

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Ekstraksi

Penelitian ini menggunakan serbuk daun tanaman kelor (*Moringa oleifera*) yang diekstrak menggunakan metode ekstraksi dingin (maserasi) dan menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk daun kelor untuk ekstraksi sebanyak 100 gram. Maserasi dilakukan selama 24 jam dengan dua kali remaserasi. Dari seluruh proses ekstraksi, didapatkan filtrat sebanyak 2463,8 ml. Kemudian ekstrak tersebut diproses untuk dipisahkan pelarutnya menggunakan rotary evaporator dengan suhu *waterbath* sebesar 40°C dan kecepatan putaran 700 rpm. Kemudian dilakukan proses pengeringan ekstrak menggunakan *vacum oven* sehingga didapatkan ekstrak sebanyak 37,81 gram yang berwarna hijau kehitaman, pekat, dan berbau khas daun.

5.1.2 Uji Fitokimia Ekstrak

Uji fitokimia secara kualitatif pada ekstrak pekat ini bertujuan untuk mengetahui kandungan yang terdapat pada daun kelor. Hasil uji fitokimia ekstrak daun kelor dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kelor

Uji Senyawa	Reagen	Hasil	Interpretasi
Alkaloid	Dragendorff	Berwarna kecokelatan	Positif
Fenol	Ferriklorida (FeCl ₃)	Hijau kehitaman	Positif
Flavonoid	NaOH + HCl	Berwarna kuning	Positif
Saponin	Pengocokan (pengamatan busa)	Berbusa	Positif
Tanin	Ferriklorida (FeCl ₃)	biru kehitaman	Positif
Terpenoid	H ₂ SO ₄	Cokelat kehitaman	Negatif

Berdasarkan hasil uji fitokimia secara kualitatif, diketahui bahwa ekstrak etanol daun kelor yang didapatkan mengandung alkaloid, fenol, flavonoid, saponin dan tanin tetapi tidak mengandung terpenoid.

5.1.3 Penentuan IC₅₀ Menggunakan MTT Assay

Pengulangan perlakuan yang dilakukan pada MTT Assay ini adalah sebanyak 3 kali, dengan 11 perlakuan konsentrasi ekstrak, yaitu kontrol (0 µg/mL), 1200 µg/mL, 1250 µg/mL, 1400 µg/mL, 1600 µg/mL, 1800 µg/mL, 2000 µg/mL, 2400 µg/mL, 2500 µg/mL, 2600 µg/mL, 2800 µg/mL, 3000 µg/mL, 3200 µg/mL, 3400 µg/mL, 3600 µg/mL, 4000 µg/mL, 4200 µg/mL, 4400 µg/mL, 4600 µg/mL, 4800 µg/mL, 5000 µg/mL, 5200 µg/mL, 5400 µg/mL, 5600 µg/mL, 5800 µg/mL, 6000 µg/mL, 6200 µg/mL, 10000 µg/mL, dan 20000 µg/mL.

Setelah sel diberi paparan ekstrak, dilakukan penentuan IC₅₀. Absorbansi sel MCF-7 dibaca menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Kemudian nilai absorbansi dikonversikan dalam bentuk presentase. Sehingga diketahui presentase hambatan proliferasi sel MCF-7 menggunakan rumus menurut (Sitorus, 2008) sebagai berikut:

$$\% \text{Hambatan proliferasi sel MCF-7} = \frac{\text{Absorbansi Rata} - \text{rata Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Rata} - \text{Rata Kontrol}} \times 100\%$$

Hasil pengukuran persentase rata – rata hambatan proliferasi sel pada masing – masing konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) ditampilkan pada tabel 5.2 berikut:

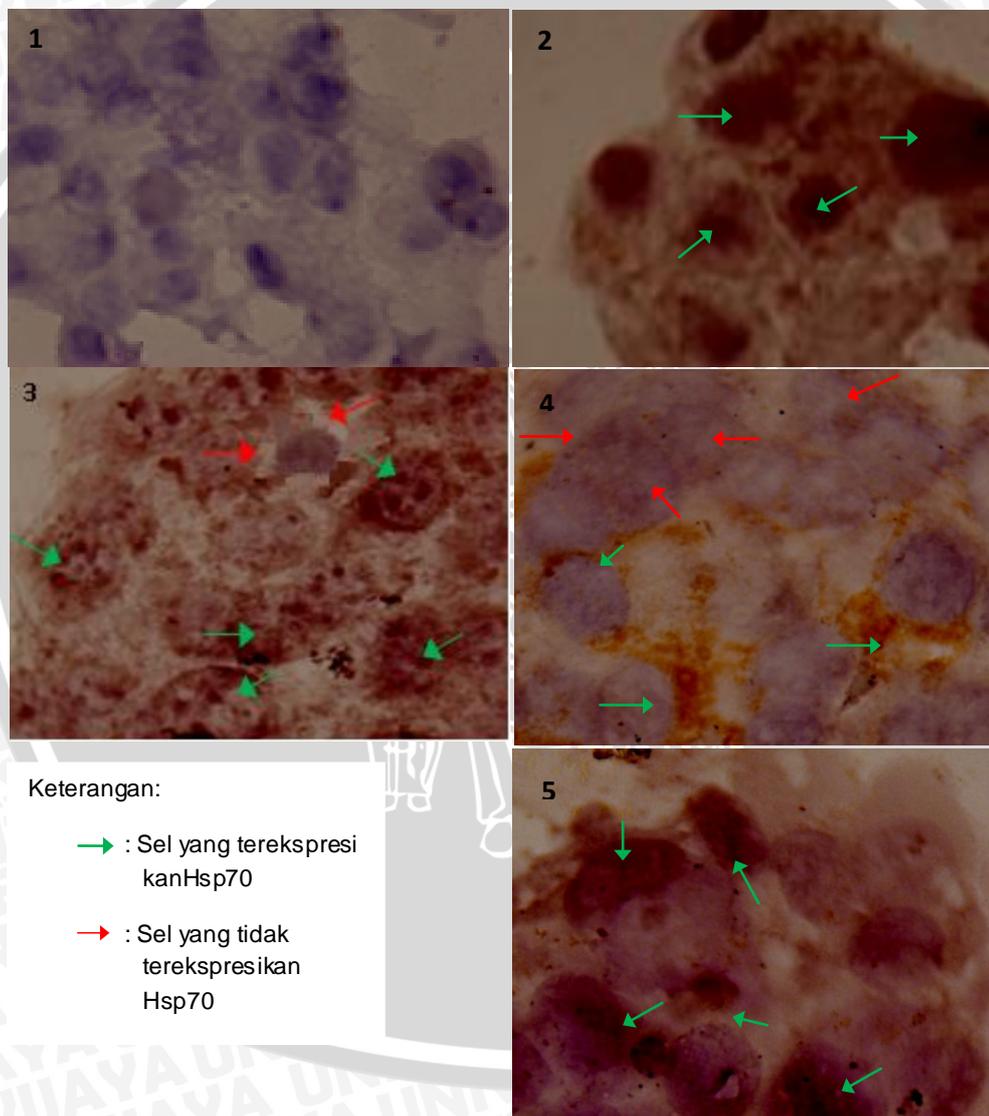
Tabel 5.2 Persentase Rata – rata Hambatan Proliferasi Sel MCF-7

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) ^{*)}	Hambatan Proliferasi (%)	Standar Deviasi
1200	30,842	0,394
1400	33,415	3,738
1600	51,389	8,232
1800	51,307	2,059
2000	54,902	0,925
2200	50,858	1,649
2400	50,858	1,244
2600	58,538	2,841
2800	62,582	1,970
3000	62,541	0,579
3200	62,582	1,436
3400	64,502	1,452
3600	60,825	1,178
3800	63,971	1,471
4000	70,343	1,061
4200	77,124	2,621
4400	79,003	1,954

Data yang didapatkan ini kemudian dibuat kurvanya dengan cara regresi linier sehingga didapatkan IC_{50} .

5.1.4 Uji Ekspresi Hsp70

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan yang terdiri dari, kontrol tanpa antibodi Hsp70, kontrol tanpa perlakuan ekstrak, pemberian ekstrak dengan konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$, 2200 $\mu\text{g/ml}$, dan 4400 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji ekspresi HSP70 ditunjukkan pad Gambar 5.1



Gambar 5.1 Hasil Uji Ekspresi Hsp70 pada sel MCF-7 dengan Metode Imunositokimia Setelah Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Kelor (perbesaran 1000 kali). 1) Kontrol tanpa antibodi, 2) Kontrol dengan Antibodi, 3) Konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ (setengah IC_{50}), 4) Konsentrasi 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), 5) Konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ (dua kali IC_{50}).

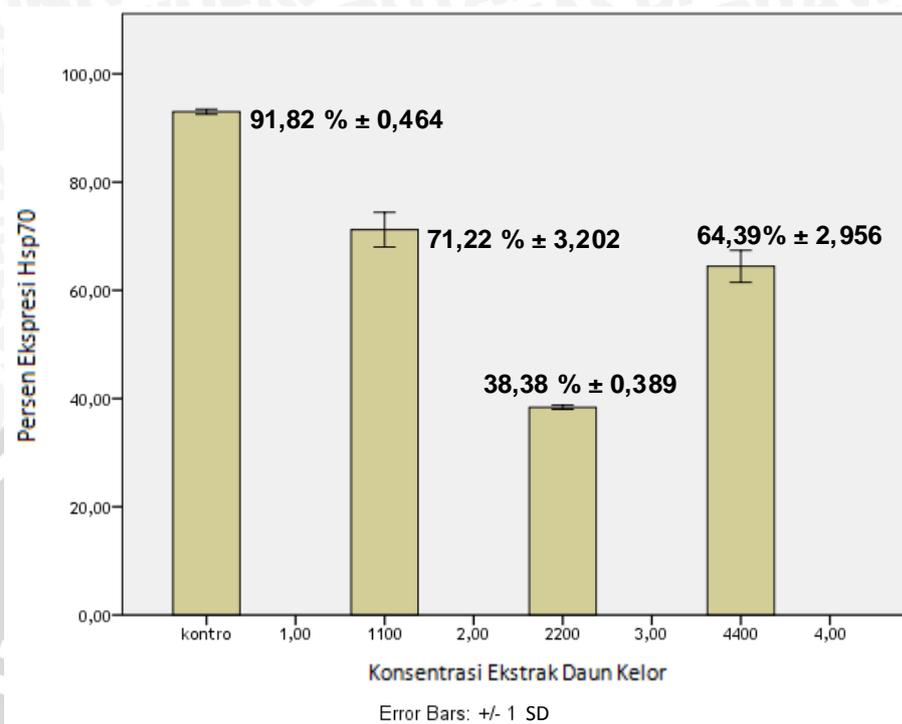
Perhitungan sel dilakukan dengan menghitung jumlah sel MCF-7 yang mengalami ekspresi Hsp70, ditandai dengan warna kecoklatan pada inti maupun sitoplasma sel di setiap lapang pandang sesuai dengan derajat perhitungan yang telah ditentukan oleh peneliti.

Indeks ekspresi Hsp70 adalah persentase perbandingan total sel yang mengalami ekspresi Hsp70 dan total seluruh sel dari 10 lapang pandang. Hasil indeks ekspresi Hsp70 kemudian ditentukan nilai rata - rata dan dihitung standar deviasinya. Rata - rata indeks dan standar *error* dari ekspresi Hsp70 dapat dilihat pada Tabel 5.3 berikut:

Tabel 5.3 Rerata Indeks Ekspresi Hsp70

Replikasi Perlakuan	kontrol	$\frac{1}{2}$ IC ₅₀	IC ₅₀	2x IC ₅₀
1	91,6	62,78	39,10	52,75
2	92	71,60	39,44	63,87
3	93,58	70,99	38,29	62,72
4	87,38	72,56	36,68	70,73
5	93,3	64,43	38,43	63,20
6	92,77	84,94	38,36	73,45
Rerata \pm SD	91,82 % \pm 0,464	71,22 % \pm 3,202	38,38 % \pm 0,389	64,39% \pm 2,956

Pada kelompok kontrol perlakuan, rata - rata indeks ekspresi Hsp70 pada sel adalah 91,82 % \pm 0,464. Pada konsentrasi 1100 μ g/ml ($\frac{1}{2}$ xIC₅₀), rata - rata indeks ekspresi Hsp70 pada sel adalah 71,22 % \pm 3,202. Pada konsentrasi 2200 μ g/ml (IC₅₀), rata - rata indeks ekspresi Hsp70 pada sel adalah 38,38 % \pm 0,389. Pada konsentrasi 4400 μ g/ml (2xIC₅₀) , rata-rata indeks ekspresi Hsp70 pada sel adalah 64,39% \pm 2,956.



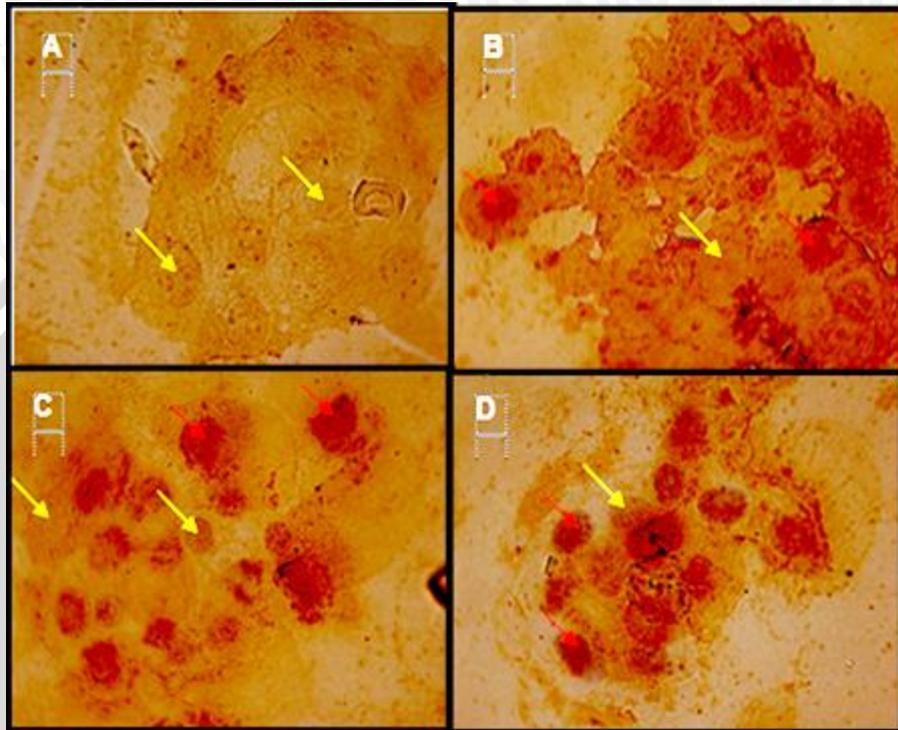
Gambar 5.2 Grafik Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Terhadap Rata – rata Indeks Ekspresi Hsp70.

Berdasarkan hasil uji statistik, Uji *post-hoc* menunjukkan perbedaan yang bermakna pada kelompok sel MCF-7 yang diberi terapi ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$, 2200 $\mu\text{g/ml}$ dan 4400 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai $p=0,000$ dibanding dengan kelompok kontrol. Sedangkan kelompok konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ tidak memiliki perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,165$).

5.1.5 Uji Apoptosis sel MCF-7

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan yang terdiri dari, kontrol tanpa perlakuan ekstrak, pemberian ekstrak dengan konsentrasi 1100 $\mu\text{g/ml}$ (setengah IC_{50}), konsentrasi 2200 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), konsentrasi 4400 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}) dengan pengulangan sebanyak 6 kali. Pengamatan apoptosis menggunakan metode Tunel Assay. Apoptosis pada sel yang ditunjukkan

dengan warna coklat pada nukleus. Pengamatan mikroskopik dari ekspresi Hsp70 dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Hasil Uji Apoptosis Pada Sel MCF-7 Menggunakan Metode TUNEL Assay Setelah Diberi Perlakuan Ekstrak Daun Kelor (perbesaran 1000 kali). (A) Kelompok kontrol, (B) Kelompok $\frac{1}{2}IC_{50}$, (C) Kelompok IC_{50} , (D) Kelompok $2xIC_{50}$. tanda panah merah menunjukkan sel yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna coklat gelap pada inti sel, sedangkan tanda panah kuning menunjukkan sel yang tidak mengalami apoptosis yang ditandai warna coklat terang pada inti sel.

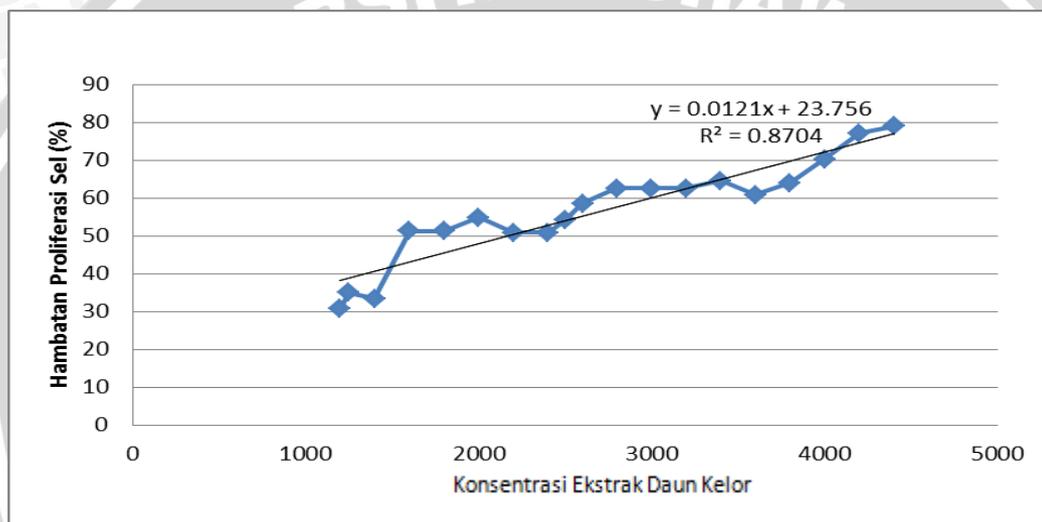
Beberapa hasil foto, tidak dapat dilihat apoptosis dan bentuk dari selnya, sehingga hasil yang didapat tidak representatif dan tidak dapat dihitung. Oleh karena itu hasil TUNEL assay ini hanya dapat dilihat secara kualitatif dengan melihat gradasi warna coklat yang tampak.

5.2. Analisa Hasil

5.2.1 Penentuan IC_{50} menggunakan MTT Assay

5.2.1.1 Penentuan IC_{50} dengan Regresi Linier

Data MTT assay yang diperoleh dari pembacaan dengan *microplate reader* dikonversi menjadi persen hambatan proliferasi, disajikan dalam gambar 5.4 berikut ini:



Gambar 5.4 Grafik Hubungan Konsentrasi Ekstrak Terhadap Persen Hambatan Proliferasi Sel MCF-7.

Berdasarkan grafik diatas, diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0.0121x + 23.756$.

Dari persamaan ini dapat ditentukan IC_{50} yaitu sebesar 2168,92 $\mu\text{g/ml}$ dan dibulatkan menjadi 2200 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.1.2 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data yang didapatkan dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wilk. Uji normalitas ini dilakukan untuk mengetahui persebaran data. Dari hasil uji normalitas, menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Dari Hasil uji

homogenitas dihasilkan nilai $p = 0.110$ ($p < 0.05$) yang menunjukkan bahwa data tidak homogen. Selanjutnya, dilakukan transformasi data, namun data tetap tidak terdistribusi normal dan tidak homogen. Oleh karena itu dilakukan uji korelasi non parametrik yaitu uji *spearman*.

5.2.1.3 Uji Korelasi dengan Metode *Spearman*

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dan persen hambatan proliferasi sel MCF-7. Pada uji *spearman*, data dinyatakan memiliki hubungan korelasi yang signifikan jika R mendekati 1 dan nilai $p < 0,05$. Hasil uji korelasi *spearman* yang untuk pengujian MTT didapatkan nilai $R = +0.945$ ($p = 0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan kuat dan positif antara pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan persen hambatan proliferasi sel MCF-7 yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula persen hambatan proliferasi sel.

5.2.2 Pengujian Ekspresi Hsp70

5.2.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Data yang didapatkan dalam penelitian ini dianalisis menggunakan analisis varian atau *one way ANOVA*. Uji normalitas menggunakan uji Saphiro-Wil. Hasil menunjukkan data terdistribusi normal ditunjukkan dari nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). Nilai signifikansi dari berbagai perlakuan ditunjukkan sebagai berikut, nilai $p = 0,267$ pada kelompok kontrol, $p = 0,232$ pada kelompok konsentrasi ekstrak $\frac{1}{2} IC_{50}$, $p = 0,257$ pada konsentrasi ekstrak IC_{50} , dan $p = 0,581$ pada kelompok konsentrasi ekstrak $2 \times IC_{50}$. Hal ini

menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak daun kelor (*M. oleifera*) memiliki perbedaan signifikan pada variabel terikat (ekspresi Hsp70). Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas dan dihasilkan nilai $p = 0.057$ ($p > 0.05$) menunjukkan bahwa data homogen.

5.2.2.2 Uji Varian (ANOVA)

Uji ANOVA dilakukan setelah diketahui bahwa data terbukti normal dan homogen. Data dinyatakan terdapat perbedaan signifikan jika nilai $p < 0.05$.

5.2.2.3 Uji Korelasi (*Post-Hoc*)

Uji korelasi dengan metode *post-hoc* dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara berbagai konsentrasi ekstrak dan ekspresi Hsp70. Data dinyatakan terdapat perbedaan signifikan jika nilai $p < 0.05$. Hasil uji korelasi ditampilkan pada tabel 5.4 berikut ini:

Tabel 5.4 Tabel hasil uji korelasi antara kelompok perlakuan

Konsentrasi Ekstrak	Konsentrasi Ekstrak	Nilai Signifikansi
Kontrol	½ IC ₅₀ (1100 µg/ml)	0,000*
	IC ₅₀ (2200 µg/ml)	0,000*
	2IC ₅₀ (4400 µg/ml)	0,000*
½ IC ₅₀ (1100 µg/ml)	Kontrol	0,000*
	IC ₅₀ (2200 µg/ml)	0,000*
	2IC ₅₀ (4400 µg/ml)	0,165
IC ₅₀ (2200 µg/ml)	Kontrol	0,000*
	½ IC ₅₀ (1100 µg/ml)	0,000*
	2IC ₅₀ (4400 µg/ml)	0,000*
2IC ₅₀ (4400 µg/ml)	Kontrol	0,000*
	½ IC ₅₀ (1100 µg/ml)	0,165*
	IC ₅₀ (2200 µg/ml)	0,000

* = menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan

Hasil uji korelasi antar berbagai kelompok perlakuan menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ekstrak ($p=0,000$). Hal ini berlaku juga pada kelompok konsentrasi IC_{50} ($p=0,000$). Namun, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok konsentrasi $2xIC_{50}$ dengan kelompok konsentrasi $\frac{1}{2}xIC_{50}$, dilihat dari nilai signifikansinya lebih dari 0.005 yaitu 0.165.

5.2.2.4 Uji Korelasi (Pearson)

Didapatkan korelasi antara konsentrasi ekstrak dan persen ekspresi Hsp70 yaitu -0,659. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara konsentrasi ekstrak dan persen ekspresi Hsp70. Nilai signifikansi data adalah 0,000. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kelor maka semakin terjadi penurunan persen ekspresi Hsp70.

5.2.3 Hasil Apoptosis menggunakan Metode Tunel Assay

Pada penelitian ini dilakukan uji apoptosis sel MCF-7 menggunakan metode TUNEL Assay yang diberi perlakuan ekstrak daun kelor dengan perlakuan yaitu, kelompok kontrol, kelompok yang diberikan perlakuan ekstrak dengan konsentrasi $\frac{1}{2}xIC_{50}$ 1100 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} 2200 $\mu\text{g/ml}$, dan $2xIC_{50}$ 4400 $\mu\text{g/ml}$. Hasil yang didapatkan, sulit untuk dilihat bentuk sel dan apoptosisnya, walaupun beberapa hasil, dapat terlihat tetapi jumlahnya sedikit dan tidak representatif, sehingga tidak dapat dilakukan perhitungan jumlah sel dan analisis lebih lanjut.