

# Biokompatibilitas Ekstrak Daun Mangrove Dan Kombinasi Dengan Ascorbic Acid Pada Sel Fibroblas

*by 9-mardiyanto Riski Hartono*

---

**Submission date:** 16-Apr-2022 03:09PM (UTC+0700)

**Submission ID:** 1811964474

**File name:** 9-Mardiyanto.pdf (567.61K)

**Word count:** 5569

**Character count:** 32980



## Biokompatibilitas Ekstrak Daun Mangrove Dan Kombinasi Dengan Ascorbic Acid Pada Sel Fibroblas

Mardiyanto Riski Hartono<sup>1)</sup>, Endah Wahjuningsih<sup>2)</sup>, Kharinna Widowati<sup>3)</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah Surabaya  
email: mardiyanto.riski@hangtuah.ac.id

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah Surabaya  
email: endah.wahjuningsih@hangtuah.ac.id

<sup>3</sup> Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah Surabaya  
email: kharinna.widowati@hangtuah.ac.id

### Abstrak

Penyembuhan luka dapat mengalami gangguan sehingga perlu pengobatan. Sel fibroblas adalah salah satu faktor penting pada proses penyembuhan luka. Penggunaan growth factor efektif meningkatkan fibroblas tetapi memiliki efek samping, dan sulit diperoleh. Ekstrak daun mangrove *avicennia marina* dan kombinasinya dengan ascorbic acid memiliki potensi meningkatkan jumlah sel fibroblas. Tujuan Untuk mengetahui biokompatibilitas dan dampak ekstrak daun mangrove *avicennia marina* dan kombinasinya dengan ascorbic acid terhadap proliferasi sel fibroblas. Metode Uji MTT Assay pada kultur sel yang diberi perlakuan dan dibagi menjadi 7 kelompok yaitu kelompok Ascorbic Acid 200µg/mL (P1), Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100µg/mL (P2), Ekstrak Etanol Daun Mangrove 200µg/mL (P3), Ekstrak Air Daun Mangrove 100µg/mL (P4), Ekstrak Air Daun Mangrove 200µg/mL (P5), Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100µg/mL dan Ascorbic Acid 200µg/mL (P6), Kombinasi Ekstrak Air Daun Mangrove 100µg/mL dan Ascorbic Acid 200µg/mL (P7). Kultur sel diperiksa dengan mikroskop, dan dibaca nilai optical density dengan Elisa Reader dan dihitung persentase sel hidup. Hasil Data nilai optical density dianalisa statistik. Seluruh kelompok perlakuan (P1-P7) bersifat biokompatibel (sel hidup  $\geq 60\%$ ). Semua kelompok perlakuan memiliki persentase sel hidup diatas kontrol sel, dan kelompok P1, P3, P4, P5, P6, dan P7 memiliki perbedaan signifikan ( $p \leq 0,05$ ), tetapi kelompok P2 tidak memiliki perbedaan signifikan ( $p > 0,05$ ). Kesimpulan Terapi ekstrak daun mangrove *avicennia marina* dan kombinasinya dengan ascorbic acid bersifat biokompatibel dan mampu menstimuli proliferasi sel fibroblas.

### Abstract

Wound healing can be impaired, and it is needs a treatment. Fibroblast cells is an important factor in the wound healing process. The use of growth factors is effective in increasing fibroblasts but has side effects, and it is hard to obtain. *Avicennia marina* mangrove leaf extract and its combination with ascorbic acid have potential to increase fibroblast cells. Purpose To determine the biocompatibility and the effect of *avicennia marina* mangrove leaf extract and its combination with ascorbic acid on fibroblast cells proliferation. Methods The MTT Assay test on the cell culture treated and divided into 7 groups, which is the Ascorbic Acid 200µg/mL (P1), Mangrove Leaf Ethanol Extract 100µg/mL (P2), Mangrove Leaf Ethanol Extract 200µg/mL (P3), Mangrove Leaf Water Extract 100µg/mL (P4), Water Extract of Mangrove Leaf 200µg/mL (P5), Combination of Ethanol Extract of Mangrove Leaves 100µg/mL and Ascorbic Acid 200µg/mL (P6), Combination of Water Extract Mangrove Leaves 100 µg/mL and Ascorbic Acid 200 µg/mL (P7) groups. The cell culture was examined under a microscope, and the optical density value was read with an Elisa Reader and the percentage of living cells was calculated. Results The optical density value of data were analyzed statistically. All treatment groups (P1-P7) were biocompatible (living cells  $\geq 60\%$ ). All treatment groups had a percentage of living cells above the control cells and groups P1, P3, P4, P5, P6, and P7 had significant differences ( $p \leq 0.05$ ), but group P2 did not have a significant difference ( $p > 0.05$ ). Conclusion *Avicennia marina* mangrove leaf extract therapy and its combination with ascorbic acid are biocompatible and able to stimulate fibroblast cells proliferation

### Sejarah Artikel

Diterima : 03-12-2021

Disetujui : 27-12-2021

### Kata kunci:

Biokompatibilitas, ekstrak daun mangrove *avicennia marina*, ascorbic acid, sel fibroblast

### Keywords:

*Biocompatibility, avicennia marina mangrove leaf extract, ascorbic acid, fibroblast cells*



## Pendahuluan

Luka kronis merupakan fenomena yang banyak terjadi di dunia. Luka kronis paling banyak disebabkan oleh adanya penyakit penyerta. Penyakit penyerta seperti penyakit diabetes mellitus pada tahun 2016 memiliki jumlah penderita 422 juta jiwa populasi dunia (World Health Organization, 2018). Gangguan lain yang dapat mengganggu fase penyembuhan seperti infeksi dan gangguan nutrisi dapat menimbulkan komplikasi yang serius. WHO menyebutkan gangguan nutrisi masih menjadi masalah global dan sebanyak 1.9 miliar dewasa yang obesitas dan 462 juta dewasa yang *underweight* (Branca, 2019). Suatu nutrisi yang tepat juga diperlukan untuk membantu penyembuhan luka (Arnold dan Barbul, 2006). Di dalam rongga mulut juga mudah mengalami luka yang dapat mengakibatkan berkurangnya kualitas hidup penderita. Luka dapat disebabkan oleh gigi tiruan yang tidak sesuai, permukaan gigi yang tajam yang bisa disebabkan berbagai macam faktor, makanan minuman yang terlalu panas, bahkan sikat gigi yang terlalu kuat dan mengenai mukosa rongga mulut sehingga menimbulkan ulkus yang nyeri (Apriasari, 2012; Khairiati *et al*, 2014).

Fibroblas memiliki peran penting pada proses penyembuhan luka, yaitu sebagai komponen seluler yang berperan dalam proses koagulasi, kerandangan seperti memproduksi komponen fibril. Fibroblas juga berperan dalam produksi defensin dan cathelicidins yang merupakan peptida antimicrobial. Fibroblas juga diketahui memproduksi *growth factor* FGF, TGF  $\beta$ , dan PDGF. Fibroblas juga merupakan sumber utama yang memproduksi substitute dermal dengan memproduksi banyak komponen struktural matriks ekstraseluler (ECM) seperti kolagen, elastin, laminin, dan licosaminoglikan (Tottoli *et al*, 2020). Peningkatan jumlah fibroblas dengan menggunakan injeksi *growth factor* memiliki efek samping, dan tidak ekonomis (Cai and Han, 2018; Buzina *et al*, 2015).

Negara Indonesia merupakan negara kepulauan dengan banyak sumber bahan alam yang dapat berpotensi sebagai tumbuhan obat. Salah satu bahan alam yang memiliki potensi sebagai tumbuhan obat dan ekonomis adalah daun mangrove. Jenis daun mangrove yang akan digunakan adalah *Avicennia Marina* karena banyak tersebar di seluruh Indonesia. Daun mangrove *Avicennia Marina* memiliki potensi sebagai antibakteri, antioksidan, dan penyembuhan luka (Renaldi *et al*, 2018; Ulmursida *et al*, 2017; Mendrofa *et al*, 2015; Sharief dan Rao, 2014; Rao *et al*, 2012). Daun mangrove *Avicennia Marina* yang telah dilakukan ekstraksi air memiliki kandungan fitokimia alkaloid, flavonoid, steroid, dan tannin. Hasil ekstraksi dengan etanol memiliki kandungan flavonoid, alkaloid, steroid, saponin, dan tannin (Hartono, 2021). Kandungan alkaloid, flavonoid, phenol, saponin, dan terpenoid juga dikenal memiliki karakter sebagai antioksidan (Sharief dan Rao, 2014). Potensi antioksidan dan antibakteri turut berperan dalam proses penyembuhan luka. Daun mangrove *Avicennia Marina* juga dilaporkan memiliki kandungan asam amino *glycine* yang berperan dalam penyembuhan luka (Mendrofa *et al*, 2015). Nutrisi juga diperlukan untuk proses penyembuhan luka. Salah satu nutrisi yang berperan penting dalam



penyembuhan luka adalah *Ascorbic Acid*. *Ascorbic Acid* juga berperan membantu sintesis kolagen (Sarpooshi *et al*, 2017; MacKay dan Miller, 2003).

Hasil ekstraksi daun mangrove *Avicennia Marina* memiliki kemampuan antioksidan tetapi secara umum masih lebih rendah dari *ascorbic acid* (Sharief dan Rao, 2014). Kandungan dari hasil ekstraksi etanol daun mangrove dengan air memiliki karakter fitokomia dan biaya produksi yang berbeda karena pada proses ekstraksi air daun mangrove memiliki waktu dan proses produksi jauh lebih singkat dan ekonomis.

Bahan aktif yang berasal dari alam memiliki potensi bahan obat yang dapat membantu proses regenerasi maupun rekayasa jaringan. Bahan aktif tersebut dapat dikombinasikan dengan senyawa lain sehingga bisa memberikan hasil yang lebih maksimal (Bickford *et al*, 2006). Kombinasi dari daun mangrove dan *ascorbic acid* diharapkan dapat saling bersinergi untuk memberikan hasil yang lebih baik dalam penyembuhan luka serta dapat dikembangkan sebagai alternatif bahan obat yang efisien, ekonomis dan aman meski pasien memiliki kondisi penyulit seperti diabetes maupun malnutrisi. Berdasarkan hal yang telah dipaparkan tersebut, maka diperlukan suatu bahan obat yang efisien, ekonomis, dan efek samping rendah sehingga aman sebagai alternatif untuk membantu proses penyembuhan luka. Untuk tujuan tersebut, diperlukan penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro* untuk mengetahui konsentrasi yang bersifat biokompatibilitas dalam penyembuhan luka dari daun mangrove *Avicennia Marina*, *Ascorbic Acid*, dan kombinasi dari keduanya.

6

## Metode

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis *penelitian quasi experimental laboratories* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

Sampel berupa kultur *cell line* fibroblas BHK-21 dengan kepadatan  $5 \times 10^5$  sel/sampel (Charyadie *et al*, 2017). Kultur sel yang digunakan adalah *cell line* sel fibroblas yang kondisi baik. Kultur sel fibroblas tersebut diperoleh di Laboratorium Pusvetma, Surabaya. Besar sampel penelitian tiap kelompok penelitian adalah sebanyak 6 replikasi (Gunawan *et al*, 2014).

Proses pengambilan daun mangrove dilakukan di wilayah Gunung Anyar, Kota Surabaya. Proses pengambilan dilakukan saat pagi hari, dan dilakukan proses pemilihan daun yang memiliki kondisi utuh, baik dan berwarna hijau. Daun mangrove yang digunakan adalah *Avicennia marina*. Kumpulan mangrove segar tersebut, dilakukan proses pengeringan dengan media oven dengan suhu  $50^{\circ}$  C selama 3 hari dan proses penyerbukan menjadi *whole avicennia marina* dan kemudian dilakukan proses ekstraksi tergantung kebutuhan. Pada ekstraksi etanol dengan cara serbuk *whole* daun mangrove *avicennia marina* tersebut direndam dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:4, kemudian dilakukan pengadukan dan dibiarkan selama 1 hari. Setelah 1 hari dilakukan penyaringan dan larutan etanol dievaporasi (Wijayanti *et al*, 2008). Proses ekstrak air daun mangrove dilakukan dengan metode dekok



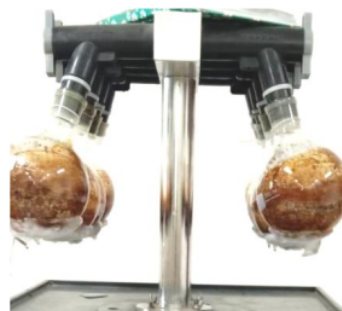
yaitu dengan serbuk daun *whole avicennia marina* direndam air dengan perbandingan 1:7 sampai terendam 2 cm dan dipanaskan suhu 90°C selama 30 menit diatas penangas air dan dilakukan penyaringan (Sulastrı *et al*, 2020). Setelah itu hasil ekstraksi dilakukan *freeze drying*.



Gambar 1. Daun Mangrove yang telah dikeringkan.



Gambar 2. Proses ekstraksi etanol daun mangrove *avicennia marina*.



Gambar 3. Proses *freeze drying* hasil ekstrak daun mangrove *avicennia marina*.

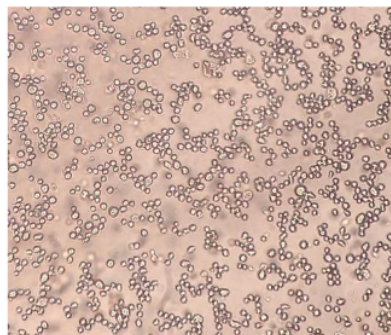
Hasil ekstraksi daun mangrove dan *ascorbic acid* ditimbang dan dilarutkan sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan untuk tiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini, konsentrasi ekstrak air daun mangrove, ekstrak etanol daun mangrove yang digunakan adalah 100 dan 200 µg/ml. Sedangkan *ascorbic acid* digunakan hanya 200 µg/ml (Hartono, 2020). Proses persiapan ekstrak dan bahan penelitian dilakukan di laboratorium farmasi UKWM Surabaya, dan proses pengujian pada sel fibrobas dilakukan di laboratorium Pusvetma, Surabaya.



**Gambar 4.** MTT Assay Plate dengan 96 sumuran yang telah berisi media sel dan kultur sel.

Persiapan kultur sel fibroblas BHK-21 dengan media kultur RPMI-1640 dengan *fetal bovine serum* dalam botol roux dan diinkubasi 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 2 hari. Setelah terbentuk lapisan sel monolayer dari fibroblas, sel dipindahkan ke *microplate* MTT Assay dengan 96 sumuran sesuai kebutuhan dan diinkubasi kembali. Dari *microplate* tersebut, dilakukan pembagian sebagai berikut:

1. Kelompok Media: Berisi Media Kultur.
2. Kelompok Kontrol: Berisi Media Kultur dan Sel Fibroblas.
3. Kelompok P1: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ascorbic Acid 200µg/mL.
4. Kelompok P2: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ekstrak etanol Daun Mangrove 100µg/mL.
5. Kelompok P3: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ekstrak etanol Daun Mangrove 200µg/mL.
6. Kelompok P4: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ekstrak air Daun Mangrove 100µg/mL.
7. Kelompok P5: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ekstrak air Daun Mangrove 200µg/mL.
8. Kelompok P6: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ekstrak etanol Daun Mangrove 100µg/ mL, dan Ascorbic Acid 200µg/mL.
9. Kelompok P7: Berisi media kultur, sel fibroblas, Ekstrak air Daun Mangrove 100µg/mL, dan Ascorbic Acid 200µg/mL.



**Gambar 5.** Hasil kultur sel fibroblas yang dilihat dengan bantuan mikroskop.

Volume larutan tiap kelompok untuk tiap sumuran adalah sebanyak 100µl. Setelah perlakuan, sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Media kultur dibuang, dan diberi cairan



MTT sebanyak 10 $\mu$ l dan diinkubasi selama 4 jam dan tiap sumuran diberi 50  $\mu$ l DMSO. Pembacaan Elisa Reader menggunakan panjang gelombang 620nm. Hasil dari pembacaan tersebut akan diperoleh Nilai OD (*optical density*) yang akan diolah dengan rumus Freshney (2010) untuk memperoleh persentase sel hidup. Bahan uji akan disebut bersifat biokompatibel jika sel yang hidup 60% keatas ( $\geq$  60%).

Rumus Freshney (2010),

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{OD Perlakuan} - \text{OD Media}}{\text{OD Kontrol Sel} - \text{OD Media}} \times 100\%$$

Data yang diperoleh juga dilakukan pemeriksaan dan analisis secara statistik dengan kemaknaan ( $\alpha = 0.05$ ). Uji statistik yang digunakan adalah uji normalitas data untuk mengetahui distribusi data menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Selanjutnya dilakukan uji beda dengan dilakukan uji homogenitas data menggunakan *Levene Test*. Untuk uji beda akan digunakan Uji analisa *t-test* dengan *Multi Comparison*.

### Hasil Dan Pembahasan

Hasil pembacaan dengan *elisa reader* akan diperoleh nilai *optical density*. Nilai tersebut mewakili jumlah sel yang hidup sehingga semakin tinggi nilai OD menunjukkan semakin tinggi jumlah sel yang hidup dan nilai diproses dengan rumus Freshney (2010). Data yang diperoleh dari tiap sampel akan dirata-rata dan dilakukan proses perhitungan. Berdasarkan hasil perhitungan rumus Freshney (2010), menunjukkan bahwa seluruh kelompok perlakuan menunjukkan persentase sel hidup adalah  $\geq$  60% (Tabel 1).



Gambar 6. Hasil MTT Assay pada kultur sel fibroblas dilakukan pembacaan dengan Elisa Reader.



**Tabel 1.** Persentase jumlah sel fibroblas dari kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol sel (Rumus Freshney, 2010).

No.	Kelompok Perlakuan	% Sel Hidup
1	Ascorbic Acid konsentrasi 200 µg/mL (P1)	121,1%
2	Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100 µg/mL (P2)	116,1%
3	Ekstrak Etanol Daun Mangrove 200 µg/mL (P3)	122,1%
4	Ekstrak Air Daun Mangrove 100 µg/mL (P4)	121,7%
5	Ekstrak Air Daun Mangrove 200 µg/mL (P5)	127,7%
6	Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100 µg/mL dan Ascorbic Acid 200 µg/mL (P6)	128,6%
7	Kombinasi Ekstrak Air Daun Mangrove 100 µg/mL dan Ascorbic Acid 200µg/mL (P7)	127,8%

Pada hasil pemeriksaan *MTT Assay* terlihat bahwa nilai rata-rata OD yang dimiliki oleh sel fibroblas pada seluruh kelompok perlakuan memiliki nilai OD yang lebih tinggi daripada kontrol sel (Grafik 1). Kelompok perlakuan bahan uji yang menunjukkan nilai OD atau persentase sel hidup paling rendah dibanding kontrol sel adalah kelompok ekstrak etanol daun mangrove 100µg/mL, yaitu sebesar 116,1%. Kelompok perlakuan bahan uji yang menunjukkan nilai OD atau persentase sel hidup paling tinggi dibanding kontrol sel adalah kelompok Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100µg/mL dan Ascorbic Acid 200µg/mL (P6).

Sebelum dilakukan analisis data pada setiap kelompok perlakuan, perlu dilakukan proses pengujian distribusi data menggunakan *Shapiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data hasil penelitian normal atau tidak. Pada uji menggunakan *Shapiro Wilk*, dikatakan data berdistribusi normal bila memiliki nilai signifikansi diatas 0,05 ( $p > 0,05$ ) dan data berdistribusi tidak normal bila memiliki nilai signifikansi 0,05 atau lebih kecil dari 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). Pada seluruh kelompok perlakuan, dan kontrol sel menunjukkan distribusi data yang normal (Tabel 2).

**Tabel 2.** Nilai statistik, signifikansi, dan standar deviasi dari tiap kelompok sampel penelitian.

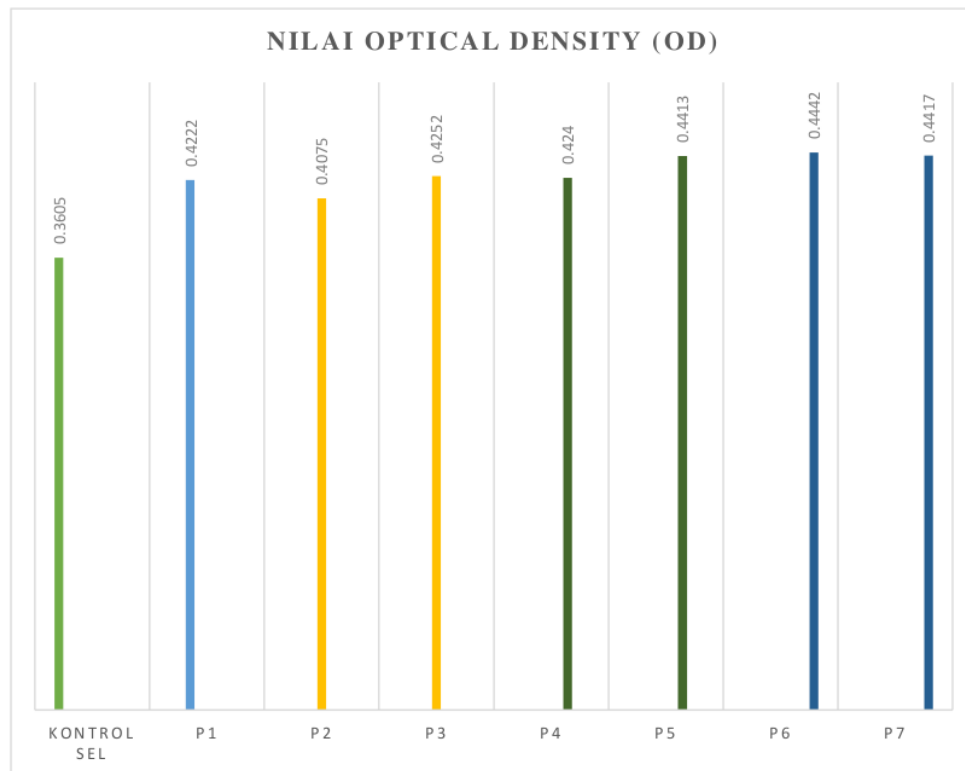
No.	Kelompok	Nilai		
		Statistik	Signifik-an	SD
1	Kontrol sel	0.876	0.250	0.013678
2	P1	0.970	0.889	0.010666
3	P2	0.964	0.850	0.009854
4	P3	0.918	0.494	0.011974
5	P4	0.977	0.936	0.017332
6	P5	0.908	0.424	0.011860
7	P6	0.923	0.530	0.027946
8	P7	0.832	0.112	0.012987

Setelah dilakukan uji distribusi data atau uji normalitas data pada seluruh kelompok, selanjutnya dilakukan pengujian homogenitas varian data dengan menggunakan *Levene Test* untuk mengetahui variasi data homogen atau heterogen. Data dikatakan memiliki varian homogen bila memiliki nilai signifikansi di atas 0,05 ( $p > 0,05$ ) dan data dikatakan tidak homogen atau nama lain heterogen jika memiliki nilai signifikansi 0,05 atau lebih kecil dari 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). Setelah dilakukan pengujian variasi



data menggunakan *Levene Test*, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0.000 ( $p \leq 0,05$ ) sehingga varian data yang diperoleh adalah heterogen.

Jadi diperoleh kesimpulan jika data berdistribusi normal tetapi karena varian data adalah heterogen sehingga uji beda yang digunakan adalah uji *t-test* dengan menggunakan uji *multi comparison* pada program SPSS untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan atau tidak signifikan.



**Grafik 1.** Grafik nilai *mean* OD pada kontrol dan kelompok perlakuan Ascorbic Acid 200µg/mL (P1), Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100 µg/mL (P2), Ekstrak Etanol Daun Mangrove 200µg/mL (P3), Ekstrak Air Daun Mangrove 100 µg/mL (P4), Ekstrak Air Daun Mangrove 200µg/mL (P5), Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100µg/mL dan Ascorbic Acid 200 µg/mL (P6), Kombinasi Ekstrak Air Daun Mangrove 100 µg/mL dan Ascorbic Acid 200 µg/mL (P7).

Pengujian hipotesis H1 bahwa ekstrak air maupun etanol daun mangrove beserta kombinasinya dengan *ascorbic acid* bersifat biokompatibel dan meningkatkan Proliferasi. Data penelitian dikatakan signifikan jika nilai signifikansinya 0,05 atau lebih kecil dari 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). Data penelitian dikatakan tidak ada perbedaan signifikan jika nilai signifikan diatas 0,05 ( $p > 0,05$ ).



Tabel 3. Hasil Uji Beda dengan uji-t *multi comparison* SPSS.

Kel.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	Kon-trol
P1		0.577	0.909	0.944	0.466	0.403	0.459	0.022*
P2			0.502	0.530	0.201	0.166	0.197	0.078
P3				0.965	0.539	0.470	0.530	0.017*
P4					0.510	0.444	0.502	0.019*
P5						0.914	0.990	0.003*
P6							0.924	0.002*
P7								0.003*
Kontrol								

**Keterangan Kelompok:**

1. *Ascorbic Acid* 200 µg/mL (P1),
2. Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100 µg/mL (P2),
3. Ekstrak Etanol Daun Mangrove 200 µg/mL (P3),
4. Ekstrak Air Daun Mangrove 100 µg/mL (P4),
5. Ekstrak Air Daun Mangrove 200 µg/mL (P5),
6. Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangrove 100 µg/mL dan *Ascorbic Acid* 200 µg/mL (P6),
7. Kombinasi Ekstrak Air Daun Mangrove 100 µg/mL dan *Ascorbic Acid* 200 µg/mL (P7),

**Keterangan Warna/Tanda:**

- = Tidak dibandingkan
- =  $p > 0,05$  (tidak ada perbedaan signifikan)
- \* = ( $p \leq 0,05$ ), ada perbedaan signifikan

Berdasarkan uji tersebut, menunjukkan bahwa kelompok *ascorbic acid* 200µg/mL, ekstrak etanol daun mangrove 200µg/mL, ekstrak air daun mangrove 100µg/mL, ekstrak air daun mangrove 200µg/mL, kombinasi ekstrak etanol daun mangrove 100µg/mL dengan *ascorbic acid* 200µg/mL, kombinasi ekstrak air daun mangrove 100µg/mL dengan *ascorbic acid* 200µg/mL memiliki perbedaan signifikan dibandingkan dengan kontrol sel karena menunjukkan hasil uji yang signifikan karena memiliki nilai signifikansi  $p \leq 0,05$ . Pada kelompok ekstrak etanol daun mangrove 100µg/mL meskipun persentase sel hidup lebih tinggi dari kontrol sel tetapi menunjukkan hasil uji yang tidak signifikan karena memiliki nilai signifikansi 0,078 yang lebih besar dari 0,05. Untuk hasil komparasi dari tiap kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada tabel 3.

Faktor intrinsik seperti usia, nutrisi, oksigenasi, sirkulasi, adanya penyakit, dan lainnya. Faktor ekstrinsik seperti radiasi, infeksi, efek obat, dan lainnya mempengaruhi proses penyembuhan (Damayanti, 2014). Upaya untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblas sebagai usaha untuk meningkatkan atau mempercepat penyembuhan luka pada pasien normal, terutama pasien yang memiliki penyakit penyerta seperti malnutrisi, diabetes atau lainnya dengan suatu terapi yang ekonomis,



mudah, aman, dan efektif masih merupakan fokus utama. Selain itu, proses penyembuhan luka yang cepat, dan tanpa menimbulkan bekas luka adalah hasil yang ideal (Park *et al*, 2018).

Fibroblas memiliki banyak peran dalam proses penyembuhan luka, salah satunya adalah sebagai komponen seluler yang berperan dalam proses koagulasi, dan kerandangan seperti memproduksi komponen fibril. Fibroblas juga berperan dalam memproduksi defensin dan cathelicidins yang merupakan amphipathic peptide yang merupakan suatu peptida antimicrobial. Fibroblas juga memproduksi *growth factor* FGF, TGF  $\beta$ , dan PDGF. Fibroblas juga merupakan sumber utama yang memproduksi substitute dermal dengan memproduksi banyak komponen structural matriks ekstraseluler (ECM) seperti kolagen, elastin, laminin, dan glicosaminoglikan (Tottoli *et al*, 2020).

Daun mangrove *avicennia marina* merupakan salah satu bahan alam yang mudah dilakukan pengolahan, ekonomis, mudah diperoleh karena banyak tersebar di kepulauan Indonesia. Nutrisi juga diperlukan untuk membantu proses penyembuhan. Salah satu nutrisi yang berperan vital dalam penyembuhan luka adalah *Ascorbic Acid* (MacKay dan Miller, 2003). *Ascorbic Acid* juga mudah diperoleh dan memiliki nilai ekonomis. Ekstrak daun mangrove *Avicennia Marina* dilaporkan bersifat antioksidan tetapi memiliki kemampuan yang lebih rendah dari *ascorbic acid* (Sharief dan Rao, 2014). Kombinasi dari daun mangrove dengan *ascorbic acid* diharapkan saling bersinergi dan berpotensi sebagai suatu formula yang dapat dikembangkan untuk mempercepat penyembuhan luka.

Pada penelitian ini, telah dipaparkan bahwa kelompok *ascorbic acid* 200 $\mu$ g/mL (P1), ekstrak etanol daun mangrove 100 $\mu$ g/mL (P2), ekstrak etanol daun mangrove 200 $\mu$ g/mL (P3), ekstrak air daun mangrove 100 $\mu$ g/mL (P4), ekstrak air daun mangrove 200 $\mu$ g/mL (P5), kombinasi ekstrak etanol daun mangrove 100 $\mu$ g/mL dengan *ascorbic acid* 200 $\mu$ g/mL (P6), kombinasi ekstrak air daun mangrove 100 $\mu$ g/mL dengan *ascorbic acid* 200 $\mu$ g/mL (P7), kepada kultur sel fibroblas selama 24 jam yang membuktikan ekstrak air dan etanol daun mangrove *avicennia marina* dan kombinasinya dengan *ascorbic acid* bersifat biokompatibel terhadap sel fibroblas karena telah memenuhi persyaratan untuk disebut biokompatibel (sel hidup  $\geq 60\%$ ). Hal itu menunjukkan bahwa kandungan bahan aktif maupun nutrisi yang terdapat dalam ekstrak daun mangrove *avicennia marina* maupun kombinasinya dengan *ascorbic acid* tidak mengganggu fungsi biologis dari sel fibroblas, dan mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas.

Pada semua kelompok perlakuan P1-P7 menunjukkan hasil uji beda yang signifikan kecuali pada kelompok P2 yaitu ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* 100 $\mu$ g/mL sehingga ekstrak etanol dengan konsentrasi 100 $\mu$ g/mL tidak terbukti mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas. Kombinasinya dengan *ascorbic acid* 200 $\mu$ g/mL pada kelompok P6 menunjukkan hasil sel hidup yang lebih tinggi daripada kelompok *ascorbic acid* 200 $\mu$ g/mL (P1) meski pada kelompok P6 tidak ada beda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok P1, tetapi kelompok P6 memiliki beda signifikan dari



kelompok kontrol. Pada golongan ekstrak etanol daun mangrove yang mulai menunjukkan hasil peningkatan jumlah fibroblas yang signifikan adalah konsentrasi 200µg/mL (P3).

Pada kelompok kombinasi ekstrak etanol daun mangrove 100µg/mL dengan *ascorbic acid* 200µg/mL pada kelompok P6, dan kombinasi ekstrak air daun mangrove 100µg/mL dengan *ascorbic acid* 200µg/mL pada kelompok P7 menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada kelompok bahan tunggal dari masing-masing jenis bahan seperti pada kelompok P1, P2, P3, P4, dan P5 yang membuktikan bahwa ekstrak air dan ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* mampu bersinergi dengan *ascorbic acid* untuk meningkatkan jumlah proliferasi sel fibroblas pada kultur sel.

Pada data penelitian ini, ekstrak air daun mangrove *avicennia marina* terlihat memiliki kemampuan yang berbeda dengan versi ekstraksi etanolnya pada konsentrasi yang sama. Pada konsentrasi 100µg/mL di kelompok ekstrak etanol daun mangrove (P2) menunjukkan hasil persentase sel hidup yang lebih rendah dari kelompok ekstrak air daun mangrove (P4). Pada konsentrasi 200µg/mL di kelompok ekstrak etanol daun mangrove (P3) juga menunjukkan hasil persentase sel hidup yang lebih rendah dari kelompok ekstrak air (P5). Hal tersebut mungkin disebabkan pada ekstrak air daun mangrove *avicennia marina* tidak memiliki kandungan saponin berdasarkan hasil pemeriksaan skrining fitokimia jika dibandingkan dengan ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* yang memiliki kandungan saponin (Hartono, 2021).

Saponin masih memiliki sifat toksik terhadap sel fibroblas pada konsentrasi tertentu. Saponin dilaporkan dapat menyebabkan siklus sel *arrest* dan menyebabkan kematian sel (Pondolak *et al*, 2010). Selain itu juga berpotensi menurunkan viabilitas pada kultur sel fibroblas dengan menurunkan ekspresi SMAD2/3 (Lee *et al*, 2019). Berdasarkan laporan tersebut, mungkin menjadi faktor berperan yang menyebabkan hasil persentase sel hidup atau viabilitas sel fibroblas pada perlakuan ekstrak air daun mangrove *avicennia marina* lebih baik daripada ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* tetapi keduanya terbukti mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas pada penelitian ini. Tetapi kelompok yang memiliki persentase sel hidup paling tinggi di penelitian ini juga adalah kelompok kombinasi ekstrak etanol daun mangrove 100µg/mL dengan *ascorbic acid* 200µg/mL (P6) jika dibandingkan dengan versi ekstrak airnya di kelompok (P7) meskipun jika dibandingkan secara statistik diantara keduanya satu sama lain tidak terbukti ada beda signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi 100µg/mL, ekstrak etanol daun mangrove mampu bersinergi lebih baik bersama *ascorbic acid* 200µg/mL dibandingkan dengan ekstrak air daun mangrove.

Kemampuan ekstrak daun mangrove *avicennia marina* untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblast kemungkinan disebabkan oleh kandungan bahan aktifnya seperti flavonoid, alkaloid yang memiliki sifat antioksidan. Berdasarkan penelitian, *ascorbic acid* juga terbukti mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas dan dapat dikombinasikan dengan ekstrak air daun mangrove *avicennia marina*, maupun ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* dengan hasil yang baik. Antioksidan dapat membantu



viabilitas sel dengan menahan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga tidak mengganggu siklus sel, dan antioksidan mampu mempromosi sel masuk ke fase S dalam siklus sel (Sun *et al*, 2013). Stress oksidatif mampu menyebabkan *cycle arrest* pada fase G1 dan menyebabkan apoptosis atau kembali ke fase berikutnya jika tingkat oksidan sudah terkendali (Sangani *et al*, 2015).

Daun mangrove *Avicennia Marina* memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, steroid, tannin yang dikenal bersifat antibakteri (Sharief dan Rao, 2014; Rao *et al*, 2012; Hartono, 2021). Kandungan alkaloid, dan flavonoid juga dikenal sebagai antioksidan (Sharief dan Rao, 2014). Flavonoid mampu mengurangi lipid peroksidasi yang mampu mencegah atau memperlambat onset sel untuk nekrosis (Ambiga *et al*, 2007). Flavonoid pada konsentrasi tertentu mampu menstimuli fibroblas dan kolagen sehingga bisa mengontrol proses penyembuhan luka (Stipcevic *et al*, 2006). Alkaloid memiliki potensi penyembuhan luka dengan berperan pada proses kolagenase, pembentukan matriks, dan proliferasi fibroblas (Mahibalan *et al*, 2016). *Ascorbic acid* mampu berperan sebagai antioksidan dan promosi proliferasi sel fibroblas melalui transporter *sodium dependent vitamin C receptor* (SVCT) (Sangani *et al*, 2015; Fulzele *et al*, 2013; Luo *et al*; 2008). Flavonoid juga mampu menginduksi reseptor *integrin* dan menstimulasi *ERK pathway* yang menstimulasi *AKT pathway* sehingga menginduksi *mTOR* yang berperan pada siklus sel (Winter *et al*, 2011; Lin *et al*, 2006).

Berdasarkan fakta dari laporan-laporan penelitian tersebut, dan hasil penelitian ini maka telah jelas dan diketahui bahwa kandungan bahan aktif pada ekstrak air daun mangrove *avicennia marina*, ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina*, dan kombinasinya bersama dengan *ascorbic acid* mampu memberikan pengaruh berupa peningkatan dari proliferasi sel fibroblas. Diperlukan penelitian lanjutan untuk optimalisasi konsentrasi dari kombinasi ekstrak daun mangrove *avicennia marina* untuk dikombinasikan dengan *ascorbic acid*, maupun ekstrak daun mangrove *avicennia* saja secara *in vitro* untuk memperoleh data yang lebih baik sebelum pengujian secara *in vivo*.

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil peneitian yang telah dipaparkan, maka dapat diambil kesimpulan:

1. Seluruh kelompok perlakuan yang terdiri dari ekstrak air daun mangrove *avicennia marina*, ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* dan kombinasinya dengan *ascorbic acid* (P1, P2, P3, P4, P5, P6, dan P7) bersifat biokompatibel terhadap kultur sel fibroblas.
2. Kelompok perlakuan P1, P3, P4, P5, P6, P7 memiliki kemampuan untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblas secara signifikan dibandingkan dengan kontrol sel.
3. Kelompok perlakuan pada penelitian ini yang memiliki hasil peningkatan proliferasi sel fibroblas tertinggi adalah kelompok kombinasi ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* 100µg/mL dengan *ascorbic acid* 200µg/mL (P6).



4. Kelompok perlakuan ekstrak air daun mangrove *avicennia marina*, ekstrak etanol daun mangrove daun *avicennia marina* bisa bersinergi dengan *ascorbic acid* untuk meningkatkan proliferasi sel fibroblast secara signifikan.
5. Kelompok perlakuan ekstrak air daun mangrove *avicennia marina* (P4, dan P5) menunjukkan hasil proliferasi sel fibroblas yang lebih baik daripada ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* (P2 dan P3).
6. Konsentrasi paling rendah yang mampu meningkatkan proliferasi sel fibroblas dari kelompok ekstrak air daun mangrove *avicennia marina* adalah 100µg/mL, sedangkan dari kelompok ekstrak etanol daun mangrove *avicennia marina* adalah 200µg/mL.

## Referensi

- Ambiga, S., Narayanan, R., Durga, G., Sukumar, D., Madhavan, S. 2007. Evaluation of wound healing activity of flavonoids from ipomoea carnea Jacq. *Ancient Science of Life* J XXVI(3): 45-51.
- Apriasari, M.L. 2012. The management of chronic traumatic ulcer in oral cavity. *Dental Journal* 45(2):68-72.
- Arnold, M., dan A. Barbul. 2006. Nutrion and Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7):42-58.
- Bickford., Paula C., Jun Tan, Roland. 2006. Nutraceuticals Synergistically Promote Proliferation of Human Stem Cells. *Stem Cells and Development* 15(1):118-23
- Branca, Francesco. 2019. Malnutrition is a World Health Crisis, *World Health Organization*, dilihat 18 November 2020. <https://www.who.int/nutrition/topics/world-food-day-2019-malnutrition-world-health-crisis/en/#> (08.53).
- Buzina, DS., Martinac, I., Drvar, DL, Ceovic, RC., Bilic, I., Marivonic, B. 2015. The Most Common Cutaneous Side Effects of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Their Management. *Acta Dermatovenerol Croat.* 23(4): 282-288.
- Cai, LZ., Han, LZ. 2018. The short- and long-term adverse effects of FGF-2 on tympanic membrane perforations. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* June 38(3):264-272.
- Charyadie, A.G., Aprilia, Widyastuti. 2017. Bioviabilitas Ekstrak Daun Mangrove *Sonneratia Alba* Terhadap Kultur Sel Fibroblas BHK-21. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi* 11(2):1-8
- Damayanti, I.P., 2014. Faktor-faktor yang berhubungan dengan penyembuhan luka post section caesarea di RSUD Arifin Achmad Provinsi Riau Tahun 2013. *Jurnal Kesehatan Komunitas* 2(5): 207-210.
- Freshney R. 2010. Culture Anima Cells: A Manual Of Basic Technique And Specialized Applications 6th. *New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.* Pp1-8,111-114,187-206,365-377.



- 3 Fulzele, S., Chothe, P., Chutkan, N., Hamrick, M., Bhattacharyya, M., Prasad, P.D., Zakhary, L., Isaacs, C., Ganapathy, C. 2013. Sodium dependent vitamin C transporter SCVT2: Expression and function in bone marrow stromal cells and in osteogenesis. *Stem Cell Research* 10(1):36-47.
- Gunawan CK, Mulawarmanti D, Laihah F. M. 2014. Sitotoksitas Ekstrak Daun Avicennia Marina Terhadap Sel Fibroblas. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi*; 8(2):67-76.
- 5 Hartono, M.R., Suardita, K., Yuliati, A. 2020. Proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell after exposure to red flesh dragon fruit extract. *Dent Res J April*. 17:107-13.
- Hartono, M.R. 2021. Potensi Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Daun Avicennia Marina Sebagai Nutraceutical. *Wahana : Tridarma Perguruan Tinggi*. Juni 73(1): 52-61.
- Khairiati, W., Martalinda, A. Bakar. 2014. Ulkus Traumatikus Disebabkan Trauma Mekanik dari Sayap Gigi Tiruan Lengkap (Laporan Kasus). *Jurnal B-Dent 1(2)*:112-117.
- Lee, H., Jeong, H., Lee, C.M., Shin, J.A., Jang, S.W., Lee, J.H., Park, S.Y., Kim, J.Y., Tchah, H. 2019. Antifibrotik effects of Sakuraso Saponin in Primary Cultured Pterygium Fibroblasts in Comparison with Mitomycin C. *Investigative ophthalmology & visual science* 60(14):47-84.
- 4 Lin, H.Y., Lansing, L., Merillon, J.M., Davis, F.B., Tang, H.Y., Shih, A., Vitrac, X., Krista, S., Kreating, T., Cao, H.J., Bergh, J., Quackenbush, S., Davis, P.J. 2006. Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contain a receptor site for resveratrol. *The FASEB Journal*: Vol 20: 0892-6638/06/0020-E1133.
- 1 Luo, S., Wang, Z., Kansara, V., Pal, D., Mitra, A.K. 2008. Activity of sodium dependent vitamin C transporter SCVT in MDCK-MDR1 cells and mechanism of ascorbate uptake. *NIH Public Acces. International Journal Pharm*: 358:168-176.
- 18 MacKay, D., dan A. L. Miller. 2003. Nutritional Support for Wound Healing. *Alternative Medicine Review* 8(4):359-377.
- 2 Mahibalan, S., Maria, S., Rohan, T.N., Rukaiyya, K., Sajeli, B. 2016. Dermal wound healing potency of single alkaloid (betaine) versus standardized crude Alkaloid enriched-ointment of *Evolvulus Alsinoides*. *Pharmaceutical Biology* vol 54 no 12: 2851-2856.
- 2 Mendrofa, A. N., I. Karsini, D. Mulawarmanti. 2015. Ekstrak daun mangrove (*A.marina*) mempercepat kesembuhan ulkus traumatikus. *Dentofasia* 14(1):11-14.
- Park, H.E.J., Deshka S.F., Michael T.L. 2018. Fibroblast and wound healing: an update. *Regenerative Medicine J* 13(5): 491-495.
- 22 Pondolak, I., Agniezka G., Danuta, S. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev* 9:425-474.
- Rao, V. U., N. Sharief, A. Srinivasulu. 2012. Antibacterial activity of leaf and stem extracts of *Avicennia marina* Leaf. *Journal of Pharmacy Research* 5(5): 2906-2909.
- 7 Renaldi, Rozirwan, T. Z. Ulqodry. 2018. The bioactivity of bioactive compound in mangrove *Avicennia marina* and *Bruguiera gymnorrhiza* as antibacterial from Payung island and Tanjung Api-Api. *Maspari Journal* 10(1):73-80.



- 1 Sangani, R., Periyasamy, T., Pathania, R., Ahmad, S., Kutiyawalla, A., Kolhe R., Bhattacharyya, M.H., Chutkan, N., Hunter, M., Hill, W.D., Hamrick, M., Isales, C., Fulzele, S. 2015. The crucial role of vitamin C and its transporter SCVT2 in bone marrow stromal cell autophagy and apoptosis. *Stem Cell Research* Sept 15(2):312-21.
- 14 Sarpooshi, H. R., M. Haddadi, M. Siavoshi, R. Borghabani. 2017. Wound Healing with Vitamin C. *Translational Biomedicine* 8(4):139-143.
- Sharief, N., U. M. Rao. 2014. Antibacterial and antioxidant activity of *Avicennia marina* Leaf. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6 (10): 252-256.
- Stipcevic, T., Jasenka, P., Dirk, V.B. 2006. Effect of Different Flavonoid on Collagen Synthesis in Human Fibroblasts. *Plant Food for Human Nutrition* April: 61(1):29-34.
- Sulastri, L., Ika O., Partomuan S. 2020. Aktivitas antioksidan kecibeling, bakau merah, dan katuk pada metode ekstraksi dan rasio ekstrak yang berbeda. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat* 31(1):1-7.
- Sun, Li Yi., Pang, Cheng Yoong., Li, Dian Kun., Liao, Chia Hsin., Huang, Wei Chao., Wu, Chao Chuan., Chou, Yi Yo., Li, Wei Wu., Chen, Shin Yuan. Chang, Yao Jen., Cheng, Ching Feng. 2013. Antioxidant cause rapid expansion of human adipose derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulator. *Journal Biomedical Science* 20(1):53.
- 16 Tottoli, E. M., Rosella D., Ida G., Enrica C., Silvia P., Bice C. 2020. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *MDPI Pharmaceutics J* 12(735):1-30.
- 11 Ulmursida, A., Ambariyanto, A. Trianto. 2017. Antibacterial activity of mangrove *avicennia marina* leaves extract against *Virgibacillus marismortui* and *micrococcus lutea* bacteria. *AACL Bioflux* 10(2): 372-380.
- 8 Wijayanti, E.D., Bambang P.S., Budi U. 2008. Pengaruh pemberian ekstrak daun api-api *avicennia marina* terhadap resopsi embrio, berat badan, dan panjang badan janin mencit. *Jurnal Veterinaria Medika* 1(1): 9-12.
- 12 Winter, Jeremiah N., Jefferson, Leonard S., Kimball, Scot R. 2011. ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling. *Journal Physiol Cell* 300(5): C1172-80.
- World Health Organization, 2018, Global Report on Diabetes, *World Health Organization*, Switzerland, dilihat 18 November 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (11:33).

# Biokompatibilitas Ekstrak Daun Mangrove Dan Kombinasi Dengan Ascorbic Acid Pada Sel Fibroblas

## ORIGINALITY REPORT

11%	%	%	11%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Bournemouth University Student Paper	1%
2	Submitted to Universitas Brawijaya Student Paper	1%
3	Submitted to Middlesex University Student Paper	1%
4	Submitted to University of Sheffield Student Paper	1%
5	Submitted to iGroup Student Paper	1%
6	Submitted to Universitas Airlangga Student Paper	1%
7	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	1%
8	Submitted to Universitas Indonesia Student Paper	<1%
9	Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia	<1%

10

Submitted to National University of Singapore

Student Paper

<1 %

---

11

Submitted to Australian National University

Student Paper

<1 %

---

12

Submitted to Universidad Estadual Paulista

Student Paper

<1 %

---

13

Submitted to Universiti Kebangsaan Malaysia

Student Paper

<1 %

---

14

Submitted to Kaplan University

Student Paper

<1 %

---

15

Submitted to Sheffield Hallam University

Student Paper

<1 %

---

16

Submitted to University of Liverpool

Student Paper

<1 %

---

17

Submitted to Endeavour College of Natural Health

Student Paper

<1 %

---

18

Submitted to Oxford Brookes University

Student Paper

<1 %

---

19

Submitted to University of the Western Cape

Student Paper

<1 %

---

20

Submitted to Roehampton University

Student Paper

<1 %

---

21

Submitted to University of Sydney

Student Paper

<1 %

---

22

Submitted to University of Leeds

Student Paper

<1 %

---

23

Submitted to Universitas Islam Indonesia

Student Paper

<1 %

---

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off

# Biokompatibilitas Ekstrak Daun Mangrove Dan Kombinasi Dengan Ascorbic Acid Pada Sel Fibroblas

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

**/0**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11

PAGE 12

PAGE 13

PAGE 14

PAGE 15