

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang diambil di Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau (*Piper betle* L.), daun yang dipilih adalah daun yang segar, tidak rusak, tidak terkena hama, dan berwarna hijau tua. Fraksi diperoleh dari ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstraksi etanol 96% daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dilanjutkan menjadi fraksi n-heksana, etil asetat, dan air secara ekstraksi cair-cair. Variabel utama penelitian yang kedua adalah aktivitas sitotoksik fraksi ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) terhadap sel kanker payudara T47D dan sel normal Vero menggunakan MTT- Assay.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang terdiri dari fraksi n-heksana (nonpolar), etil asetat (semipolar), dan air (polar).

Variabel terikat adalah hasil atau respons yang diukur dalam penelitian sebagai dampak dari perlakuan terhadap variabel bebas. Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aktivitas sitotoksik yang ditunjukkan oleh nilai viabilitas sel (menggunakan MTT Assay) terhadap sel kanker T47D dan sel normal Vero.

Variabel kontrol (terkontrol) adalah variabel yang dijaga konstan selama proses penelitian agar tidak memengaruhi hasil, meliputi jenis sel (T47D dan Vero), volume dan konsentrasi sampel, lama inkubasi, suhu dan kondisi kultur sel selama uji.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun sirih hijau adalah daun segar yang diambil dari tawangmangu. Daun yang dipilih merupakan daun yang segar, tidak

rusak, tidak terkena hama, dan berwarna hijau tua.

Kedua, serbuk daun sirih hijau adalah serbuk yang diperoleh dari daun sirih hijau segar yang dikeringkan lalu dibuat menjadi serbuk dan kemudian di ayak menggunakan ayakan mesh no 60.

Ketiga, ekstrak etanol daun sirih hijau adalah ekstrak yang diperoleh dari serbuk daun sirih hijau yang di maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian diuapkan dengan rotary evaporator.

Keempat, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air adalah fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol daun sirih hijau yang difraksinasi dengan Ekstraksi Cair-Cair dengan pelarut sesuai tingkat kepolarannya. N-heksan pelarut non polar, etil asetat pelarut semi polar, dan air pelarut polar. Hasil fraksinasi diuapkan dengan waterbath

Kelima, sel T47D adalah sel kanker payudara yang dikultur di laboratorium parasitologi Universitas Gadjah Mada yang kemudian siap digunakan untuk uji sitotoksik.

Keenam, sel Vero adalah sel normal manusia yang dikultur di laboratorium parasitologi Universitas Gadjah Mada yang kemudian siap digunakan untuk uji sitotoksik.

Ketujuh, uji sitotoksik adalah uji untuk mengetahui kemampuan suatu sampel bersifat toksik yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker T47D dan sel normal Vero. Uji sitotoksik menggunakan metode MTT yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Hasilnya kemudian di hitung untuk menentukan nilai IC_{50} .

Kedelapan, fraksi yang paling aktif adalah fraksi yang memiliki aktivitas sitotoksik sebanding dengan kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dan sel normal Vero. Penentuan aktivitas sitotoksik berdasarkan persentase viabilitas dan ditentukan nilai IC_{50} .

Kesembilan, selektivitas adalah suatu sampel yang mampu memberikan efek toksik yang lebih besar terhadap sel target tertentu seperti sel kanker dibandingkan sel normal, sehingga menunjukkan tingkat keamanan terhadap sel normal. Nilai indeks selektivitas berdasarkan perbandingan nilai IC_{50} pada sel normal terhadap nilai IC_{50} pada sel kanker.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik,

pisau, blender, ayakan mesh no 60, wadah maserasi, toples kaca, batang pengaduk, erlenmeyer, gelas ukur, corong, kertas saring, rotary evaporator, alat destilasi, water bath, beaker glass, corong pisah, kurs, oven, desikator, vial, tabung reaksi, chamber, pipa kapiler, pipet tetes, Laminar Air Flow (LAF), inkubator CO₂, culture flask kecil, eppendorf steril, cryotube, mikroskop, hemositometer, counter, centrifuge, mikropipet, *microplate* 96, dan spektrofotometri ELISA Reader.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan meliputi daun sirih

hijau segar (*Piper betle* L.) sebagai bahan utama yang akan diekstraksi dan difraksinasi, serta dua jenis sel, yaitu sel kanker payudara T47D sebagai sel uji dan sel normal Vero sebagai sel pembanding dalam uji selektivitas, cisplatin digunakan sebagai kontrol positif.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan antara lain etanol 96%, n- heksana, etil asetat, akuades, media RPMI-1640 dan DMEM, Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin- streptomisin, trypsin-EDTA, PBS, reagen MTT, DMSO, stopper SDS.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan pada tahap pertama penelitian untuk memastikan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan karakteristik morfologi yang terdapat pada tanaman daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi.

2. Pengambilan Sampel

Sampel daun sirih hijau (*Piper betle* L.) diambil di Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar yang teridentifikasi bebas dari hama dan polusi. Daun yang dipilih adalah daun segar, tidak rusak, dan berwarna hijau tua. Daun sirih segar yang telah dikumpulkan kemudian dicuci dengan bersih dan disortasi basah untuk menghilangkan kotoran dan bahan asing lainnya. Selanjutnya, daun dikeringkan diikuti dengan sortasi kering untuk memastikan tidak ada kontaminan yang tersisa dalam simplisia (Priyadi *et al.*, 2025).

3. Pembuatan Serbuk Simplisia

Simplisia daun sirih hijau yang sudah dikeringkan kemudian dihaluskan dan diayak dengan diayak menggunakan ayakan mesh no. 60 (Aini *et al.*, 2023), Semakin kecil ukuran partikel (semakin besar luas permukaan), maka semakin luas kontak serbuk–pelarut permukaan kontak antara serbuk dan pelarut sehingga senyawa dapat ditarik dengan maksimal. Rumus Rendemen bobot serbuk terhadap bobot kering daun sirih hijau :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot serbuk daun sirih hijau (g)}}{\text{Bobot kering daun sirih hijau(g)}} \times 100\%$$

4. Identifikasi Serbuk Daun Sirih Hijau

4.1 Pemeriksaan organoleptis serbuk. Pemeriksaan organoleptis serbuk dilakukan dengan tujuan mengetahui sifat fisik dan kualitas serbuk dilihat dari segi warna, bentuk, dan aroma (Priyadi *et al.*, 2025).

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk. Penetapan susut pengeringan berdasarkan (Farmakope Herbal Indonesia 2017), menimbang tepat serbuk sebanyak 1 hingga 2 gram dalam kurs dengan tutup rapat yang lebih dahulu sudah dipanaskan dengan suhu oven 105°C dengan suhu penentuan dan ditara. Buka tutupnya, kemudian keringkan dengan suhu penentuan sampai bobot tetap, yaitu selisih antara dua penimbangan berturut-turut 0,0001-0,0005 g. Sebelum setiap pengeringan, diamkan kurs dalam eksikator sampai suhu ruang. Berdasarkan persyaratan, susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10%. Rumus susut pengeringan :

$$\frac{\text{Bobot serbuk sebelum dikeringkan} - \text{bobot serbuk setelah dikeringkan (g)}}{\text{Bobot serbuk sebelum dikeringkan(g)}} \times 100\%$$

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih hijau dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut yang sesuai dimana 1 bagian serbuk simplisia ditambahkan dengan 10 bagian pelarut (Kemenkes RI, 2017). Serbuk daun sirih hijau ditimbang sebanyak 300 g dan dimasukkan ke dalam wadah stoples kaca yang gelap, kemudian ditambahkan etanol 96% sebagai pelarut sebanyak 3000 mL dengan perbandingan (1:10). Maserasi pada suhu ruang $\pm 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$ selama 3 hari dengan pengadukan setiap 6 jam sekali. Lalu filtrat disaring dengan kain flanel dan kertas saring hingga didapat filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh ditampung. selanjutnya, residu diremaserasi dengan etanol 96% dengan menambahkan etanol 96% sebanyak 1500 mL, kemudian saring dengan

kain flanel dan kertas saring. Kumpulkan semua filtrat, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* $\pm 55-58^{\circ}\text{C}$ hingga didapatkan ekstrak kental (Mulangsari *et al.*, 2022). Kemudian, dihitung rendemen yang diperoleh :

$$\text{Rendemen ekstrak} : \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (gram)}}{\text{Bobot simplisia yang ditimbang (gram)}} \times 100\%$$

6. Pengujian Kadar Air Ekstrak

Pengujian kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen dengan cara memasang rangkaian alat terlebih dahulu. Ekstrak etanol daun sirih hijau ditimbang sebanyak 20 gram, dimasukkan ke dalam labu kering. Selanjutnya dimasukkan toluen yang sudah dijenuhkan ke dalam labu. Toluena yang telah dijenuhkan dengan air dialirkan ke dalam tabung penerima melalui pendingin hingga mencapai bagian leher alat penampung. Labu kemudian dipanaskan secara perlahan selama ± 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, proses destilasi diatur dengan laju sekitar 2 tetes per detik sampai sebagian besar air terdestilasi. Selanjutnya, laju destilasi ditingkatkan menjadi ± 4 tetes per detik dan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima kemudian didinginkan hingga mencapai suhu ruang, dan volume air ditentukan setelah fase air dan toluen terpisah secara sempurna. Volume air dibaca sesudah toluen dan air memisah sempurna. Kadar air dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air ekstrak} : \frac{\text{Volume air yang tertampung (mL)}}{\text{Bobot ekstrak yang ditimbang (gram)}} \times 100\%$$

7. Uji Bebas Etanol Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Identifikasi bebas etanol dilakukan dengan uji esterifikasi, yaitu menimbang ekstrak daun sirih hijau sebanyak 0,1 gram lalu ditambahkan 1 mL asam asetat glasial dan 1mL asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Hasil uji dinyatakan positif apabila tidak tercium bau khas ester yang berasal dari etanol (Vifta *et al.*, 2017).

8. Pembuatan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

Pembuatan fraksi dari ekstrak etanol daun sirih hijau dilakukan dengan metode ekstraksi cair–cair menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda, yaitu n-heksana untuk fraksi nonpolar, etil asetat untuk fraksi semipolar, dan air untuk fraksi polar. Fraksinasi direplikasi sebanyak tiga kali. Sebanyak 10 g ekstrak etanol kental dihomogenkan dengan 10 mL etanol 96% (perbandingan 1:1) untuk mempermudah proses pelarutan sebelum dilakukan partisi. Perbandingan ekstrak yang sudah dilarutkan tersebut dengan n-heksan adalah 1:7,5. Maka, n-heksan

yang digunakan yaitu 75 mL, kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 65 mL. Kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair dengan corong pisah ± 5 menit dengan dilakukan venting secara berkala, kemudian didiamkan hingga terbentuk dua fase yang terpisah. Partisi diulang 10-13 kali hingga fase n-heksan tampak jernih. Lapisan atas merupakan n-heksan dan lapisan bawah merupakan air. Fraksi n-heksan yang didapat kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 50°C.

Residu fase air selanjutnya dipartisi dengan etil asetat sebanyak 75 mL menggunakan prosedur yang sama. Kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair dengan corong pisah ± 5 menit dengan venting secara berkala dan didiamkan hingga terbentuk dua fase. Partisi dengan etil asetat diulang sebanyak 5–8 kali hingga lapisan etil asetat tampak jernih. Fraksi etil asetat yang diperoleh digabungkan dan diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C. Fraksi air merupakan fase sisa setelah proses partisi dengan n-heksan dan etil asetat. Fraksi ini kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C. Setelah itu, didapatkan bobot akhir dari ketiga fraksi tersebut dan disimpan dalam wadah tertutup (Chairunisa *et al.*, 2022). Rendemen fraksi dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen fraksi} : \frac{\text{Bobot fraksi yang diperoleh (gram)}}{\text{Bobot ekstrak yang ditimbang (gram)}} \times 100\%$$

9. Identifikasi Kandungan Senyawa Dalam Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

9.1 Uji alkaloid. Sebanyak 0,1 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan masing-masing 2 mL kloroform dan 2 mL amonia, selanjutnya dikocok hingga homogen dan ditambahkan HCl 2 N. Larutan hasil perlakuan kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambahkan pereaksi Dragendorff, Mayer, dan Wagner. Pembentukan endapan merah atau jingga pada pereaksi Dragendorff, endapan putih pada pereaksi Mayer, serta endapan coklat pada pereaksi Wagner menunjukkan hasil positif adanya senyawa alkaloid. (Kursia *et al.*, 2016).

9.2 Uji flavonoid. Sebanyak 0,1 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mg serbuk magnesium dan selanjutnya ditetesi HCl pekat sebanyak tiga tetes. Terbentuknya warna kuning hingga jingga menunjukkan hasil positif adanya senyawa flavonoid. (Kursia *et al.*, 2016).

9.3 Uji tanin. Sebanyak 0,1 g sampel direaksikan dengan tiga tetes larutan FeCl_3 1%. Munculnya perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua menandakan hasil positif adanya senyawa tanin. (Kursia *et al.*, 2016).

9.4 Uji saponin. Sebanyak 0,1 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air hangat atau panas dan dikocok selama ± 30 detik hingga terbentuk busa. Larutan dibiarkan selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan HCl 2 N. Apabila busa tetap stabil dan tidak hilang, maka hasil tersebut menunjukkan adanya senyawa saponin. (Kursia *et al.*, 2016).

9.5 Uji triterpenoid dan steroid. Sebanyak 0,1 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes asam asetat dan 2 mL H_2SO_4 pekat. Perubahan warna menjadi merah jingga menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menandakan hasil positif steroid. (Aini *et al.*, 2023)

10. Identifikasi Kandungan Senyawa Kromatografi Lapis Tipis Dalam Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau

10.1 Alkaloid. Kromatogram diperoleh dengan cara menotolkan baku pembanding kafein, sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air pada fase diam lempeng silika gel GF₂₅₄ dan menggunakan fase gerak toluen : etil asetat : dietilamina (7:2:1) dan bercak yang terbentuk diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian, plat KLT disemprot dengan pereaksi dragendorff.

10.2 Flavonoid. Kromatogram diperoleh dengan cara menotolkan baku pembanding quercetin, sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air pada fase diam lempeng silika gel GF₂₅₄ dan menggunakan fase gerak chloroform : etil asetat (6:4) dan bercak yang terbentuk diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian, plat KLT disemprot dengan pereaksi sitroborat.

10.3 Tanin. Kromatogram diperoleh dengan cara menotolkan baku pembanding asam galat, sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air pada fase diam lempeng silika gel GF₂₅₄ dan menggunakan fase gerak chloroform : metanol (9:1) dan bercak yang terbentuk diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian, plat KLT disemprot dengan pereaksi FeCl_3 .

10.4 Triterpenoid. Kromatogram diperoleh dengan cara menotolkan baku pembanding stigmasterol, sampel ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air pada fase diam lempeng silika

gel GF₂₅₄ dan menggunakan fase gerak n-heksan : etanol (1:1) dan bercak yang terbentuk diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian, plat KLT disemprot dengan pereaksi anisaldehyd.

11. Ethical Clearence (EC)

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2016 yang mengatur tentang pelaksanaan penelitian dan pengembangan di bidang kesehatan, setiap kegiatan penelitian yang melibatkan subjek manusia atau hewan uji wajib mematuhi prinsip-prinsip etika penelitian yang berlaku. Penelitian ini merupakan bagian dari upaya untuk mendukung pelayanan kesehatan guna meningkatkan kualitas kesehatan masyarakat secara optimal. prosedur *ethical clearence* untuk penelitian ini dilakukan di Universitas Muhammadiyah Surakarta.

12. Uji Sitotoksik Terhadap Sel T47D Dan Vero

12.1 Pembuatan media kultur. Pembuatan media kultur dilakukan dalam LAF. Media RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) dan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) disiapkan dengan melarutkan bubuk media ke dalam 950 mL akuabides masing masing beaker glass berukuran 1000mL aduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan 2,2 gram NaHCO₃ dan diaduk hingga homogen kemudian ditambahkan akuabides hingga 1 liter. Campuran diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai seluruh media dan NaHCO₃ larut sempurna, dilanjutkan dengan penyesuaian pH sekitar 0,2–0,3 di bawah pH yang diinginkan menggunakan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Media kemudian difiltrasi menggunakan filter 0,2 µm ke dalam botol Duran 1000 mL secara aseptis di dalam LAF, diberi label, dan disimpan pada suhu 4 °C (CCRC, 2010).

12.2 Pembuatan media kultur lengkap. Media kultur yang sudah dibuat, sebanyak 100mL ditambahkan dengan FBS 10 % dan penisilin streptomisin 1 % (CCRC, 2010).

12.3 Penumbuhan Sel T47D dan Sel Vero. Sel T47D dan Vero diambil dari cryotube yang disimpan di tangki nitrogen cair lalu dicairkan. Setelah itu, sel dicuci dengan media yang sesuai. Sel kemudian disentrifugasi conical tube, supernatan dibuang, dan sel diresuspensi dengan 4 mL media kultur baru hingga homogen. Masing-masing 2 mL suspensi sel dipindahkan ke dua dish baru, ditambahkan 5 mL media masing-masing, kemudian diinkubasi semalam dalam CO₂. (CCRC, 2010).

12.4 Pemeliharaan dan penggantian media. Media yang lama dibuang secara perlahan, kemudian dish dicuci dengan 3mL PBS lalu ditambahkan media baru yang sesuai 5-7mL. Diinkubasi kembali ke dalam inkubator CO₂ , kemudian diamati dengan mikroskop untuk memastikan sel tumbuh dengan baik(CCRC, 2010).

12.5 Panen sel T47D dan sel Vero. Sel diambil dari inkubator CO₂, lalu media dibuang dengan mikropipet. Sel dicuci dua kali dengan PBS untuk menghilangkan FBS yang dapat menonaktifkan tripsin. Tripsin-EDTA 0,25% ditambahkan secara merata untuk melepaskan sel dan diinkubasi 3 menit, kemudian diinaktivasi dengan media ± 5 mL. Sel dipindahkan ke conical tube steril baru (CCRC, 2010).

12.6 Perhitungan sel. Sel dihitung dengan hemositometer, dan hand counter di bawah mikroskop. Hemositometer terdiri atas empat kamar hitung, di mana setiap kamar tersusun dari 16 kotak. Sel yang berwarna gelap (sel mati) serta sel yang berada pada batas luar kotak tidak dimasukkan dalam perhitungan. Jumlah sel selanjutnya ditentukan menggunakan rumus perhitungan sel :

$$\frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik}}{4} \times 10^4 / \text{mL}.$$

Jumlah sel yang telah diketahui selanjutnya digunakan untuk menentukan total sel yang dibutuhkan. Sel yang dibutuhkan untuk 100 sumuran (dibuat lebih). (CCRC, 2010). Sel yang dibutuhkan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Jumlah sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung}}$$

12.7 Larutan uji sampel. Larutan uji dibuat dengan cara melarutkan 20 mg sampel dengan 200 µL DMSO Sampel terdiri dari ekstrak etanol daun sirih hijau, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air. Selanjutnya dibuat larutan dengan seri kadar (500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625) µg/mL untuk sel kanker payudara T47D dan sel normal Vero, pembuatan larutan stok maupun pengenceran seri untuk perlakuan dilakukan secara aseptik di dalam LAF.

12.8 Larutan uji cisplatin. Serbuk cisplatin 10 mg dilarutkan dalam 10 mL NaCl0,9%. Larutan kemudian disaring steril menggunakan filter 0,22 µm sebelum diaplikasikan ke kultur sel. Dari stok tersebut, dibuat seri pengenceran dengan rentang konsentrasi (500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625) µg/mL.

13. Uji Sitotoksik Menggunakan MTT

Microplate 96-well diisi dengan 100 µL suspensi sel kanker payudara T47D dalam media RPMI-1640, dan 100 µL suspensi sel sel normal Vero dalam media DMEM, inkubasi semalam kemudian buang media. Selanjutnya, 100 µL PBS dimasukkan dalam semua microplate, kemudian buang PBS, sisa cairan ditiriskan dengan tisu. 100 µL sampel dimasukkan ke setiap sumuran, termasuk ekstrak etanol daun sirih hijau, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, dan cisplatin dengan konsentrasi bertingkat (500; 250; 125; 62,5; 31,25; dan 15,625 µg/mL) masing-masing ke plate yang berbeda direplikasi tiga kali atau triplo. Konsentrasi DMSO akhir dalam sumuran diperkirakan <0,5%. Selain perlakuan sampel, disertakan juga kontrol sel, yaitu tanpa perlakuan. Ditambahkan juga kontrol media yang hanya berisi media, kemudian diinkubasi 24 jam.

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT terhadap sel normal Vero dan sel kanker payudara T47D. *Microplate* yang berisi media dan sampel dibuang, kemudian ditambahkan PBS 100 µL tiap sumuran lalu buang. Selanjutnya ditambahkan dengan MTT 100 µL tiap sumuran termasuk kontrol media. Inkubasi selama 4 jam dalam inkubator CO₂. Sel hidup akan bereaksi dengan reagen MTT membentuk formazan. Setelah di inkubasi, amati menggunakan mikroskop, dilakukan penambahan 100 µL *stopper* SDS 10%. Kemudian, inkubasi plate dalam tempat gelap dan suhu kamar dengan cara membungkus plate dengan alumunium foil selama semalam. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan ELISA reader (CCRC, 2010).

14. Analisis Data

Data hasil uji sitotoksik dianalisis dengan menghitung persentase viabilitas sel berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan spektrofotometer (ELISA reader). Persentase viabilitas sel dihitung dengan membandingkan absorbansi perlakuan terhadap kontrol menggunakan rumus:

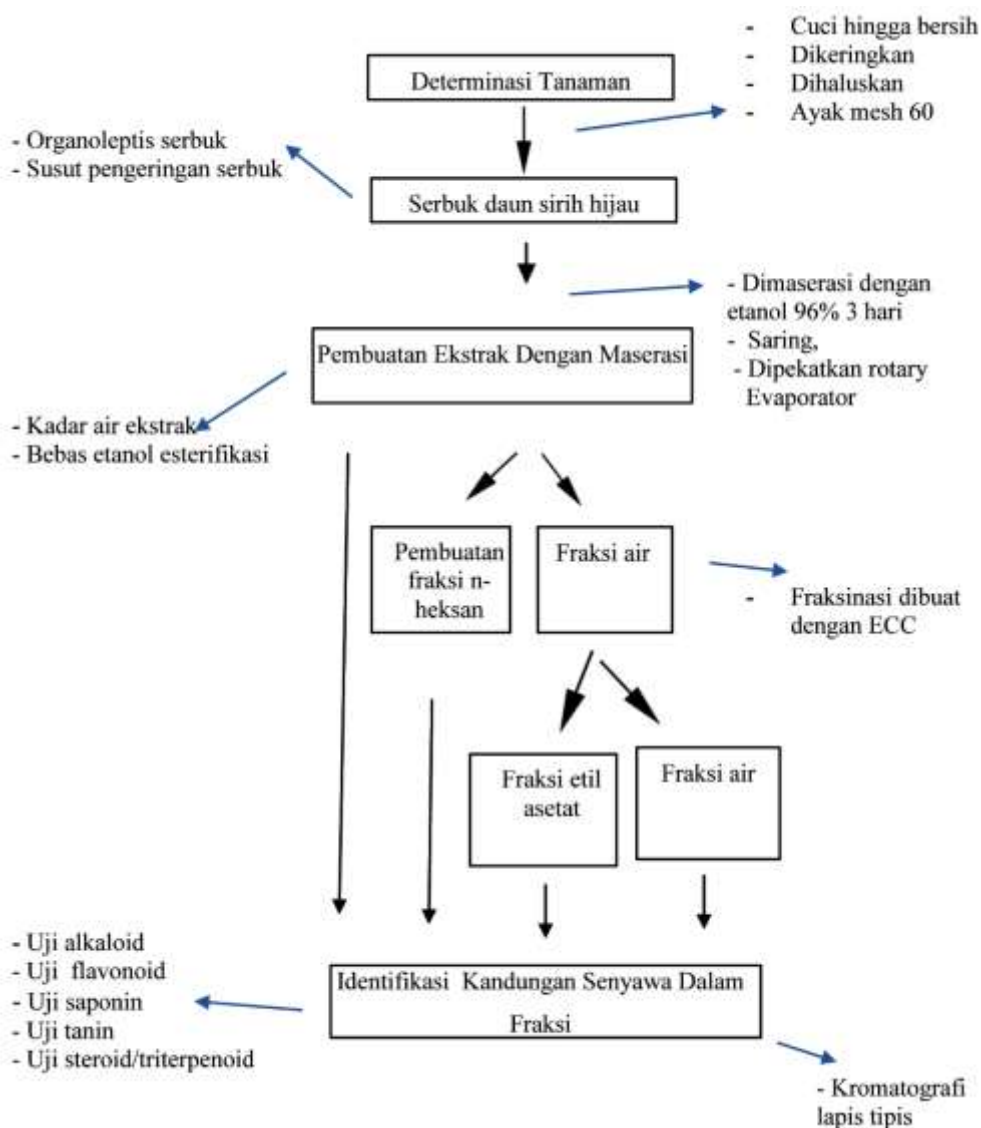
$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100$$

Nilai viabilitas pada berbagai konsentrasi larutan uji kemudian diplot ke dalam grafik dan persamaan regresi linier untuk menentukan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan sel sebesar 50%. Penentuan IC₅₀ dilakukan menggunakan dengan perangkat lunak statistik seperti Microsoft Excel dan GraphPad Prism. Perbandingan

nilai IC_{50} antara sel kanker dan sel normal digunakan untuk menghitung indeks selektivitas yang merupakan indikator selektivitas senyawa terhadap sel kanker (Wardihan *et al.*, 2013). Sampel dianggap memiliki selektivitas tinggi jika nilai $IS \geq 3$, sedangkan jika nilai $IS < 3$, sampel tersebut dikategorikan memiliki selektivitas rendah. (Sirait *et al.*, 2019) Indeks selektivitas dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Indeks selektivitas} = \frac{IC_{50} \text{ sel Vero}}{IC_{50} \text{ sel T47D}}$$

E. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema pembuatan sampel

Menyiapkan media RPMI – 1640 dan DMEM, tambah FBS 10% dan penisilin streptomisin

Media dibuang, dicuci dua kali dengan PBS, tripsin EDTA, inkubasi 3menit. Menambahkan media menonaktifkan tripsin, sel dipindah tube baru.

Media dibuang, cuci 100 μ L PBS, 100 μ L sampel seri konsentrasi, inkubasi 24–48jam.

Pembuatan media kultur

Penumbuhan sel T47D dan sel Vero

Pemeliharaan dan pergantian media

Panen sel T47D dan Vero

Perhitungan sel

Pembuatan larutan uji sampel

Uji sitotoksik

Mencairkan sel dari cryotube, cuci media sentrifugasi, kultur kembali dan ditumbuhkan ke dish baru. Inkubasi CO₂

Media lama dibuang, dish dicuci PBS, tambah media baru 5-7mL. Inkubasi CO₂. Amati mikroskop.

Sel dihitung dengan hemositometer dan handcounter. Sel yang diperlukan tambahkan dalam plate, inkubasi

Sampel 20mg dilarutkan 200 μ L DMSO, dibuat 6 seri konsentrasi

Media dibuang, cuci 100 μ L PBS, 100 μ L MTT hingga membentuk formazan, inkubasi 4jam, amati, 100 μ L stopper SDS 10%, inkubasi Baca absorbansi ELISA reader

Gambar 5. Skema uji sitotoksik