

BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1 Hasil Penelitian****5.1.1 Maserasi Perikarp Manggis dengan Etanol 95%**

100 gram serbuk kering perikarp manggis dimaserasi dengan 750 ml etanol 95% pada suhu kamar selama 5 hari lalu disaring dan diremaserasi dengan 150 ml etanol 95% pada suhu kamar selama 2 hari, kemudian ekstrak yang didapatkan dirotav pada suhu 40°C dengan kecepatan 70 rpm, diperoleh ekstrak cair kental berwarna coklat kehitaman sebanyak 14,7174 gram.



Gambar 0.1 Ekstrak Kental Perikarp Manggis Hasil Maserasi

5.1.2 Skrining Kandungan Fitokimia Ekstrak Perikarp Manggis dan Penentuan Kadar α -mangostin dengan HPLC MS/MS

Hasil uji fitokimia ekstrak perikarp manggis pada pengujian kandungan triterpenoid, tannin dan polifenol, saponin, alkaloid, dan flavonoid, diperoleh

hasil positif untuk semua kandungan dengan hasil uji yang tercantumkan pada tabel.

Tabel 0.1 Hasil Skrining Kandungan Fitokimia Ekstrak Perikarp Manggis

Kandungan fitokimia	Hasil	Keterangan
Triterpenoid	(+)	Terbentuk cincin kecoklatan/violet pada perbatasan 2 pelarut
Tannin dan Polifenol	(+)	Terbentuk warna hijau kehitaman
Saponin	(+)	Terbentuk buih yang mantap selama ≥ 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan HCl 2 N buih tidak hilang
Alkaloid	(+)	Terbentuknya endapan jingga pada tabung dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung lainnya
Flavonoid	(+)	Terbentuk warna orange sampai merah

Keterangan : (+) =mengandung kandungan fitokimia yang diuji

Kadar α -mangostin pada ekstrak perikarp manggis ditentukan dengan HPLC MS/MS. Sampel ditimbang sebanyak 0,1124 gram kemudian dilarutkan dalam 5 ml etanol dan disonifikasi selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit dan difiltrasi menggunakan membran filter 0,2 μ m. Kemudian diinjeksikan ke dalam HPLC MS/MS untuk selanjutnya dianalisa dan didapatkan kadar α -mangostin sampel yakni 5984,55 μ g/gram.

Tabel 0.2 Hasil Pengukuran Kadar α -mangostin pada Ekstrak Perikarp Manggis dengan HPLC MS/MS

No	Sampel	Kadar (μ g/g)
1.	Ekstrak Perikarp Manggis	5984,55

5.1.3 Identifikasi Pertumbuhan *M. tuberculosis*

Kultur *M. tuberculosis* dilakukan dengan medium pertumbuhan BD BACTEC MGIT 960 SIRE. Senyawa fluorescent yang terdapat dalam medium sensitif terhadap adanya oksigen yang terlarut dalam *broth*

sehingga ketika terjadi pertumbuhan bakteri maka fluoresensi akan terdeteksi.

5.1.4 Penentuan Kadar Protein Sampel Dengan Metode Nanodrop

Penentuan kadar protein sampel dilakukan dengan menggunakan Nanodrop Spectrophotometer ND-100. Masing-masing sampel ditetaskan pada *lower measurement pedestal* secara bergantian untuk dideteksi kadar protein yang dikandung. Deteksi kadar protein dilakukan pada λ 280 nm.

Tabel 0.3 Hasil Penentuan Kadar Protein Sampel Dengan Metode Nanodrop

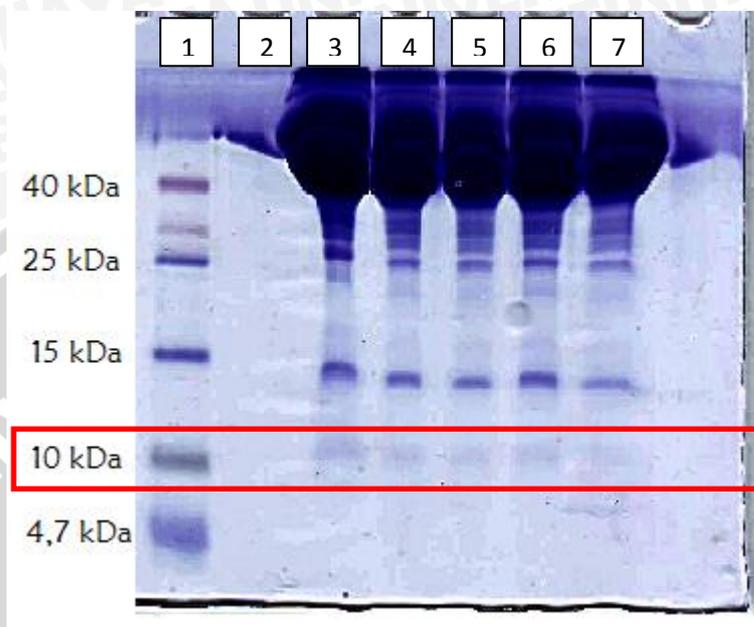
Sampel	Kadar (mg/ml)
Perlakuan A (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α -mangostin 3,125 μ g/ml)	1,62
Perlakuan B (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α -mangostin 6,25 μ g/ml)	2,64
Perlakuan C (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi α -mangostin 12,5 μ g/ml)	2,64
Perlakuan D (kontrol negatif)	2,66
Perlakuan F (ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi α -mangostin 6,25 μ g/ml)	2,12

5.1.5 Hasil Identifikasi Protein CFP-10 Menggunakan SDS PAGE

5.1.5.1 Metode Pengecatan Coomassie Blue

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak perikarp manggis mampu menghambat sekresi protein CFP-10 pada *M. tuberculosis* H37Rv. Hasil penghambatan dapat dilihat dengan SDS PAGE setelah sampel diinkubasikan dalam media yang mengandung ekstrak perikarp manggis selama 6 hari. Namun untuk sampel dengan perlakuan rifampicin tidak diikutsertakan karena dibutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama. Pada identifikasi dengan pengecatan Coomassie blue digunakan *separating gel* 15% dan *stacking gel* 4%. Adapun hasil

identifikasi dengan metode pengecatan Coomassie blue disajikan pada gambar berikut.



Gambar 0.2 Hasil Pengecatan Protein *M. tuberculosis* H37Rv Dalam Filtrat Kultur dengan Pewarnaan Coomassie Blue.

Lajur 1: protein marker. Lajur 2: protein medium BD BACTEC MGIT 960 SIRE. Lajur 3: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak manggis pembeding dengan konsentrasi 1044,5 μ g/ml. Lajur 4: protein *M. tuberculosis* H37Rv tanpa perlakuan. Lajur 5: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 μ g/ml (mengandung α -mangostin 12,5 μ g/ml). Lajur 6: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 1044,5 μ g/ml (mengandung α -mangostin 6,25 μ g/ml). Lajur 7: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 522,25 μ g/m (mengandung α -mangostin 3,125 μ g/ml).

Dari hasil pengecatan protein *M. tuberculosis* H37Rv dalam filtrat kultur dengan pengecatan Coomassie blue didapat beberapa baris pita protein yang terbentuk. Untuk protein marker berukuran 10 kDa dapat dilihat pada lajur 1 baris keempat. Apabila ditarik garis secara lurus ke sebelah kanan dapat dilihat adanya pita protein yang terbentuk. Dapat dinyatakan bahwa pita protein yang terbentuk adalah protein CFP-10 karena berat molekulnya sama yakni 10 kDa. Pada lajur 2 tidak terbentuk pita protein yang menandakan bahwa medium tidak mengandung protein

yang dapat mengganggu hasil identifikasi protein CFP-10 pada filtrat hasil kultur. Setelah dilakukan pengamatan dilakukan penghitungan intensitas cahaya pada pita protein dengan menggunakan Adobe Photoshop Cs 6 dan diperoleh data sebagai berikut:

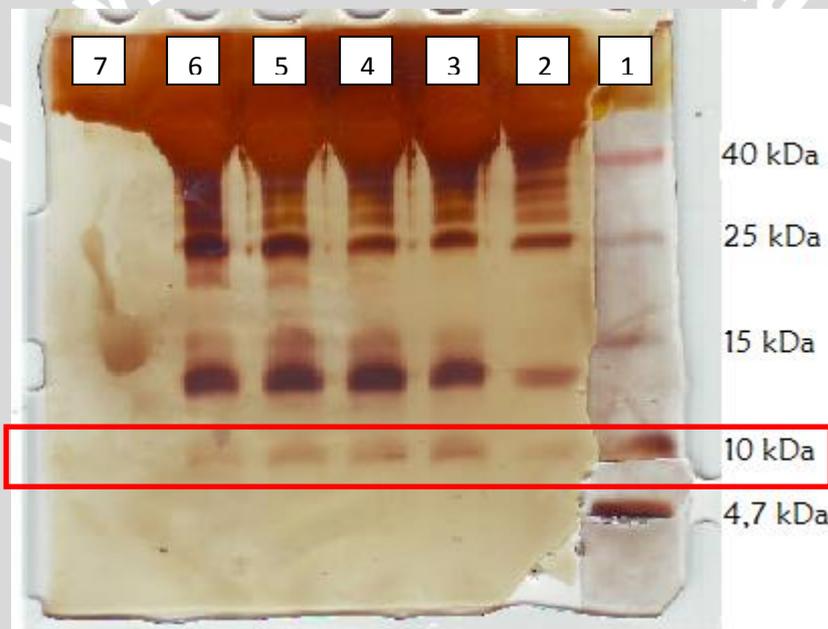
Tabel 0.4 Perhitungan Intensitas Cahaya Pita Protein Hasil Metode Pewarnaan Coomassie Blue

Lajur	Perlakuan	Intensitas cahaya			Rata-rata
1	Protein marker	198.60	198.74	198.16	196.50
2	G (Kontrol media)	227.72	227.41	227.60	227.58
3	F (Ekstrak perikarp manggis pembeding 1044,5 µg/ml)	219.28	219.32	219.23	219.28
4	D (Kontrol negatif)	222.59	222.20	222.08	222.29
5	C (Ekstrak perikarp manggis 2089 µg/ml mengandung α-mangostin 12,5 µg/ml)	223.59	223.46	223.69	223.58
6	B (Ekstrak perikarp manggis 1044,5 µg/ml mengandung α-mangostin 6,25 µg/ml)	222.83	222.44	222.46	222.58
7	A (Ekstrak perikarp manggis 522,25 µg/ml mengandung α-mangostin 3,125 µg/ml)	224.99	224.88	224.82	224.90

Semakin tinggi nilai kuantifikasi maka semakin tipis pita protein yang terbentuk. Dari tabel tersebut dapat diketahui urutan tingkat ketebalan pita protein dimulai dari yang paling tipis ke paling tebal adalah perlakuan A dilanjutkan dengan perlakuan C, perlakuan B, perlakuan D, dan perlakuan F. Untuk perlakuan G tidak terbentuk pita protein sehingga menimbulkan nilai kuantifikasi yang paling tinggi. Dari data analisa profil protein dengan pewarnaan Coomassie blue diperoleh pita protein CFP-10 yang sangat tipis sehingga diperlukan teknik pengecatan lain yang lebih sensitif yakni metode silver stain.

5.1.5.2 Metode Pengecatan Silver Stain

Metode pengecatan silver stain dapat digunakan untuk mendeteksi protein dengan berat molekul hingga 1 ng. Oleh karena itu teknik ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi protein CFP-10 mengingat hasil pewarnaan dengan Coomassie blue yang sangat tipis. Pada identifikasi dengan pengecatan silver stain digunakan *separating gel* 15% dan *stacking gel* 4%. Adapun hasil identifikasi dengan metode pengecatan Silver stain disajikan pada gambar berikut.



Gambar 0.3 Hasil Pengecatan Protein *M. tuberculosis* H37Rv Dalam Filtrat Kultur dengan Pewarnaan Silver Stain.

Lajur 1: protein marker. Lajur 2: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 522,25 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 3,125 $\mu\text{g/ml}$). Lajur 3: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 1044,5 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 6,25 $\mu\text{g/ml}$). Lajur 4: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 $\mu\text{g/ml}$ (mengandung α -mangostin 12,5 $\mu\text{g/ml}$). Lajur 5: protein *M. tuberculosis* H37Rv tanpa perlakuan. Lajur 6: protein *M. tuberculosis* H37Rv perlakuan ekstrak manggis pembanding dengan konsentrasi 1044,5 $\mu\text{g/ml}$. Lajur 7: protein media BD BACTEC MGIT 960 SIRE.

Pada hasil identifikasi protein CFP-10 dengan metode pengecatan Silver stain diperoleh pita protein yang lebih tebal dibandingkan dengan metode pewarnaan Coomassie blue. Protein CFP-10 memiliki berat molekul 10 kDa sehingga ada tidaknya dapat diidentifikasi dari lokasi protein marker 10 kDa yang di tarik garis lurus ke samping kiri. Dari hasil tersebut dapat diidentifikasi bahwa bentukan pita protein yang terbentuk adalah protein CFP-10. Pada lajur 7 tidak terbentuk pita protein yang menandakan bahwa medium tidak mengandung protein yang dapat mengganggu hasil identifikasi protein CFP-10 pada filtrat hasil kultur. Setelah dilakukan pengamatan dilakukan penghitungan intensitas cahaya pada pita protein dengan menggunakan Adobe Photoshop Cs 6 dan diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 0.5 Perhitungan Intensitas Cahaya Pita Protein Hasil Metode Pewarnaan Silver Stain

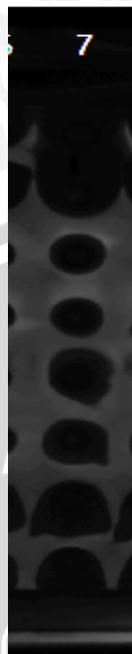
Lajur	Perlakuan	Intensitas cahaya			Rata-rata
1	Protein marker	101.11	103.01	103.46	102.53
2	A (Ekstrak perikarp manggis 522,25 µg/ml mengandung α-mangostin 3.125 µg/ml)	148.32	148.60	148.40	148.44
3	B (Ekstrak perikarp manggis 1044,5 µg/ml mengandung α-mangostin 6.25 µg/ml)	126.74	126.83	126.51	126.69
4	C (Ekstrak perikarp manggis 2089 µg/ml mengandung α-mangostin 12.5 µg/ml)	134.20	133.69	134.15	134.01
5	D (Kontrol negatif)	138.32	138.29	138.72	138.44
6	F (ekstrak perikarp manggis pembanding 1044,5 µg/ml)	145.85	145.75	146.03	145.88
7	G (Kontrol media)	177.62	178.36	178.15	178.04

Semakin tinggi nilai kuantifikasi maka semakin tipis pita protein yang terbentuk. Dari tabel tersebut dapat diketahui urutan tingkat ketebalan pita

protein dimulai dari yang paling tipis ke paling tebal adalah perlakuan A dilanjutkan perlakuan F, perlakuan D, perlakuan C, dan perlakuan B. Untuk perlakuan G yang merupakan kontrol media memiliki nilai kuantifikasi paling tinggi karena tidak terbentuk pita protein pada lajur tersebut.

5.1.5.3 Uji Spesifisitas Protein CFP-10 dengan Metode Dot Blot dan Visualisasi Membran Nitrocellulose dengan ImageQuant LAS 500

Uji spesifisitas dengan metode dot blot bertujuan untuk membuktikan apakah protein yang di *profiling* adalah benar protein yang diduga yakni protein CFP-10. Hal ini dapat diketahui dari adanya reaksi antigen antibodi yang spesifik. Antibodi primer CFP-10 yang digunakan diperoleh dari abcam. Setelah proses dot blot selesai, membran *nitrocellulose* divisualisasikan dengan ImageQuant LAS 500. Hasil visualisasi diperoleh dari sinyal yang merupakan hasil reaksi antibodi sekunder konjugat SA-HRP dengan substrat peroksida-luminol (1:1). Warna hitam pada pembacaan dengan metode *chemiluminescence* dan warna hijau pada pembacaan dengan metode *colorimetric* menunjukkan adanya sinyal yang ditangkap oleh alat. Untuk objektivitas dilakukan kuantifikasi dari data kualitatif yang diperoleh dengan menggunakan software ImageQuant TL sehingga didapatkan data dalam angka.



Gambar 0.4 Visualisasi Membran *Nitrocellulose* Hasil Dot Blot dengan ImageQuant LAS 500

Tabel 0.6 Kuantifikasi Data Kualitatif Hasil Visualisasi Membran *Nitrocellulose* dengan ImageQuant LAS 500

Perlakuan	Nilai kuantifikasi
Perlakuan A (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 522,25 $\mu\text{g/ml}$ mengandung α -mangostin 3,125 $\mu\text{g/ml}$)	0.00
Perlakuan B (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 1044,5 $\mu\text{g/ml}$ mengandung α -mangostin 6,25 $\mu\text{g/ml}$)	0.00
Perlakuan C (ekstrak perikarp manggis dengan konsentrasi 2089 $\mu\text{g/ml}$ mengandung α -mangostin 12,5 $\mu\text{g/ml}$)	123737.46
Perlakuan D (kontrol negatif)	112787.96
Perlakuan E (kontrol positif yakni dengan pemberian larutan Rifampicin 1 $\mu\text{g/ml}$)	95281.73
Perlakuan F (ekstrak perikarp manggis pembanding dengan konsentrasi 1044,5 $\mu\text{g/ml}$)	102411.27
Perlakuan G (kontrol media)	6134.66
Perlakuan H (kontrol membran)	28388.34

Hasil pengamatan yang diperoleh menunjukkan bahwa pada Perlakuan A dan B memiliki nilai yang paling rendah yakni 0,00 diikuti perlakuan G sebesar 6134; kontrol membran *nitrocellulose* sebesar

28388,34; perlakuan E sebesar 95281,73; perlakuan F sebesar 102411,27; perlakuan D sebesar 112787,96; dan perlakuan E sebesar 123737,46 yang merupakan nilai yang paling besar. Semakin rendah nilai hasil kuantifikasi menunjukkan semakin sedikit sinyal yang diterima oleh alat sehingga dapat dinyatakan semakin rendah nilai kuantifikasi semakin kecil jumlah protein yang dikandung.

5.2 Analisis Data

5.2.1 Analisis Statistik Profil Protein dengan SDS-PAGE Metode Pewarnaan Coomassie Blue

5.2.1.1 One Way Anova

Setelah didapatkan hasil penelitian, selanjutnya dilakukan analisis data dengan *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% atau tingkat signifikansi (α) 5%. Artinya, jika nilai probabilitas (p) $<0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan. Sebaliknya jika nilai $p>0,05$ maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Asumsi yang harus dipenuhi sebelum dilakukan analisis statistik dengan *One Way Anova* adalah adanya ragam antar kelompok yang homogen dan distribusi data yang memenuhi asumsi normalitas.

Dari *output* uji asumsi homogenitas p -value (Sig.)= 0.077, dimana > 0.05 yang berarti asumsi kehomogenan ragam terpenuhi sehingga ANOVA dapat diterapkan pada data ini menurut uji asumsi homogenitas. Setelah uji asumsi homogenitas terpenuhi dapat dilanjutkan uji asumsi normalitas.

Dari *output* uji asumsi normalitas Kolmogorov-Smirnov nilai Asymp. Sig (2-tailed) $>\alpha$ (0,05) maka artinya distribusi data memenuhi asumsi normalitas. Setelah dilakukan uji asumsi di atas dan terpenuhi maka dapat dilanjutkan untuk analisis statistik *One Way Anova*.

Output analisis statistik *Anova* bertujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan pengaruh yang diberikan dari keenam perlakuan tersebut. Dapat dilihat *p-value* (Sig.)= 0.000 dimana <0.05 yang artinya kita menolak H_0 (H_0 =tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan). Sehingga dari *output* dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang diberikan dari keenam perlakuan tersebut secara signifikan.

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan mana saja yang berbeda, dilakukan uji lanjutan atau post hoc test. Dari ketiga uji yaitu Tukey, LSD, dan Bonferroni dapat dilihat adanya tanda bintang menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda. Dapat pula dilihat dari *p-value*, apabila kurang dari 0.05 maka ada perbedaan. Dari *output* yang diperoleh disimpulkan bahwa semua perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda.

5.2.1.2 Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui adakah hubungan yang linier antar tiap perlakuan terhadap jumlah protein CFP-10 yang disekresikan. *Output* uji korelasi *Pearson* menunjukkan bagaimanakah korelasi antar masing-masing perlakuan. Apabila Sig. (2-tailed) $>$ nilai α 0.05 maka tidak ada korelasi antar perlakuan. Dari *output*

yang diperoleh dapat dilihat bahwa nilai Sig. (2-tailed) > nilai α 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat korelasi antar perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10 yang dihasilkan yang dilihat dari tebal tipisnya pita protein yang terbentuk.

5.2.2 Analisis Statistik Profil Protein dengan SDS-PAGE Metode Pewarnaan Silver Stain

5.2.2.1 One Way Anova

Setelah diperoleh hasil penelitian, selanjutnya dilakukan analisis data dengan *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% atau tingkat signifikansi (α) 5%. Artinya, jika nilai probabilitas (p) < 0,05 maka terdapat perbedaan yang signifikan. Sebaliknya jika nilai p > 0,05 maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Asumsi yang harus dipenuhi sebelum dilakukan analisis statistik dengan *One Way Anova* adalah adanya ragam antar kelompok yang homogen dan distribusi data yang memenuhi asumsi normalitas.

Dari *output* uji asumsi homogenitas *p-value* (Sig.) pada tabel adalah 0.212 dimana > 0.05 yang berarti asumsi kehomogenan ragam terpenuhi sehingga analisis statistik *One Way Anova* dapat diterapkan pada data ini menurut uji asumsi homogenitas. Setelah uji asumsi homogenitas terpenuhi dapat dilanjutkan uji asumsi normalitas.

Dari *output* uji asumsi normalitas Kolmogorov-Smirnov nilai Asymp. Sig (2-tailed) > α (0,05) maka artinya distribusi data memenuhi asumsi normalitas. Setelah dilakukan uji asumsi di atas dan terpenuhi maka dapat dilanjutkan untuk analisis statistik *One Way Anova*.

Output uji *Anova* bertujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan pengaruh yang diberikan dari keenam perlakuan tersebut. Dapat dilihat *p-value* (Sig.)= 0.000 dimana <0.05 yang artinya kita menolak H_0 (H_0 =tidak ada perbedaan yang signifikan antar perlakuan). Sehingga dari *output* dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan pengaruh yang diberikan dari keenam perlakuan tersebut secara signifikan.

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan mana saja yang berbeda, dilakukan uji lanjutan atau *post hoc* test. Dari ketiga uji yaitu Tukey, LSD, dan Bonferroni dapat dilihat adanya tanda bintang menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda. Dapat pula dilihat dari *p-value*, apabila kurang dari 0.05 maka ada perbedaan. Dari *output* yang diperoleh disimpulkan bahwa semua perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda.

5.2.1.2 Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui adakah hubungan yang linier antar tiap perlakuan terhadap jumlah protein CFP-10 yang disekresikan. *Output* uji korelasi *Pearson* menunjukkan bagaimanakah korelasi antar masing-masing perlakuan. Apabila Sig. (2-tailed) $>$ nilai α 0.05 maka tidak ada korelasi antar perlakuan. Dari *output* yang diperoleh dapat dilihat bahwa nilai Sig. (2-tailed) $>$ nilai α 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat korelasi antar perlakuan terhadap sekresi protein CFP-10 yang dihasilkan yang dilihat dari tebal tipisnya pita protein yang terbentuk.