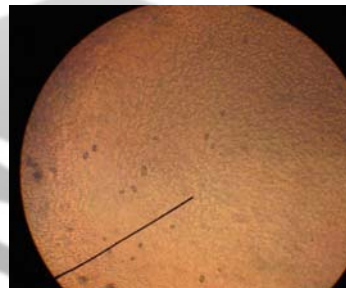
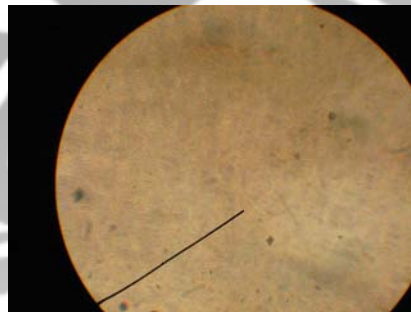


BAB 5 HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik kitosan terhadap kultur sel HSC-4 dan HAT-7 yang dilakukan secara *in vitro*. Kedua jenis sel diaktivasi kembali dari *cryopreservation* (-80°C) dan kemudian dikultur dalam inkubator dengan suhu 37°C dan 5% CO_2 selama satu hari, sampai diperoleh kondisi yang *confluent*, yaitu kondisi pada fase morfologi sel menyerupai jaringan asalnya seperti pada gambar 5.1 dan 5.2.



Gambar 5.1. Sel HSC-4 dalam kondisi *confluent* (4x/0,10)



Gambar 5.2. Sel HAT-7 dalam kondisi *confluent* (4x/0,10)

Selanjutnya, dari setiap jenis sel dikelompokkan menjadi menjadi dua, yaitu: kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan. Kelompok Kontrol adalah kelompok sel yang tidak dipajan oleh kitosan, sedangkan kelompok Perlakuan adalah kelompok sel yang dipajan dengan kitosan dalam berbagai konsentrasi, yaitu 0,0005%, 0,0025%, 0,005%, 0,25%, dan 0,5%.

Sitotoksisitas kitosan terhadap sel HSC-4 dan HAT-7 ditentukan berdasarkan viabilitas sel yang diukur dengan metode *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide (MTT) assay* dan dibaca dengan *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm. Hasil pembacaan *microplate reader*

berupa data numerik. Dari masing-masing kelompok, diambil rata-rata nilai absorbansi (OD) dan dihitung standar deviasi dalam kelompok konsentrasi yang sama. Lalu nilai absorbansi tersebut dinyatakan ke dalam persentase terhadap kelompok Kontrol sebagai viabilitas sel. Nilai absorbansi dan viabilitas sel HSC-4 dapat dilihat pada Tabel 5.1. Nilai absorbansi dan viabilitas sel HAT-7 dapat dilihat pada Tabel 5.2.

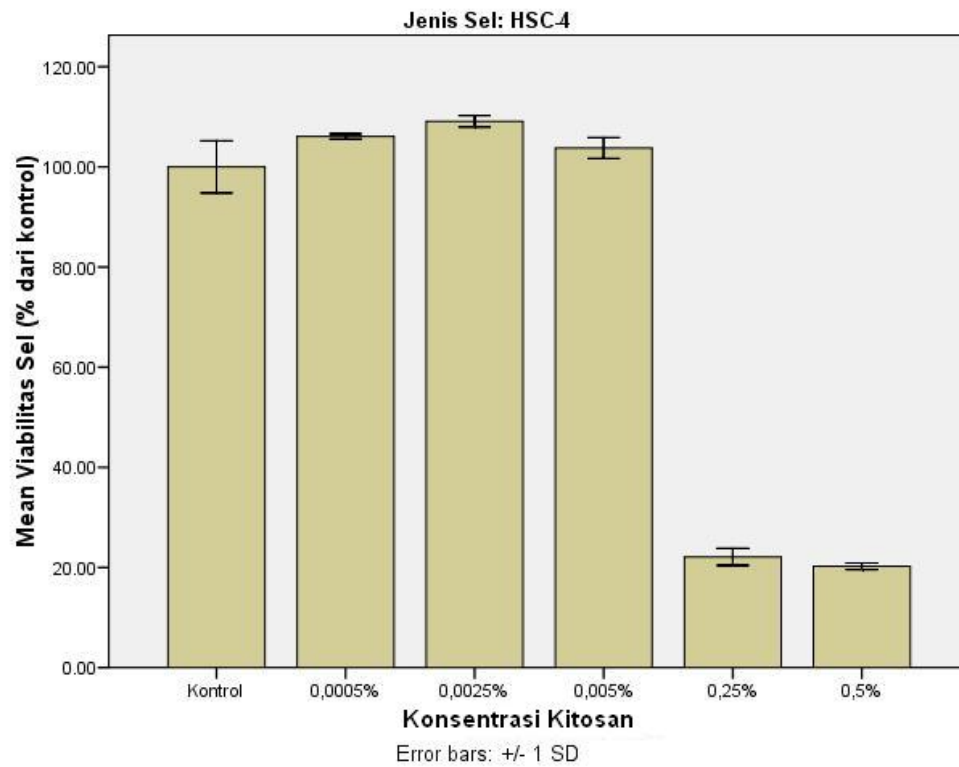
Tabel 5.1. Nilai absorbansi (OD) dan viabilitas sel HSC-4 dengan MTT Assay

	HSC-4					
	Kontrol (tanpa Kitosan)	Kitosan 0,0005%	Kitosan 0,0025%	Kitosan 0,005%	Kitosan 0,25%	Kitosan 0,5%
Rata-rata Absorbansi (OD) ± SD	2,850 ± 0,015	3,024 ± 0,015	3,109 ± 0,032	2,957 ± 0,059	0,630 ± 0,048	0,577± 0,019
Viabilitas Sel HSC-4 ± SD	100% ± 5,21%	106,09% ± 0,52%	109,10% ± 1,14%	103,75% ± 2,08%	22,11% ± 1,69%	20,23% ± 0,67%

Viabilitas sel HSC-4 kelompok Perlakuan 0,0005% (106,09% ± 0,49%); 0,0025% (109,10% ± 1,04%); dan 0,005% (103,75% ± 2,01%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol (100% ± 1,98%). Sedangkan pada kelompok Perlakuan 0,25% (22,11% ± 7,65%) dan 0,5% (20,23% ± 3,29%) viabilitas selnya lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol.

Secara statistik, perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 0,0005%; 0,0025%, 0,25%; dan 0,5% mempunyai perbedaan bermakna ($p < 0,05$), sedangkan perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 0,005% tidak mempunyai perbedaan bermakna ($p > 0,05$). (Lampiran 5) Terlihat bahwa persentase viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok Perlakuan dengan konsentrasi 0,0025% dan menurun seiring dengan

meningkatnya konsentrasi. Perbandingan tersebut dapat lebih jelas terlihat pada grafik yang terdapat dalam Gambar 5.3.



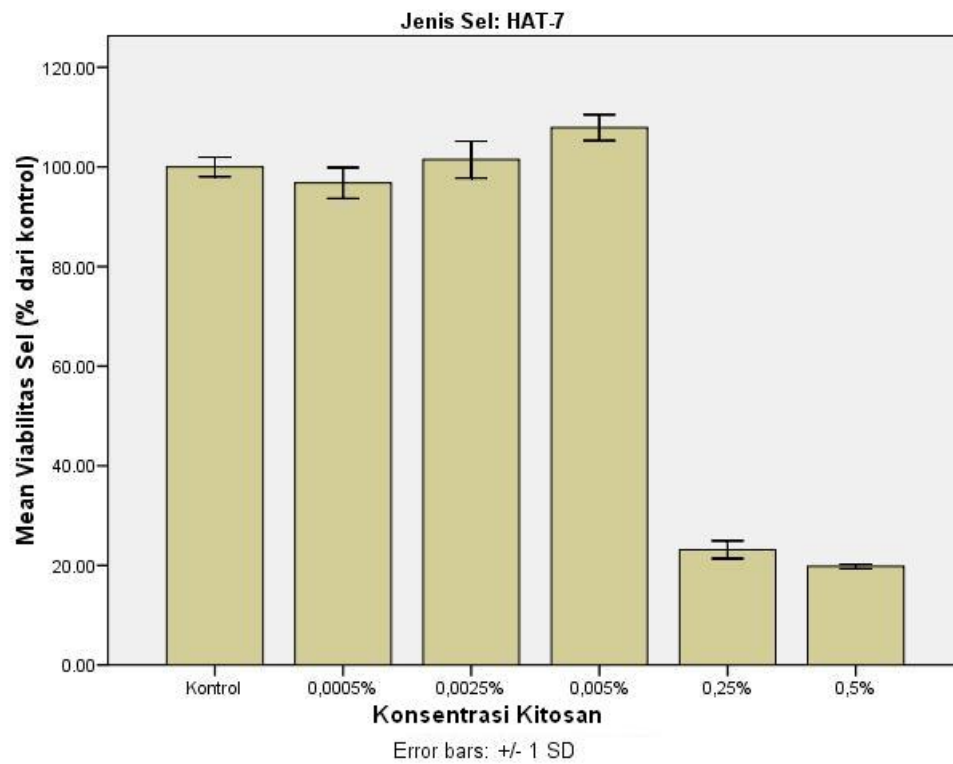
Gambar 5.3. Viabilitas Sel HSC-4 berdasarkan konsentrasi kitosan dan standar deviasinya

Tabel 5.2. Nilai absorbansi (OD) dan viabilitas sel HAT-7 dengan MTT Assay

	HAT-7					
	Kontrol (tanpa Kitosan)	Kitosan 0,0005%	Kitosan 0,0025%	Kitosan 0,005%	Kitosan 0,25%	Kitosan 0,5%
Rata-rata Absorbansi (OD) ± SD	3,211 ± 0,019	3,108 ± 0,149	3,258 ± 0,1	3,464 ± 0,119	0,743 ± 0,084	0,635 ± 0,015
Viabilitas Sel HSC-4 ± SD	100% ± 1,98%	96,79% ± 3,11%	101,47% ± 3,71%	107,90% ± 2,61%	23,15% ± 1,79%	19,79% ± 0,48%

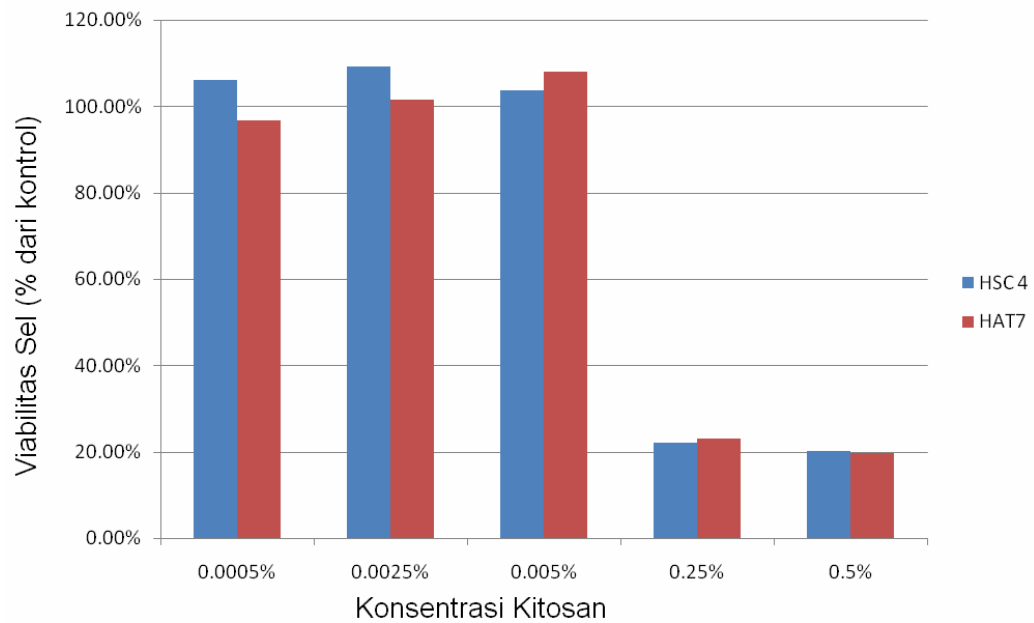
Viabilitas sel HAT-7 kelompok Perlakuan 0,0025% (101,47% ± 3,71%) dan 0,005% (107,90% ± 2,61%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol (100% ± 1,98%). Sedangkan viabilitas sel pada kelompok Perlakuan 0,0005% (96,79% ± 3,11%), 0,25% (23,15% ± 1,79%), dan 0,5% (19,79% ± 0,48%) lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol.

Secara statistik, perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 0,005%; 0,25%; dan 0,5% mempunyai perbedaan bermakna ($p < 0,05$), sedangkan perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 0,0005% dan 0,0025% tidak mempunyai perbedaan bermakna ($p > 0,05$). (Lampiran 3) Persentase viabilitas tertinggi terletak pada kelompok Perlakuan dengan konsentrasi 0,005% dan menurun sejalan dengan meningkatnya konsentrasi. Perbandingan tersebut dapat lebih jelas terlihat pada grafik yang terdapat dalam Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Viabilitas Sel HAT-7 berdasarkan konsentrasi kitosan dan standar deviasinya.

Apabila viabilitas kedua jenis sel dibandingkan dalam konsentrasi yang sama, maka pada kelompok Perlakuan 0,0025%; 0,005%; 0,25%; dan 0,5% secara statistik mempunyai perbedaan bermakna ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok Perlakuan 0,0005% tidak mempunyai perbedaan bermakna ($p > 0,05$). (Gambar 5.5) (Lampiran 3)



Gambar 5.5. Perbandingan viabilitas sel HSC-4 dan HAT-7 pada berbagai konsentrasi.

Tabel 5.3. Nilai konsentrasi IC₅₀ sel HSC-4 dan HAT-7

Jenis Sel	Konsentrasi Kitosan	Nilai konsentrasi IC ₅₀
HSC-4	0,005% - 0,25%	0,166%
HAT-7	0,005% - 0,25%	0,172%

BAB 6 PEMBAHASAN

Kitosan dalam dunia kedokteran menjadi salah satu pilihan alternatif yang cukup sering digunakan karena sifatnya yang biokompatibel terhadap jaringan dan dapat berfungsi sebagai bahan antitumor. Salah satunya, dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi. Benang operasi ini mempunyai keunggulan dapat diurai dan diserap dalam jaringan tubuh, tidak toksik, dapat disterilisasi dan dapat disimpan lama. Selain itu, kitosan berasal dari kulit atau cangkang hewan krustasea laut dimana dalam kehidupan sehari-hari menjadi limbah atau sampah dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga biaya produksinya menjadi lebih murah dibandingkan bahan sintetis lainnya.⁽³⁸⁾ Pada penelitian ini diamati pengaruh berbagai konsentrasi kitosan terhadap viabilitas sel HSC-4 yang merupakan sel kanker skuamosa mulut dan HAT-7 yang merupakan sel normal.

Setelah nilai absorbansi (OD) didapat melalui pembacaan *microplate reader*, dari uji statistik Kolmogorov-Smirnov diketahui bahwa sebaran data adalah normal ($p > 0,05$), sehingga dapat digunakan uji parametrik One-way ANOVA dengan *Post Hoc Bonferroni* untuk membandingkan kelompok Kontrol dengan masing-masing kelompok Perlakuan. (Lampiran 1 & 6) Uji *One-way ANOVA* dipilih karena terdapat lebih dari dua kelompok data viabilitas sel. Kelompok tersebut adalah kelompok Kontrol dibandingkan dengan kelompok Perlakuan pada konsentrasi 0,0005%; 0,0025%; 0,005%; 0,25%; dan 0,5%. Pada sel HSC-4, uji *Post Hoc Bonferroni* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) pada hampir semua kelompok Perlakuan kecuali pada perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 0,005%. Kemudian pada sel HAT-7, perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan pada konsentrasi 0,0005%; 0,25%; dan 0,5% mempunyai perbedaan bermakna ($p < 0,05$), namun tidak berbeda bermakna pada kelompok lainnya.

Uji *T* dilakukan untuk membandingkan 2 kelompok sel, yaitu viabilitas sel HSC-4 dan HAT-7 pada konsentrasi yang sama. Hasilnya, hampir semua Uji *T* kelompok Perlakuan mempunyai perbedaan bermakna ($p > 0,05$), kecuali pada kelompok perlakuan 0,0005%.

Untuk menentukan titik maksimum kitosan mulai berefek sitotoksik, maka dalam penelitian ini digunakan IC_{50} . IC_{50} menunjukkan konsentrasi suatu bahan yang dibutuhkan untuk menghambat 50% replikasi sel secara *in vitro*.⁽³⁹⁾ Nilai IC_{50} didapat dengan menggunakan uji statistik regresi linear. Terlihat pada kelompok Perlakuan 0,005% dan 0,25% ada penurunan viabilitas yang cukup signifikan. Nilai IC_{50} sel HSC-4 adalah 0,166%, yang berarti pada konsentrasi kitosan 0,166%, viabilitas sel HSC-4 terhambat 50%. Meskipun demikian, nilai IC_{50} diatas tidaklah akurat, dikarenakan rentang antar konsentrasi besar dan persamaan garis secara statistik diantara keduanya tidak murni linear. Tetapi dapat disimpulkan bahwa nilai IC_{50} terletak diantara kelompok Perlakuan 0,005% dan 0,25%.

Mekanisme kerja kitosan dalam menimbulkan efek sitotoksik terhadap sel HSC-4 tidak diteliti dalam penelitian ini. Menurut laporan Takashi Mori, et al., kitosan menginduksi apoptosis makrofag. Mekanismenya melalui Fas signaling pathway. Pertama-tama kitosan akan berikatan dengan reseptor *mannose*, kemudian keduanya akan internalisasi ke dalam sel dan didegradasi oleh lisosom menjadi *N-acetyl-D-glucosamine*.⁽⁴⁰⁾ Menurut sumber lain, mengatakan bahwa glukosamin terasetilasi merupakan bahan antitumor, sedangkan glukosamin sendiri bersifat toksik terhadap sel-sel tumor sehingga dapat menurunkan kadar kolesterol darah dan kolesterol liver.⁽³⁸⁾ Kemudian pada penelitian Zhe Wang, dikatakan bahwa glukosamin sulfat dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada galur sel CML (K562).⁽⁴¹⁾ Setelah dipaparkan oleh glukosamin sulfat, sel K562 mengembangkan banyak vakuola ke dalam sitoplasma. Vakuola-vakuola ini menyerupai lisosom autofagik dan ketika terdapat kebocoran beberapa komponen lisosomal, seperti cat B dan D, ke dalam sitosol, maka akan menginduksi apoptosis. Berdasarkan data dan analisis hasil penelitian diatas, maka subhipotesis pertama yang mengatakan bahwa kitosan memiliki efek terhadap galur sel kanker skuamosa (HSC-4) pun diterima.

Kemudian pada sel HAT-7, nilai IC_{50} terletak pada konsentrasi kitosan 0,172%. Hal ini menandakan bahwa pada konsentrasi 0,172%, kitosan dapat menurunkan viabilitas sel HAT-7 sebesar 50% dan apabila konsentrasi kitosan terus dinaikkan maka diklasifikasikan sebagai efek sitotoksitas.

Pada sel HAT-7, kitosan dengan konsentrasi kecil dapat meningkatkan viabilitas sel, sedangkan ketika konsentrasinya ditingkatkan, kitosan mulai menunjukkan efek sitotoksiknya. Terlihat pada kelompok Perlakuan 0,25% terjadi adanya penurunan viabilitas sel yang cukup signifikan yang berarti kitosan berefek sitotoksik, akan tetapi mekanisme kerja kitosan dalam menimbulkan efek meningkatkan viabilitas sel dan menurunkan viabilitas sel HAT-7 tidak diteliti dalam penelitian ini. Kitosan dengan konsentrasi yang sangat kecil terlihat adanya peningkatan viabilitas sel, diasumsikan bahwa dalam konsentrasi kecil kitosan dapat didegradasi oleh lisosom dan menjadi glukosamin. Jika pada sel tumor glukosamin bersifat toksik, lain halnya dengan bagi sel normal. Glukosamin dalam konsentrasi kecil akan membuat sel lebih aktif. Apabila konsentrasi kitosan dinaikkan, kitosan akan terlebih dahulu merusak membran sel dan menyebabkan sel akan mati. Hal ini diperkuat dengan penelitian Tee Yong Lim mengatakan bahwa kitosan dengan 50 µg/ml meningkatkan differensiasi sel *bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMMSC)* menjadi sel osteoblas.⁽⁴²⁾ Kemudian penelitian lainnya mengatakan bahwa kitosan dengan konsentrasi 30% dapat meningkatkan viabilitas sel kolagen yang berperan dalam penyembuhan luka.⁽⁴³⁾ Juga ada penelitian yang mengatakan bahwa kitosan dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit pada tikus.⁽⁴⁴⁾ Berdasarkan hasil penelitian dan analisa diatas, maka subhipotesis kedua yang mengatakan bahwa kitosan mempunyai efek terhadap galur sel HAT-7 pun diterima.

Pada penelitian ini, tidak hanya dilihat efek kitosan terhadap sel kanker saja, melainkan juga dibandingkan dengan sel normal, yaitu HAT-7. Terlihat pada data hasil penelitian bahwa pola viabilitas kedua jenis sel hampir sama. Tetapi pada kelompok Perlakuan 0,0005%, viabilitas sel HSC-4 lebih tinggi daripada viabilitas sel HAT-7. Hal ini mungkin disebabkan karena pada umumnya sifat sel kanker yang lebih proliferaatif dibandingkan sel normal, sehingga dengan konsentrasi kitosan yang sangat kecil viabilitas sel HSC-4 akan terlihat lebih tinggi daripada sel HAT-7 meskipun secara statistik hal ini tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Begitu pula pada kelompok Perlakuan 0,0025%, viabilitas sel HSC-4 lebih tinggi daripada HAT-7 dan secara statistik, mempunyai perbedaannya bermakna. Kemudian pada kelompok Perlakuan 0,005%, terlihat

bahwa kitosan mulai menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel HSC-4, sedangkan pada sel HAT-7 viabilitas sel meningkat. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh jenis dan karakteristik sel. Menurut *microbiologyprocedure.com*, membran sel kanker mempunyai muatan negatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel normal. Kemudian kitosan sendiri bermuatan positif, sehingga apabila konsentrasi kitosan dinaikkan, membran sel kanker akan lebih cepat rusak daripada sel normal karena lebih cepat kehilangan kandungannya.⁽⁴⁵⁾

Dari penelitian-penelitian yang dilakukan mengenai kitosan terhadap berbagai macam sel, kitosan menimbulkan efek berbeda pada masing-masing jenis sel, ada yang menurunkan viabilitas sel atau menaikkan viabilitas sel tergantung dari konsentrasinya. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa efek kitosan bergantung pada konsentrasi dan jenis sel.

Sedangkan pada konsentrasi 0,25% dan 0,5% viabilitas sel sangat rendah. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertentu kitosan toksik baik terhadap sel HSC-4 maupun sel HAT-7.

