

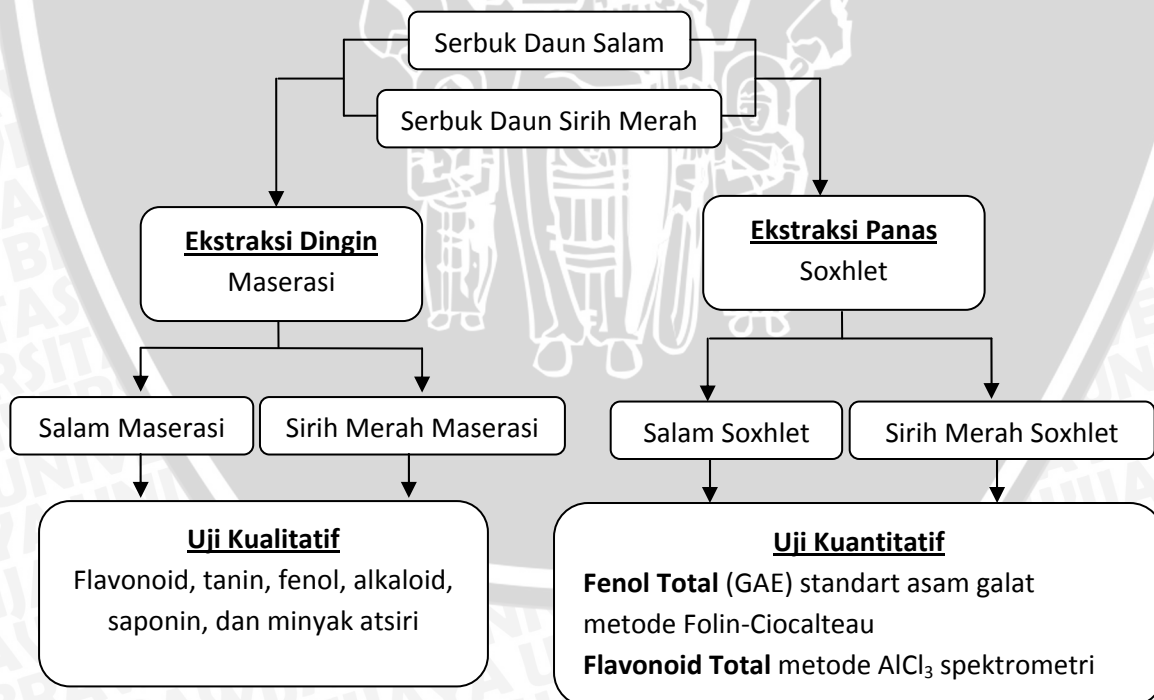
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan studi empiris melalui pendekatan kuantitatif dan semikualitatif secara eksperimental murni menggunakan desain *true experimental in vitro. post-test only, control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi kedua ekstrak terhadap efektifitas terapi dalam menghambat proliferasi dan mennginduksi apoptosis sel HeLa CCL-2 dengan dosis yang efektif serta mengetahui jalur mekanisme dari aktivitas antikanker nya. Berikut adalah desain penelitian ini:

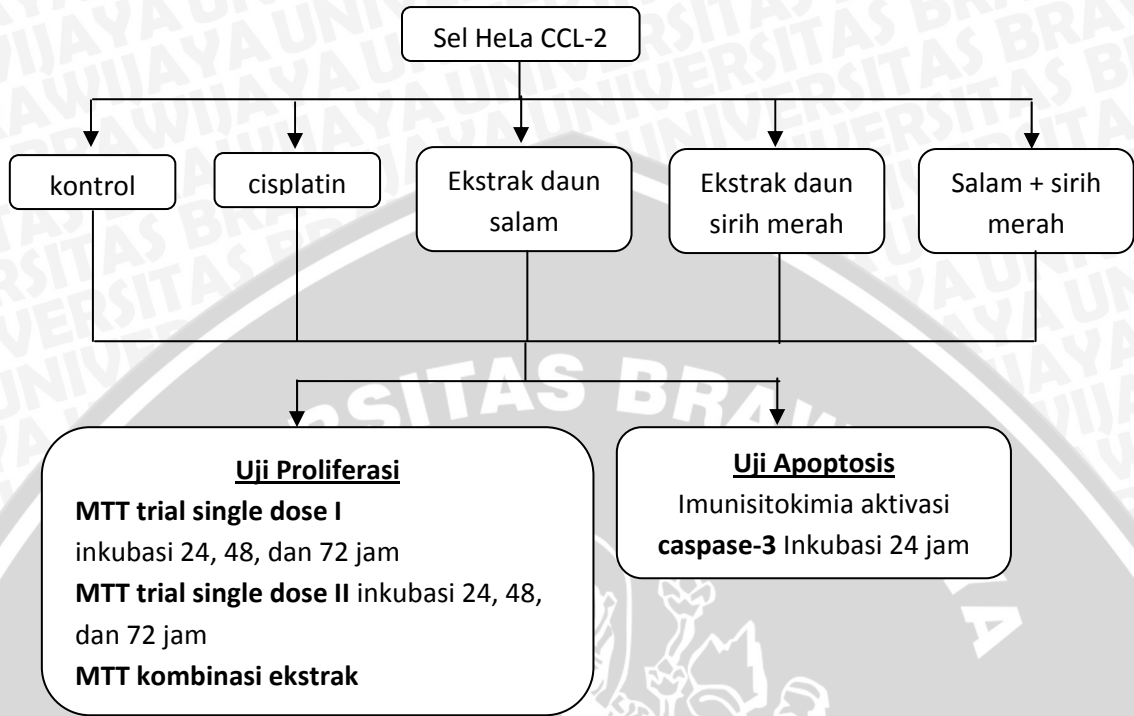
4.1.1 Optimalisasi Kualitas Ekstrak



Bagan 4.1.1 Desain Penelitian Optimasasi Ekstrak

4.1.2 Optimalisasi Terapi

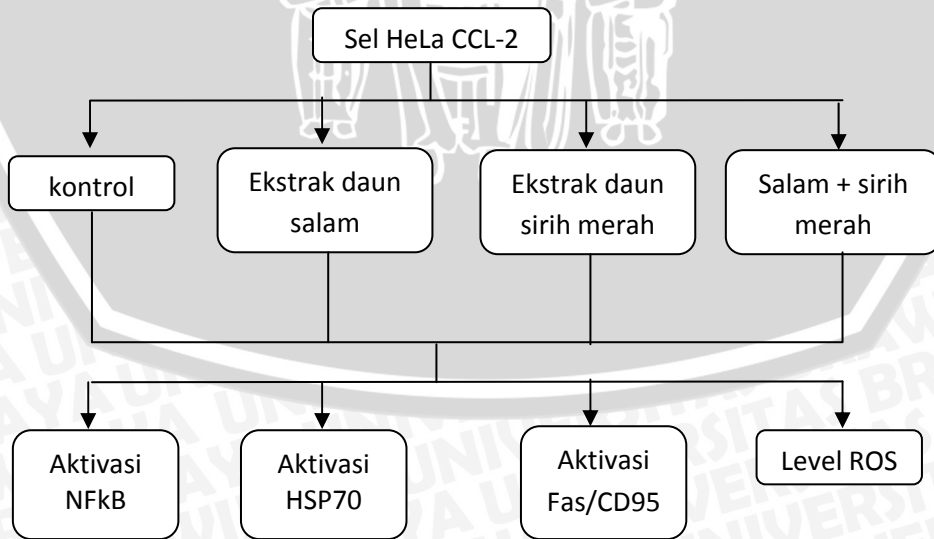
4.1.2.1 Uji Aktivitas Antikanker (Antiproliferasi dan Induksi Apoptosis)



Bagan 4.1.2.1 Desain Penelitian Uji Aktivitas Antikanker

4.1.2.2 Uji Jalur Mekanisme Antikanker

Aktivitas Antikanker (Antiproliferasi dan Induksi Apoptosis)



Keterangan :

Dosis MTT trial I

Salam maserasi : 3,3 µg/ml; 6,6 µg/ml; 13,2 µg/ml; 26,4 µg/ml; 52,8 µg/ml;
105,6 µg/ml; 211,2 µg/ml; dan 422,4 µg/ml

Salam soxhlet : 3,3 µg/ml; 6,6 µg/ml; 13,2 µg/ml; 26,4 µg/ml; 52,8 µg/ml;
105,6 µg/ml; 211,2 µg/ml; dan 422,4 µg/ml

Sirih merah maserasi : 4,8 µg/ml; 9,6 µg/ml; 19,2 µg/ml; 38,4 µg/ml; 76,8 µg/ml;
153,6 µg/ml; 307,2 µg/ml; dan 614,4 µg/ml

Sirih merah soxhlet : 4,8 µg/ml; 9,6 µg/ml; 19,2 µg/ml; 38,4 µg/ml; 76,8 µg/ml;
153,6 µg/ml; 307,2 µg/ml; dan 614,4 µg/ml

Dosis MTT trial II

Salam maserasi : 1,27 µg/ml; 2,54 µg/ml; 5,08 µg/ml; 10,16 µg/ml; 20,32
µg/ml; dan 40,64 µg/ml

Salam soxhlet : 1,45 µg/ml; 2,9 µg/ml; 5,81 µg/ml; 11,62 µg/ml; 23,24
µg/ml; dan 46,48 µg/ml

Sirih merah maserasi : 1,71 µg/ml; 3,43 µg/ml; 6,85 µg/ml; 13,71 µg/ml; 27,42
µg/ml; dan 54,84 µg/ml

Dosis MTT kombinasi

Salam maserasi 81,28 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL

Salam maserasi 40,64 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL

Salam maserasi 20,32 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL

Salam maserasi 10,16 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL

Salam maserasi 5,08µg/mL + Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL



Salam maserasi 2,54µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam maserasi 81,28 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam maserasi 40,64 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam maserasi 20,32 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam maserasi 10,16 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam maserasi 5,08µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam maserasi 2,54µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam maserasi 81,28 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam maserasi 40,64 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam maserasi 20,32 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam maserasi 10,16 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam maserasi 5,08µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam maserasi 2,54µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam maserasi 81,28 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam maserasi 40,64 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam maserasi 20,32 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam maserasi 10,16 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam maserasi 5,08µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam maserasi 2,54µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam maserasi 81,28 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam maserasi 40,64 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam maserasi 20,32 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam maserasi 10,16 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam maserasi 5,08µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam maserasi 2,54µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam maserasi 81,28 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL

Salam maserasi 40,64 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam maserasi 20,32 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam maserasi 10,16 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam maserasi 5,08µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam maserasi 2,54µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam soklet 46,48µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam soklet 23,24µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam soklet 11,62µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam soklet 5,81µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam soklet 2,905µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 109,68µg/mL
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam soklet 46,48µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam soklet 23,24µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam soklet 11,62µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam soklet 5,81µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam soklet 2,905µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84µg/mL
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam soklet 46,48µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam soklet 23,24µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam soklet 11,62µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam soklet 5,81µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam soklet 2,905µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam soklet 46,48µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam soklet 23,24µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL

Salam soklet 11,62µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam soklet 5,81µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam soklet 2,905µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam soklet 46,48µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam soklet 23,24µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam soklet 11,62µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam soklet 5,81µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam soklet 2,905µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam soklet 46,48µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam soklet 23,24µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam soklet 11,62µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam soklet 5,81µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL
Salam soklet 2,905µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44µg/mL

Dosis Imunositokimia caspase-3

Salam maserasi : 10,16 µg/ml dan 20,32 µg/ml

Salam soxhlet : 11,62 µg/ml dan 23,24 µg/ml

Sirih merah maserasi : 13,71 µg/ml dan 27,42 µg/ml

Salam maserasi 20,32 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam soxhlet 11,62 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam soxhlet 23,24 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Dosis Imunositokimia NFκB

Salam maserasi : 10,16 µg/ml dan 20,32 µg/ml

Salam soxhlet : 11,62 µg/ml dan 23,24 µg/ml

Sirih merah maserasi : 13,71 µg/ml dan 27,42 µg/ml

Salam maserasi 20,32 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam soxhlet 11,62 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam soxhlet 23,24 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Dosis Imunositokimia HSP70

Salam maserasi : 10,16 µg/ml dan 20,32 µg/ml

Salam soxhlet : 11,62 µg/ml dan 23,24 µg/ml

Sirih merah maserasi : 13,71 µg/ml dan 27,42 µg/ml

Salam maserasi 10,16 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam maserasi 20,32 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam soxhlet 11,62 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam soxhlet 23,24 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Dosis Imunositokimia Fas/CD95

Salam maserasi : 10,16 µg/ml dan 20,32 µg/ml

Salam soxhlet : 11,62 µg/ml dan 23,24 µg/ml

Sirih merah maserasi : 13,71 µg/ml dan 27,42 µg/ml

Salam maserasi 10,16 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam maserasi 20,32 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam soxhlet 11,62 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam soxhlet 23,24 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/m

Dosis NBT ROS

Salam maserasi : 10,16 µg/ml dan 20,32 µg/ml

Salam soxhlet : 11,62 µg/ml dan 23,24 µg/ml

Sirih merah maserasi : 13,71 µg/ml dan 27,42 µg/ml

Salam maserasi 10,16 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam maserasi 20,32 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam maserasi 10,16 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam maserasi 20,32 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam soxhlet 11,62 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam soxhlet 23,24 µg/ml + Sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

Salam soxhlet 11,62 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Salam soxhlet 23,24 µg/ml + Sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel HeLa CCL-2, *cell line* kanker leher rahim yang di kultur. Sel HeLa CCL-2 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) Yogyakarta. Dalam penelitian ini terdapat 5 macam pengujian dimana masing-masing terdapat 32 kelompok, 18 kelompok, 72 kelompok, 10 kelompok, dan 14 kelompok perlakuan di masing-masing pengujian, maka jumlah pengulangan untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $P(n-1) \geq 15$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan.

Pengujian I : MTT trial I

$$P(n-1) \geq 15$$

$$32(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 0,47$$

$$n \geq 2$$

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 2 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Dua sampel berisi sel HeLa CCL-2 saja sebagai kontrol
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 3,3 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 6,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 13,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 26,4 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 52,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 105,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 211,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 422,4 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 4,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 9,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 19,2 µg/ml

- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 38,4 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 76,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 153,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 307,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 614,4 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 3,3 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 6,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 13,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 26,4 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 52,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 105,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 211,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 422,4 µg/ml

- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 4,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 4,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 9,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 19,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 38,4 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 76,8 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 153,6 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 307,2 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 614,4 µg/ml

Pengujian II : MTT trial II

$P(n-1) \geq 15$

$18(n-1) \geq 15$

$n-1 \geq 0,83$

$n \geq 2$

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 2 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Dua sampel berisi sel HeLa CCL-2 saja sebagai kontrol
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 1,27 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 2,54 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 5,08 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 40,64 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 1,71 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 3,43 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 6,85 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/ml

- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 54,84 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 1,45 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 2,9 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 5,81 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 11,62 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 23,24 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 46,48 µg/ml
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soxhlet dengan konsentrasi 614,4 µg/ml

Pengujian III : MTT kombinasi

$$P (n-1) \geq 15$$

$$72 (n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 0,2$$

$$n \geq 2$$

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Tiga sampel berisi sel HeLa CCL-2 saja sebagai kontrol
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 81,28 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 40,64 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 5,08 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 2,54 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 81,28 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 40,64 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 µg/mL

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 5,08 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 2,54 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 81,28 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 40,64 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 5,08 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 2,54 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 81,28 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 40,64 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 5,08 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 2,54 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 81,28 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 40,64 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 µg/mL

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 5,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 2,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 81,28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 40,64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 5,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 2,54 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 92,96 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 46,48 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 5,81 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 2,905 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 92,96 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 46,48 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84µg/mL

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 5,81 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 2,905 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 92,96 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 46,48 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 5,81 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 2,905 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 92,96 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 46,48 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 5,81 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 2,905 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 92,96 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 µg/mL
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 46,48 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 µg/mL

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 5,81 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 2,905 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 92,96 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 46,48 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g/mL}$
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 5,81 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g/mL}$

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 2,905 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44µg/mL

Pengujian IV : Imunositokimia caspase-3

P (n-1) ≥ 15

10 (n-1) ≥ 15

n-1 ≥ 1,5

n ≥ 3

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 11,62 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 23,24 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 µg/ml

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Pengujian IV : Imunositokimia NFkB

P (n-1) ≥ 15

10 (n-1) ≥ 15

n-1 ≥ 1,5

n ≥ 3

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 µg/ml

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 11,62 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 23,24 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Pengujian IV : Imunositokimia HSP70

P (n-1) ≥ 15

10 (n-1) ≥ 15

n-1 ≥ 1,5

n ≥ 3

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 11,62 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 23,24 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
-

Pengujian IV : Imunositokimia Fas/CD95

P (n-1) ≥ 15

10 (n-1) ≥ 15

n-1 ≥ 1,5

n ≥ 3

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 11,62 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 23,24 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 µg/ml

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

Pengujian V : NBT ROS

$$P(n-1) \geq 15$$

$$14(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 1,07$$

$$n \geq 2$$

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 11,62 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet dengan konsentrasi 23,24 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 10,16 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 11,62 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soxhlet 23,24 µg/ml + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/ml

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini dosis ekstrak daun salam, daun sirih merah. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas anti proliferasi, induksi apoptosis dari aktivasi caspase-3, aktivasi NFkB, aktivasi HSP70, aktivasi HSP70 dan Level ROS pada Cell HeLa CCL-2.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian ditetapkan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Berikut lokasi dan waktu penelitian yang ditetapkan:

4.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Berikut tempat penelitian yang digunakan:

- Ekstraksi dilakukan di Laboratorium LSIH UB dan Laboratorium Farmasi FKUB
- Kultur sel HeLa dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB
- Uji Aktivitas Antikanker dan Uji Mekanisme jalur antikanker dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB Malang, Laboratorium Biokimia FKUB dan LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakarta

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung antara bulan Februari – Juni 2013

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan – bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Ekstraksi Maserasi

Bahan yang digunakan adalah serbuk kering daun salam 100 gram, serbuk kering daun sirih merah 100 gram, etanol 96%.

4.5.1.2 Bahan Ekstraksi Soxhlet

Bahan yang digunakan adalah serbuk kering daun salam 100 gram, serbuk kering daun sirih merah 100 gram, etanol 96%.

4.5.1.3 Bahan Uji Fitokimia Ekstrak

Bahan yang digunakan untuk uji kualitatif ekstrak meliputi :

- Bahan yang digunakan untuk uji tannin adalah 0,5 g sampel ekstrak; 20mL air distilasi; 0,1% FeCl₃; kertas saring.
- Bahan yang digunakan untuk uji saponin adalah 2 g sampel ekstrak, 20mL air distilasi.
- Bahan yang digunakan untuk uji flavonoid adalah sampel ekstrak, 1% larutan NH₃.

- Bahan yang digunakan untuk uji terpenoid adalah 5 mL larutan ekstrak, 2mL CHCl_3 , 3mL H_2SO_4 .
- Bahan yang digunakan untuk uji alkaloid adalah 5g sampel ekstrak, 200mL 10% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ dalam $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.
- Bahan yang digunakan untuk uji fenol adalah 500mg ekstrak, 5 mL air distilasi, 5% larutan Ferric chloride.

4.5.1.4 Bahan Uji Penentuan Fenol Total

Bahan yang digunakan untuk penentuan kadar fenol total adalah 50 μL sampel ekstrak *Eugenia polyantha*; 0,5 mL Folin dan Ciocalteu's reagen fenol; 2,5 mL larutan Na_2CO_3 20%; 15 mL H_2O destilasi (aquadest) dan larutan standar gallic acid.

4.5.1.5 Bahan Uji Penentuan Flavonoid Total

Bahan yang digunakan untuk uji penentuan kadar flavonoid total adalah 250 mg ekstrak, aseton, HCl 2M, Aquadest, Etil Asetat, Asam Asetat Glasial dan larutan AlCl_3 10%.

4.5.1.6 Bahan Kultur Sel HeLa

Bahan yang digunakan untuk kultur sel HeLa adalah Sel HeLa CCL-2, medium RPMI 1640, penicillin-streptomycin, FBS (Fetal Bovine Serum), PBS (Phosphate Buffer Saline), Sodium Bicarbonate, HCl, Trypsine-EDTA, aquadest, spirtus, dan alkohol.

4.5.1.7 Bahan Uji Proliferasi Sel HeLa dengan MTT Assay

Bahan yang digunakan untuk MTT Assay adalah Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, RPMI 1640, PBS 1X, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) 0,5 mg/ml, dan stopper SDS 10% dalam 0.1 N HCl.

4.5.1.8 Bahan Uji Apoptosis dengan Imunositokimia caspase-3

Bahan yang digunakan untuk uji aktivasi HSP70 adalah Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, RPMI 1640, PBS 1X, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk caspase-3, xylol, dan mounting media.

4.5.1.9 Bahan Uji Aktivasi NFkB

Bahan yang digunakan untuk uji aktivasi HSP70 adalah Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, RPMI 1640, PBS 1X, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk NFkB, xylol, dan mounting media.

4.5.1.10 Bahan Uji Aktivasi HSP70

Bahan yang digunakan untuk uji aktivasi HSP70 adalah Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, RPMI 1640, PBS 1X, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk HSP70, xylol, dan mounting media.

4.5.1.11 Bahan Uji Aktivasi Fas/CD95

Bahan yang digunakan untuk uji aktivasi HSP70 adalah Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, RPMI 1640, PBS 1X, metanol, larutan hidrogen peroksida, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk Fas/CD95, xylol, dan mounting media.

4.5.1.12 Bahan Uji Penentuan kadar ROS

Bahan yang digunakan untuk uji penentuan kadar ROS adalah Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, DMSO, RPMI 1640, PBS 1X, NBT, KOH, dan ethanol absolut.

4.5.2 Peralatan Penelitian

Alat-alat disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Pada umumnya, alat-alat yang digunakan sesuai standart peralatan laboratorium.

Berikut alat-alat yang digunakan selama proses penelitian :

Tabel 4.1 Peralatan Penelitian

Tahap Penelitian	Alat
Ekstraksi Maserasi	Toples kaca 5 L, Toples kaca 1 L, Stirer, gelas ukur, pipet tetes, beaker glass
Ekstraksi Soxhlet	Seperangkat peralatan ekstraksi soxhlet, gelas ukur, pipet tetes, beaker glass
Uji Fitokimia Ekstrak	Plat tetes, pipet tetes, waterbath, tabung reaksi, rak tabung reaksi
Uji Penentuan Fenol Total	Spektrofotometer, cuvet, mikropipet, gelas ukur, beaker glass, pipet tetes, labu ukur
Uji Penentuan Flavonoid Total	Spektrofotometer, cuvet, mikropipet, gelas ukur, beaker glass, pipet tetes, labu ukur, corong pisah, gelas arloji
Kultur sel Hela	Laminar air-flow, inkubator 37°C ± 5% CO ₂ , mikroskop <i>inverted</i> , 96-well plates, cover glass, sentrifuge, pipet

	<p>disposable, mikro pipet, conical tube, syringe, Filter 0.2 μm, <i>blue tip</i>, <i>yellow tip</i> dan tisu.</p>
<p>Uji Proliferasi Sel HeLa</p>	<p>Mikropipet 20, 200, 1000 μL, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, <i>conical tube</i>, <i>96-well plate</i>, <i>ELISA-reader</i> atau microplate reader, tempat buangan untuk media bekas dan PBS, tisu makan (kotak), <i>blue tip</i>, <i>yellow tip</i> dan aluminium foil</p>
<p>Uji Apoptosis dengan Caspase-3</p>	<p>Mikropipet 20, 200, 1000 μL, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, <i>cover slip</i>, <i>object glass</i>, <i>24-well plate</i>, <i>blue tip</i>, <i>yellow tip</i>, dan buangan untuk media bekas</p>
<p>Uji Aktivasi NFkB</p>	<p>Mikropipet 20, 200, 1000 μL, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, <i>cover slip</i>, <i>object glass</i>, <i>24-well plate</i>, <i>blue tip</i>, <i>yellow tip</i>, dan buangan untuk media bekas</p>
<p>Uji Aktivasi HSP70</p>	<p>Mikropipet 20, 200, 1000 μL, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, <i>cover slip</i>, <i>object glass</i>, <i>24-well plate</i>, <i>blue tip</i>, <i>yellow tip</i>, dan buangan untuk</p>

	media bekas
Uji Aktivasi Fas/CD95	Mikropipet 20, 200, 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, <i>cover slip</i> , <i>object glass</i> , <i>24-well plate</i> , <i>blue tip</i> , <i>yellow tip</i> , dan buangan untuk media bekas
Uji Penentuan Kadar ROS	Mikropipet 20, 200, 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, <i>conical tube</i> , <i>48-well plate</i> , <i>ELISA-reader</i> atau <i>microplate reader</i> , tempat buangan untuk media bekas dan PBS, tisu makan (kotak), <i>blue tip</i> , <i>yellow tip</i> dan aluminium foil

4.6 Definisi Istilah/Operasional

4.6.1 Proliferasi sel merupakan peningkatan jumlah sel sebagai hasil dari pertumbuhan dan pembelahan sel (Ghobrial *et al.*, 2005).

4.6.2 Apoptosis atau kematian sel secara terprogram untuk mengontrol proliferasi sel maupun respon terhadap kerusakan DNA pada sel (Ghobrial *et al.*, 2005).

4.6.3 Caspase (*Cystein Aspartate Specific Proteases*) merupakan kelompok enzim protease yang berperan dalam apoptosis sel mamalia. Aktivasi caspase terjadi sebagai akibat dihentikannya *growth factor*, paparan radiasi atau zat kemoterapi, atau inisiasi proses kematian sel yang diperantarai reseptor Fas/Apo-1 (Hussana *et al.*, 2010). Caspase-3

mengamplifikasi sinyal dari caspase-8 (ekstrinsik) atau caspase-9 (intrinsik) menuju apoptosis (Hussana *et al*, 2010).

4.6.4 NFkB merupakan faktor transkripsi pada inti sel yang meregulasi ekspresi dari berbagai gene yang meregulasi apoptosis, replikasi virus, tumorigenesis, inflamasi, dan berbagai macam penyakit autoimun (Ghobial *et al*, 2005).

4.6.5 HSP70 merupakan suatu protein penting pada fisiologi inflamasi, infeksi, dan perkembangan tumor (Rodriguez *et al*, 2009). Protein ini memiliki fungsi biologis beragam meliputi pembentukan protein, mencegah agregasi protein, dan memodulasi perakitan/pembongkaran kompleks protein (Messey *et al*, 2009).

4.6.6 ROS termasuk triplet ($3O_2$), tunggal (singlet/ $1O_2$), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH), nitrit oksida (NO), peroksinitrit ($ONOO^-$), asam hipoklorus ($HOCl$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal alkoksil (LO^-), dan radikal peroksil (LO_2^-). Radikal bebas mengandung karbon (CCL_3^-) berasal dari oksidasi radikal molekul organik. Radikal mengandung hidrogen hasil penyerangan atom H ($H^$). Bentuk lain adalah radikal mengandung sulfur yang diproduksi pada oksidasi glutation menghasilkan radikal *thiyl* ($RS^$). Radikal mengandung nitrogen misalnya radikal *fenyldiazine* (Arief, 2003).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur sel HeLa (CCRC, 2013)

4.7.1.1 Penumbuhan sel

- Menyiapkan alikuot 3 mL RPMI 1640 dalam *conical tube* steril
- Mengambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel HeLa CCL-2 dari tangki nitrogen cair

- Mencairkan suspensi sel dalam *cryo tube* pada suhu kamar hingga tepat mencair
- Mengambil suspensi sel dengan mikropipet 1 ml (blue tip), masukkan tetes demi tetes ke dalam RPMI 1640 yang telah disiapkan dalam *conical tube*
- Menutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* (tanpa pendingin) pada 1000 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali
- Kembali ke dalam LAF. menyemprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70 %
- Membuka *conical tube*, tuang supernatan RPMI 1640 ke dalam pembuangan
- Menambahkan 4 ml RPMI 1640 baru, meresuspensi kembali sel hingga homogen
- Mentransfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 *cell culture dish*
- Menambahkan masing-masing 5 ml RPMI 1640 ke dalam dish, dihomogenkan dan diamati kondisi sel dengan mikroskop, pastikan sel homogen pada seluruh permukaan *dish*)
- Memberi penandaan dan simpan sel ke dalam inkubator inkubator 37°C ± 5% CO₂

4.7.1.2 Pergantian Media

- Mengaliquot PBS dan RPMI 1640 di dalam *conical tube*
- Membuang media lama secara perlahan dengan pipet Pasteur
- Menuang 3 ml PBS ke dalam *dish*, goyang-goyangkan dish ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel
- Membuang PBS dengan pipet Pasteur

- Menuang 7 ml RPMI 1640 ke dalam *dish* yang berisi sel
- Mengamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop *inverted*
- Inkubasi semalam dan amati keadaan sel keesokan harinya

4.7.1.3 Pemanenan Sel

- Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 diamati kondisi sel, panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen
- Membuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril
- Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal)
- Menambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit
- Menambahkan RPMI 1640 ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu
- Mengamati keadaan sel di mikroskop, resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
- Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru

4.7.1.4 Perhitungan Sel

- Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 , diamati kondisi sel
- Membuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril
- Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS + $\frac{1}{2}$ volume media awal)
- Tambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit
- Menambahkan media kurang lebih 2-3 ml untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu

- Mengamati keadaan sel di mikroskop, meresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
- Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru, tambahkan RPMI 1640 kurang lebih 2-3 ml, resuspensi sel
- Mengambil 10 μ l panen sel dan dipipetkan ke hemasitometer
- Menghitung sel di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*

4.7.1.5 Subkultur Sel

- Melakukan panen sel sesuai dengan protokol panen sel
- Meresuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*
- Mengambil 300 μ l panen sel dan masukkan ke dalam *conical* yang lain. menambahkan 7 ml RPMI 1640 dan meresuspensi kembali
- Menuang sel ke dalam wadah (*dish*) yang telah disiapkan, dihomogenkan dan diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif
- Menginkubasi semalam dan mengganti RPMI 1640 esok harinya, diamati keadaan sel sebelum dan setelah diganti media

4.7.2 Maserasi Daun Salam dan Daun Sirih Merah (Handa, 2008)

- Mencuci semua alat yang akan digunakan
- Mengeringkan semua alat yang akan digunakan
- Memberi label “maserasi serbuk daun salam dan daun sirih merah” pada wadah kaca tertutup 1,5L
- Mengambil kaca alroji dan sendok untuk tempat serbuk
- Menimbang 100 gram serbuk daun salam dan daun sirih merah
- Memasukkan 100 gram serbuk daun salam dan daun sirih merah (sesuaikan dengan label pada toples)
- Merendam dengan etanol 96% 1L selama 6 hari dengan pergantian pelarut sebanyak 3 kali

- Mencatat waktu tepat setelah menutup wadah
- Melakukan pengadukan setiap 30 menit setiap hari (sore hari) menggunakan stirer
- Hasil dari masing-masing filtrat dicampur pada wadah kaca tertutup 3L kemudian disaring menggunakan kertas saring whatman-42/Flanel
- Hasil Ekstraksi dikeringkan menggunakan rotary evaporator
- Hasil akhir ekstrak di *freeze-dryed* untuk menghilangkan residu air
- Hasil akhir ekstrak di simpan pada suhu 4°C sampai digunakan

4.7.3 Soxhletasi Daun Salam dan Daun Sirih Merah (Handa, 2008)

- Mencuci semua alat yang akan digunakan
- Mengeringkan semua alat yang akan digunakan
- Menimbang serbuk daun salam dan daun sirih merah sebanyak 100 gram dan bungkus dengan kertas saring whatman
- Menyiapkan alat soxhlet untuk mengekstraksi
- Memasukkan pelarut etanol 96% dalam labu alas bulat yang ada disoxhlet (\pm 100 ml)
- Memasukkan bahan yang telah diberi kertas saring ke dalam labu klonsong soxhlet
- Menyalakan alat ekstraksi soxhlet
- Melakukan proses soxhletasi hingga bahan terekstrak sempurna (16 siklus atau 20-25 siklus)
- Hasil Ekstraksi dikeringkan menggunakan rotary evaporator
- Hasil akhir ekstrak di *freeze-dryed* untuk menghilangkan any residual air
- Hasil akhir ekstrak di simpan pada suhu 4°C sampai digunakan

4.7.4 Pemaparan Ekstrak Daun Salam, Ekstrak Daun Sirih Merah, dan Kombinasi keduanya pada Kultur Sel

- Mengencerkan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanya sesuai dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan di medium sel HeLa.
- Menambahkan larutan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanya tersebut ke dalam plate, mendiamkan selama 24, 48, dan 72 jam.
- larutan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanya dicuci dengan medium sel kembali.

4.7.5 Penentuan Kualitatif Fitokimia

Tannin. 0,5 g sampel dipanaskan dengan 20mL air distilasi pada tabul reaksi, disaring dan ditambahkan 0,1% FeCl_3 , sampel mengandung tanin jika berwarna coklat kehijauan sampai biru kehitaman. **Saponin** 2 g sampel dipanaskan dengan 20mL air distilasi pada waterbath, kemudian disaring dan ditambahkan 5mL air distilasi pada tabung reaksi, dikocok keatas kebawah, mengandung saponin jika terbentuk buih. **Flavonoid** sampel dilarutkan pada plat tetes ditambahkan 1% larutan NH_3 , sampel mengandung flavonoid jika berwarna kuning. **Terpenoid** 5 mL larutan ekstrak ditambah dengan 2mL CHCl_3 dan 3mL H_2SO_4 pada plat tetes, sampel mengandung terpenoid jika berwarna coklat kemerahan. **Alkaloid** 5g sampel dilarutkan dengan 200mL 10% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ dalam $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ pada gelas beaker, sampel berwarna putih jika mengandung alkaloid. **Fenol** 500mg ekstrak dilarutkan 5 mL air distilasi, kemudian ditambahkan 5% larutan Ferric chloride, sampel mengandung fenol jika berwarna hijau gelap.

4.7.6 Penetapan Kadar Fenol dan Flavonoid Total

- **Penetapan Kadar Fenol Total**

Penetapan kadar fenol total dalam menggunakan metode kolorimetri assay oleh Slinkard dan Singleton dengan beberapa modifikasi. 50 µL sampel ekstrak dicampur dengan 1 ml H₂O destilasi tabung uji, Setelah tercampur dengan baik; 0,5 mL Folin dan Ciocalteu's reagen fenol ditambahkan ke campuran, Setelah 3 menit ; ditambahkan 2,5 mL larutan Na₂CO₃ 20% (w/v) dan ditambahkan sampai H₂O destilasi sampai volume 10 mL, Reaksi dilakukan di tempat gelap selama 90 menit inkubasi pada suhu ruang setelah absorbansinya diukur pada 735 nm terhadap blank, Prosedur yang sama dilakukan untuk larutan standar gallic acid dan kadar fenol total dihitung menggunakan kurva kalibrasi galic acid, Hasilnya dinyatakan sebagai mg dari Gallic Acid Equivalent/ g ekstrak (Perumal *et al*, 2012).

- **Penetapan Kadar Flavonoid Total**

1. Pembuatan larutan baku induk dengan cara sebagai berikut : Diambil 250 mg ekstrak, ditambahkan 20 ml aseton, dan HCl 2 M 3 ml, lalu dihidrolisis di microwave selama 20 detik kekuatan 5 (biasa). Filtrat ditampung pada labu ukur 100 ml, ditambahkan aseton hingga tepat 100 ml. Diambil larutan sebanyak 20 ml, ditampung dalam corong pisah, ditambahkan 20 ml air. Dilakukan ekstraksi kocok 3x @ menit, pertama dengan penambahan 15 ml etil asetat, kedua dan ketiga dengan 10 ml etil asetat. Fase etil asetat dijadikan satu di dalam labu ukur 50 ml, dan ditambahkan etil asetat sampai tepat tanda.

2. Pembuatan larutan blanko dengan prosedur sebagai berikut : Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur.
3. Pembuatan larutan sampel dengan cara sebagai berikut : Diambil 10,0 ml larutan induk, ditambah dengan 1 ml larutan $AlCl_3$ 10% dan tambahkan larutan asam asetat glasial sampai 25,0 ml dalam labu ukur.
4. Dilakukan pengukuran dengan cara sebagai berikut : Pengukuran dilakukan segera setelah pembuatan larutan blanko dan larutan sampel dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm. Kadar flavonoid total dihitung dengan rumus :
Kadar flavonoid dalam 250 mg ekstrak = $(Absorbansi \times 1,25) / 2,5$

4.7.7 Uji proliferasi sel (CCRC, 2013)

- Mengambil sel dari inkubator $37^\circ C \pm 5\% CO_2$, diamati kondisi sel
- Memanen sel sesuai dengan protokol panen
- Menghitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan RPMI 1640 sesuai kebutuhan mengikuti protokol penghitungan sel (jumlah sel untuk dibutuhkan untuk uji proliferasi sel adalah $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran ($1,5 \times 10^4$ sel/100 μl MK))
- Mentransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μl
- Menyiapkan 3 sumuran kosong untuk kontrol media
- Mengamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel, didokumentasikan dengan kamera
- Menginkubasi sel di dalam inkubator selama 24 jam
- Jika dalam waktu 24 jam kondisi sel belum pulih, inkubasikan kembali
- membuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol DMSO) sesuai dengan protokol preparasi sampel

- Mengambil *plate* yang telah berisi sel dari inkubator
- Membuang media sel dengan cara balikkan *plate* 180° di atas tempat buangan, kemudian tekan *plate* secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan
- Mencuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100µl PBS
- Membuang PBS, ditiriskan sisa cairan dengan tisu
- Memasukkan 100 µl seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo)
- Menginkubasi di dalam inkubator 37°C ± 5% CO₂ (lama inkubasi berbeda-beda, mulai dari 24, 48, dan 72 jam)
- Menjelang akhir waktu inkubasi, didokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan
- Membuat stok MTT 5 mg/ml dengan cara metimbang 50 mg serbuk MTT, dilarutkan dalam 10 ml PBS (dengan bantuan vortex), dibuat reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 ml stok MTT 5 mg/ml, diencerkan dengan RPMI 1640 add 10 ml
- Membuang media sel, dicuci dengan PBS sebanyak 1x
- Menambahkan reagen 100 µl MTT 0,5 mg/ml ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media
- Menginkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan yang ungu
- Setelah 2-4 jam, diperiksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl
- Membungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan pada tempat gelap (suhu ruangan) semalam

- Keesokan harinya, *plate* di-*shaker* selama 10 menit untuk melarutkan formazan
- Menghidupkan *ELISA reader*, di tunggu proses *progressing* hingga selesai
- Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate* dan masukkan ke dalam *ELISA reader*
- Membaca absorbansi masing-masing sumuran dengan *ELISA reader* dengan $\lambda=550-600$ nm (595 nm) dengan menekan tombol *START*
- Persentase proliferasi dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi media}}{\text{Absorbansi control sel} - \text{Absorbansi media}} \times 100\%$$

4.7.8 Imunositokimia caspase-3, NFkB, HSP70 dan Fas/CD95 (CCRC, 2013)

- Mengambil sel HeLa CCL-2 dari inkubator CO₂, amati kondisi sel
- Memanen sel sesuai dengan protokol panen
- Menghitung jumlah sel HeLa CCL-2 sesuai dengan protokol penghitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5×10^4 sel/sumuran (5×10^4 sel/1000 μ l RPMI 1640))
- Membuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^4 sel/1000 μ l RPMI 1640
- Menyiapkan *24 well plate* dan *cover slip*
- Masukkan *cover slip* sejumlah yang dibutuhkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati
- Mentransfer 1000 μ l RPMI 1640 suspensi sel ke atas *cover slip*
- Mengamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel
- Menginkubasi sel di dalam inkubator selama semalam
- membuat satu konsentrasi sampel, yaitu pada IC₅₀ untuk perlakuan sebanyak 1000 μ l. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan

- : a. Perlakuan dengan sampel , b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru), c. Kontrol sel dengan antibodi primer
- Mengambil *24 well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO₂
 - Membuang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan
 - Mengisiskan PBS masing-masing 500µl ke dalam sumuran untuk mencuci sel
 - Membuang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan
 - Memasukkan sampel sebanyak 1000 µl ke dalam sumuran
 - Memasukkan 1000 µl MK untuk kontrol sel
 - Menginkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 15 jam
 - Mengamati kondisi sel setelah 14 jam, didokumentasikan dengan kamera
 - Menyiapkan metanol dingin dan PBS
 - Pada jam ke-15, inkubasi dengan sampel dihentikan (Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF)
 - Membuang semua media dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.
 - mengisiskan PBS 500 µl ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel
 - Membuang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan
 - Mengambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati
 - Meletakkan di dalam sumuran *6-well plate* bekas atau dish bekas yang bersih
 - Memberi label pada masing-masing sumuran
 - Meneteskan 300 µl metanol dingin, inkubasi 10 menit di dalam *freezer*

- metanol secara perlahan, jangan sampai *cover slip* terbalik
- Menambahkan 500 μ l PBS pada *cover slip*, diamkan selama 5 menit., ambil dan buang PBS dengan mikropipet 1 ml, lakukan pencucian dengan PBS 2 kali
- Menambahkan 500 μ l akuades, diamkan selama 5 menit, buang akuades, lakukan pencucian dengan akuades 2 kali
- Meneteskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan dengan mikropipet
- Meneteskan *prediluted blocking serum*, inkubasi selama 10 menit, buang larutan
- Meneteskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati (caspase-3, NFkB, HSP70 dan Fas/CD95)
- Menambahkan 500 μ l PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS
- Meneteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), inkubasi selama 10 menit
- Menambahkan 500 μ l PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS
- Meneteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit.
- Menambahkan 500 μ l PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS
- meneteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit
- Menambahkan 500 μ l akuades, kemudian buang kembali
- Meneeteskan larutan MayeHaematoxylin, inkubasi selama 3 menit
- Menambahkan 500 μ l akuades, kemudian buang kembali
- Mengangkat *cover slip* dengan pinset secara hati-hati, kemudian celupkan dalam xylol
- Mencelupkan *cover slip* dalam alkohol. *cover slip* dikeringkan

- Meletakkan *cover slip* di atas *object glass*, tetesi dengan lem (*mounting media*). Menutup *cover slip* dengan cover slip kotak
- Mengamati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya

4.7.9 Uji NBT ROS

- Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$, diamati kondisi sel
- Memanen sel sesuai dengan protokol panen
- Menghitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan RPMI 1640 sesuai kebutuhan mengikuti protokol penghitungan sel (jumlah sel untuk dibutuhkan untuk uji ROS adalah 5×10^5 sel/sumuran (5×10^5 sel/100 μl MK))
- Mentransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μl
- Menyisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media
- Mengamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel, didokumentasikan dengan kamera
- Menginkubasi sel di dalam inkubator selama 24 jam
- Jika dalam waktu 24 jam kondisi sel belum pulih, inkubasikan kembali
- membuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol DMSO) sesuai dengan protokol preparasi sampel
- Mengambil *plate* yang telah berisi sel dari inkubator
- Membuang media sel dengan cara balikkan *plate* 180° di atas tempat buangan, kemudian tekan *plate* secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan
- Mencuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100 μl PBS
- Membuang PBS, ditiriskan sisa cairan dengan tisu
- Memasukkan 100 μl seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo)

- Menginkubasi di dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ selama 24 jam
- Menjelang akhir waktu inkubasi, didokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan
- Mengambil supernatan dari 48 *well plate*
- Membuang media sel, dicuci dengan PBS sebanyak 1x
- Menambahkan reagen 100 μl NBT ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media
- Menginkubasi sel selama 1 jam di dalam ruangan gelap
- Memfiksasi sel dengan ethanol absolut
- Membungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan pada tempat gelap (suhu ruangan) selama 15 menit
- Ethanol absolut diambil dari 48 *well plate*
- Menambahkan larutan KOH dan DMSO hingga terbentuk blue formazan
- Menghidupkan ELISA reader, di tunggu proses *progressing* hingga selesai
- Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate* dan masukkan ke dalam ELISA reader
- Membaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader dengan $\lambda=570$ dengan menekan tombol *START*
- Level ROS dihitung dengan cara :

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 16,0 for Windows 7*. Dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Uji statistik data menggunakan one way ANOVA. Untuk mengetahui pengaruh dosis daun salam dan daun sirih merah serta kombinasinya terhadap aktivitas antiproliferasi, apoptosis dari aktivasi caspase-3, aktivasi NFkB, aktivasi HSP70, aktivasi Fas/CD95 dan level ROS. Dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p =$

0,05) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Apabila diperoleh $p > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan/pengaruh yang signifikan, sebaliknya bila $p < 0,05$ menunjukkan ada perbedaan/pengaruh yang signifikan.

