

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 1. Determinasi dan Identifikasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Morfologi Tumbuhan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Berdasarkan hasil determinasi tanaman bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). Deskripsi lengkap dari tanaman sirih merah dapat dilihat pada lampiran 2.

#### 2. Pengmpulan simplisia, pengeringan simplisia, dan pembuatan ekstrak

Tanaman daun sirih merah yang digunakan, disortir terlebih dahulu. Daun yang diambil untuk penelitian diusahakan yang bagus, segar, tidak cacat, dan tidak mengalami pembusukan. Daun kemudian dicuci berulang-ulang dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun, berat daun segar yang diperoleh adalah 8000 g (8 kg). Daun sirih yang bersih dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C hingga kering, sehingga kadar air dalam daun sirih merah dapat berkurang untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Daun kering yang diperoleh adalah 3400 g (3,4 kg). Data rendemen berat daun sirih merah kering terhadap daun sirih merah basah dapat dilihat pada tabel 1 dan perhitungan lengkap rendemen daun kering dapat dilihat pada lampiran 4.

**Tabel 1. Rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah**

<b>Berat basah (g)</b>	<b>Berat kering (g)</b>	<b>Rendemen (%)</b>	<b>LOD (%)</b>
8000	3400	42,5	57,5

Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan, memperluas permukaan partikel sehingga dapat memaksimalkan proses ekstraksi karena dengan permukaan partikel yang luas dapat meningkatkan kontak antara pelarut dan serbuk. Pada tahap ini, juga dilakukan pemeriksaan secara organoleptis terhadap serbuk daun sirih merah.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk daun sirih merah

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Serbuk halus
Warna	Hijau kecokelatan
Bau	Khas daun sirih
Rasa	Pahit sepat

### 3. Hasil penetapan kandungan lembab pada serbuk daun sirih merah

Serbuk daun sirih merah ditimbang sebanyak 2 g, kemudian kandungan lembab diukur dengan menggunakan *moisture balance*. Penetapan kandungan lembab daun sirih merah dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Hasil penetapan kandungan lembab serbuk daun sirih merah dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

Tabel 3. Hasil penetapan kandungan lembab daun sirih merah

Berat awal (g)	Kandungan lembab serbuk (%)
2	7,24
2	7,47
2	7,39
Rata-rata $\pm$ SD	7,37 $\pm$ 0,116

Berdasarkan tabel 3, rata-rata kandungan lembab serbuk daun sirih merah sebesar 7,37 %. Konsentrasi tersebut telah dapat mengurangi potensi pembusukan simplisia.

### 4. Pembuatan ekstrak etanol 70% daun sirih merah

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah menggunakan metode maserasi yang dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi. Serbuk daun sirih merah yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol sebanyak 500 g. Metode maserasi dipilih sebagai metode pembuatan ekstrak karena mudah dalam pengerjaannya, selain itu alat yang digunakan relatif lebih sederhana dan murah. Metode ini cocok digunakan untuk senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan, wadah maserasi yang digunakan berkaca gelap untuk menghindari dari sinar matahari langsung. Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam keadaan tertutup agar etanol tidak menguap pada suhu kamar.

Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%, dengan menggunakan pelarut etanol dalam proses maserasi ini diharapkan dapat menarik sebagian besar

senyawa aktif dalam simplisia daun sirih merah. Hal ini dikarenakan pelarut etanol mampu melarutkan zat aktif seperti alkaloid, flavanoid, dan steroid. Selain itu, etanol sebagai penyari lebih selektif dari pada air, diabsorpsi dengan baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, memperbaiki stabilitas bahan aktif, dan tidak memerlukan suhu tinggi untuk pemekatan (Pratiwi 2014). Hasil ekstraksi berwarna hijau pekat, hal ini karena etanol juga menyari senyawa klorofil yang ada di dalam daun sirih merah selain zat aktifnya.

Penguapan pelarut dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Prinsip dari *rotary evaporator* adalah penguapan dengan tekanan sehingga dapat terjadi penguapan dibawah titik didih, suhu yang digunakan saat penguapan adalah 50°C. Penguapan menggunakan suhu yang stabil tersebut bertujuan untuk tetap menjaga stabilitas senyawa aktif dari proses pemanasan yang dilakukan dalam jangka waktu yang lama. Ekstrak kental ditampung di gelas kaca kemudian dikeringkan lebih lanjut di dalam oven untuk memperoleh ekstrak kental dengan bobot konstan. Data rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel 4 dan hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun sirih merah**

<b>Berat serbuk (g)</b>	<b>Berat ekstrak (g)</b>	<b>Rendemen (%)</b>
500	75	15

**Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol daun sirih merah**

<b>Organoleptis</b>	<b>Hasil</b>
Bentuk	Kental
Warna	Coklat
Bau	Khas daun sirih

## 5. Uji kadar air

Ekstrak etanol daun sirih merah dilakukan uji kadar air bertujuan untuk menjamin tidak adanya kontaminasi bakteri dan jamur pada ekstrak, karena pelarut yang digunakan adalah etanol 70 % dimana kandungan air pada pelarut tersebut sebesar 30 % sehingga ekstrak yang sudah melalui proses pemekatan di dalam oven hingga didapatkan bobot konstan perlu dilakukan pengecekan kadar air pada ekstrak tersebut untuk mencegah penurunan kualitas ekstrak akibat

pertumbuhan jamur dan bakteri. Pada pengujian kadar air ekstrak digunakan metode *Sterling Bidwell* karena prosesnya relatif cepat dan data yang dihasilkan akurat, sedangkan kelemahan metode ini adalah penggunaan alat yang rumit sehingga dibutuhkan operator yang terampil. Hasil kadar air ekstrak daun sirih merah dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

**Tabel 6. Hasil kadar air ekstrak daun sirih merah**

Berat awal (g)	Kadar air (%)
6	8,3
6	5,0
6	6,7
<b>Rata-rata <math>\pm</math> SD</b>	<b>6,7 <math>\pm</math> 1,650</b>

## 6. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol daun sirih merah

Identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun sirih merah dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna, terjadinya buih atau endapan yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa di dalam ekstrak. Identifikasi dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan pereaksi yang sesuai dan diamati perubahannya. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel 7.

**Tabel 7. Hasil identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun sirih merah**

Senyawa	Hasil identifikasi	Pustaka	Kesimpulan
Flavonoid	Merah kecokelatan	Merah, jingga, ungu	Positif
Alkaloid	Cokelat	Mayer (endapan putih)	Negatif
	Cokelat	Wagner (Cokelat kemerahan)	Positif
	Kuning kecokelatan	Dragendorff (Jingga)	Positif
Tanin	Biru hitam	Biru, biru hitam, hijau	Positif
Saponin	Busa	Busa 1-10 cm (>10 menit)	Positif
Terpenoid	Terbentuk cincin coklat	Cincin coklat/ungu	Positif
Steroid	Hijau	Hijau/Biru	Positif

(Widiastuti 2014) ; (Minarno 2015) ; (Triputra 2016)

## 7. Uji sitotoksik ekstrak daun sirih merah dengan metode MTT assay

Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel kanker hati HepG2 di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Sel HepG2 dikultur dalam media DMEM dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C. Kultur sel adalah teknik yang digunakan untuk mengembangkan sel di luar tubuh atau secara *in vitro*. Keuntungan pengkulturan sel adalah lingkungan tempat

hidup sel dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan. Kelemahan teknik ini adalah sel yang dikultur dapat mengalami perubahan sifat karena perkembangbiakan sel di dalam tubuh (*in vivo*) bekerja secara terintegrasi dalam suatu jaringan, sedangkan dalam kultur sel terpisah-pisah. Kondisi lingkungan kultur harus dibuat semirip mungkin dengan lingkungan di dalam tubuh supaya sel tumbuh dengan baik.

Media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) merupakan media penumbuh yang optimal untuk menumbuhkan sel kanker HepG2 untuk jangka waktu yang pendek. Media tersebut mengandung konsentrasi asam amino yang tinggi, vitamin, serta glukosa. Media ini cocok digunakan untuk sel dengan kecepatan pertumbuhan yang cepat seperti sel HepG2, HaCat, HuCCT-1, sel line kanker pankreas (HPAF-II, HPAC), sel B92, dll. Media ini mengandung FBS 10 %, Penisillin-Streptomisin 1%, dan Fungizon (Amphotericin B) dimana kandungan FBS (*Fetal Bovine Serum*) di dalam media ini sebagai suplemen peningkat pertumbuhan yang efektif untuk sel kanker karena kompleksitas dan banyaknya faktor pertumbuhan dan nutrisi yang dikandungnya, streptomisin bekerja untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang dapat mengkontaminasi media penumbuh sehingga media dapat spesifik hanya menumbuhkan sel kanker serta kandungan fungizon untuk mencegah tumbuhnya jamur dan kapang yang juga dapat mengkontaminasi media penumbuh sel kanker (Syahidah & Hadisaputri 2016).

Sebelum dilakukan *treatment* ekstrak, dilakukan preparasi terhadap kultur sel. Sel kanker HepG2 ditumbuhkan hingga konfluen dalam media DMEM, jumlah sel yang telah konfluen terlihat menempel rapat di dasar *plate*. Media kultur sel dibuang untuk memudahkan pemanenan sel, kemudian ditambahkan dengan 5 ml PBS (*Phospat Buffer Saline*) sebanyak dua kali untuk mencuci sel dari sisa media yang masih menempel pada *plate*. Sel yang sudah dicuci kemudian ditambahkan tripsin 0,1 % sebanyak 2 ml untuk melepaskan sel yang menempel pada dasar plate. Morfologi sel HepG2 yang lepas dari dasar plate akan terlihat berbentuk bulat memanjang (Gambar 5)



**Gambar 5. Morfologi sel HepG2 pada perbesaran 400x setelah pemberian tripsin 0,1 %.**

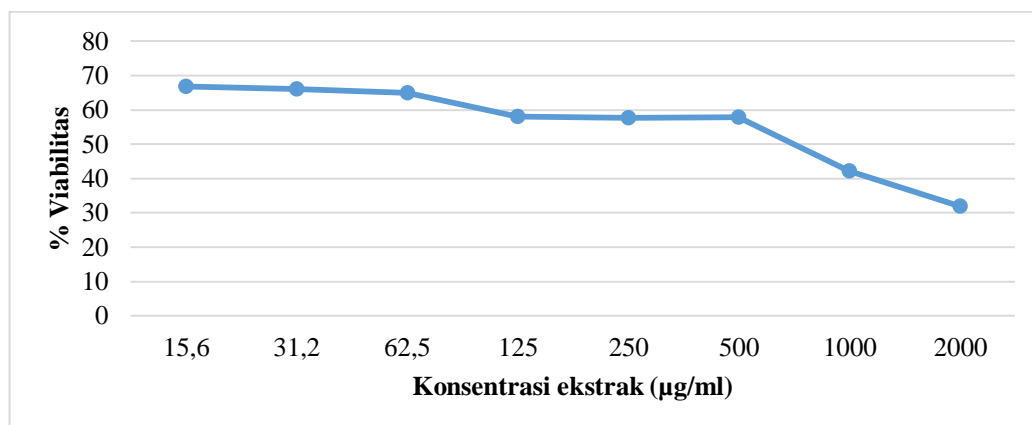
Pemberian tripsin berfungsi sebagai enzim protease yang melepaskan interaksi antara molekul glikoprotein dan proteoglikan dengan permukaan *plate*, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada permukaan *plate* (Triputra 2016).

Pada penelitian ini jumlah sel kanker HepG2 yang hidup dalam suspensi sel stok adalah  $50 \times 10^4$  sel/3000  $\mu$ l. Kemudian dilakukan pengenceran suspensi untuk mendapatkan konsentrasi sel HepG2 sebesar  $10 \times 10^4$  sel/ml dan ditambah media hingga 10 ml agar cukup untuk satu *plate* 96 *well* dimana dalam satu *well* memiliki konsentrasi  $1 \times 10^4$  sel/100  $\mu$ l. Jumlah sel HepG2 tersebut diharapkan dapat bertahan hidup melewati siklus hidupnya dengan baik dalam waktu inkubasi 24 jam. Penentuan waktu inkubasi 24 jam adalah untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan sel untuk bertahan hidup, karena media DMEM akan berfungsi secara maksimal dalam mengkultur sel HepG2 selama 24 jam.

Sebanyak 15 mg ekstrak kental dilarutkan dengan 100  $\mu$ l DMSO dalam ependrof. DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar ekstrak dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (dimetil sulfoksida) digunakan untuk membuat larutan uji sampel karena DMSO telah digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik serta tidak memberikan aktifitas apapun. Larutan tersebut digunakan untuk melarutkan ekstrak dalam pembuatan larutan stok sampel uji, kemudian dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi (2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6)  $\mu$ g/ml. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan konsentrasi sampel uji dengan efek anti proliferasi sel yang dihasilkan. MTT dengan enzim suksinat dihidrogenase pada

mitokondria sel dihentikan dengan penambahan SDS karena reaksi antara enzim tersebut dengan MTT berlangsung secara berkelanjutan sehingga diperlukan reagen *stopper*. Kristal formazan yang terbentuk pada sel yang hidup akan memberikan warna ungu dimana warna tersebut akan semakin bertambah pekat intensitasnya dengan menurunnya konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi tertinggi intensitas warna ungu semakin memudar atau rendah, hal ini menunjukkan sel yang hidup pada konsentrasi 2000  $\mu\text{g/ml}$  sangat sedikit namun pada konsentrasi selanjutnya terjadi peningkatan intensitas warna ungu yang mengindikasikan bahwa dengan semakin menurunnya konsentrasi dari ekstrak etanol daun sirih merah maka efek penghambatan pertumbuhannya terhadap sel kanker juga berkurang.

Kristal formazan ungu yang larut dalam SDS kemudian diukur absorbansinya dan disajikan dalam bentuk grafik % viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (Gambar 6). Berdasarkan grafik tersebut, aktivitas ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan *dose dependent*, yaitu viabilitas sel berkurang seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak.

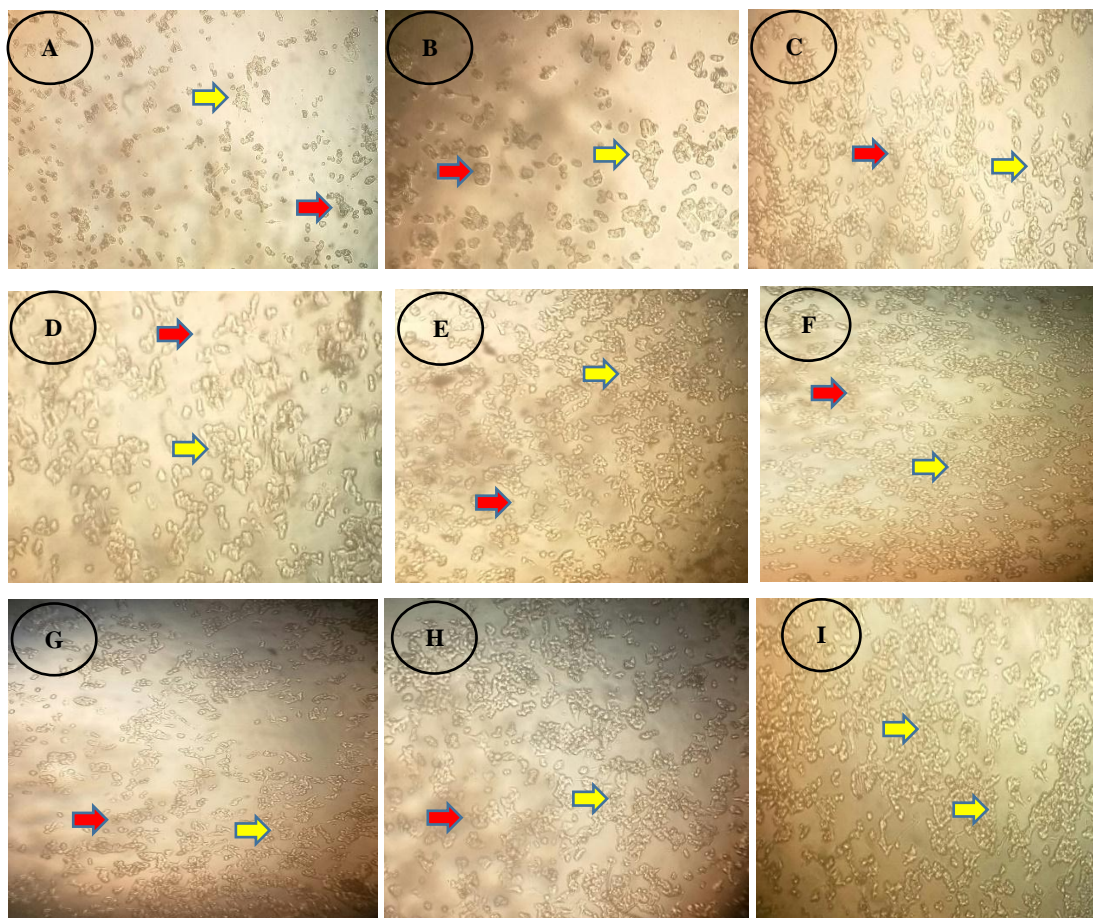


**Gambar 6. Grafik hubungan % viabilitas sel dengan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah**

Penentuan nilai  $\text{IC}_{50}$  pada penelitian ini dilakukan dengan regresi linear pada 8 titik konsentrasi yaitu 2000  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 125  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , 31,2  $\mu\text{g/ml}$ , dan 15,6  $\mu\text{g/ml}$  dengan 3 kali replikasi, sehingga didapatkan persamaan linear untuk replikasi I :  $Y = -15,170x + 89,785$  dengan nilai  $r = 0,904$ ; replikasi II :  $Y = -13,999x + 87,269$  dengan nilai  $r = 0,929$ ; dan replikasi III :  $Y = -18,137x + 98,137$  dengan nilai  $r = 0,947$ . Sedangkan nilai  $\text{IC}_{50}$

kontrol positif sebesar 1,468  $\mu\text{g/ml}$  dengan nilai  $r = 0,980$ . Nilai  $r$  merupakan koefisien korelasi yang menunjukkan linearitas atau tidaknya data absorbansi. Berdasarkan persamaan linear ini didapatkan rata-rata nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanol daun sirih merah sebesar 443,250  $\mu\text{g/ml}$ . Menurut Rollando (2016) ekstrak yang memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  di bawah 100  $\mu\text{g/ml}$  memiliki efek sitotoksik yang poten, dan menurut *American National Cancer Institute* kategori senyawa sitotoksik dibagi menjadi 4 kategori, yaitu kategori sangat toksik jika nilai  $\text{IC}_{50} \leq 20$   $\mu\text{g/ml}$ , kategori moderat atau cukup aktif jika nilai  $\text{IC}_{50}$  masuk dalam range 21-200  $\mu\text{g/ml}$ , kategori lemah jika nilai  $\text{IC}_{50}$  masuk dalam range 201- 500  $\mu\text{g/ml}$ , dan jika nilai  $\text{IC}_{50} \geq 500$   $\mu\text{g/ml}$  termasuk kategori tidak toksik (Hameed *et al* 2012). Oleh karena itu, berdasarkan kriteria tersebut dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah pada penelitian ini menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kurang poten atau lemah terhadap sel kanker HepG2. Nilai  $\text{IC}_{50}$  telah menjelaskan penyebab kematian sel, karena pada penelitian ini juga dilakukan uji imunositokimia untuk melihat pengaruh dari ekstrak etanol daun sirih merah terhadap ekspresi caspase-3 pada jalur apoptosis sel kanker HepG2. Nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanol daun sirih merah yang besar diduga karena berbagai faktor yang mempengaruhinya, seperti kompleksitas senyawa yang terkandung di dalam ekstrak tersebut dapat memungkinkan mempengaruhi aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Kadar rendah pada senyawa flavonoid yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik juga dapat menyebabkan nilai  $\text{IC}_{50}$  pada penelitian ini cukup besar, penurunan kualitas dari senyawa flavonoid pada ekstrak juga mampu dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti lama waktu pemekatan dan penyimpanan yang dapat mempengaruhi stabilitas senyawa pada ekstrak tersebut.





**Gambar 7. Morfologi sel HepG2 pada perbesaran 400x setelah pemberian ekstrak.**

Ket : Ekstrak etanol daun sirih merah (A) 2000 µg/ml, (B) 1000 µg/ml, (C) 500 µg/ml, (D) 250 µg/ml, (E) 125 µg/ml, (F) 62,5 µg/ml, (G) 31,2 µg/ml, (H) 15,6 µg/ml, (I) kontrol sel.

( → sel HepG2 hidup, → sel HepG2 mati)

Pada kondisi ekstrak 2000 µg/ml (gambar 7A), morfologi sel HepG2 yang mati terlihat lebih gelap, kepadatan sel berkurang dan sel terlihat mengambang tidak menempel pada dasar *plate* karena hilangnya ikatan antara glikoprotein dan peptidoglikan pada permukaan *plate* sehingga menyebabkan sel yang mati tidak dapat menempel pada permukaan *plate*, sedangkan pada konsentrasi 15,6 µg/ml (gambar 7H) kepadatan populasi sel mendekati kepadatan kontrol sel yang menandakan viabilitas sel masih tinggi.

## 8. Uji indeks selektivitas ekstrak etanol daun sirih merah

Nilai indeks selektivitas menunjukkan tingkat keamanan atau selektivitas sitotoksik dari ekstrak terhadap sel kanker dan sel normal, yang dihitung dengan membandingkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak terhadap sel normal (sel vero) dan  $IC_{50}$  ekstrak terhadap sel kanker hati (sel HepG2). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol daun sirih merah

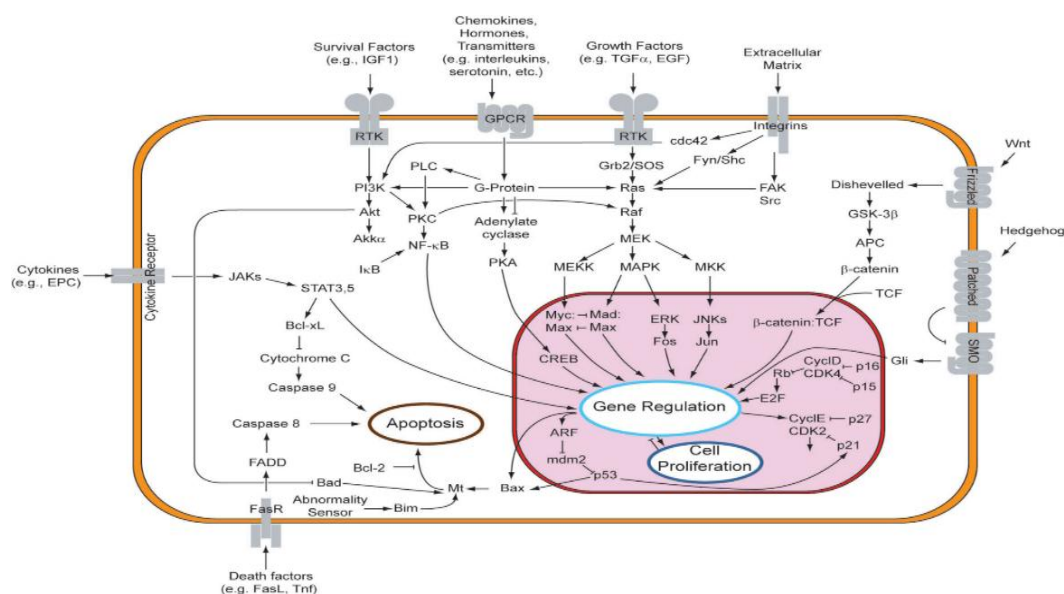
terhadap sel vero adalah 1.472,905  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak terhadap sel HepG2 adalah 443,250  $\mu\text{g/ml}$ . Sehingga diperoleh nilai indeks selektivitas ekstrak sebesar 3,323. Ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang tinggi apabila nilai indeks selektivitasnya  $> 3$  (Sutedjo 2016). Sedangkan pada cisplatin yang memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  pada sel vero sebesar 0,802  $\mu\text{g/ml}$  dan pada sel HepG2 sebesar 1,468  $\mu\text{g/ml}$  sehingga nilai indeks selektivitas yang didapatkan sebesar 0,546. Dari nilai indeks selektivitas tersebut dapat dinyatakan bahwa ekstrak sirih merah memiliki tingkat selektivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel, artinya ekstrak sirih merah tersebut memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker tetapi juga memiliki tingkat keamanan yang tinggi terhadap sel normal.

## 9. Uji imunositokimia ekstrak etanol daun sirih merah

Pada uji imunositokimia ini bertujuan untuk melihat aktivitas ekstrak etanol daun sirih merah terhadap ekspresi salah satu protein pro apoptosis yaitu caspase-3, dimana protein ini memiliki peran penting dalam mekanisme regulasi sel untuk mengontrol program kematian sel.

Jalur apoptosis dapat melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik, pada jalur ekstrinsik dengan melibatkan metabolit sekunder dari ekstrak sirih merah untuk menginduksi *death ligand* untuk berikatan dengan *death receptor* yang disebut TNF (*Tumor necrosis factor*) sehingga memodulasi procaspase-8 yang kemudian membentuk *death-inducing signaling complex* (DISC). Kompleks ini menyebabkan aktivasi caspase-8 yang selanjutnya mampu mengaktifasi caspase-3 (Meutia 2018). Aktivasi caspase-3 juga dapat melalui jalur intrinsik yang melibatkan peran caspase-9, dimana pada jalur ini disebabkan stres oksidatif pada mitokondria akibat dari suatu senyawa kimia atau kehilangan faktor pertumbuhan sehingga menyebabkan gangguan pada mitokondria dan memodulasi keluarnya protein proapoptosis pada mitokondria seperti BAX dan BAK. Kemudian protein tersebut akan menstimulasi keluarnya sitokrom-c dari membran mitokondria lalu mengaktifasi Apaf-1 yang membentuk CARD (*Caspase Recruitment Domain*) lalu beberapa CARD bergabung dan membentuk suatu kompleks yang disebut apoptosom. Kompleks ini memodulasi procaspase-9 dan mengaktifkannya menjadi caspase-9, selanjutnya caspase-9 akan

mengaktivasi caspase-3. Caspase-3 yang teraktivasi akan memecah protein yang melapisi inti sel seperti endonuklease, kemudian merusak benang-benang kromatid pada kromosom sehingga fase mitosis terhenti. Sel akan berhenti mengalami proses proliferasi dan akan mengalami kematian. Protein caspase-3 juga mengaktivasi protein lain p-21 *activated kinase* yang berfungsi untuk membentuk *apoptotic body* yang mampu memberikan sinyal ke sel makrofag untuk melakukan fagositosis (Widyaningsih *et al* 2014). Jalur apoptosis dapat dilihat pada gambar di bawah ini (gambar 8).



**Gambar 8. Jalur apoptosis sel**

Pada pengujian imunositokimia ini dilakukan pengamatan pada tiga konsentrasi ekstrak untuk mengamati tingkat ekspresi caspase-3, konsentrasi pertama yaitu (2000 µg/ml), (1000 µg/ml), dan (500 µg/ml), lalu ditambah dua kontrol yaitu kontrol sel tanpa pemberian antibodi dan kontrol sel dengan pemberian antibodi untuk melihat perbandingan persentase ekspresi caspase-3. Hasil perhitungan ekspresi caspase-3 pada konsentrasi (2000 µg/ml) adalah 83,34 %, konsentrasi (1000 µg/ml) sebesar 61,90 %, dan pada konsentrasi (500 µg/ml) sebesar 43, 52 %. Sedangkan pada kelompok kontrol sel dengan pemberian antibodi memiliki ekspresi dari caspase-3 yang rendah, hal itu menunjukkan pada sel kanker HepG2 terjadi penurunan ekspresi caspase-3 karena adanya hambatan yang diberikan oleh protein antiapoptosis seperti Bcl-2.

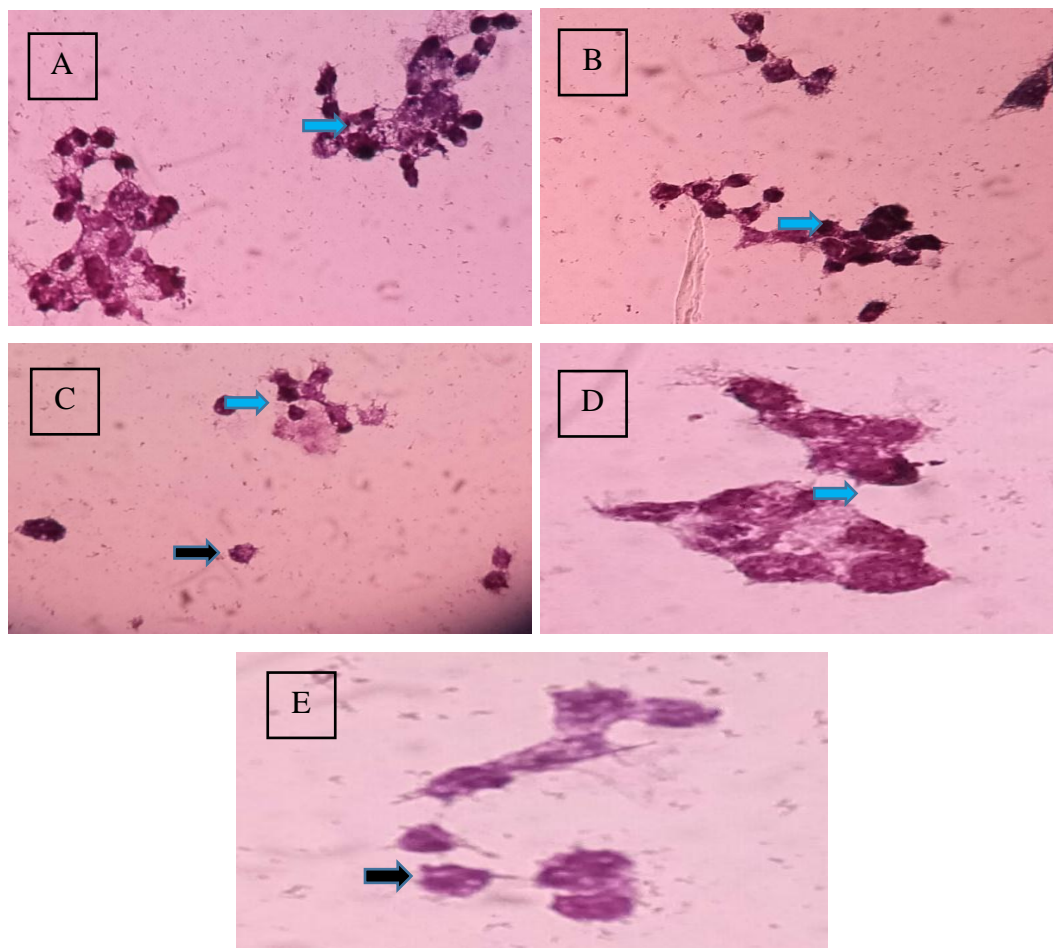
Tabel 8. % Ekspresi Caspase-3

Perlakuan	% Ekspresi caspase-3
(2000 µg/ml)	83,34
(1000 µg/ml)	61,90
(500 µg/ml)	43,52
Kontrol sel dengan antibodi	7,5

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, semakin rendah konsentrasi ekstrak maka jumlah ekspresi caspase-3 juga semakin menurun. Hal tersebut menunjukkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 2000 µg/ml, ekstrak etanol daun sirih merah mampu meningkatkan caspase-3 pada sel kanker sehingga membuat sel tersebut mengalami apoptosis atau kematian sel. Kemampuan ekstrak dalam meningkatkan caspase-3 pada penelitian ini dapat melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dengan meningkatkan death receptor seperti TNF dan Fas-L agar dapat memodulasi caspase-8 melalui pembentukan kompleks DISC (*Death Inducing Signalling Complex*) yang kemudian melakukan aktivasi terhadap caspase-3 atau melalui jalur intrinsik yaitu dengan meningkatkan protein BAX dan BAK yang merupakan protein pengatur keluarnya sitokrom-c pada mitokondria dan menekan protein Bcl-2 sehingga terjadi ikatan antara sitokrom-c, Apaf-1, dan caspase-9 yang membentuk suatu kompleks yang disebut apoptosom yang akan melakukan aktivasi ke caspase-3. Protein caspase-3 yang teraktivasi akan memecah protein pada lapisan inti sel seperti endonuklease, kemudian merusak benang kromatid pada kromosom sehingga fase mitosis terhambat. Sel akan berhenti melakukan proliferasi karena inti sel rusak, dan mengalami kematian sel atau apoptosis sel. Protein caspase-3 juga akan mengaktivasi protein p-21 *activated kinase* yang akan membentuk badan apoptosis pada sel yang mengalami kematian, badan apoptosis ini berfungsi memberi sinyal kepada sel makrofag untuk melakukan fagositosis. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati ekspresi beberapa protein lain yang memodulasi terjadinya apoptosis untuk memastikan jalur apoptosis tersebut (Meutia 2018).

Pada uji imunositokimia, sel yang mengekspresikan protein caspase-3 akan memberikan intensitas warna coklat sedangkan sel yang tidak

mengekspressikan akan memberikan intensitas warna ungu. Hasil mikroskopis imunositokimia caspase-3 pada sel Hepg2 dapat dilihat di bawah ini.



**Gambar 9. Mikroskopis imunositokimia caspase-3 pada sel HepG2.**

Ket : (A)  $IC_{50}$  (2000  $\mu\text{g/ml}$ ), (B)  $\frac{1}{2}IC_{50}$  (1000  $\mu\text{g/ml}$ ), (C)  $\frac{1}{4}IC_{50}$  (500  $\mu\text{g/ml}$ ), (D) Kontrol sel dengan antibodi caspase-3, (E) Kontrol sel tanpa antibodi caspase-3.  
( ➡ Sel yang mengekspresi, ➡ Sel yang tidak mengekspresi).

Warna coklat yang dihasilkan oleh sel yang terekspresi akibat adanya perubahan warna dari reagen DAB oleh antibodi caspase-3 yang diberikan kepada sel kanker, sedangkan warna ungu yang dihasilkan akibat adanya penambahan reagen Haematoxylin sebagai counterstain untuk memudahkan pengamatan terhadap sel yang mengekspresi caspase-3. Sehingga sel yang tidak diberikan antibodi caspase-3 seperti kontrol sel tidak menunjukkan warna coklat karena reagen DAB tidak bereaksi dengan antibodi sehingga sel hanya akan terwarnai oleh reagen haematoxylin yang berwarna ungu (Sukmajaya *et al* 2011).