

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Analisis Hasil

Di bawah ini akan disajikan analisis hasil penelitian yang terdiri dari uji kuantitatif fenol total dan flavonoid total, pengaruh ekstrak tunggal (daun salam dan daun sirih merah) serta kombinasinya terhadap ekspresi HSP70, pengaruh ekstrak tunggal (daun salam dan daun sirih merah) serta kombinasi terhadap aktivasi HSP70, dan pengaruh ekstrak tunggal (daun salam dan daun sirih merah) serta kombinasi terhadap persentase kadar ROS.

6.1.1 Uji Kuantitatif

6.1.1.1 Fenol Total

Kandungan fenol total yaitu asam galat pada ekstrak daun salam lebih rendah dibandingkan ekstrak daun sirih merah baik dengan metode maserasi maupun soxhlet. Secara kualitatif daun sirih merah positif memiliki kandungan fenol (Alfarabi *et al.*, 2010; Sekti, 2014) namun belum ada penelitian yang menguji secara kuantitatif kandungan asam galat sebagai komponen fenol pada sirih merah. Pada penelitian ini didapatkan kandungan asam galat pada daun sirih merah sebesar 96,470 mg GAE/gram ekstrak (metode ekstraksi soxhlet) dan 62,465 mg GAE/gram ekstrak (metode ekstraksi maserasi). Metode ekstraksi soxhlet menghasilkan jumlah asam galat lebih tinggi dibandingkan dengan metode maserasi.

Kandungan asam galat ekstrak daun salam pada penelitian ini adalah sebesar 62,465 mg GAE/gram ekstrak (metode ekstraksi soxhlet) dan 47,706 mg

GAE/gram ekstrak. Metode ekstraksi soxhlet menghasilkan jumlah asam galat lebih tinggi dibandingkan dengan metode maserasi. Jumlah kandungan asam galat pada ekstrak daun salam di penelitian ini berbeda jauh dengan penelitian yang dilakukan oleh Perumal *et al* (2012) yang menyebutkan bahwa kandungan asam galat ekstrak metanol daun salam dengan metode maserasi adalah sebesar 333,75 mg GAE/gram ekstrak. Jumlah asam galat ekstrak daun salam pada penelitian ini lebih rendah dikarenakan oleh beberapa hal. Pertama, pelarut yang digunakan berbeda, pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol sedangkan dalam Perumal *et al* (2010) menggunakan pelarut metanol. Penggunaan pelarut ini akan mempengaruhi jumlah fenol (asam galat) yang terekstraksi ke dalam pelarut. Selain itu daun salam yang digunakan juga berbeda, penelitian ini menggunakan daun salam yang berasal dari Batu Materia Medika Malang sedangkan Perumal *et al* (2010) menggunakan daun salam yang berasal dari Taman Herbal di Relau, Kota Penang, Malaysia yang dimungkinkan memiliki kandungan asam galat yang lebih tinggi.

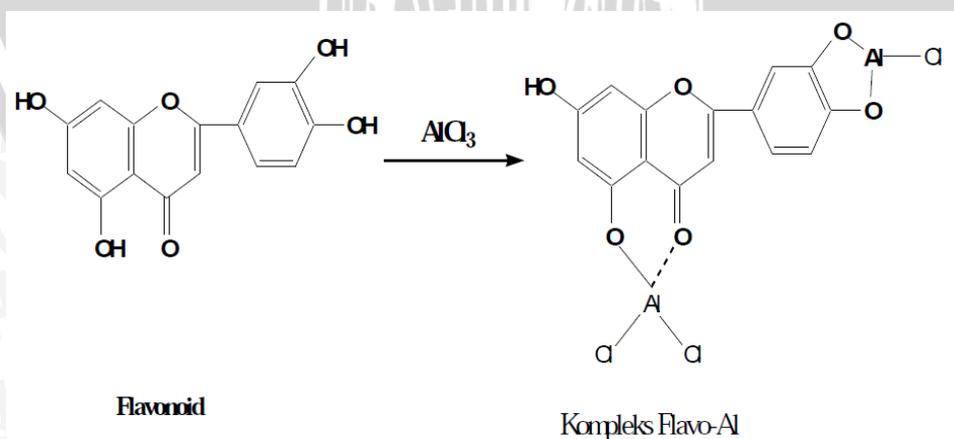
Metode ekstraksi juga mempengaruhi dalam memperoleh kandungan fenol total asam galat. Penelitian sebelumnya belum ada yang membandingkan metode ekstraksi dalam menghasilkan komponen asam galat yang lebih tinggi. Pada penelitian menunjukkan bahwa metode ekstraksi dengan soxhlet dapat menghasilkan jumlah asam galat dengan jumlah yang lebih tinggi.

6.1.1.2 Flavonoid Total

Dalam penelitian ini kandungan flavonoid total pada ekstrak daun salam lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak daun sirih merah baik dengan metode ekstraksi soxhlet maupun maserasi. Daun salam dan daun sirih merah positif

mengandung flavonoid pada uji kualitatif (Sekti, 2014). Namun belum ada penelitian yang menyatakan secara kuantitatif jumlah flavonoid total pada ekstrak daun sirih merah. Kandungan flavonoid total pada ekstrak daun sirih merah dari hasil penelitian ini sebesar 6,07% (dengan metode maserasi) dan 5,205% (dengan metode ekstraksi soxhlet). Metode maserasi menghasilkan flavonoid total lebih tinggi dibandingkan dengan metode ekstraksi soxhlet.

Secara kuantitatif daun salam mengandung flavonoid total sebesar 65,2 mg *Catechin Equivalent* (CE)/ gram ekstrak (Perumal *et al.*, 2012). Pada penelitian ini kandungan flavonoid total tidak dinyatakan dalam *Catechin Equivalent*. Sehingga beberapa jenis flavonoid yang dapat berinteraksi dengan reagen yang digunakan yaitu $AlCl_3$ terhitung dalam persentase flavonoid total. $AlCl_3$ akan membentuk kompleks yang stabil dengan grup keto C-4 dan grup hidroksil C-3 atau C-5 dari flavonoid. Banyaknya kompleks yang terbentuk akan diketahui dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer (Wahyuningrum, 2006). Golongan flavonoid ini termasuk catechin dan quercetin. Pembentukan kompleks nya adalah sebagai berikut :



Gambar 6.1 Reaksi Flavonoid dengan $AlCl_3$ (Rahayu, 2009)

Jumlah flavonoid total ekstrak daun salam pada penelitian ini adalah sebesar 4,615% (dengan metode maserasi) dan 2,885% (dengan metode ekstraksi soxhlet). Metode maserasi menghasilkan flavonoid total lebih tinggi dibandingkan dengan metode ekstraksi soxhlet.

6.1.2 HSP70

6.1.2.1 Ekspresi HSP70

6.1.2.1.1 Perlakuan Ekstrak Tunggal

Berdasarkan hasil penelitian pemberian ekstrak tunggal menunjukkan bahwa semua perlakuan yang diberikan dengan menggunakan ekstrak salam maserasi (SM), salam soxhlet (SS) dan sirih merah maserasi (SMM) memberikan nilai indeks ekspresi HSP70 yang sama dengan kontrol sel. Yang berarti semua perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh terhadap indeks ekspresi HSP70 pada sel HeLa. Ekstrak tunggal tidak dapat menurunkan indeks ekspresi HSP70.

Kandungan asam galat dan flavonoid yang terdapat di ekstrak daun salam dan sirih merah tidak dapat menurunkan ekspresi HSP70. Pada penelitian sebelumnya oleh Das *et al* (2012) menyebutkan bahwa fraksi asam galat yang berasal dari *Terminalia chebula* dapat menurunkan ekspresi HSP70 pada Jurkat sel. Penelitian lain oleh Schriener *et al* (2012) juga menyebutkan bahwa ekstrak *Rosa damascena* yang secara kuantitatif mengandung asam galat 0,004% dan flavonoid quercetin 0,051% dapat menurunkan ekspresi dari HSP70. Hasil ini juga didukung oleh Rusak *et al* (2002) yang menyebutkan bahwa flavonoid quercetin dapat menurunkan ekspresi HSP70 pada *Human Promyeloid Leukimia cells HL-60*.

Ekstrak salam dan sirih merah secara kuantitatif diketahui mengandung asam galat dan flavonoid namun tidak dapat menghambat ekspresi HSP70, padahal pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa tanaman yang mengandung senyawa tersebut memiliki aktivitas dalam menghambat HSP70. Hal ini mungkin dikarenakan karena beberapa hal. Pertama, adanya senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak salam maupun sirih merah memiliki efek dalam menetralkan aktivitas asam galat dan flavonoid dalam menghambat ekspresi HSP70. Kedua, jumlah kandungan asam galat dan flavonoid lebih sedikit dibandingkan dengan senyawa lain yang menetralkan efek kedua senyawa tersebut. Ketiga, ada zat lain yang memiliki aktivitas yang berlawanan dan efeknya melebihi asam galat dan flavonoid.

Sekti (2014) menyebutkan bahwa ekstrak tunggal daun salam, daun sirih merah memiliki efek dalam meningkatkan aktivasi caspase-3. Aktivasi caspase 3 ini dapat dihambat oleh HSP70 melalui jalur apoptosis intrinsik (caspase-9) dan apoptosis ekstrinsik (caspase-8). Sehingga dari penelitian ini dapat diketahui bahwa efek peningkatan aktivasi caspase-3 oleh ekstrak daun salam maupun sirih merah tidak melalui penghambatan pada ekspresi HSP70.

6.1.2.1.2 Perlakuan Ekstrak Kombinasi Terhadap Ekspresi HSP70

Pemberian ekstrak kombinasi hasilnya juga sama dengan pemberian ekstrak tunggal. Pemberian ekstrak kombinasi juga tidak dapat menurunkan ekspresi HSP70 pada sel HeLa. Nilai indeks ekspresi HSP70 perlakuan ekstrak kombinasi sama dengan kontrol sel. Yang berarti semua perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh terhadap indeks ekspresi HSP70 pada sel HeLa.

Ekstrak kombinasi tidak memiliki aktivitas dalam menurunkan indeks ekspresi HSP70.

Dari hasil pemberian ekstrak tunggal diketahui bahwa ekstrak tunggal tidak memiliki aktivitas dalam menghambat ekspresi HSP70. Karena secara tunggal masing masing ekstrak tidak dapat menghambat HSP70 secara kombinasi juga demikian.

6.1.2.2 Aktivasi HSP70

6.1.2.2.1 Perlakuan Ekstrak Tunggal

Berdasarkan hasil penelitian pemberian ekstrak tunggal Salam Maserasi (SM), Salam Soxhlet (SS), dan Sirih Merah Maserasi (SMM) pada dosis yang diberikan signifikan berpengaruh terhadap indeks aktivasi HSP70. Hanya SS dosis 11,62 $\mu\text{g/mL}$ dan SS dosis 23,24 $\mu\text{g/mL}$ yang signifikan menurunkan indeks aktivasi HSP70 dibandingkan dengan kontrol sel. Indeks aktivasi paling rendah pada pemberian ekstrak SS dosis 11,62 $\mu\text{g/mL}$. Namun, secara statistika indeks aktivasi HSP70 SS dosis 11,62 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda signifikan dengan SS dosis 23,24 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak Salam Soxhlet (SS) dapat menurunkan indeks aktivasi HSP70 namun tidak menunjukkan perbedaan indeks aktivasi HSP70 antar dosis Salam Soxhlet.

Ekstrak salam soxhlet mengandung fenol total yang dinyatakan sebagai asam galat sebesar 62,465 mg GAE/ gram ekstrak yang lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan asam galat pada ekstrak salam maserasi maupun sirih merah maserasi. Namun masih lebih rendah dibandingkan dengan kandungan asam galat pada ekstrak sirih merah soxhlet. Namun pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari (2014) menyebutkan bahwa ekstrak sirih

merah soxhlet tidak memiliki aktivitas antikanker sehingga ekstrak sirih merah maserasi tidak diuji aktivitasnya pada aktivasi HSP70.

Ekstrak salam soxhlet mengandung flavonoid total yang paling rendah dibandingkan dengan ekstrak lain yang diberikan. Dengan kadar flavonoid yang paling rendah ekstrak salam soxhlet signifikan menurunkan indeks aktivasi HSP70.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak salam soxhlet dengan kandungan asam galat tertinggi dan flavonoid terendah dibandingkan dengan ekstrak lain yang diberikan memiliki aktivitas dalam menurunkan indeks aktivasi HSP70 paling baik. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa asam galat merupakan komponen fenol terbesar dalam ekstrak daun salam (Perumal *et al.*, 2012) memiliki aktivitas dalam menghambat HSP70 (Das *et al.*, 2012; Schriener *et al.*, 2012). Namun hasil penelitian juga berlawanan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rusak *et al.* (2002) yang menyebutkan bahwa golongan flavonoid termasuk quercetin memiliki aktivitas dalam menghambat HSP70 yang aktivitas penghambatannya tergantung pada keberadaan -OH di cincin B dan saturasi dari ikatan C2-C3. Sehingga penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas dalam menurunkan indeks aktivasi HSP70 pada sel HeLa lebih tergantung pada kandungan asam galat yang paling tinggi.

Pemberian ekstrak salam soxhlet dapat menurunkan indeks aktivasi HSP70 sehingga dapat menurunkan aktivitas penghambatan HSP70 pada pembelahan GATA-1 dan CAD di intisel sehingga dapat memicu apoptosis. Walaupun salam soxhlet tidak dapat menurunkan ekspresi HSP70 namun salam

soxhlet dapat menurunkan aktivasi dari HSP70. Wu *et al* (2005) menyebutkan bahwa penurunan HSP70 dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

Ekstrak salam maserasi dan sirih merah maserasi juga memiliki kandungan asam galat dan flavonoid namun tidak signifikan menurunkan indeks aktivasi HSP70. Hal ini mungkin dikarenakan jumlah asam galat yang rendah dibandingkan dengan salam soxhlet dan ada zat lain yang bisa bekerja sebagai penghambat HSP70 yang tidak ikut terekstraksi dengan metode maserasi. Karena pada intinya yang bekerja adalah semua komponen dalam ekstrak bukan hanya satu atau dua jenis kandungan dalam suatu ekstrak. Selain itu juga dimungkinkan bahwa pada ekstrak maserasi terdapat zat lain yang memiliki aktivitas berlawanan dengan asam galat dan flavonoid dalam menghambat aktivasi HSP70 dan efeknya melebihi asam galat dan flavonoid tersebut.

6.1.2.2.2 Perlakuan Ekstrak Kombinasi

Berdasarkan hasil penelitian pemberian ekstrak kombinasi Salam Maserasi (SM) + Sirih Merah Maserasi (SMM) dan Salam Soxhlet (SS) + Sirih Merah Maserasi (SMM) tidak berpengaruh signifikan terhadap indeks aktivasi HSP70 pada berbagai dosis yang diberikan.

Pemberian ekstrak kombinasi tidak mempengaruhi indeks aktivasi HSP70 jika dibandingkan dengan kontrol sel. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kombinasi tidak memiliki aktivitas dalam menurunkan aktivasi HSP70. Pada pemberian ekstrak tunggal dengan salam soxhlet yang tidak tergantung dosis signifikan menurunkan indeks aktivasi HSP70. Namun pemberian Salam Soxhlet yang dikombinasikan dengan Sirih Merah Maserasi tidak memberikan pengaruh terhadap indeks aktivasi HSP70. Hal ini mungkin disebabkan karena beberapa

hal. Pertama, ekstrak salam dan sirih merah mengalami interaksi dan terjadi suatu reaksi netralisasi pada gugus – gugus yang memiliki aktivitas penghambatan pada aktivasi HSP70. Kedua, ekstrak sirih merah maserasi yang secara tunggal tidak memiliki aktivitas dalam menurunkan aktivasi HSP70 meniadakan efek dari salam soxhlet.

Hasil ini sama dengan pemberian ekstrak kombinasi pada ekspresi HSP70. Ekstrak kombinasi tidak dapat menghambat ekspresi HSP70 dan tidak dapat menghambat aktivasi HSP70.

6.1.3 Persentase Kadar ROS

6.1.3.1 Perlakuan Ekstrak Tunggal

Berdasarkan hasil penelitian pemberian ekstrak tunggal daun salam maupun sirih merah dapat meningkatkan persentase kadar ROS pada sel HeLa. Ekstrak Salam Maserasi (SM), Salam Soxhlet (SS), dan Sirih Merah Maserasi (SMM) pada dosis yang diberikan signifikan berpengaruh terhadap persentase kadar ROS pada sel HeLa. SM 10,16 $\mu\text{g/mL}$; SM 20,32 $\mu\text{g/mL}$; SS 11,62 $\mu\text{g/mL}$; SS 23,24 $\mu\text{g/mL}$ dan SMM 27,42 $\mu\text{g/mL}$ signifikan meningkatkan persentase kadar ROS pada sel HeLa dibandingkan dengan kontrol sel. Hanya SMM 13,71 $\mu\text{g/mL}$ yang tidak signifikan meningkatkan persentase ROS pada sel HeLa. Persentase kadar ROS paling tinggi pada pemberian SMM dosis 27,42 $\mu\text{g/mL}$. Namun, secara statistika persentase kadar ROS SMM dosis 27,42 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda signifikan dengan SM 10,16 $\mu\text{g/mL}$; SM 20,32 $\mu\text{g/mL}$; SS 11,62 $\mu\text{g/mL}$; dan SS 23,24 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tunggal tidak menunjukkan perbedaan persentase kadar ROS antar tanaman dan antar

dosis. Semua ekstrak yang diberikan berpotensi meningkatkan kadar ROS pada sel HeLa kecuali ekstrak sirih merah maserasi dengan dosis 13,71 µg/mL.

Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak dalam meningkatkan kadar ROS tidak tergantung pada jumlah kandungan asam galat. Ekstrak yang diberikan sama – sama mengandung asam galat tapi memiliki kadar asam galat yang berbeda beda namun potensi dalam meningkatkan kadar ROS pada sel HeLa adalah sama pada semua jenis tanaman yang diberikan.

Pada penelitian sebelumnya asam galat telah dibuktikan dapat meningkatkan kadar ROS pada sel promyelocytic leukimia (Inoue *et al.*, 2000) dan meningkatkan kadar ROS pada sel kanker prostat DU145 (Chen *et al.*, 2009) yang akhirnya akan menginduksi apoptosis.

ROS diproduksi oleh mitokondria. ROS ini akan keluar dari mitokondria dan akan menginduksi terbentuknya jembatan sulfida antara 2 molekul Bax dan akan menyebabkan translokasi Bax ke membran luar mitokondria sehingga membentuk suatu kanal. Sedangkan di dalam mitokondria sendiri, ROS akan menginduksi sitokrom c untuk keluar dari membran dalam mitokondria menuju membran luarnya dan akan keluar menuju sitosol melalui kanal Bax di membran luar mitokondria. Sitokrom c merupakan salah satu molekul apoptogenik yang dilepaskan oleh mitokondria (Neuzil *et al.*, 2006). Pelepasan sitokrom c ini akan menginduksi pembentukan kompleks dengan Apaf-1 yang selanjutnya akan mengaktivasi pro-caspase-9 menjadi caspase-9 dan caspase-9 akan mengaktivasi caspase-3 dan pada akhirnya akan terjadi apoptosis (Ghobrial *et al.*, 2005; Lanneau *et al.*, 2008; Rerole *et al.*, 2010).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sekti (2014) ekstrak salam dan sirih merah memiliki aktivitas antikanker dengan mengaktivasi

caspase-3. Jalur mekanisme dari ekstrak daun salam dan daun sirih merah telah dibuktikan pada penelitian ini bahwa aktivitas dalam meningkatkan aktivasi caspase-3 salah satunya adalah melalui jalur apoptosis intrinsik dengan peningkatan kadar ROS.

6.1.3.2 Perlakuan Ekstrak Kombinasi

Berdasarkan hasil penelitian pemberian ekstrak kombinasi Salam Maserasi (SM) + Sirih Merah Maserasi (SMM) dan Salam Soxhlet (SS) + Sirih Merah Maserasi (SMM) berpengaruh secara signifikan terhadap persentase kadar ROS pada sel HeLa. Namun hanya kombinasi SS + SMM pada berbagai dosis yang diberikan yang signifikan meningkatkan persentase kadar ROS pada sel HeLa dibandingkan dengan kontrol sel. Persentase kadar ROS paling tinggi pada SS dosis 11,62 µg/mL + SMM 13,71 µg/mL. Namun, secara statistika persentase kadar ROS pada SS dosis 11,62 µg/mL + SMM 13,71 µg/mL tidak berbeda signifikan dengan SS + SMM dosis yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak Salam Soxhlet (SS) + ekstrak Sirih Merah Maserasi (SMM) dapat meningkatkan persentase kadar ROS namun tidak menunjukkan perbedaan persentase kadar ROS antar dosis SS + SMM.

Ekstrak salam maserasi secara tunggal memiliki aktivitas dalam meningkatkan kadar ROS sama dengan ekstrak salam soxhlet dan sirih merah maserasi. Namun ketika salam maserasi dikombinasi dengan ekstrak sirih merah maserasi aktivitas dalam meningkatkan kadar ROS menjadi hilang. Hal ini mungkin disebabkan adanya interaksi antara kandungan dalam ekstrak salam maserasi dengan gugus pada ekstrak sirih merah maserasi yang menyebabkan hilangnya aktivitas dalam meningkatkan kadar ROS. Sedangkan pada ekstrak

salam soxhlet yang dikombinasikan dengan ekstrak sirih merah maserasi tetap memiliki aktivitas dalam meningkatkan persentase kadar ROS pada sel HeLa.

