

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Jenis penelitian ini digunakan untuk menguji dan memvalidasi kinerja atau efektivitas suatu perlakuan atau intervensi. Dalam penelitian ini, peneliti memberikan perlakuan atau intervensi tertentu kepada kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok kontrol yang tidak mendapatkan perlakuan (Putri & Savitri, 2023). Penelitian eksperimental dipilih karena memungkinkan peneliti untuk mengetahui hubungan sebab-akibat antara variabel yang diteliti melalui pengontrolan kondisi penelitian (Mesra & Dolonseda, 2023).

3.2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang merupakan rancangan percobaan paling sederhana di antara rancangan-rancangan percobaan yang lain. RAL umumnya cocok digunakan untuk kondisi lingkungan, alat, bahan dan media yang homogen. Pemilihan RAL dalam penelitian ini didasarkan pada pertimbangan bahwa kondisi unit percobaan yang digunakan relatif homogen, sehingga yang mempengaruhi respon hanya perlakuan dan faktor keacakan (Rahmawati & Erina, 2020). Menurut Indrataman dan Yenita (2019) banyaknya jumlah pengulangan penelitian ditentukan berdasarkan rumus pengulangan Federer sebagai berikut:

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

Keterangan: r = pengulangan; t = perlakuan

Berdasarkan rumus Federer, maka perhitungan pengulangan pada uji sitotoksik dengan sembilan jenis perlakuan adalah sebagai berikut:

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

$$(r-1)(9-1) \geq 15$$

$$(r-1)8 \geq 15$$

$$8r-8 \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,86 \sim 3$$

Berdasarkan perhitungan pengulangan tersebut, uji sitotoksik dengan sembilan perlakuan dilakukan masing-masing sebanyak tiga kali pengulangan seperti yang tertera pada (Tabel 3.1) berikut.

Tabel 3.1 Desain Penelitian Uji Sitotoksik

No.	Perlakuan	Pengulangan		
1	Kontrol Negatif (KN) : HepG2 dengan medium DMEM-F12 2% FBS tanpa induksi dan perlakuan	KN-1	KN-2	KN-3
2	Kontrol Positif (KP): HepG2 diinduksi LPS dengan medium DMEM-F12 2% FBS	KP-1	KP-2	KP-3
3	Kontrol <i>Vehicle</i> (KV): HepG2 diinduksi LPS dengan medium DMEM-F12 <i>free serum</i>	KV-1	KV-2	KV-3
4	Sekretom hWJ-MSCs 50% (SW 50%): KV + sekretom 50%	SW 50%-1	SW 50%-2	SW 50%-3
5	Sekretom hWJ-MSCs 25% (SW 25%): KV + sekretom 25%	SW 25%-1	SW 25%-2	SW 25%-3
6	Sekretom hWJ-MSCs 12,5% (SW 12,5%): KV + sekretom 12,5%	SW 12.5%-1	SW 12.5%-2	SW 12.5%-3

No.	Perlakuan	Pengulangan		
7	Sekretom hWJ-MSCs 6,25% (SW 6,25%): KV + sekretom 6,25%	SW 6,25%-1	SW 6,25%-2	SW 6,25%-3
8	Sekretom hWJ-MSCs 3,13% (SW 3,13%): KV + sekretom 3,13%	SW 3,13%-1	SW 3,13%-2	SW 3,13%-3
9	Sekretom hWJ-MSCs 1,6% (SW 1,6%): KV + sekretom 1,6%	SW 1,6%-1	SW 1,6%-2	SW 1,6%-3

Setelah melakukan uji sitotoksik dan mengetahui tiga konsentrasi sekretom dengan hasil terbaik, selanjutnya dilakukan penelitian dengan pemberian perlakuan dan kontrol untuk kemudian dianalisis ekspresi gennya. Berdasarkan rumus Federer, maka perhitungan pengulangan analisis ekspresi gen (qRT-PCR) dengan enam jenis perlakuan adalah sebagai berikut:

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

$$(r-1)(6-1) \geq 15$$

$$(r-1) 5 \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan pengulangan tersebut, analisis ekspresi gen (qRT-PCR) dengan enam jenis perlakuan dilakukan masing-masing sebanyak empat kali pengulangan seperti yang tertera pada (Tabel 3.2) berikut.

Tabel 3.2 Desain Penelitian Uji Analisis Ekspresi Gen (qRT-PCR)

No.	Perlakuan	Pengulangan			
		KN-1	KN-2	KN-3	KN-4
1	Kontrol Negatif (KN): HepG2 dengan medium DMEM-F12 2% FBS tanpa induksi dan perlakuan				
2	Kontrol Positif (KP): HepG2 diinduksi LPS dengan medium DMEM-F12 2% FBS	KP-1	KP-2	KP-3	KP-4
3	Kontrol <i>Vehicle</i> (KV): HepG2 diinduksi LPS dengan medium DMEM-F12 <i>free serum</i>	KV-1	KV-2	KV-3	KV-4
4	Sekretom 1 (SW 1) : KV + sekretom 1,6%	SW 1,6%-1	SW 1,6%-2	SW 1,6%-3	SW 1,6%-4
5	Sekretom 2 (SW 2) : KV + sekretom 4,17%	SW 4,17%-1	SW 4,17% - 2	SW 4,17%- 3	SW 4,17% - 4
6	Sekretom 3 (SW 3) : KV + sekretom 12,5%	SW 12,5%-1	SW 12,5%- 2	SW 12,5%- 3	SW 12,5%- 4

3.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

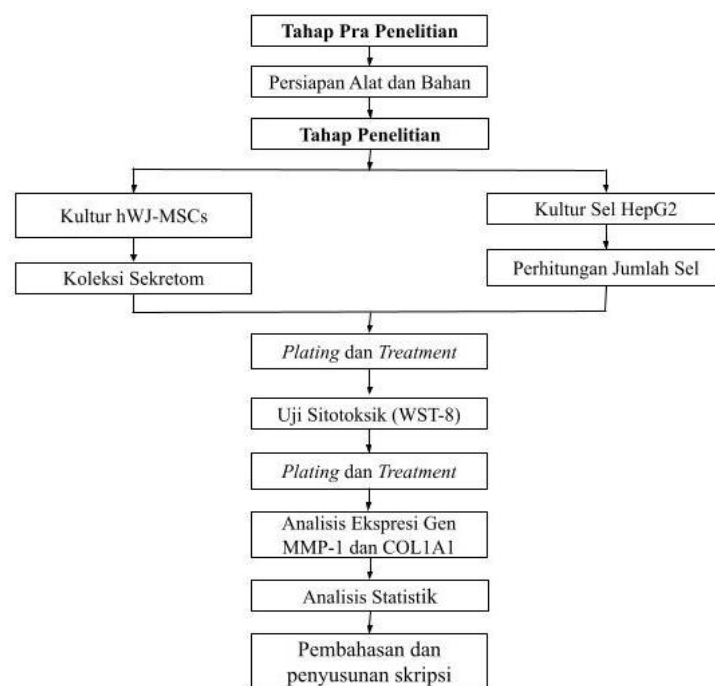
Penelitian ini meliputi uji sitotoksik dengan WST-8 dan uji analisis ekspresi gen dengan qRT-PCR dilakukan di laboratorium kultur sel dan molekuler Aretha Medika Utama Biomolecular and Biomedical Research Center, Bandung. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan dimulai dari bulan November 2024 hingga April 2025.

3.4. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah sel hati manusia. Sampel pada penelitian ini adalah HepG2 *cell line* (ATCC® HB-8065™) yang digunakan sebagai model sel hati manusia.

3.5. Alur Penelitian

Alur dari penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada (Gambar 3.1) berikut.



Gambar 3.1. Alur Penelitian

3.6. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi alat yang digunakan dalam penelitian (Tabel 3.3) dan bahan yang digunakan dalam penelitian (Tabel 3.3).

Tabel 3.3 Alat yang Digunakan Pada Penelitian

No	Alat	Jumlah
1	Autoklaf (HVE-50, Hirayama)	1 set
2	CO ₂ Incubator (Thermo, IH3543)	1 unit
3	Biosafety Cabinet II (Thermo Scientific, 1300 Series A2 Class II)	1 unit
4	Microscope Inverted (Olympus, CKX41-F32FL)	1 unit

No	Alat	Jumlah
5	<i>Waterbath</i>	1 unit
6	<i>Refrigerated Centrifuge</i> (MWP 260r)	1 unit
7	<i>Mini Centrifuge</i> (OHAUS Frontier, FC5306)	1 unit
8	Vortex (Thermo Scientific, 88880017),	1 unit
9	PCR cabinet (Esco, 2017-122662)	1 unit
10	Spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)	1 set
11	<i>Microdrop Plate</i>	1 unit
12	PCR thermal cyclers (Cleaver Scientific, GTC96S)	1 set
13	Real-Time PCR System (Agilent, G8830A)	1 set
14	<i>Durapore filter unit</i> (Millipore Corporation, SLGV 03397 RS)	1 set
15	Hemositometer (Marienfeld, 17849)	1 unit
16	Mikropipet	3 set
17	<i>6 well plate</i>	3 unit
18	<i>96 well plate</i> (Costar, 3596)	1 unit
19	<i>Tissue culture flask</i> 25 cm ²	1 unit
20	<i>Microtube</i> 1,5 mL (SPL, 62015)	1 unit
21	Filter milipore 0,22 mikro	1 unit
22	<i>Column dan Collection Tube</i>	1 set
23	Tabung sentrifugasi	1 set
24	<i>Manual cell counter</i>	1 unit

Tabel 3.4 Bahan yang Digunakan Pada Penelitian

No.	Bahan	Jumlah
1	Lini Sel HepG2 (ATCC® HB-8065™)	1 set
2	hWJ-MSCs	-
3	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) 10x (Biowest, X0520-500)	3 L

No.	Bahan	Jumlah
4	<i>Fetal bovine serum Premium</i> (FBS) (Biowest, S1810-500)	3L
5	Lipopolisakarida (Sigma-Aldric, L2880).	2 L
6	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)- F12 (Biowest, MS00N11007)	2 L
7	<i>Minimum Essential Medium</i> (MEM)- α 20% FBS (Biowest, L0475-500)	2 L
8	<i>Anti Biotic Anti Myotic</i> (ABAM)	1 botol
9	<i>Amphotericine</i>	1 botol
10	<i>MEM Vitamin</i>	1 botol
11	<i>MEM non essential</i> (Biowest, X0557-100)	1 botol
12	<i>L-Glutamine</i>	1 botol
13	<i>Nanomycopultine</i>	1 botol
14	<i>Gentamicin</i>	1 botol
15	<i>Nuclease free water</i> (NFW)	1 L
16	<i>TRI reagent</i> (ZYMO Research, R2050-1-200)	2400 μ L
17	Etanol absolut	2400 μ L
18	<i>Trypsin EDTA</i> (0.25%) (Gibco, 25200072)	24 mL
19	<i>Trypan Blue</i>	10 μ L
20	<i>Enhanced Cell Counting Kit 8</i> (WST-8/CCK8) (Elabscience, E-CK-A362)	240 μ L
21	<i>Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit</i> yang berisi : 1. <i>RNA wash buffer</i> 2. <i>Direct-zol RNA PreWash</i> 3. <i>DNase I</i> 4. <i>DNA digestion buffer</i> 5. <i>DNase/RNase-free water</i> 6. <i>Zymo-spin IIICG columns</i> 7. <i>Collection tubes</i>	1 set

No.	Bahan	Jumlah
22	<i>Sensi-FAST cDNA synthesis kit</i> (Meridian Bioscience, BIO-65054)	1 set
23	<i>Forward dan Reverse Primer Human MMP-1</i>	1 set
24	<i>Forward dan Reverse Primer Human COL1A1</i>	1 set
25	<i>Forward dan Reverse Primer Human GAPDH</i>	1 set
26	<i>Sensifast Sybr NO ROX</i> (Meridian, BIO-98005)	1 set
27	Alkohol 70%	3 L

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam kegiatan laboratorium disiapkan kemudian dilakukan sterilisasi agar alat dan bahan bebas dari kontaminan. Sterilisasi alat dilakukan dengan cara membungkus alat dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam plastik. Alat-alat yang sudah dibungkus dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Sterilisasi dengan *wet heat* (uap air) jauh lebih cepat dan lebih efisien karena molekul air mendenaturasi protein secara ireversibel dengan memutus sambungan H antara gugus peptida pada suhu yang relatif rendah. Sterilisasi ini digunakan untuk mensterilkan apa pun yang tahan terhadap suhu tersebut (Baggini, 2022). Kegiatan sterilisasi alat dan bahan dilakukan di PT Aretha Medika Utama.

3.7.2. Kultur Sel hWJ-MSCs

hWJ-MSCs sudah disediakan oleh PT. Aretha Medika Utama yang diisolasi dari tali pusat (*umbilical cord*) segar wanita berusia 25 tahun (n=1) yang telah melakukan persalinan secara normal dengan masa kehamilan penuh. Donor telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Universitas Maranatha, Indonesia (No. Reg: 033/KNEPK/2008). hWJ-MSCs yang diisolasi dari tali pusat kemudian dibilas dalam larutan PBS 10x, dipotong menjadi eksplan yang sangat kecil (1-2 mm), dan ditanam dalam *6-well plate*. Eksplan dikultur dengan media lengkap Minimum Essential Medium (MEM)- α yang mengandung 20% FBS (Widowati dkk., 2021b). Kultur kemudian diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Media kultur diganti setiap 7 hari selama 14 hari. Ketik, sel diambil dan disubkultur pada

kepadatan 8×10^3 sel/cm². hWJ-MSCs kemudian dikultur menggunakan medium lengkap MEM- α 15% FBS dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C dan medium kultur diganti setiap 2-3 hari.

3.7.3. Koleksi Sekretom hWJ-MSCs

Koleksi sekretom dilakukan sesuai dengan metode Widowati dkk. (2024) dengan beberapa modifikasi. Sekretom diperoleh dari kultur hWJ-MSCs pada *phase* ke-4 dengan konfluensi 80-90%. Secara singkat, media kultur diganti dengan DMEM-F12 dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂, 37°C. Selanjutnya, media kultur dikumpulkan dan sentrifugasi menggunakan *Refrigerated Centrifuge* pada dengan kecepatan 3000x g selama 4 menit pada suhu 37°C. Supernatan yang dihasilkan mengandung molekul yang disekresikan yang kemudian dimurnikan menggunakan unit filter Durapore sehingga hanya tersisa bagian sekretomnya saja.

3.7.4. Kultur Sel HepG2

Sel HepG2 diperoleh dari Aretha Medika Utama. Sel dikeluarkan dari cryotank yang berisi nitrogen cair (-196°C) kemudian dimasukkan dalam *water bath* yang telah diisi air suhu 37°C hingga mencair. Sel kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi medium kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 3 ml medium kultur dan dipindahkan ke *Tissue culture* flask steril ukuran 25 cm². Kultur sel diinkubasikan dalam inkubator pada kondisi 5% CO₂ pada suhu 37°C dalam media kultur yang dibuat dengan mencampurkan 10% FBS, 1% ABAM, 1% Amphotericine B, 1% MEM Vitamin, 1% MEM non essential, 1% L-Glutamine, 1% Nanomycopulitine, 0,1% Gentamicin dan medium basal DMEM-F12 ditambahkan sampai 50 mL (Budiman dkk., 2015). Media diganti setiap 2-3 hari untuk menghilangkan produk sampingan metabolisme dan menyediakan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan sel.

3.7.5. Penghitungan Jumlah Sel

Kultur sel HepG2 yang telah konfluen pada *Tissue culture* flask dibilas dengan PBS ABAM 1% sebanyak 1 mL sebanyak 2 ulangan kemudian ditambahkan 2 ml tripsin EDTA (0,25%). Flask diinkubasi selama 5 menit pada

suhu 37°C dan 5% CO₂. Setelah sel terlepas, sel dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi medium basal 2 mL, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan pelet sel disuspensikan dengan 1 ml medium pertumbuhan. Selanjutnya, 10 µL dari larutan sel diambil dan ditambahkan pewarna *trypan blue* 10µL kemudian dihomogenkan. 10 µL campuran diambil dan dimasukkan ke dalam hemositometer. Hemositometer diletakkan di bawah *Microscope Inverted* yang telah diproyeksikan ke layar monitor kemudian sel yang berada di dalam empat kuadran dihitung dengan bantuan *manual cell counter*. Stok sel dibuat setelah mendapatkan hasil hitungan jumlah sel. Jumlah sel total dihitung dengan menggunakan rumus (Pioli, 2019) sebagai berikut:

$$Sel/mL = \frac{\text{total sel yang dihitung}}{\text{jumlah kotak yang dihitung}} \times \text{faktor pengenceran} \times 10.000$$

3.7.6. Plating dan Treatment

Sel yang telah dihitung dan diketahui jumlahnya selanjutnya ditanamkan dalam 96-well plate (1x10⁴ sel/well) untuk uji sitotoksik seperti yang tertera pada (Gambar 3.2) dan 6-well plate (5x10⁵ sel/well) untuk analisis ekspresi gen seperti yang tertera pada (Gambar 3.3). Kemudian sel diinkubasi dalam selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Setelah 24 jam, sel diinduksi LPS untuk menginduksi inflamasi.

Model inflamasi pada sel dibuat secara *in vitro* dengan Lipopolisakarida *Escherichia coli* O55: B5 (Sigma-Aldric, L2880). LPS dibuat dengan memfilter bubuk lifolisasi dengan filter milipore 0,22 mikro. LPS dengan konsentrasi 4µg/mL dalam medium lengkap DMEM-F12 2% FBS ditambahkan ke dalam well masing-masing sebanyak 20 µL untuk uji sitotoksik dan 200 µL untuk analisis ekspresi gen dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂ (Priyandoko dkk., 2024). Setelah 18 jam, morfologi sel diamati dibawah *Microscope Inverted*. Kemudian sel diberikan *treatment* sesuai dengan kelompok perlakuan. Medium kultur diganti dengan medium sebanyak 180 µL dan 20 µL perlakuan (uji sitotoksik) dan medium sebanyak 1800 µL dan 200 µL perlakuan (analisis ekspresi gen). Sel diberi perlakuan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Peta perlakuan kontrol dan konsentrasi sekretom hWJ-MSCs untuk uji

sitotoksitas dalam 96-well plates tertera pada (Gambar 3.2) sedangkan untuk uji ekspresi gen dalam 6-well plates tertera pada (Gambar 3.3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KN	KN	KN	Blank	SW 1,6%	SW 1,6%	SW 1,6%	Blank				
B	KP	KP	KP	Blank								
C	KV	KV	KV	Blank								
D	SW 50%	SW 50%	SW 50%	Blank								
E	SW 25%	SW 25%	SW 25%	Blank								
F	SW 12,5%	SW 12,5%	SW 12,5%	Blank								
G	SW 6,25%	SW 6,25%	SW 6,25%	Blank								
H	SW 3,13%	SW 3,13%	SW 3,13%	Blank								

Gambar 3.2. Peta Perlakuan Uji Sitotoksitas Sel HepG2

Keterangan :

Kontrol Negatif (KN) : HepG2 + medium DMEM-F12 2% FBS

Kontrol Positif (KP) : HepG2 + LPS + medium DMEM-F12 2% FBS

Kontrol *Vehicle* (KV) : HepG2 + LPS + medium DMEM-F12 *free serum*

SW 50% (Sekretom hWJ-MSCs 50%) : KV + sekretom 50%

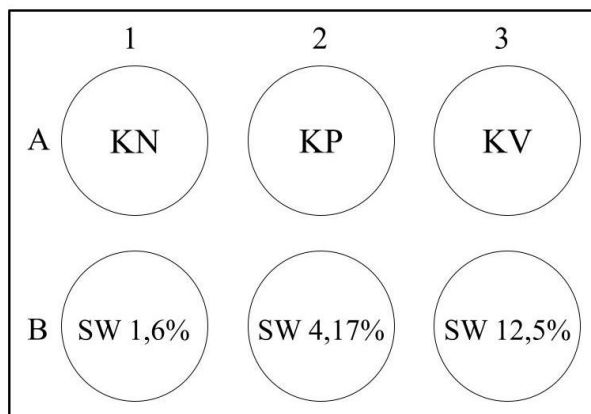
SW 25% (Sekretom hWJ-MSCs 25%) : KV + sekretom 25%

SW 12,5% (Sekretom hWJ-MSCs 12,5%) : KV + sekretom 12,5%

SW 6,25% (Sekretom hWJ-MSCs 6,25%) : KV + sekretom 6,25%

SW 3,13% (Sekretom hWJ-MSCs 3,13%) : KV + sekretom 3,13%

SW 1,6% (Sekretom hWJ-MSCs 1,6%) : KV + sekretom 1,6%



Gambar 3.3. Peta Perlakuan Analisis ekspresi gen MMP-1 dan COL1A1

Keterangan:

Kontrol Negatif (KN) : HepG2 + medium DMEM-F12 2% FBS

Kontrol Positif (KP) : HepG2 + LPS + medium DMEM-F12 2% FBS

Kontrol vehicle (KV) : HepG2 + LPS + medium DMEM-F12 *free serum*

SW 1,6% : KV + sekretom 1,39%

SW 4,17% : KV + sekretom 4,17%

SW 12,5% : KV + sekretom 12,5%

Sitotoksik pada sel HepG2 diuji menggunakan *Enhanced Cell Counting Kit 8* (WST-8/CCK8) (Elabscience, E-CK-A362) sesuai dengan instruksi pabrik. Pengerjaan uji sitotoksisitas dilakukan di dalam *biosafety cabinet II* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II). Sel yang telah *diplating* dan diinduksi oleh LPS dalam *96-well plate*, kemudian diganti medium kulturnya dengan medium DMEM-F12 2% FBS dan 20 μ L isolat sekretom dengan berbagai konsentrasi (50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,6)% selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Setelah inkubasi 24 jam, 20 μ L WST 8 ditambahkan ke setiap well dan diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C, 5% CO₂. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm (Widowati dkk., 2021b).

3.7.8. Analisis Ekspresi Gen (RT-PCR) MMP-1 dan COL1A1

a. Isolasi RNA

Proses isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan prosedur yang disediakan oleh *Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit* dengan prosedur sesuai protokol produk. Sel-sel yang telah diberi perlakuan dipanen dan

ditambahkan 300 μ L *TRI reagent*, kemudian disentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan ditambahkan dengan 300 μ L etanol absolut dan selanjutnya diresuspensi. Sel-sel tersebut dipindahkan ke dalam kolom Zymo-spin IIICG dan disentrifugasi pada 10.000 x g selama 30 detik. Selanjutnya, sebanyak 400 μ L *Direct-zol RNA PreWash* ditambahkan ke dalam kolom Zymo-spin IIICG dan disentrifugasi pada 10.000 x g selama 30 detik. Filtrat yang terkumpul dalam tabung koleksi dibuang, dan langkah ini diulang sebanyak dua kali. Sebanyak 700 μ L RNA Wash Buffer ditambahkan ke dalam kolom dan disentrifugasi pada 10.000 x g selama 30 detik. Setelah itu, kolom dipindahkan ke tabung koleksi yang bebas dari *RNase* dan *DNase*, dan 100 μ L *DNase/RNase free water* ditambahkan untuk melarutkan RNA yang telah terisolasi, diikuti dengan proses sentrifugasi pada 10.000 x g selama 180 detik. Konsentrasi RNA yang terisolasi diukur menggunakan *microdrop plate* (Widowati dkk., 2019).

b. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan menggunakan SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience, BIO-65054) sesuai dengan instruksi pabrik. Proses sintesis dilakukan dalam PCR cabinet (Esco, 2017-122662) dimulai dengan pembuatan campuran reaksi PCR. Komponen reaksi terdiri dari 5x *iScript Reaction Mix* sebanyak 4 μ L, *iScript Reverse Transcriptase* sebanyak 1 μ L, serta hasil isolasi RNA yang konsentrasinya telah disesuaikan menggunakan NFW (Thermo Scientific, R0581) hingga total volume 15 μ L kemudian dihomogenkan. menggunakan vortex (Thermo Scientific, 88880017) dan *mini centrifuge* (OHAUS Frontier, FC5306) kemudian *dirunning* dalam *PCR thermal cycler* (Clever Scientific, GTC96S).

c. Desain primer

Sekuens nukleotida gen MMP-1, COL1A1, dan GAPDH manusia dalam format FASTA didapatkan dengan cara mencari pada *database National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). GAPDH digunakan sebagai

housekeeping gene. Kandidat primer dianalisis menggunakan situs Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Kandidat primer yang dihasilkan tersebut kemudian dianalisis struktur sekunder dan sifat lainnya menggunakan perangkat OligoAnalyzer. Sekuen primer yang didapatkan ditunjukkan pada (Tabel 3.5) berikut.

Tabel 3.5 Informasi Primer

Gen	Sekuen Primer (5'-3')	Annealing (°C)	Cycle	Referensi
COL1A1 (<i>Homo sapiens</i>)	F: GAATTCGGCTTCGACGTTGG	58	40	NM_000088.4
	R: AGGGGGTTCAGTTTGGGTTG			
MMP-1 (<i>Homo sapiens</i>)	F: GGAGGCAAGTTGAAAAGCGG	58	40	NM_002421.4
	R: CCACATCAGGCACTCCACAT			
GAPDH (<i>Homo sapiens</i>)	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	58	40	NM_001289745.3
	R: GAAGATGGTGATGGGATTTC			

d. Kuantifikasi Ekspresi Gen

Metode untuk menguji kuantifikasi ekspresi gen diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Widowati dkk. (2019). Proses pembuatan mix reaksi PCR dilakukan di dalam PCR cabinet (Esco, 2017-122662). Mix reaksi PCR yang disiapkan terdiri dari *Nuclease Free Water* (NFW) sebanyak 3,2 µL, *Sensifast Sybr NO ROX* (Meridian Bioscience, BIO98005) sebanyak 5 µL, *primer forward* sebanyak 0,4 µL, *primer reverse* sebanyak 0,4 µL, dan cDNA template sebanyak 1 µL. Setelah itu, campuran reaksi PCR dimasukkan ke dalam RT-PCR tube dan dijalankan pada qRT-PCR (Agilent, G8830A). Kuantifikasi ekspresi gen dihitung menggunakan metode Livak, dengan GAPDH berfungsi sebagai gen *housekeeping*. Kondisi qRT-PCR diatur untuk mencapai kondisi optimum, dengan pengaturan suhu, waktu, dan siklus qRT-PCR.

3.7.9. Analisis Statistik

Analisis data dikerjakan dengan *software* IBM SPSS 22 for Windows. Analisis data diawali dengan uji normalitas Shapiro-Wilk untuk menentukan apakah data berdistribusi normal. Data yang berdistribusi normal kemudian diuji

homogenitasnya menggunakan uji Levene. Untuk data yang tidak berdistribusi normal, digunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan secara statistik antar kelompok. Jika ditemukan perbedaan signifikan, uji Mann-Whitney dilakukan sebagai analisis lanjutan. Data yang berdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji One-Way Analysis of Variance (One-Way ANOVA) untuk menguji perbedaan rata-rata antar kelompok dan dilanjutkan dengan uji post-hoc Tukey HSD untuk mengidentifikasi kelompok yang berbeda. Jika data berdistribusi normal tetapi tidak homogen, digunakan uji Dunnett T3 untuk menilai signifikansi antara dua kelompok (Widowati dkk., 2023).. Seluruh pengujian dilakukan pada tingkat signifikansi (α) sebesar 0,05 atau 5%. GraphPad Prism (versi 8.0.1) digunakan untuk membuat histogram dan data disajikan sebagai rata-rata standar deviasi. Website Biorender digunakan untuk membuat skema.