

PENGARUH KOMBINASI MADU DAN LIDAH BUAYA (*ALOE VERA*) TERHADAP PROLIFERASI PADA SEL LINE FIBROBLAST NIH3T3: STUDI IN VITRO

THE EFFECT OF HONEY AND *ALOE VERA* (*ALOE VERA*) COMBINATION ON THE PROLIFERATION OF THE NIH3T3 FIBROBLAST CELL LINE: IN VITRO STUDY

Januar Rizqi^{1*}, Tia Amestiasih²

¹Program Studi Keperawatan Program Sarjana, Universitas Respati Yogyakarta

²Program Studi Keperawatan Program Sarjana, Universitas Respati Yogyakarta

arizqi.januar@gmail.com

*Penulis Korespondensi

Abstrak

Madu dan lidah buaya (*Aloe vera*) merupakan bahan alami yang dapat digunakan secara tunggal maupun kombinasi. Kandungan di dalamnya memiliki sifatnya sebagai anti-microbial, anti-inflamasi, antioksidan yang digunakan untuk mencegah penyakit dan mengobati luka. Pemberian madu dan lidah buaya secara in vitro tidak menimbulkan efek toksisitas yang kuat, dan dapat mempercepat waktu penyembuhan luka secara in vivo. Fakta tersebut mendorong untuk dilakukannya penelitian mengetahui efektifitas kombinasi madu dan lidah buaya terhadap proliferasi sel fibroblast secara in vitro. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kombinasi madu dan lidah buaya terhadap proliferasi sel fibroblast NIH3T3 secara in vitro. Penelitian ini adalah eksperimen murni menggunakan desain *post-test only with control group design*. Uji proliferasi dilakukan pada kultur sel fibroblast NIH3T3 dengan metode MTT assay setelah diberikan kombinasi madu dan lidah buaya. Hasil penelitian bahwa kombinasi 0,5 % madu dengan 50 µg/mL lidah buaya dan madu 0,1% dengan 0,5 µg/mL lidah buaya dapat meningkatkan proliferasi setelah intervensi selama 24 jam. Pemberian madu dan lidah buaya menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok namun terdapat perbedaan bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Kombinasi madu dan lidah buaya meningkatkan proliferasi sel fibroblast NIH3T3 secara in vitro.

Kata kunci: proliferasi; kombinasi madu dan lidah buaya; fibroblas; in vitro

Abstract

Honey and Aloe vera are natural ingredients used singly or in combination. The content in it has anti-microbial, anti-inflammatory, antioxidant properties to prevent disease and treat wounds. Giving honey and aloe vera in vitro does not have a strong toxic effect and can speed up wound healing time in vivo. This fact encourages research to determine the effectiveness of the combination of honey and aloe vera on fibroblast cell proliferation in vitro. This study aims to test honey and aloe vera combination against the in vitro NIH3T3 fibroblast cell proliferation. This research is a pure experiment using the post-test only design with control group design. The proliferation test was carried out on NIH3T3 fibroblast cell culture using the MTT assay method after being given a combination of honey and aloe vera. The results study is the combination of 0.5% honey with 50 µg / mL aloe vera and 0.1% honey with 0.5 µg / mL aloe vera increased proliferation after 24 hours of intervention. The administration of honey and aloe vera showed no significant difference between groups, but there were significant differences compared to the control group. The combination of honey and aloe vera increases the proliferation of NIH3T3 fibroblast cells in vitro.

Keywords: proliferation; combination of honey and aloe vera; fibroblasts; in vitro

1. PENDAHULUAN

Luka dapat didefinisikan sebagai gangguan pada kontinuitas lapisan epitel kulit atau mukosa. Luka menurut etiologi nya diklasifikasikan menjadi luka akut dan kronis [1]. Luka akut bisa sembuh dalam waktu singkat dengan pengobatan yang tepat. Luka kronis membutuhkan waktu yang lebih lama karena proses penyembuhan luka tidak berkembang secara normal, terutama karena kondisi patologis yang menyertainya seperti diabetes [2]. Luka kronis secara signifikan menjadi beban ekonomi serta menyebabkan berkurangnya produktivitas yang sangat besar bagi masyarakat dan system medis [3]. Diperkirakan pengobatan ulkus diabetes di Amerika Serikat memerlukan biaya sebesar AS \$ 9 hingga AS \$ 13 milyar dan secara keseluruhan memerlukan biaya US \$ 8659 per pasien [4].

Tujuan dalam perawatan luka harus mempertimbangkan keefektifan obat yang digunakan dengan beban keuangan pasien. Dengan munculnya produk perawatan luka alternative, diharapkan menjadi pilihan yang tepat untuk mengatasi luka kronis. Menurut WHO bahwa perawatan alternative bisa menggunakan bahan tanaman, hewan dan mineral yang dapat digunakan secara tunggal maupun kombinasi untuk mengobati dan mencegah penyakit [5]. Beberapa bahan yang tersedia di alam seperti madu dan lidah buaya dilaporkan dapat digunakan dalam pengelolaan penyembuhan luka [6]

Madu telah dikenal sebagai obat sejak berabad – abad yang lalu untuk mengatasi demam, nyeri dan mengobati luka. Madu memiliki pH rendah, aktifitas hidrogen peroksida (H_2O_2), dan berbagai fitokimia yang berguna untuk aktivitas antibakteri dan antioksidan. Kandungan vitamin C dan flavonoid berperan dalam mempromosikan jaringan baru dan meningkatkan proliferasi sel fibroblast secara in vitro [7],[8]. Sedangkan Günes dan Eser menyatakan bahwa waktu penyembuhan madu empat kali lebih cepat dibandingkan dengan kelompok methoxy-diaminoacridine pada pasien pressure ulcer [9]. Kandungan gula bersifat sebagai osmolaritas yang dapat menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme [10].

Lidah buaya adalah tanaman obat herbal dengan aktifitas biologis seperti anti mikroba, anti kanker, anti-inflamasi, dan bersifat imunomodulator yang dapat digunakan mengobati luka akut maupun luka kronis [11]. Lidah buaya mengandung berbagai senyawa aktif seperti polisakarida, vitamin, asam amino, fenolik yang berperan dalam proses angiogenesis [12]. Angiogenesis merupakan factor penting dalam remodeling penyembuhan luka. Zat anti-mikroba dan anti-inflamasi yang terkandung di dalamnya dapat mencegah TNF- α dan IL-6 yang berlebihan sehingga mempercepat fase inflamasi penyembuhan luka.

Berdasarkan hal-hal diatas, mendorong peneliti untuk mengevaluasi efek kombinasi madu dan lidah buaya terhadap proliferasi sel fibroblast NIH3T3. Urgensi dari penelitian untuk menilai kombinasi dari madu dan lidah buaya sehingga menjadi salah satu pilihan atau alternative bahan alam yang dapat digunakan sebagai perawatan luka.

2. METODOLOGI

2.1 Bahan Penelitian

Madu hutan, Lidah buaya (*aloe vera*), sel fibroblast NIH3T3 yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Terapi UGM, doxorubicin, serbuk media RPMI 1640, Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, Amfoterisin B, Penisilin Streptomisin (Penstrep), Tripsin EDTA 0,25%, Sodium Dedosil Sulfat (SDS) (Gibco®), Natrium bikarbonat (Nacalai Tesque), Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen®), pereaksi yellow MTT ((3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida) (Bio Basic Inc.®).

2.2 Persiapan Kombinasi Madu dan Lidah Buaya

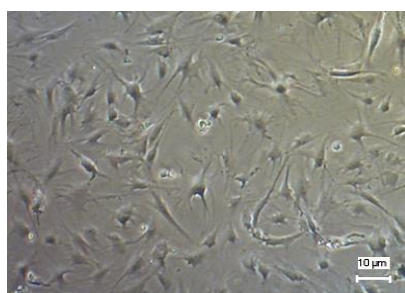
Madu yang digunakan diperoleh dari Klinik Kitamura Pontianak berasal dari hutan Putusibau Kalimantan Barat. Madu di larutkan di dalam *Dubecco's Minimal Essential Medium* (DMEM, Gibco). Lidah buaya diperoleh dari Pusat Pelatihan Pertanian dan Pedesaan Swadaya Kulon Progo, Yogyakarta. Pembuatan ekstrak lidah buaya dilakukan di laboratorium Farmakologi dan Terapi UGM. Selanjutnya kedua bahan dijadikan kombinasi dibagi menjadi 5 konsentrasi yaitu kombinasi 1 (madu 2% dan 500 µg/mL (0,005%) lidah buaya), kombinasi 2 (madu 1.5% dan 250 µg/mL (0.0025%) lidah buaya), kombinasi 3 (madu 1% dan 125 µg/mL (0,00125%) lidah buaya), kombinasi 4 (Madu 0.5% dan 50 µg/mL (0,0005%) lidah buaya), kombinasi 5 (Madu 0,1% dan 0.5 µg/mL (0,00005%) lidah buaya).

2.3 Uji Proliferasi dengan Metode MTT Assay

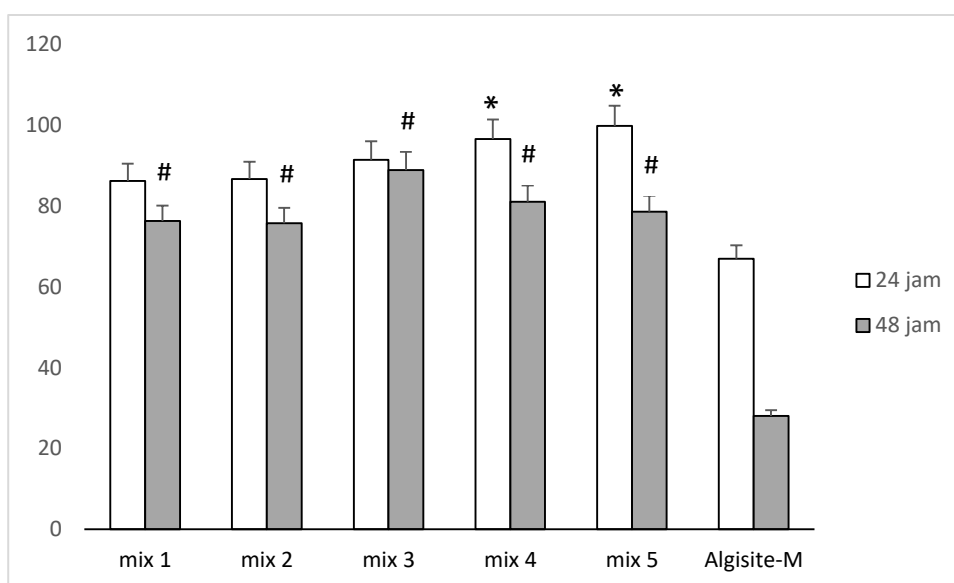
Sel fibroblasts NIH3T3 dimasukkan ke dalam *microplate* 96 well masing-masing 100 µL/sumuran sebanyak 1×10^4 . Sel di inkubasi selama 24 jam dalam keadaan starvasi. Diberi perlakuan dengan masing-masing konsentrasi kombinasi kemudian di inkubasi kembali selama 24 jam dan 48 jam. Sumuran ditambah dengan 100 µL media baru dan 10 µL reagen MTT (10 µL/100 µL per sumuran), kemudian diinkubasi selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Setiap sumuran ditambah dengan 100 µL *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% dalam HCl 0,01%. Diinkubasi pada suhu kamar selama 12 jam atau semalaman. Sumuran mikrokultur tersebut kemudian dibaca absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Perhitungan proliferasi dengan menghitung viabilitas sel yaitu persentase viabilitas sel = (Absorbansi Perlakuan–Absorbansi Media) / (Absorbansi control sel–Absorbansi Media) x 100%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan sel fibroblas mencapai konfluen 80-90%, saat diamati dengan menggunakan mikroskop inversi terlihat sel fibroblas memenuhi dasar sumuran secara merata. Sel fibroblas yang menempel di sumuran memiliki morfologi seperti gepeng memanjang, prosesus plasma, terlihat inti yang memanjang dan ovoid (gambar 1).



Gambar 1. Gambaran kultur sel-line NIH 3T3



Gambar 2. Proliferasi sel fibroblast setelah intervensi 24 jam dan 48 jam. Keterangan: *= $p < 0,05$, Uji Anova dilanjutkan Post hoc LSD, dibandingkan dengan kelompok kombinasi 1, 2, 3 dan kelompok kontrol; # = $p < 0,05$, Uji Anova dilanjutkan Post hoc LSD, dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Data yang ditampilkan pada Gambar 2. Menunjukkan bahwa pemberian kombinasi madu dan lidah buaya dapat meningkatkan proliferasi sel setelah intervensi selama 24 jam. Terdapat perbedaan bermakna pada kelompok kombinasi 4 (96,50%) dan 5 (99,80%) dibandingkan dengan kelompok perlakuan serta kelompok kontrol. Hasil perlakuan setelah 48 jam menunjukkan penurunan persentase proliferasi untuk masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kombinasi madu dan lidah buaya dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Pada proses penyembuhan luka secara normal, sel fibroblast bermigrasi dan berproliferasi secara seimbang untuk menggantikan sel atau jaringan yang rusak untuk menjaga keberlangsungan suatu organisme. Fibroblast berperan penting pada fase proliferasi dengan meningkatkan berbagai faktor pertumbuhan seperti VEGF-A, TGF- β , dan CTGF. Selain itu, fibroblasts juga migrasi dan proliferasi ke daerah luka kemudian berdiferensiasi menjadi myofibroblas untuk meningkatkan daya kontraktile luka, pematangan jaringan granulasi, mendukung signal angiogenesis dan terjadinya epitelisasi. Sel fibroblasts yang digunakan pada penelitian ini yaitu sel fibroblasts NIH3T3. Pada penelitian ini dipilih sel fibroblasts NIH3T3 karena fibroblasts terdapat pada matriks dan jaringan ikat tubuh serta banyak digunakan untuk menentukan sitotoksitas seluler dan genotoksitas berbagai formulasi [13].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase proliferasi sel pada kelompok kombinasi madu dan lidah buaya terlihat lebih baik dibandingkan kelompok kontrol yang menggunakan Algisite-M. Proliferasi sel merupakan jumlah sel yang masih hidup dari total sel keseluruhan pada suatu sampel. Pada penelitian ini, pemberian kombinasi konsentrasi 4 (madu 0.5% dan 50 $\mu\text{g/mL}$ lidah buaya) dan konsentrasi 5 (madu 0,1% dan 0.5 $\mu\text{g/mL}$ lidah buaya) secara signifikan meningkatkan viabilitas sel dibandingkan antar kelompok. Pada penelitian sebelumnya juga sudah dinilai efek sitotoksik kombinasi madu dan lidah buaya [14]. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi tersebut tidak memiliki efek sitotoksik yang kuat sehingga aman dan dapat digunakan sebagai dressing luka. Pemberian perlakuan setelah 48 jam menunjukkan penurunan proliferasi. Hasil ini kemungkinan disebabkan oleh aktifitas peningkatan ROS

(*reactive oxygen species*) yang berlebih di dalam sel. Peningkatan ROS menyebabkan kerusakan protein selular, lipid membran dan asam nukleat sehingga menyebabkan apoptosis pada sel [15].

Pemberian madu maupun lidah buaya secara tunggal berpotensi untuk meningkatkan viabilitas sel [16], [17]. Madu dan lidah buaya bersifat nontoxic dan dapat meningkatkan proliferasi pada sel fibroblasts serta memperbaiki viabilitas sel dari konsentrasi yang diberikan [18] [19]. Peningkatan nilai viabilitas sel juga terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak lidah buaya, sehingga dibutuhkan konsentrasi ekstrak lidah buaya yang lebih besar untuk menjaga atau meningkatkan viabilitas sel [20]. Pemberian madu pada penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa konsentrasi 1,5% memiliki efek proliferasi yang maksimal dibandingkan kelompok perlakuan lainnya [17], [21]. Penggunaan madu secara *in vivo* dapat mempercepat waktu penyembuhan luka empat kali lebih cepat dibandingkan kelompok kontrol pada kasus pressure ulcer.

Dalam penelitian ini juga menggunakan Algisite-M[®] sebagai kelompok kontrol, merupakan dressing standar yang sering digunakan untuk menjaga kelembaban, menyerap eksudat dan merangsang proliferasi sel. dressing Algisite-M[®] bersifat nontoxic dan dapat menjaga viabilitas sebesar 89,5% pada sel *keratinocyte* [22]. Kandungan kalsium yang terdapat pada dressing Algisite-M[®] dapat memicu aktivitas dasar seluler seperti adhesi, pergerakan sel, proliferasi dan juga diferensiasi sel [22]. Madu digunakan sebagai agen topical penyembuhan luka karena memiliki sifat antimicrobial, antioksidan dan anti inflamasi. Selain itu, madu dengan konsentrasi yang tepat dapat menciptakan lingkungan yang lembab, berguna untuk menstimulasi peningkatan faktor pertumbuhan, merangsang proliferasi dan migrasi fibroblasts. Lidah buaya mempunyai komponen glikoprotein dan polisakarida yang secara signifikan meningkatkan proliferasi dan migrasi sel fibroblasts serta berpengaruh pada ekspresi EGF dan sintesis kolagen dengan meningkatkan metabolisme sel [8]. Kombinasi kedua bahan tersebut menjadi alternatif dressing baru untuk perawatan luka karena memiliki efek sitotoksik yang rendah dan dapat meningkatkan viabilitas sel fibroblast dibandingkan dengan kelompok kontrol.

4. KESIMPULAN

Kombinasi madu dan lidah buaya dapat meningkatkan proliferasi sel fibroblas NIH3T3 dengan nilai proliferasi sebesar 86,13% sampai 99,80%.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] J. D. Whitney, "Overview: Acute and Chronic Wounds," *Nurs. Clin. North Am.*, vol. 40, no. 2, pp. 191–205, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.cnur.2004.09.002.
- [2] T. N. Demidova-Rice, M. R. Hamblin, and I. M. Herman, "Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care," *Adv. Skin Wound Care*, vol. 25, no. 7, pp. 304–314, Jul. 2012, doi: 10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.
- [3] K. Järbrink *et al.*, "The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review," *Syst. Rev.*, vol. 6, no. 1, p. 15, Dec. 2017, doi: 10.1186/s13643-016-0400-8.
- [4] J. B. Rice, U. Desai, A. K. G. Cummings, H. G. Birnbaum, M. Skornicki, and N. B. Parsons, "Burden of diabetic foot ulcers for medicare and private insurers," *Diabetes Care*, vol. 37, no. 3, pp. 651–658, 2014, doi: 10.2337/dc13-2176.

- [5] S. Fink, "International Efforts Spotlight Traditional, Complementary, and Alternative Medicine," *Am. J. Public Health*, vol. 92, no. 11, pp. 1734–1739, Nov. 2002.
- [6] A. Dorai, "Wound care with traditional, complementary and alternative medicine," *Indian J. Plast. Surg.*, vol. 45, no. 2, p. 418, 2012, doi: 10.4103/0970-0358.101331.
- [7] D. Stagos *et al.*, "Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 42, May 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3656.
- [8] A. Kabbash *et al.*, "Nature treasure: Aloe vera and Bee-products: Kabbash A *et al.* Nature treasure: Aloe vera and Bee-products," *J. Gastroenterol. Hepatol. Res.*, vol. 7, no. 4, pp. 2612–2631, 2018, doi: 10.17554/j.issn.2224-3992.2018.07.790.
- [9] Ü. Yapucu Güneş and İ. Eşer, "Effectiveness of a Honey Dressing for Healing Pressure Ulcers," *J. Wound. Ostomy Continence Nurs.*, vol. 34, no. 2, pp. 184–190, Mar. 2007, doi: 10.1097/01.WON.0000264833.11108.35.
- [10] P. H. S. Kwakman and S. A. J. Zaat, "Antibacterial components of honey," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 1, pp. 48–55, Jan. 2012, doi: 10.1002/iub.578.
- [11] K. H. Kwon *et al.*, "Antimicrobial and immunomodulatory effects of Aloe vera peel extract," *J. Med. Plants Res.*, vol. 5, no. 22, pp. 5385–5392, 2011.
- [12] S. Rahman, P. Carter, and N. Bhattarai, "Aloe Vera for Tissue Engineering Applications," *J. Funct. Biomater.*, vol. 8, no. 1, p. 6, Feb. 2017, doi: 10.3390/jfb8010006.
- [13] R. Coradeghini *et al.*, "Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts," *Toxicol. Lett.*, vol. 217, no. 3, pp. 205–216, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.11.022.
- [14] J. Rizqi and T. Amestiasih, "Evaluation of Cytotoxic Activity of Combination Honey and Aloe Vera in NIH3T3 Fibroblast Cell Lines and Its Effect on Cell Viability," vol. 1, no. 1, p. 6, 2020.
- [15] Y. H. Xuan *et al.*, "High-Glucose Inhibits Human Fibroblast Cell Migration in Wound Healing via Repression of bFGF-Regulating JNK Phosphorylation," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 9, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108182.
- [16] S. Negahdari, H. Galehdari, M. Kesmati, A. Rezaie, and G. Shariati, "Wound healing activity of extracts and formulations of aloe vera, henna, adiantum capillus-veneris, and myrrh on mouse dermal fibroblast cells," *Int. J. Prev. Med.*, vol. 8, no. 1, p. 18, 2017, doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_338_16.
- [17] J. Rizqi, D. Agustini, D. A. Agung, and N. Arfian, "Efek Sitotoksik Madu Dan Silver Dressing Terhadap Sel Fibroblas Dalam Media Tinggi Glukosa: Studi In Vitro," *J. Keperawatan Respati Yogyakarta.*, vol. 6, no. 2, p. 587, May 2019, doi: 10.35842/jkry.v6i2.316.
- [18] S. Martinotti and E. Ranzato, "Honey, Wound Repair and Regenerative Medicine," *J. Funct. Biomater.*, vol. 9, no. 2, May 2018, doi: 10.3390/jfb9020034.
- [19] E. M. Curto, A. Labelle, and H. L. Chandler, "Aloe vera: an in vitro study of effects on corneal wound closure and collagenase activity," *Vet. Ophthalmol.*, vol. 17, no. 6, pp. 403–410, Nov. 2014, doi: 10.1111/vop.12163.
- [20] S. M. Gontijo, A. D. Gomes, A. Gala-García, R. D. Sinisterra, and M. E. Cortés, "Evaluation of antimicrobial activity and cell viability of Aloe vera sponges," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.2225/vol16-issue1-fulltext-2.
- [21] R. Munshi, "Exploration of the Angiogenic Potential of Honey," *Br. J. Pharm. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 477–489, Jan. 2014, doi: 10.9734/BJPR/2014/6930.



- [22] J. E. Paddle-Ledinek, Z. Nasa, and H. J. Cleland, “Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 117, no. 7 Suppl, pp. 110S-118S; discussion 119S-120S, Jun. 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000225439.39352.ce.