

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Ruang lingkup penelitian**

Ruang lingkup penelitian ini adalah Ilmu Bedah Onkologi.

#### **4.2. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian akan dilaksanakan di Bangsal Bedah RSUP dr. Kariadi Semarang, Laboratorium Sentral RSUP dr. Kariadi Semarang dan Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Waktu penelitian adalah mulai bulan November 2008 sampai dengan bulan Juli 2010 (jumlah sampel terpenuhi).

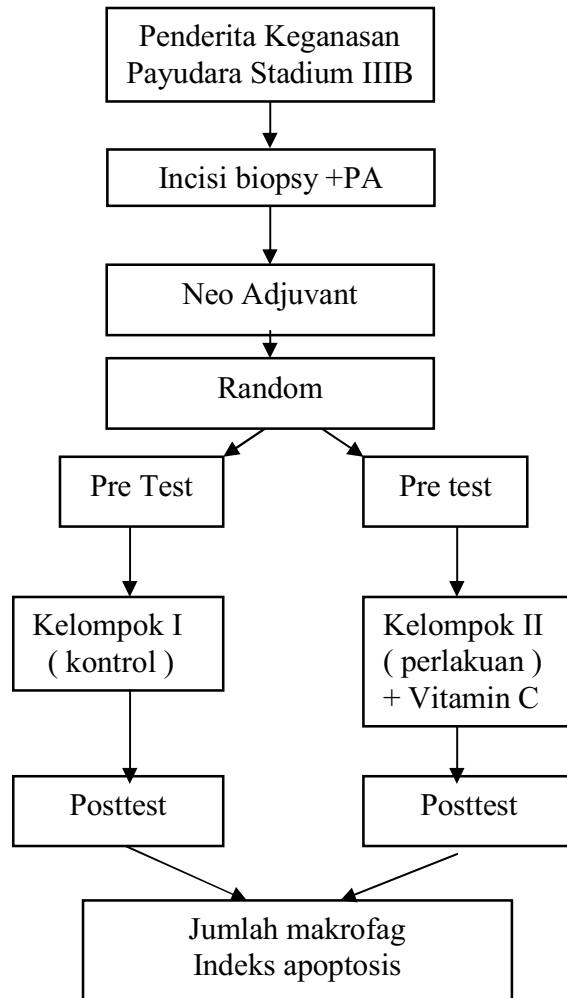
#### **4.3. Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan randomized control pre dan post test design. Kelompok penelitian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol, dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol tidak mendapat injeksi vitamin C sedangkan kelompok perlakuan mendapat injeksi vitamin C.

#### **4.4. Skema penelitian**

Wanita yang menderita keganasan payudara yang menjalani pengobatan dengan kemoterapi secara *neoadjuvan* dan akan menjalani operasi mastektomi dibagi dalam 2 kelompok. Kelompok 1 adalah kelompok kontrol, tidak mendapat vitamin C. Kelompok 2 adalah kelompok perlakuan, akan mendapat vitamin C injeksi intravena sebanyak 2 gr selama 5 hari, pada hari

keenam dilakukan mastektomi. Pada kedua kelompok, dilakukan pemeriksaan jumlah makrofag di sekitar sel tumor dan indeks apoptosis sel tumor dari sediaan tumor yang didapat sebelum menjalani kemoterapi neoadjuvan dan paska operasi mastektomi.



#### 4.5 Populasi dan Sampel

- Sampel dalam penelitian ini adalah wanita berusia 30 – 50 tahun yang menderita keganasan payudara yang berobat ke RSUP dr. Kariadi pada tahun 2008 sd 2010 dengan kriteria inklusi :

- Hasil Patologi Anatomi adalah karsinoma ductal invasive
- Penderita karsinoma mammae dengan stadium III B
- Menggunakan kemoterapi regimen CAF
- Karnofsky indeks  $\geq 70$ .
- Kadar HB  $> 10$  gr/dl

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah menjalani radioterapi pada saat bersamaan dengan kemoterapi, kadar serum creatinin diatas normal. Kriteria drop out adalah mendapat transfusi darah atau injeksi granulopoetik sebelum operasi mastektomi, alergi vitamin C. Peserta yang drop out akan diganti dengan pasien lainnya yang sesuai kriteria inklusi. Cara pengambilan sampel dilakukan secara consecutive sampling.

#### 4.6. Besar sampel

Besar sampel dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus

$$N1=N2=\frac{(Z_{1-\alpha/2} [P1(1-P1) + P2 (1-P2)])}{d^2}$$

$Z_{1-\alpha}$  dengan confidence interval 95% = 1,96 , d = perbedaan yang diinginkan = 20%, P1 = 0,1, P2 = 0,15

Nilai "V" pada tabel,yang didapat dari rumus  $[P1(1-P1)+P2(1-P2)]$  adalah sebesar 22.

Besar sampel berdasarkan tabel untuk masing – masing kelompok adalah sebanyak

22. Total sampel adalah sebanyak 44 orang.

## **4.7. Bahan dan cara kerja**

### **4.7.1. Bahan**

Preparat vitamin C injeksi 1 gr diperoleh dari PT. Ethica. Sel kanker payudara (adenokarsinoma mamma) diperoleh dari biopsi ( pre test ) dan mastektomi (post test) . Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin.

- Formalin buffer 10%
- Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
- Xylol
- Parafin cair (Histoplast)
- Albumin dan Poly-L-Lysine
- Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)
- Canada balsam dan Entelan

### **4.7.2. Cara kerja**

#### **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 2x2 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 inkubator suhu 56-58°C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan HE

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. Mayer HE	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. Eosin (0,5%)-Alkohol-Asam asetat	1 menit		

#### 4.8. DEFINISI OPERASIONAL

- **Jumlah makrofag** dihitung secara visual dari preparat potongan massa tumor dengan pengecatan HE, dengan menghitung jumlah makrofag dalam 100 sel tumor dari area tepi tumor yang berbatasan dengan daerah vaskularisasi pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang, hasil skala variabel : rasio.

- **Indeks apoptosis** dihitung secara visual dari preparat potongan massa tumor dengan pengecatan HE, dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et all, dimana badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil skala variabel : rasio.
- **Vitamin C** : preparat vitamin C injeksi 1 gr (PT. Ethica), diberikan sebanyak 2 gr intravena selama 5 hari. Skala nominal

#### **4.9. Analisis data**

Data yang terkumpul dilakukan data cleaning, koding, dan tabulasi. Analisis data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisis deskriptif yaitu jumlah makrofag dan indeks apoptosis akan dipaparkan dalam bentuk rerata. Selanjutnya dilakukan uji normalitas sebelum dilakukan uji hipotesis. Uji hipotesis berpasangan dilakukan dengan Uji Independent t.test jika data normal. Data tidak normal dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney Test. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA).

#### **4.10. Etika penelitian**

*Ethical clearance* didapat dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RS dr. Kariadi Semarang. Responden yang dilibatkan dimintakan memberikan persetujuan (*informed consent*) setelah mendapatkan penjelasan mengenai penelitian ini. Responden tidak dibebani biaya tambahan untuk pengambilan data yang dibutuhkan peneliti.