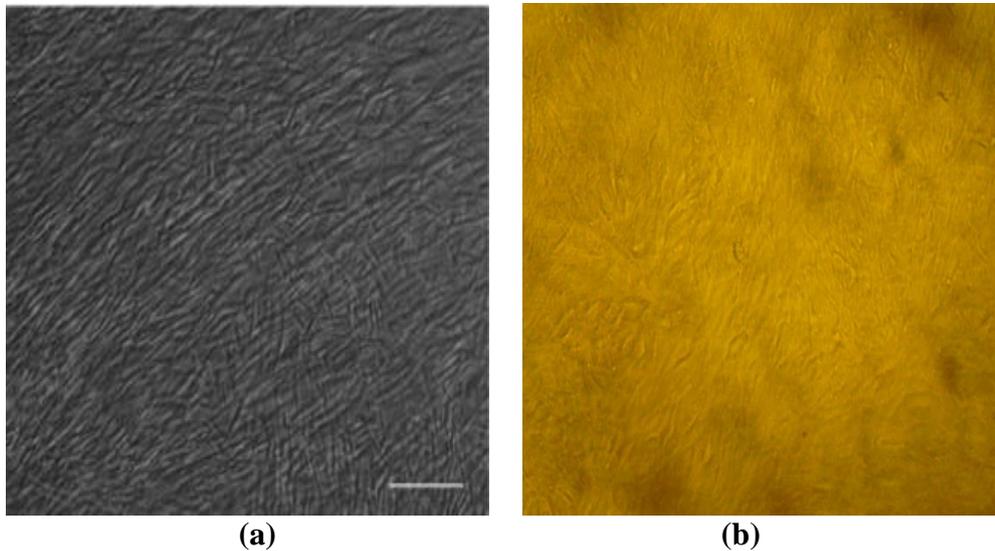


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan sel kultur primer fibroblas. Gambar 8 menunjukkan perbandingan kondisi fibroblas yang didapat dari dua produsen yang berbeda untuk memastikan sel yang didapat dari LPPT unit III UGM dalam kondisi normal dan sehat. Badawy *et al.*, (2005) menyatakan bahwa ciri-ciri morfologi dari sel fibroblas normal yaitu berbentuk sel yang memanjang dengan batas sel yang tidak jelas.

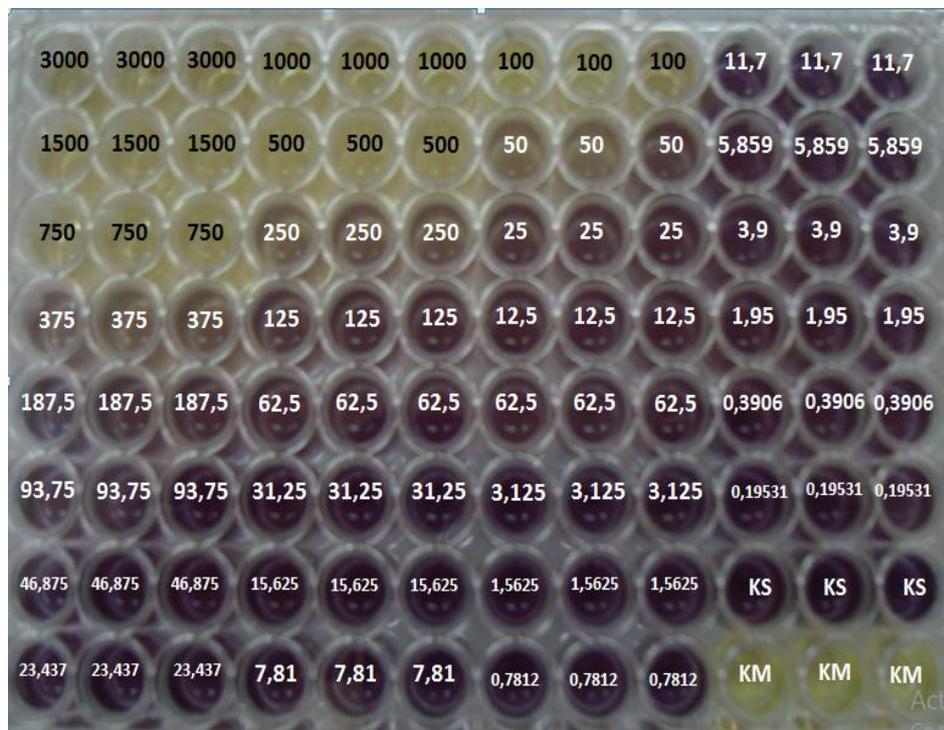


(a) (b)
Gambar 8. Morfologi *dermal fibroblast*
(a) *Normal Human Adult Dermal Fibroblast* (ATCC PCS-201-012, US) Perbesaran 200x
(b) *Human Dermal Fibroblast, adult* (Gibco C-013-5C, US) Perbesaran 40x

(Sumber : Zych *et al.*, 2014; Dokumentasi Pribadi)

Gambar 8a menunjukkan sel fibroblas (konfluensi 70%) yang diisolasi dari kulit. Sel dikultur menggunakan *fibroblast growth basal* medium yang

disuplementasi dengan 2% *fetal bovine serume* (ATCC). Gambar 8b menunjukkan kondisi sel fibroblas (*passage* ke-3, konfluensi 80-90%) yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Sel fibroblas dikultur dalam kombinasi media kultur (RPMI, DMEM, M199) yang disuplementasi dengan *fetal bovine serum* 10% (Gibco, US).



Gambar 9. Sampel penelitian pada 96-well plate. Angka pada gambar sumuran diatas adalah konsentrasi EEP dalam $\mu\text{g/mL}$. KS = Kontrol Sel (*untreated group*); KM= Kontrol Media (*culture media*).

Viabilitas fibroblas pasca perlakuan diperoleh melalui pengukuran absorbansi menggunakan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 550 nm yang kemudian dikonversikan dalam persentase viabilitas dengan menggunakan referensi absorbansi kelompok sel tanpa perlakuan. *ELISA Reader* dapat mendeteksi kristal formazan yang terakumulasi di dalam sel

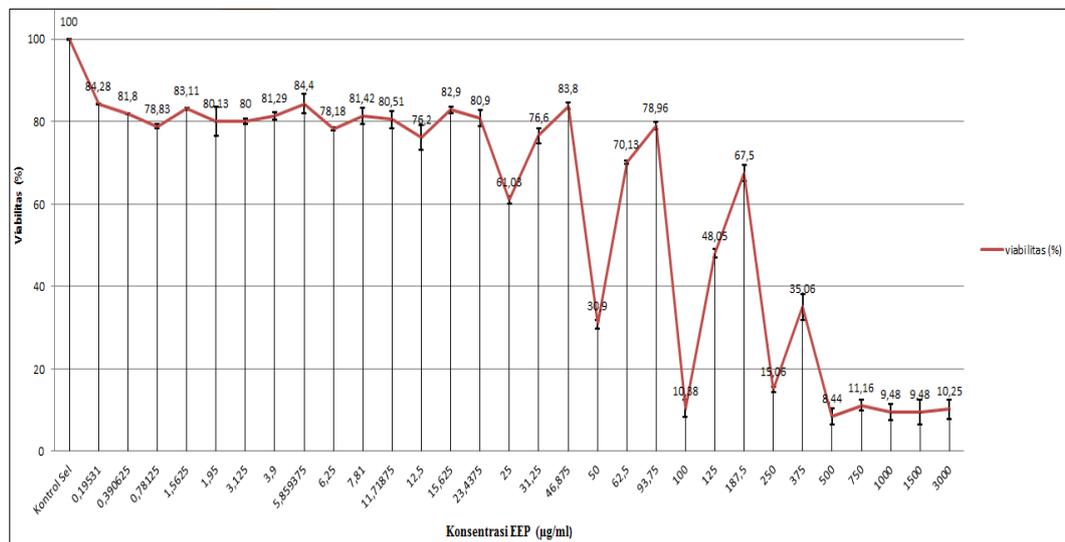
akibat reaksi reduksi substrat MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) yang berpenetrasi melalui membran sel.

Kristal formazan yang terakumulasi pada *intact membrane* secara makroskopis tampak berwarna ungu. Pada sumuran *96 well plate*, warna ungu merefleksikan banyaknya sel yang hidup sedangkan sumuran berwarna kuning merefleksikan semakin banyak sel yang mengalami kematian.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Persentase Viabilitas Fibroblas

Konsentrasi EEP ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas Sel Fibroblas (%)	Konsentrasi EEP ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas Sel Fibroblas (%)
Kontrol Sel	100	25	61,03
3000	10,25	23,4375	80,9
1500	9,48	15,625	82,9
1000	9,48	12,5	76,2
750	11,16	11,71875	80,51
500	8,44	7,81	81,42
375	35,06	6,25	78,18
250	15,06	5,859	84,4
187,5	67,5	3,9	81,29
125	48,05	3,125	80
100	10,38	1,95	80,13
93,75	78,96	1,5625	83,11
62,5	70,13	0,78125	78,83
50	30,9	0,390625	81,8
46,875	83,8	0,19531	84,28
31,25	76,6		

Data pada tabel 1 diatas adalah persentase viabilitas fibroblas masing-masing jenis konsentrasi EEP. Kontrol sel adalah sumur yang hanya berisi media kultue dan sel fibroblas (tanpa perlakuan EEP). Persentase viabilitas kontrol sel dianggap 100% dan digunakan untuk normalisasi persentase viabilitas kelompok perlakuan lainnya.



Gambar 10. Grafik pengaruh konsentrasi EEP terhadap viabilitas sel

Berdasarkan grafik diatas didapatkan viabilitas sel tertinggi (84,4%) pada kelompok konsentrasi EEP 5,859 µg/mL. Kelompok dengan viabilitas terendah terdapat pada kelompok konsentrasi EEP 500 µg/mL yaitu dengan viabilitas 8,44%.

Analisis data secara statistik diawali dengan melakukan uji normalitas terlebih dahulu. Uji normalitas menggunakan *Saphiro-Wilk* dikarenakan kelompok perlakuan < 50 .

Tabel 2. Ringkasan Hasil Uji Normalitas

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Viabilitas	,775	31	,000

Hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk* pada tabel 2 didapat nilai probabilitas (p)=0,000. Nilai probabilitas dapat dikatakan terdistribusi normal apabila $p > 0,05$. Nilai p dari uji *Saphiro-Wilk* diatas adalah $< 0,05$, sehingga data pada penelitian ini tidak terdistribusi normal.

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara dua variabel numerik. Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Spearman* karena data berjenis non-parametrik. Hasil pengujian dinyatakan dalam koefisien korelasi (r). Menurut Sostroasmoro *et al.*, (2009) nilai r dapat dikategorikan sangat lemah ($r < 0,4$), lemah ($0,4-0,59$), sedang ($0,6-0,79$), kuat ($r > 0,8$), dan hubungan sempurna ($r = 1$).

Tabel 3. Ringkasan Hasil Uji Korelasi *Pearson*

	Koefisien Korelasi (r)	
	Konsentrasi EEP	Viabilitas Fibroblast
Konsentrasi EEP	1,000	-,839
Viabilitas Fibroblas	-,839	1,000

Hasil perhitungan menyatakan koefisien korelasi (r) sebesar -0,839 yang berarti terdapat hubungan kuat antara konsentrasi EEP dan viabilitas fibroblas. Tanda negatif (-) menunjukkan hubungan yang berlawanan arah,

yang berarti semakin besar konsentrasi EEP maka semakin kecil viabilitas fibroblas *vice versa*.

Mengacu pada gambar 10 dapat dilihat bahwa grafik membentuk tiga pola pengaruh konsentrasi EEP terhadap viabilitas berdasarkan signifikansi perubahan viabilitas yang terjadi pada grafik. Pola pertama berada diantara konsentrasi 0,19531 $\mu\text{g/mL}$ hingga 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Pola kedua berada diantara konsentrasi 23,4375 $\mu\text{g/mL}$ hingga 500 $\mu\text{g/mL}$. Pola ketiga berada diantara konsentrasi 750 $\mu\text{g/mL}$ hingga 3000 $\mu\text{g/mL}$.

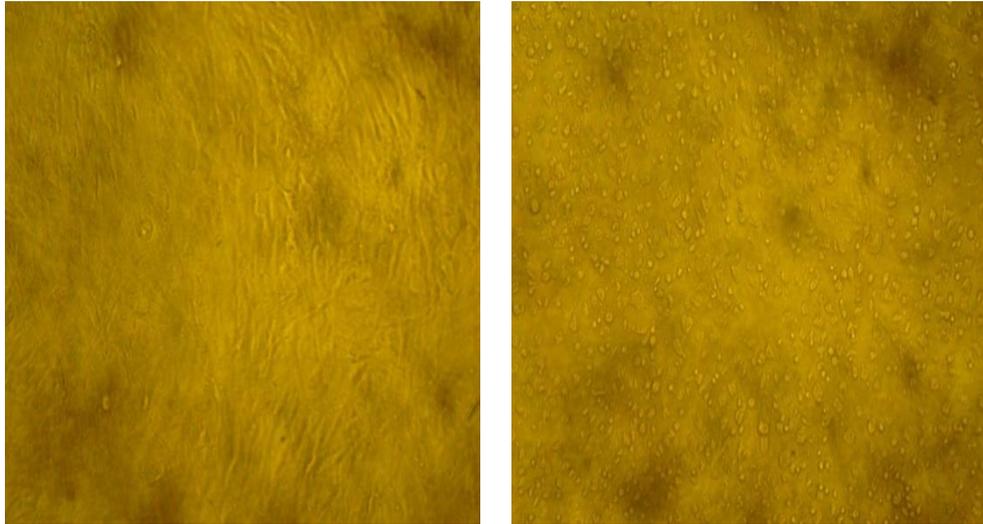
Ketiga pola ini kemudian dilakukan uji korelasi dan didapat hasil pada pola pertama $r = -0,253$; pola kedua $r = -0,67$; dan pola ketiga $r = -0,316$. Pola pertama diinterpretasikan memiliki hubungan sangat lemah dan berlawanan arah, pola kedua memiliki hubungan sedang dan berlawanan arah, pola ketiga memiliki hubungan sangat lemah dan berlawanan arah.

B. PEMBAHASAN

Data viabilitas sel pada tabel 1 menunjukkan seluruh konsentrasi EEP pada penelitian ini tidak ada yang memenuhi kriteria biokompatibel (>90% viabilitas) berdasarkan kategorisasi sitotoksisitas menurut Jahromi *et al.*, (2014). EEP dengan konsentrasi 5,859375 $\mu\text{g/mL}$ diketahui memiliki efek sitotoksik paling rendah dibanding sampel lain dengan menunjukkan viabilitas sel 84,4% (toksik ringan). Konsentrasi terkecil pada penelitian ini yaitu 0,19531 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan persentase viabilitas sebesar 84,28% (toksik ringan). Dapat diasumsikan bahwa, konsentrasi EEP yang mungkin bersifat biokompatibel berada dibawah 0,19531 $\mu\text{g/mL}$.

Gambaran kematian sel fibroblas yang dipengaruhi oleh EEP dapat dilihat pada gambar 10. Gambar tersebut menunjukkan perbedaan morfologi sel fibroblas antara kelompok kontrol sel (*untreated*) dengan fibroblas kelompok perlakuan berupa pemberian EEP 3000 $\mu\text{g/mL}$. Kelompok fibroblas dengan pemberian dosis tinggi sebesar 3000 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bentuk sel yang membulat dan berukuran kecil.

Perubahan morfologi merupakan respon sel yang terpapar oleh *stress*. *Stress* pada sel dapat berasal dari suatu substansi yang bersifat toksik, mutagenik, maupun *oxidative* (Fulda *et al.*, 2009; Ohnishi *et al.*, 2007).



Gambar 11. Morfologi fibroblas normal (kiri) dan fibroblas yang diberi perlakuan EEP 3000 µg/mL (kanan)

Perubahan morfologi serupa ditunjukkan oleh Ohnishi *et al.*, (2007) dalam penelitiannya menggunakan sel L2 (epitel paru-paru *Rattus norvegicus*) yang diinfeksi dengan *Bordetella pertusis*. Sel epitel yang diinfeksi selama 6 jam dengan *B.pertusis* menunjukkan perubahan morfologi dari bentuk rata memanjang menjadi bulat.

Sarteshnizi *et al.*, (2014) mengamati kronologis perubahan morfologi pada sel AGS yang diberikan perlakuan *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) selama 72 jam. Pada 24 jam paparan sel mengalami *shrinkage* dan menimbulkan jejas pada membran. Pada 72 jam dapat diamati sel mengalami pembengkakan sitoplasma, kerusakan membran, dan sel akan pecah menjadi fragmen yang lebih kecil disebut dengan badan apoptosis.

Popova *et al.*, (2017) memaparkan bahwa propolis menyebabkan aktivitas pro-apoptosis pada berbagai jenis baik sel neoplastik maupun sel normal. Aktivitas pro-apoptosis disebabkan terutama oleh kandungan

flavonoid (quersetin, apigenin, galangin, pinosembrin, dan pinostrobin). Menurut Sawicka *et al.*, (2012) efek sitotoksik propolis terjadi karena induksi apoptosis melalui *pathway* enzim capcase-3.

Bacanli *et al.*, (2016) melakukan penelitian mengenai efek sitotoksik galangin (salah satu senyawa derivat flavonoid yang terdapat dalam propolis) terhadap *cell line* V79 (fibroblas paru-paru *Cricetulus griceus*). Sel V79 diberi perlakuan pemberian galangin dengan konsentrasi 1 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, dan 1000 μ M. Galangin dengan konsentrasi 1 μ M (setara 0,027 μ g/mL) adalah satu-satunya yang menunjukkan kriteria biokompatibel (93,94% viabilitas). Secara umum, galangin memiliki aktivitas *dose-dependent cytotoxicity* terhadap sel V79.

Kesesuaian hasil penelitian ini terhadap hipotesa dapat dilihat dari hasil uji korelasi pada tabel 3 dan grafik pada gambar 10. Uji korelasi menyatakan hubungan kuat dan berlawanan arah antara konsentrasi EEP dan viabilitas sel fibroblas, Grafik pada gambar 10 menunjukkan adanya penurunan viabilitas seiring peningkatan konsentrasi EEP. Dari analisa data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa EEP memiliki *dose-dependent cytotoxicity* terhadap viabilitas sel fibroblas.