

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah potong lintang dengan pengamatan prospektif yang merupakan studi evaluatif penatalaksanaan karsinoma serviks uteri.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Bagian/SMF Obstetri Ginekologi dan poliklinik/bangsar Radioterapi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS dr. Kariadi Semarang, dimulai dari 1 Juli 2005 sampai dengan Maret 2006.

4.3 Subyek Penelitian

Subyek penelitian adalah semua penderita karsinoma epidermoid serviks uteri stadium IIB, IIIA dan IIIB yang dirawat di bangsal Onkologi Ginekologi dan poliklinik/bangsar Radioterapi yang mendapatkan terapi radiasi di Subbagian Radioterapi RS dr. Kariadi Semarang.

Sebelum mendapatkan terapi radiasi, penderita telah didiagnosis secara klinis, laboratorium, histopatologis, dan radiologi.

Penentuan stadium klinis dilakukan oleh Ahli Ginekologi Onkologi Subbagian Onkologi, Bagian Obstetri dan Ginekologi / RS dr. Kariadi Semarang berdasarkan klasifikasi FIGO tahun 2000.

4.3.1 Kriteria inklusi

Kasus dibatasi pada penderita karsinoma epidermoid serviks uteri stadium IIB, IIIA dan IIIB.

4.3.2 Kriteria eksklusi

- Menderita penyakit hati dan ginjal.
- Mendapatkan kemoterapi selain radiasi.
- Dalam keadaan hamil
- Terdapat infeksi dalam rongga pelvis.

4.3.3 Kriteria *drop out*

- Penderita meninggal dunia, terapi radiasi tidak selesai, dan hilang dari pengamatan.
- Tidak dapat dilakukan penentuan derajat diferensiasi tumornya.
- Bila sampel serum yang diambil tidak memenuhi syarat pemeriksaan.

4.4 Besar Sampel

Untuk menerima atau menolak hipotesis dengan menggunakan tingkat kemaknaan $\alpha = 0,05$ ($z\alpha = 1,96$) dan $\beta = 10\%$, power 90% ($z\beta = 1,282$) dimana diperkirakan terdapat perbedaan klinis berkaitan dengan kadar *SCC antigen* sebesar $d = 1,5$ ng/ml dan simpang baku kadar *SCC antigen* pada karsinoma epidermoid serviks uteri sebesar 2,97 ng/ml yang didapatkan dari Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Tamaya T

dalam The value of platelet-derived endothelial cell growth factor as a novel predictor of advancement of uterine cervical cancers, dari Cancer Research 60, July 1, 2000, sehingga perhitungan besar sampel minimal yang akan dipergunakan sebagai berikut:

$$n = \left[\frac{(z\alpha + z\beta) s}{d} \right]^2$$

n = jumlah sampel keseluruhan

s = simpang baku kadar *SCC antigen* pada karsinoma epidermoid serviks uteri

$z\alpha$ = tingkat kemaknaan $\alpha = 0,05$ ($z\alpha = 1,96$)

$z\beta$ = power 90% ($z\beta = 1,282$)

maka $n = 41,2 \approx 41$ sampel. Dengan kemungkinan terjadi drop out sebesar 10%, sehingga besar sampel keseluruhan minimal adalah 45.

Pada sampel tersebut akan dicatat datanya pra dan pasca terapi radiasi.

4.5 Cara Kerja

Cara pengambilan spesimen :

- Sampel penelitian adalah setiap penderita karsinoma epidermoid serviks uteri yang memenuhi kriteria inklusi, kemudian diberikan penjelasan tentang prosedur penelitian, keuntungan dan kerugian mengikuti penelitian. Setelah mendapat penjelasan secara lengkap tentang prosedur penelitian, penderita diminta untuk mengisi formulir kesediaan mengikuti penelitian ini. Selanjutnya penderita

ditentukan pengelolaan terapi serta diambil sampel darah untuk penilaian kadar *SCC antigen*.

- Setiap penderita diambil 5 CC darah dari vena kubiti dengan semprit steril. Darah dibiarkan membeku pada suhu kamar (tidak lebih dari 24 jam), kemudian diputar (*centrifuge*) dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya supernatan (serum) yang diperoleh dipindahkan kedalam tabung steril yang lain dan dibekukan dalam lemari pendingin dengan temperatur -20° C sampai pemeriksaan dilakukan (tidak lebih dari 5 bulan).
- Teknik pemeriksaan kadar *SCC antigen*:

Pemeriksaan kadar *SCC antigen* dilakukan dengan teknik imunoenzimatik menggunakan reagen CanAg SCC EIA (dari CanAg Diagnostics AB, Sweden) yang berisi Anti *SCC antigen* untuk 96 test. Prosedur pemeriksaan *SCC antigen* dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. CanAg SCC EIA (Enzym immunometric assay) merupakan fase *solid immunoassay* non kompetitif yang didasarkan pada teknik *direct sandwich*.
2. Sampel penderita diinkubasikan bersama dengan antibodi monoklonal Biotin Anti-SCC dan peroksidase horseradish (HRP) dengan label antibodi monoklonal Anti-SCC dalam mikrostrip berlapis Streptavidin.
3. Disiapkan reaksi sel pada karosel sel.
4. Setelah dicuci, reagen bufer substrat/kromogen (hidroksi peroksidase dan 3, 3', 5, 5' tetra-methylbenzidine) ditambahkan pada tiap tabung dan reaksi

enzim akan berlanjut. Bila didapatkan antigen maka selama reaksi enzim akan terbentuk warna biru.

5. Intensitas warna diukur dalam *microplate spectrophotometer* pada gelombang 620 nm atau 405 nm.
 6. Masukkan karosel ke dalam alat CanAg SCC EIA kit.
 7. Penilaian dilakukan secara komputerisasi dan dibaca dari kurva kalibrasi.
- Selanjutnya penderita diberikan terapi radiasi secara lengkap dan standar (radiasi eksternal 5000 Rad dan *After Loading* 2 kali) di bagian Radioterapi RSDK sesuai dengan prosedur yang berlaku.
 - 3 bulan setelah penderita mendapatkan terapi radiasi secara lengkap dan standar, dilakukan pemeriksaan ulang terhadap kadar serum *SCC antigen* yang dikonfirmasi dengan hasil penilaian respon radiasi histopatologis dengan cara biopsi serviks.
 - Biopsi serviks dilakukan di poliklinik ginekologi RSDK oleh peneliti, kemudian dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dinilai respon radiasi histopatologisnya oleh ahli Patologi Anatomi.

4.6 Variabel Penelitian

- Variabel bebas adalah radiasi.
- Variabel tergantung adalah respon radiasi histopatologis dan kadar *SCC antigen*.

- Variabel perancu adalah usia, gangguan fungsi hepar dan ginjal, stadium sel karsinoma dan derajat diferensiasi. Untuk mengatasi adanya variabel perancu tersebut, maka variabel usia dibagi menjadi beberapa kelompok. Sedangkan gangguan fungsi hepar dan ginjal dieksklusi dari pengambilan sampel.

4.7 Batasan Operasional

1. Karsinoma epidermoid serviks uteri adalah suatu penyakit dengan ditemukannya sel ganas yang berasal dari epitel skuamosa yang ditetapkan melalui pemeriksaan histopatologis.
2. Stadium klinik adalah stadium kanker yang ditetapkan berdasarkan klasifikasi FIGO 2000.
3. Karsinoma serviks uteri stadium IIB adalah bila proses keganasan telah mencapai parametrium.
4. Karsinoma serviks uteri stadium IIIA adalah bila proses keganasan telah mencapai sepertiga distal vagina tanpa penyebaran ke dinding panggul.
5. Karsinoma serviks uteri stadium IIIB adalah bila proses keganasan telah mencapai dinding panggul dan/ atau menyebabkan hidronefrosis atau kegagalan fungsi ginjal.
6. Usia adalah ditetapkan berdasarkan ulang tahun terakhir penderita pada saat penelitian dilakukan.

7. Radiasi eksterna (teleterapi) adalah suatu cara radiasi pada seluruh pelvis dalam lapangan depan dan belakang terutama pada kelenjar getah bening panggul dan penjalaran di parametra ke arah dinding panggul dengan menggunakan pesawat linear akselerator atau Cobalt 60. Dosis radiasi sebesar 200 cGy per fraksi/hari, 5 kali dalam seminggu, diberikan sebanyak 5 kali atau 5000 Rad.
8. Radiasi intrakaviter (brakiterapi) dengan teknik *after loading* yang memberi kemungkinan radiasi dengan intensitas tinggi (*high dose rate*) sehingga lama radiasi sangat pendek. Bahan radioaktif yang biasa dipakai adalah Cesium 137. Dosis radiasi diberikan sebanyak 2 x 850 cGy pada titik A, dengan interval 1 minggu, dilaksanakan 2 minggu setelah radiasi eksterna selesai. Setiap aplikasi dilakukan dengan anestesi umum.
9. Radiasi lengkap adalah bila penderita sudah mendapatkan terapi radiasi eksterna 5000 Rad dan radiasi intrakaviter dengan teknik *after loading* 2 x 850 cGy.
10. Respon Radiasi Histopatologis baik adalah bila dalam seluruh sediaan biopsi tidak ditemukan satu pun sel ganas setelah terapi radiasi (lisis). Pada sediaan hanya ditemukan jaringan granulasi dengan atau tanpa nekrosis, atau hanya ditemukan jaringan nekrotik.
11. Respon Radiasi Histopatologis moderat adalah bila sarang-sarang sel tumor mengalami kerusakan hebat, nekrosis dan hanya ditemukan beberapa atau sulit ditemukan sel viabel.
12. Respon Radiasi Histopatologis jelek adalah bila dalam sediaan biopsi pasca terapi radiasi tidak ditemukan kerusakan sarang-sarang sel tumor atau derajat kerusakan

masih rendah dengan beberapa sel tumor telah lisis karena pengaruh radiasi, serta dapat ditemukan sel tumor yang membengkak, inti banyak, dan sitoplasma bervakuola (sel viabel).

13. Diferensiasi baik, sebagian besar berbentuk sel dewasa dengan mutiara epitel banyak dijumpai dan gambaran mitosis jarang (< 2 mitosis per lapangan pandang besar) dan sedikit pleimorfik.
14. Diferensiasi moderat, ditemukan sedikit sel dengan sitoplasma berlebihan. Disini keratinisasi sedang, mutiara epitel jarang ditemui, dapat ditemukan jembatan interselular, dengan 2-4 mitosis per lapangan pandang besar, sel-sel bervariasi sedang dalam ukuran maupun bentuk sel tumor dengan sel pleimorfik lebih banyak dan batas sel kabur.
15. Diferensiasi jelek, terlihat sedikit sitoplasma mengelilingi nukleus yang hiperkromatik, sebagian besar berbentuk sel muda yang pleimorfik, tidak ditemukan mutiara tanduk, keratinisasi minimal, ditemukan lebih dari 4 mitosis per lapangan pandang besar, dengan rasio inti-sitoplasma sangat meningkat.
16. Kadar *SCC antigen* adalah kadar *SCC antigen* yang diambil dari serum penderita serta diukur kadarnya pra dan pasca terapi radiasi dengan nilai batas normal $\leq 2,5$ ng/ml berdasarkan CanAg SCC EIA kit.
17. Infeksi dalam rongga pelvis adalah terjadinya infeksi akut atau kronik pada genetalia interna yang disebabkan oleh mikroorganisme, yang dapat menyerang

endometrium, tuba, ovarium maupun daerah parametrium baik secara asenden/ perkontinuitatum dari organ sekitarnya atau secara hematogen.

18. Gangguan fungsi hati dinilai berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan laboratorium (SGOT dan SGPT). Kadar SGOT dianggap normal bila kadarnya 15 – 37 U/L, dan kadar SGPT dianggap normal bila kadarnya 30-65 U/L. Bila terdapat kenaikan kadar SGOT dan SGPT dilakukan pemeriksaan protein total, albumin dan globulin.
19. Gangguan fungsi ginjal dinilai berdasarkan anamnesis dan pemeriksaan laboratorium (ureum dan kreatinin). Kadar ureum dianggap normal bila kadarnya 15-39 mg/dl, dan kadar kreatinin dianggap normal bila kadarnya 0,6-1,3 mg/dl.

4.8 Analisis Data

1. Semua data dianalisis secara deskriptif melalui tabel silang dengan prosentase.
2. Semua data berskala numerik dihitung nilai reratanya .
3. Perbedaan kadar *SCC antigen* pra dan pasca terapi radiasi serta data lain yang berskala numerik diuji dengan *Mann-Whitney U test*, karena distribusinya tidak normal.
4. Hubungan kadar *SCC antigen* dan respon radiasi histopatologis pada karsinoma epidermoid serviks uteri dihitung dengan uji χ^2 .
5. Untuk mengendalikan faktor perancu dihitung menggunakan regresi logistik.

6. Untuk menentukan nilai batas kadar *SCC antigen* yang tepat dalam memperkirakan prognosis terapi dengan melakukan penghitungan sensitivitas dan spesifisitas untuk mencari *cut of point* yang terbaik dengan kurva ROC.
7. Pengolahan dan analisis data menggunakan komputer dengan program SPSS versi 13.0 for windows, dengan tingkat signifikansi $p = 0,05$.

4.9 Etika penelitian

- Semua subyek pada penelitian ini memberikan persetujuan tertulis yang menyatakan kesediaannya untuk mengikuti penelitian.
- Biaya pemeriksaan kadar *SCC antigen* dibebankan pada peneliti.
- Penelitian ini tidak merugikan atau membahayakan penderita.
- Terhadap subyek penelitian tetap diutamakan pelayanan dengan selalu mengindahkan tata cara etika yang berlaku.
- Mendapat persetujuan dari Ketua Bagian/SMF Obstetri-Ginekologi, Bagian Radioterapi RSDK, Direktur RSDK Semarang serta Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSDK Semarang.

4.10 ALUR PENELITIAN

