

BAB 4
METODE PENELITIAN

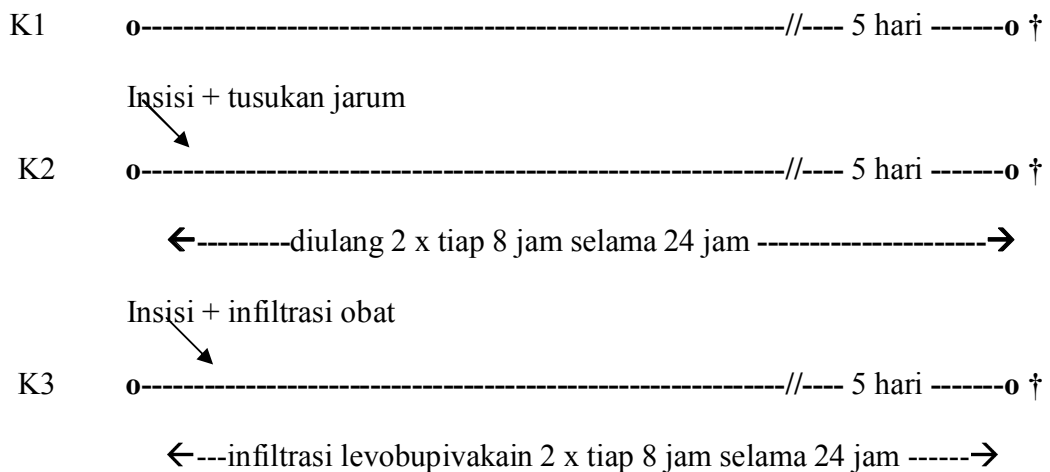
4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan disain “*Randomized post test only control group design*”. Sampel penelitian dibagi menjadi tiga kelompok sebagai berikut:

K1 : Kelompok 1, tikus tanpa perlakuan.

K2 : Kelompok 2, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi (sputit kosong) 2 x tiap 8 jam selama 24 jam.

K3 : Kelompok 3, tikus yang dilakukan insisi 2 cm, diberikan infiltrasi levobupivakain 2 x tiap 8 jam selama 24 jam.



Gambar 5. Skema rancangan penelitian

4.2. Sampel penelitian

Hewan coba adalah tikus Wistar yang diperoleh dari Fakultas Peternakan UGM, Yogyakarta.

4.2.1 Kriteria inklusi :

1. Tikus Wistar betina keturunan murni.
2. Belum pernah digunakan untuk penelitian.
3. Umur 2 sampai 2,5 bulan.
4. Berat badan 250-300 gram.
5. Tidak terdapat kelainan anatomis

4.2.2 Kriteria eksklusi:

1. Tikus sakit selama masa adaptasi.
2. Tikus mati selama masa adaptasi dan perlakuan.

4.2.3. Besar sampel :

Menurut WHO besar sampel hewan coba untuk penelitian jangka pendek tiap kelompok minimal 5 ekor, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 15 ekor , masing-masing 5 ekor untuk tiap kelompok (pemeriksaan hari ke 5).²⁹

4.2.4. Randomisasi :

15 tikus dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok yaitu:

Kelompok 1 (K1 : tanpa perlakuan) : 5 ekor tikus

Kelompok 2 (K2 : infiltrasi tanpa anestetik lokal) : 5 ekor tikus

Kelompok 3 (K3 : dengan infiltrasi anestetik lokal) : 5 ekor tikus

4.3. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada tikus, proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Proses pembuatan preparat dan pewarnaan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS Surakarta dan UNDIP Semarang

4.4. Variabel penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Infiltrasi levobupivakain 0,25% pada sekitar luka.

4.4.2. Variabel terikat

Nilai Ag NOR

4.4.3. Variabel perantara

Skor histologi c-erbB-2

4.4.4. Definisi operasional

1. Infiltrasi levobupivakain 0,25%, dosis 12,6 mcg/gram BB memakai semprit tuberkulin pada jarak 1 cm dari kedua tepi luka.
2. Skor histologi c-erbB-2 adalah metode pemeriksaan imunohistokimia yang hasilnya dinyatakan dengan penilaian ekspresi c-erbB-2 berdasar presentasi dan intensitas

Skor Histologi = (IK x PK) + (IS x PS) + (IL x PL) + (IN x PN)

I = intensitas, P = presentase, K = kuat, S = sedang, L = lemah,

N = negatif

3. Nilai Ag NOR

Nilai AgNOR adalah jumlah AgNOR interfase per sel dengan pembesaran kuat (1000X dengan minyak emersi) pada 100 sel endotel, Penghitungan rerata jumlah AgNOR pada setiap inti per 100 sel dinyatakan sebagai mAgNOR dan penghitungan jumlah sel yang memiliki kandungan AgNOR 5 atau lebih pada setiap inti per 100 sel dinyatakan sebagai prosentase AgNOR atau pAgNOR.

4.5. Bahan dan alat penelitian

4.5.1. Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah tikus Wistar betina dengan umur 2,5 sampai 3 bulan dan berat 250-300 gram. Tikus diperoleh dari Fakultas Peternakan UGM. Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum ad libitum. Sebelum penelitian, tikus menjalani masa adaptasi selama 7 hari.

4.5.2. Bahan untuk eksisi-biopsi

Inkubator 56⁰ C

Mikrotom

Kaca obyek dan penutup

4.5.3. Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia

Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (MoAb) anti c-erbB-2*

a) *Kit universal streptavidin-biotin*

b) Pensil PAP

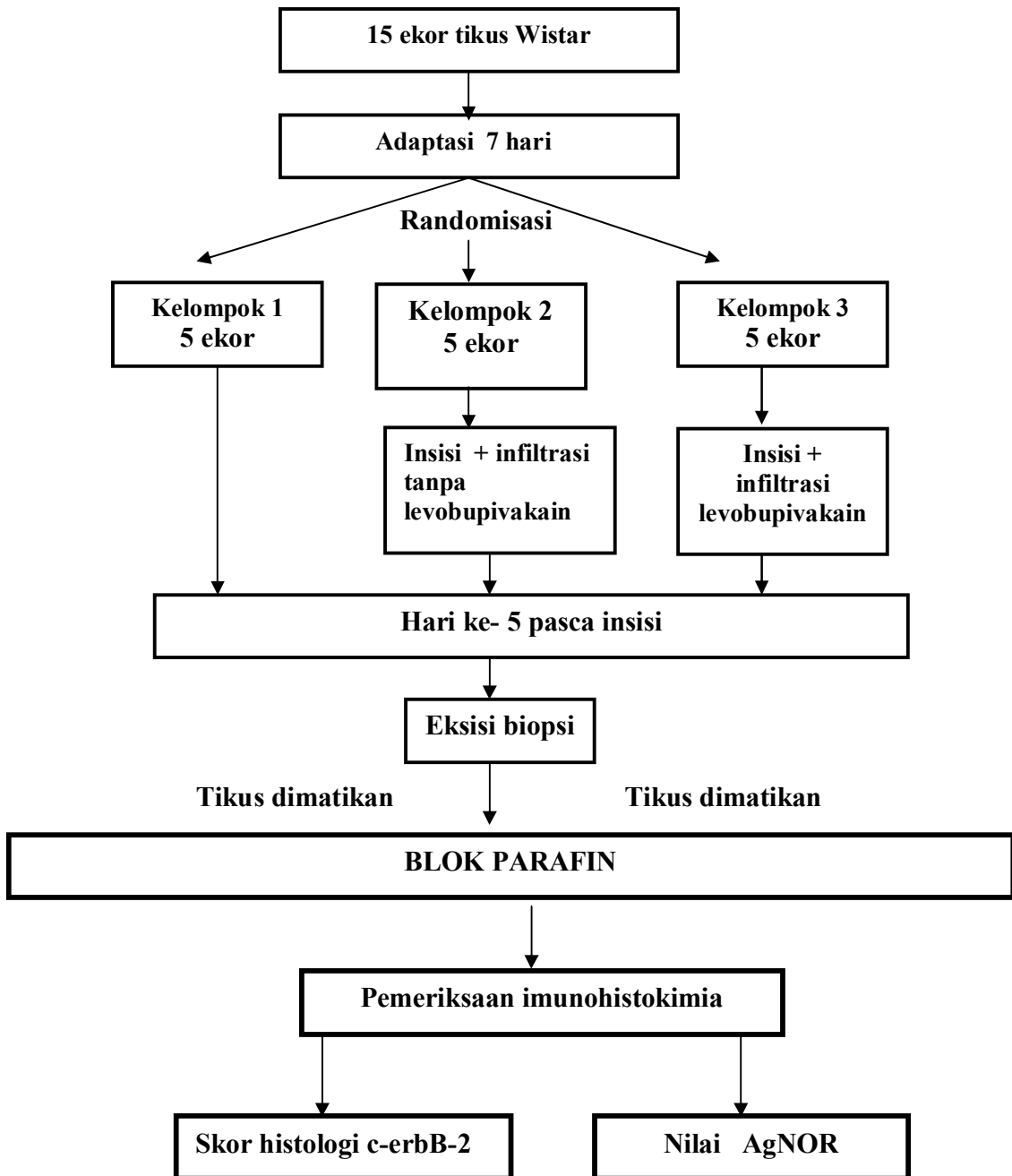
- c) *Waterbath*
- d) Tempat pewarnaan dan cucian
- e) Mikropipet 100 μ l , 1-10 μ l ; 40-200 μ l ; 200-100 μ l. *white tip, yellow tip, blue tip.*
- f) Kertas saring
- g) *Freezer*
- h) *Timer*
- i) Tabung plastik dan pipet

4.5.4. Bahan untuk pemeriksaan AgNOR

- a) Tempat pewarnaan dan cucian
- b) Timer
- c) Tabung plastik dan pipet
- d) AgNOR

4.6. Pelaksanaan penelitian

4.6.1 Alur kerja



4.7. Prosedur pemeriksaan

4.7.1. Prosedur eksisi-biopsi

Pada hari ke 5 pasca perlakuan, pada ketiga kelompok dilakukan pembiusan dengan menggunakan ether. Setelah tikus terbius kemudian pada kelompok 2 & 3 jaringan bekas irisan diusap dengan alkohol 70% lalu dibuat eksisi-biopsi kira-kira 0,5 cm persegi melintasi garis irisan. Pada kelompok1 pada tempat yang bersesuaian dilakukan hal yang sama. Jaringan biopsi diproses menjadi preparat imunohistokimia dan preparat untuk pengecatan AgNOR setelah dibuat dengan blok parafin.

4.7.2. Prosedur pembuatan preparat imunohistokimia

4.7.2.1. Deparafinisasi

Rendam slide yang ditempel potongan jaringan biopsi dari blok parafin ke dalam xylol I dan xylol II masing masing selama 5 menit, kemudian kedalam alkohol absolut I dan alkohol absolut II masing masing selama 5 menit, lalu ke dalam alkohol 90% dan alkohol 70% masing masing selama 5 menit, dan ke dalam aquabidest I dan aquabidest II masing masing selama 5 menit.

4.7.2.2. *Quenching endogenous peroxidase*

Rendam slide dalam metanol ditambah H_2O_2 0.3 % selama 30 menit

4.7.2.3. *Unmasking antigen*

Membuka kembali epitop antigen yang tertutup selama proses parafinisasi dengan bufer sitrat PH 6,4 dalam *microwave oven* temperatur *medium* selama 2 menit kemudian dalam temperatur *low* selama 2 menit.

4.7.2.4. Immunostaining

Bloking serum albumin ditetaskan diatas potongan jaringan dalam slide selama 30 menit. diberi antibodi primer (dengan pengenceran 1 : 50 sampai dengan 1: 200) di inkubasi selama 1 jam dalam temperatur 25° C, kemudian cuci dua kali dengan aquadest. Di beri antibodi sekunder *biotinilated* dan di inkubasi selama 30 menit, dan dicuci dua kali dengan aquadest. Diberi ensim SA- HRP (*Streptavidin horse raddish peroxidase*) kemudian cuci dua kali dengan aquadest. Diberi substrat ensim DAB (*diaminoben sidin*) dan pewarna tandingan *Hematoxin Meyer* lalu diberi kanada balsem.

4.7.3. Prosedur pembuatan preparat & cara pengecatan AgNOR

Blok parafin yang telah dipilih dipotong setebal 3 mikron , dan dipulas dengan teknik pewarnaan perak AgNOR menggunakan metode ploton. Sediaan yang telah dipotong, dilakukan deparafinisasi dalam xylol dan alkohol dengan konsentrasi diturunkan setiap 5 menit. Kemudian dicuci selama 3 menit sebanyak 4 X dalam aquabidest. Jaringan kemudian diinkubasi dalam campuran 2 bagian larutan perak nitrat 50% dengan 1 bagian gelatin 2% dalam asam format 1%. Inkubasi dilakukan dalam ruang gelap pada suhu ruangan selama 45 menit. Kemudian dicuci 3 kali dengan cara celup, dan dikeringkan dengan alkohol bertingkat dengan konsentrasi yang semakin tinggi, mulai 80%, 95% dan absolut. Selanjutnya dilakukan clearing dengan xylol. Mounting dilakukan dengan kanada balsem.

4.8. Cara pengumpulan data

Dari masing masing kelompok dilakukan fiksasi dengan blok parafin. Kemudian dilakukan Pemeriksaan Imunohistokimia untuk menentukan skor c-erbB-2 dan pemeriksaan AgNOR untuk menentukan mAg NOR dan pAgNOR.

4.9. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning, coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dalam bentuk rerata, standart deviasi, median dan grafik dan uji hipotesis. Data dikumpulkan, diolah serta dinyatakan dalam rerata \pm simpang baku (*mean \pm SD*) disertai kisaran (*range*). Dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene*. Distribusi data variabel c-erbB-2 dan mAgNOR dan p AgNOR diuji menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena sesuai dengan uji non parametrik dan $n < 30$. Selanjutnya dilakukan uji beda non parametrik untuk 3 variabel (C-erbB-2 dan mAgNOR dan pAgNOR) menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Uji beda non parametrik untuk 2 variabel berskala rasio (c-erbB-2) menggunakan *independent samples t-test*. Untuk menilai hubungan (c-erbB-2) terhadap nilai AgNOR (mAgNOR dan pAgNOR) digunakan uji korelasi yang sesuai dengan uji non parametrik dengan $n < 30$ yaitu uji *Spearman* (apabila uji normalitas data hasilnya normal). Dengan batas derajat kemaknaan $p \leq 0.05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Penyajian dalam bentuk tabel dan grafik. Analisis data menggunakan program komputer SPSS 11.0 *for windows*.²⁸