

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan *posttest only with control group design* karena sel-sel fibroblas yang digunakan dalam setiap kelompok berasal dari jaringan keloid yang sama dan menyertakan kelompok kontrol yang berisi sel-sel fibroblas tanpa intervensi sama sekali.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel penelitian diambil dari pasien yang datang ke Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD dr. Moewardi Surakarta. Kultur fibroblas dilakukan di Laboratorium Dermama *Biotechnology* Surakarta sedangkan pemeriksaan MTT dan ELISA dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Pemilihan lokasi penelitian berdasarkan ketersediaan alat untuk penelitian. Waktu Penelitian telah dilaksanakan pada Maret hingga Juni 2020.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah jaringan keloid dari pasien dengan keloid yang berobat ke poliklinik Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD dr. Moewardi Surakarta dan telah dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi.

2. Sampel penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *in vitro* dengan menggunakan sampel penelitian berupa fibroblas keloid yang diperoleh dari 3 pasien keloid. Penentuan besar sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan cara *non random sampling* (sampel tidak acak) dengan teknik *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah “pengambilan sampel yang dilakukan dengan

memilih secara sengaja menyesuaikan dengan tujuan penelitian” (Etikan, 2016). Pemilihan sampel penelitian untuk penelitian eksperimental secara sederhana dapat dihitung menggunakan rumus replikasi : (Supranto, 2000)

$$(t - 1) (r - 1) > 15$$

r: jumlah replikasi

t: jumlah kelompok perlakuan

Perlakuan pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan (t) terdapat 4 perlakuan yakni kontrol sel, pemberian PFD 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml, kombinasi PFD 1.5mg/ml dan 5 FU 1 mg/ml maka jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan dapat dihitung:

$$(4-1) (r-1) > 15$$

$$3 (r-1) > 15$$

$$r > 15/3$$

$$r > 6$$

Berdasarkan rumus diatas, penelitian ini sudah memenuhi jumlah minimal replikasi ($r > 6$) yakni sejumlah 9 kali replikasi.

Penelitian ini menggunakan sampel jaringan keloid yang berasal dari 3 pasien yakni pasien A, pasien B dan pasien C. Masing-masing jaringan dibagi menjadi 4 kelompok sampel penelitian dan mendapatkan perlakuan sebagai kontrol sel, diberikan terapi PFD 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml, kombinasi PFD 1.5mg/ml dan 5 FU 1 mg/ml. Setiap jaringan kemudian di lakukan pengukuran kadar pSmad3, TGF- β 1, kolagen tipe 1 dan proliferasi fibroblas setelah 72 jam perlakuan.

Fibroblas keloid tersebut diambil dengan cara eksisi pada penderita keloid yang sudah menandatangani *inform consent* sebelumnya dan atas persetujuan Komisi Etik Penelitian RSUD dr. Moewardi, kemudian dibawa ke laboratorium Dermama *Biotechnology* dengan menggunakan media transport jaringan untuk dilakukan kultur fibroblas. Terdapat 4 kelompok yaitu kelompok dengan pemberian PFD 1.5 mg/ml (PFD-1.5), 5-FU 1mg/ml

(5-FU), kombinasi PFD-1.5/5-FU (PFD-1.5/5-FU), dan kontrol sel (tanpa terapi). Pemilihan dosis ini ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya dimana kadar PFD 1.5 mg/ml dan 5-FU 1 mg/ml menurunkan deposisi kolagen lebih kuat (Dharmawan *et al.*, 2020). Pemeriksaan untuk proliferasi sel (MTT), TGF β -1 dan kolagen tipe 1 dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sedangkan khusus pemeriksaan untuk pSmad3 dilakukan pengulangan 2 kali dengan mempertimbangkan kebutuhan sel.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah;

1. Pasien keloid yang belum pernah mendapatkan terapi dalam 1 tahun terakhir.

Satu studi menyebutkan bahwa pasien dengan keloid minor akan mengalami perkembangan menjadi keloid kurang lebih memerlukan waktu selama 1 tahun setelah mendapatkan lesi (Nicoletti *et al.*, 2013). Lebih lanjut, Baker dan rekan kerjanya menyebutkan bahwa untuk proses maturasi pembentukan skar yang sempurna dan komplisit terjadi kurang lebih selama 1 tahun (Baker *et al.*, 2009).

2. Bersedia dilakukan operasi keloid.

Persetujuan melakukan tindakan (*informed consent*) merupakan prosedur etik dan legal yang harus dilakukan sebelum tindakan medis kepada pasien. Kesiapan pasien secara sadar dalam melakukan tindakan medis merupakan prinsip *autonomy* dalam prinsip etik dalam pengambilan keputusan, sehingga ketika prinsip *autonomy* tersebut belum terpenuhi maka tindakan medis sebaiknya tidak dilaksanakan kecuali jika pasien datang dalam keadaan gawat darurat dan mengancam jiwa (Stiggelbout *et al.*, 2004).

3. Usia antara 20 hingga 40 tahun.

Keloid jarang dijumpai pada dekade I karena usia tersebut belum distimulasi oleh hormon seks. Dekade II dan dekade III memiliki insidensi yang paling tinggi kemudian akan menurun pada orang tua

yang kemungkinan disebabkan karena usia muda lebih sering terpapar trauma serta memiliki tegangan kulit yang lebih kuat daripada orang tua (Shaheen, 2017a). Penelitian oleh *Dharmawan et al.* dengan subjek pasien keloid yang datang berobat ke RS. dr. Moewardi Surakarta menyatakan bahwa laki-laki lebih banyak menderita keloid daripada wanita, sedangkan usia terbanyak antara 21-30 tahun (*Dharmawan et al.*, 2019).

Kriteria Eksklusi pada penelitian ini adalah:

1. Pasien yang memiliki lesi keloid didaerah persendian.

Penelitian yang dilakukan oleh *Akaishi et al.* menyebutkan bahwa ketegangan pada proses peregangan kulit yang tinggi dapat mempengaruhi terjadinya pembentukan jaringan keloid seperti pada regio dada, skapula sehingga sering terjadi kekambuhan dan sulit untuk menilai efektifitas terapi (*Akaishi et al.*, 2008).

2. Pasien keloid anak-anak.

Pasien keloid pada anak-anak disebutkan dalam suatu penelitian memiliki angka kekambuhan yang relatif tinggi sehingga memerlukan waktu yang cukup lama dalam terapi (*Khan et al.*, 2020).

3. Lesi keloid meradang atau mengalami infeksi.

Teknik injeksi merupakan salah satu terapi yang digunakan dalam pengobatan jaringan keloid akan tetapi pemberian injeksi pada jaringan keloid yang meradang atau terjadi infeksi dapat memperparah jaringan keloid itu sendiri karena dapat memperparah jaringan keloid tersebut (*Trislina Perdanasari et al.*, 2014).

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: Pemberian kombinasi terapi pada keloid.

Variasi: PFD 1.5 mg/ml, 5-FU 1 mg/ml, kombinasi PFD 1.5 mg/ml dan 5-FU 1 mg/ml.

2. Variabel terikat: kadar pSmad3, kadar TGF- β 1, kadar kolagen tipe 1 dan proliferasi fibroblas pada fibroblas keloid.

3. Variabel perancu

Tidak dapat dikendalikan: faktor genetik, jalur sinyal MAPK, jalur sinyal integrin dan jalur sinyal IGF-I, mutasi genetik, perbedaan karakteristik antara tepi dan tengah lesi keloid dan tidak dilakukan karakterisasi sel fibroblas pada saat kultur.

F. Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional

No.	Parameter	Definisi	Metode	Satuan	Skala
1.	Pirfenidon	Pirferidon (<i>5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone</i>) adalah obat yang sudah mendapat persetujuan dari FDA sebagai terapi dari fibrosis pulmonar idiopatik, selain itu mempunyai efek anti inflamasi dan anti fibrotik pada berbagai macam penyakit fibrosis	Observasi langsung	mg/ml	Kategorikal
2.	5-FU	5-FU adalah salah satu agen anti metabolik yang merupakan analog pirimidin. Mekanisme kerjanya sebagai penghambat <i>thymidylate</i> dan enzim sintase yang akan mengubah uridin ke timidin yang diperlukan untuk sintesis DNA dan proliferasi sel	Observasi langsung	mg/ml	Kategorikal
3.	Proliferasi fibroblas	Proliferasi sel adalah proses dimana sel tumbuh dan membelah. Proliferasi sel menyebabkan peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan karenanya merupakan mekanisme pertumbuhan jaringan yang cepat	MTT assay	Prosentase	Numerik
4.	Kadar pSmad3	Smad3 (<i>Drosophila mothers against decapentaplegic related protein</i>) adalah salah satu mediator intraseluler yang menyampaikan informasi seluler dari	ELISA	pg/ml	Numerik

		membran sel dengan proses fosforilasi sebelum masuk kedalam nukleus dengan proses translokasi.			
5.	Kadar TGF- β 1	TGF- β merupakan salah satu <i>growth factor</i> yang merupakan modulator fibrogenesis yang paling utama, dimana akan memicu fibrosis melalui jalur <i>Smad-dependent (canonical)</i> dan jalur <i>Smad-independent (non canonical)</i> .	ELISA	pg/ml	Numerik
6.	Kadar Kolagen tipe I	Adalah salah satu komponen dari matriks ekstraseluler yang paling utama pada keloid.	ELISA	ng/ml	Numerik

G. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan dalam penelitian ini adalah:

1. Jaringan keloid.
2. Pirfenidon *powder* murni 99,87% (Octagon Chemical Limited, Cas. 53179-13-8).
3. 5-*Fluorouracyl* (5-FU) 1mg/ml (Curasil 500mg, Kalbe Farma).
4. Human TGF- β 1 ELISA kit (Bioassay Technology Laboratory, Cat.No E0134Hu).
5. *Human Phosphorylated Smad-3* ELISA kit (MyBioSource, Cat. No. MBS269936).
6. MTT *assay* (Biobasic, CAS 298-93-1).
7. Alkohol 70%.
8. Betadin 10%.
9. *Dullbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) dengan suplemen (serum dan antibiotik).
10. PesStrep 1%.
11. PenStrep 4%.
12. Gentamisin sulfat.

13. *Fungizone* 0,5%.
14. *Versene* (EDTA).
15. *Phosphate-buffered saline* (PBS).
16. *Fetal bovine serum* (FBS) 10%.
17. Piring kultur jaringan (100 mm, 60 mm, 35 mm).
18. Tabung *centrifuge* 15 ml dan 50 ml polipropilen.
19. Alat *centrifuge*.
20. Inkubator jaringan CO₂.
21. *Multi-well plate* 96.
22. Blue tip.
23. Pipet *Pasteur*.
24. Pinset dan pisau jaringan.
25. Mikroskop.
26. Kamera digital.
27. *Automatic cell counter* (Scepter™, MILLIPORE CORP BILLERICA, CAT No: PHCC00000).
28. *Microplate reader* (iMark™, BIO-RAD).

H. Tata Laksana Penelitian

Prosedur penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan mengacu dari penelitian mengenai fibroblas sebelumnya dengan tahapan sebagai berikut : (Fernandes *et al.*, 2016; Dharmawan *et al.*, 2020).

1. Pengambilan Sampel.

Sampel keloid diambil dari 3 pasien yang menderita keloid di daerah dada serta telinga, dimana pasien tersebut belum pernah mendapatkan terapi sebelumnya. Pasien diminta menandatangani *informed consent* setelah dijelaskan tentang prosedur dan maksud penelitian ini.

Setelah aseptik dan antiseptik medan operasi, disuntik anastesi dengan lidokain HCL kurang lebih 2 ml, kemudian ditunggu setelah 5 menit supaya anastesi bekerja maksimal. Lesi keloid kemudian disayat dengan menggunakan pisau no 11 sejajar dengan permukaan kulit. Sedangkan pada

pasien keloid telinga, lesi keloid di eksisi lalu defek dijahit dengan menggunakan benang 4.0. Setelah lesi terangkat sempurna, kemudian sampel lesi tersebut dicuci dengan NaCl 0,9%, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 15 ml yang berisi media transport (PBS 30 ml, heparin 2 μ l, gentamisin 4%). Tabung tersebut kemudian dimasukkan ke dalam box yang berisi es dan segera dibawa ke laboratorium Dermama *Biotechnology* untuk selanjutnya dilakukan kultur jaringan keloid. Defek yang ada pada bekas pengambilan lesi keloid kemudian dibersihkan, diberi salep antibiotik gentamisin 1% dan ditutup dengan kassa. Penderita diberikan antibiotik sefadroxil 2 x 500 mg dan dianjurkan kontrol setiap 2 hari.

2. Kultur Fibroblas

- a. Jaringan direndam dalam larutan *povidone iodine* 10% selama 3 menit lalu cuci jaringan dengan PBS steril sampai bersih hingga warna merah *povidone iodine* benar-benar hilang di dalam cawan petri.
- b. Lapisan dermis dari epidermis dipisahkan dengan menggunakan pisau steril lalu sampel dipotong-potong pada piring kultur 100 mm berbentuk kotak-kotak kecil dengan ukuran sekitar 2x2 mm. Kemudian potongan-potongan tersebut diletakkan ditengah piring kultur 35 mm sebanyak yang dibutuhkan.
- c. Petri diberi medium DMEM lengkap sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C, CO₂ 5% dan diinkubasi selama 24 jam.
- d. Medium DMEM lengkap diganti setiap hari selama 3 hari sampai jaringan benar-benar sudah menempel pada dasar cawan petri.
- e. Jika jaringan sudah menempel, medium yang ditambahkan dalam cawan petri harus sampai menggenangi semua jaringan.
- f. Pergantian medium dilakukan setiap 3 hari sekali dan ditunggu hingga sel fibroblas mencapai konfluensi 75% dari luas permukaan petri untuk selanjutnya dilakukan sub kultur.

3. Sub Kultur Fibroblas

- a. Sub kultur dilakukan setelah fibroblas sudah mencapai konfluen 70% luas permukaan. Medium dalam cawan petri dibuang, lalu jaringan dicuci dengan PBS steril, didiamkan selama 10 menit kemudian dibuang.
- b. Tripsin sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam cawan, kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 2-3 menit dan dilihat apakah sel sudah terlepas atau belum. Apabila belum terlepas, tambahkan waktu inkubasi.
- c. Setelah itu ditambahkan 5ml medium DMEM lengkap dan suspensi dipindahkan dari cawan ke tabung 15 ml dengan menggunakan pipet *Pasteur* dan di *vortex*.
- d. Kemudian suspensi di sentrifugasi 200 G selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang dan diambil suspensinya.
- e. Medium lengkap DMEM 1 ml dilakukan *vortex*.
- f. Kemudian suspensi dibagi menjadi beberapa cawan petri, tambahkan medium DMEM dalam masing-masing cawan petri dan masukkan ke dalam inkubator selama 24 jam. Medium diganti setiap 3 hari sekali.
- g. Ditunggu sampai sel penuh mencapai 70% luas permukaan petri dan siap untuk dilakukan sub kultur kembali.
- h. Proses diatas diulang hingga pasase VII.

4. Pasase VII

- a. Medium sel fibroblas yang ada di dalam flask dibuang lalu masukkan 5 ml PBS steril ke dalam cawan petri dan diamkan 10 menit lalu PBS dibuang.
- b. Lalu dimasukkan 1 ml tripsin dalam inkubator selama 2-3 menit.
- c. Sel dikeluarkan dari dalam inkubator dan dikontrol dibawah mikroskop untuk memastikan sel sudah lepas atau belum. Jika sel belum lepas semuanya, tambahkan waktu inkubasinya.
- d. Ditambahkan 5cc medium DMEM lengkap dan dipindahkan suspensi sel di dalam flask ke dalam tabung 15cc dengan menggunakan pipet *Pasteur* lalu di *vortex*.
- e. Setelah itu dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 200G selama 10 menit dan suspensi diambil dari alat *centrifuge* dan buang supernatannya.

- f. Ditambahkan 1cc medium DMEM lengkap lalu *vortex*.
 - g. Medium DMEM diambil sebanyak 175 μL dan sel sebanyak 25 μL lalu dimasukkan ke dalam tube *ependorf* 1.5 ml.
 - h. Jumlah sel dihitung dengan alat *Automatic cell counter* (ScepterTM, MILLIPORE CORP BILLERICA, CAT No: PHCC00000) untuk menghitung kebutuhan jumlah sel tiap *well* (5.000 sel).
 - i. Setelah dilakukan perhitungan jumlah sel, dimasukkan sebanyak 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ kedalam 96 *well* kit.
 - j. Setelah inkubasi selama 48 jam, lalu diberikan perlakuan dan kembali diinkubasi selama 72 jam.
5. Pengenceran 5-FU
- Sediaan 5-FU adalah 50 mg/ml, sehingga diperlukan sebanyak 0,02 ml untuk setiap perlakuannya.
6. Pengenceran pirfenidon.
- a. Disiapkan pirfenidon powder (Octagon Chemical Limited, Cas. 53179-13-8)
 - b. Dilakukan pengenceran untuk dosis 1.5 mg/ml
 - c. Pada kelompok perlakuan pirfenidon 1.5 mg/ml (0.3 mg dalam 200 μL). diencerkan dengan cara menimbang pirfenidon 2mg lalu dimasukkan ke dalam tabung 15 ml.
 - d. Kemudian pada setiap tabung berisi pirfenidon tadi dimasukkan 4 ml DMEM, lalu di*vortex*.
7. MTT *assay*
- a. Fibroblas dimasukkan ke dalam well (96 kit) sebanyak 200 μL , lalu diinkubasi selama 48 jam.
 - b. Setelah 48 jam diinkubasi, supernatan diambil.
 - c. Media lalu diganti, dan ditambahkan masing-masing pirfenidon dalam dosis PFD-1.5, 5-FU, PFD-1.5/5-FU yang sudah diencerkan dalam DMEM.
 - d. Pada kelompok kontrol ditambahkan media pertumbuhan DMEM.
 - e. Diinkubasi kembali selama 72 jam.

- f. Setelah diinkubasi 72 jam, ambil semua supernatan pada *well* dan dimasukkan tabung *ependorf*, lalu sel pada *well* dicuci dengan PBS dan dicek dibawah mikroskop untuk memastikan sel tetap menempel.
- g. Disiapkan MTT *powder* sebanyak 1 mg dan dicampur dengan medium sebanyak 2 ml, kemudian di *vortex* supaya larut.
- h. Larutan MTT dimasukkan ke dalam *well* sebanyak 200 μ l/*well*.
- i. *Multi-well plate* dibungkus dengan dengan alumunium *foil* lalu diinkubasi kembali selama 4 jam di dalam, inkubator CO₂ 37° C.
- j. Setelah diinkubasi 4 jam, supernatan dibuang dan ditambahkan DMSO 200 μ l/*well*. Hasil MTT dibaca dengan menggunakan *Microplate reader* (iMark™, BIO-RAD).

8. ELISA

ELISA adalah pemeriksaan biokimia analitik yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi atau mengukur suatu protein, baik protein tunggal maupun kompleks protein, secara kualitatif dan kuantitatif. Pemeriksaan ini menggunakan teknik *radioimmunoassay* untuk mendeteksi antibodi yang telah dilabeli dengan radioisotop, sehingga pengukuran kuantitatif protein secara langsung dapat diukur dengan mengukur radioaktifitas-nya. Teknik ini adalah pemeriksaan yang simpel dan efisien, digunakan untuk mengetahui *signaling pathway* dan efek obat terhadap sel. Kadar pSmad3 dan TGF- β -1 dapat diukur dengan pemeriksaan ini.

Setelah sel diinkubasi dalam *multi-well plate* selama 48 jam, maka media DMEM dibuang dan diganti dengan DMEM yang sudah ditambah dengan dosis perlakuan yaitu kelompok perlakuan PFD-1.5, 5-FU, PFD-1.5/5-FU, sedangkan kelompok kontrol yang diisi dengan DMEM. Masing masing dosis dilakukan secara *triplicate* kemudian diinkubasi 72 jam. Setelah 72 jam perlakuan maka supernatan dipisahkan dengan *pellet* untuk pemeriksaan ELISA TGF- β 1.

a. Pemeriksaan Kadar pSmad3.

Smad3 adalah protein yang ada di intraseluler sehingga untuk mengukur kadarnya memerlukan *lysis buffer* untuk ekstraksi proteinnya. Untuk mendapatkan hasil yang bisa dianalisis, maka khusus pemeriksaan pSmad3 memerlukan jumlah sel fibroblas yang lebih banyak. Pada penelitian ini, sub kultur sel fibroblas untuk pemeriksaan pSmad3 pada pasase VII dalam 6 *multi-wells plate* dengan estimasi 300.000 sel/*well*. Setelah 48 jam inkubasi, sebelum pemberian perlakuan, diharapkan jumlah sel dapat mencapai 800.000 hingga 1.000.000 sel/*well* sehingga nantinya akan di dapatkan sel pellet yang lebih banyak untuk keperluan ekstrasi protein menggunakan *lysis buffer*. Langkah ekstraksi protein sebagai berikut:

1. Boks stereofom disiapkan dan diisi dengan es minimal setengah dari tinggi boks.
2. Sampel ditimbang kurang lebih 100 mg dan masukkan ke dalam tabung 2 ml.
3. Ditambahkan 1 ml larutan *lysis buffer* dan ditaruh kedalam boks stereofom.
4. Sel dilisiskan dengan menggunakan sonikator selama 30 detik dan ditaruh taruh kembali kedalam es selama 10 detik.
5. Kemudian dihomoginizer selama 20 detik, 3000 rpm dan ditaruh kembali ke dalam es selama 10 detik.
6. Langkah ke-4 diulangi hingga sel lisis sempurna.
7. Sel dipindahkan kedalam tabung *ependorf* 1.5 ml yang baru.
8. Disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 G selama 20 menit pada suhu 18-20°C.
9. Supernatan dipindahkan kedalam tabung *ependorf* yang baru dan diletakkan kedalam boks *stereofom*.

b. Prosedur pemeriksaan ELISA untuk TGF- β 1 (Komabiotech, Cat No. K0332110)

1. Persiapan sampel.

Setelah diinkubasi 72 jam, sel kultur kemudian dilakukan sentrifugasi selama pada 1500 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰ C untuk membuang partikel-partikel.

2. Prosedur aktivasi sampel.

3. Kemudian ditambahkan 20 μ l 1 N HCL kedalam 100 μ l supernatan lalu *divortex*.

4. Lalu diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang.

5. Dinetralisasi dengan menambah 20 μ l 1.2 N NaOH/05 M HEPES lalu *divortex* kembali supaya tercampur sempurna.

6. Sampel yang sudah diaktivasi ini segera dilakukan pemeriksaan.

7. Konsentrasi sampel yang akan dibaca ini harus dimultiplikasi dengan faktor pengenceran 1.4.

c. Persiapan Reagen.

1. Standar protein.

Disiapkan 1 vial standar protein ke dalam 0.11 ml air steril hingga mencapai konsentrasi 100.000 pg/ml. Kemudian diencerkan dalam *Assay Diluent* dengan perbandingan 1:2 seperti bagan dibawah. *Standard diluent buffer* berfungsi sebagai standar 0.

Tabel 3. Metode dilusi standar protein.

<i>Step</i>	<i>Dilution Method</i>	<i>Concentration</i>
Step A	0.02 ml of Standard + 0.98 ml <i>assay diluent</i>	2000 pg/ml
Step B	0.5 ml Step A + 0.5 ml <i>assay diluent</i>	1000 pg/ml
Step C	0.5 ml Step B + 0.5 ml <i>assay diluent</i>	500 pg/ml
Step D	0.5 ml Step C + 0.5 ml <i>assay diluent</i>	250 pg/ml
Step E	0.5 ml Step D + 0.5 ml <i>assay diluent</i>	125 pg/ml
Step F	0.5 ml Step E + 0.5 ml <i>assay diluent</i>	62.5 pg/ml
Step G	0.5 ml Step F + 0.5 ml <i>assay diluent</i>	31.25 pg/ml

2. Deteksi ntibodi.

Disiapkan 1 vial *detection antibody* dalam 0.275 aquades steril dan diencerkan dalam perbandingan 1:2 dengan *assay diluent*.

3. *Streptavidin-HRP*.

Diencerkan dengan *Streptavidin-HRP conjugate* 1:20 *assay diluent*.

4. *Wash buffer*.

Diencerkan dengan *wash buffer concentrate* dalam 1 L *aqua destilata*.

d. Prosedur ELISA.

1. Pencucian. Pertama ditambahkan 200 μl *washing solution* kedalam tiap *well*, lalu diaspirasi dan dicuci sebanyak 3x menggunakan 300 μl tiap *well*. Pada pencucian terakhir, plat dibalik untuk menghilangkan residu dan dikeringkan dengan kertas tisu. *Well* jangan dibiarkan sampai benar benar kering dan langsung dilanjutkan ke tahap berikutnya.
2. Reaksi. Ditambahkan 100 μl standar, blank dan sampel ke dalam tiap *well*. Tutup *plate* dengan *plate sealer* lalu diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam.
3. Pencucian. Cairan dalam setiap *well* diaspirasi lalu cuci *plate* sebanyak 4 kali seperti langkah no 1.
4. Deteksi. Tahap ini ditambahkan 100 μl antibodi deteksi yang sudah diencerkan ke dalam tiap *well* kemudian tutup *plate* dengan *plate sealer* lalu diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruangan.
5. Pencucian. *Plate* diaspirasi dan dicuci seperti no 1.
6. Konjugasi. Sebanyak 100 μl *Streptavidin-HRP* yang sudah diencerkan ditambahkan kedalam tiap *well*. Tutup *plate* lalu diinkubasi dalam suhu ruangan selama 30 menit.
7. Pencucian. Tahap ini diaspirasi dan dicuci seperti langkah no 1.
8. Pewarnaan. Sebanyak 100 μl TMB atau pink-ONE TMB solution ditambahkan kedalam tiap *well*, inkubasi dalam suhu ruang sehingga akan terbentuk warna lalu tambahkan 100 μl *stop solution* (H_2SO_4) kedalam tiap *well*.

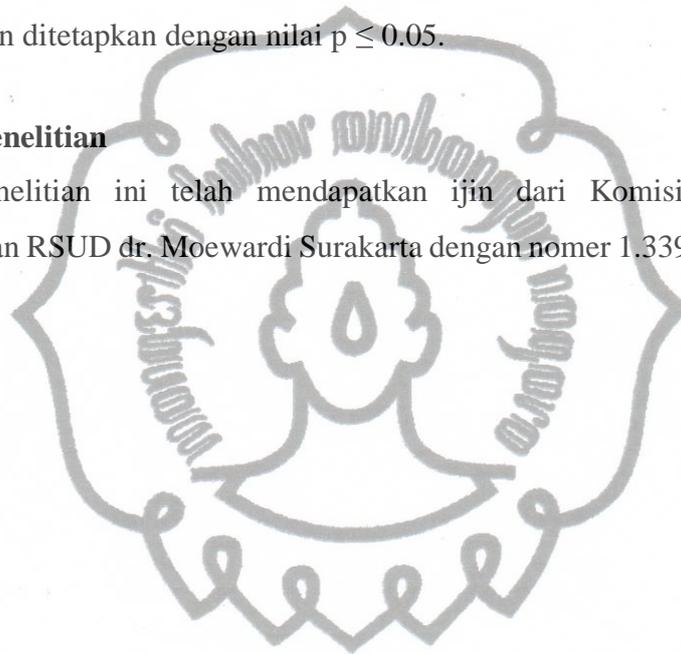
9. Pembacaan. Masukkan dalam *microplate reader* pada 450 nm.

I. Analisis Hasil Penelitian

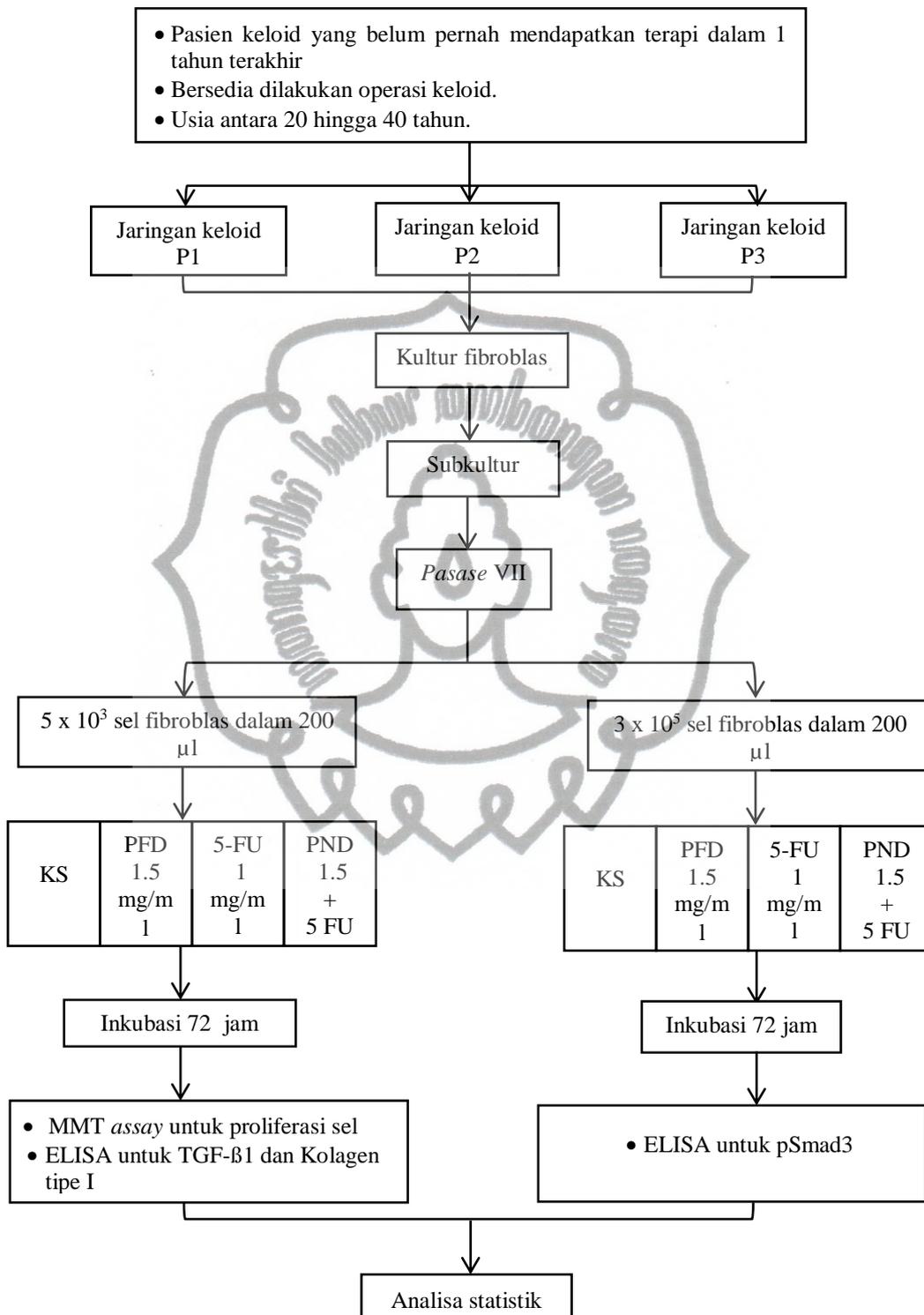
Analisis data penelitian menggunakan *software* statistik SPSS 21.0. Pada penelitian ini, uji normalitas *Shapiro-Wilk* digunakan untuk menentukan data berdistribusi normal atau tidak. Karena data terdistribusi normal, perbedaan rerata antar kelompok dianalisis dengan uji ANOVA dan dilanjutkan uji *post hoc* untuk menentukan perbandingan antar kelompok yang berbeda. Perbedaan signifikan ditetapkan dengan nilai $p \leq 0.05$.

J. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan ijin dari Komisi Etik penelitian Kesehatan RSUD dr. Moewardi Surakarta dengan nomer 1.339/XII/HREC/2019



K. Alur Penelitian



Keterangan:

Jaringan keloid P1 : jaringan keloid pasien 1.

Jaringan keloid P2 : jaringan keloid pasien 2.

Jaringan keloid P3 : jaringan keloid pasien 3.

commit to user

Pengambilan sampel penelitian ini dilakukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah disebutkan sehingga didapatkan 3 sampel yaitu jaringan keloid P1, P2 dan P3. Ketiga jaringan fibroblas keloid tersebut dilakukan kultur primer hingga mencapai konfluensi 70% luas permukaan. Selanjutnya, dilakukan sub-kultur hingga pasase VII. Sel fibroblas kemudian dipindahkan kedalam 96 *well kit* dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi 48 jam, kemudian sel diberikan dosis obat perlakuan baik tunggal maupun kombinasi. Kemudian, jaringan diinkubasi kembali selama 72 jam. Setelah inkubasi 72 jam, jaringan kemudian dilakukan pemeriksaan ELISA untuk mengetahui TGF β -1, pSmad3 dan kolagen tipe 1 dan dilakukan pemeriksaan MTT untuk mengetahui proliferasi fibroblas.

