

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true experimental post test only group design* yang terdiri dari 5 kelompok. Empat kelompok mencit diinduksi 10mg/kg Azoxymethane (AOM) secara intra-peritoneal pada hari pertama (minggu ke-0), dilanjutkan dengan Dextran Sodium Sulfate (DSS) 5% pada air minum pada minggu 1, 3, 5, 7, 9, 11, dan 13. Pada minggu ke 2, 4, 6, 8, 10, dan 14 mencit pada kelompok ini diberi minum aquades. Pada minggu ke-6 dilakukan uji SAA dan FOBT. Pada minggu ke-6 hingga minggu ke-14, tiga kelompok yang termasuk di dalamnya diberikan ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) per oral dengan sonde dengan dosis 125 mg/kgBB, 250 mg/kgBB, dan 500 mg/kgBB. Kelompok terakhir diberikan aquades dan diet normal. Pada minggu ke-15 dilakukan pembedahan, diambil spesimen kolon desenden untuk dibuat preparat histopatologi.

5.1 Hasil Penelitian

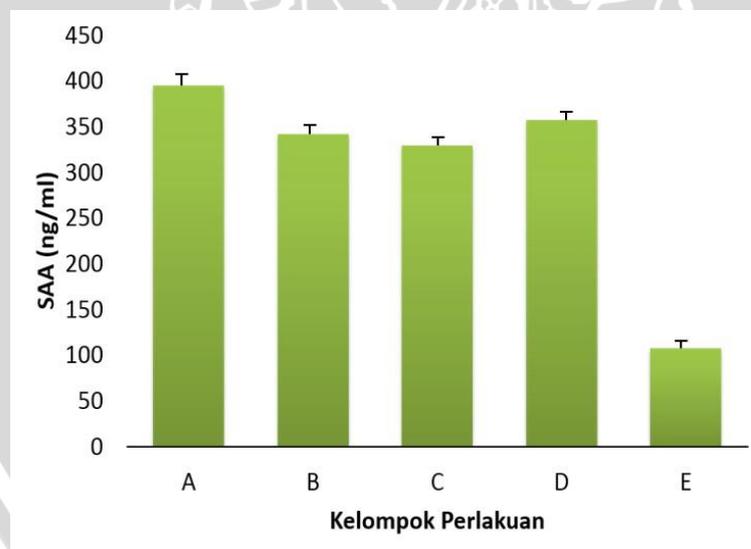
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap jumlah infiltrasi sel limfosit pada lapisan mukosa kolon. Untuk itu, spesimen kolon yang sudah dibuat preparat histopatologi diberi pewarnaan HE (hematoksilin dan eosin) dan dilihat di bawah mikroskop binokular. Pembacaan dilakukan dengan pembesaran 1000 menggunakan minyak emersi pada 25 lapang pandang.

Pada preparat diamati limfosit dengan bentuk sel bulat dengan inti tercat

gelap mengisi hampir seluruh sitoplasma, yang terlihat berupa daerah basofilik yang tipis di sekitar inti. Sitoplasma limfosit biasanya agranular namun dapat mengandung beberapa granula. Dihitung jumlah sel limfosit yang menginfiltrasi lapisan mukosa kolon. Deskripsi dan perincian data hasil penelitian tersebut sebagai berikut.

5.1.1 Hasil Uji SAA & FOBT

Serum amyloid α (SAA) merupakan indikator yang sensitif untuk menilai aktivitas inflamasi pada mencit. Pada penelitian ini, di minggu ke-6, satu mencit dari setiap kelompok perlakuan dibedah dan diambil sampel darah dari jantung. Serum darah kemudian dianalisa menggunakan *mouse SAA immunoassay* ELISA kit.



Grafik 5.1 Rerata Kadar Serum Amyloid α dari Mencit Model *Colitis-associated Colon Cancer*

Keterangan: A (kontrol positif); B (AOM & DSS + dosis ekstrak 125 mg/kgBB/ hari); C (AOM & DSS + dosis ekstrak 250 mg/kgBB/ hari); D (AOM & DSS + dosis ekstrak 500 mg/kgBB/ hari); E (kontrol negatif);

Pada kelompok yang menerima induksi AOM dan DSS selama 5 minggu, kadar SAA kelompok kontrol positif 359,08 ng/ml, dosis ekstrak 1

342,02 ng/ml, dosis ekstrak 2 329,65 ng/ml, dosis ekstrak 3 357,32 ng/dl. Pada kelompok kontrol negatif, konsentrasi SAA 107,92 ng/ml. Tampak kenaikan konsentrasi SAA yang bermakna dibandingkan kelompok kontrol negatif (Grafik 5.1). Hal ini menunjukkan telah terjadi inflamasi pada kelompok mencit yang diberi induksi AOM dan DSS.

Pada minggu ke-6 juga dilakukan *Fecal Occult Blood Test* (FOBT). Untuk pemeriksaan makroskopis dilakukan *swab* pada dubur mencit, dibuat hapusan pada kertas dan ditetesi cairan benzidine. Apabila muncul warna kehijauan maka feses mengandung eritrosit. Dilakukan juga pemeriksaan mikroskopis dengan membuat hapusan pada preparat dan menggunakan mikroskop untuk melihat bentukan eritrosit. Didapatkan data seperti tabel 5.1

Tabel 5.1 Hasil Pemeriksaan FOBT

Kelompok		A	B	C	D	E
Makroskopis	Perubahan Warna	+	+	+	+	-
Mikroskopis	Jumlah Eritrosit	39	32	35	42	2

Keterangan :

A : Kontrol Positif

B : AOM & DSS + dosis ekstrak 125 mg/kgBB/hari

C : AOM & DSS + dosis ekstrak 250 mg/kgBB/hari

D : AOM & DSS + dosis ekstrak 500 mg/kgBB/hari

E : Kontrol Negatif

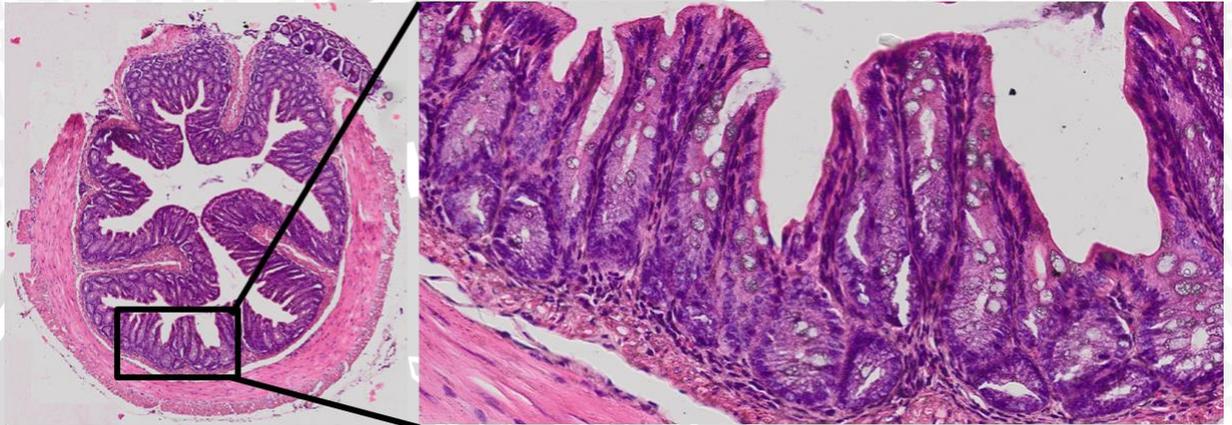
Perubahan warna + : Hijau (Feses mengandung eritrosit)

Perubahan warna - : Biru (Feses tidak mengandung eritrosit)

Berdasarkan pemeriksaan FOBT, *swab* dubur mencit dengan induksi AOM & DSS (Kelompok A,B,C,D) secara makroskopis mengandung eritrosit, ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau. Pemeriksaan ini juga didukung hasil penghitungan eritrosit secara mikroskopis, dimana terdapat peningkatan jumlah eritrosit yang bermakna pada hapusan dibanding kelompok kontrol negatif. FOBT merupakan metode diagnosis awal kanker kolon yang paling mungkin dikerjakan pada mencit. Hasil pemeriksaan ini menunjukkan

mencit dengan induksi AOM dan DSS pada minggu ke-6 sudah menunjukkan gejala awal kanker kolon.

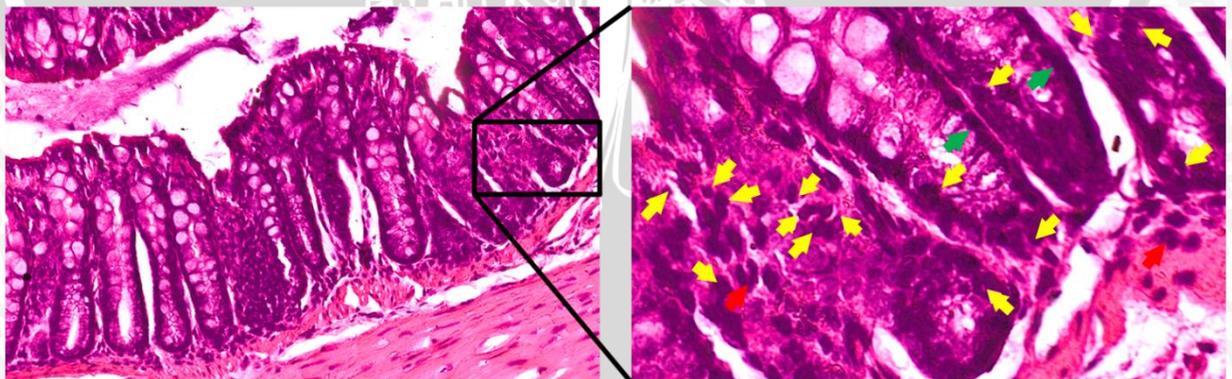
5.1.2 Gambaran Mikroskopis Kolon Mencit



Gambar 5.1 Kolon Mencit Kelompok Kontrol Negatif

Keterangan: Kiri (pandangan menyeluruh, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 40); Kanan (dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 100x)

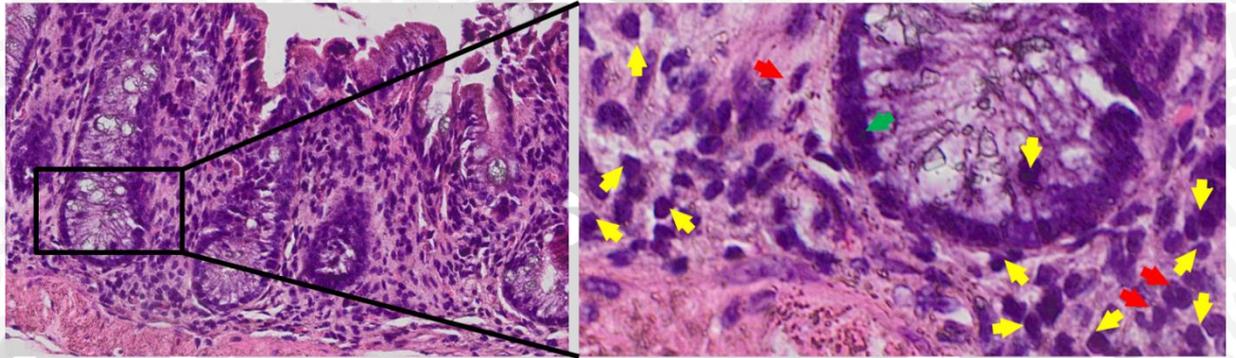
Gambar 5.1 memperlihatkan jaringan kolon normal. Terlihat epitel selapis silindris yang intact mengandung sel goblet. Kripta dalam dan lurus.



Gambar 5.2 Kolon Mencit Kelompok Kontrol Positif (Diinduksi AOM & DSS)

Keterangan: Kiri (dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 100x); Kanan (mukosa dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 1000x, panah kuning menunjukkan infiltrasi sel limfosit, panah merah sel neutrofil, panah hijau sel epitel)

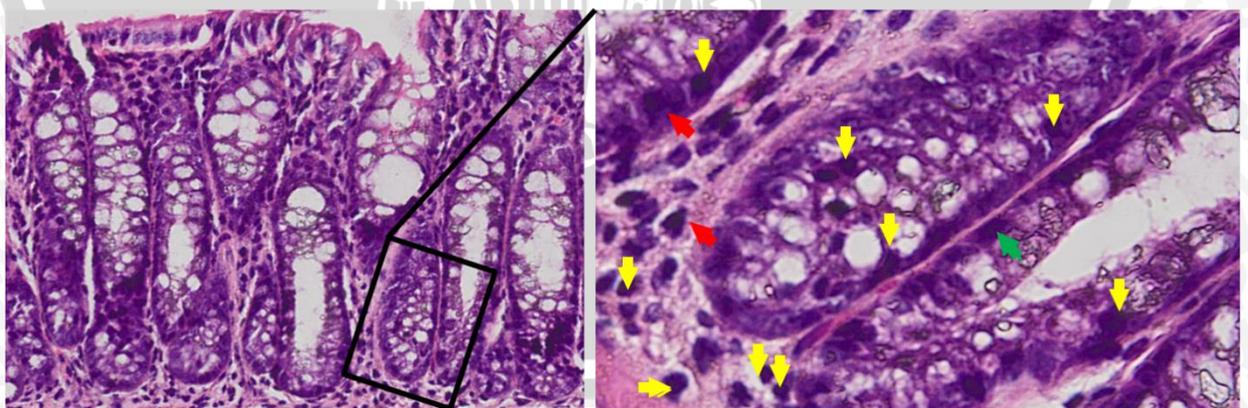
Gambar 5.2 memperlihatkan jaringan kolon yang diinduksi AOM dan DSS. Terlihat lapisan epitel yang mengalami erosi dan populasi sel radang yang menginfiltrasi lapisan mukosa secara massif (jumlah 429,25 sel).



Gambar 5.3 Kolon Mencit Kelompok Dosis 1 (Diinduksi AOM & DSS; Dosis 125 mg/kgBB)

Keterangan: Kiri (dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 100x); Kanan (mukosa dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 1000x, panah kuning menunjukkan infiltrasi sel limfosit, panah merah sel neutrofil, panah hijau sel epitel)

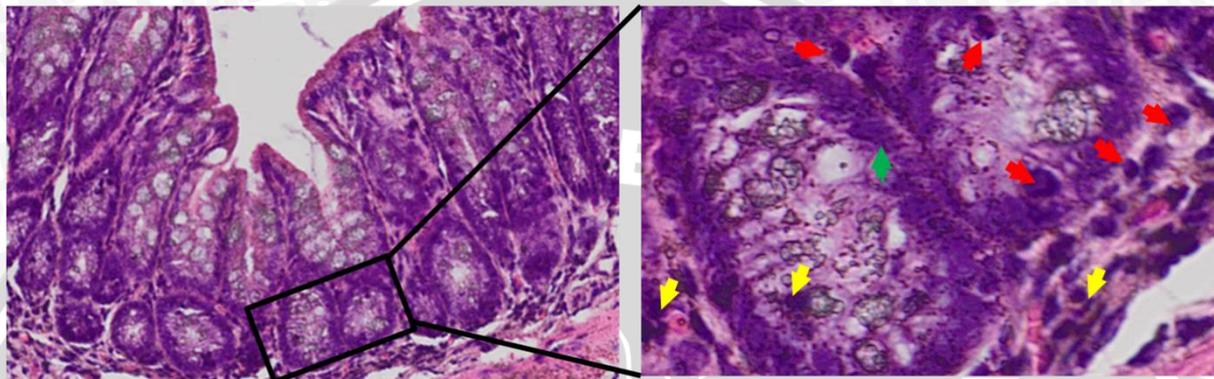
Gambar 5.3 memperlihatkan jaringan kolon yang diinduksi AOM dan DSS dengan dosis terapi 125 mg/kgBB. Terlihat populasi sel radang yang menginfiltrasi lapisan mukosa terutama daerah lamina propria, namun tidak sepadat kontrol positif (jumlah 248,25 sel, Gambar 5.2).



Gambar 5.4 Kolon Mencit Kelompok Dosis 2 (Diinduksi AOM & DSS; Dosis 250 mg/kgBB)

Keterangan: Kiri (dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 100x); Kanan (mukosa dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 1000x, panah kuning menunjukkan infiltrasi sel limfosit, panah merah sel neutrofil, panah hijau sel epitel)

Gambar 5.4 memperlihatkan jaringan kolon yang diinduksi AOM dan DSS dengan dosis terapi 250 mg/kgBB. Terlihat populasi sel radang yang menginfiltrasi lapisan mukosa namun lebih jarang dibanding kelompok Dosis 1 (jumlah 160,25 sel, Gambar 5.3).



Gambar 5.5 Kolon Mencit Kelompok Dosis 3 (Diinduksi AOM & DSS; Dosis 500 mg/kgBB)

Keterangan: Kiri (dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 100x); Kanan (mukosa dinding kolon, potongan transversal, pengecatan HE perbesaran 1000x, panah kuning menunjukkan infiltrasi sel limfosit, panah merah sel neutrofil, panah hijau sel epitel)

Gambar 5.5 memperlihatkan jaringan kolon yang diinduksi AOM dan DSS dengan dosis terapi 500 mg/kgBB. Terlihat populasi sel radang yang menginfiltrasi lapisan mukosa sangat minimal. Dapat diamati epitel intak, kripta lurus dan dalam. Gambaran ini mendekati kolon normal, kelompok kontrol negatif (jumlah 67,50 sel, Gambar 5.1).

5.1.3 Jumlah Sel Limfosit Infiltrasi

Pada pengamatan di bawah mikroskop, dihitung jumlah sel limfosit yang mengalami infiltrasi secara kuantitatif pada 25 lapang pandang. Jumlah keseluruhan sel limfosit yang ditemukan pada lapisan mukosa merupakan data yang akan diolah dengan analisa statistik. Didapatkan data seperti Tabel 5.1

Tabel 5.2 Jumlah Sel Limfosit yang Mengalami Infiltrasi pada Keseluruhan Lapang Pandang

Kelompok Perlakuan	Pengulangan				Mean	SD
	1	2	3	4		
A	425	423	440	429	429,25	±7,588
B	226	252	267	248	248,25	±16,939
C	161	168	152	160	160,25	± 6,551
D	49	70	84	67	67,50	±14,387
E	4	5	6	8	5,75	±1,708

Keterangan :

A : Kontrol Positif

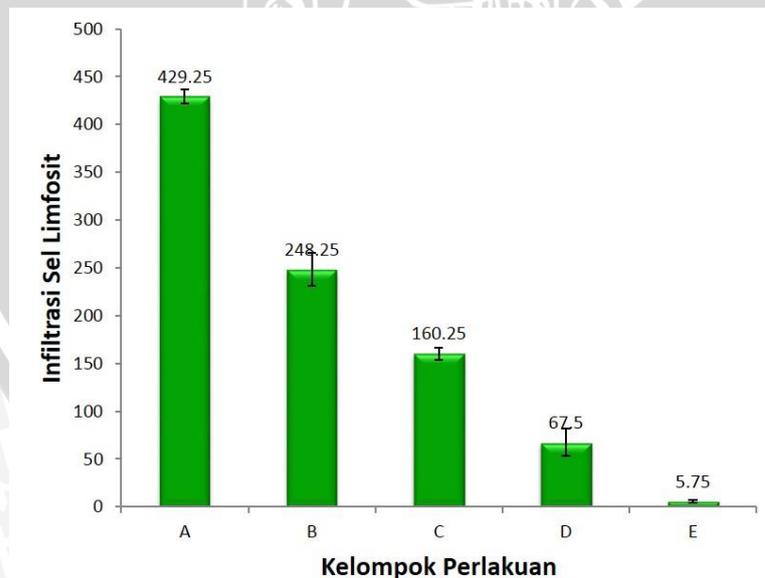
B : AOM & DSS + dosis ekstrak 125 mg/kgBB/hari

C : AOM & DSS + dosis ekstrak 250 mg/kgBB/hari

D : AOM & DSS + dosis ekstrak 500 mg/kgBB/hari

E : Kontrol Negatif

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa jumlah infiltrasi sel limfosit terendah adalah pada kelompok E sebesar 5,75 sel, kemudian perlakuan kelompok D sebesar 67,50 sel, sedangkan kelompok C sebesar 160,25 sel, kelompok B sebesar 248,25 sel dan kelompok A memiliki jumlah sel limfosit terbanyak sebesar 429,25 sel. Untuk jelasnya dapat dilihat pada Grafik 5.1



Grafik 5.2 Rerata Infiltrasi Sel Limfosit dari Mencit Model *Colitis-associated Colon Cancer* yang diberi perlakuan ekstrak daun benalu mangga

Keterangan: A (kontrol positif); B (AOM & DSS + dosis ekstrak 125 mg/kgBB/ hari); C (AOM & DSS + dosis ekstrak 250 mg/kgBB/ hari); D (AOM & DSS + dosis ekstrak 500 mg/kgBB/ hari); E (kontrol negatif);

Dari grafik dapat dilihat rata-rata jumlah infiltrasi sel limfosit pada kelompok A (kontrol positif) sebesar 429,25. Penurunan yang cukup signifikan menjadi senilai 248,25 terlihat pada kelompok B, yakni mencit dengan pemberian dosis ekstrak 125 mg/kgBB/hari. Jumlah ini terus menurun seiring meningkatnya dosis terapi. Pada kelompok perlakuan C, dosis 250 mg/kgBB/hari, didapati jumlah sel infiltrasi sejumlah 160,25. Pada kelompok D dengan dosis tertinggi sebesar 500 mg/kgBB/hari, penurunan nilai jumlah sel infiltrasi paling rendah menjadi 67,5 dan paling mendekati nilai kontrol negatif (5,75).

5.2 Analisis Data

Pada penelitian ini, pemberian terapi ekstrak daun benalu mangga merupakan variabel bebas, sementara variabel terganggu adalah jumlah infiltrasi limfosit pada kolon mencit. Data yang telah diperoleh selanjutnya diuji normalitasnya dengan menggunakan *Shapiro-Wilk*. Rangkuman hasil uji normalitas dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.3 Uji Normalitas Data

	Kelompok Perlakuan	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Infiltrasi Limfosit	A	.883	4	.350
	B	.967	4	.820
	C	.968	4	.828
	D	.971	4	.846
	E	.971	4	.850

Keterangan :

A : Kontrol Positif

B : AOM & DSS + dosis ekstrak 125 mg/kgBB/hari

C : AOM & DSS + dosis ekstrak 250 mg/kgBB/hari

D : AOM & DSS + dosis ekstrak 500 mg/kgBB/hari

E : Kontrol Negatif

Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan probabilitas untuk semua kelompok perlakuan adalah lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Nilai tersebut mempunyai arti bahwa semua data terdistribusi normal, maka daripada itu syarat uji *one way anova* terpenuhi.

Setelah diketahui data terdistribusi normal, kemudian dilakukan uji homogenitas varian menggunakan uji *Levene*. Rangkuman hasil uji homogenitas dapat dilihat pada Tabel 5.3

Tabel 5.4 Uji Homogenitas Data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.341	4	15	.301

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa nilai signifikansi $p = 0.126$ yang lebih besar daripada nilai $\alpha = 0,05$ yang ditetapkan. Berarti kelima kelompok perlakuan terhadap jumlah infiltrasi sel limfosit kolon identik atau memiliki varians yang sama.

Data yang diperoleh adalah normal dan homogen, selanjutnya dilakukan uji parametrik, yaitu *one way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan perlakuan terhadap jumlah infiltrasi sel limfosit kolon pada *colitis-associated colon cancer*. Rangkuman hasil analisis *one way ANOVA* tercantum pada tabel 5.4

Tabel 5.5 Uji ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between groups	440675.200	4	110168.800	922.172	.000
Within groups	1792.000	15	119.467		
Total	442467.200	19			

Dari hasil uji *one way* ANOVA didapatkan nilai signifikansi $p = 0,000$ ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dan kelompok uji sehingga pada dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan jumlah infiltrasi sel limfosit yang signifikan pada 2 atau lebih kelompok perlakuan. Analisis dilanjutkan dengan analisis *post hoc* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes *one way* ANOVA. Dari uji *post hoc* diperoleh hasil sebagai berikut :

Tabel 5.6 Uji Post Hoc (Tukey)

Mean Difference	A	B	C	D	E
A	-	181.000*	269.000*	361.750*	423.500*
B	-181.000*	-	88.000*	180.750*	242.500*
C	-269.000*	-88.000*	-	92.750*	154.500*
D	-361.750*	-180.750*	-92.750*	-	61.750*
E	-423.500*	-242.500*	-154.500*	-61.750*	-

Keterangan :

* : Rerata Perbedaan signifikan

A : Kontrol Positif

2 : AOM & DSS + dosis ekstrak 125 mg/kgBB/hari

3 : AOM & DSS + dosis ekstrak 250 mg/kgBB/hari

4 : AOM & DSS + dosis ekstrak 500 mg/kgBB/hari

5 : Kontrol Negatif

Dari hasil uji *post hoc* (Lampiran 2) didapatkan nilai signifikansi perbedaan jumlah infiltrasi sel limfosit $p=0.000$ pada setiap kelompok. Nilai tersebut bermakna bahwa perbedaan tiap kelompok signifikan ($p < 0.05$).

5.2.1 Uji Korelasi

Untuk mengetahui besarnya hubungan dan konsentrasi ekstrak daun benalu mangga terhadap jumlah sel limfosit yang menginfiltrasi kolon mencit, maka digunakan uji korelasi Pearson.

Uji korelasi parametrik Pearson (Lampiran 3) menunjukkan nilai

signifikansi $p=0,000$ ($p<0,05$) dan koefisien korelasi $-0,977$ yang mempunyai arti bahwa terdapat korelasi bermakna antara konsentrasi ekstrak terhadap jumlah sel limfosit yang mengalami infiltrasi pada mukosa usus. Arah korelasi yang bernilai negatif berarti korelasi berbanding terbalik, yang menunjukkan semakin tinggi dosis atau konsentrasi ekstrak maka semakin rendah pula jumlah sel limfosit yang menginfiltirasi kolon, serta menunjukkan kekuatan korelasi yang kuat.

5.2.2 Uji Regresi Linear

Berdasarkan hasil uji Post Hoc (Tukey), masih didapati perbedaan yang signifikan antara dosis tertinggi yang digunakan pada penelitian (500 mg/kgBB) dengan kelompok kontrol negatif. Maka dari itu, diperlukan penghitungan prediksi untuk mengetahui peningkatan dosis yang sesuai agar jumlah infiltrasi limfosit dapat mendekati kondisi kolon normal. Penghitungan dilakukan menggunakan uji regresi linear (Lampiran 4).

Tabel 5.7 Uji ANOVA Regresi Linear

Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1 Regression	254023.802	1	254023.802	108.552	.000 ^a
Residual	32761.636	14	2340.117		
Total	286785.437	15			

Dari table ANOVA, diketahui dimana nilai p (signifikansi) besarnya $0,000$ dengan demikian $p<0,05$, maka H_0 ditolak, sehingga rumus regresi dapat digunakan untuk memprediksi dosis yang sesuai untuk rerata jumlah limfosit kolon normal (kelompok kontrol negatif).

Tabel 5.8 Koefisien

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		t	Sig.
	B	Std. Error	Beta			
1 (Constant)	375.400	18.735			20.037	.000
Dosis_Ekstrak	-.682	.065	-.941		-10.419	.000

Dari table koefisien, diketahui rumus regresi, dimana diketahui nilai koefisien regresi dari nilai B untuk konstanta 375,4 dan dosis 0.682 maka $Y=375,4 - 0,682X$. Penghitungan prediksi dosis dilakukan sebagai berikut (diketahui Y = rerata limfosit kontrol negatif = 5,75 sel)

$$Y = 375,4 - 0,682X$$

$$5,75 = 375,4 - 0,682X$$

$$0,682X = 375,4 - 5,75$$

$$0,682X = 369,65$$

$$X = 369,65/0,682$$

$$X = 542,00$$

Sehingga untuk mencapai jumlah infiltrasi limfosit yang mendekati kondisi kolon normal, dosis prediksi yang perlu diberikan pada mencit adalah 542 mg/kgBB/hari.