

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian design eksperimental di laboratorium. Penelitian ini dilakukan dengan membuat beberapa formula gel *Amniotic Membran Stem Cell* (AMSC-MP) dengan beberapa rasio variasi asam hialuronat (HA) dengan kombinasi *SPACE Peptide* sebagai *enhancer* makromolekul. Masing-masing formula dilakukan karakterisasi (FTIR, organoleptis, pH dan daya sebar); uji efektivitas (penetrasi, kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast); ujestabilitas (pH, daya sebar dan kandungan *growth factor β*) dan uji iritabilitas, kemudian dibandingkan dengan kontrol dan dilakukan pengumpulan data dan penarikan kesimpulan dari penelitian.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasiasam hialuronat (HA) yang digunakan dalam formulasi gel AMSC-MP.

4.2.2 Variabel tergantung

Variabel terikat pada penelitian ini adalah stabilitas (pH, daya sebar dan kadar *growth factor β*), efektivitas (kedalaman penembusan kulit, kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast) dan skor iritasi.

4.2.3 Variabel kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah jenis dan jumlah bahan aktif, suhu, tekanan, metode penelitian, jenis dan umur mencit (*mus musculus*).

4.2.4 Definisi operasional

1. *Amniotic Membran Stem Cell Metabolit Produk* (AMSC-MP) adalah produk metabolit dari *Amniotic Membran* (AM) yang mengandung *growth factor* dan sitokin yang diperoleh dari Laboratorium Stem Cell Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr.Soetomo Surabaya.
2. Sediaan gel adalah sistem semipadat yang pergerakan medium pendispersinya terbatas oleh sebuah jaringan tiga dimensi dari partikel-partikel atau antarmolekul yang terlarut pada fase pendispersi.
3. Uji efektivitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui efektivitas formula gel *Amniotic Membran Stem Cell Metabolit Produk* (AMSC-MP) dengan variasi konsentrasi asam hialuronat dalam hal penetrasi (penembusan kulit) dan aktivitas *antiaging* (kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast).
4. Uji penembusan kulit adalah pengamatan kedalaman penembusan kulit dari sediaan gel *Amniotic Membran Stem Cell* (AMSC-MP) dengan variasi konsentrasi asam hialuronat secara mikroskopis pada kulit punggung mencit dengan marker Rhodamin B pada jam ke-0,5; ke-1 dan ke-2.

5. Uji iritasi adalah pengamatan histologi kulit punggung mencit setelah 24 jam penggunaan sediaan gel *Amniotic Membran Stem Cell* (AMSC-MP) dengan beberapa variasi konsentrasi asam hialuronat
6. Uji stabilitas merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui perubahan stabilitas baik pH dan daya sebar pada penyimpanan selama 28 hari dan kadar *growth factor* β dengan menggunakan ELISA kitsediaan gel *Amniotic Membran Stem Cell* (AMSC-MP) dengan variasi konsentrasi asam hialuronat dengan penyimpanan sediaan pada suhu ruang di tempat terlindung cahaya matahari selama 21 hari.

4.3 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Amniotic Membran Stem Cell* Metabolit produk (AMSC-MP) *Freeze dry* (Laboratorium Stem Cell dan Instalasi Pusat Biomaterial-Bank Jaringan RSUD Dr.Soetomo), *SPACE Peptide* (PT. MedChem), Asam Hialuronat (PT. Evonic Industries) dan basis gel.

4.4 Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *One Fourier Transform Infrared* (FTIR) *Spectrophotometer* Alpha II Bruker Instrument, *ELISA KIT* Bioassay Technology Laboratory dengan nomor katalog Cat. No. E3051Hu untuk pemeriksaan TGF β , pH Meter Schott glass mainz CG 842, *Freeze Dried*, neraca analitik CHYO JP-160, Mikroskop *fluorescence* Olympus FX-100, Lampu UV-Meter, Lemari pendingin dan alat gelas lainnya.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan maret 2019 sampai dengan oktober 2019. Pengambilan bahan *Amniotic Membran Stem Cell* Metabolit Produk (AMSC-MP) dan pembuatan *Amniotic Membran Stem Cell* Metabolit Produk (AMSC-MP) *Freeze dry* di Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Formulasi sediaan dan pengujian karakteristik fisik dilaksanakan di laboratorium farmasetika dan pengujian FTIR dilakukan di laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Uji dengan *ELISA Kit* dilakukan di Laboratorium Rumah Sakit Khusus Infeksi (RSKI) Rumah Sakit Universitas Airlangga (RSUA). Perlakuan dan pemeliharaan hewan uji dilakukan di laboratorium hewan FFUA. Untuk pembuatan preparat uji penembusan kulit (penetrasi) dilakukan di Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD Dr. Soetomo, Pembacaan hasil preparat dilakukan di Rumah Sakit Khusus Infeksi Universitas Airlangga. Pembuatan preparat untuk uji efektivitas (kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast) dilakukan di laboratorium patologi dan anatomi Fakultas Kedokteran universitas Airlangga (FKUA) dan pembacaan preparat dilakukan di bagian patologi dan anatomi RS Dr. Soetomo. Untuk uji Iritasi, pembuatan preparat dan pembacaan hasil dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (FKHUA).

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Identifikasi kualitatif bahan penelitian

1. Organoleptis

Dilakukan secara visual meliputi : bentuk, warna dan bau. Kemudian hasil yang diperoleh dibandingkan dengan sertifikat analisa bahan.

2. Pemeriksaan Serapan Inframerah (FTIR)

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan alat FTIR ATR Alpha-II Bruker dengan asesoris ATR Ge yang terhubung dengan komputer dengan sistem operasi Windows XP dan piranti lunak OPUS (Versi 7.0) digunakan selama akuisisi spektrum FTIR. Cara penggunaan alat FTIR ATR Alpha-II Bruker yaitu :

- a. Bersihkan *plate* ATR dengan alcohol dan tunggu hingga kering
- b. Lakukan pengukuran background, jangan letakkan sampel pada *plate* ATR
- c. Semua jenis sampel, baik berupa solid, film, liquid, pasta maupun suspense dapat langsung diletakkan di atas *plate* ATR. Lalu putar tuas ATR dengan isopropanol lalu keringkan dengan tisu kering,
NB : Perhatikan sifat dari ATR yang digunakan (Diamond, ZnSe, Ge), Penjelasan lebih lengkap dapat dilihat pada *Manual Book* bagian *ATR Instruction*.
- d. Setelah sampel diletakkan pada diletakkan *plate* ATR, pilih menu Acquire pada jendela OPUS
- e. Klik *Measurement* → Setup “*Measurement*”
- f. isi box *sample description* pada bagian *Basic Parameters*.
- g. Atur jumlah scanning dan rentang wave number pada bagian *Advanced Setting*

- h. Tentukan *Result Spectrum* dan *Checklist Transmittance, Single Channel* dan *Background* pada bagian *Data block to be save* —► *Save and Exit*
- i. Kembali pastikan sample telah siap untuk diukur, kemudian klik *Measurement* dan tunggu sampai proses scanning selesai kemudian hasil pengukuran muncul pada jendela OPUS
- j. Kembali pastikan sampel telah siap untuk diukur, kemudian klik *Measurement* dan tunggu sampai proses scanning selesai kemudian hasil pengukuran muncul pada jendela OPUS
- k. Langkah-langkah pengolahan data dapat dilihat pada OPUS Manual

4.6.2 Formula

Pada penelitian ini akan dibuat lima formula yang dibentuk dalam sediaan gel dengan bahan aktif AMSC-MP dan variasi rasio asam hialuronat (HA). Formula AMSC-MP dengan 0,01 % Asam hialuronat (FI), Formula AMSC-MP dengan 0,02 % Asam hialuronat (FII), Formula AMSC-MP dengan 0,04 % Asam hialuronat (FIII), Formula AMSC-MP tanpa asam hialuronat (FIV) dan Formula AMSC-MP tanpa asam hialuronat dan *SPACE Peptide* (FV). Susunan formula dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4.1 Formula gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi asam hialuronat

Bahan	Fungsi	Konsentrasi Formula (%) (b/b)				
		F _I	F _{II}	F _{III}	F _{IV}	F _V
AMSC-MP	Bahan Aktif	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Asam Hialuronat	Enhancer,moisturizer	-	-	0,01	0,02	0,04
SPACE-Peptide	Enhancer makromolekul	-	0,016	0,016	0,016	0,016
Basis Gel	Basis	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

4.6.3 Pembuatan sediaan gel AMSC-MP

Basis gel yang telah dioptimasi disiapkan kemudian massa gel diaduk untuk membentuk gel yang tercampur dengan baik. Kemudian AMSC-MP yang telah dilarutkan aquadest di larutkan dan ditambahkan kedalam gel. Setelah itu asam hialuronat dan *SPACE Peptide* yang telah diencerkan dengan larutan dapar juga dimasukkan ke dalam gel.

4.7 Hewan Coba

4.7.1 Kriteria hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) yang memiliki kriteria sebagai berikut :

Kriteria inklusi : Mencit jantan usia 4-5 minggu, berat mencit 20-25 gram, sehat

tidak cacat dan tidak luka

Kriteria eksklusi : Terdapat penyakit penyerta, terjadi perdarahan kulit, mati sebelum diteliti.

4.7.2 Kelompok uji dan jumlah hewan coba

Pada penelitian ini akan dilakukan tiga macam uji yang menggunakan hewan coba, yaitu penembusan kulit, uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast dan uji iritasi. Perhitungan jumlah hewan coba menggunakan rumus Federer sebagai berikut

Rumus Federer :

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

Keterangan :

t = banyak taraf perlakuan

n = jumlah hewan yang dibutuhkan untuk penelitian

Dengan menggunakan rumus diatas, dapat dilakukan perhitungan besar sampel sebagai berikut :

1. Kelompok Uji Penetrasi

- a) Kelompok I : Kelompok uji penetrasi gel AMSC-MP tanpa HA dan tanpa *SPACE Peptide*
- b) Kelompok II : Kelompok uji penetrasi gel AMSC-MP tanpa HA
- c) Kelompok III : Kelompok uji penetrasi gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,01 %
- d) Kelompok IV : Kelompok uji penetrasi gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,02 %

- e) Kelompok V : Kelompok uji penetrasi gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,04 %

Perhitungan kebutuhan hewan coba untuk pengujian penetrasi:

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

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

$$14n - 14 \geq 15$$

$$14n \geq 15 + 14$$

$$14n \geq 29; n \geq 2,07 \sim 2$$

Tiap kelompok ditambahkan sebagai cadangan $10\% \times 2 = 0,2 \sim 1$ untuk mengatasi *drop out* pada kelompok mencit. Rincian jumlah mencit yang dibutuhkan untuk masing-masing uji dapat dilihat pada tabel 4.2 :

Tabel 4. 2 Jumlah mencit yang dibutuhkan untuk uji penetrasi

No	Penetrasi Jam ke-	Kelompok mencit				
		F _I	F _{II}	F _{III}	F _{IV}	F _V
1.	2 jam	3 ekor	3 ekor	3 ekor	3 ekor	3 ekor
2.	4 jam	3 ekor	3 ekor	3 ekor	3 ekor	3 ekor
3.	6 jam	3 ekor	3 ekor	3 ekor	3 ekor	3 ekor
Total mencit yang dibutuhkan			45 Ekor			

2. Kelompok uji Efektivitas (Jumlah fibroblast dan kerapatan kolagen)

- a. Kelompok I : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast gel AMSC-MP tanpa HA dan tanpa *SPACE Peptide*
- b. Kelompok II : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast gel AMSC-MP tanpa HA

- c. Kelompok III : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,01 %
- d. Kelompok IV : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,02 %
- e. Kelompok V : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,04 %
- f. Kelompok VI : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast, kontrol tanpa perlakuan
- g. Kelompok VII : Kelompok uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast, kontrol mencit yang dipapar sinar UV tanpa gel AMSC-MP

Perhitungan kebutuhan hewan coba untuk pengujian kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast

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

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \sim 4$$

tiap kelompok ditambahkan sebagai cadangan $10\% \times 4 = 0,4 \sim 1$ untuk mengatasi *drop out* pada kelompok mencit. Rincian jumlah mencit yang dibutuhkan untuk masing-masing uji dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4. 3 Jumlah mencit yang dibutuhkan untuk uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast

Nama uji	Kelompok mencit						
	F _I	F _{II}	F _{III}	F _{IV}	F _V	Kontrol	UV
Uji kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast	5	5	5	5	5	5	5
Total mencit yang dibutuhkan 35 ekor							

2) Kelompok Uji Iritasi

- a) Kelompok I : Kelompok uji iritasi gel AMSC-MP tanpa HA dan tanpa *SPACE Peptide*
- b) Kelompok II : Kelompok uji iritasi gel AMSC-MP tanpa HA
- c) Kelompok III : Kelompok uji iritasi gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,01 %
- d) Kelompok IV : Kelompok uji iritasi gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,02 %
- e) Kelompok V : Kelompok uji iritasi gel AMSC-MP dengan konsentrasi HA 0,04 %
- f) Kelompok VI : Kelompok uji iritasi, kontrol tanpa perlakuan

Perhitungan kebutuhan hewan coba untuk pengujian iritasi

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15 + 5$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Tiap kelompok ditambahkan sebagai cadangan $10\% \times 4 = 0,4 \sim 1$ untuk mengatasi *drop out* pada kelompok mencit. Rincian jumlah mencit yang dibutuhkan untuk masing-masing uji dapat dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Jumlah mencit yang dibutuhkan untuk uji iritabilita

Nama uji	Kelompok Mencit					
	F _I	F _{II}	F _{III}	F _{IV}	F _V	Kontrol
Uji Iritabilitas	5	5	5	5	5	5
Total mencit yang dibutuhkan 30 ekor						

4.7.3 Persiapan hewan coba

Satu minggu sebelum digunakan, mencit jantan dikarantina dan diberi makan minum sesuai standar laboratorium dengan *ad libitum*. Satu hari sebelum uji, mencit jantan dibius dengan ketamin (20 mg/kg BB) secara interaperitoneal, rambut pada bagian punggung dibersihkan dengan *mechanical hair clipper*. Setiap mencit diberi kandang khusus agar tidak dapat menyentuh bagian yang akan dioleskan sampel yang akan di uji.

4.8 Uji Efektivitas

4.8.1 Uji kedalaman penembusan kulit

1. *Rhodamine* ditambahkan pada sampel yang akan diuji sebagai *fluorescent label*
2. Tikus dibius dengan menggunakan ketamin dengan dosis 0,5 mg/KgBB
3. Sejumlah sampel uji diaplikasikan pada kulit punggung mencit yang telah dihilangkan bulunya

4. Setelah sampel diaplikasi pada kulit mencit, mencit dikorbankan dengan dislokasi setelah jam ke 0,5;1;dan 2 jam
5. Bagian kulit dipotong dengan menggunakan *frozen cryotome*.
6. Preparat diamati dengan mikroskop *fluorosense* pada perbesaran 42X.

4.8.2 Uji aktivitas antiaging (penentuan kerapatan kolagen dan jumlah fibroblast)

1. Sejumlah sampel uji diaplikasikan pada kulit punggung mencit yang telah dihilangkan bulunya dua kali sehari, yaitu 20 menit sebelum disinari dengan UV (untuk memberikan waktu absorpsi bahan topikal ke dalam kulit) dan 4 jam setelah penyinaran (terbentuknya ROS mulai 4 jam setelah paparan). Penyinaran UV dilakukan 2 hari sekali, yaitu pada hari 1,3,5,7,9,11 dan 13 (mencit dibiarkan terlebih dahulu selama dua puluh empat jam setelah penyinaran berakhir untuk menyingkirkan pengaruh efek penyinaran akut) (Vayalil *et al.*,2004).
2. Aplikasikan sediaan tetap dilakukan pada hari tanpa penyinaran UV
3. Setelah 14 hari, mencit dikorbankan dengan dislokasi
4. Bagian kulit dipotong menggunakan *mycrotome* lalu direndam dengan larutan formalin untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan *masson trichome*
5. Preparat diamati dengan mikroskop cahaya
6. Kerapatan kolagen diukur dengan cara skoring hispatologi dan jumlah fibroblast dihitung dengan analisis digital.

4.9 Uji Iritasi

1. Mencit dibius dengan menggunakan ketamin dengan dosis 0,5 mg/KgBB
2. Sejumlah sampel uji diaplikasikan pada kulit punggung mencit yang telah dihilangkan bulunya
3. Setelah sampel diaplikasi pada kulit mencit, mencit dikorbankan dengan dislokasi setelah 24 jam
4. Bagian kulit dipotong dengan *mycotom* lalu direndam dengan larutan formalin untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan hematoxilin-eosin
5. Preparat diamati dengan mikroskop cahaya
6. Pengamatan iritasi kulit dilakukan dengan skoring hispatologi

4.10 Uji Stabilitas

4.10.1 Uji pH

Uji stabilitas dengan menyimpan sediaan dalam suhu $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ serta terlindung dari paparan sinar matahari langsung. Selanjutnya dilakukan evaluasi pH pada hari ke 1,7,14 dan 28 hari.

4.10.2 Uji daya sebar

Uji dilakukan dengan menggunakan alat-alat seperti sepasang lempeng kaca bundar (*extensometer*) dan anak timbang gram. Gel ditimbang ± 1 gram dan diletakkan ditengah kaca bundar yang berskala lalu ditutup dengan kaca bundar lain tanpa skala serta diberi anak timbangan sebagai beban. Lalu dibiarkan 1 menit. Diameter gel yang menyebar (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi) diukur.

Kemudian ditambahkan beban 50 gram tiap 1 menit sampai penyebarannya konstan. Hal ini dilakukan 3x replikasi. Setelah itu dibuat grafik antara beban dan luas penyebaran dari data yang didapat pada sediaan yang baru dibuat, setiap dua minggu selama dua bulan, Menurut Garg *et al.* Rentang daya sebar yang disyaratkan pada sediaan topikal adalah antara 4,0-5,6 cm.

4.10.3 Uji kadar *growth factor* (TGF β)

Pengujian dilakukan dengan menggunakan ELISA kit *growth factor* β

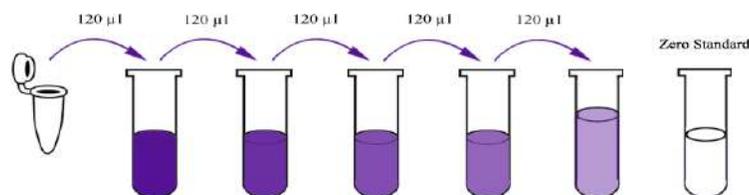
a) Prinsip Pengujian

Pemeriksaan immunoassay menggunakan reagen dari Bioassay Technology Laboratory dengan nomor katalog Cat. No. E3051Hu untuk pemeriksaan TGF B. Kit ini adalah *Enzim-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Prinsip pengujian sebagai berikut : perangkat ELISA ini menggunakan metode *sandwich* ELISA. Pelat mikro yang disediakan didalam *kit* telah dilapisi dengan antibody *Human* TGF-B. standar atau sampel ditambahkan ke sumur ELISA yang sesuai dan dikombinasikan dengan antibody spesifik dan mengikat antibody yang dilapisi pada sumur. Kemudian antibody deteksi biotinylated TGF B spesifik ditambahkan dan mengikat TGF B di dalam sampel. Kemudian Streptavidin-HRP ditambahkan dan mengikat ke antibody TGF-B yang terbiotinilasi. Setelah inkubasi, Streptavidin-HRP yang tidak terikat terhanyut selama tahap pencucian. Larutan substrat kemudian ditambahkan dan warna berkembang sesuai dengan jumlah Human TGF-B. Human. Reaksi diakhiri dengan penambahan *stop solution*. Kepadatan optik atau *optical*

density (OD) dapat diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm \pm 2 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi *human TGF-B*. Konsentrasi Human TGF B dalam sampel dihitung dengan membandingkan OD dari sampel dengan kurva.

b) Persiapan reagen

- 1) Semua reagen yang akan digunakan disimpan pada suhu ruangan terlebih dahulu
- Rekonstitusi 120 μ l dari standar (4800 ng / L) dengan 120 μ l pengencer standar untuk menghasilkan larutan stok standar 2400 ng / L. biarkan standar pada dudukan selama 15 menit dengan agitasi lembut sebelum membuat pengenceran. siapkan duplikat titik standar dengan mengencerkan larutan stok standar (2400 ng/L) 1: 2 dengan pengenceran standar untuk menghasilkan 1.200 ng / L, 600 ng / l, 300 ng / L, dan 150 ng / L larutan. Pengencer standar berfungsi sebagai standar nol (0 ng / L), larutan yang tersisa harus dibekukan pada -20 ° C dan digunakan dalam waktu satu bulan. Pengenceran larutan standar disarankan sebagai berikut : Wash Buffer. Encerkan 20ml *Wash Buffer* konsentrasi 25x ke dalam air deionisasi atau air suling untuk menghasilkan 500 ml 1x *Wash Buffer*. Jika kristal telah terbentuk dalam konsentrat, campur dengan lembut sampai kristal benar-benar larut



Gambar 4. 1 Pengenceran Larutan Standar

Tabel 4. 5 Pengenceran larutan standar uji ELISA

Konsentrasi standar	Standar no.5	Standar no.4	Standar no.3	Standar no.2	Standar no.1
4800 ng/L	2400 ng/L	1200 ng/L	600 ng/L	300 ng/L	150 ng/L

2400 ng/L	Standar no.5	120 μ L standar asli + 120 μ L standar pengencer
1200 ng/L	Standar No.4	120 μ L standar no 5 + 120 μ L standar pengencer
600 ng/L	Standar no.3	120 μ L standar no.4 + 120 μ L standar pengencer
300 ng/L	Standar no.2	120 μ L standar no.3 + 120 μ L standar pengencer
150 ng/L	Standart no1	120 μ L standar no.2 + 120 μ L standar pengencer

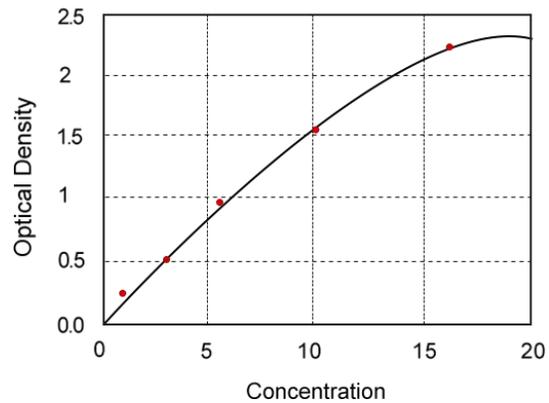
c) Prosedur Pengujian

1. Persiapkan semua pereaksi, larutan standar, dan sampel sesuai instruksi. Bawa semua reagen ke suhu kamar sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu kamar.
2. Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip di bingkai untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada 2-8 ° C.
3. Tambahkan 50 μ l standar ke sumur standar. Catatan: Jangan menambahkan antibodi ke sumur standar karena larutan standar mengandung biotinylated antibodi.

4. Tambahkan 40µl sampel ke sumur sampel, lalu tambahkan 10µl antibodi anti TGF-B ke sumur sampel, lalu tambahkan 50µl streptavidin-HRP ke sampel sumur dan sumur standar (sumur Kontrol kosong). Campur dengan baik. Tutup piring dengan *sealer*. Inkubasi 60 menit pada suhu 37 ° C.
 5. Lepas sealer dan cuci piring 5 kali dengan buffer pencuci. Rendam sumur dengan setidaknya 0,35 ml buffer pencuci selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap kali pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi semua sumur dan cuci 5 kali dengan buffer pencuci, sumur yang penuh dengan buffer pencuci. Blot piring ke kertas tisu atau bahan penyerap lainnya.
 6. Tambahkan 50µl larutan substrat A ke setiap lubang lalu tambahkan 50µl larutan substrat B ke masing-masing lubang. Inkubasi piring yang ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37 ° C dalam gelap.
 7. Tambahkan 50µl *Stop Solution* ke masing-masing sumur, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
 8. Tentukan kerapatan optik (nilai OD) dari masing-masing sumur segera menggunakan pembaca lempeng mikro diatur pada 450 nm dalam 10 menit setelah penambahan *stop solution*.
- d) Perhitungan Hasil

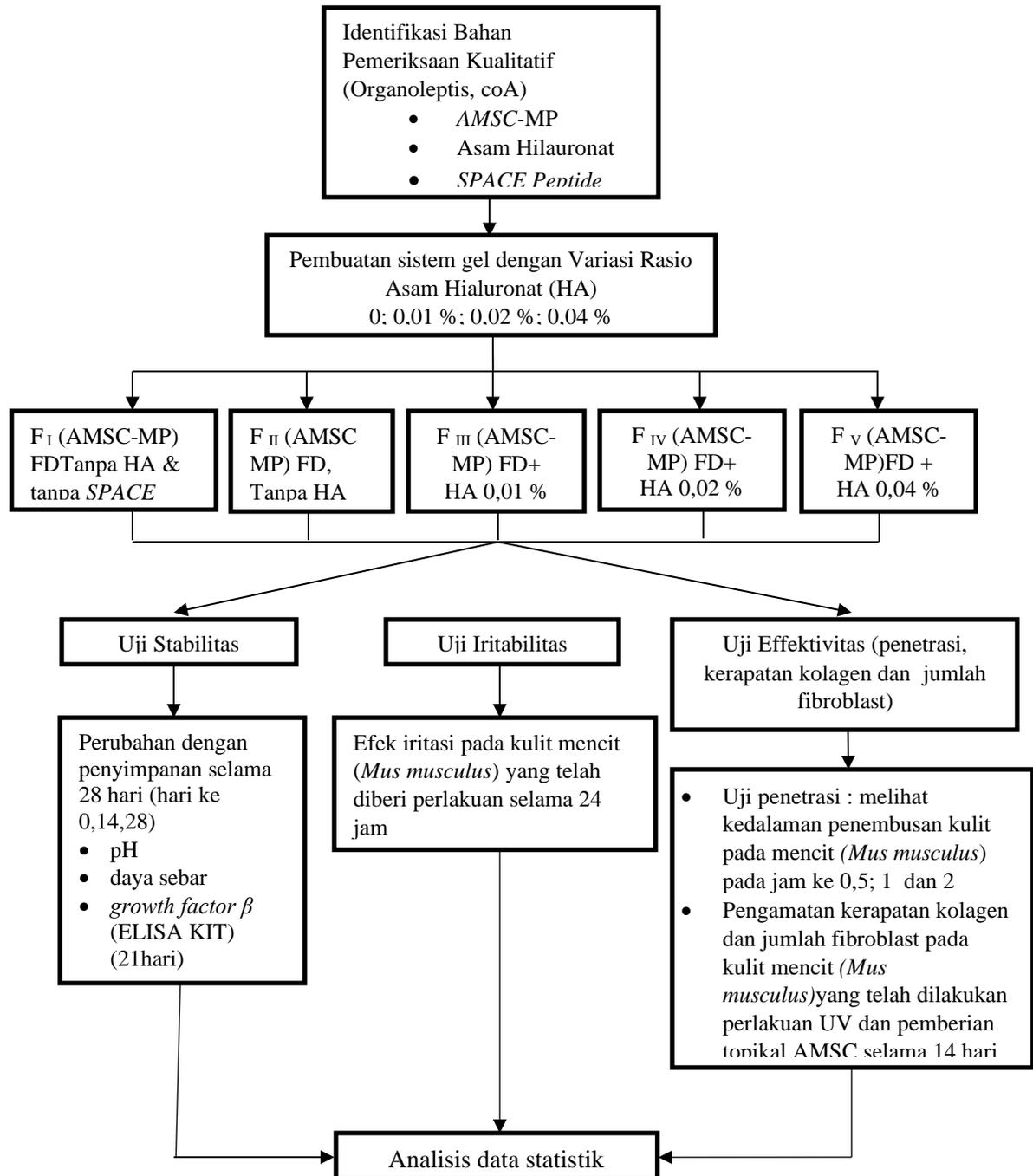
Buat kurva standar dengan memplot OD rata-rata untuk setiap standar pada sumbu vertikal (Y) terhadap konsentrasi pada sumbu horizontal (X) dan gambarkan kurva yang paling cocok melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan

ini dapat dilakukan dengan paling baik dengan perangkat lunak kurva-pas berbasis komputer dan garis paling pas dapat ditentukan dengan analisis regresi.



Gambar 4. 2 Kurva standar ELISA kit

4.11 Bagan Kerangka Operasional



Gambar 4. 3 Skema kerangka operasional

4.12 Analisis Data

Dari data hasil pengujian stabilitas (pH dan *growth factor* β), uji efektivitas (penetrasi dan kerapatan kolagen serta jumlah fibroblast) dan uji iritabilitas dilakukan analisis statistika menggunakan metode *One way ANOVA* dan *Paired T-Test* (data parametrik) serta uji *Kruskal-Wallis* (data non-parametrik) untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antar formula. Apabila diperoleh nilai signifikansi $<0,05$, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* (data parametrik) atau uji *Mann-Whitney* (data non parametric) untuk mengetahui mana saja kelompok yang memiliki perbedaan bermakna. Hasil yang didapat kemudian dibandingkan untuk mendapatkan kesimpulan komposisi formula *Amniotic Membran Stem Cell Metabolit Produk* (AMSC-MP) dengan penambahan asam hialuronat yang optimal sebagai gel *anti aging*.