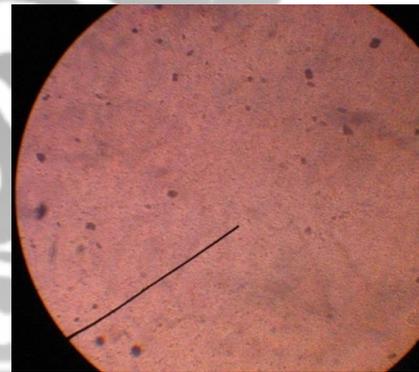


BAB 5 HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik kitosan terhadap berbagai jenis sel kanker yang dilakukan secara eksperimental di dalam laboratorium. Sel kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur sel HSC-4 dan A-549. Setelah diaktifkan kembali dari keadaan beku, sel-sel ini diinkubasikan selama satu hari pada suhu 37°C dan 5% CO₂, hingga didapat kultur sel-sel kanker dengan kondisi yang *confluent* yaitu kondisi morfologi kultur sel menyerupai jaringan asalnya, seperti pada gambar 5.1 dan gambar 5.2.



Gambar 5.1. Kultur sel-sel HSC-4
(4x/0.10) setelah 24 jam.

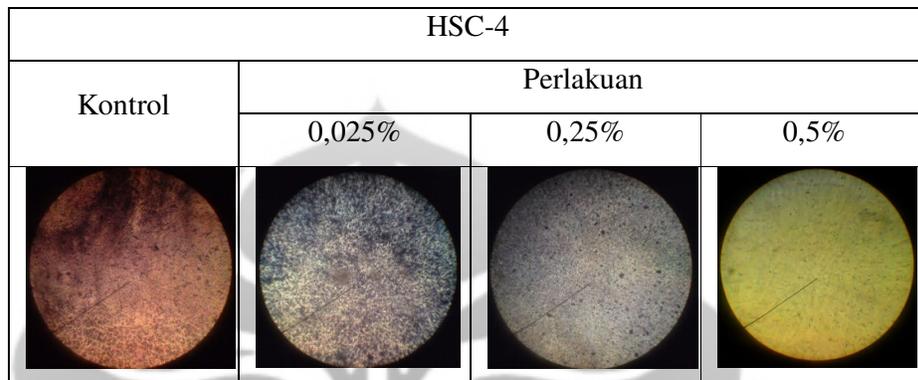


Gambar 5.2. Kultur sel-sel A-549
(4x/0.10) setelah 24 jam.

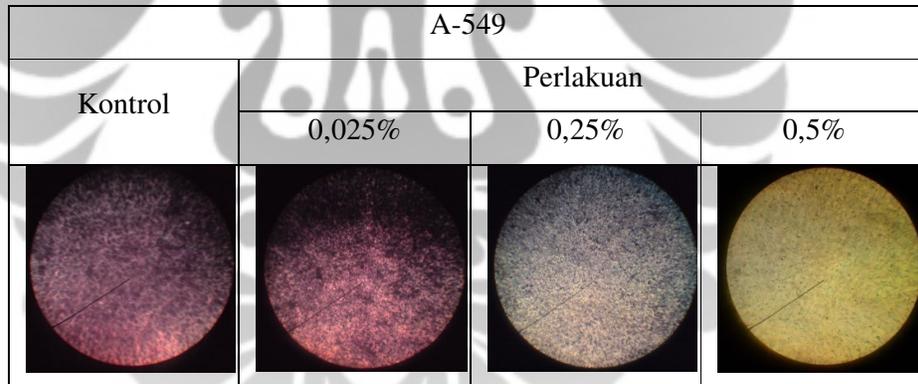
Sel yang sudah dipanen dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu: kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan. Kelompok Perlakuan adalah kelompok sel yang dipajan dengan kitosan pada konsentrasi 0,0005%; 0,0025%; 0,005%; 0,25%; dan 0,5%. Sedangkan kelompok Kontrol adalah kelompok yang tidak dipajan oleh kitosan.

Pengukuran viabilitas sel HSC-4 dan A-549 ditentukan berdasarkan metoda *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 skala. Terlihat dari gambar 5.3 dan gambar 5.4 hasil pewarnaan MTT, dimana semakin besar konsentrasi kitosan, kristal formazan yang dihasilkan akan semakin sedikit. Sehingga Medium akan bewarna kuning.



Gambar 5.3. Gambar sel HSC-4 setelah 3 jam pemaparan MTT (4x/0.10)



Gambar 5.4. Gambar sel A-549 setelah 3 jam pemaparan MTT (4x/0.10)

Dari kelompok Kontrol maupun kelompok Perlakuan diambil rata-rata nilai absorbansi dan dihitung standar deviasi dalam kelompok konsentrasi yang sama. Selanjutnya nilai absorbansi (OD) ini dinyatakan dalam persentase terhadap kelompok kontrol sebagai viabilitas sel-sel kanker. Nilai rata-rata absorbansi dan viabilitas sel dalam media kultur

galur sel HSC-4 yang dipajan kitosan dengan berbagai konsentrasi dapat dibaca pada tabel 5.1. Sedangkan nilai rata-rata absorbansi dan viabilitas sel dalam media kultur galur sel A-549 yang dipajan kitosan dengan berbagai konsentrasi dapat dibaca pada tabel 5.2.

Tabel 5.1. Nilai rata-rata absorbansi dan viabilitas sel HSC-4 beserta standar deviasi setiap rata-rata.

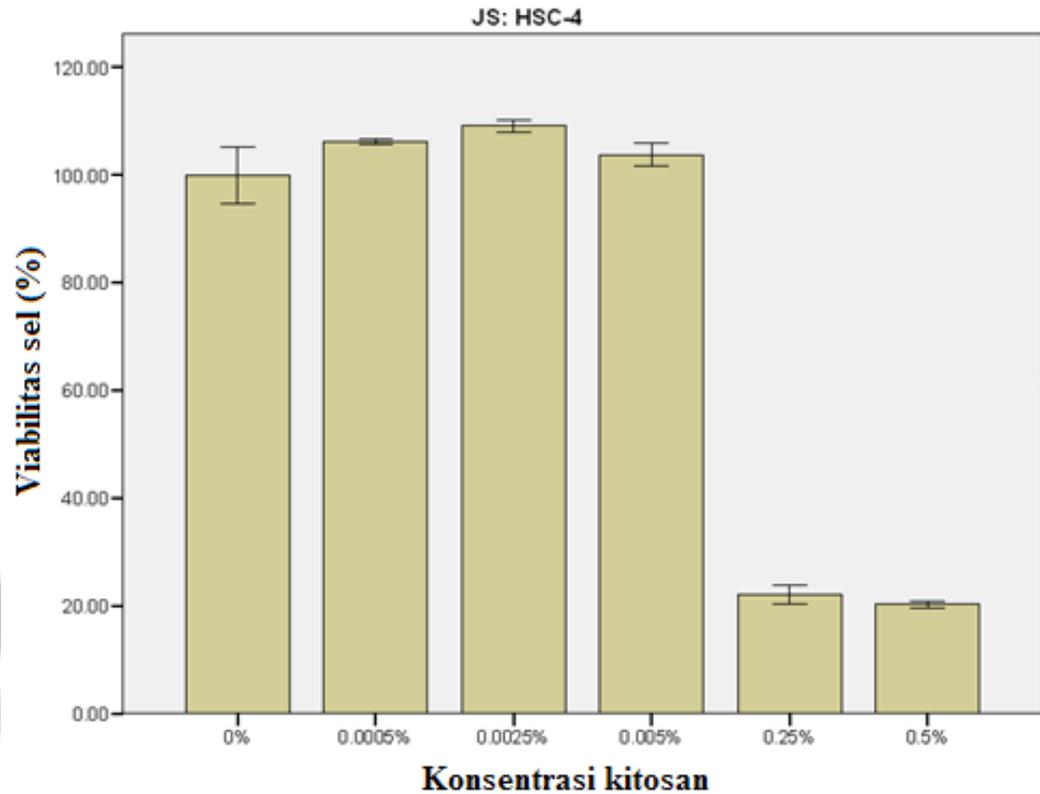
	HSC-4	
	Rata-rata OD \pm standar deviasi	Viabilitas sel \pm Standar deviasi (%)
Kontrol	2,85 \pm 0,149	100 \pm 5,21
0,0005%	3,024 \pm 0,015	106,09 \pm 0,52
0,0025%	3,109 \pm 0,032	109,1 \pm 1,14
0,005%	2,957 \pm 0,059	103,75 \pm 2,08
0,25%	0,63 \pm 0,048	22,11 \pm 1,69
0,5%	0,577 \pm 0,019	20,23 \pm 0,66

Tabel 5.2. Nilai rata-rata absorbansi dan viabilitas sel A-549 beserta standar deviasi setiap rata-rata.

	A-549	
	Rata-rata OD \pm standar deviasi	Viabilitas sel \pm Standar deviasi (%)
Kontrol	2.384 \pm 0.131	100 \pm 5,49
0,0005%	2.688 \pm 0.128	112,72 \pm 5,38
0,0025%	2.733 \pm 0.055	114,6 \pm 2,29
0,005%	2.839 \pm 0.0161	119,1 \pm 0,67
0,25%	0.742 \pm 0.021	31,12 \pm 0,89
0,5%	0.762 \pm 0.021	31.97 \pm 0,89

Pada Tabel 5.1, viabilitas sel HSC-4 kelompok Perlakuan 0,0005% (106,09% \pm 0,52%); 0,0025% (109,1% \pm 1,14%); dan 0,005% (103,75% \pm 2,08) lebih tinggi dibandingkan kelompok Kontrol (100% \pm 5,21%). Sedangkan viabilitas sel kelompok Perlakuan 0.25% (22,11% \pm 1,69%) dan 0.5%(20,23% \pm 0,66%) lebih rendah dibandingkan kelompok Kontrol (100% \pm 5,21%). Secara statistik, viabilitas kelompok Perlakuan dibandingkan kelompok Kontrol menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), kecuali pada kelompok Perlakuan 0,005%.

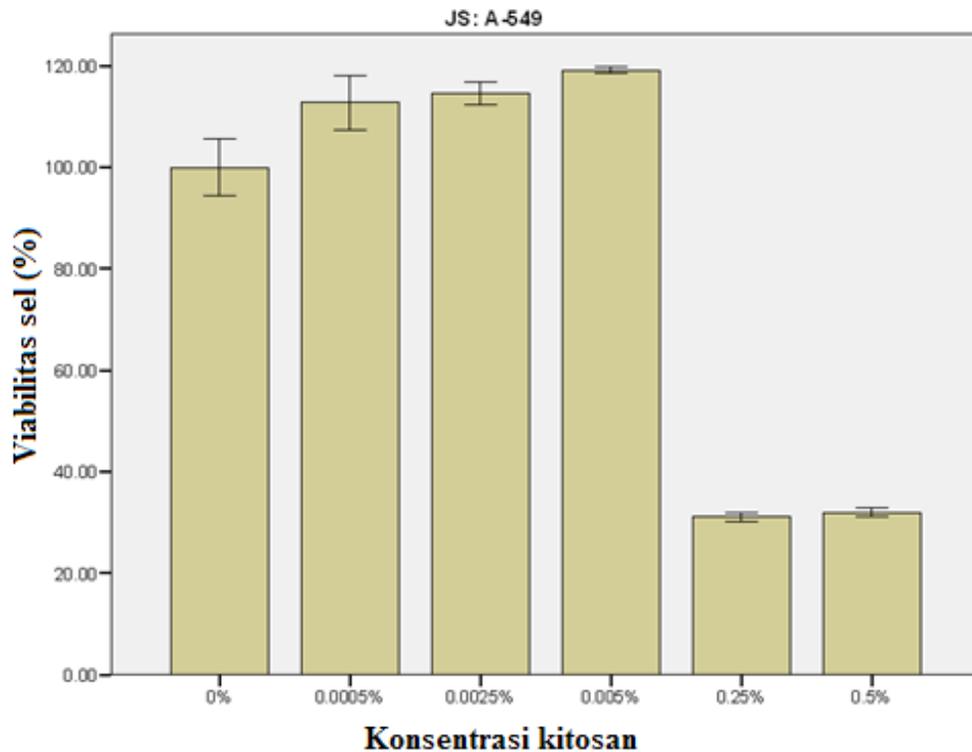
Perbandingan ini lebih jelas terlihat pada Gambar 5.5, uji viabilitas tertinggi terdapat pada kelompok Perlakuan dengan konsentrasi 0.0025% dan semakin menurun sejalan dengan peningkatan konsentrasi.



Gambar 5.5. Viabilitas sel HSC-4 berdasarkan konsentrasi kitosan beserta standar deviasinya.

Pada Tabel 5.2, viabilitas sel A-549 kelompok Perlakuan 0,0005% ($112,72\% \pm 5,38\%$); 0,0025% ($114,6\% \pm 2,29\%$); dan 0,005% ($119,1\% \pm 0,67\%$) lebih tinggi dibandingkan kelompok Kontrol ($100\% \pm 5,49\%$). Sedangkan viabilitas sel kelompok Perlakuan 0.25% ($31,12\% \pm 0,89\%$) dan 0.5% ($31,97\% \pm 0,89\%$) terlihat lebih rendah dibandingkan kelompok Kontrol ($100\% \pm 5,49\%$). Secara statistik, perbandingan antara kelompok Perlakuan dengan kelompok Kontrol mempunyai perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Perbandingan ini lebih jelas terlihat pada Gambar 5.6, uji viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok Perlakuan dengan konsentrasi 0.005%, tetapi menurun pada konsentrasi 0.25% dan sedikit meningkat pada konsentrasi 0.5%.



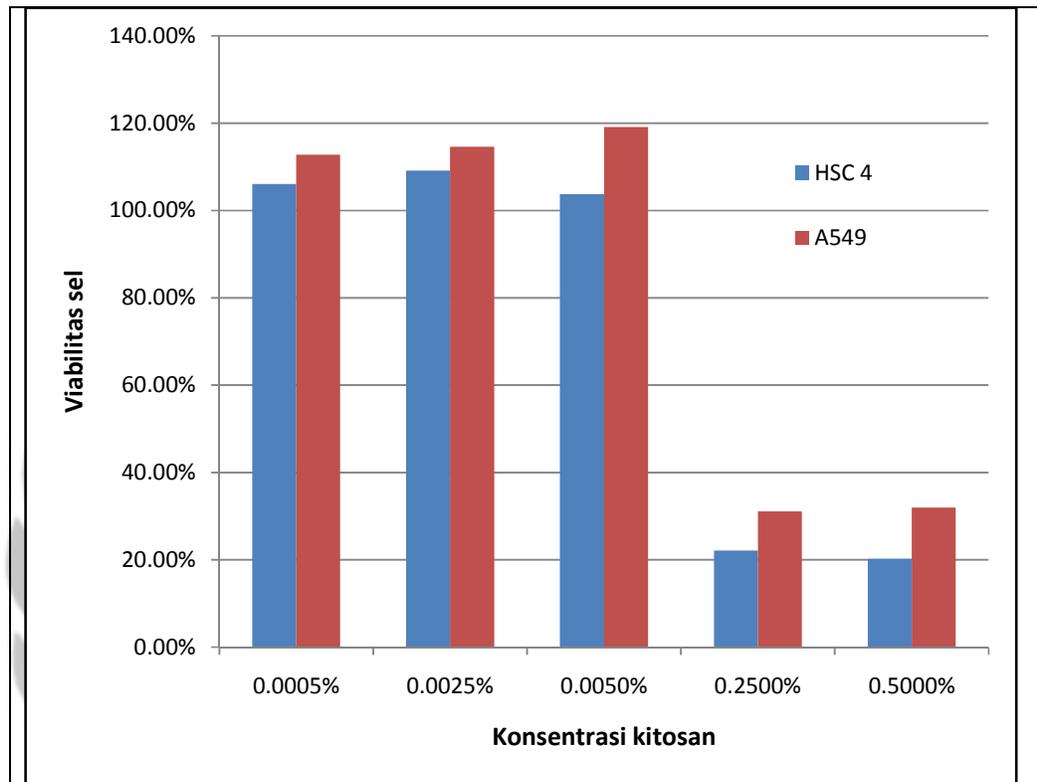
Gambar 5.6. Viabilitas sel A-549 berdasarkan konsentrasi kitosan dan standart deviasinya.

Konsentrasi penghambatan 50% (nilai C_{50}) dihitung pada tiap jenis sel dengan 2 konsentrasi: pertama, yang menyebabkan $IC > 50%$, dan yang lain $IC < 50%$. IC_{50} dari tiap jenis sel HSC-4 dan sel A-549 dapat dilihat pada tabel 5.3.⁽⁷⁹⁾

Tabel 5.3. IC_{50} (%) dalam MTT Assay

Jenis Sel	Viabilitas sel	Rentang IC_{50}	Perkiraan IC_{50}
HSC-4	50%	0,005%-0,25%	0.166%
A-549	50%	0,005%-0,25%	0.197%

Pada penelitian ini juga diamati perbandingan sitotoksitas kitosan antara sel HSC-4 dengan sel A-549. Pada Gambar 5.7, terlihat bahwa kitosan lebih bersifat toksik pada sel HSC-4 dibandingkan dengan A-549 ($p < 0,05$).



Gambar 5.7. Viabilitas sel HSC-4 dibandingkan dengan sel A-549 setelah dipajan dengan kitosan berbagai konsentrasi

BAB 6 PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, ditetapkan beberapa kelompok eksperimen untuk mengamati pengaruh pemberian kitosan terhadap viabilitas sel kanker secara *in vitro*. Viabilitas sel kanker dilihat berdasarkan nilai absorbansi hasil uji MTT yang dihasilkan oleh tiap kelompok Perlakuan kemudian dipersentasekan terhadap nilai absorbansi dari kelompok Kontrol.

Untuk melihat apakah data memiliki sebaran normal atau tidak pertama-tama dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov terhadap data nilai absorbansi yang ada. Hasil dari uji Kolmogorov-Smirnov mengindikasikan bahwa data tersebut memiliki sebaran normal (Lampiran 1-8), sehingga uji statistik lebih lanjut dapat menggunakan uji parametrik ($p > 0.05$).

Selanjutnya, untuk membandingkan kelompok Kontrol dengan masing-masing kelompok Perlakuan dalam jenis sel yang sama, dilakukan uji Oneway ANOVA dengan Post Hoc (Bonferroni). Uji Oneway ANOVA dipilih karena menggunakan lebih dari 2 kelompok data viabilitas sel. Kelompok data tersebut adalah kelompok Kontrol yang dibandingkan dengan kelompok Perlakuan kitosan pada konsentrasi 0,0005%; 0,0025%; 0,005%; 0,25%; dan 0,5%. Pada kelompok sel HSC-4, uji Post Hoc (Bonferroni) hanya menunjukkan adanya perbedaan tidak bermakna ($p > 0.05$) pada perbandingan kelompok Kontrol dengan kelompok Perlakuan 0,005% ($p = 0,363$). Sedangkan seluruh kelompok Perlakuan sel A-549 menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol. (Lampiran 10)

Uji *T* dilakukan karena membandingkan 2 kelompok sel, yaitu antara viabilitas sel HSC-4 dengan sel A-549 saat dipajan dengan kitosan dalam konsentrasi yang sama. Uji *T* dalam kelompok Perlakuan 0,0005%;

0,0025%; 0,005%; 0,25%; dan 0,5% menunjukkan perbedaan yang bermakna pada setiap kelompoknya ($p < 0.05$). (Lampiran 11-18)

Berdasarkan perhitungan Konsentrasi hambat viabilitas 50% (nilai IC_{50}), kitosan bersifat toksik terhadap galur sel HSC-4 pada konsentrasi lebih besar dari 0,166%; dan terhadap galur sel A-549 pada konsentrasi lebih besar dari 0,197%. Dapat disimpulkan bahwa kitosan memiliki efek ganda terhadap viabilitas kedua jenis sel. Pada konsentrasi kecil, kitosan akan meningkatkan viabilitas kedua jenis sel, tetapi pada konsentrasi yang lebih besar, kitosan akan menekan viabilitas kedua jenis sel tersebut. Oleh karena itu, hipotesis pertama dan kedua yang menyatakan kitosan memiliki efek toksik terhadap viabilitas galur sel kanker skuamosa mulut dan galur adenokarsinoma paru-paru dalam medium kultur diterima.

Sedangkan perbandingan keefektifan kitosan untuk menghambat viabilitas sel HSC-4 dengan A-549, terlihat pada bahwa kitosan lebih efektif menghambat viabilitas sel pada sel HSC-4. Viabilitas sel HSC-4 lebih rendah dibandingkan viabilitas sel A-549 ($p < 0.05$). Ini mengindikasikan bahwa lebih banyak sel yang mati dalam kultur sel HSC-4 dibandingkan dengan dalam kultur sel A-549 bila dipajankan konsentrasi kitosan yang sama. Hal yang sama juga ditunjukkan dalam konsentrasi hambat viabilitas 50% (nilai IC_{50}). Nilai IC_{50} menunjukkan bahwa daya hambat kitosan lebih besar pada sel HSC-4 daripada A-549. Dapat dikatakan demikian, karena kitosan membutuhkan konsentrasi yang lebih kecil bila dipajankan pada sel HSC-4 untuk mendapatkan efek hambat viabilitas yang sama daripada bila dipajankan pada sel A-549.⁽⁷⁹⁾ Oleh karena itu, hipotesis ketiga yang menyatakan kitosan memiliki efek yang berbeda terhadap viabilitas galur sel kanker sel skuamosa dan galur sel adenokarsinoma paru-paru diterima.

Ada dua asumsi yang menyebabkan kitosan dapat menghambat viabilitas sel kanker. Pertama, kitosan dapat memicu apoptosis didalam sel kanker. Dan kedua, kitosan dapat menghambat transportasi keluar masuk membran sel. Menurut penelitian Mori (2005), kitosan akan merangsang reseptor protein (mannoses) yang memediasi terjadinya fas

apoptosis pada makrofag. Dapat diasumsikan bahwa kitosan akan memicu apoptosis pada sel kanker dengan menggantikan fungsi fas ligant. Menurut penelitian Balicka-Ramis (2005), muatan positif dari gugus amino yang dimiliki kitosan (Rout, 2001) akan menempel dengan asam *N-acetylmuramic*, asam salisilat dan asam neuraminik yang bermuatan negatif pada permukaan membran sel. Dapat diasumsikan bahwa kitosan akan menghambat pertukaran antara medium, mengganggu pertukaran ion, dan menghambat kerja enzim.^{(80), (51)}

Penelitian tentang kitosan ini juga dilakukan oleh Medwin (2008). Dalam penelitiannya mengenai galur sel epitel dental (HAT-7) dan galur sel karsinoma sel skuamosa (HSC-4) yang dipajankan kitosan dengan konsentrasi 0,0005% hingga 0,5%; ditemukan pada konsentrasi 0,0005%; 0,0025%; dan 0,005%; viabilitas sel kelompok Perlakuan lebih tinggi daripada kelompok Kontrol; sedangkan pada konsentrasi 0,25% dan 0,5%; viabilitas sel kelompok Perlakuan terlihat lebih rendah daripada Kontrol. Dalam kelompok Perlakuan 0,0005% dan 0,0025%, viabilitas sel HSC-4 terlihat lebih tinggi daripada viabilitas sel HAT-7. Diasumsikan bahwa 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. Kemudian pada kelompok Perlakuan 0,005%, terlihat bahwa kitosan mulai menekan viabilitas sel HSC-4, sedangkan pada sel HAT-7 viabilitas sel meningkat. Hal ini mungkin dipengaruhi oleh jenis dan karakteristik sel kanker dengan sel normal. Menurut Stanley (1976), membran sel kanker mempunyai muatan negatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel normal. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa kitosan memiliki muatan positif, sehingga apabila konsentrasi kitosan dinaikkan, dengan lebih banyak kitosan yang dapat menempel pada sel kanker, membran sel kanker akan lebih cepat rusak daripada sel normal karena lebih cepat kehilangan kandungan lemaknya.⁽⁸¹⁾

Akan tetapi, dalam penelitian ini kami tidak meneliti bagaimana mekanisme penghambatan viabilitas sel kanker bila dipajankan kitosan;

baik mekanisme apoptosis sel maupun pertautan kitosan pada membran sel kanker. Oleh karena itu, perlu dilakukan beberapa uji lebih lanjut seperti uji apoptosis maupun uji proliferasi sel kanker bila dipajankan oleh kitosan.

