

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian merupakan penelitian deskriptif kuantitatif dengan metode eksperimental. Jaenud (2011) menyatakan bahwa metode deskriptif kuantitatif adalah metode mengolah data dari lapangan ke dalam bentuk angka kemudian dideskripsikan dalam bentuk kalimat. Metode eksperimen dilakukan dengan memberi perlakuan dan variabel (variabel terikat) pada subjek yang diteliti sehingga terdapat hasil yang diinginkan dapat timbul dengan cara memanipulasi suatu perlakuan. Hasil data yang diperoleh dengan membandingkan hasil perlakuan subjek penelitian dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan. Zuriah (2006) menyatakan bahwa penelitian eksperimen merupakan penelitian yang sistematis, logis, dan terperinci dalam melakukan kontrol kondisi melalui manipulasi suatu stimultan, atau perlakuan eksperimental, lalu dilakukan observasi terhadap hasil dari kontrol kondisi tersebut (Zuriah, 2006).

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Desain penelitian bertujuan untuk mengelompokkan mencit yang akan digunakan ke dalam enam kelompok, satu kelompok kontrol negatif, satu kontrol positif, satu kontrol *vehicle*, satu kelompok pembanding dan dua kelompok perlakuan. Keenam kelompok tersebut masing-masing diberi perlakuan yang berbeda selama empat belas hari. Berdasarkan rumus Federer (2015), pada penelitian ini digunakan sebanyak 24 ekor dengan mempertimbangkan rumus perhitungan untuk menentukan pengulangan dalam setiap kelompok, yaitu:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan ; n = jumlah pengulangan

Syifa Indah Suci Ati, 2023

POTENSI BLEMISH BALM CREAM EKSTRAK KULIT BUAH SALAK (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss.) TERHADAP EKSPRESI GEN TGF- β 1, IL-10, DAN IL-18 PADA MENCIT (*Mus musculus* L.) YANG DIINDUKSI ULTRAVIOLET SEBAGAI MODEL PENUAAN

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

Pengelompokkan perlakuan pada mencit dilakukan secara acak bertujuan untuk menghilangkan bias. Pengelompokkan dilakukan dengan memberi kode 1-24 untuk penempatan kandang mencit dan kode A-F untuk menentukan perlakuan yang digunakan. Hasil pengelompokkan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Hasil Randomisasi Mencit

1 C2	2 D1	3 E4	4 A1	5 C1	6 B3
7 A4	8 B4	9 D3	10 F1	11 A2	12 C4
13 B2	14 F3	15 B1	16 E3	17 D2	18 F2
19 E2	20 C3	21 A3	22 D4	23 E1	24 F4

Keterangan:

A = Kontrol Negatif

B = Kontrol Positif

C = Kontrol Vehicle

D = Kontrol Pembanding

E = Perlakuan krim BB ekstrak kulit buah salak I

F = Perlakuan krim BB ekstrak kulit buah salak II

Berdasarkan hasil randomisasi mencit, maka didapatkan penempatan mencit pada setiap kandangnya yang dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Penempatan Mencit Berdasarkan Hasil Randomisasi

Kandang	Perlakuan	Kode Mencit			
		I	II	III	IV
A	Kelompok Normal	4	11	21	7
B	Kelompok kontrol positif	15	13	6	8
C	Kelompok kontrol vehicle	5	1	20	12
D	Kelompok kontrol pembanding	2	17	9	22
E	kelompok perlakuan krim BB ekstrak kulit buah salak 1	23	19	16	3
F	Kelompok perlakuan krim BB ekstrak kulit buah salak 2	10	18	14	24

Syifa Indah Suci Ati, 2023

POTENSI BLEMISH BALM CREAM EKSTRAK KULIT BUAH SALAK (Salacca zalacca (Gaert.) Voss.) TERHADAP EKSPRESI GEN TGF-B1, IL-10, DAN IL-18 PADA MENCIT (Mus musculus L.) YANG DIINDUKSI ULTRAVIOLET SEBAGAI MODEL PENUAAN

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

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2022 sampai dengan Mei 2023 dan dilakukan di dua tempat, adapun rinciannya adalah sebagai berikut:

1. Penelitian *in vivo* meliputi aklimatisasi, induksi UV, perlakuan dan terminasi pada mencit dilakukan di PT Aretha Medika Utama, Bogor, Jawa Barat, Indonesia
2. Penelitian isolasi RNA, sintesis cDNA, dan ekspresi gen TGF- β , IL-10, dan IL-18 pada jaringan kulit mencit dilakukan di Laboratorium *Biomolecular and Biomedical Research Center* Aretha Medika Utama, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah mencit jantan galur DDY dan sampel yang digunakan sebanyak 24 ekor mencit. Mencit yang digunakan berumur 10-11 minggu dengan berat 30-35 gram. Sampel mencit diinduksi UV dan diberikan perlakuan berupa olesan krim BB sesuai pada kelompok perlakuan.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan terdiri dari tahapan berikut:

3.5.1 Persiapan Alat bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini ditujukan untuk proses aklimatisasi hewan uji, uji *in vivo*, koleksi organ kulit, uji isolasi *ribonukleat acid* (RNA), sintesis *complementary DNA* (cDNA), dan kuantifikasi ekspresi gen (Lampiran 5). Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini harus dipastikan dalam kondisi baik. Alat yang sudah dipersiapkan dilakukan proses sterilisasi dengan cara dibungkus menggunakan kertas lalu dimasukkan ke dalam autoklaf selama 20 menit dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121⁰C.

3.5.2 Aklimatisasi Hewan Uji

Mencit diaklimatisasi selama tujuh hari sebelum perlakuan pada kondisi lingkungan yang memiliki suhu minimum 25 – 26 °C dan kelembaban 55%-60%. Seluruh mencit diberi pakan standar basal metabolisme diet (protein 14%, lemak

5%) dan minum secara *ad libitum*. Proses aklimatisasi ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hidayat, *et al* (2022).

3.5.3 Pengelompokan Hewan Uji

Hewan uji berupa mencit (*Mus musculus*) jantan sebanyak 24 ekor dibagi menjadi enam kelompok, berikut pembagian kelompoknya:

1. Kelompok negatif (KN) yang terdiri dari 4 mencit jantan. Pada kelompok ini hewan uji tidak dicukur maupun tidak diberi induksi UV.
2. Kelompok positif (KP) yang terdiri dari 4 mencit jantan. Pada kelompok ini hewan uji dicukur rambut punggungnya dan diinduksi UV
3. Kelompok vehicle (KV) yang terdiri dari 4 mencit jantan. Pada kelompok ini hewan uji dicukur rambut punggungnya, diinduksi UV, dan dioleskan krim dasar sebanyak 2x sehari.
4. Kelompok pembanding (KPB) yang terdiri dari 4 mencit jantan. Pada kelompok ini hewan uji dicukur rambut punggungnya, diinduksi UV, dan oleskan tabir surya sebanyak 2x sehari.
5. Kelompok perlakuan ekstrak kulit buah salak 1 (KSI) yang terdiri dari 4 mencit jantan. Pada kelompok ini hewan uji dicukur rambut punggungnya, diinduksi UV dari, dan oleskan krim BB kulit buah salak sebanyak 1x sehari.
6. Kelompok perlakuan ekstrak kulit buah salak 2 (KSII) yang terdiri dari 4 mencit jantan. Pada kelompok ini hewan uji dicukur rambut punggungnya, diinduksi UV dan dioleskan krim BB kulit buah salak dosis sebanyak 2x sehari.

3.5.4 Perlakuan Hewan Model

Sebanyak 24 ekor mencit yang telah melewati masa aklimatisasi dimasukkan secara acak ke dalam enam kelompok perlakuan dengan jumlah masing-masing empat ekor dan diberi perlakuan selama 14 hari. Mencit dicukur menggunakan alat pencukur pada bagian punggung dengan luas area 3 x 4 cm lalu diaplikasikan krim sesuai kelompok perlakuan. Krim dioleskan pada punggung mencit secara merata 20 menit sebelum disinari sinar UV. Krim diambil sebanyak 0.3 cc menggunakan *sprit* yang berukuran 1 cc dan dioleskan pada pukul 07.40 WIB untuk perlakuan

dengan satu kali olesan. Pada perlakuan dua kali olesan, krim diberikan pada pukul 07.40 WIB dan 12.40 WIB. Mencit yang sudah dioleskan krim akan diinduksi menggunakan sinar UVB dengan penyinaran dilakukan sebanyak dua kali sehari selama empat belas hari. Mencit diinduksi oleh sinar UVB selama 5 menit pada pukul 08.00 WIB dan pukul 13.00 WIB yaitu empat jam setelah penyinaran pertama untuk mendapatkan efek pembentukan ROS. Penelitian krim yang dioleskan pada kulit punggung mencit yang telah dicukur lalu diinduksi UV digunakan untuk menguji sifat antipenuaan, hal ini sesuai penelitian Sari *et al.* (2017).

3.5.4 Terminasi dan Koleksi Organ Kulit Mencit

Mencit yang sudah diberi perlakuan dilakukan proses terminasi dengan cara *cervical dislocation*. Mencit yang telah diterminasi bagian punggung dieksisi dengan ukuran 2 x 3 cm dan ketebalan 3 mm menggunakan *needle holder* dan pinset anatomis. Tahap terminasi ini mengikuti penelitian Tjahjani *et al.* (2019).

Kulit mencit dieksisi, dipotong, dan ditimbang dengan berat 0.05 gram untuk diambil jaringan segarnya. Hasil potongan tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro sentrifus yang berisi NaCl 0.9% sebanyak 1 ml. Jaringan segar kulit mencit lalu segera dipindahkan ke dalam wadah yang tertutup untuk dibekukan pada suhu -80°C. Prosedur tersebut dilakukan sesuai penelitian Maryam *et al.* (2022). Sampel yang telah diperoleh dipersiapkan sesuai protokol *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) untuk mengetahui kuantifikasi ekspresi gen TGF- β 1, IL-10 dan IL-18.

3.5.5 Uji qRT-PCR

3.5.5.1 Isolasi mRNA

Jaringan kulit seberat 0,05 gram ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 600 μ l TRI reagen (R2050-1-200) dan dihomogenisasikan menggunakan homogenizer selama 60 detik. Sampel jaringan kulit yang telah lisis kemudian disentrifugasi 13.000 xg selama 60 detik menggunakan *refrigerated centrifuge* (MWP 260r). Supernatan hasil sentrifus dipindahkan ke dalam tabung mikro sentrifus. Pada supernatan ditambahkan 350 μ l etanol dan sel diresuspensi. Sampel campuran supernatan dan etanol dipindahkan ke dalam kolom zymo-spin" IIICG dalam tabung pengumpul dan dimasukkan ke dalam sentrifus dengan 13.000xg

selama 30 detik. Cairan hasil filtrat yang terdapat pada tabung pengumpul dibuang. Pada sampel ditambahkan 400 µl RNA wash buffer dan dilakukan sentrifus dengan 13.000xg selama 30 detik. Cairan hasil filtrat yang terdapat pada tabung pengumpul dibuang. Pada tabung ditambahkan 5 µl DNase dan 75 µl DNA digestion buffer, lalu sampel diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan 25,5°C dengan kelembaban 57%. Pada tabung ditambahkan 400 µl Direct-zol RNA prewash dan dilakukan sentrifus dengan kecepatan 13.000xg selama 30 detik sebanyak dua kali pengulangan. Cairan hasil filtrat yang terdapat dalam tabung pengumpul dibuang. Sampel ditambahkan 700 µl RNA wash buffer dan sentrifus dengan 13.000xg selama 30 detik untuk memastikan *buffer* pencuci benar-benar hilang. Hasil cairan filtrat pada proses sentrifus yang terdapat pada tabung pengumpul dibuang. Sampel pada tabung dipindahkan kedalam tabung bebas RNase atau DNase yang baru dan ditambahkan 100 µl DNase/RNase free water langsung ke matriks kolom untuk disentrifus 13.000xg selama 3 menit sehingga dapat melarutkan RNA yang terisolasi. Konsentrasi RNA yang terisolasi diukur menggunakan spektrofotometer (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300) pada *microdrop plate*.

Nilai kemurnian RNA dihitung dengan membandingkan tingkat absorbansi menggunakan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀). Nilai perbandingan ideal ~ 2.1 menunjukkan kemurnian RNA (Wilfinger *et al.*, 2000). Nilai RNA yang diperoleh digunakan untuk sintesis cDNA dengan konsentrasi yang sama pada setiap sampel. Isolasi mRNA dilakukan menggunakan prosedur kit Direct-zolTM RNA Miniprep Plus (Nos.R2073) Prosedur isolasi RNA dilakukan dalam kabinet PCR (Esco, 2017-122662) sesuai dengan penelitian Widowati *et al.* (2020).

3.5.5.2 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA diawali dengan membuat reaksi campuran pada tabung PCR yang terdiri dari 4 µl 5x iScript TAMP (Bio-Rad #170-8841), 1 µl iScript transcriptase, 15 µl RNA dan NFW (Thermoscientific, R0581). Reaksi campuran tersebut dihomogenisasi menggunakan *spindown*. Reaksi campuran dimasukkan ke dalam kabinet PCR (Esco, 2017-122662) dengan ketentuan tahap *priming* selama

5 menit pada suhu 25°C, tahap *reverse transcription* selama 20 menit pada suhu 46°C, dan tahap *RT inactivation* selama 1 menit dengan suhu 95°C, dan Optional Step pada suhu 4°C (hold). Prosedur ini dilakukan sesuai dengan penelitian Widowati *et al.*(2020).

3.5.5.3 Uji Kuantifikasi Ekspresi Gen

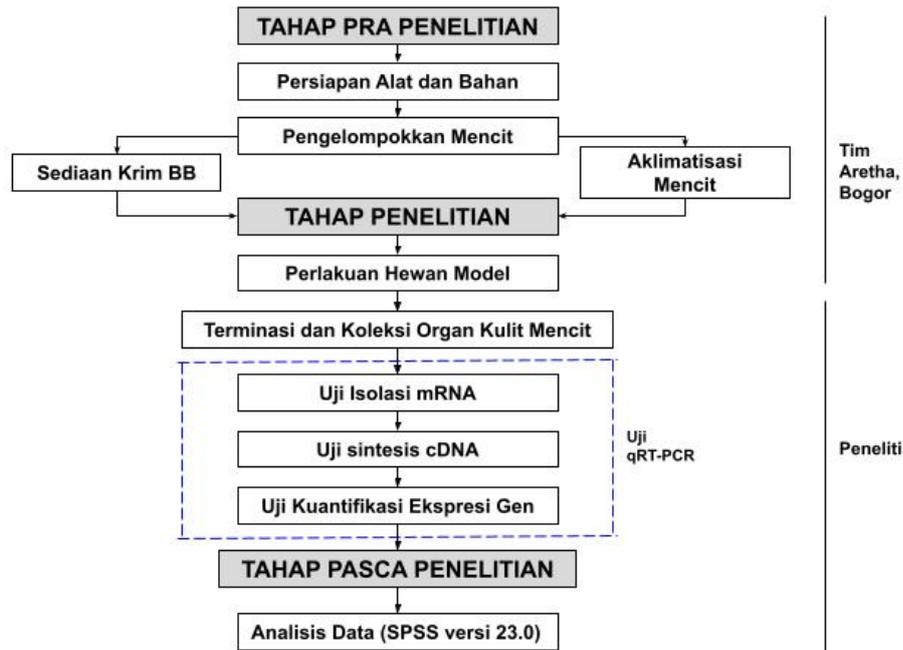
Reaksi campuran PCR yang terdiri dari 3,2 µl NFW, 5 µl ssfast evagreen supermix (Bio-Rad, 172-5200), 0,4 µl primer forward, 0,4 µl primer reverse, dan 1 µl cDNA hasil perlakuan. Reaksi campuran dimasukkan ke *wellplate* dan dimasukkan ke dalam qRT-PCR (Agilent, G8830A). Penggunaan β -actin digunakan sebagai *house keeping*. Gen TGF- β 1, IL-18, IL-10, dan β -actin dilakukan proses pradenaturasi selama 5 menit pada suhu 95°C dan denaturasi selama 30 menit pada suhu 95°C selama 40 siklus. Pada proses *annealing* dilakukan selama 40 detik dan 40 siklus, suhu yang dibutuhkan untuk gen TGF- β 1 yaitu 60° C, sedangkan pada IL-18 dan IL-10 yaitu 58° C. Proses pre-elongasi membutuhkan waktu selama 60 detik dengan suhu 72°C. Pada proses elongasi membutuhkan suhu 72°C dengan waktu 60 detik. Suhu pada kurva leleh yaitu 55-95°C, setelah itu disimpan dalam suhu 4°C. Urutan primer β -actin, TGF β , IL-10, dan IL-18 pada (Lampiran 3). Prosedur sesuai dengan penelitian Widowati *et al.* (2020).

3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara statistik menggunakan aplikasi *software* SPSS versi 23.0. Analisis data diawali dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Data yang terdistribusi normal serta homogen ditandai dengan nilai $P > 0.05$. Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* untuk menghitung nilai rata-rata sampel dan uji Tukey untuk membandingkan nilai rata-rata kelompok sampel setelah analisis (Ginting *et al.*, 2021).

3.7 Alur Penelitian

Berikut merupakan alur penelitian yang akan dilakukan (Gambar 3.1)



Gambar 3.1. Alur Penelitian Uji qRT-PC