

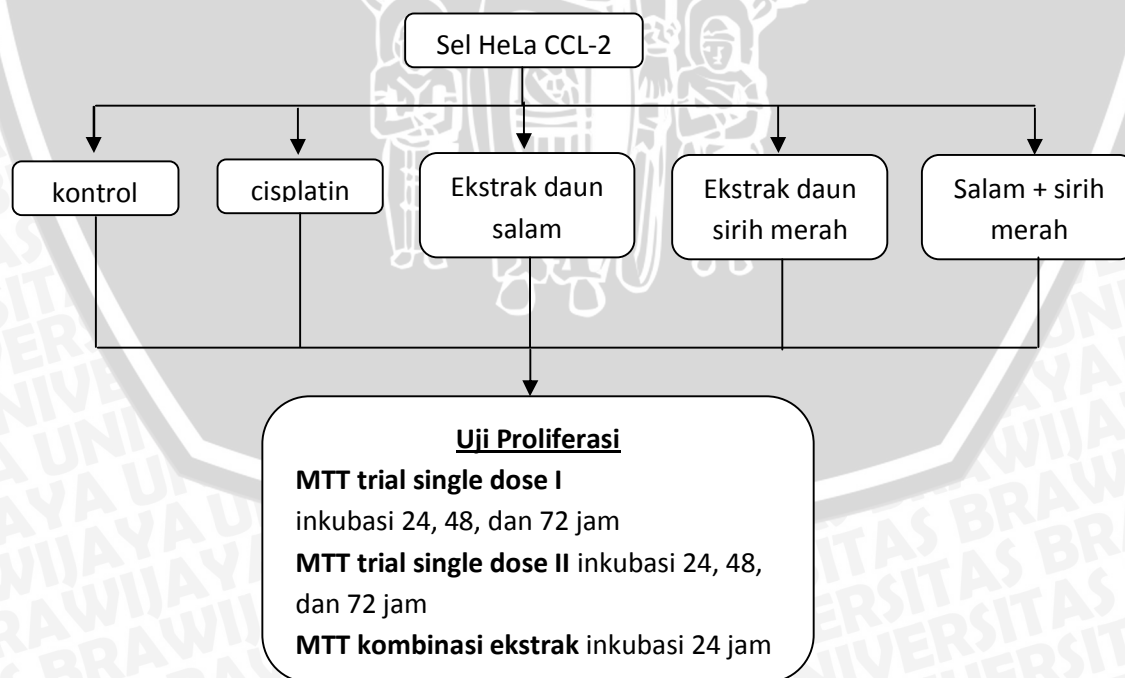
BAB IV METODE PENELITIAN

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, kontrol group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi kedua ekstrak terhadap efektifitas terapi dalam menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis sel HeLa CCL-2 dengan dosis yang efektif serta mengetahui jalur mekanisme dari aktivitas antikankernya. Berikut adalah desain penelitian ini:

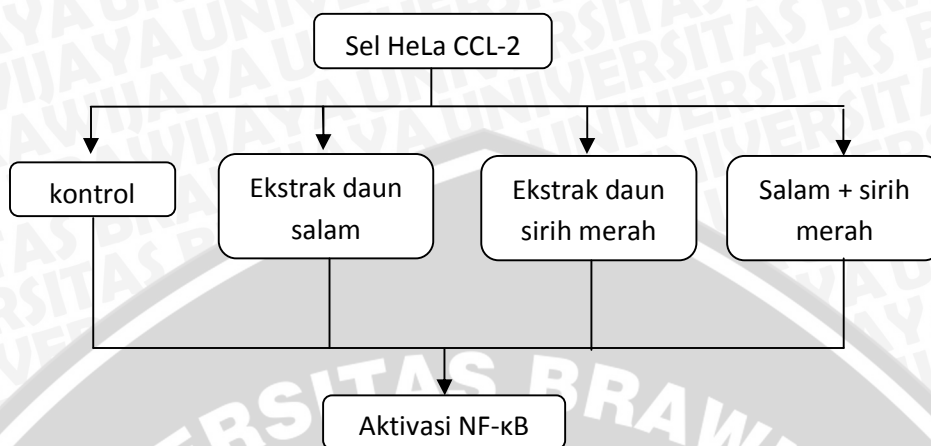
4.1.1 Optimalisasi Terapi

4.1.1.1 Uji Aktivitas Antikanker (Antiproliferasi dan Induksi Apoptosis)



Bagan 4.1.1.1. Desain Penelitian Uji Aktivitas Antikanker.

4.1.1.2 Uji Jalur Mekanisme Antikanker



Bagan 4.1.1.2. Desain Penelitian Uji Jalur Mekanisme Antikanker.

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 soklet : 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 soklet : 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 soklet : 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 109,68 µg/mL.

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

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

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

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

Salam maserasi 2,54 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.

Salam maserasi 81,28 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.

Salam maserasi 40,64 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.

Salam maserasi 20,32 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.

Salam maserasi 10,16 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.

Salam maserasi 5,08 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.

Salam maserasi 2,54 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/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 5,08 µg/mL + Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.

Salam maserasi 2,54 µg/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 5,08 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam maserasi 2,54 µg/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 5,08 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam maserasi 2,54 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam maserasi 81,28 µg/mL +	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam maserasi 40,64 µg/mL +	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam maserasi 20,32 µg/mL +	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam maserasi 10,16 µg/mL +	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam maserasi 5,08 µg/mL +	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam maserasi 2,54 µg/mL +	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam soklet 92,96 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.
Salam soklet 46,48 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.
Salam soklet 23,24 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.
Salam soklet 11,62 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.
Salam soklet 5,81 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.
Salam soklet 2,905 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 109,68 µg/mL.
Salam soklet 92,96 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.
Salam soklet 46,48 µg/mL +	Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.

Salam soklet 23,24 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.
Salam soklet 11,62 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.
Salam soklet 5,81 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.
Salam soklet 2,905 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 54,84 µg/mL.
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.
Salam soklet 46,48 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.
Salam soklet 23,24 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.
Salam soklet 11,62 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.
Salam soklet 5,81 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.
Salam soklet 2,905 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 27,42 µg/mL.
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam soklet 46,48 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam soklet 23,24 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam soklet 11,62 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam soklet 5,81 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam soklet 2,905 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 13,71 µg/mL.
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam soklet 46,48 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam soklet 23,24 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam soklet 11,62 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam soklet 5,81 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam soklet 2,905 µg/mL	+	Sirih Merah Maserasi 6,88 µg/mL.
Salam soklet 92,96 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam soklet 46,48 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.
Salam soklet 23,24 µg/mL	+	Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.

Salam soklet 11,62 µg/mL + Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.

Salam soklet 5,81 µg/mL + Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.

Salam soklet 2,905 µg/mL + Sirih Merah maserasi 3,44 µg/mL.

Dosis Imunositokimia NF-κB

Salam maserasi : 10,16 µg/mL dan 20,32 µg/mL.

Salam soklet : 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 soklet 11,62 µg/mL + Sirih merah maserasi 13,71 µg/mL.

Salam soklet 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 serviks 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 soklet dengan konsentrasi 3,3 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 6,6 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 13,2 µg/mL.

- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 26,4 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 52,8 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 105,6 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 211,2 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 422,4 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 4,8 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 4,8 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 9,6 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 19,2 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 38,4 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 76,8 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 153,6 µg/mL.

- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 307,2 µg/mL.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet 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 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 40,64 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 1,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 3,43 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 6,85 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 1,45 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 2,9 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 5,81 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 11,62 $\mu\text{g/mL}$.

- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 23,24 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 46,48 $\mu\text{g/mL}$.
- Dua sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah soklet dengan konsentrasi 614,4 $\mu\text{g/mL}$.

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 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 109,68 $\mu\text{g/mL}$.

- 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 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 54,84 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 54,84 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 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 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 2,54 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 81,28 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 40,64 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 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 5,08 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 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 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 6,88 $\mu\text{g/mL}$.

- 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 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 3,44 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 3,44 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 3,44 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 3,44 $\mu\text{g/mL}$.

- 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 3,44 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 3,44 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 92,96 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 46,48 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 23,24 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 11,62 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 5,81 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 2,905 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 109,68 $\mu\text{g/mL}$.

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 92,96 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 46,48 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 54,84 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 2,905 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 92,96 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 46,48 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 23,24 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 11,62 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.

- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 5,81 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 2,905 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 92,96 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 46,48 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 6,88 $\mu\text{g/mL}$.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 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 soklet 2,905 $\mu\text{g/mL}$ + ekstrak daun sirih merah maserasi 3,44 $\mu\text{g/mL}$.

Pengujian IV : Imunositokimia NF- κ B

$P (n-1) \geq 15$

$10 (n-1) \geq 15$

$n-1 \geq 1,5$

$n \geq 3$

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 soklet dengan konsentrasi 11,62 µg/mL.
- Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 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 soklet 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 soklet 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 dan daun sirih merah. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah kecepatan proliferasi dan aktivasi NF- κ B pada sel 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:

- 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

4.5.1 Bahan Penelitian

4.5.1.1 Bahan Kultur Sel HeLa

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

4.5.1.2 Bahan Uji Proliferasi Sel HeLa dengan MTT

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 (Trevigen, MD).

4.5.1.3 Bahan Uji Aktivasi NF- κ B

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

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 :

4.5.2.1 Peralatan Kultur Sel HeLa

Laminar air-flow, inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO₂, mikroskop cahaya, *wellplate*- (24, 48, 96), sentrifuge, pipet kultur, mikro pipet, conical tube, Filter 0.2 μm , tip berwarna biru, tip berwarna kuning, dan tissu.

4.5.2.2 Peralatan Uji Proliferasi Sel HeLa

Laminar air-flow, inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO₂, mikroskop cahaya, *wellplate*- 96, sentrifuge, pipet kultur, mikro pipet -(20, 200, 1000 μL), conical tube, Filter 0.2 μm , tip berwarna biru, tip berwarna kuning, vortex, mikroplate reader, aluminium foil, tissu, dan tempat buang untuk media bekas.

4.5.2.3 Peralatan Imunositokimia NF- κ B

Mikropipet (-20, 200, 1000 μ L), tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, gelas ukur, *cover slip*, *object glass*, *24-well plate*, tip berwarna biru, tip berwarna kuning, dan buangan untuk media bekas.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- **Proliferasi sel** merupakan peningkatan jumlah sel sebagai hasil dari pertumbuhan dan pembelahan sel (Ghobrial *et. al.*, 2005).
- **Apoptosis** atau kematian sel secara terprogram untuk mengontrol proliferasi sel maupun respon terhadap kerusakan DNA pada sel (Ghobrial *et. al.*, 2005).
- **NF- κ B** merupakan faktor transkripsi pada inti sel yang mengatur ekspresi dari berbagai gen yang mengatur apoptosis, replikasi virus, tumorigenesis, inflamasi, dan berbagai macam penyakit autoimun (Ghobrial *et. al.*, 2005).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur sel HeLa

4.7.1.1 Penumbuhan sel

- Menyiapkan aliquot 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, 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.

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 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, mendinginkan selama 24, 48, dan 72 jam.
- larutan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanya dicuci dengan medium sel kembali.

4.7.3 Uji proliferasi sel

- 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 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 .
- 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ (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 sampai 10 mL.
- Membuang media sel, dicuci dengan PBS sebanyak 1kali.
- Menambahkan reagen 100 μ L 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 cahaya. 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 mikroplate reader dengan $\lambda=550-600$ nm (595 nm) dengan menekan tombol *START*.
- Persentase proliferasi dihitung dengan rumus :

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

4.7.4 Imunositokimia NF- κ B

- 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.
- Mengisikan PBS masing-masing 500 μ L 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 CO_2 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.
- mengisi 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 μL PBS pada *cover slip*, diamkan selama 5 menit., ambil dan buang PBS dengan mikropipet 1 mL, lakukan pencucian dengan PBS 2 kali.
- Menambahkan 500 μL 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 100–400 μL antibodi primer (NF- κB) yang telah encerkan dengan FBS 1:200.
- Diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang.
- Menambahkan 500 μL PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
- Meneteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*), inkubasi selama 10 menit.
- Menambahkan 500 μL PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
- Meneteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit.
- Menambahkan 500 μL PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
- meneteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit.
- Menambahkan 500 μL akuades, kemudian buang kembali.
- Meneeteskan larutan Mayer Haematoxylin, inkubasi selama 3 menit.
- Menambahkan 500 μL 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.

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 16 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, aktivasi caspase-3, dan aktivasi NF- κ B. 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.

