

## BAB III METODE PENELITIAN

### 1.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Menurut Ratminingsih (2010), penelitian eksperimental adalah penelitian yang memiliki tujuan untuk mencari hubungan kausal (sebab-akibat) dari satu perlakuan (variabel bebas) terhadap perlakuan atau variabel lainnya (variabel terikat). Penelitian ini akan melakukan eksperimen terhadap penuaan dini sel dan ekspresi gen *p53* dan *Bcl-2* pada lini sel kanker payudara (MCF-7).

### 1.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2023 sampai dengan Februari 2024. Uji *senescence*, qRT-PCR ekspresi gen *p53* dan *Bcl-2* dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Utama Biomolecular and Biomedical Research Center, Bandung, Jawa Barat, Indonesia.

### 1.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah ekstrak jahe merah dan lini sel kanker payudara (MCF-7) yang didapatkan dari ATCC dan dipelihara di laboratorium kultur PT. Aretha Medika Utama.

### 1.4 Prosedur Penelitian

#### 1.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu terdapat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2. Selengkapnya, alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1 dan Lampiran 2.

**Tabel 3.1** Alat yang Digunakan dalam Penelitian

Alat	Spesifikasi
<b>Kultur Sel dan Subkultur Sel</b>	
<i>Biosafety Cabinet</i>	Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II
<i>CO<sub>2</sub> Incubator</i>	Thermo IH3543
<i>Centrifuge</i>	DLAB DM0412

<b>Alat</b>	<b>Spesifikasi</b>
<b>Kultur Sel dan Subkultur Sel</b>	
<i>Microscope Inverted</i>	Olympus CKX41-F32FL
<b>Plating Sel MCF-7 dan Perlakuan EJM</b>	
<i>Biosafety Cabinet</i>	Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II
<i>CO<sub>2</sub> Incubator</i>	Thermo IH3543
<i>Centrifuge</i>	DLAB DM0412
<i>Inverted Microscope</i>	Olympus CKX41-F32FL
<b>Isolasi RNA</b>	
<i>PCR cabinet</i>	Esco, 2017-122662
<i>Spektrofotometer</i>	Multiskan GO Thermo Scientific 51119300
<i>Refrigerated centrifuge</i>	MWP 260r
<b>Sintesis cDNA</b>	
<i>PCR cabinet</i>	Esco 2017-122662
<b>Kultur Sel dan Subkultur Sel</b>	
<b>Alat</b>	<b>Alat</b>
<i>Spektrofotometer</i>	Multiskan GO Thermo Scientific 51119300
<b>Uji Kuantifikasi Ekspresi Gen</b>	
<i>PCR cabinet</i>	Esco 2017-122662
<i>qRT-PCR</i>	Agilent, G8830A
<b>Uji Senescence dengan Pewarnaan <math>\beta</math>-galactosidase</b>	
<i>Microscope</i>	Olympus CKX41-F32FL

**Tabel 3.2** Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

<b>Bahan</b>	<b>Spesifikasi</b>
<b>Kultur Sel</b>	
Sel MCF-7	ATCC® HTB-22™
Medium kultur DMEM High	Biowest, L0103-500
20% Fetal bovine serum Premium/FBS	Biowest, S181B-500
1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM)	Biowest, L0010-100
0.1% Gentamicin	Gibco, 15750060
Amphotericin B	Biowest, L0009-050
MEM Vitamins 100x	Biowest, X0556-100
PBS 1x	Biowest, X0515-500
0.25% Trypsin – EDTA	Biowest, L0931-100
<b>Subkultur Sel</b>	
Medium kultur sel MCF-7	Biowest, L0103-500
Kultur lini sel MCF-7	ATCC® HTB-22™
PBS 1x	Biowest, X0515-100
0.25% Trypsin – EDTA	Biowest, L0931-100
<b>Plating Sel MCF-7 dan Perlakuan EJM</b>	
Kultur sel MCF-7	ATCC® HTB-22™
Medium kultur sel MCF-7	Biowest, L0103-500
DMSO 100% dan 10%	Merck, 1029521000
Merck, 1029521000	Gibco, 15250-100
Ekstrak Jahe Merah	
<b>Isolasi RNA</b>	
TRI reagent	R2050-1-200
Ethanol absolute	Merck 1,009,832,500
Kit isolasi RNA yang berisi: 1. RNA wash buffer	Zymo, R2073

<b>Bahan</b>	<b>Spesifikasi</b>
2. Direct-zol RNA PreWash 3. DNase I 4. DNA digestion buffer 5. DNase/RNase-free water 6. Zymo-spin IICG columns 7. Collection tubes	
<b>Sintesis cDNA</b>	
<i>Nuclease free water</i>	Thermocientific, R0581
SensiFAST cDNA Synthesis Kit	Meridian Bioscience, BIO-65054
<b>Uji kuantifikasi Ekspresi Gen</b>	
<i>Forward dan Reverse Primer Human p53</i>	Macrogen
<i>Forward dan Reverse Primer Human BCL-2</i>	Macrogen
<i>Nuclease free water</i>	Thermoscientific, R0581
Sensifast Sybr NO ROX	Meridian Bioscience, BIO-98005
<b>Uji Senescence dengan Pewarnaan <math>\beta</math>-galactosidase</b>	
<i>Senescence Cells Histochemical Staining Kit</i>	Sigma 069M4101V
Glicerol	Merck 1,040,941,000
Parafilm M, 2 x 250Inch Roll on 1 cor	Parafilm M PM992

#### 1.4.2 Pembuatan Ekstrak Jahe Merah

Rimpang jahe merah segar dicuci hingga bersih di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan bakteri. Setelah dicuci, jahe merah dipisahkan menjadi bagian jahe yang kering, rusak, atau busuk. Setelah itu, jahe merah dipotong menjadi potongan kecil. Jahe merah dikeringkan dalam oven pada suhu rendah (40-50°C) hingga kadar airnya berkurang, lalu dihaluskan dengan blender atau penggiling hingga menjadi bubuk. Jahe merah diekstraksi

dengan pelarut ethanol 70% lalu dihomogenkan dan filtrasi. Setelah diekstraksi, dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan 40-50°C (Susanty & Yulendra, 2018).

### 1.4.3 Kultur Sel

Metode kultur sel diadaptasi dari Widowati *et al.* (2018) & Widowati *et al.* (2019). Sel diambil dari tanki nitrogen cair (-196°C), selanjutnya dicairkan di dalam *ultrasonic cleaner* dengan suhu 37°C selama 30 detik, lalu diamkan di suhu ruang (20°C) hingga mencair. Sel dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 ml yang berisi medium basal DMEM *High Glucose* 9 mL. Sel disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan 4 mL medium kultur. Medium kultur sel MCF-7 dibuat dengan mencampurkan 15% FBS, 1% ABAM, 1% Amphotericine B, 1% MEM Vitamin, 1% L-Glutamine, 1% Nanomycopolitine, 1% Gentamicin dan medium basal DMEM *High Glucose* ditambahkan sampai 50 mL. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Sel yang telah tumbuh pada *flask* T75 diamati di menggunakan mikroskop *inverted* hingga konfluens sekitar 70-80%.

### 1.4.4 Subkultur Sel

Metode subkultur sel diadaptasi dari Widowati *et al.* (2019). Sel yang telah tumbuh pada *flask* T75 diamati menggunakan mikroskop *inverted* hingga konfluens sekitar 70-80%. Medium kultur dibuang, kemudian sel dibilas dengan PBS 1x ABAM 1% sebanyak dua kali. Kemudian ditambahkan 2 ml Trypsin-EDTA dan diinkubasi selama 5 menit dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C. Selanjutnya dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop *inverted* untuk memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar *flask*. Pada sel yang telah terlepas ditambahkan medium basal untuk menghentikan aktivitas tripsin dan diresuspensi. Suspensi sel dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet di resuspensi dengan 1 mL komplit medium kultur. Suspensi sel dibagi ke dalam dua buah *flask* T75. Sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C. Dilakukan pengecekan dan penggantian medium kultur setiap 2 – 3 hari sekali.

#### 1.4.5 Pembuatan *Stock Solution*

*Stock solution* adalah larutan sampel berkonsentrasi tinggi yang dilarutkan dalam DMSO 100% (Merck, 1029521000). *Stock solution* sampel ekstrak jahe merah yang dibuat memiliki konsentrasi 70.000 µg atau 70 mg/mL. Pembuatan *stock solution* dimulai dengan menimbang 70.000 µg atau 70 mg sampel ekstrak jahe merah, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL (SPL, 62015). Ditambahkan 1 mL DMSO 100% dan dihomogenkan dengan melakukan resuspensi menggunakan *vortex* (Thermo Scientific, 88880017).

#### 1.4.6 Pembuatan *Working Solution*

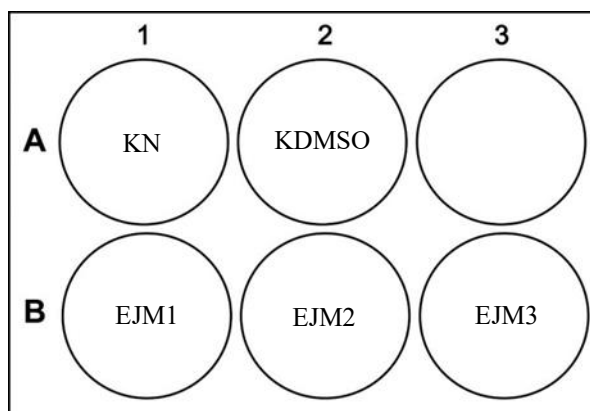
*Working solution* adalah larutan sampel yang digunakan untuk pengujian. *Working solution* dibuat dari hasil pengenceran *stock solution* dengan perbandingan 1:10. *Working solution* dibuat dalam tiga seri konsentrasi, yaitu 7000, 3500, 1750 µg/mL. Berikut merupakan tahapan pembuatan *working solution* sampel ekstrak jahe merah.

1. Sediakan tiga *microtube* 1,5 mL (SPL, 62015), lalu diberi nama A–C.
2. Dimasukkan 900 µL ddH<sub>2</sub>O pada *microtube* A.
3. Dimasukkan 500 µL DMSO 10% (Merck, 1029521000) pada *microtube* B–C.
4. Dimasukkan 100 µL *stock solution* (70000 µg/mL) pada *microtube* A lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 7000 µg/mL.
5. Diambil 500 µL larutan A dan dimasukkan pada *microtube* B, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 3500 µg/mL.
6. Diambil 500 µL larutan B dan dimasukkan pada *microtube* C, lalu dihomogenkan untuk membuat larutan 1750 µg/mL.
7. *Working solution* difilter dengan menggunakan *syringe filter tissue culture* pori 0,22 µm (Sartorius, 17845), sehingga diperoleh sampel yang steril.

#### 1.4.7 *Plating* Sel MCF-7 dan Perlakuan Ekstrak Jahe Merah

Metode *plating* sel MCF-7 dan perlakuan ekstrak jahe merah diadaptasi dari Widowati *et al.* (2023). Prosedur dilakukan di dalam *biosafety cabinet*. Sel yang telah konfluens sekitar 80-100% dibuang medium pertumbuhannya, kemudian dicuci dengan PBS 1x sebanyak kali kali. Setelah itu, ditambahkan 2 ml Trypsin-EDTA kemudian diinkubasi selama 5 menit di inkubator CO<sub>2</sub> 5%

dengan suhu 37°C. Selanjutnya, dilakukan pengecekan menggunakan mikroskop *inverted* guna memastikan sel sudah benar-benar terlepas dari dasar *flask* T25. Sel dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Sel yang telah diresuspensi dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Sel ditanam pada 6 *well plate* sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/*well* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah sel yang telah ditanam konfluens, dilakukan penggantian medium perlakuan 1800 µl lalu ditambahkan *working solution* sampel ekstrak jahe merah sebanyak 200 µl (Gambar 3.1). Sel yang telah diberi perlakuan diinkubasi pada suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam. Setelah 24 jam, medium sel dibuang, sel dilepaskan dari *flask* dengan penambahan *trypsin* dan disentrifugasi.



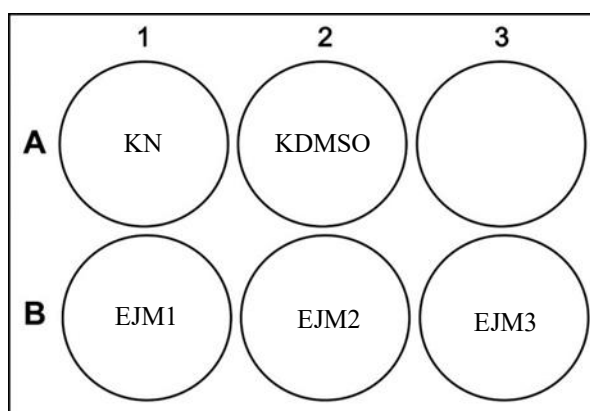
**Gambar 3.1** Peta enam *well plate* untuk Penanaman Sel Kelompok Perlakuan dan Kontrol

Keterangan:

- KN : Sel MCF-7 + medium kultur normal
- KDMSO : Sel MCF-7 + DMSO 1%
- EJM1 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 175 µg/mL
- EJM2 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 350 µg/mL
- EJM 3 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 700 µg/mL

### 1.4.8 Uji *Senescence*

Uji *Senescence* dilakukan sesuai dengan prosedur yang terdapat pada  $\beta$ -*galactosidase* kit (Sigma Aldrich, CS0030-1KT). Sel yang telah diberi perlakuan dibilas menggunakan 1ml PBS 1x ABAM 1% sebanyak dua kali (Gambar 3.2). Selanjutnya, ditambahkan 1,5 ml *fixation buffer* 1x pada setiap well, kemudian sel diinkubasi selama 7 menit pada suhu 20°C. Setelah itu, sel dibilas dengan 1ml PBS 1x sebanyak tiga kali. Ditambahkan 1 ml *staining mixture* per well lalu tutup dengan parafilm agar sel tidak kering, selanjutnya sel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam hingga sel berwarna biru. Amati sel dibawah mikroskop. Selanjutnya sel yang terwarnai (biru) dan seluruh sel (sel berwarna biru dan tidak berwarna biru) dihitung. Setelah sel dihitung, *plate* dicuci dengan PBS 1x. Penyimpanan sel dilakukan dengan menambahkan *glycerol solution* 70% lalu simpan pada kulkas dengan suhu 2-8°C.



**Gambar 3.2** Peta enam *well plate* untuk Uji *Senescence* Sel Kelompok Perlakuan dan Kontrol

Keterangan:

- KN : Sel MCF-7
- KDMSO : Sel MCF-7 + DMSO 1%
- EJM1 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 100  $\mu\text{g/mL}$
- EJM2 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 50  $\mu\text{g/mL}$
- EJM 3 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 25  $\mu\text{g/mL}$



## 1.4.9 Analisis qRT-PCR

### 3.4.8.1 Isolasi RNA

Sel ditanam pada enam *well plate* sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/*well*, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dengan 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam. Sel dianalisis konfluensinya hingga 50%. Setelah sel konfluens, sel diinduksi oleh EJM dan diinkubasi kembali selama 24 jam. *Harvest* sel untuk isolasi RNA. Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan prosedur kit Zymoresearch (R2050-1-200). Sel hasil perlakuan dipanen dan ditambahkan 300  $\mu\text{L}$  TRI *reagent* lalu di sentrifugasi. Supernatan ditambah dengan 300  $\mu\text{L}$  ethanol absolut lalu di resuspensi. Sel dipindahkan ke Zymo-spin IICG *column* dan disentrifugasi 10.000 x g selama 30 detik. Selanjutnya, sebanyak 400  $\mu\text{L}$  Direct-zol RNA *PreWash* ditambahkan ke Zymo-spin IICG *column* dan disentrifugasi (10.000 x g selama 30 detik). Filtrat pada *collection tube* dibuang dan langkah ini diulangi dua kali. RNA *Wash Buffer* ditambahkan sebanyak 700  $\mu\text{L}$  ke dalam *column* dan di disentrifugasi (10.000 x g selama 30 detik). Setelah itu, *column* dipindahkan ke *collection tube free* RNase dan DNase, lalu 100  $\mu\text{L}$  *DNase/RNase-Free water* ditambahkan untuk melarutkan RNA yang terisolasi dan disentrifugasi (10.000 x g selama 180 detik). Konsentrasi RNA yang terisolasi diukur dengan *microdrop plate* (Widowati *et al.*, 2019).

### 3.4.8.2 Sintesis cDNA

Sintesis CDNA dilakukan dengan menggunakan prosedur kitSensiFAST cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience, BIO-65054). Prosedur dilakukan dalam PCR *cabinet* (Esco, 2017-122662). Dibuat mix reaksi PCR *tube* yang terdiri dari 5x TAMP (4  $\mu\text{L}$ ), *reverse transcriptase* (1  $\mu\text{L}$ ), dan RNA (15  $\mu\text{L}$ ) hasil isolasi dan *Nuclease Free Water* (NFW). RNA yang dimasukkan sesuai dengan konsentrasi awal dan ditambahkan dengan NFW hingga konsentrasi RNA 50ng/ $\mu\text{L}$ . Mix reaksi di *spindown* dan *run* menggunakan PCR *Gradient* (Clever Scientific Ltd GTC96S) dengan protokol *priming* selama 10 menit pada suhu  $25^\circ\text{C}$ ; *Reverse Transcription* selama 15 menit pada suhu  $42^\circ\text{C}$ ; RT *inactivation* selama 5 menit pada suhu  $85^\circ\text{C}$ . *Optional step*,  $4^\circ\text{C}$  (*hold*). Peta 96 *well plate* untuk analisis qRT-PCR gen *p53* disajikan pada Tabel 3.3, gen *Bcl-2* disajikan pada Tabel 3.4, *housekeeping gene*  $\beta$ -*actin* disajikan pada Tabel 3.5.

Dalam penelitian ini, desain primer gen *p53*, *Bcl-2*, dan  *$\beta$ -actin*.  *$\beta$ -actin* digunakan sebagai *housekeeping gene*. Desain primer disajikan pada Tabel 3.6. Berikut merupakan peta 96 well plate dan desain primer untuk analisis qRT-PCR:

**Tabel 3.3** Peta Perlakuan Kontrol dan Konsentrasi EJM untuk analisis qRT-PCR gen *p53* pada 96 well plate

Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KN	KN	KN	KN	KN							
B	KDMSO	KDMSO	KDMSO	KDMSO	KDMSO							
C	EJM1	EJM1	EJM1	EJM1	EJM1							
D	EJM2	EJM2	EJM2	EJM2	EJM2							
E	EJM3	EJM3	EJM3	EJM3	EJM3							
F												
G												
H												

**Tabel 3.4** Peta Perlakuan Kontrol dan Konsentrasi EJM untuk analisis qRT-PCR gen *Bcl-2* pada 96 well plate

Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KN	KN	KN	KN	KN							
B	KDMSO	KDMSO	KDMSO	KDMSO	KDMSO							
C	EJM1	EJM1	EJM1	EJM1	EJM1							
D	EJM2	EJM2	EJM2	EJM2	EJM2							
E	EJM3	EJM3	EJM3	EJM3	EJM3							
F												
G												
H												

**Tabel 3.5** Peta 96 well plate analisis qRT-PCR *housekeeping gene  $\beta$ -actin*

Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KN	KN	KN	KN	KN							
B	KDMSO	KDMSO	KDMSO	KDMSO	KDMSO							
C	EJM1	EJM1	EJM1	EJM1	EJM1							
D	EJM2	EJM2	EJM2	EJM2	EJM2							
E	EJM3	EJM3	EJM3	EJM3	EJM3							
F												
G												
H												

Keterangan:

- KN : Sel MCF-7 + medium kultur normal  
 KDMSO : Sel MCF-7 + DMSO 1%  
 EJM1 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 175 µg/mL  
 EJM2 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 350 µg/mL  
 EJM 3 : Sel MCF-7 + Ekstrak Jahe Merah 700 µg/mL

**Tabel 3.6** Desain Primer

Gen		Primer (5 - 3)	TM (°C)	Panjang (bp)	Referensi
<i>p53</i>	F	AGAGTCTATAGGCCACCCC	59,81	20	NM_000546.6
	R	GCTCGACGCTAGGATCTGAC	60,04	20	
<i>Bcl-2</i>	F	GGTCATGTGTGTGGAGAGCG	61,02	20	NM_000657.3
	R	GGTGCCGGTTCAGGACTCA	61,82	20	
<i>β-actin</i>	F	TCTGGCACCACACCTTCTACAATG	62,85	24	NM_001101.5
	R	AGCACAGCCTGGATAGCAACG	63,04	21	

Keterangan: Referensi primer yang digunakan diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). F: *Forward primer*; R: *Reverse primer*; TM: *Melting Temperature* (°C); bp: *base pair* atau pasang basa (pb)

### 3.4.9 Uji Kuantifikasi Ekspresi Gen

Metode uji kuantifikasi ekspresi gen diadaptasi dari Widowati *et al.*, (2019). Pembuatan *mix* reaksi PCR dilakukan dalam PCR *cabinet* (Esco, 2017-122662). Selanjutnya, dibuat *mix reaction* PCR yang berisi *Nuclease Free Water* (NFW) (3,2 µL), Sensifast Sybr NO ROX (Meridian Bioscience, BIO-98005) (5 µL), *Primer forward* (0,4 µL), *Primer Reverse* (0,4 µL), dan *cDNA template* (1 µL). Setelah itu *mix reaction* PCR dimasukkan ke RT-PCR *tube* lalu di-*run* pada qRT-PCR (Agilent, G8830A). Kuantifikasi ekspresi gen dihitung menggunakan metode Livak. *β-actin* digunakan sebagai *housekeeping gene*. Desain primer gen yang diukur dicantumkan pada Tabel 3.6. Kondisi qRT-PCR diatur sedemikian rupa agar dicapai kondisi optimum, pengaturan suhu, waktu, dan siklus qRT-PCR dicantumkan pada Tabel 3.7.

**Tabel 3.7** Pengaturan Suhu, Waktu dan Siklus qRT-PCR

Gen	Suhu; Waktu; Siklus					
	Pre Denaturasi	Denaturasi	Annealing	Pre-elongasi	Elongasi	~

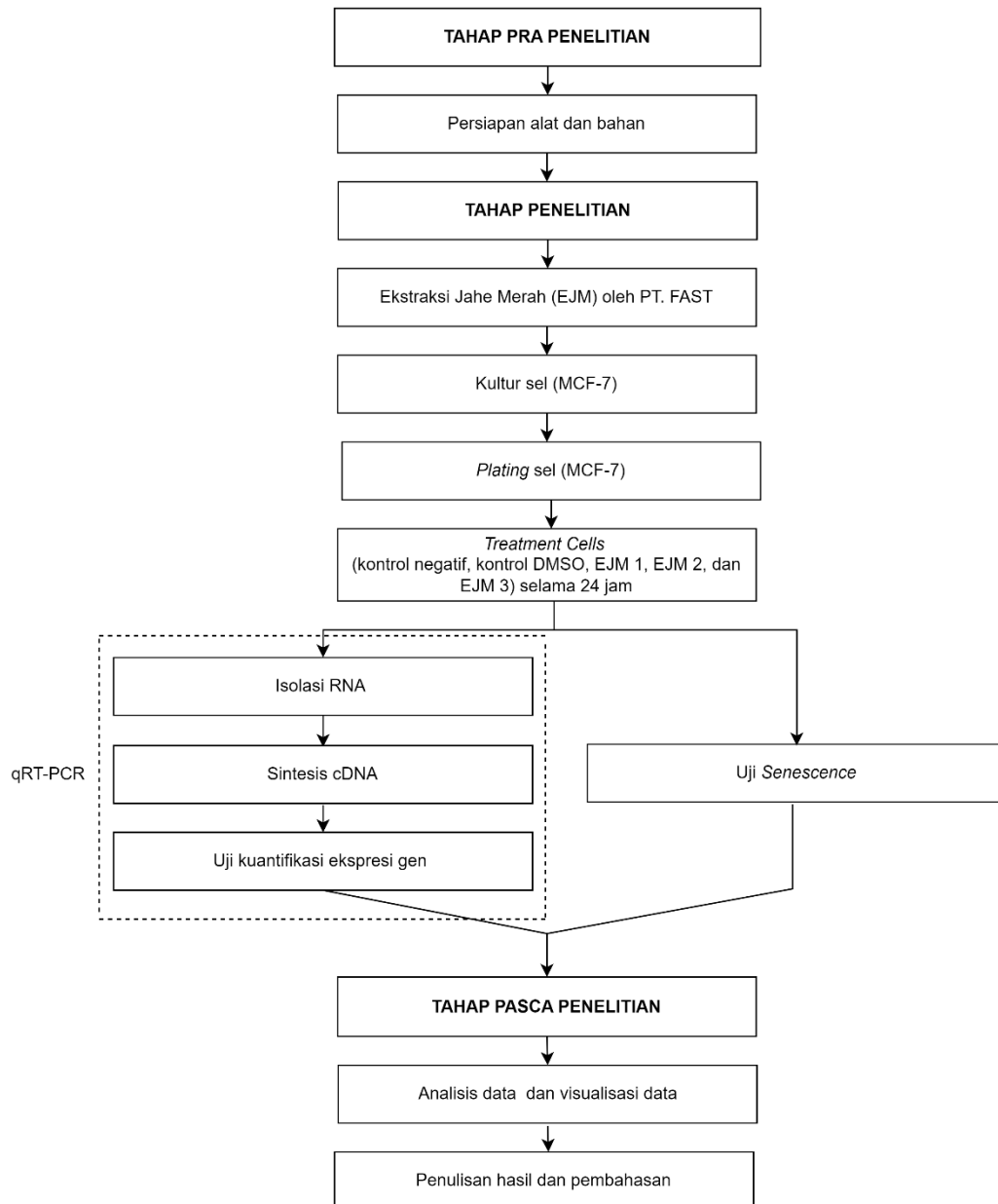
<i>p53</i>	95°C; 5 menit	95°C; 30 detik; 40 siklus	58°C; 50 detik; 40 siklus	72°C; 50 detik	72°C; 5 menit	4°C
<i>Bcl-2</i>	95°C; 5 menit	95°C; 30 detik; 40 siklus	58°C; 50 detik; 40 siklus	72°C; 50 detik	72°C; 5 menit	4°C
<i><math>\beta</math>-actin</i>	95°C; 5 menit	95°C; 30 detik; 40 siklus	58°C; 50 detik; 40 siklus	72°C; 50 detik	72°C; 5 menit	4°C

### 3.5 Analisis Data

SPSS (versi 20.0) digunakan untuk menganalisis data hasil pengujian secara statistik. Analisis varian (ANOVA) satu arah (*one-way ANOVA*) dengan uji lanjutan *Post-Hoc Tukey HSD* digunakan untuk data yang berdistribusi normal dan homogen. Data menunjukkan nilai signifikan dengan nilai  $P < 0.05$ . Analisis *Pearson Corellation* digunakan untuk menentukan adanya nilai korelasi antar data. Data menunjukkan adanya korelasi dengan nilai signifikansi sig. (2-tailed) menunjukkan adanya korelasi antar variabel dengan nilai  $0.002 < 0.05$ . GraphPad Prism (versi 8.0.1) digunakan untuk membuat histogram dan data disajikan sebagai rata-rata + standar deviasi (Widowati *et al.*, 2023).

### 3.6 Alur Penelitian

Tahapan utama dalam diagram ini mencakup pra penelitian, penelitian, dan pasca penelitian. Berikut merupakan alur penelitian yang akan dilakukan. Alur penelitian disajikan pada diagram alur (Gambar 3.3).



**Gambar 3.3** Diagram Alur Penelitian