi gen TGF-  $\beta$ 1 dan IL-6 berdasarkan sela masa hari ke-2, 5 dan 8

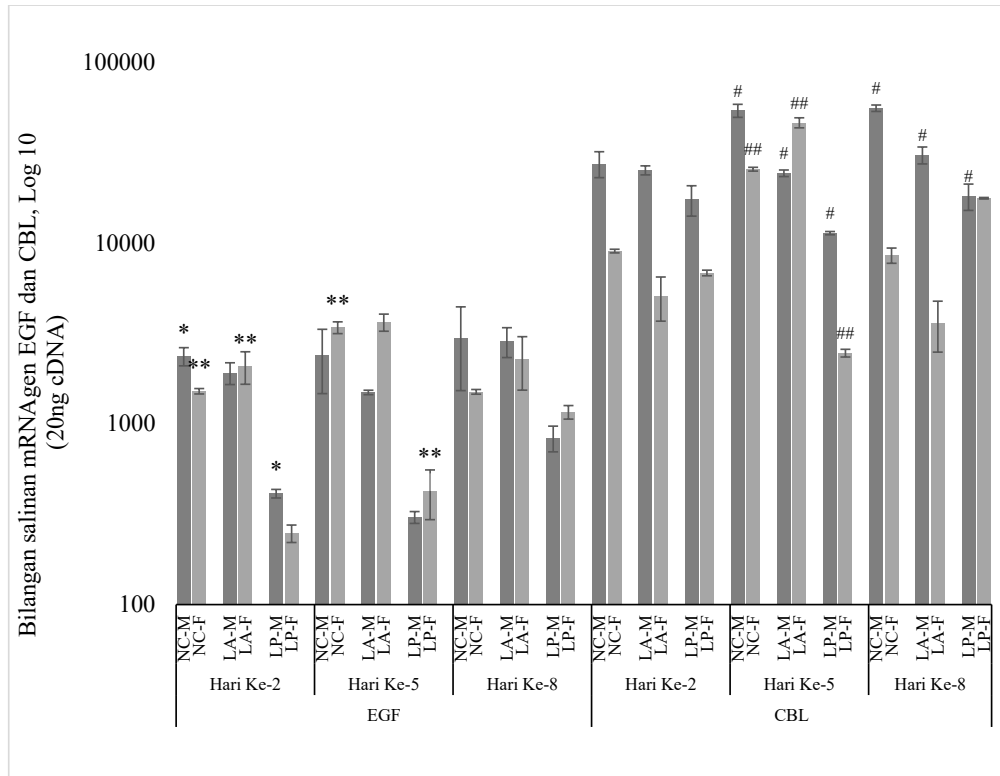
\*Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen TGF- $\beta$ 1 bagi kumpulan tikus jantan dengan nilai  $p < 0.05$

\*\* Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen TGF- $\beta$ 1 bagi kumpulan tikus betina dengan nilai  $p < 0.05$

#Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen IL-6 bagi kumpulan tikus jantan dengan nilai  $p < 0.05$

##Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen IL-6 bagi kumpulan tikus betina dengan nilai  $p < 0.05$

(NC-F: kawalan negatif tikus betina; NC-M: kawalan negatif tikus jantan; LA-F & LA-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* bagi jantan dan betina; LP-F & LP-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *pumila* bagi jantan dan betina)



RAJAH 4. Kesan rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* dan *L. pumila* var. *pumila* terhadap bilangan salinan mRNA  $\pm$  SEM (n = 4) bagi gen EGF dan CBL berdasarkan sela masa hari ke-2, 5 dan 8

\*Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen EGF bagi kumpulan tikus jantan dengan nilai  $p < 0.05$

\*\*Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen EGF bagi kumpulan tikus betina dengan nilai  $p < 0.05$

#Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen CBL bagi kumpulan tikus jantan dengan nilai  $p < 0.05$

##Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen CBL bagi kumpulan tikus betina dengan nilai  $p < 0.05$

(NC-F: kawalan negatif tikus betina; NC-M: kawalan negatif tikus jantan; LA-F & LA-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* bagi jantan dan betina; LP-F & LP-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *pumila* bagi jantan dan betina)

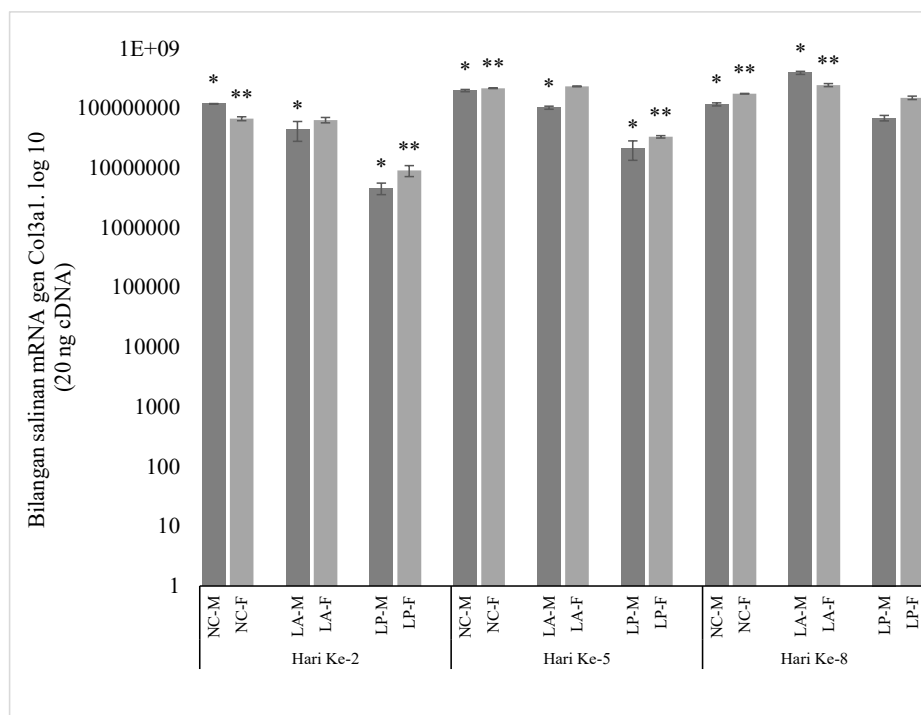
sebanyak 4570360 salinan mRNA dan 20875230 salinan mRNA bagi jantan, dan sebanyak 9042612 salinan mRNA dan 33189729 salinan mRNA bagi betina.

#### KESAN RAWATAN KRIM EKSTRAK AIR *L. pumila* TERHADAP LUKA MODEL KULIT MANUSIA 3D

Hasil pemerhatian slaid histologi bagi kesemua sampel model kulit manusia 3D menunjukkan empat jenis lapisan yang jelas iaitu lapisan paling atas, stratum korneum (sk) yang merupakan sel keratinosit yang sudah mati akibat terdedah kepada udara, diikuti dengan lapisan epidermis (e) yang terdiri daripada sel keratinosit, lapisan dermis (d) yang meliputi sel fibroblas dan lapisan paling bawah, kerangka (k) yang biasanya merupakan bahan kolagen (Jadual 2). Satu hari selepas biopsi, didapati sampel model kulit manusia 3D bagi kawalan dan rawatan kedua-dua krim ekstrak air *L. pumila* menunjukkan pergerakan kedua-dua lapisan

sel keratinosit epidermis (e) dan sel fibroblas dermis (d) mengunjur daripada pinggir luka. Pada hari ke-4, pengunjuran kedua-dua lapisan epidermis (e) dan dermis (d) bagi kawalan dan rawatan kelihatan agak sama. Walau bagaimanapun, pada hari ke-6, ketiga-tiga sampel model kulit manusia 3D menunjukkan perbezaan yang ketara antara satu sama lain. Bagi sampel model kulit manusia 3D kawalan (hari 6), didapati lapisan epidermis (e) iaitu sel keratinosit mengalami proliferasi yang pesat sehingga menutupi pinggir luka merentasi lapisan dermis (d) sehingga ke lapisan bawah kerangka kolagen (k). Manakala sampel model kulit manusia 3D yang dirawat dengan krim 1% ekstrak air *L. pumila* varieti *alata* didapati menunjukkan proliferasi kedua-dua lapisan epidermis (e) dan dermis (d) yang baik sehingga kelihatan menutupi kawasan luka sepenuhnya, berbanding dengan rawatan dengan krim 1% ekstrak air *L. pumila* varieti *pumila*.





RAJAH 5. Kesan rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* dan *L. pumila* var. *pumila* terhadap bilangan salinan mRNA  $\pm$  SEM (n = 4) bagi gen COL3A1 berdasarkan sela masa hari ke-2, 5 dan 8

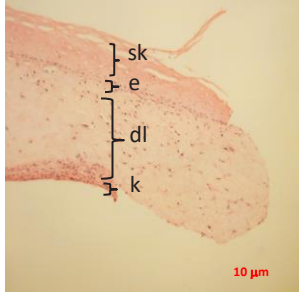
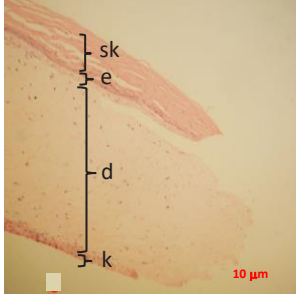
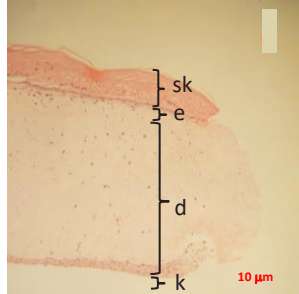
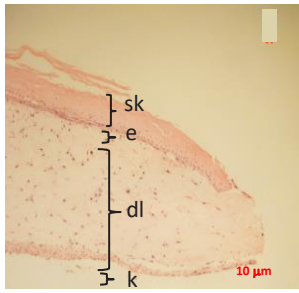
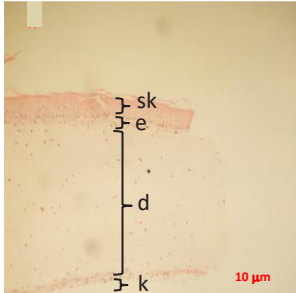
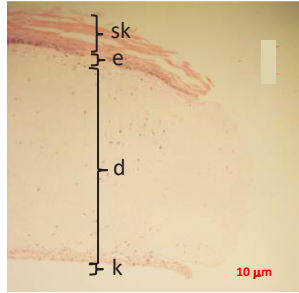

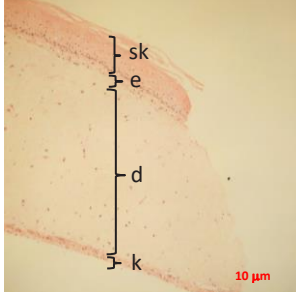
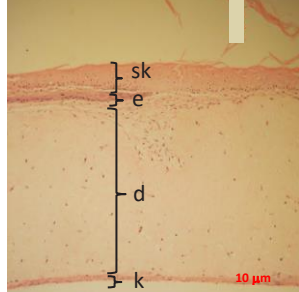
\*Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen COL3A1 bagi kumpulan tikus jantan dengan nilai  $p < 0.05$   
 \*\* Perbezaan signifikan terhadap kumpulan kawalan untuk gen COL3A1 bagi kumpulan tikus betina dengan nilai  $p < 0.05$   
 (NC-F: kawalan negatif tikus betina; NC-M: kawalan negatif tikus jantan; LA-F & LA-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *alata* bagi jantan dan betina; LP-F & LP-M: rawatan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *pumila* bagi jantan dan betina)

JADUAL 1. Pencetus yang digunakan dalam kajian ini

Nama pencetus	Jujukan (5' → 3')	Saiz produk (bp)	Nombor akses GenBank
Uji kaji <i>in vivo</i> model tikus			
CBL-rat-F	CAC ATC GTG GCA GGT GGAA AA	145	KJ944833.1
CBL-rat-R	CTT GGA AGC AGT CCC CAG AAC		
IL6-rat-F	AGC CAC TGC CTT CCC TAC TT	159	NM_012589.2
IL6-rat-R	GAA TTG CCA TTG CAC AAC TCT T		
TGFβ1-rat-F	GAC CGC AAC AAC GCA ATC TA	160	NM_021578.2
TGFβ1-rat-R	CGT GTT GCT CCA CAG TTG AC		
COL3A1-rat-F	GGA AGG GAT GGA AAC CCT GG	177	NM_032085.1
COL3A1-rat-R	AGG ACC CGT TTC TCC TCT GT		
EGF-rat-F	GTG TGC AAC TGT GTC ATT GGC	195	NM_012842.1
EGF-rat-R	TGA TAG CTG CTT CCG AGT CCT		
Uji kaji <i>in vitro</i> model kulit manusia 3D			
TGFβ1-human-F	CGA CTC GCC AGA GTG GTT ATC	153	NM_000660.6
TGFβ1-human-R	GTA GTG AAC CCG TTG ATG TCC		
IL10-human-F	GCG CTG TCA TCG ATT TCT TCC	180	NM_000572.2
IL10-human-R	GCC ACC CTG ATG TCT CAG TT		
COL3A1-human-F	GAA AGA TGG CCC AAG GGG TC	103	NM_000090.3
COL3A1-human-R	TAT ACC TGG AAG TCC GGG GG		

CBL: *Casitas B-lineage lymphoma*; IL66: Interleukin 6; TGFβ1: *Tumour Growth Factor Beta Subunit 1*; COL3A1: *CollagenType III Alpha 1 Chain*; EGR: *Epidermal Growth Factor*; IL10: Interleukin 10

JADUAL 2. Gambarfoto histologi berdasarkan hasil pewarnaan H&E, melalui mikroskop cahaya pada skala pembesaran 100× bagi sampel binaan tisu EpiDerm FT (MatTek, USA) kawalan serta yang dirawat dengan krim 1% ekstrak air *L. pumila* var. *pumila* dan *L. pumila* var. *alata* untuk hari ke-2, ke-4 dan ke-6 hari

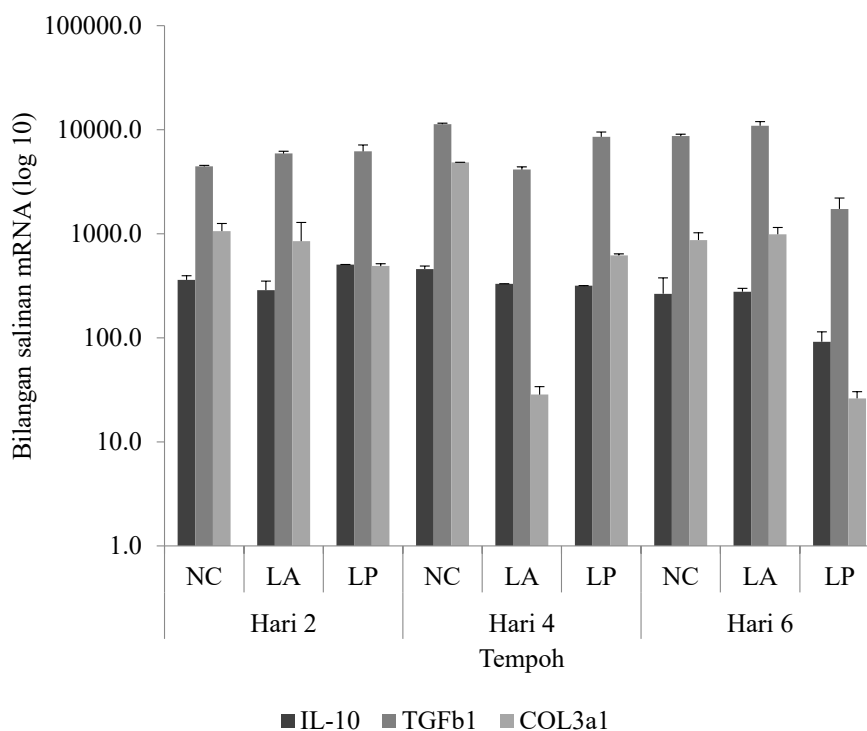
Tempoh rawatan	Jenis rawatan		
	Kawalan	Krim 1% ekstrak air <i>L. pumila</i> var. <i>pumila</i>	Krim 1% ekstrak air <i>L. pumila</i> var. <i>alata</i>
Hari 2			
Hari 4			
Hari 6			

Label: stratum korneum (sk), lapisan keratinosit (e), lapisan fibroblas (d) dan kerangka (k)

#### KESAN RAWATAN KRIM EKSTRAK AIR *L. pumila* TERHADAP PENGEKSPRESAN GEN TERLIBAT DALAM FASA PENYEMBUHAN LUKA BINAAN TISU KULIT MANUSIA

Rajah 6 menunjukkan profil pengekspressan gen TGFβ1, IL10 dan COL3A1 yang dianalisis daripada sampel binaan tisu kulit manusia yang dirawat dengan dua sediaan krim ekstrak air yang masing-masing mengandungi 1% *L. pumila* var. *alata* dan var. *pumila*. Didapati bilangan salinan mRNA bagi gen IL10 tidak menunjukkan

perubahan yang ketara berbanding kawalan terutamanya pada tempoh jangkaan bagi fasa keradangan. Manakala terdapat sedikit peningkatan bilangan salinan mRNA bagi gen TGFβ1 bagi luka tisu kulit yang dirawat dengan *L. pumila* var. *alata* pada sela hari ke-2 dan hari ke-6. Namun begitu, bilangan salinan mRNA bagi gen COL3A1 daripada sampel yang terawat krim ekstrak air *L. pumila* menunjukkan penurunan atau tiada perbezaan berbanding kawalan.



RAJAH 6. Profil pengekspresan gen IL-10, TGFb1 dan COL3A1, masing-masing mewakili fasa keradangan, proliferasi dan penstrukturan semula tisu bagi mekanisme penyembuhan luka, bagi sampel luka binaan tisu kulit manusia yang dirawat dengan krim yang disediakan daripada 1% ekstrak air *L. pumila* varieti *alata* (LA) dan ekstrak air *L. pumila* varieti *pumila* (LP)

#### PERBINCANGAN

Dalam kajian ini, analisis profil pengekspresan bagi gen yang terlibat berdasarkan bilangan salinan mRNA melalui pendekatan PCR-kuantitatif dapat menentukan kesan rawatan ekstrak yang khusus terhadap fasa proses penyembuhan tertentu. Kesemua rawatan kecuali bagi ekstrak *L. pumila* varieti *alata* pada tikus jantan, menunjukkan kesan penurunan aktiviti gen yang terlibat dalam fasa keradangan. Ini mungkin disebabkan oleh fitokimia anti-radang seperti flavonoid, saponin dan fenol yang terdapat pada *L. pumila* (Abdullah et al. 2013; Chua et al. 2012). *L. pumila* var. *pumila* dilaporkan mengandungi jumlah kandungan flavonoid yang lebih tinggi daripada var. *alata* dan var. *lanceolata* terutamanya ekstrak daun (Karimi et al. 2011; Norhaiza et al. 2009). Oleh itu, kandungan flavonoid yang lebih tinggi dalam var. *pumila* mungkin mengurangkan kesan keradangan yang dapat dikaitkan dengan penurunan gen yang terlibat dalam fasa radang semasa proses penyembuhan luka dalam kajian ini.

Fasa keradangan yang diperantarakan oleh sitokin adalah penting dalam penyembuhan luka untuk

menghentikan pendarahan dan mencegah jangkitan kerana sel, patogen dan bakteria yang cedera dilupuskan daripada kawasan luka (Turabelidze & Dipietro 2013). Oleh itu, kesan anti-radang boleh mengganggu proses penyembuhan dan memanjangkan proses pembaikan, dan sebatian dengan sifat anti-radang harus dielakkan semasa awal fasa penyembuhan luka. Namun begitu, kesan anti-radang *L. pumila* berpotensi untuk merawat masalah kesihatan yang disebabkan oleh keradangan seperti demam, jangkitan, arthritis dan penyakit paru-paru (Pahwa et al. 2020). Selain itu, sifat anti-radang *L. pumila* memberi potensi dalam bidang terapi untuk menurunkan komplikasi yang disebabkan oleh keradangan dan mungkin dapat merawat masalah kesihatan yang disebabkan oleh keradangan seperti demam, jangkitan, arthritis dan penyakit paru-paru (Pahwa et al. 2020). Namun begitu, flavonoid, fenol dan quersetin yang mungkin ada dalam ekstrak *L. pumila* juga bertanggungjawab untuk ciri anti-oksidan, anti-bakteria dan anti-virus yang boleh menyumbang kepada proses penyembuhan. Berdasarkan kajian lepas, dengan membasmi mikro-organisma pada luka yang dijangkiti,

persekitaran yang sesuai untuk penyembuhan dapat berlaku yang meningkatkan potensi aplikasi *L. pumila* untuk pengurusan luka (Demilew et al. 2018).

Rawatan *L. pumila* memberi kesan peningkatan yang signifikan terhadap penutupan luka semasa fasa proliferasi pada tikus betina dan sebaliknya bagi tikus jantan, penutupan luka yang dirawat oleh dua varieti tersebut didapati agak terencat pada fasa ini (Jadual 2). Faktor jantina ini semestinya dipengaruhi oleh hormon pembiakan betina iaitu estrogen yang memainkan peranan dalam mengawalatur pemulihan tisu yang cedera melalui penindasan respons imun dan pemendapan matriks pada tempat luka (Ashcroft et al. 2003; Engeland et al. 2009). *L. pumila* dipercayai mempunyai kesan fito-estrogen yang mungkin dapat bertindak secara sinergi dengan hormon estrogen sedia ada dalam sistem tubuh tikus betina kajian yang seterusnya menyumbang kepada kesan penyembuhan luka. Ini disokong oleh aras mRNA yang meningkat bagi gen CBL dan tidak berubah bagi gen EGF pada fasa proliferasi bagi rawatan *L. pumila* var. *alata* pada tikus betina. *Casitas B-lineage lymphoma* (CBL) adalah salah satu unsur utama EGFR dan memainkan peranan penting dalam pertumbuhan sel yang diperantarakan EGF kerana CBL menghubungkan dengan EGFR untuk meningkatkan EGF dan membentuk kompleks dengan beberapa protein isyarat lain (Fukazawa et al. 1996). Dicadangkan supaya lebih banyak gen yang terlibat dengan tapak jalan EGF dianalisis untuk mendapat gambaran yang lebih menyeluruh bagi pengaktifan aktiviti pertumbuhan sel semasa proses penyembuhan.

Penutupan kawasan luka yang kurang baik disertai dengan aras mRNA yang tidak berubah bagi gen CBL dan menurun bagi gen EGF daripada sampel luka tikus jantan terawat kedua-dua varieti *L. pumila* dalam kajian ini menunjukkan kemungkinan terdapat kesan anti-proliferatif ekstrak, terutamanya pada keadaan tiadanya atau kurang pengaruh hormon estrogen. Ini boleh dikaitkan dengan sifat anti-proliferatif herba ini yang boleh disebabkan oleh kehadiran unsur anti-kanser dan anti-tumor seperti  $\beta$ -karoten, fenol seperti asid galik, serta flavonoid yang pernah dikenal pasti daripada *L. pumila* (Abdullah et al. 2013). Proliferasi sel adalah bahagian penting dalam mekanisme penyembuhan luka. Apabila fasa ini dikompromikan, ia membawa kepada peningkatan komplikasi dalam penyembuhan luka (Anderson & Hamm 2012). Walau bagaimanapun, aktiviti anti-proliferatif berpotensi dalam bidang terapi perubatan lain terutamanya bagi proliferasi sel barah yang tidak terkawal (Pihie et al. 2012, 2011).

Secara keseluruhannya, melalui uji kaji *in vitro* asai penyembuhan luka menggunakan model tikus, kedua-dua

rawatan berupaya mempercepatkan proses penutupan luka secara lengkap bagi kedua-dua tikus jantan dan betina iaitu antara hari ke-12 dan 13, berbanding dengan kumpulan tikus rawatan yang mengambil tempoh 17 hari bagi luka tertutup sepenuhnya. Pengurangan masa yang diperlukan untuk luka sembuh sepenuhnya dalam kumpulan rawatan menunjukkan bahawa *L. pumila* mungkin mempunyai bahan aktif yang mempengaruhi fasa pembentukan semula secara positif kerana dipercayai mempromosikan sintesis kolagen (Chua et al. 2012). Ini disokong dalam kajian oleh Ahmad et al. (2018) yang melaporkan terdapat pengurangan penyusutan sel-sel inflamasi pada tisu granulasi tetapi peningkatan ketara dalam sel fibroblas, angiogenesis, epitelisasi semula dan pembinaan tisu granulasi pada hari ke 8 melalui analisis histologi terhadap tisu luka tikus yang dirawat krim sediaan 1% ekstrak air *L. pumila*.

Bilangan salinan mRNA gen COL3A1 yang rendah terutamanya bagi kumpulan betina mungkin dipengaruhi oleh sela masa pensampelan pada hari ke-5 uji kaji. Gen COL3A1 tidak diatur pada fasa awal penyembuhan namun mampu mengekalkan tahap pengekspresan yang tinggi selama berminggu-minggu setelah kecederaan awal tetapi gen COL3A1 digantikan oleh gen *Collagen type I alpha 1 chain* (COL1A1) pada tahap penyembuhan kemudian (Stepień-Słodkowska et al. 2015). Penutupan kawasan luka pada fasa penstrukturan semula tisu melibatkan tempoh yang agak panjang dan untuk mendapatkan gambaran yang lebih baik, peranan sintesis kolagen dalam fasa ini adalah dicadangkan supaya ditambah sela masa yang lebih kemudian dan adalah lebih signifikan untuk melibatkan lebih gen yang mengekodkan subunit kolagen yang lain juga.

Daripada pemerhatian histologi melalui pewarnaan H & E bagi keratan rentas model tisu kulit tersebut, didapati rawatan dengan formulasi krim yang mengandungi ekstrak air *L. pumila* var. *alata* sebanyak 1% mempunyai kesan yang positif terhadap penyembuhan luka berdasarkan terdapat unjuran sel melangkaui sempadan luka yang dibuat pada awal uji kaji. Disebabkan masalah teknikal, pengukuran luas kawasan luka atau panjang unjuran sel baru tidak dapat dilakukan dan mungkin boleh ditambahbaik pada masa akan datang dengan penggunaan peralatan mikroskop yang lebih mantap dengan ciri konfokal dan pengimejan secara nyata. Begitu juga dengan analisis pengekspresan gen yang melibatkan gen IL10, TGF $\beta$ 1 dan COL3A1 yang masing-masing mewakili fasa keradangan, proliferasi dan penstrukturan semula tisu, perubahan gen yang dikesan bagi tisu luka yang dirawat adalah tidak signifikan secara statistik, berbanding dengan tisu luka kawalan. Ini

mungkin disebabkan oleh keperluan proses penyembuhan luka memerlukan persekitaran peredaran darah sistemik (Gonzalez et al. 2016). Berdasarkan pemerhatian histologi yang menunjukkan terdapat aktiviti proliferasi yang pesat, kemungkinan pemilihan gen adalah lebih sesuai sekiranya melibatkan tapak jalan EGF. Begitu juga dengan fasa keradangan, pilihan gen mungkin lebih sesuai dipilih dalam kalangan modulator atau sitokin yang terlibat dalam pengawalaturan proses keradangan setempat. Bagi mendapatkan gambaran fasa penstrukturan semula tisu, mungkin memerlukan penambahbaikan dari segi penggunaan medium yang lebih sesuai untuk menepati unsur yang diperlukan dalam sintesis matriks tisu.

#### KESIMPULAN

Penemuan daripada kajian ini dapat memberikan gambaran berkenaan potensi tumbuhan herba *L. pumila* atau kacip fatimah terhadap penyembuhan luka yang boleh dikaitkan dengan aplikasinya yang sedia ada untuk pemulihan luka bersalin atau boleh dicadangkan sebagai agen penyembuhan luka. Walau bagaimanapun, kajian lanjut adalah digalakkan untuk mendapatkan bukti saintifik yang lebih konklusif bagi menaikkan lagi potensi khasiat spesies herba *L. pumila* ini sebagai produk kesihatan dan terapeutik semula jadi.

#### PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia di bawah Skim Geran Penyelidikan NKRA (NRGS; No. Geran: NH1014D034) dan dijalankan di Kompleks Makmal Biologi Molekul, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia.

#### RUJUKAN

- Abdullah, N., Chermahini, S.H., Suan, C.L. & Sarmidi, M.R. 2013. *Labisia pumila*: A review on its traditional, phytochemical and biological uses. *World Applied Sciences Journal* 27(10): 1297-1306.
- Aburjai, T. & Natsheh, F.M. 2003. Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research* 17(9): 987-1000.
- Agyare, C., Asase, A., Lechtenberg, M., Niehues, M., Deters, A. & Hensel, A. 2009. An ethnopharmacological survey and *in vitro* confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 125(3): 393-403.
- Ahmad, S.U., Shuid, A.N. & Mohamed, I.N. 2018. *Labisia pumila* improves wound healing process in ovariectomized rat model. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 13(1): 106-113.
- Al-Wahaibi, A., Nazaimoon, W.M.W., Norsyam, W.N., Fariyah, H.S. & Azian, A.L. 2008. Extract of *Labisia pumila* var. *alata* on aorta of ovariectomized Sprague Dawley rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 7(2): 208-213.
- Anderson, K. & Hamm, R.L. 2012. Factors that impair wound healing. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists* 4(4): 84-91.
- Ashcroft, G.S., Mills, S.J., Lei, K., Gibbons, L., Jeong, M.J., Taniguchi, M., Burrow, M., Horan, M.A., Wahl, S.M. & Nakayama, T. 2003. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of Clinical Investigation* 111(9): 1309-1318.
- Azidah, A.K., Nik, H.N.H., Wan, M.W.B., Dayang, M.M., Wan, M.Z.W.M., Intan, I.H., Norlela, S., Nor, A.K. & Wan, N.W.M. 2012. The effect of *Labisia pumila* var. *alata* on postmenopausal women: A pilot study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 216525.
- Azimahtol, H., Lope, P., Zainul, A.Z. & Faezah, O. 2011. Antiproliferative and proapoptotic effects of *Labisia pumila* ethanol extract and its active fraction in human melanoma HM3KO cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 123470.
- Burkill, I.H. 1966. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Edisi Kedua. Kuala Lumpur: Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Choi, H.K., Kim, D.H., Kim, J.W., Ngadiran, S., Sarmidi, M.R. & Park, C.S. 2010. *Labisia pumila* extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(3): 291-296.
- Chua, L.S., Lee, S.Y., Abdullah, N. & Sarmidi, M.R. 2012. Review on *Labisia pumila* (Kacip Fatimah): Bioactive phytochemicals and skin collagen synthesis promoting herb. *Fitoterapia* 83(8): 1322-1335.
- Demilew, W., Adinew, G.M. & Asrade, S. 2018. Evaluation of the wound healing activity of the crude extract of leaves of *Acanthus polystachyus Delile* (Acanthaceae). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2018: 2047896.
- Engeland, C.G., Sabzehei, B. & Marucha, P.T. 2009. Sex hormones and mucosal wound healing. *Brain, Behavior, and Immunity* 23(5): 629-635.
- Fukazawa, T., Miyake, S., Band, V. & Band, H. 1996. Tyrosine phosphorylation of Cbl upon epidermal growth factor (EGF) stimulation and its association with EGF receptor and downstream signaling proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271(24): 14554-14559.
- Gonzalez, A.C.D.O., Costa, T.F., Andrade, Z.D.A. & Medrado, A.R.A.P. 2016. Wound healing – A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 91(5): 614-620.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M.T. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453(7193): 314-321.
- Hussain, N.H.N. & Kadir, A.A. 2013. Potential role of *Labisia pumila* in the prevention and treatment of chronic diseases. *Journal of Food Research* 2(4): 55-60.

- Indubala, J. & Ng, L.T. 2000. *Herbs: The Green Pharmacy of Malaysia*. Vinpress Sdn. Bhd.
- Jamal, J.A., Houghton, J.P. & Milligan, R.S. 2003. The oestrogenic and cytotoxic effects of the extracts of *Labisia pumila* var. *alata* and *Labisia pumila* var. *in vitro*. *Malaysian Journal of Health Sciences* 1: 53-60.
- Karimi, E. & Jaafar, H.Z.E. 2011. HPLC and GC-MS determination of bioactive compounds in microwave obtained extracts of three varieties of *Labisia pumila* Benth. *Molecules* 16(8): 6791-6805.
- Karimi, E., Jaafar, H.Z.E. & Ahmad, S. 2011. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisia pumila* Benth. *Molecules* 16(6): 4438-4450.
- Ma, H., Chung, M.H., Lu, Y., Nishihara, T. & Hattori, M. 2010. Estrogenic effects of the herbal formula, menoprogen, in ovariectomized rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33(3): 455-460.
- Mukrish, M.H. 2012. The photoprotective and collagen stimulatory effects of *Labisia pumila* var. *pumila* extract on UVB irradiated human skin fibroblast (HSF1184) cells. Universiti Teknologi Malaysia. M.Sc. Thesis (Tidak diterbitkan).
- Nadia, M.E., Nazrun, A.S., Norazlina, M., Isa, N.M., Norliza, M. & Ima Nirwana, S. 2012. The anti-inflammatory, phytoestrogenic, and antioxidative role of *Labisia pumila* in prevention of postmenopausal osteoporosis. *Advances in Pharmacological Sciences* 2012: 706905.
- Norhaiza, M., Maziah, M. & Hakiman, M. 2009. Antioxidative properties of leaf extracts of a popular Malaysian herb, *Labisia pumila*. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(4): 217-223.
- Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P. & Jialal, I. 2020. *Chronic Inflammation*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>. Accessed on 21 November 2020.
- Pihie, A.H.L., Zakaria, Z.A. & Othman, F. 2012. Antiproliferative and proapoptotic effects of *Labisia pumila* ethanol extract and its active fraction in human melanoma HM3KO cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 123470.
- Pihie, A.H.L., Othman, F. & Amiruddin Zakaria, Z. 2011. Anticarcinogenic activity of *Labisia pumila* against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)/croton oil-induced mouse skin carcinogenesis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(7): 823-832.
- Poh, S.W.M., Navaratnam, V. & Chia, Y.Y. 2012. Phytoestrogenic property of *Labisia pumila* for us as an estrogen replacement therapy agent. *African Journal of Biotechnology* 11(50): 11053-11056.
- Singh, G.D., Ganjoo, M., Youssouf, M.S., Koul, A., Sharma, R., Singh, S., Sangwan, P.L., Koul, S., Ahamad, D.B. & Johri, R.K. 2009. Sub-acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Labisia pumila*, a Malaysian herb. *Food and Chemical Toxicology* 47(10): 2661-2665.
- Stępień-Słodkowska, M., Ficek, K., Maciejewska-Karłowska, A., Sawczuk, M., Ziętek, P., Król, P., Zmijewski, P., Pokrywka, A. & Ciężczyk, P. 2015. Overrepresentation of the COL3A1 AA genotype in Polish skiers with anterior cruciate ligament injury. *Biology of Sport* 32(2): 143-147.
- Turabelidze, A. & Dipietro, L.A. 2013. Inflammation and wound healing. *Endodontic Topics* 24(1): 26-38.
- Wiat, C. 2002. *Orthosiphon stamineus* Benth. In *Medicinal Plants of Southeast Asia*, edited by Wong, F.K. Kuala Lumpur: Prentice Hall. pp. 264-266.

\*Pengarang untuk surat menyurat; email: yuziana@ukm.edu.my