

## **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 pucuk 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 pucuk merah yang cukup tua dan berwarna hijau dengan 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 pucuk merah.

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

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

##### **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 terkendali.

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 etanol daun pucuk merah yang ditambahkan pada biakan sel kanker hati HepG2.

Variabel tergantung dari penelitian ini yaitu aktivitas sitotoksik yang ditunjukkan dengan persen kematian sel HepG2 oleh ekstrak etanol daun pucuk merah.

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 pucuk merah adalah bagian daun hijau dari tanaman pucuk merah yang diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu.

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

Ketiga,  $IC_{50}$  adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi efektif ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ ) yang mampu menghambat proses pertumbuhan sel kanker sebesar 50%.

Keempat, sel kanker hati HepG2 yang digunakan adalah *continuous cell line* koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta yang 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 ekstrak daun pucuk merah terhadap sel Vero sebagai sel normal.

Keenam, sel Vero adalah sel monolayer berbentuk poligonal dan pipih yang diisolasi dari sel ginjal monyet hijau Afrika.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan adalah serbuk kering daun hijau tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) dan untuk ekstraksi menggunakan etanol 70%.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah toluene, ammonia, kloroform,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, bubuk Mg,  $\text{FeCl}_3$ , pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, metanol, HCl pekat, aquadest, asam asetat anhidrat, butanol, etil asetat, asam galat, dan Liebermann-Burchard.

Bahan untuk uji sitotoksik adalah sel kanker hati HepG2, sel Vero, *cell line*; media stok: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), media 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 (Amphoteterisin 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 Dodecyl Sulphat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*).

## 2. Alat

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

Alat uji sitotoksik meliputi autoklaf, inkubator 37°C aliran  $\text{CO}_2$  5% model 6200 (Napco), *laminar air flow class II* (Labconco), tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), spektrokolorimeter pada alat ELISA reader (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), *tissue culture flask* (Nuncclone), tabung *conical* steril (Nuncclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), *microplate* 96 well (Nuncclone), mikropipet 20-200  $\mu\text{L}$  dan 200-1000  $\mu\text{L}$  (Pipetman), mesin vortex, *inverted microscope* (Axiovert-25), *counting*, *magnetic stirrer*, dan kamera digital.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi tanaman pucuk 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 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

## 2. Persiapan bahan uji

Bahan uji yang digunakan yaitu ekstrak daun pucuk merah dengan uraian sebagai berikut:

### 2.1 Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk.

Tanaman pucuk merah diperoleh dari daerah Tawangmangu, Karanganyar. Daun pucuk merah yang akan digunakan adalah daun hijau yang segar, utuh, dan bebas dari penyakit. Daun dibersihkan dan dicuci dengan air bersih. Daun pucuk 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 pucuk 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 (Depkes RI 1985).

**2.2 Penetapan susut pengeringan.** Penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah dilakukan dengan cara serbuk ditimbang sebanyak 2 gram. Serbuk dimasukkan dalam alat *moisture balance* O'Haus MB23 pada suhu 105°C, lalu dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Susut pengeringan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 12%. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta (Depkes RI 2000).

**2.3 Pembuatan ekstrak etanol.** Serbuk daun pucuk merah yang sudah diayak lalu ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan dalam wadah gelap ditambah dengan etanol 70% sebanyak 5000 ml. Wadah ditutup sambil sesekali diaduk tiap 30 menit selama 6 jam. Setelah 6 jam kemudian wadah didiamkan dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari selama 18 jam. Ekstrak disaring menggunakan kain flanel dan ampas kemudian dilakukan remaserasi dengan 2500 ml pelarut etanol 70% dengan perlakuan yang sama seperti pada proses maserasi. Setelah 24 jam saring ekstrak dan kedua hasil maserat ditampung

dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan uapkan pada oven dengan suhu 55°C sampai dihasilkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan pemeriksaan organoleptis terhadap ekstrak (Depkes RI 2000).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot serbuk awal yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

**2.4 Uji kadar air ekstrak.** Uji ini menggunakan metode destilasi *Bidwell-Sterling*, yaitu sebanyak 10 gram ekstrak dimasukkan kedalam labu didih dan ditambah 200 mL toluen yang sudah dijenuhkan dengan aquadest. Proses destilasi dilakukan selama 3 jam atau hingga air yang dihasilkan tidak bertambah lagi. Setelah selesai proses destilasi, jumlah air yang dihasilkan dapat diketahui dengan menentukan volume air pada tabung perangkap. Kadar air dihitung berdasarkan volume air yang dihasilkan lalu dikalikan massa jenis air dan dibagi dengan berat sampel yang dianalisis (volume/berat) (Depkes RI 2000).

$$\% \text{ kadar air ekstrak} = \frac{(\text{Volume air yang dihasilkan} \times \text{massa jenis air})}{(\text{Berat sampel})} \times 100\%$$

### 3. Uji fitokimia

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

**3.1 Identifikasi flavonoid.** Sebanyak 2 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan metanol panas. Selanjutnya ditambah bubuk Mg secukupnya dan 4-5 tetes HCl pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) dalam waktu 3 menit (Sangi *et al.* 2008).

**3.2 Identifikasi alkaloid.** Sebanyak 2 mg ekstrak dibasakan dengan amonia 10% dan disari dengan kloroform. Kemudian ditambahkan asam sulfat 2N sebanyak 10 tetes. Filtrat dikocok dengan teratur kemudian dibiarkan beberapa lama sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi dan masing-masing dianalisis dengan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Wagner. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan

putih, dengan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah jingga dan dengan pereaksi Wagner terbentuk endapan coklat (Sangi *et al.* 2008).

**3.3 Identifikasi tanin.** Ekstrak dilarutkan dengan etanol dan sebanyak 1 ml dipindahkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, biru tua, biru kehitaman atau hijau kehitaman (Sangi *et al.* 2008).

**3.4 Identifikasi saponin.** Sebanyak 2 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah aquadest sampai terendam seluruhnya, dididihkan selama 2-3 menit, dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil (Sangi *et al.* 2008).

**3.5 Identifikasi steroid.** Sebanyak 2 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 1 ml kloroform dan ditambah 1 ml asam asetat anhidrat. Adanya steroid ditunjukkan dengan adanya warna hijau kebiruan (Sangi *et al.* 2008).

**3.6 Identifikasi terpenoid.** Sebanyak 2 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 1 ml kloroform. Ekstrak didiamkan selama kira-kira 15 menit dan ditambah 1-2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan munculnya cincin berwarna kecoklatan pada perbatasan larutan (Sangi *et al.* 2008).

#### 4. Uji sitotoksik

**4.1. 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  $121^\circ\text{C}$  (CCRC 2013).

**4.2. Pembuatan media stok (M199) dan media penumbuh sel Vero.** Sebanyak 9,5 gram media M199, 2,2 gram  $\text{NaHCO}_3$ , dan 2 gram HEPES dimasukkan ke dalam *beaker glass* 1 L. Ditambahkan 800 ml *aquabidest* dan dihomogenkan menggunakan *stirrer* sampai larut. Ditambahkan larutan dapar (1 N NaOH atau 1 N HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambahkan *aquabidest* hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan

penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22  $\mu\text{m}$  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 (CCRC 2013).

#### **4.3. Pembuatan media stok (DMEM) dan media penumbuh HepG2.**

Sebanyak 10,4 gram serbuk media DMEM dilarutkan dengan *aquabidest* kurang lebih 800 ml dalam *beaker glass* 1 L, masukkan 2,2 gram  $\text{NaHCO}_3$  dan 2 gram HEPES. Larutan tersebut diaduk dengan *stirrer* sampai larut. Ditambahkan larutan dapar (1 N NaOH atau 1 N HCl) untuk menjaga pH larutan antara 7,2-7,4. Ditambah lagi *aquabidest* hingga volume larutan menjadi 1 L dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan filter polietilen sulfon 0,22  $\mu\text{m}$  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 (CCRC 2013).

**4.4. Pembuatan larutan uji.** Sebanyak 10 mg ekstrak uji ditimbang selanjutnya dilarutkan dengan 100  $\mu\text{l}$  DMSO dalam eppendorf, kemudian disimpan sebagai larutan stok untuk digunakan dalam pengujian. Pembuatan larutan stok maupun seri kadar larutan untuk perlakuan dilakukan secara aseptis di dalam LAF. Untuk membuat larutan stok kemudian dipipet 10  $\mu\text{l}$  kemudian ditambah 90  $\mu\text{l}$  media kultur sehingga konsentrasi akhir 100.000  $\mu\text{g/ml}$ , selanjutnya dibuat dalam variasi konsentrasi untuk sampel ekstrak uji (CCRC 2013).

### **5. Preparasi sel**

**5.1 Pengaktifan sel HepG2.** Sel HepG2 yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian siapkan 3 ml media DMEM pada *conical tube*. Semprot *conical tube* dan tangan dengan etanol 70% lalu di dalam LAF diambil suspensi sel dan dimasukkan tetes

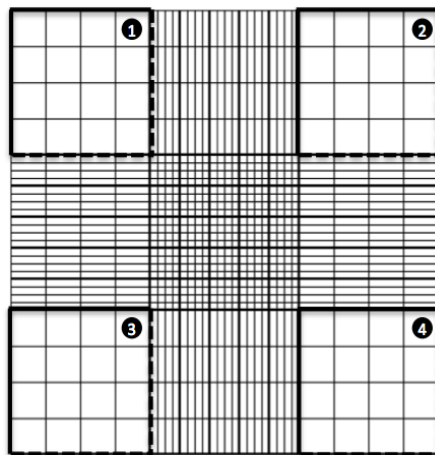
demii tetes sebanyak 1000 µl ke dalam media DMEM yang telah disiapkan. Tutup *conical tube* dengan rapat dan sentrifugasi pada 1200 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan media DMEM dan diresuspensi hingga homogen. Dipindahkan ke dalam wadah *flask* atau *petridish culture* dan ditambahkan media penumbuh DMEM sebanyak 5 ml. Amati dengan *inverted microscope* untuk memastikan sel homogen pada seluruh permukaan *flask* dan tidak menggerombol pada bagian tertentu. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 24 jam atau sampai sel tumbuh hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian (CCRC 2013).

**5.2 Pengaktifan sel Vero.** Sel Vero yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 37°C) kemudian siapkan 3 ml media M199 pada *conical tube*. Semprot *conical tube* dan tangan dengan etanol 70% lalu di dalam LAF diambil suspensi sel dan dimasukkan tetes demi tetes sebanyak 1000 µl ke dalam media M199 yang telah disiapkan. Tutup *conical tube* dengan rapat dan sentrifugasi pada 1200 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan media M199 dan diresuspensi hingga homogen. Dipindahkan ke dalam wadah *flask* atau *petridish culture* dan ditambahkan media penumbuh M199 sebanyak 5 ml. Amati dengan *inverted microscope* untuk memastikan sel homogen pada seluruh permukaan *flask* dan tidak menggerombol pada bagian tertentu. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 24 jam atau sampai sel tumbuh hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian (CCRC 2013).

**5.3 Panen dan perhitungan sel.** Media dalam *flask* dibuang menggunakan mikropipet lalu dicuci dengan PBS (*phosphat buffer saline*) sebanyak 2 kali. Kemudian ditambah 1 ml tripsin. Inkubasi selama 3-5 menit, lalu ditambah media penumbuh sebanyak 5 ml untuk menghentikan kerja tripsin. Amati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan *inverted microscope* lalu sel dipipet masuk ke *conical* steril. Terakhir ditambahkan media sampai 10 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml media dan diresuspensikan. Diambil 10 µl dan dipipetkan ke



hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah *inverted microscope* atau mikroskop terbalik dengan *counter* atau alat hitung.



**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 (CCRC 2013) :

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

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

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$$

Diambil volume panen sel, ditransfer ke *conical* baru dan ditambahkan 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  $1 \times 10^4$  sel/*well*. Sel didistribusikan ke dalam *microplate* 96 *well*, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% (37°C) selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai sel siap untuk diberi perlakuan ekstrak etanol daun pucuk merah.

**5.4 Pemberian ekstrak dan MTT** Sumuran-sumuran yang berisi suspensi sel tersebut ditambahkan 100 µl larutan uji yaitu masing-masing ekstrak etanol daun pucuk merah yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga

diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6)  $\mu\text{g/ml}$  tiap *well*. 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), sebagai kontrol positif digunakan sel dengan penambahan cisplatin. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Akhir inkubasi medium masing-masing *well* dibuang dengan cara *plate* dibalikkan  $180^\circ\text{C}$  di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Dicuci dengan PBS sampai tidak berwarna. Kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu dan untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalaman pada suhu kamar, kemudian sel dikocok dengan *shaker* selama 10 menit. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm (CCRC 2013).

## 6. Uji Indeks Selektivitas

Sel Vero ditanam pada microplate dengan konsentrasi  $1 \times 10^4$  sel/100  $\mu\text{l/well}$  dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium dibuang kemudian ditambahkan ekstrak pada konsentrasi (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6)  $\mu\text{g/ml}$  tiap *well* dengan cosolvent DMSO dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing *well*, ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  media kultur M199 dan 10  $\mu\text{l}$  MTT. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . 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).

## E. Analisa Data

### 1. Ekstraksi

Menghitung rendemen daun pucuk merah diperoleh dari berat ekstrak pucuk merah yang dihasilkan dibagi dengan berat serbuk daun pucuk merah yang digunakan.

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat serbuk daun}} \times 100\%$$

### 2. Uji sitotoksik

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

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

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

$$Y = a + bx$$

Keterangan :

X : konsentrasi sampel uji

Y : persen viabilitas sel

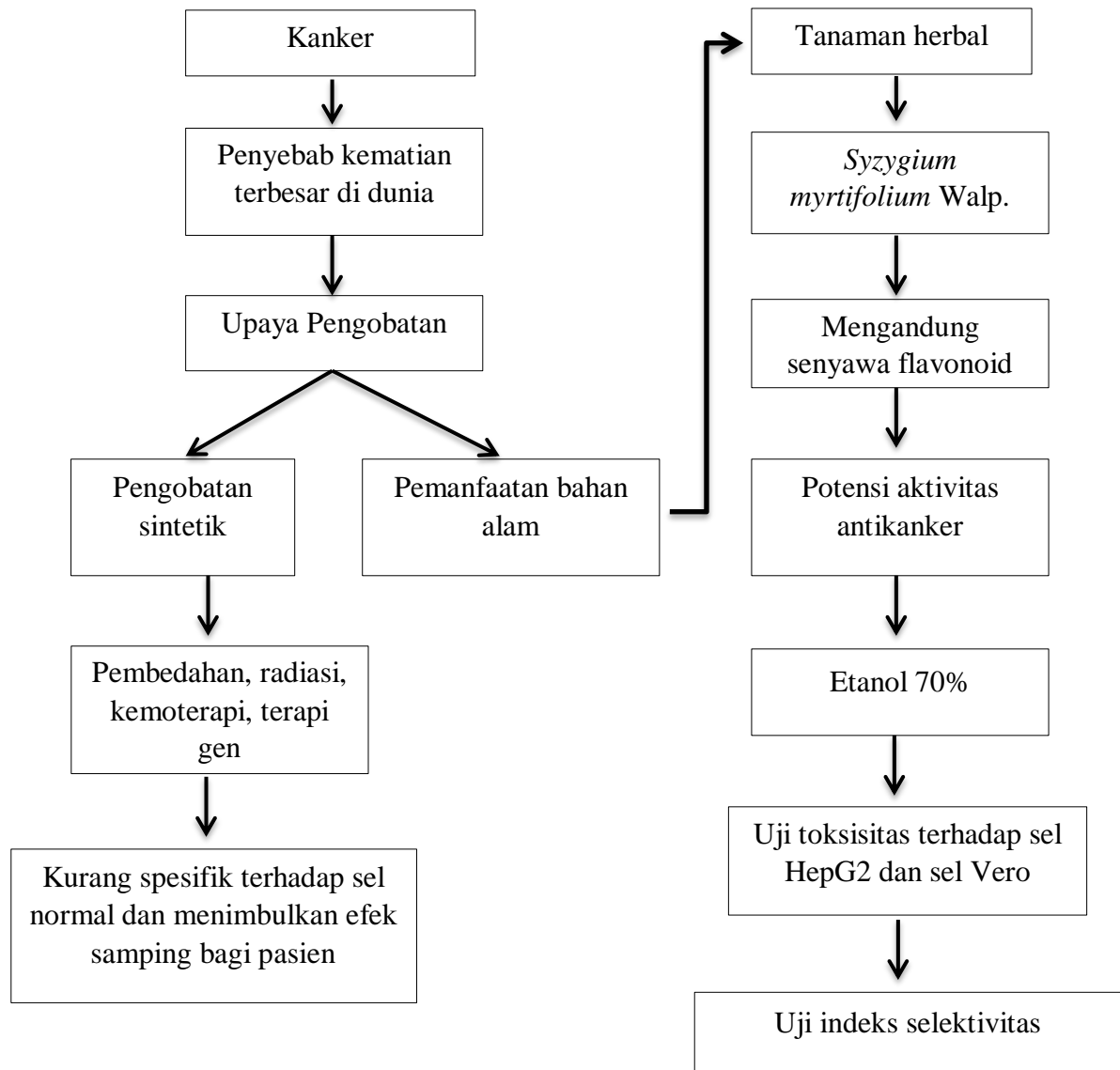
Hasil x dari persamaan di atas, merupakan nilai IC<sub>50</sub>.

### 3. Indeks selektivitas

Indeks selektivitas dihitung menggunakan persamaan dibawah ini :

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Sel Vero}}{\text{IC}_{50} \text{ Sel kanker}}$$

## F. Kerangka Pikir



Gambar 5. Diagram kerangka pikir penelitian