

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Pada kelompok percobaan, dilakukan perlakuan kepada subjek penelitian atau variabel yang akan diteliti (variabel terikat). Data yang diperoleh berasal dari hasil perlakuan subjek penelitian dan dibandingkan terhadap kontrol yang tidak diberi perlakuan (Nazir, 1988; Jaenud, 2011).

3.2 Desain Penelitian

Desain Penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain ini digunakan dalam percobaan homogen yang mana kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol (Nazir, 1988). Rancangan penelitian ini digunakan untuk membagi mencit menjadi enam kelompok, antara lain satu kelompok kontrol negatif, satu kontrol positif, satu kontrol *vehicle*, satu kelompok pembanding dan dua kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok diberi perlakuan yang berbeda selama 14 hari.

Untuk menentukan jumlah pengulangan pada setiap perlakuan, maka digunakan rumus Federer (2015) dengan perhitungan sebagai berikut:

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan.

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan jumlah pengulangan sebanyak empat kali dari setiap perlakuan, sehingga digunakan 24 ekor mencit jantan dalam penelitian ini. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi organ kulit mencit dengan menggunakan pewarnaan HE serta ekspresi protein p53 dan COL4A1 menggunakan metode IHK.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2022 sampai dengan Januari 2023.

3.3.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di dua tempat, yaitu:

1. Penelitian *in vivo* meliputi aklimatisasi, induksi UV, pemberian perlakuan dan terminasi pada mencit dilakukan di Aretha Medika Utama, Bogor, Jawa Barat, Indonesia.
2. Pengamatan histopatologi dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE), analisis ekspresi protein p53 dan COL4A1 dengan metode Imunohistokimia (IHK) pada kulit mencit dilakukan di Laboratorium Aretha Medika Utama *Biomolecular and Biomedical Research Center*, Bandung, Jawa Barat, Indonesia.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah kelompok mencit (*Mus musculus*) jantan galur *Deutschland Denken Yoken* (DDY). Sampel pada penelitian ini adalah mencit jantan galur DDY sebanyak 24 ekor. Mencit yang digunakan berumur 10-11 minggu dengan berat 30-35 gram yang diperoleh dari iRATco.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengajuan *Ethical Clearance* (Kelayakan Etik)

Ethical Clearance atau surat keterangan kelayakan etik sebagai syarat dalam penelitian yang menggunakan hewan uji didapatkan dari komisi etik iRATco *Veterinary Laboratory Services* (**Lampiran 1**).

3.5.2 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan dalam penelitian ini digunakan untuk proses perlakuan hewan uji, terminasi dan koleksi organ kulit, pengamatan gambaran histopatologis epidermis serta analisis ekspresi protein p53 dan COL4A1 (**Lampiran 2**). Krim BB dasar dan krim BB ekstrak kulit salak dibuat oleh pabrik kosmetik CV Skinsol, sedangkan tabir surya yang digunakan sebagai kontrol pembanding merupakan produk dari 3W clinic yang umum di pasaran. Komposisi krim BB ekstrak kulit salak tersaji dalam **Lampiran 3**. Alat *consumable* disterilkan sebelum digunakan, dengan cara dibersihkan, dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas, dan disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit (1,5 atm, 121° C).

3.5.3 Persiapan Hewan Uji

Metode perawatan dan perlakuan terhadap hewan uji diadaptasi dari Hidayat *et al.* (2022). Mencit diaklimatisasi selama tujuh hari dalam kandang *individually ventilated cages* (IVC) dengan suhu antara 25-26°C kelembaban 50-55%, diberikan pakan dan minum *ad libitum*. Pakan dengan menggunakan diet metabolisme basal standar (protein 14%, lemak 5%) yang diperoleh dari iRATco Laboratorium. Mencit kemudian dibagi menjadi enam kelompok dengan empat pengulangan yaitu kelompok negatif (KN), kontrol positif (KP), kontrol *vehicle* (KV), kontrol pembanding (KPb), kelompok perlakuan dengan krim BB ekstrak kulit salak satu kali sehari (EKSI) dan kelompok perlakuan dengan krim BB ekstrak kulit salak dua kali sehari (EKSII). Pengelompokkan acak dilakukan untuk menghilangkan bias. Semua perlakuan dilakukan dengan empat pengulangan. Pengelompokkan dilakukan dengan memberi kode 1-24 untuk mencit yang akan menempati kandang berkode perlakuan (**Tabel 3.1**).

Tabel 3.1 Hasil Randomisasi Mencit

1 KPb 4	2 KN 1	3 KPb 3	4 KP 1	5 EKSI 1	6 KV 3
7 KP 2	8 KV 4	9 EKSI 4	10 KN 2	11 KP 3	12 EKSI 2
13 KN 4	14 EKSII 1	15 KP 4	16 EKSII 2	17 KPb 1	18 EKSII 3
19 KV 2	20 KPb 2	21 EKSII 4	22 KV 1	23 EKSI 3	24 KN 3

Berdasarkan hasil randomisasi mencit, didapatkan penempatan mencit pada setiap kandangnya (**Tabel 3.2**). Setiap mencit ditandai dengan cara diberi garis hitam di bagian ekor untuk setiap pengulangan.

Tabel 3.2 Penempatan Mencit Berdasarkan Hasil Randomisasi

Kandang	Kode mencit			
	I	II	III	IV
KN	2	10	24	13
KP	4	7	11	15
KV	22	19	6	8
KPb	17	20	3	1
EKS I	5	12	23	9
EKS II	14	16	18	21

3.5.4 Perlakuan Hewan Uji

Metode perlakuan hewan uji dimodifikasi berdasarkan metode penelitian Sari *et al.* (2017). Mencit pada semua kelompok perlakuan yang telah diaklimatisasi, dilakukan pencukuran rambut punggung. Pencukuran dilakukan menggunakan alat cukur rambut razor (Parco) seluas 3 x 4 cm pada area yang mendapat penyinaran. Selama 14 hari mencit diberikan perlakuan sesuai kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok normal (KN) tidak diberi perlakuan
2. Kelompok kontrol positif (KP) dipapar sinar UV-B
3. Kelompok kontrol *vehicle* (KV) dioles krim BB dasar 2x sehari pada jam 08.00 dan 13.00 serta dipapar sinar UV-B
4. Kelompok kontrol pembanding (KPb) dioles tabir surya 2x sehari pada jam 08.00 dan 13.00 serta dipapar sinar UV-B
5. Kelompok perlakuan krim BB ekstrak kulit salak 1x sehari (EKS I) dioles krim BB ekstrak kulit salak 1x sehari pada jam 08.00 serta dipapar sinar UV-B
6. Kelompok perlakuan krim BB ekstrak kulit salak 2x sehari (EKS II) dioles krim BB ekstrak kulit salak 2x sehari pada jam 08.00 dan jam 13.00 serta dipapar sinar UV-B.

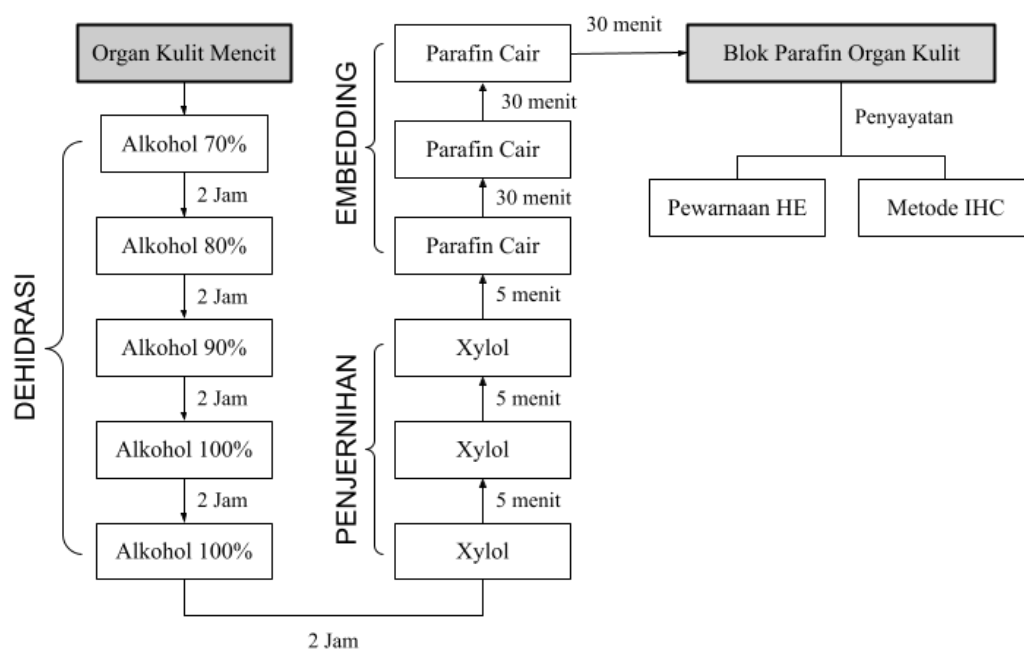
Pengambilan krim menggunakan spuit berukuran 1 cc sebanyak 0.3 cc, kemudian dioleskan merata pada punggung mencit. Penyinaran UV-B dilakukan menggunakan alat sinar UV-B kanlux HERON kt017c selama 5 menit sebanyak 2 kali sehari selama 14 hari.

3.5.5 Terminasi dan Koleksi Organ

Metode dalam terminasi dan koleksi organ mengadaptasi metode yang dilakukan oleh Tjahjani et al. (2019) dan Criswell et al. (2022). Terminasi pada mencit dilakukan pada hari ke-15 dengan cara *cervical dislocation*. Daerah punggung mencit dieksisi dengan diameter 3 cm. Kemudian organ kulit mencit yang didapat dipotong menjadi bagian kecil dan disimpan dalam *Neutraled buffered formalin* (NBF) / Formaldehid 10% sebanyak 10 mL untuk setiap sampel dan difiksasi selama tiga hari untuk pengamatan histopatologi dan metode IHK.

3.5.6 Parafinasi Organ Kulit

Metode parafinasi diadaptasi dan dimodifikasi dari Widowati *et al.* (2022a). Proses parafinasi dimulai dari dehidrasi kulit mencit dengan serial alkohol 70%, 80%, 96% dan alkohol absolut selama masing-masing dua jam di dalam inkubator dan dilanjutkan dengan penjernihan. Penjernihan dilakukan dengan merendam kulit dalam xylol selama selama lima menit. Tahap ini diulang sebanyak tiga kali. Selanjutnya dilakukan parafinasi dengan cara kulit dimasukkan dalam parafin cair sebanyak tiga kali pengulangan dalam inkubator bersuhu 60°C lalu dibuat blok parafin dalam suhu kamar (**Gambar 3.1**).

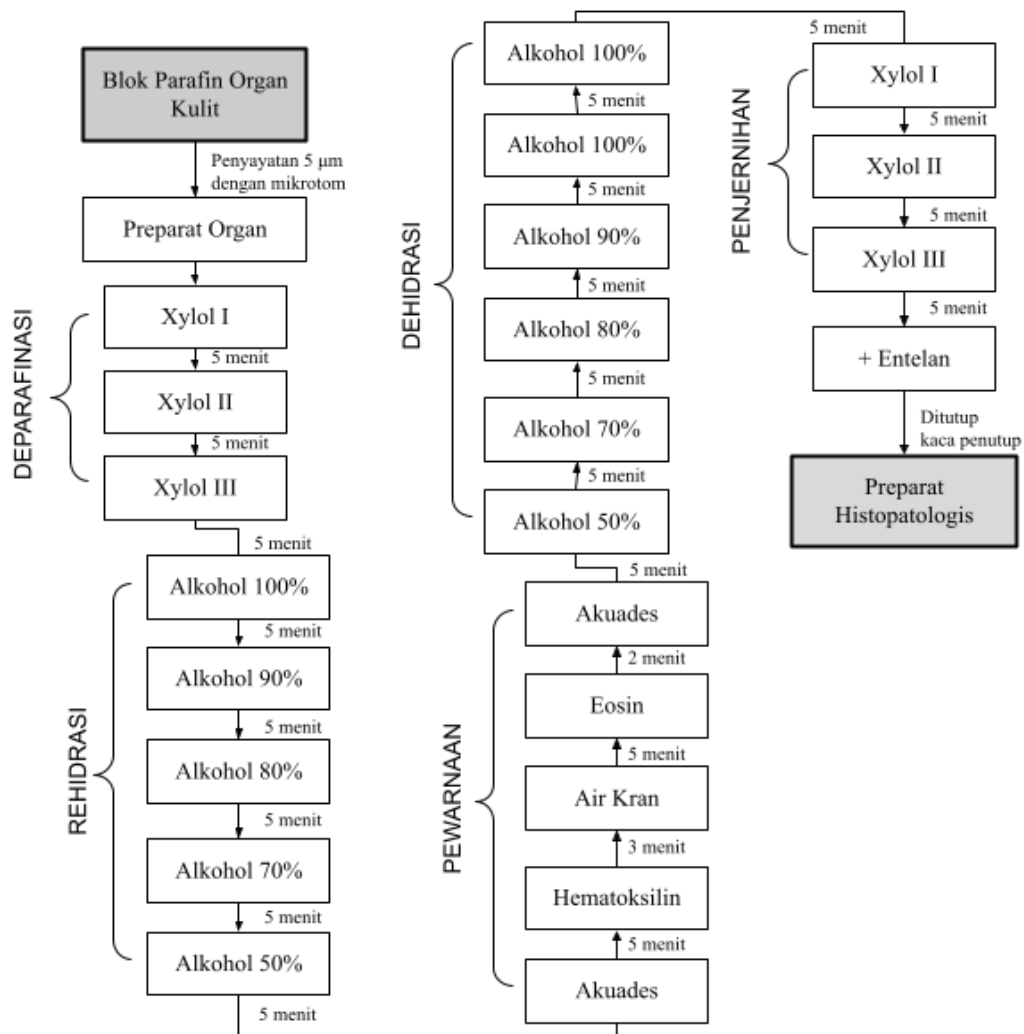


Gambar 3.1 Proses Parafinasi

(Widowati *et al.*, 2022a)

3.5.7 Pewarnaan Hematoksin-Eosin dan Pengamatan Histopatologi Kulit

Metode ini diadaptasi dan dimodifikasi dari Widowati *et al.* (2022a; 2022b). Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) bertujuan untuk mengamati histopatologi kulit yaitu perubahan morfologi sel dari jaringan kulit mencit setelah perlakuan. Proses pewarnaan HE pada kulit mencit dimulai dari penyayatan blok parafin kulit dengan menggunakan mikrotom. Sayatan jaringan yang didapat pada kaca objek dideparafinasi dengan xilol kemudian direhidrasi dengan alkohol bertingkat. Jaringan diwarnai dengan pewarna hematoksin dan eosin, kemudian didehidrasi kembali. Jaringan dijernihkan menggunakan xilol kemudian ditutup dengan kaca penutup direkatkan menggunakan entelan (**Gambar 3.2**).

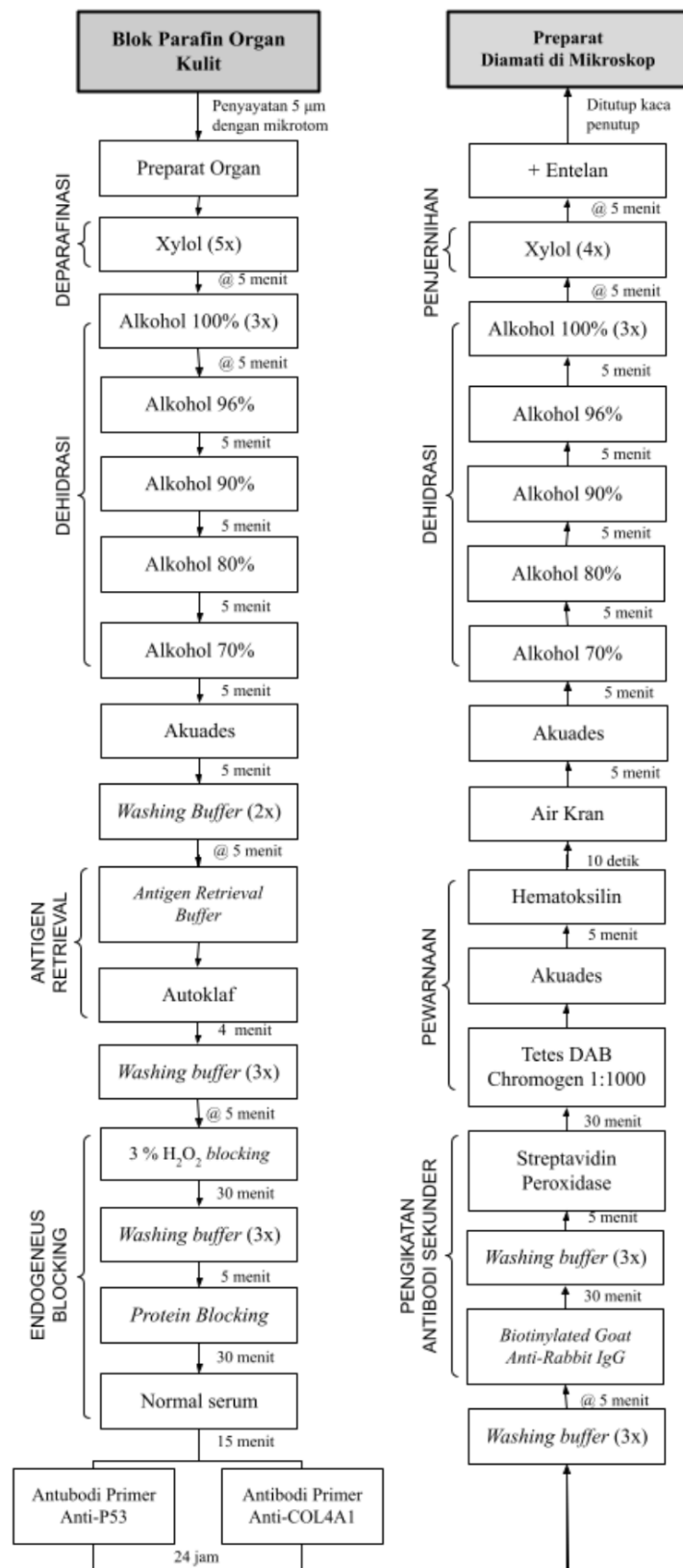


Gambar 3.2 Proses Pewarnaan Hematoksin-Eosin

(Widowati *et al.*, 2022a; Widowati *et al.*, 2022b)

3.5.8 Analisis Ekspresi Protein p53 dan COL4A1 dengan Metode Imunohistokimia

Metode Imunohistokimia (IHK) dilakukan untuk mengidentifikasi ikatan antigen-antibodi pada sel jaringan yang telah diberi perlakuan serta melihat ekspresi dari protein p53 dan COL4A1. Prinsip dari IHK adalah kombinasi dari reaksi imunologi dan kimia. Reaksi imunologi ditandai dengan reaksi antara antibodi dan antigen, sedangkan reaksi kimia ditandai dengan reaksi antara enzim dan substrat (Sudiana, 2005). Teknik ini memanfaatkan terbentuknya kompleks antigen-antibodi pada preparat jaringan atau permukaan sel yang dapat dideteksi dengan antibodi yang terikat pada enzim. Untuk memvisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibodi dilakukan dengan konjugasi antibodi dengan enzim peroksidase. Metode IHK diadaptasi dari Widowati *et al.* (2022a; 2022b) dengan urutan tahapan yaitu penyayatan, deparafinasi dengan xilol, dehidrasi dengan alkohol, pengambilan antigen (*antigen retrieval*) dengan *citrate buffer*, endogeneous *blocking* dengan *hidrogen peroksidase blocking*, *protein blocking*, pemberian normal serum, inkubasi antibodi primer (anti-p53 dan anti-COL4A1) dan antibodi sekunder (*Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG*), pengikatan antibodi sekunder dengan streptavidin peroksidase, pemberian substrat DAB kromogen, pewarnaan dengan HE, dehidrasi, penjernihan, dan penutupan preparat (**Gambar 3.3**).



Gambar 3.3 Alur Metode Imunohistokimia

(Widowati *et al.*, 2022a; 2022b)

Fadhilah Haifa Zahiroh, 2023

PENGARUH BLEMISH BALM CREAM EKSTRAK KULIT SALAK (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN p53 DAN COL4A1 PADA MENCIT (*Mus musculus* L.) YANG DIINDUKSI ULTRAVIOLET SEBAGAI MODEL PENUAAN

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.8 Kuantifikasi Data Histopatologi dan Ekspresi Protein

Pengamatan histopatologi kulit mencit secara kualitatif dilakukan menggunakan mikroskop PrimoStar (Zeiss) yang dilengkapi dengan kamera Lumenera Infinity 1-3c. Bagian yang diamati pada preparat histopatologi yang diwarnai dengan pewarnaan HE adalah struktur kolagen dan inflamasi yang ditandai dengan infiltrasi sel imun pada jaringan dermis. Kuantifikasi data kolagen dapat dihitung menggunakan rumus menurut Saldarriaga *et al.* (2021).

$$\text{Proporsi Kolagen (\%)} = \frac{\text{Luas jaringan kolagen pada dermis}}{\text{Luas seluruh jaringan pada dermis}} \times 100$$

Dalam kuantifikasi tingkatan inflamasi digunakan perhitungan skor dengan kriteria sebagai berikut:

- 0 = tidak ada peradangan dengan sedikitnya infiltrasi sel imun pada jaringan
- 1 = peradangan ringan dengan ditemukan infiltrasi sel imun yang tersebar
- 2 = peradangan sedang dengan ditemukan infiltrasi sel imun dengan cukup banyak dan mengumpul disatu daerah
- 3 = peradangan berat dengan jaringan ikat yang tidak teratur dan banyak ditemukan sel imun yang berkumpul

Pengamatan kuantitas ekspresi protein p53 dan protein COL4A1 juga dibantu dengan *software image J* sehingga didapatkan kuantitas ekspresi protein dengan satuan persen area. Preparat histologis diambil gambar dari beberapa bidang pandang pada setiap kelompok uji untuk diamati distribusi warna sel positif. Hasil ekspresi protein p53 dan COL4A1 dinyatakan positif (+) apabila warna coklat tervisualisasi dalam sitoplasma sel (intrasitoplasmik) dan negatif (-) jika warna coklat tidak tervisualisasi. Ekspresi protein p53 dan COL4A1 meningkat apabila terlihat warna coklat pekat dengan distribusi yang luas dan sebaliknya.

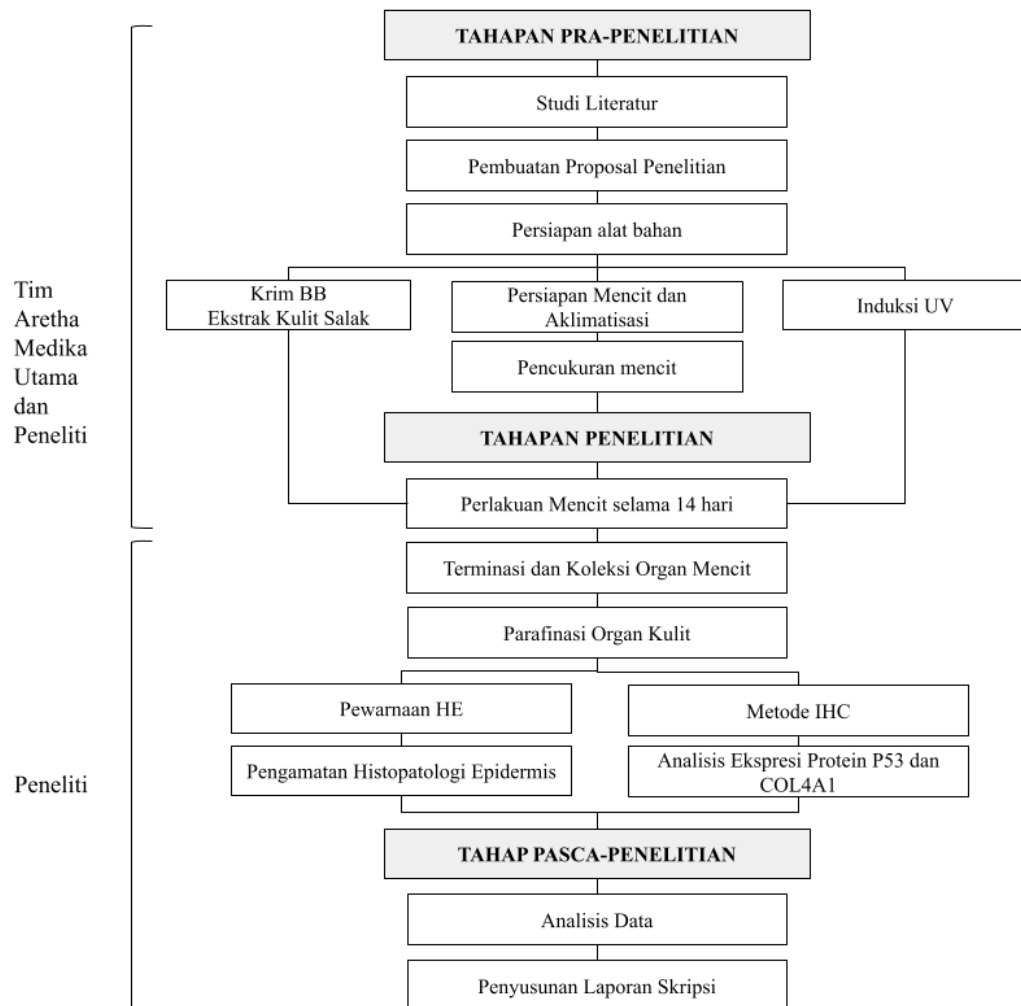
3.9 Analisis Data

Metode analisis data diadaptasi dari Ginting *et al.* (2021). Analisis data dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis data secara kualitatif dilakukan dengan cara mengamati histopatologi kulit serta distribusi warna sel positif protein p35 dan COL4A1 dengan teknik IHK. Analisis kuantitatif menggunakan *software* SPSS (versi 23.0) yang diawali dengan tes normalitas. Data yang terdistribusi normal dianalisis dengan uji analisis varian (ANOVA) satu arah dengan $P < 0.05$. Perbedaan signifikan antar kelompok diperoleh dengan uji Post Hoc Tukey untuk

data yang homogen dan *independent sample T test* untuk data yang tidak homogen. Data yang tidak terdistribusi normal dianalisis dengan Kruskal Wallis dan Post Hoc Test Mann Whitney U Data divisualisasikan sebagai rata-rata \pm standar deviasi dalam histogram yang dibuat dalam *software* GraphPad Pism (Versi 8.0.1).

3.6. Alur Penelitian

Diagram alur penelitian tersaji pada **Gambar 3.4** berikut. Dari tahapan pembuatan krim BB ekstrak kulit salak hingga perlakuan mencit selama 14 hari dilakukan oleh Tim Aretha Medika Utama. Dari tahapan terminasi dan koleksi sampel kulit mencit hingga analisis data dilakukan oleh peneliti. Dokumentasi penelitian tersaji dalam **Lampiran 4**.



Gambar 3.4 Alur Penelitian