

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Ruang lingkup penelitian





Ruang lingkup penelitian ini adalah ilmu bedah khususnya bedah onkologi, ilmu Patologi Anatomi dan Imunologi.

4.2. Tempat dan waktu penelitian

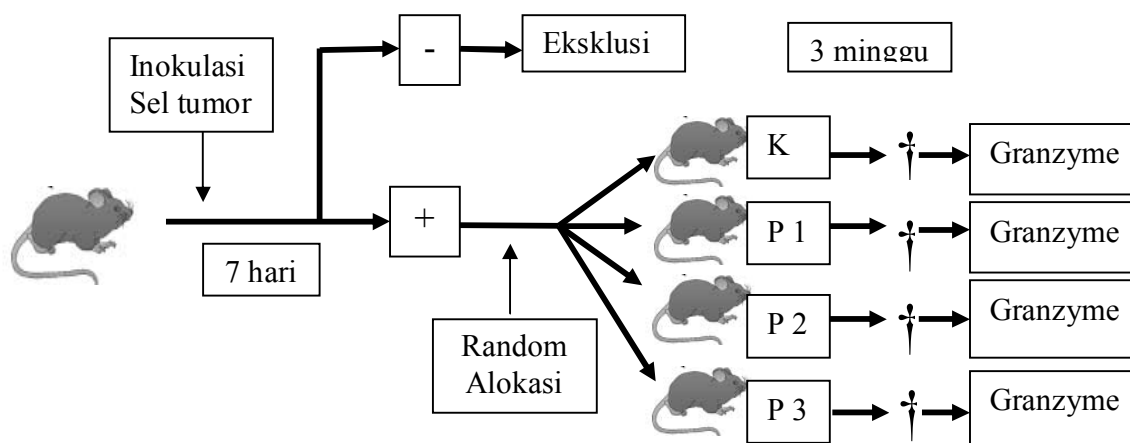
Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama enam bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan dilaboratorium Histologi FK UNDIP, proses pembuatan blok parafin, pemeriksaan imunohistokimia sampai pewarnaan imunoperoksidase yang dipakai pada paraffin embedded tissue dengan fiksasi formalin dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM/ RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.3. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *Randomized Control Group Only Design* yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Percobaan dilakukan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) , perlakuan 3 (P3). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

K		Kelompok kontrol, mencit yang hanya diinokulasi sel kanker.
P1		Kelompok perlakuan 1, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat <i>cyclophosphamide</i> 0,2 mg (0,2 ml) p.o dan <i>transfer factor</i> 1 mg (0,5 ml) p.o
P2		Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat <i>transfer factor</i> 1 mg (0,5 ml) p.o
P3		Kelompok perlakuan 3, mencit yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat <i>cyclophosphamide</i> 0,2 mg (0,2ml) p.o

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



4.1. Populasi dan sampel

4.4.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain C3H. Strain ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian kanker juga dapat diamati respon imunologiknya. Sedang penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini dilakukan untuk memudahkan pemeliharaan karena jenis kelamin betina tidak begitu agresif dibandingkan jenis jantan sehingga dapat mengurangi resiko terjadinya cedera karena perkelahian. Adanya cedera ini akan menimbulkan kerancuan dalam menilai respon imunitasnya.

4.4.2. Sampel

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

4.4.2.1. Kriteria inklusi:

- a. Mencit betina, Strain C3H.
- b. Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi.
- c. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.
- d. Setelah inokulasi tumor (7 hari) terdapat pertumbuhan tumor.
- e. Tumor yang diinokulasikan jenis adenocarcinoma mamma ductus invasif grade II-III.

4.4.2.2. Kriteria eksklusi:

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

4.4.3. Besar sampel

Besar sampel ditetapkan berdasarkan kriteria sampel minimal untuk penelitian binatang berdasarkan persyaratan *World Health Organization* (WHO) untuk penelitian keganasan yaitu minimal 5 ekor mencit untuk tiap kelompok penelitian. Menimbang adanya kemungkinan tikus mati selama penelitian yang besarnya diperkirakan sebesar 10% maka besar sampel dengan koreksi drop-out adalah:

$$ndo = \frac{n}{(1-do)} = \frac{5}{(1-0,1)} = 5,56 \approx 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut besar sampel total untuk 4 kelompok penelitian adalah 24 ekor mencit C3H.

4.5. Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Sebagai variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

1. Pemberian kombinasi *cyclophosphamide* dan *transfer factor*.
2. Pemberian *transfer factor*.
3. Pemberian *cyclophosphamide*.

4.5.2 Variabel tergantung

Sebagai variable tergantung dalam penelitian ini adalah :

- Ekspresi granzyme

4.5.3 Definisi operasional

1. Pemberian terapi *cyclophosphamide* dan *transfer factor*
 - a. Perlakuan yang diberikan selama 3 minggu
 - b. *Cyclophosphamide* diberikan secara oral dengan dosis 0,2 mg(0,2ml) diberikan 1 kali. Dosis adalah dosis yang dianjurkan untuk terapi kanker pada manusia sebesar 30 mg tablet oral dengan dikalikan angka konversi untuk mencit 20 g yaitu 0,0026 diberikan dengan pipet peroral. Skala pengukuran dari dosis *cyclophosphamide* adalah skala numerik.
 - c. *Transfer factor* diberikan secara oral dengan dosis 1 mg(0,5ml) diberikan 3 kali. Dosis adalah dosis maksimal yang dianjurkan pada manusia yakni 385mg dengan dikalikan angka konversi untuk mencit 20 g yaitu 0,0026 diberikan dengan pipet peroral. Skala pengukuran dari dosis *transfer factor* adalah skala numerik.
2. Ekspresi granzyme dihitung dari jumlah semua sel mononuklear yang berwarna coklat dengan pewarnaan *antibody monoclonal anti-granzyme* pada setiap 100 sel tumor dan dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 200x. Penghitungan dilakukan di daerah yang bukan sentral nekrosis dan dicari pada tepi tumor yang kontak dengan vaskularisasi, pada 5 lapangan

pandang, diambil rata-rata persentasenya. Dilihat berurutan dari kiri ke kanan. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

Skala variabel : rasio

4.6. Bahan dan alat

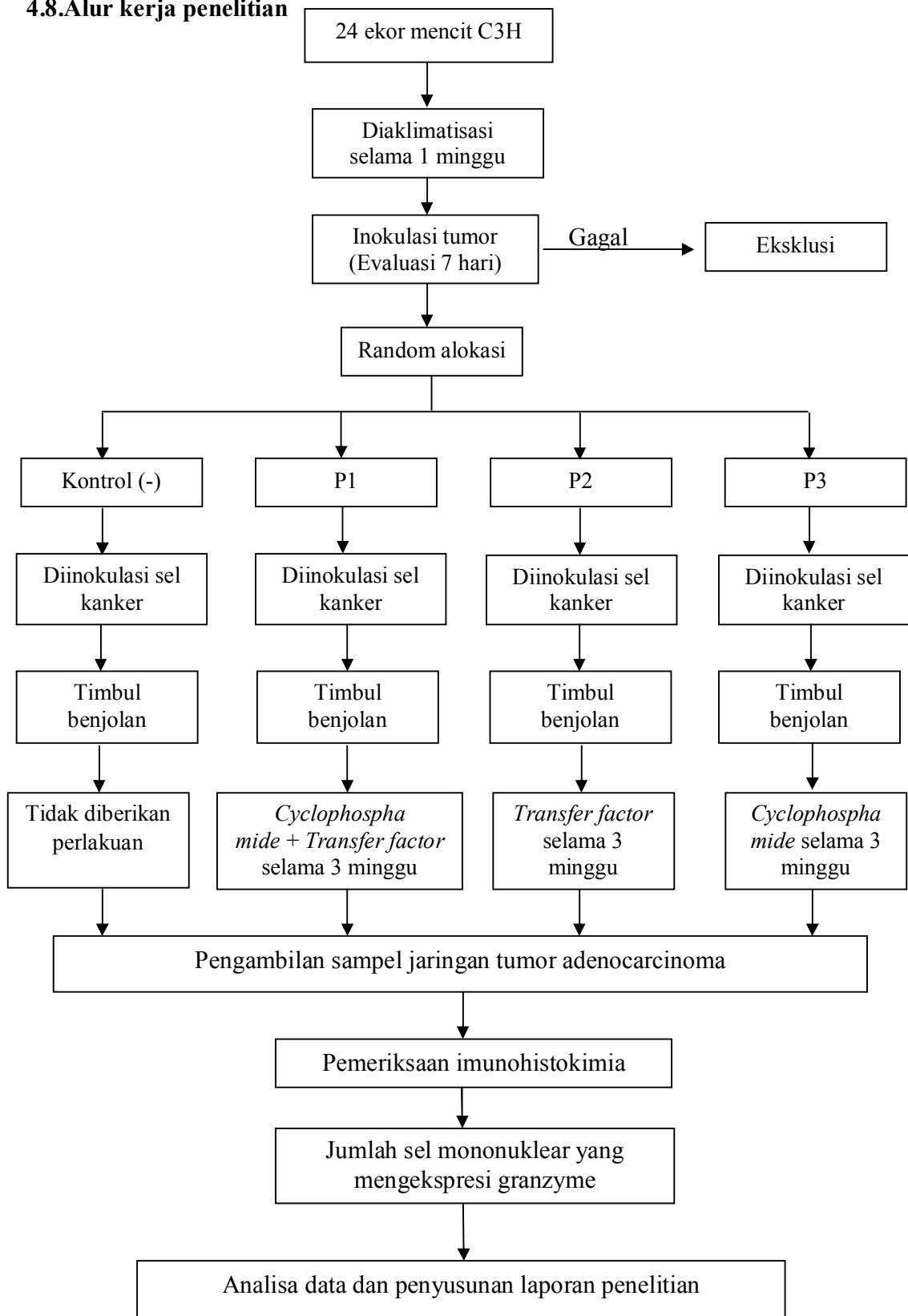
1. Jaringan adenocarcinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenocarcinoma dari mencit donor akan ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diinsisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya.
2. *Cyclophosphamide* tablet @ 50 mg dari Kalbe Farma.
3. *Transfer Factor* kapsul @ 385 mg dari 4life *transfer factor* USA.
4. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit.(terlampir)
5. Bahan untuk pemeriksaan pengecatan granzyme.(terlampir)

4.7 Prosedur pengumpulan data

1. Pemeliharaan dan perlakuan dilakukan di Bagian Biokimia FK UNDIP, sebanyak 24 ekor mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan dan berat 20 - 30 gram diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum penelitian. Setiap mencit dimasukkan kedalam kandang terpisah dan diberi pakan standar serta minum ad libitum.

2. Dilakukan inokulasi sel-sel kanker pada masing-masing mencit kemudian ditunggu selama 7 hari.
3. 24 ekor mencit yang telah terpapar kanker tersebut kemudian dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak dengan komputer, masing-masing kelompok dikandangkan secara individual. Perlakuan yang diberikan selama 3 minggu dan pemberian *cyclophosphamide* dan *transfer factor* secara oral dengan pipet mikro.
4. Mencit dianestesi dengan ether selanjutnya diambil jaringan tumornya Jaringan tumor diproses menjadi preparat histopatologik setelah dibuat blok paraffin.

4.8. Alur kerja penelitian



4.9. Cara mengumpulkan data

Dari masing-masing kelompok diambil massa tumornya setelah perlakuan dan selanjutnya dibuat preparat setebal 6 mikron, dengan metode imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi granzyme B dengan pewarnaan *antibody monoclonal anti-granzyme*, lalu dihitung jumlah sel limfosit di sekitar sel kanker yang memproduksi granzyme B yang berwarna coklat dengan mikroskop cahaya pembesaran 200X. Pengukuran tersebut dilakukan oleh dua orang yaitu peneliti dan seorang ahli Patologi Anatomi.

4.10. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan data cleaning, coding, tabulasi dan dimasukkan kedalam komputer. Analisis data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisis deskriptif yaitu ekspresi granzyme dipaparkan dalam bentuk rerata. Uji hipotesis dilakukan dengan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Post Hoc dengan menggunakan uji Least Significant Difference (LSD). Sebelum uji ANOVA dilakukan, diperiksa asumsi untuk uji ANOVA yaitu normalitas distribusi dan homogenitas varians dari data. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $P \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc, USA).³⁷

4.11. Etika penelitian

Sebelum penelitian dilaksanakan, proposal penelitian dimintakan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP/RSUP. Dr. Kariadi Semarang. Seluruh hewan coba dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang. Seluruh tindakan yang bersifat invasif termasuk terminasi hewan coba dilakukan dibawah anestesi. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan animal ethics antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan dan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian dan pemusnahannya.