

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*True Experimental Designs*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vitro* dengan memakai rancangan percobaan *Randomized Group Post Test Only Design*. Subjek dipilih secara acak untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan. Hal ini disebabkan sel HeLa, tempat percobaan, dan bahan yang digunakan bisa dikatakan homogen sehingga setiap anggota populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk diambil sebagai sampel. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak putri malu (*Mimosa Pudica*) terhadap apoptosis sel HeLa.

4.1.1 Rancangan Sampel Acak Sederhana (Simple Random Sampling)

Setiap bagian dari populasi memiliki kesempatan untuk diseleksi sebagai sampel, maka pengambilan sampel dapat dilakukan secara acak sederhana. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana dipilih karena anggota populasi dianggap homogen. Subyek yang terpilih masing-masing akan dimasukkan ke dalam empat kelompok yang terdiri dari:

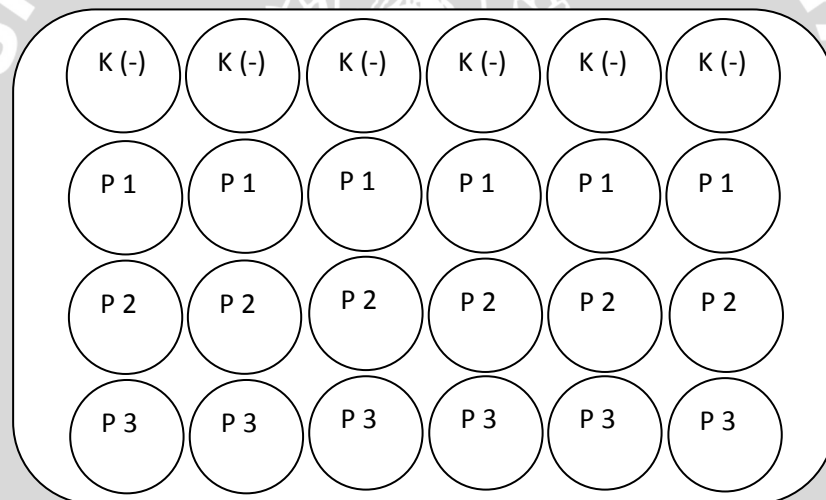
Kelompok I : sel HeLa yang tidak diberikan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai kontrol negatif.

Kelompok II : sel HeLa yang diberikan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai kelompok perlakuan dosis I (200 mg/ml).

Kelompok II : sel HeLa yang diberikan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai kelompok perlakuan dosis II (400 mg/ml).

Kelompok IV : sel HeLa yang diberikan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai kelompok perlakuan dosis III (800 mg/ml).

Peta 24 well plate



4.2 Subjek dan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HeLa, *cell line* kanker leher rahim yang dikultur. Sel HeLa diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya, Malang.

Penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana menurut rumus Federer :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

dimana : t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlahnya replikasi / pengulangan

Pada penelitian ini $t = 4$ sehingga jumlah pengulangan adalah :

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15 : 3$$

$$r = 5 + 1 = 6$$

Hasil penghitungan sampel menunjukkan jumlah pengulangan sebanyak 6, sehingga besar kelompok sampel total yang diperlukan untuk penelitian ini adalah $4 \times 6 = 24$ kelompok sel HeLa.

4.3 Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam kelompok ini dibagi menjadi 3 variabel, yaitu :

a. Variabel bebas

Ekstrak tanaman putri malu dengan variasi dosis. Dosis yang diberikan berdasarkan deret ukur, yaitu deret yang perubahan sukunya berdasarkan perkalian terhadap sebuah bilangan tertentu untuk mendapatkan dosis efektifitas ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) pada sel kanker serviks (sel HeLa). Dosis yang diberikan dimulai dari 200 mg/ml, 400 mg/ml dan 800mg/ml.

b. Variabel terikat

Jumlah sel HeLa

4.3.2 Definisi Operasional

1. Serbuk daun putri malu (*Mimosa pudica*) diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur. Daun putri malu (*Mimosa pudica*) ditanam di daerah Batu, pada ketinggian terletak pada ketinggian ± 875 D.P.L

dan daun dipetik pada segala usia. Selanjutnya serbuk daun putri malu ini diekstrak dengan pelarut etanol dengan metode maserasi.

2. TUNEL (*Terminal deoxybucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*) merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis berdasarkan terjadinya fragmentasi DNA.
3. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram. Sel yang mati ini merupakan respon terhadap berbagai macam stimulus. Apoptosis sel ditandai dengan sel berwarna coklat.
4. Indeks apoptosis dihitung dengan melihat jumlah sel apoptosis.

Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak. Sel apoptosis mempunyai tanda-tanda kondensasi dan fragmentasi inti dan dikelilingi oleh halo, dapat dilabel dengan Tunel, yang akan mengekspresikan warna coklat pada inti sel. Jumlah sel apoptosis yang terekspresi positif dilakukan penghitungan :

Indeks apoptosis, dihitung dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari 1000 sel tumor dari 10 lapangan pandang dengan pembesaran 400X, kemudian dinilai index apoptosis dengan rumus:

$$\text{Index apoptosis (IA)} = (\text{sel apoptosis/total sel}) \times 100\%.$$

Index apoptosis bernilai bermakna apabila lebih dari 50%.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari-April tahun 2012, di Laboratorium Biomedik dan Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Peralatan dan Bahan Kultur Sel HeLa

Alat dan bahan yang digunakan untuk kultur sel HeLa adalah mikropipet 1 ml, botol duran 100 l, stiker label, pipet pasteur, inkubator, *dish*, *conical tube*, lampu spiritus, mikroskop cahaya, *hemacytometer*, mikropipet 20 μ l, counter, Penisilin-streptomisin 1%, FBS (Fetal bovine serum) *qualified* 10%, RPMI, Tripsin-EDT dan PBS.

4.5.2 Peralatan dan Bahan Pembuatan Ekstrak Tanaman Putri Malu

(*Mimosa pudica*)

Alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah : Wadah maserat, Rotary Evaporator, botol kaca, Saringan, Bejana stainless steel. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah : 500 gram simplisia *Mimosa pudica*, dan Etanol 1500 ml (Sharma, 2010).

4.5.3 Peralatan dan Bahan Uji Fitokimia Kualitatif Ekstrak Daun Putri Malu

(*Mimosa pudica*)

Bahan dan alat untuk uji fitokimia adalah asam sulfat pekat, NaCl, HCl 2 N, alkohol, aquades, pereaksi Meyer, gelatin dan FeCl₃ 5%. Alat yang digunakan antara lain cawan porselen, corong gelas, tabung reaksi, rak tabung, penjepit kayu, timbangan digital, pipet tetes, batang pengaduk, hot plate, kertas saring, beaker glass, api bunsen dan erlenmeyer.

4.5.4 Peralatan dan Bahan Tunnel Assay

Permanox chamber slide, mikroskop cahaya, humidified chamber, 200nm staurosporine, 10 μ M cycloheximide, 4% paraformaldehida, PBS,

0,1% sodium citrate, 0,1% larutan triton X-100 , dan larutan Vectashield mounting.

4.6 Cara Kerja

4.6.1 Kultur Sel HeLa

a) *Freezing* Sel HeLa

Langkah ini digunakan untuk menyiapkan atau membuat stok sel beku dari sel konfluen pada sel heLa yang disimpan dalam waktu yang lama. Sel harus dapat disimpan ke dalam tabung khusus yang dapat disimpan dalam nitrogen cair (cryotube). Langkah pertama yang dilakukan adalah membuang media pada kultur sel, kemudian sel dibilas dengan serum atau PBS satu kali. Ditambahkan tripsin EDTA 2 ml dan diinkubasi selama 3-5 menit pada suhu 37°C. T-flash diketuk-ketuk untuk mengurangi adherent sel pada permukaan dish agar sel terlepas dan ditambahkan medium komplet 10% yang selanjutnya ditampung di falcon 15 ml. Kemudian, disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet disuspensikan dengan dengan serum FBS 90% dan DMSO 10%. Re-suspend sel dipindahkan ke dalam cryotube maksimal 1,8 ml dan dilakukan pendinginan secara bertahap yaitu -20°C pagi hari, -40°C sepanjang malam dan -120°C sampai sel akan digunakan.

b) Kultur Sel

1. Sel HeLa dikultur pada suhu 37°C dengan Roswell Park Memorial Institute (RPMI) yang mengandung 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 50 µg/ml penicillin dan 50 µg/ml streptomycin.

2. Diinkubasi dalam inkubator suhu 37°C 5% CO₂ selama 24 jam dan diamati sel yang telah menempel di *dish*.
3. Media diganti setiap dua hari sekali. Media diganti dengan cara membuang media lama, lalu dibilas dengan media baru tanpa serum. Kemudian, media dipipetin dan diberi media dengan serum dan disimpan dalam inkubator.

c) Aktivasi dan Pemiakan Sel HeLa

Proses pengaktifan kembali (*thawing*) HeLa cell line dilakukan dengan membuat medium komplit yang terdiri dari RPMI, antibiotik (penicilin dan streptomisin) 1% dan FBS 10%. Kemudian, media difilter pada membran 0,45 dan 0,2 µm. Vial berisi sel yang telah diambil dari tempat penyimpanan (nitrogen cair) dihangatkan dengan cara menggosok-gosokkan vial dengan kedua telapak tangan di suhu ruang, hingga larutan sel menjadi cair dan dipindahkan ke dalam T-flash yang berisi medium komplit. Disentrifuse pada kecepatan 1000 rpm selama 8 menit untuk membersihkan sel dari larutan DMSO. Selanjutnya supernatant dibuang lalu pelet diresuspensikan dengan RPMI dan disentrifuse lagi pada kecepatan 900 rpm selama 10 menit. Suspensi sel kemudian dimasukkan ke dalam T-flask yang telah diisi RPMI berserum lalu dilihat dengan mikroskop kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ suhu 37°C selama 24 jam. Sore harinya, medium diganti dengan medium baru lalu diperiksa dengan mikroskop dan mengamati viabilitas sel. Penggantian medium pada proses *thawing* dilakukan secara berkala sampai sel mengalami pertumbuhan yang baik dan dapat dilakukan subkultur.

d) Subkultur Sel

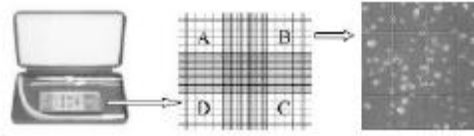
Proses subkultur sel dilakukan dengan cara membuang medium di dalam T-flask, lalu mencuci sel dengan PBS 15 mL sebanyak dua kali pencucian. Kemudian sel ditambahkan trypsin 2 ml dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 3-5 menit lalu sel dilepaskan dari dinding T-flask dengan cara diketuk-ketuk. Selanjutnya tripsin dipipet dan dicuci dengan medium komplit yang terdiri 1 mL RPMI dan 20% FBS berserum ditambahkan ke dalam T-flask. Campuran sel dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge lalu disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Pelet diresuspensikan dengan RPMI berserum 7 mL lalu dimasukkan ke dalam Tflask. Sebelum diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C, sel diperiksa dengan mikroskop. Selanjutnya, pembiakan sel dilakukan dengan mengganti medium RPMI berserum secara berkala sampai diperoleh kerapatan sel yang diinginkan.

e) Penghitungan Sel

Perhitungan sel menggunakan metode *hemacytometer*. Langkah perhitungan sel sebagai berikut :

1. *Chamber* dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol dan dikeringkan.
2. Hemacytometer ditutup dengan menggunakan *cover glass*.
3. Sel dipanen.
4. Ditambahkan 10 µL sel dan 10 µl *triptan blue* untuk hemacytometer dan tidak melebihi dari *chamber*.
5. *Chamber* ditempatkan di bawah mikroskop.
6. Diamati dan dihitung jumlah sel hidup.

7. Hitung sel pada 4 kamar hitung (A,B,C dan D) seperti gambar dibawah ini



$$\text{Jumlah sel yang dihitung/ml} = \frac{\Sigma \text{sel kamar A} + \Sigma \text{sel kamar B} + \Sigma \text{sel kamar C} + \Sigma \text{sel kamar D} \times 10^4}{4}$$

8. Dikalikan dengan 10^4 untuk memperkirakan jumlah sel per ml.
 9. Menyiapkan duplikat sampel dan dirata-rata jumlah sel yang diperoleh.

f) Panen Sel

1. Menghitung sel di *hemacytometer*.
2. Sel diencerkan dengan media.
3. Rumus hitung hemacytometer :

$$\frac{\Sigma}{n.kotak} \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran}$$

$$\frac{21}{4} \times 10^4 \times 10^2 \times 2 = 10,5 \times 10^6 \text{ ml}$$

$$= 10.500 \mu\text{l}$$

Dibutuhkan 200.000 sel untuk setiap sumuran di 24 *well plate*,

maka sel yang diperlukan : $\frac{200.000}{10.500} = 20 \mu\text{l} / \text{sumuran}$.

4. Sel dipindahkan ke *wells* dengan perkiraan *seeding* 200.000 sel per wells dan diinkubasi 24 jam hingga sel menempel pada *cover slip*. *Cover slip* yang digunakan adalah *cover slip* yang dilapisi dengan Poly-L-Lisine.
5. Setelah diinkubasi 24 jam, media diambil dan diganti dengan media mengandung ekstrak daun putri malu pada konsentrasi

200 mg/ml, 400 mg/ml dan 800 mg/ml dan satu kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak.

6. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam.
7. Setelah diinkubasi selama 24 jam, sel difiksasi.

g) Fiksasi Sel

1. Media lama dibuang.
2. Cuci dengan PBS dua kali.
3. Fiksasi dengan methanol absolut dingin selama 3-5 menit.
4. Methanol absolut dibuang.
5. Simpan dalam kulkas 4°C.
6. Setelah disimpan dan akan digunakan disk ditempel pada cover glass dengan entelan dan kemudian dilakukan proses imunohistokimia.

4.6.2 Ekstrak Tanaman Putri Malu

a) Proses Ekstraksi Maserasi

1. Masukkan 100 gram serbuk daun putri malu ke dalam toples kaca bertutup.
2. Dimasukan 500 ml pelarut etanol 70% kedalam wadah yang berisi serbuk dan disimpan dalam suhu ruangan.
3. Direndam dan diaduk dengan *shaker* kecepatan 600 rpm selama 2 jam.
4. Didiamkan hingga 72 jam.
5. Saring hasil maserasi menggunakan corong dan kertas saring, residu penyaringan dimaserasi kembali dengan 50% etanol selama 2 jam, diulangi sekali lagi hingga mendapat tiga filtrat ekstraksi.

6. Hasil ekstraksi pertama dan ekstraksi residu disatukan. Lalu dipiekatkan menggunakan *rotatory evaporator* pada suhu kurang dari 40° C hingga pelarut menguap dan dioven.
7. Ekstrak disimpan pada 4 ° C sampai digunakan lebih lanjut untuk evaluasi (Sharma, 2010).

4.6.3 Uji Fitokimia Kualitatif Ekstrak Daun Putri Malu

4.6.3.1 Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan menimbang 0,3 g ekstrak ditambah 5 ml HCL 2N (di cawan porselen), dipanaskan di atas penangas air selama 3 menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,5 g NaCl dan diaduk sampai rata, lalu disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambah 5 ml HCL 2N, dan dibagi menjadi 2 bagian yaitu larutan A dan larutan B. Selanjutnya, dilakukan uji pengendapan dengan menambahkan larutan b dengan pereaksi Meyer. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan putih kekuningan (cream) (Wagner, 1996).

4.6.3.2 Steroid

Uji steroid yang dilakukan adalah uji salkowski yang bertujuan untuk mendeteksi kandungan steroid tidak jenuh di ekstrak. Uji salkowski dilakukan dengan menimbang 0,3 g ekstrak dilarutkan dalam 15 ml etanol, lalu dibagi menjadi dua bagian, yaitu larutan A dan larutan B. Larutan A digunakan sebagai blanko sedangkan larutan B ditambahkan H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tidak jenuh ditunjukkan dengan timbulnya cincin merah (Wagner, 1996).

4.6.3.3 Saponin (uji busa)

Saponin dapat dideteksi dengan metode forth atau uji busa. Ekstrak sebanyak 0,3 g dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan air suling 10 ml. Dikocok dengan kuat selama 30 detik. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih stabil (stabil selama 15 menit) (Wagner, 1996).

4.6.3.5 Tanin dan Polifenol

Dilakukan preparasi sampel dengan menyiapkan 0,3 g ekstrak ditambah 10 ml akuades, dipanaskan dan diaduk serta didiamkan sampai temperatur kamar. Kemudian, ditambahkan 3-4 tetes NaCl 10%, diaduk dan disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian yaitu larutan A, larutan B dan larutan C.

Uji tanin dilakukan dengan melakukan uji gelatin yaitu pada larutan B ditambahkan dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCl 10%. Adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih dibandingkan dengan blanko (larutan A) (Wagner, 1996).

Adanya polifenol diuji dengan uji ferriklorida. Larutan C diberi beberapa tetes larutan FeCl_3 5%, lalu diamati adanya perubahan warna. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya polifenol (Wagner, 1996).

4.6.4 Pembuatan Sediaan Putri Malu (*Mimosa pudica*)

1. Ekstrak daun putri malu ditimbang sebanyak 4,8 g didalam ependrof.
2. Ekstrak dilarutkan dalam 6 ml media sehingga konsentrasinya menjadi 0,8 g/ml.

3. Larutan ekstrak yang didapatkan terlalu pekat sehingga larutan ekstrak disaring menggunakan filter sterile syringe dan didapatkan 6 ml media ekstrak.

4. Membuat sediaan konsentrasi 200, 400 dan 800 mg/ml

Pada imunohistokimia, setiap sumuran membutuhkan 500 μ l media.

Setiap kelompok uji terdapat 6 kali pengulangan, sehingga dibutuhkan 3000 μ l.

a) Konsentrasi 800 mg/ml

$$V_1 \cdot M_2 = V_2 \cdot M_1$$

$$X \cdot 800 \text{ mg/ml} = 3000 \text{ } \mu\text{l} \cdot 800 \text{ mg/ml}$$

$$X \cdot 800 \text{ mg/ml} = 3 \text{ ml} \cdot 800 \text{ mg/ml}$$

$$800 X = 2400 \text{ ml}$$

$$X = 3 \text{ ml}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 800 mg/ml sebanyak 3000 μ l diperlukan 3 ml dari larutan stok.

b) Konsentrasi 400 mg/ml

$$V_1 \cdot M_2 = V_2 \cdot M_1$$

$$X \cdot 800 \text{ mg/ml} = 3000 \text{ } \mu\text{l} \cdot 400 \text{ mg/ml}$$

$$X \cdot 800 \text{ mg/ml} = 3 \text{ ml} \cdot 400 \text{ mg/ml}$$

$$800 X = 1200 \text{ ml}$$

$$X = 1,5 \text{ ml}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 800 mg/ml sebanyak 3000 μ l diperlukan 1,5 ml dari larutan stok yang ditambahkan media sampai dengan 3000 μ l.

c) Konsentrasi 200 mg/ml

$$V_1 \cdot M_2 = V_2 \cdot M_1$$

$$X \cdot 800 \text{ mg/ml} = 3000 \text{ } \mu\text{l} \cdot 200 \text{ mg/ml}$$

$$X \cdot 800 \text{ mg/ml} = 3 \text{ ml} \cdot 200 \text{ mg/ml}$$

$$800 \cdot X = 600 \text{ ml}$$

$$X = 0,75 \text{ ml}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 800 mg/ml sebanyak 3000 μ l diperlukan 0,75 ml dari larutan stok yang ditambahkan media sampai dengan 3000 μ l.

4.6.5 Perlakuan dan Kontrol

- a. Enam sumuran berisi kultur sel HeLa saja tanpa dipapar ekstrak tanaman putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai kontrol positif.
- b. Enam sumuran yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak etanol putri malu (*Mimosa pudica*) dengan konsentrasi I (200 mg/ml media).
- c. Enam sumuran yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak etanol putri malu (*Mimosa pudica*) dengan konsentrasi II (400 mg/ml media).
- d. Enam sumuran yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak etanol putri malu (*Mimosa pudica*) dengan konsentrasi III (800 mg/ml media).

4.6.6 Tunel Assay

Apoptosis (kematian sel secara terprogram) berperan penting dalam perkembangan biologis dan pemeliharaan jaringan yang aktif membelah supaya selalu dalam kondisi *steady state*. Metode untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dapat didasarkan pada karakteristik apoptosis itu sendiri, contohnya adalah fragmentasi DNA.

Metode yang umum untuk mendeteksi fragmentasi DNA secara enzimatik adalah TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*). Reagen TUNEL terdiri dari enzim terminal transferase yang bertugas mengenali ujung 3'OH (*nick end*) yang dihasilkan oleh fragmentasi DNA dan *deoxyuridine triphosphate*

nucleotides (dUTP) untuk memvisualisasikan ujung 3'OH tersebut yang dapat diamati menggunakan mikroskop fluoresensi, *flow cytometry*, ataupun mikroskop cahaya. Pada penelitian ini akan dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya untuk memvisualisasikan perbandingan sel apoptosis dengan sel non apoptosis dalam satu lapang pandang pengamatan, digunakan metoda pewarnaan menggunakan reagen TUNEL. TUNEL akan mendeteksi sel apoptosis dan menghasilkan warna coklat. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan *Cells death detection kit* dari Roche inc, teknik sesuai petunjuk kit, sebagai berikut :

1. Memindahkan cover glass yang terdapat sel HeLa setelah dilakukan fiksasi pada slide.
2. Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
3. Diberi protease-k 4 μ l : PBS 200 μ l
4. Diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C dalam inkubator.
5. Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
6. Diberi setetes H₂O₂ 30% dan diinkubasi selama 15 menit dan selanjutnya cuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
7. Diberi equilibration buffer dan diinkubasi pada suhu ruangan, lalu dikeringkan.
8. Diberi TdT enzim yang terdiri dari 33 μ l TdT : 77 μ l buffer
9. Diinkubasi selama 60 menit pada 37°C.
10. Distop dengan larutan stop solution 20 μ l dan diagitasi.
11. Didiamkan selama 10 menit.

12. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
13. Konjugated dengan anti-digoxigen peroksidase solution selama 40 menit pada 37°C.
14. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
15. Cuci dengan akuades.
16. Ditetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB – Diamino Benzidine) selama 20 menit pada suhu ruang.
17. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
18. Dicuci dengan akuades dan ditunggu hingga kering dari akuades.
19. Dilakukan counterstain dengan mayer selama 7 menit.
20. Bilas dengan akuades.
21. Slide dikeringkan dan ditetaskan entelan serta diberikan cover slide.
22. Pengamatan dan perhitungan sel dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Sel yang dihitung adalah seluruh jumlah sel dan sel yang mengalami apoptosis yaitu yang tampak berwarna kecoklatan di inti sel dalam satu lapang pandang.

4.7 Analisa Data

Data yang telah terkumpul, lalu diolah dan dilakukan analisis uji normalitas data. Uji normalitas data dilakukan untuk menguji dan mengetahui sebaran data terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji normalitas *saphiro wilk*. Data dapat dikatakan

berdistribusi normal juga apabila besarnya nilai signifikansi $> 0,05$ ($\alpha : 5\%$). Selain itu, perlu dilakukan uji homogenitas data. Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji Levene karena perhitungan analisis statistik menggunakan *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software 15*. Selanjutnya, bila data berdistribusi normal dan homogenitas ragam terpenuhi maka menggunakan uji parametrik yaitu *one way ANOVA*.

Analisa data dilakukan dengan uji statistik menggunakan *one way ANOVA* karena merupakan uji parametrik. Uji *one way ANOVA* adalah analisis varian untuk satu variabel independen. Analisa data dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengalami apoptosis terhadap perlakuan yang diberikan dan perbedaan dikatakan signifikan bila $p < 0,05$. Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah:

H0 : tidak terjadi penurunan jumlah sel kanker serviks (sel HeLa) yang menunjukkan tidak ada apoptosis sel setelah diberikan ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*).

H1 : terjadi penurunan jumlah sel kanker serviks (sel HeLa) yang menunjukkan apoptosis sel setelah diberikan ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*).

Setelah melakukan uji *one way Anova*, jika data yang diperoleh menunjukkan adanya pengaruh (uji hipotesa adalah tolak H_0) maka langkah selanjutnya melakukan uji lanjutan yaitu uji perbandingan Berganda yaitu mengetahui rata-rata perlakuan mana yang berbeda. Metode Post Hoc yang digunakan adalah teknik Tukey juga biasa disebut dengan HSD (honestly Significant difference). Uji Tukey digunakan untuk menguji signifikansi perbedaan rerata antara variabel mana yang berbeda dibanding yang lain.

Uji korelasi data menggunakan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui adanya hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun putri malu

dengan jumlah sel HeLa dan persentase sel yang mengalami apoptosis. Arah dan besarnya hubungan tersebut dapat dilihat pada nilai *pearson correlation*. Rumus uji korelasi pearson untuk product-moment adalah :

$$r = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{\left(n \sum (X)^2 - (\sum X)^2 \right) \left(n \sum (Y)^2 - (\sum Y)^2 \right)}}$$

Keterangan :

r : koefisien korelasi

X : data-data dari variabel bebas

Y : data-data dari variabel terika



4.8 Alur Penelitian

