

## BAB 4

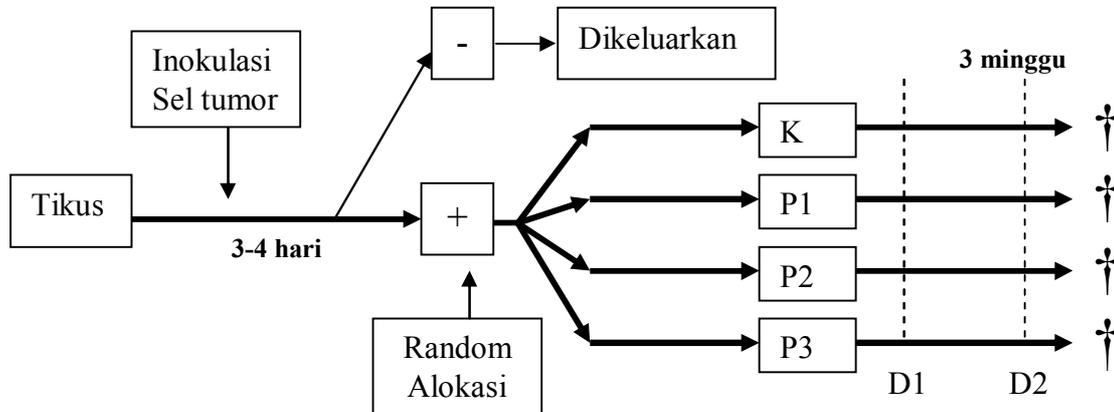
### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*Pre and post test 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 *Phaleria macrocarpa*
- P1 : Kelompok Perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat *Phaleria macrocarpa* 0,035mg /hari (0,175 mL /hari)
- P2 : Kelompok Perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari)
- P3 : Kelompok Perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat *Phaleria macrocarpa* 0,14 mg /hari (0,7 mL /hari)

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut: 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:

- a. Mencit betina
- b. Strain C3H
- c.. Berat badan 20-30gram setelah aklimatisasi.
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak

Kriteria Eksklusi:

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

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor<sup>34</sup>, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 5 ekor mencit.

Randomisasi: 20 mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 5 mencit

Kelompok P1 : 5 mencit

Kelompok P2 : 5 mencit.

Kelompok P3 : 5 mencit

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

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 4 bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan di Laboratorium Histologi FK UNDIP, proses pengambilan jaringan dan proses pembuatan blok parafin sampai pewarnaan HE dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

### **4.4. Variabel penelitian**

#### 4.4.1. Variabel bebas

Pemberian beberapa dosis ekstrak *Phaleria macrocarpa*.

#### 4.4.2. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

1. Indeks apoptosis sel kanker payudara yang dihitung sesuai metode yang digunakan oleh *Aihara M et al.*<sup>35</sup>.
2. Perkembangan massa tumor, diukur diameter tumor sebelum dan setelah perlakuan selesai dengan menggunakan alat pengukur diameter tumor (caliper).

#### 4.4.3. Definisi operasional

1. Ekstrak *Phaleria macrocarpa* adalah ekstrak yang berasal dari daging buah kering, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi, dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,2mg/mL
2. Indeks apoptosis dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et al, di mana sediaan tumor yang dilakukan pengecatan dengan Hematoxylin-Eosin dihitung badan apoptotiknya per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil rata-rata Skala variabel : rasio
3. Perkembangan massa tumor didapat dengan menghitung ukuran diameter tumor menggunakan alat caliper tumor (CaliPro<sup>R</sup>), diukur pada diameter terbesar tumor. Alat ukur caliper dengan ketepatan sampai  $10^{-2}$ , kita ukurkan pada diameter yang paling lebar dengan pengukuran satu dimensi, sebelum dan sesudah perlakuan. Satuan ukurannya adalah *centimeter*.

Skala variabel : rasio.

#### 4.5. Bahan dan alat penelitian

##### 4.5.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina 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.

Phaleria macrocarpa yang digunakan adalah Ekstrak Phaleria macrocarpa, diperoleh dengan cara :

- 1 kg daging buah Phaleria macrocarpa yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50mg) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.
- Hasil ekstrak dimasukkan dalam labu rotary evaporator dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).
- Ekstrak dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.
- Didapatkan hasil 5,5mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2mg/mL .

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram 1 x sehari <sup>8</sup> , dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 <sup>36</sup> dikalikan

konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah  $5000 \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715$  mg/hari (0,36 mL). Selain itu juga diberikan dosis 0,035mg (0,175 mL)/hari dan 0,14 mg (0,7 mL)/hari.

#### 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. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, 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  | 7. Gunting bengkok 10 Cm |
| 2. Cawan petri ukuran 15 Cm | 8. Pinset anatomi 10 Cm  |
| 3. Cawan ukuran 10 Cm       | 9. Alas fiksasi          |
| 4. Sput 1cc                 |                          |
| 5. Jarum suntik trocar      |                          |
| 6. Gunting lurus 10 Cm      |                          |

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

- a. *Digital Tissue Processor Leica<sup>R</sup>*
- b. *Tissue Blocking Leica<sup>R</sup> EG-1160*
- c. Inkubator suhu 56<sup>0</sup> C *Memmert<sup>R</sup>*
- d. Mikrotom *Leica<sup>R</sup> RM-2135*
- e. *Auto Stainer Leica-XL<sup>R</sup>*
- f. Kaca obyek dan kaca penutup

4.5.6. Alat untuk pengukuran diameter tumor.

4.5.7. 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

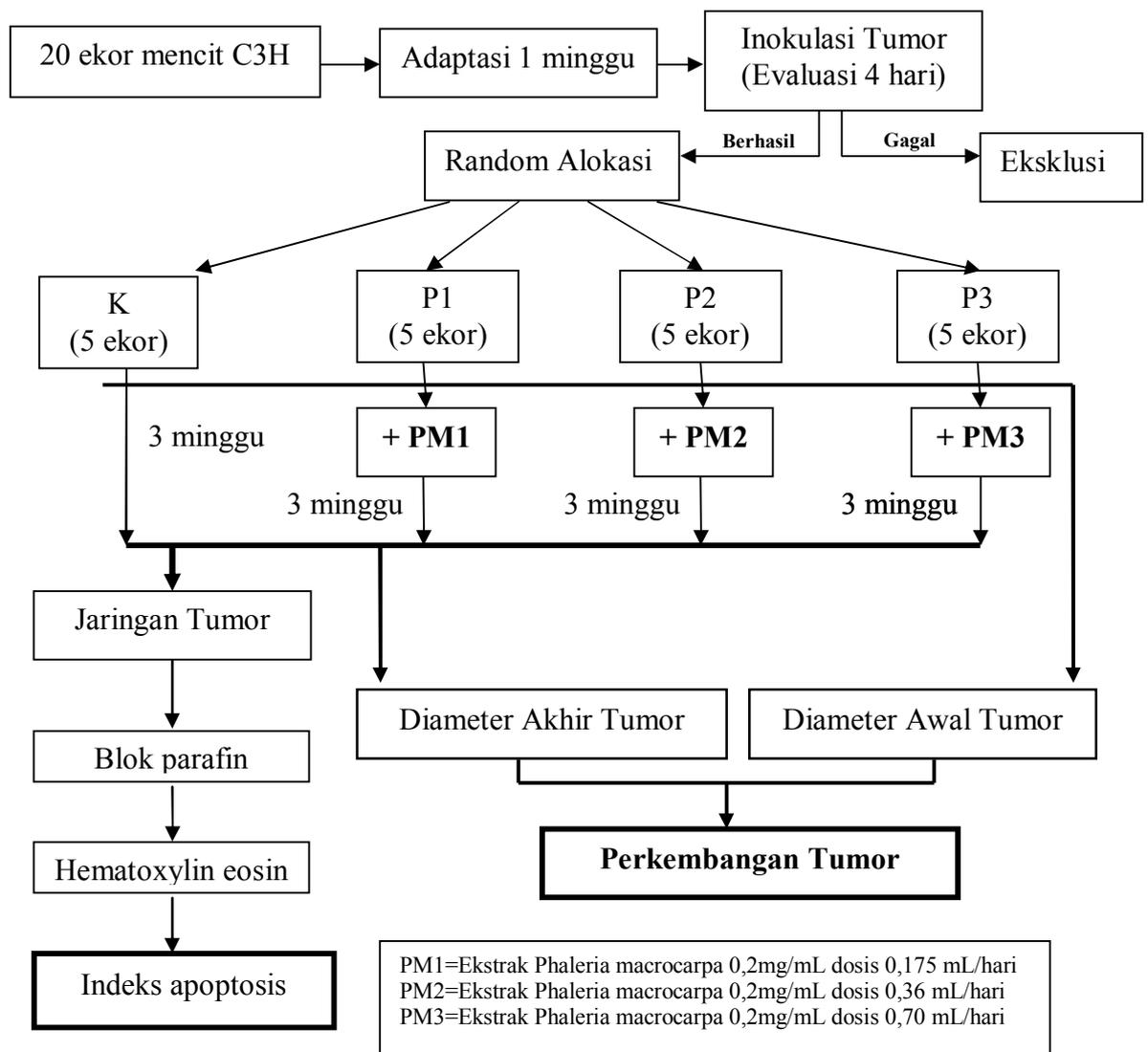
Dua puluh ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

Dua puluh 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 dan diukur diameter tumornya. Kemudian diberikan perlakuan, perlakuan

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

Setelah perlakuan selesai, diameter tumor diukur kembali. 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 dicawan 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 ke arah jalur susu (milk streak) 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 pengukuran diameter tumor

Massa tumor diukur menggunakan caliper (CaliPro<sup>R</sup>) dengan ketepatan  $10^{-2}$ . Kita ukur tumor pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi.

#### 4.8.3. 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 2jam.

##### c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

##### d. Embedding .

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58<sup>0</sup>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<sup>0</sup>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. Mayer HE                          | 7,5 menit |                  |          |
| 9. Air                               | 7,5 menit |                  |          |
| 10. Eosin (0,5%)-alcohol-asam asetat | 1 menit   |                  |          |

#### 4.9. Cara mengumpulkan data

Dari masing-masing kelompok diukur diameter tumor sebelum dan sesudah perlakuan, dan diambil massa tumornya setelah perlakuan yang selanjutnya dibuat preparat setebal 6 mikron, diwarnai dengan pengecatan Hematoxylin-Eosin kemudian diamati 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 indeks apoptosis dan perkembangan tumor adenokarsinoma payudara disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median, dan grafik garis.

Pada penelitian ini dilakukan uji delta dengan ANOVA untuk mengetahui perbedaan seluruh kelompok dan dilakukan Post Hoc Test dengan Tamhane pada variabel perkembangan masa tumor. Sedangkan pada variabel Indeks apoptosis dilakukan uji *One-way ANOVA*. Untuk uji korelasi antara variabel indeks apoptosis dengan ukuran diameter tumor setelah perlakuan diuji dengan uji korelasi *Pearsons*<sup>37-40</sup>.

Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $P \leq 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan *software* SPSS Ver. 10.0 for Windows.