

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan "*Post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1) , Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut: .

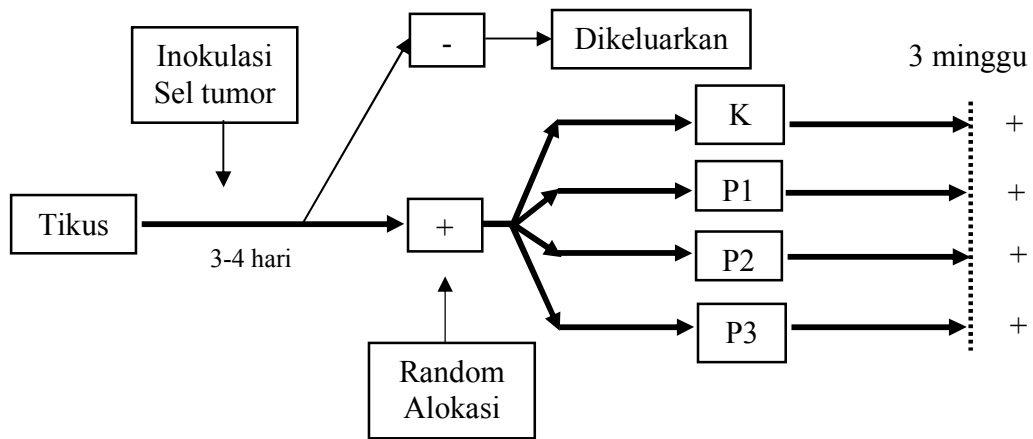
K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, tidak mendapat ekstrak sarang semut

P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat ekstrak sarang semut 4 mg /hari (0,175 mL /hari)

P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak sarang semut 8 mg /hari (0,35 mL /hari)

P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak sarang semut 16 mg /hari (0,7 mL /hari)

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



#### 4.2. Sampel penelitian

Hewan coba adalah mencit strain C3H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kriteria Inklusi:

- Mencit Strain C3H
- Berat badan 20-30 gram.
- Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria Eksklusi:

- Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi
- Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 7 ekor mencit dimana tiap kelompok terdiri dari minimal 5 ekor dan 1 ekor sebagai tambahan serta 1 ekor lagi akan diterminasi pada awal penelitian setelah tumbuh tumor dan sebelum diberi perlakuan ekstrak sarang semut yang akan diperiksa secara histopatologis untuk memastikan adanya sel adenokarsinoma mamma.

Randomisasi: 28 mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 7 mencit

Kelompok P1 : 7 mencit

Kelompok P2 : 7 mencit.

Kelompok P3 : 7 mencit

#### **4.3. Waktu dan lokasi penelitian**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 4 bulan. Perlakuan pada mencit, proses pengambilan jaringan, proses pembuatan blok paraffin dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUI. Pengecatan AgNOR dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dan pengecatan TUNEL dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada.

#### **4.4. Variabel penelitian**

##### 4.4.1. Variabel bebas

Pemberian beberapa dosis ekstrak sarang semut

##### 4.4.2. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

1. aktifitas proliferasi sel kanker payudara dinilai dengan menggunakan metode AgNOR yang dilakukan sesuai metode ploton.
2. Indeks apoptosis sel kanker payudara dinilai dengan menggunakan metode TUNEL

##### 4.4.3. Definisi operasional

1. Pemberian ekstrak sarang semut peroral merupakan salah satu bahan dasar kapsul ekstrak sarang semut yang diproduksi PT. Prima Solusi Medika Wamena-Papua dengan dosis yang dikonversikan terhadap dosis mencit C3H sebesar 4 mg/hari, 8 mg/hari dan 16 mg/hari dalam 3 dosis dengan sonde lambung selama 3 minggu dalam masa penelitian.
2. Aktifitas proliferasi sel dinilai dengan menggunakan metode AgNOR yang dilakukan sesuai metode ploton dengan menghitung jumlah AgNOR interfase per sel pada 100 sel tumor dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak emersi, kemudian diambil rata ratanya. Pada setiap sediaan dilakukan penghitungan pada daerah yang paling anaplastik, hindari nekrotik dan sel yang

bertumpuk. Kontrol internal reaksi dilakukan dengan penghitungan AgNOR pada limfosit yang hanya memiliki satu bintik AgNOR. Pengecatan AgNOR tampak sebagai titik coklat atau hitam dalam inti sel epitel kelenjar.<sup>41,42</sup> skala : rasio

3. Indeks apoptosis dengan pewarnaan TUNEL pada seluruh jaringan tumor adenokarsinoma. Pemeriksaan dilakukan secara acak dengan menggunakan mikroskop fluorescent pembesaran 40 kali. Sel yang mengalami apoptosis dihitung pada 100 sel tumor dalam 1 lapang pandang, sebanyak 5 lapang pandang. Indeks apoptosis dihitung menggunakan rumus :  $IA = (\text{sel apoptosis} / \text{total sel tumor}) \times 100\%$ .<sup>43</sup> Adapun penghitungan skor apoptosis adalah sebagai berikut :<sup>44</sup>

Skor 1 : jumlah sel yang mengalami apoptosis < 5 sel

Skor 2 : jumlah sel yang mengalami apoptosis 5 sel – 25%

Skor 3 : jumlah sel yang mengalami apoptosis >25% - <50%

Skor 4 : jumlah sel yang mengalami apoptosis >50% - <75%

Skor 5 : jumlah sel yang mengalami apoptosis >75% - 100%

## **4.5. Bahan dan alat penelitian**

### **4.5.1 Bahan untuk perlakuan**

Hewan coba adalah mencit strain C3H dengan umur 6 bulan, dan berat 20 - 30 gram. Mencit diperoleh dari Laboratorium Patologi

Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara ad libitum. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama 1 minggu. Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor akan ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diincisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya.

Dosis ekstrak sarang semut yang digunakan adalah dosis dengan konversi dosis lazim ekstrak sarang semut untuk manusia dewasa pada obat ekstrak sarang semut dalam bentuk kapsul terhadap dosis mencit dengan bobot 20 gram. Dosis lazim untuk manusia dewasa tersebut adalah 3 kali 1 – 2 kapsul perhari dimana tiap kapsul mengandung ekstrak sarang semut sebesar 500 mg. Sehingga dosis ekstrak sarang semut tersebut perhari adalah sebesar 1500 – 3000 mg. Faktor konversi manusia terhadap mencit 20 gr adalah 0,0026 (Laurence & Bacharach, 1964).

#### 4.5.2. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit

- a. Alkohol 70 %
- b. Larutan Garam Fisiologik
- c. Es batu

- d. Mencit donor bertumor
- e. Mencit resipien

#### 4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- a. Formalin buffer 10%
- b. Alkoholo150%, 70%, 80%, 9G%, absolute, xylol
- c. Parafin cair (Histoplast)
- d Albumin dan Poly-L-Lysine
- e. Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)
- f. Canada balsam dan Entelan

#### 4.5.4. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit

- 1. Cawan petri ukuran 6 Cm
- 2. Cawan petri ukuran 15 Cm
- 3. Cawan ukuran 10 Cm
- 4. Spuit 1 cc
- 5. Jarum suntik trocar
- 6. Gunting lurus 10 Cm
- 7. Gunting bengkok 10 Cm
- 8. Pinset anatomi 10 Cm
- 9. Alas fiksasi

#### 4.5.5. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E:

- a. *Digital Tissue Processor Leica<sup>R</sup>*
- b. *Tissue Blocking Leica ' EG-1160*

- c. Inkubator suhu 56° C *Memmert<sup>R</sup>* ,.
- d. Mikrotom *Leica " XM-2135*
- e. *Auto Stainer Leica XL<sup>R</sup>*
- f. Kaca obyek dan kaca penutup

4.5.6. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah :

- 1 Unit *Multi Head Microscope Olympus<sup>R</sup>*
- *Nikon<sup>R</sup> Digital Net Camera DN 100 + SD Card*
- 1 Unit Personal Computer *Intel Pentium<sup>R</sup> Processor*

#### **4.6. Pelaksanaan penelitian**

Cara perlakuan

Dua puluh delapan ekor mencit strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

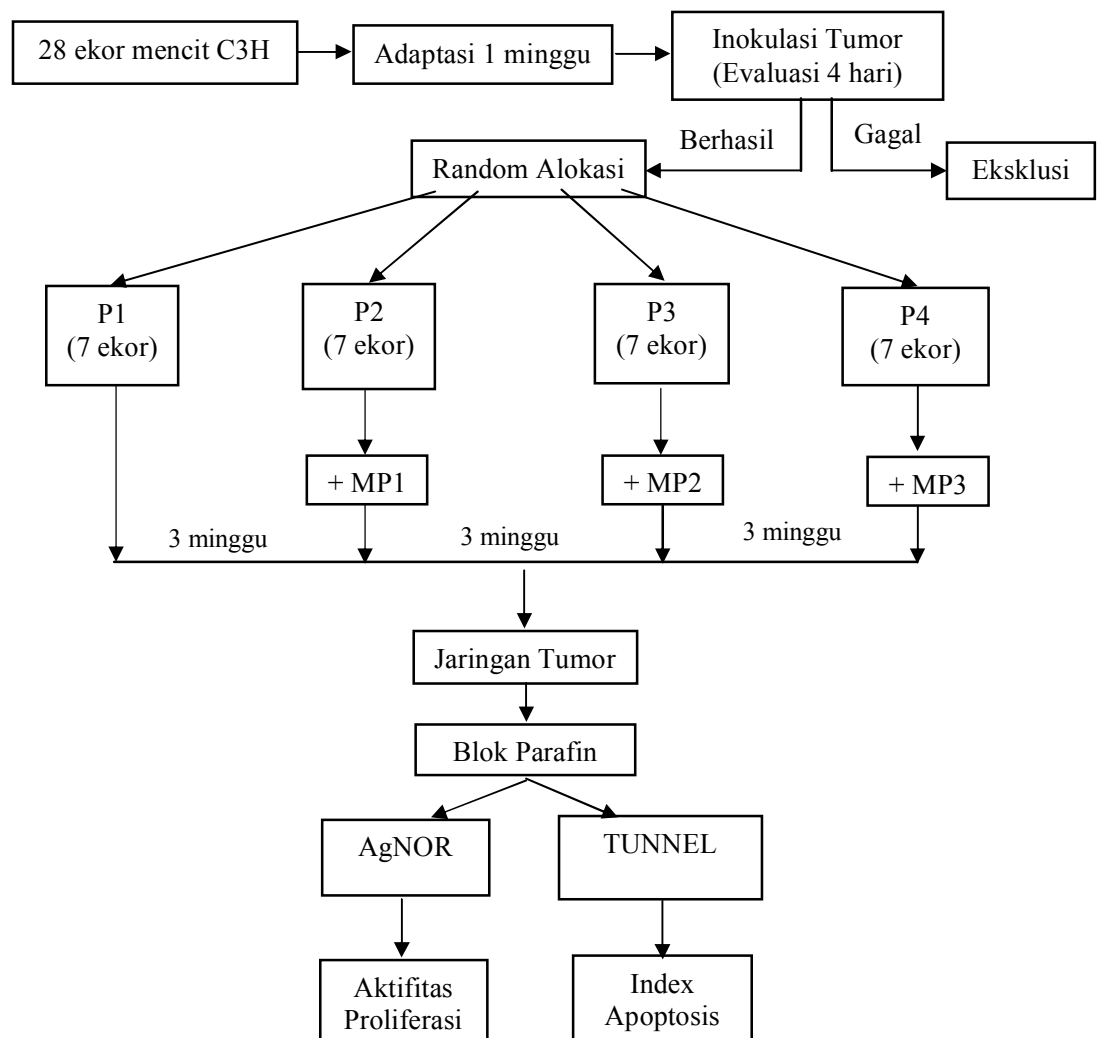
Dua puluh delapan ekor mencit tersebut kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari. Pada kelompok mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum. Sebelum perlakuan dari masing –masing kelompok diambil satu ekor mencit kemudian dibunuh dan diambil jaringan tumornya untuk diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok paraffin. Sehingga masing –masing kelompok terdiri dari enam mencit



kemudian diberikan perlakuan selama 3 minggu, dan pemberian ekstrak dilakukan dengan pipet mikro.

Setelah perlakuan selesai, mencit di anaestesi dengan ether selanjutnya mencit dibunuh dengan cara di dislokasi cervical-nya, kemudian diambil jaringan tumor. Jaringan tumor diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok paraffin.

#### 4.7. Alur kerja



## 4.8 Prosedur pemeriksaan

### 4.8.1. Prosedur transplantasi tumor

- a. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
- b. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
- c. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
- d. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh di cawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk "bubur tumor" yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
- e. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin dengan ketepatan  $10^{-1}$ .
- f. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

- g. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya (lihat bagan) dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi

#### 4.8.2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

##### a. Fiksasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

##### b. Dehidrasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

##### c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

##### d. Embedding.

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polilisin

sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58°C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

1. Xylol	1 menit	11. Air	15 detik
2. Xylol	2 menit	12. Alkohol 80%	15 detik
3. Xylol	2 menit	13. Alkohol 96%	30 detik
4. Alkohol 100%	2 menit	14. Alkohol 100%	45 detik
5. Alkohol 96%	2 menit	15. Xylol	1 menit
6. Alkohol 80%	2 menit	16. Xylol	1 menit
7. Air	1 menit		
8. Haematoxilin	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. Eosin (0,5%)-alcohol-asam asetat	1 menit		

f. Pewarnaan sel apoptosis dengan menggunakan metode TUNEL

Assay

Lakukan deparaffinisasi, caranya adalah dengan memasukkan sayatan jaringan berturut-turut ke dalam :

1. Xylol : 2 menit
2. Xylol : 2 menit
3. Etanol absolute : 1 menit
4. Etanol absolute : 1 menit
5. Etanol 95% : 1 menit
6. Etanol 95% : 1 menit
7. Etanol 80% : 1 menit
8. Etanol 70% : 1 menit

9. Air mengalir : 10 – 15 menit
10. Sitrat buffer : 60° dalam microwave selama 38 menit
11. Bilas dengan PBS 3 kali (a: 2 menit)
12. Proteinase K : 15 menit
13. Cuci dengan dH<sub>2</sub>O 2 kali (2 menit)
14. Masukkan ke dalam 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 15 menit
15. Cuci dengan PBS 3 kali (a: 2 menit)
16. Masukkan ke dalam equilibrium buffer : 10 menit pada suhu kamar
17. Masukkan pada working strength TdT enzyme yang dilengkapi digoxigenin pada 37°C : 1 jam
18. Masukkan pada stop buffer
19. Cuci dengan PBS 3 kali (a: 2 menit)
20. Masukkan pada anti digoxigenin peroxidase conjugate : 30 menit
21. Cuci dengan PBS 3 kali (a: 2 menit)
22. Masukkan pada anti digoxigenin yang dilabel peroxidase : 30 menit
23. Cuci dengan dH<sub>2</sub>O 3 kali (a: 2 menit)
24. DAB – peroxide : 10 menit
25. Masukkan pada fast green : 6 menit
26. Cuci dengan H<sub>2</sub>O
27. Dehidrasi --- clearing ----Mounting

#### **4.9. Cara mengumpulkan data**

Dari masing-masing kelompok diambil massa tumornya setelah perlakuan yang selanjutnya dibuat preparat setebal 4 mikron, diwarnai dengan pengecatan AgNOR untuk mengamati aktifitas proliferasinya dan pengecatan TUNEL untuk mengamati indeks apoptosisnya.

#### 4.10. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hypothesis. Pada analisa deskriptif aktifitas proliferasi dan indeks apoptosis tumor payudara disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median, dan grafik garis. Kemudian uji normalitas data dengan uji kolmogorov-Smirnov dan homogenitas data dengan uji homogeneity of variance, jika distribusi data normal dan varian sama, dilanjutkan dengan uji *one way analysis of variance (ANOVA)* Jika distribusi data tidak normal, dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Nilai  $p$  dianggap bermakna jika  $p < 0,05$ .