

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Pada bab ini akan disajikan hasil penelitian dan analisis data. Pembahasan dimulai dengan penyajian proses penelitian dan dilanjutkan dengan pemaparan hasil penelitian dan analisis data.

5.1 Proses Penelitian

Penelitian menggunakan putri malu sebagai variabel bebas dan sel HeLa sebagai variabel terikat. Masing-masing proses penelitian akan diuraikan di bawah ini :

5.1.1 Ekstraksi Daun Putri Malu

Serbuk daun putri malu dalam penelitian ini berasal dari Materia Medika Batu. Dilakukan ekstraksi maserasi untuk membuat ekstrak daun putri malu. Proses ekstraksi dilakukan seperti yang telah dilakukan Sharma (2010) dengan modifikasi. Modifikasi proses ekstraksi tersebut yaitu perbandingan pelarut alkohol 70% yang digunakan 1:10 untuk merendam serbuk daun putri malu dan perendaman dilakukan selama tiga hari. Selain itu dilakukan proses re-maserasi sebanyak dua kali. Proses re-maserasi adalah pemisahan antara filtrat dan residu ekstraksi daun putri malu. Kemudian, residu direndam kembali menggunakan pelarut alkohol 70% dan distirer selama 2 jam. Selanjutnya hasil filtrat pertama, kedua dan ketiga dijadikan satu dan dilakukan pemekatan menggunakan *rotatory evaporator* pada suhu kurang dari 40° C hingga pelarut menguap dan dioven. Ekstrak disimpan pada 4 ° C sampai

digunakan lebih lanjut. Ekstrak yang didapat dilakukan untuk uji fitokimia dan uji apoptosis sel HeLa.

5.1.2 Prosedur Kultur Sel HeLa dan Tunnel Assay

Penelitian ini menggunakan sampel sel kanker serviks (sel HeLa) dari Universitas Gajahmada Yogyakarta yang telah dibekukan dan disimpan dalam nitrogen cair di Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya. Dilakukan thawing pada sel HeLa beku sebelum dilakukan subkultur pada 24 *well plate*. Sel dibagi dalam empat kelompok yang mana masing-masing terdiri atas enam kali pengulangan.

Sel HeLa terbagi dalam dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol, sel HeLa tidak diberi perlakuan. Sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak daun putri malu dalam tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 200 mg/ml, 400 mg/ml dan 800 mg/ml. Setelah diberi perlakuan, kultur sel diinkubasi dalam inkubator dalam suhu 37°C, CO₂ 5% selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan fiksasi sel dengan metanol absolut dan dilakukan imunohistokimia untuk mengamati dan menghitung sel HeLa yang mengalami apoptosis dengan menggunakan *TUNNEL assay*. *Tunnel assay* dilakukan sesuai prosedur *Cells death detection kit* dari Roche inc (Swiss). Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop untuk melihat adanya apoptosis sel. Perhitungan sel dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel HeLa yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna sel yang kecoklatan pada setiap lapang pandang (gambar 5.1). Setiap perlakuan dihitung sebanyak lima kali lapang pandang dengan perbesaran 400x.

5.2 Hasil Uji Fitokimia

Hasil ekstrak pekat daun putri malu yang didapatkan dalam penelitian ini adalah sekitar 13,56 gram. Dari hasil pengamatan organoleptik, didapatkan ekstrak yang berwarna hijau tua kehitaman, konsistensi pekat dan berbau agak keras khas daun. Dilakukan uji fitokimia secara kualitatif pada ekstrak daun putri malu untuk mengetahui kandungan yang ada di dalamnya. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada tabel 5.1.

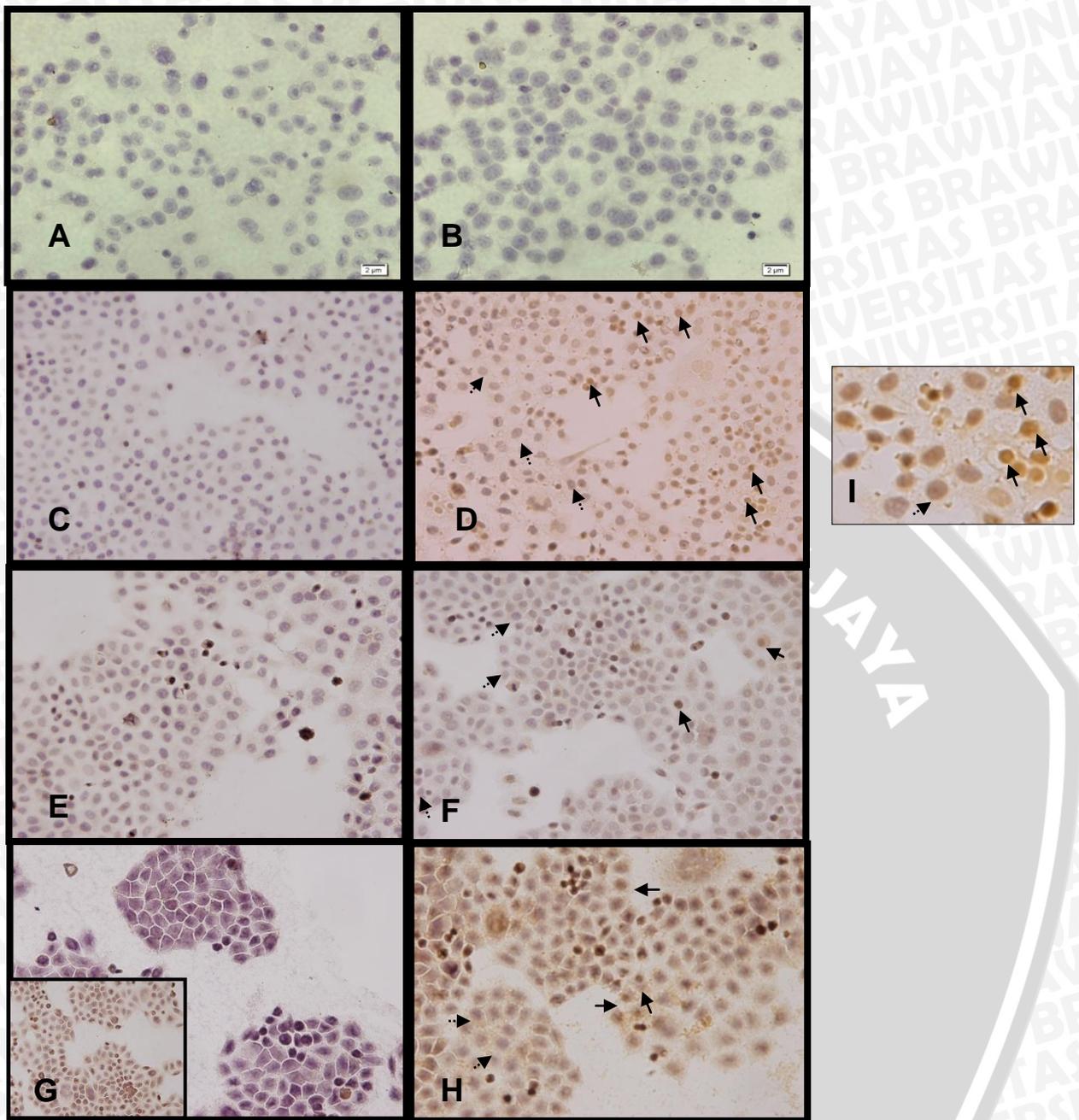
Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Putri Malu

Zat yang Diuji	Metode Uji	Hasil
Saponin	Forth / Uji Busa	Positif
Alkaloid	Meyer	Positif
Steroid (non-jenuh)	Salkowski	Negatif
Tanin	Gelatin	Positif
Polifenol	Ferriklorida	Positif

Berdasarkan tabel 5.1 diketahui bahwa ekstrak daun putri malu mengandung saponin, alkaloid, tanin dan polifenol. Namun, ekstrak daun putri malu tidak mengandung atau menunjukkan hasil negatif pada uji steroid non-jenuh yang ditandai dengan tidak terbentuknya cincin merah.

5.3 Hasil Imunohistokimia

Perhitungan sel dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel HeLa yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna sel yang kecoklatan pada inti sel di setiap lapang. Hasil imunohistokimia dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Pengecatan Imunohistokimia pada Sel HeLa setelah Perlakuan. (A) Kontrol negatif kelompok kontrol (tanpa perlakuan), (B) Kontrol (tanpa perlakuan), (C) Kontrol negatif dosis 200 mg/ml, (D) Dosis 200 mg/ml, (E) Kontrol negatif dosis 400 mg/ml, (F) Dosis 400 mg/ml, (G) Kontrol negatif dosis 800 mg/ml, (H) Dosis 800 mg/ml, (I) Perbesaran foto dosis 200 mg/ml. Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Keterangan : tanda panah menunjukkan sel yang mengalami apoptosis dengan warna kecoklatan pada inti selnya. Tanda panah putus-putus menunjukkan sel yang tid53ak mengalami apoptosis yang ditandai dengan sel berwarna ungu secara keseluruhan.

Dari gambar 5.1 dapat diketahui bahwa bentuk morfologi sel kelompok kontrol, dosis 200 mg/ml dan 400 mg/ml tidak terdapat perbedaan yaitu sel menyebar, ukuran sel sama dan kerapatan antar sel minimal. Namun, bentuk sel pada pemberian dosis 800 mg/ml ukuran sel lebih besar, membentuk koloni dan kerapatan antar sel lebih besar.

5.4 Analisis Data

5.4.1 Deskriptif Rata-Rata jumlah Sel HeLa dan Apoptosis

Perhitungan sel heLa dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel HeLa total yang hidup dan apoptosis sebanyak lima lapang pandang dan sel yang mengalami apoptosis saja. Pada rerata perhitungan jumlah sel HeLa total, diketahui pemberian ekstrak daun putri malu pada dosis 200 mg/ml dan 400 mg/ml tidak menunjukkan penurunan jumlah sel HeLa dibandingkan dengan kontrol. Penurunan jumlah sel HeLa, ditunjukkan pada perlakuan pemberian ekstrak daun putri malu pada dosis 800 mg/ml. Hasil perhitungan jumlah sel HeLa total dari masing-masing kelompok dengan lima kali pengulangan dapat dilihat pada tabel 5.2.

Persentase apoptosis dihitung dari perbandingan jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan total keseluruhan jumlah sel HeLa. Dari hasil pengujian dan perhitungan diketahui bahwa pemberian ekstrak daun putri malu mampu meningkatkan persentase apoptosis. Pada dosis 200 mg/ml, ekstrak daun putri malu mampu meningkatkan persentase apoptosis dengan rerata sebesar 25,52%. Persentase tersebut merupakan persentase paling besar jika dibandingkan dengan dosis yang lain. Sedangkan rerata apoptosis pada perlakuan pemberian ekstrak daun putri malu paling rendah dihasilkan oleh dosis 400 mg/ml. Hasil rerata apoptosis dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.2 Deskriptif Jumlah Sel Ha pada Masing-Masing Dosis Ekstrak Daun Putri Malu

Dosis	Rerata (%)	Std. Deviasi
Kontrol	509,80	115,26
200 mg/ml	611,40	157,56
400 mg/ml	529,00	131,73
800 mg/ml	267,60	63,53

Tabel 5.3 Deskriptif Persentase Apoptosis pada Masing-Masing Dosis Ekstrak Daun Putri Malu

Dosis	Rerata (%)	Std. Deviasi
Kontrol	0,00	0,00
200 mg/ml	25,52	10,86
400 mg/ml	17,98	9,79
800 mg/ml	19,86	14,09

5.4.2 Uji Asumsi Data yang Melandasi ANOVA

Pengujian jumlah sel HeLa dan Apoptosis dengan menggunakan 4 level perlakuan (kontrol, ekstrak daun putri malu dengan dosis 200 mg/ml, 400 mg/ml/ dan 800 mg/ml) dilakukan dengan menggunakan

ANOVA. Namun, sebelum dilakukan pengujian jumlah sel HeLa dan Apoptosis dengan menggunakan ANOVA, dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam.

5.4.2.1 Uji Normalitas Data

Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan lebih besar dari $\alpha = 0,05$. Berdasarkan hasil perhitungan, didapatkan koefisien Saphiro Wilk pada masing-masing variabel pengamatan yaitu jumlah sel heLa dan apoptosis sel sebesar 0,966 dan 0,943 dengan signifikansi lebih besar $\alpha = 0,05$. Sehingga, dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi.

5.4.2.2 Uji Homogenitas Ragam

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika nilai signifikansi hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Hasil uji Levene, didapatkan koefisien Levene Statistic pada masing-masing variabel jumlah sel heLa dan apoptosis sel sebesar 0,712 dan 2,805 dengan nilai signifikansi lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Sehingga, dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi homogenitas ragam telah terpenuhi.

5.4.3 Analisis One Way Anova

5.4.3.1 Pengujian Jumlah Sel HeLa dengan ANOVA

Setelah kedua asumsi yang melandasi ANOVA telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun putri malu dengan beberapa dosis terhadap jumlah sel HeLa. Hasil pengujian jumlah sel HeLa dengan menggunakan ANOVA didapatkan sumber keragaman (SK) Dosis memiliki nilai F-hitung sebesar 7,358 dengan signifikansi sebesar 0,003. Nilai F-hitung tersebut lebih besar daripada F-tabel pada taraf 5% serta nilai signifikansi yang didapatkan dari proses penghitungan lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$. Dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan penggunaan ekstrak daun putri malu dengan beberapa dosis terhadap jumlah sel HeLa. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel HeLa yang diberikan ekstrak daun putri malu pada beberapa level dosis. Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan rata-rata jumlah sel HeLa, dilakukan uji lanjut dengan menggunakan BNJ/uji Tukey. Berikut hasil pengujian BNJ 5%, lihat tabel 5.4.

Tabel 5.4 Uji BNJ/Tukey Jumlah sel HeLa Perlakuan

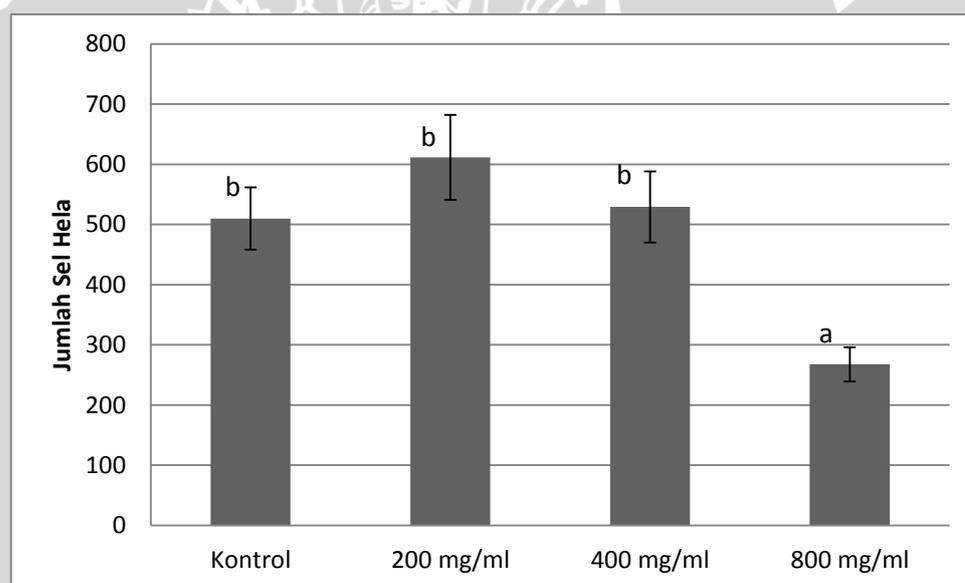
Perlakuan	Rata-Rata	Notasi (BNJ 5%)
Kontrol	509,80	b
200 mg/ml	611,40	b
400 mg/ml	529,00	b
800 mg/ml	267,60	a

Berdasarkan pada hasil uji BNJ/Tukey pada Tabel 5.4, dapat dijelaskan bahwa rata-rata jumlah sel HeLa paling rendah didapatkan pada perlakuan pemberian ekstrak daun putri malu dengan dosis 800 mg/ml yakni sebesar 267,6. Rata-rata jumlah sel akibat pemberian ekstrak daun putri malu dengan dosis 800 mg/ml berbeda nyata dengan dosis yang lain (lihat lampiran 4). Sedangkan rata-rata jumlah sel HeLa paling tinggi dihasilkan pada pemberian ekstrak daun putri malu dengan dosis 200 mg/ml. Namun tidak berbeda dengan dosis 400 mg/ml dan kontrol. Pemberian notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan rata-rata jumlah sel HeLa yang signifikan. Berikut tabel dan diagram rata-rata jumlah sel HeLa pada masing-masing perlakuan (lihat Tabel 5.5 dan Gambar 5.2) :

Tabel 5.5 Jumlah Sel HeLa

Dosis	Ulangan	Mean \pm Std. Error Mean (per lima lapang pandang)	%	P ($p < 0,05$)
Kontrol	5	509,80 \pm 51,55 (b)	100%	0,003
200 mg/ml	5	611,40 \pm 70,46 (b)	119,93	
400 mg/ml	5	529,00 \pm 58,91 (b)	100,04	
800 mg/ml	5	267,60 \pm 28,41 (a)	47,51	

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan. Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

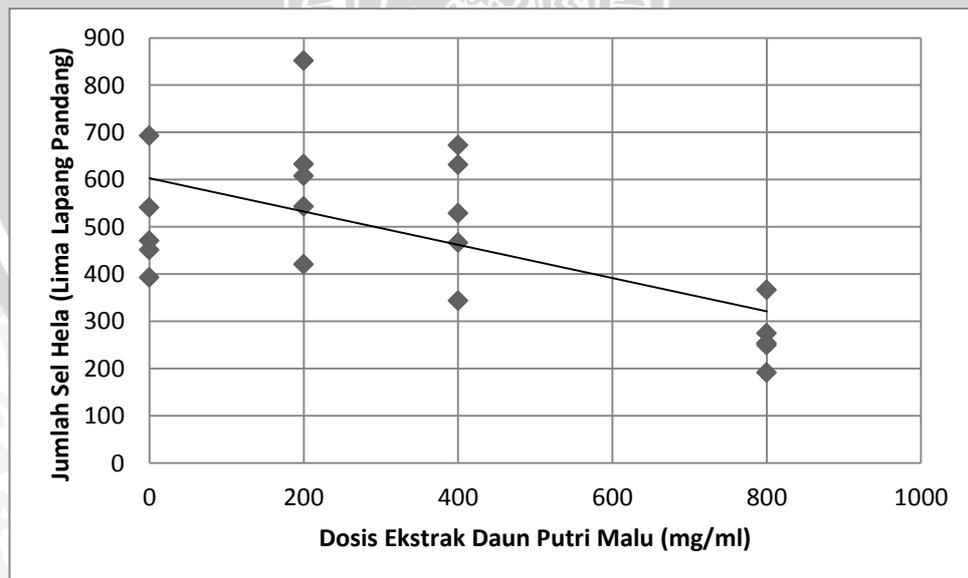


Gambar 5.2 Diagram Rata-Rata Jumlah Sel HeLa

Keterangan : Diagram deskriptif rata-rata jumlah sel HeLa pada masing-masing perlakuan. Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan. Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

5.4.3.2 Pengujian Hubungan Ekstrak Daun Putri Malu dengan Jumlah Sel HeLa

Untuk mengetahui hubungan penggunaan ekstrak daun putri malu terhadap jumlah sel HeLa, dapat dilakukan dengan menggunakan analisis korelasi Pearson. Berdasarkan dari hasil analisis, didapatkan koefisien korelasi sebesar $-0,619$ dengan signifikansi sebesar $0,004$. Signifikansi kurang dari $\alpha = 0,05$ menunjukkan bahwa terdapat hubungan/korelasi yang signifikan antara dosis ekstrak daun putri malu dengan jumlah sel HeLa. Koefisien yang negatif mengindikasikan bahwa hubungan yang terbentuk bersifat negatif. Artinya penambahan konsentrasi ekstrak daun putri malu akan berdampak pada penurunan jumlah sel HeLa. Secara deskriptif, hubungan konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan jumlah sel HeLa dijelaskan dalam grafik berikut (lihat gambar 5.3) :



Gambar 5.3 Grafik Hubungan Dosis dengan Jumlah Sel HeLa

Keterangan : Grafik hubungan dosis ekstrak daun putri malu dengan jumlah sel HeLa berbanding lurus.

5.4.3.3 Pengujian Persentase Apoptosis dengan Uji ANOVA

Setelah kedua asumsi yang melandasi ANOVA telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak daun putri malu dengan beberapa dosis terhadap persentase apoptosis. Hasil pengujian persentase apoptosis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan sumber keragaman (SK) Dosis memiliki nilai F-hitung sebesar 5,909 dengan signifikansi sebesar 0,007. Nilai F-hitung tersebut lebih besar daripada F-tabel pada taraf 5% serta nilai signifikansi yang didapatkan dari proses penghitungan lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$. Dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan penggunaan ekstrak daun putri malu dengan beberapa dosis terhadap persentase apoptosis. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan persentase apoptosis yang diberikan ekstrak daun putri malu pada beberapa level dosis. Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan rata-rata persentase apoptosis, dilakukan uji lanjut dengan menggunakan BNJ/uji Tukey. Hasil pengujian BNJ 5% :

Tabel 5.6 Uji BNJ/Tukey Persentase Apoptosis

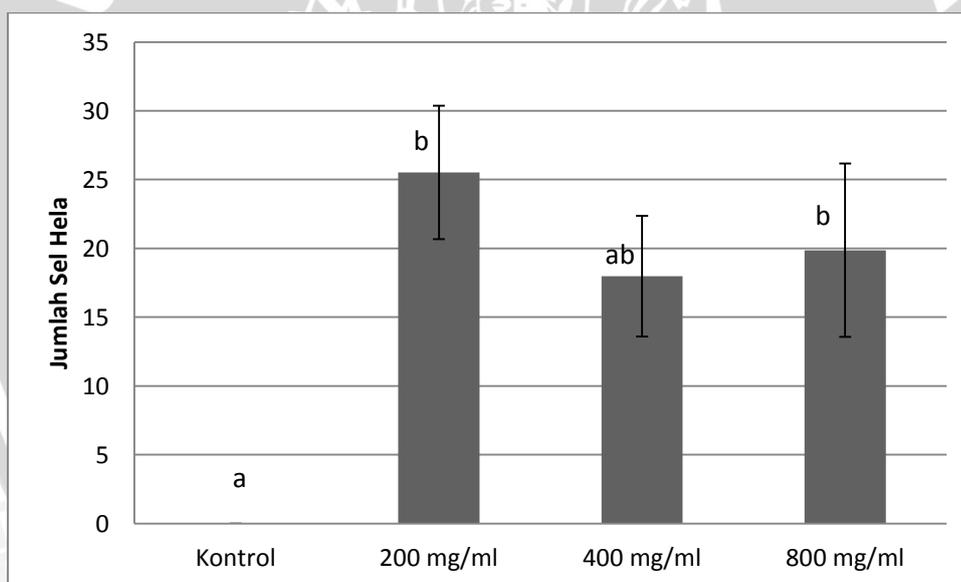
Perlakuan	Rata-Rata	Notasi (BNJ 5%)
Kontrol	0,00	a
200 mg/ml	25,52	b
400 mg/ml	17,98	ab
800 mg/ml	19,86	b

Berdasarkan pada hasil uji BNJ/Tukey pada Tabel 5.5 di atas, dapat dijelaskan bahwa rata-rata persentase apoptosis paling rendah didapatkan pada perlakuan kontrol yakni sebesar 0%. Namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan ekstrak daun putri malu 400 mg/ml. Sedangkan rata-rata persentase apoptosis paling tinggi dihasilkan pada pemberian ekstrak daun putri malu dengan dosis 200 mg/ml. Namun tidak berbeda dengan dosis 400 mg/ml dan 800 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun putri malu tidak menunjukkan perbedaan persentase apoptosis. Pemberian notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan rata-rata persentase apoptosis yang signifikan. Berikut tabel dan diagram rata-rata persentase apoptosis pada masing-masing perlakuan (lihat tabel 5.4 dan gambar 5.4) :

Tabel 5.7 Persen Apoptosis

Dosis	Ulangan	n/N	Mean ± Std. Error Mean	P
			(per lima lapang pandang) (%)	(p<0,05)
Kontrol	5	0/510	0 ± 0,00 (a)	0,007
200 mg/ml	5	159/611	25,52 ± 4,85 (b)	
400 mg/ml	5	89/529	17,98 ± 4,38 (ab)	
800 mg/ml	5	58/268	19,86 ± 6,30 (a)	

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan. Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

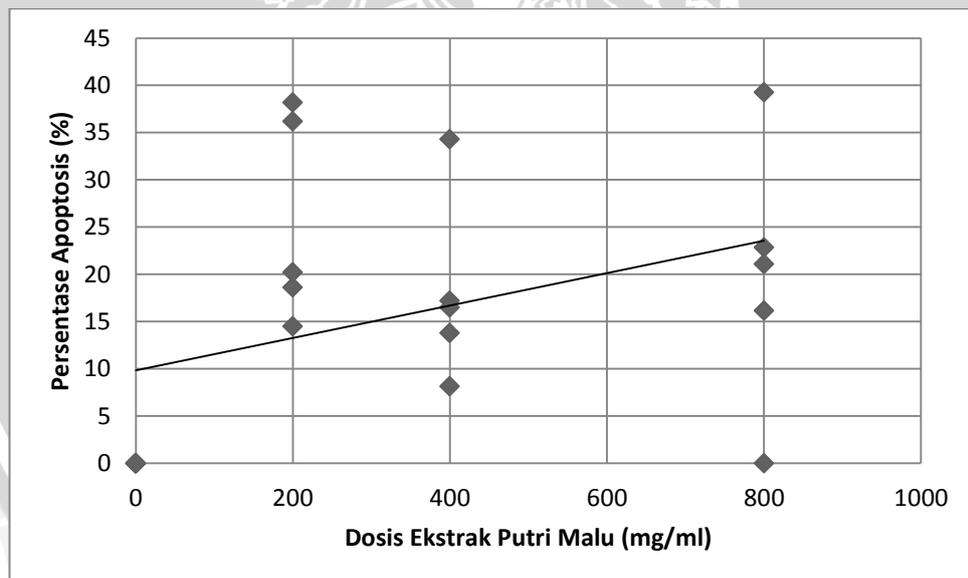


Gambar 5.4 Diagram Rata-rata Persentase Apoptosis

Keterangan : Diagram deskriptif rata-rata persentase apoptosis pada masing-masing perlakuan. Notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan. Notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

5.4.3.4 Pengujian Hubungan Ekstrak Daun Putri Malu dengan Persentase Apoptosis

Untuk mengetahui hubungan penggunaan ekstrak daun putri malu terhadap persentase apoptosis, dapat dilakukan dengan menggunakan analisis korelasi Pearson. Berdasarkan dari hasil pengujian korelasi dengan menggunakan bantuan software SPSS, didapatkan koefisien korelasi sebesar 0,385 dengan signifikansi sebesar 0,094. Signifikansi lebih dari $\alpha = 0,05$ menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan/korelasi yang signifikan antara dosis ekstrak daun putri malu dengan persentase apoptosis. Secara deskriptif, hubungan konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persentase apoptosis dijelaskan dalam grafik berikut (lihat gambar 5.5) :



Gambar 5.5 Grafik Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu dengan Persentase Apoptosis

Keterangan : Grafik hubungan konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persentase apoptosis berbanding lurus.