

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah representasi populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang muda hingga cukup tua dengan kedudukan dari ujung tanaman pada daun ke 3 sampai 7 dan diperoleh dalam kondisi segar, bersih, dan tidak busuk.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah memuat identifikasi dari semua sampel yakni ekstrak etanol daun sirih merah.

Variabel utama kedua adalah aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun sirih merah terhadap sel kanker hati HepG2.

Variabel utama ketiga dalam penelitian adalah selektivitas ekstrak etanol daun sirih merah terhadap sel kanker hati HepG2.

Variabel utama keempat dalam penelitian adalah kemampuan ekstrak etanol daun sirih merah menginduksi ekspresi caspase-3.

2. Klasifikasi operasional variabel utama

Variabel yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah yang direncanakan untuk diteliti yang berpengaruh terhadap variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun sirih merah yang diujikan pada sel kanker hati HepG2.

Variabel tergantung dari penelitian ini yaitu aktivitas sitotoksik terhadap sel HepG2 dengan menghitung jumlah sel yang mati.

Variabel terkontrol yaitu variabel yang dianggap berpengaruh, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suhu, tekanan inkubator, lama inkubasi, kondisi laboratorium seperti kebersihan dari ruangan dan instrumen laboratorium, konsentrasi sampel uji, dan keadaan sel HepG2.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih merah adalah bagian daun dari tanaman sirih merah yang diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu.

Kedua, ekstrak etanol daun sirih merah adalah hasil maserasi daun sirih merah dengan menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

Ketiga, aktivitas sitotoksik adalah kemampuan senyawa dalam membunuh sel kanker setengah dari jumlah populasi. Memiliki aktivitas sitotoksik apabila nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$.

Keempat, sel kanker hati HepG2 yang digunakan adalah *continuous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) yang mengandung PBS 10% dan penisillin-streptomisin 1%.

Kelima, indeks selektivitas adalah suatu uji untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal.

Keenam, Imunositokimia adalah suatu uji untuk mengetahui mekanisme kerja dari senyawa sitotoksik dalam mengekspresi protein pada jalur apoptosis sel.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dan untuk ekstraksi menggunakan etanol 70%.

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker hati HepG2, sel vero, *cell line*; media stok: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), M199, Cisplatin, Natrium bikarbonat dan HEPES (Sigma); media kultur sel: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), media M199, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin 1% v/v (Gibco), Fungizon (Amphoterasin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 5mg/ml dalam PBS; media pencuci sel: larutan PBS pH 7,2; Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*).

Reagen imunositokimia : Metanol, *blocking serum*, hidrogen peroksida, antibodi primer untuk antigen caspase-3, antibodi sekunder (biotin), streptavidin, DAB, meyerhematosiklin, alcohol 95% dan *xylol*.

2. Alat

Alat penyari terdiri atas bejana maserasi, kain flanel, ayakan no. 40, batang pengaduk, blender, *moisture balance* O'haus MB23, kertas saring, eksikator, timbangan elektrik, corong Buchner, oven, evaporator, dan alat gelas.

Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), autoklaf, inkubator 37⁰C aliran CO₂ 5% model 6200 (Napco), *laminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA *reader* (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), mikroplate 96 sumuran (Nunclone), mikroplate 24 sumuran, lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 μ L dan 200-1000 μ L (Pipetman), mesin vortex, conical tube 15 ml, mikroskop inverted (Axiovert-25), *magnetic stirrer* dan kamera digital.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman sirih merah

Tahap pertama penelitian adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Tanaman sirih merah diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar. Daun sirih merah yang akan digunakan adalah daun tua dan segar. Daun dibersihkan dan dicuci dengan air bersih.

Daun sirih merah yang sudah dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatis yang dapat menurunkan mutu, menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri, dan memudahkan dalam proses pembuatan serbuk.

Daun sirih merah yang sudah kering, digiling dan diblender, kemudian diayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 40. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dan dilakukan pemeriksaan secara organoleptis.

3. Penetapan kandungan lembab

Penetapan kandungan lembab daun sirih merah dilakukan dengan cara serbuk dari daun sirih merah ditimbang 2 gram. Kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* O'Haus MB23 pada suhu 105°C, lalu dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana kadar air suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

4. Pembuatan ekstrak etanol

Pembuatan ekstrak daun sirih merah dilakukan dengan maserasi. Serbuk kering daun sirih merah sebanyak 500 gram dibagi ke dalam 2 buah maserator bervolume 2,5 liter yang masing-masing maserator dimasukkan serbuk sebanyak

250 gram kemudian ditambah dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10, yaitu masing-masing maserator dimasukkan etanol 70% sebanyak 2,5 liter. Campuran direndam dan setiap 6 jam sambil sesekali diaduk, kemudian disimpan dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari selama 18 jam. Setelah 18 jam, maserat disaring dan ulangi proses penyarian dengan menggunakan ampas pada penyarian pertama dengan pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Semua hasil maserat dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C sampai dihasilkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan pemeriksaan organoleptis dan perhitungan rendemen dari ekstrak kental tersebut (Depkes 2013).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} 100\%$$

5. Uji kadar air ekstrak

Uji ini menggunakan metode destilasi, dimana sebanyak 6 gram sampel dimasukkan dalam labu dan tambahkan toluene sampai sampel terendam. Hubungkan labu dengan tangan tabung Bidwell-Sterling. Panaskan labu sampai mendidih dan distilasikan sampai most water tertampung dalam penampung Bidwell-Sterling hingga tidak ada air yang menetes atau konstan. Baca banyaknya air dalam penampung dan hitung dalam rumus (Santoso *et al* 2012) :

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{Berat sampel (g)}} 100\%$$

6. Uji fitokimia

Kandungan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun sirih merah diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing.

6.1 Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavanoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dalam aquadest, kemudian disaring dan filtratnya ditambah 100 mg serbuk Mg, 0,5 ml HCl pekat, dan 0,5 ml amil alkohol. Terbentuknya warna jingga atau merah menunjukkan adanya flavanoid (Widiastuti 2014)

6.2 Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Sebanyak 100 mg ekstrak dilarutkan dengan aquadest dan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian dalam tabung reaksi, masing-masing ditambah dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif pada alkaloid, terbentuknya warna coklat kemerahan pada pereaksi Wagner menunjukkan hasil positif alkaloid, dan terbentuknya warna jingga menunjukkan hasil positif alkaloid (Widiastuti 2014)

6.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 100 mg ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dengan aquadest, kemudian disaring dan filtratnya ditampung dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambah 2 ml aquadest panas lalu didinginkan kemudian dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Minarno 2015).

6.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 100 mg ekstrak dilarutkan dengan aquadest kemudian disaring, filtrat tersebut ditambah 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya golongan tanin (Widiastuti 2014).

6.5 Identifikasi triterpenoid. Sebanyak 100 mg ekstrak dilarutkan dengan aquadest, lalu ditambah dengan 1 ml kloroform dan ditambah 0,5 ml asam asetat pekat anhidrat. Lalu ditambah asam sulfat pekat sebanyak 2 ml melewati dinding tabung reaksi, reaksi positif triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan larutan (Minarno 2015).

7. Uji sitotoksik

7.1 Sterilisasi alat. Alat-alat gelas yang akan digunakan harus berada dalam keadaan steril. Alat dicuci dan dikeringkan dalam oven. Alat-alat kering tersebut dibungkus dengan kertas, kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15-30 menit pada suhu 121°C (Triputra 2016).

7.2 Pembuatan media stok (DMEM) dan media penumbuh HepG2. Sebanyak 10,4 gram/L serbuk media DMEM dilarutkan dengan *aquadestilata* kurang lebih 800 ml dalam *beaker glass* 1 L, masukkan 2,2 gram natrium bikarbonat dan 2 gram *hepes*. Larutan tersebut diaduk dengan *stirrer* sampai larut.

Berikan larutan dapar (1 M NaOH atau 1 M HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambah lagi *aquadestilata* hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22 μm ke dalam botol steril (lakukan di dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diberi label.

Pembuatan media DMEM penumbuh dibuat dari 87,5 ml DMEM *stock* ditambah 10 ml FBS, 2 ml antibiotika penisillin-streptomisin dan 0,5 ml Fungizon (Triputra, 2016).

7.3 Pembuatan media stok (M199) dan media penumbuh sel vero.

Sebanyak 9,5 gram media M199, 2,2 gram NaHCO, 2 gram *hepes* dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1 L. Ditambah 800 ml *aquadest* dan dihomogenkan menggunakan *stirrer* sampai larut. Ditambah larutan dapar (1 M NaOH atau 1 M HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambah *aquadest* hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22 μm ke dalam botol steril (dilakukan dalam LAF), disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diberi label.

Pembuatan media penumbuh M199 dengan cara 86 ml media stok M199 ditambah 10 ml FBS, 3 ml antibiotika penisillin-streptomisin dan 1 ml fungizon (Triputra, 2016).

7.4 Pembuatan larutan uji. Sebanyak 15 mg ekstrak uji ditimbang selanjutnya dilarutkan dengan 100 μl DMSO dalam *ependrof*, kemudian disimpan sebagai larutan stok untuk digunakan dalam pengujian. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar larutan untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF (Triputra, 2016).

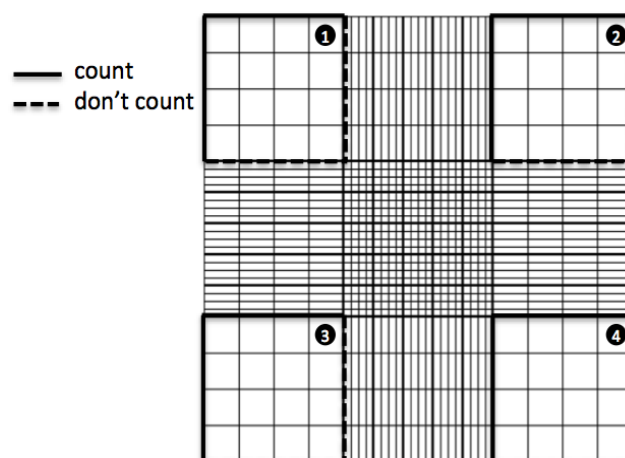
8. Preparasi sel

8.1 Pengaktifan sel HepG2. Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Di dalam LAF, sel HepG2 dimasukkan dalam tabung sentrifuge lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media penumbuh DMEM

dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam *plate* dan diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih, dan bersinar. *Plate* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian (Triputra, 2016).

8.2 Pengaktifan sel vero. Persiapkan alat dan kondisikan bahan pada suhu ruangan, ambil 10 ml PBS 1x *Room Temperature* (RT) pada tabung konikel, diambil sel vero yang inaktif dari *freezer* dan dicairkan pada suhu 37°C di *waterbath*, diambil suspensi sel dan dimasukkan tetes demi tetes ke dalam PBS 1x RT yang telah disiapkan. Sentrifugasi pada 1200 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan media M199 dan diresuspensi hingga homogen. Dipindah ke dalam wadah *flask* atau *petridish culture* dan ditambah media penumbuh M199 sebanyak 5 ml (Triputra, 2016).

8.3 Panen dan perhitungan sel. Media dalam *plate* dibuang lalu dicuci dengan PBS (*phosphat buffer saline*) 2 kali. Kemudian ditambah 1 ml tripsin. Inkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar *plate* dengan mikroskop. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh sebanyak 2 ml untuk menghentikan kerja tripsin. Terakhir ditambah media sampai 10 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, ditambah 3 ml media dan diresuspensikan. Diambil 10 µl dan dipipet ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*.



Gambar 4. Hemositometer

Hemositometer terdiri dari 4 kamar hitung (1, 2, 3, dan 4), setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Dihitung sel pada 4 kamar hemositometer, sel yang gelap (mati) dan sel yang berada di batas luar di sebelah kiri dan atas tidak ikut dihitung. Sel di batas kanan dan bawah ikut dihitung. Dihitung jumlah sel per mL dengan rumus (Triputra, 2016) :

$$\Sigma \text{sel/ml} = \frac{\Sigma \text{sel 1} + \Sigma \text{sel 2} + \Sigma \text{sel 3} + \Sigma \text{sel 4}}{4} \times 10^4$$

Dihitung volume panen sel yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus:

$$\text{Volume panen sel} = (V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2)$$

Diambil volume panen sel, ditransfer ke konikel baru dan ditambah medium sampai total volume yang diperlukan. Setelah itu jumlah suspensi sel yang harus diambil dan jumlah media yang harus ditambahkan dihitung untuk memperoleh konsentrasi sel sebesar 1×10^4 sel/100 μl . Sel didistribusikan ke dalam *microplate* 96 sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% (37°C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan ekstrak etanol daun sirih merah.

8.4 Pemberian ekstrak dan MTT Sumuran-sumuran yang berisi suspensi sel tersebut ditambah 100 μl larutan uji yaitu masing-masing ekstrak etanol daun sirih merah yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6) $\mu\text{g/ml}$ tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media penumbuh DMEM untuk sel HepG2, sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media penumbuh DMEM (sel HepG2), dan sebagai kontrol positif digunakan cisplatin. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Akhir inkubasi medium masing-masing sumuran dibuang dengan cara *plate* dibalikkan 180°C di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Dicuci dengan PBS sampai tidak berwarna. Kemudian ditambahkan 100 μl MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta

melarutkan formazan maka ditambah 100 μ l SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasi semalaman pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm (Triputra, 2016).

9. Uji Indeks Selektivitas

Sel vero ditanam pada microplate dengan konsentrasi 1×10^4 sel/100 μ l dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium diganti dengan yang baru kemudian ditambah ekstrak pada konsentrasi (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6) μ g/ml tiap sumuran dengan cosolvent DMSO dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran, ditambah 100 μ l media kultur M199 dan 10 μ l MTT. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen stopper (SDS 10 % dalam HCl 0,01 N), plate dibungkus agar tidak tembus cahaya dan dibiarkan selama satu malam, serapan dibaca dengan elisa reader pada panjang gelombang 595 nm (Triputra, 2016).

10. Uji Imunositokimia

Sel sebanyak 2 ml ditanam pada *coverslip* dalam mikroplate 6 sumuran kemudian ditunggu 15 menit lalu diberi penambahan media DMEM sebanyak 300 μ l, inkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Ditambah ekstrak etanol daun sirih merah sesuai dengan konsentrasi IC₅₀ dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Medium dibuang lalu *coverslip* dicuci dengan PBS secukupnya kemudian *coverslip* diambil dari dalam sumuran dan difiksasi dengan metanol masing-masing 300 μ l selama 10 menit. Metanol dibuang, kemudian dicuci dengan PBS 500 μ l sebanyak dua kali selama 2 menit, PBS dibuang kemudian dicuci dengan aquadest 500 μ l sebanyak dua kali selama 2 menit. Aquadest dibuang kemudian menambahkan larutan hidrogen peroksida sebanyak 300 μ l selama 10 menit, hidrogen peroksida dibuang kemudian dicuci kembali dengan PBS sebanyak dua kali sebanyak 500 μ l selama 2 menit, kemudian PBS dibuang. Selanjutnya *coverslip* ditambah 100 μ l *blocking serume* selama 10 menit RT.

Coverslip lalu diberi penambahan antibody primer caspase-3 sebanyak 100 µl lalu didiamkan selama satu jam pada suhu kamar. Hasil inkubasi dengan antibody caspase-3 dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 2 menit sebanyak 500 µl, lalu diberikan antibody sekunder sebanyak 100 µl selama 20 menit RT (Trekkte Link). *Coverslip* dicuci menggunakan PBS sebanyak dua kali selama 2 menit sebanyak 500 µl. Kemudian diberikan 100 µl label selama 10 menit RT (Streptavidin-HRP), dicuci dengan PBS sebanyak dua kali selama 2 menit sebanyak 500 µl. *Coverslip* selanjutnya diberi penambahan DAB sebanyak 100 µl dan ditunggu hingga 2 menit, setelah itu DAB dibuang dan dicuci dengan aquadest 500 µl sebanyak dua kali selama 2 menit setelah itu aquadest dibuang. *Coverslip* direndam dalam Mayer-hematoksilin selama 5 menit sebanyak 100 µl setelah itu cairan dibuang. Lakukan pencucian dengan aquadest hingga bersih (warna biru hilang) dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan alkohol 95 % dan penjernihan dengan *xylol*. Setelah kering *coverslip* ditutup dengan kaca penutup menggunakan perekat (*mounting media*) dan diamati dengan mikroskop cahaya untuk melihat ekspresi caspase-3 (Widyaningsih *et al* 2014).

E. Analisa Data

1. Uji sitotoksik

Dari hasil uji sitotoksik yang berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{(\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

Dilanjutkan analisis untuk menentukan regresi linear antara log konsentrasi sampel uji (ekstrak etanol daun sirih merah) *versus* persen sel hidup menggunakan *Microsoft Excel* 2010, hingga akan didapatkan persamaan:

$$Y = a + bx$$

Keterangan :

X : log konsentrasi sampel uji

Y : persen viabilitas sel

Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan nilai IC₅₀.

2. Indeks selektivitas

Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan di bawah ini :

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Sel vero}}{\text{IC}_{50} \text{ Sel Kanker}}$$

3. Uji Imunositokimia

Ekspresi protein diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat, sedangkan yang tidak berekspresi memberikan warna ungu. Data yang diperoleh dilakukan perhitungan persentase sel yang terekspresi dengan persamaan di bawah ini :

$$\% \text{ Ekspresi sel} = \frac{\text{Jumlah sel terekspresi}}{\text{Jumlah total sel}} \times 100 \%$$