

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan penelitian

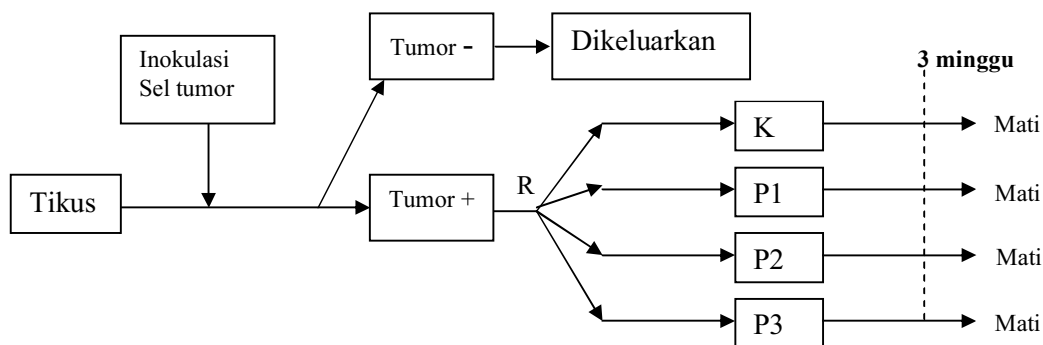
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, tidak mendapat ekstrak *Phaleria macrocarpa*
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,035 mg /hari (0,175 mL /hari)
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari)
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,14 mg /hari (0,7 mL /hari)

Pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa* kepada mencit dibagi menjadi tiga dosis yang makin meningkat. Dosis-dosis ekstrak *Phaleria macrocarpa* tersebut dibedakan untuk mempelajari dosis yang mana yang berpengaruh

terhadap ekspresi VEGF dan perkembangan massa tumor.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



4.2. Populasi dan sampel

4.2.1 Populasi

Hewan coba adalah mencit strain C3H berusia 6 bulan dengan berat badan 20-30 gram yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

4.2.2. Sampel

Besar sampel menurut WHO untuk tiap kelompok minimal 5 ekor hewan coba.⁸² Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 5 ekor mencit.

Dua puluh mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu: kelompok K, kelompok P1, kelompok P2 dan kelompok P3.

Setiap mencit diberi nomor. Nomor 1 sampai 20. Pembagian

kelompok dengan cara undian. Dilakukan pengambilan 5 buah kertas yang telah diberi nomor masing-masing mencit. Lima buah kertas pertama akan dimasukkan kelompok K. Selanjutnya dilakukan hal yang sama sehingga terpenuhi keempat kelompok mencit.

Kriteria Inklusi:

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

Kriteria Eksklusi:

- Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif).

4.3. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 6 bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, proses pembuatan blok parafin sampai pewarnaan H&E dan imunohistokimia (IHC) dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

4.4. Variabel penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Pemberian tiga dosis ekstrak *Phaleria macrocarpa*: 0,035mg /hari (0,175 mL /hari), 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari), dan 0,14 mg /hari

(0,7 mL /hari). Skala numerik.

4.4.2. Variabel perantara

Ekspresi VEGF. Skala rasio.

4.4.3. Variabel tergantung

Perkembangan massa tumor. Skala rasio.

4.5. Definisi operasional

1. Ekstrak *Phaleria macrocarpa* adalah ekstrak yang berasal dari daging buah kering. Ekstrak diperoleh dengan cara sokletasi di Institut Bahan Alam Pemerintah Propinsi Jawa Tengah.
2. Ekspresi VEGF adalah warna coklat yang timbul di membran sitoplasma sel tumor dengan pengecatan IHC dan H&E setelah diberi *monoclonal antibody antiVEGF*, dihitung per 100 sel tumor per lapang pandang dalam 5 lapang pandang dengan pembesaran 400 kali. Kemudian dihitung reratanya.
3. Perkembangan massa tumor didapat dengan menghitung ukuran diameter tumor menggunakan alat caliper tumor (CaliPro^R) sebelum dan setelah pemberian ekstrak, diukur diameter terbesar tumor. Satuan cm.

4.6. Bahan dan alat penelitian

4.6.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 6 bulan dan berat 20 - 30 gram. Berat badan tersebut adalah berat badan ideal mencit berusia 6 bulan. 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.⁸²

Adenokarsinoma diperoleh dari mencit donor. Tumor yang mengandung sel adenokarsinoma dari mencit donor ditransplantasikan ke mencit resipien. Sebelum ditransplantasikan, tumor dari mencit donor akan diincisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi dengan pewarnaan H&E untuk mengkonfirmasi jenis tumornya.

Phaleria macrocarpa yang digunakan adalah ekstrak *Phaleria macrocarpa*. Ekstrak diperoleh dengan cara sokletasi. Cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

- 1 kg daging buah *Phaleria macrocarpa* yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50 mg) 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.
- Setelah kering didapatkan hasil 5,5 mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%).

- Hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2 mg/mL.⁸³

Dosis yang digunakan disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu serbuk daging buah seberat 5 gram, dikonsumsi 1 x sehari, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026⁸⁴ dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah $5000 \text{ mg} \times 0,0026 \times 0,0055 = 0,0715 \text{ mg/hari}$ (0,36 mL/hari). Selain itu juga diberikan dosis 0,035mg/hari (0,175 mL/hari) dan 0,14 mg/hari (0,7 mL/hari).

4.6.2. Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit:

- a. Alkohol 70 %
- b. Larutan garam fisiologik
- c. Es batu
- d. Mencit donor bertumor
- e. Mencit resipien

4.6.3. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin:

- a. Formalin *buffer* 10%
- b. Alkohol 70%, 80%, 96% absolut
- c. Xylol
- d. Parafin cair (Histoplast)
- e. Albumin dan *poly-L-lysine*
- f. Bahan pengecatan H&E
- g. Canada balsam dan entelan

4.6.4. Bahan tambahan untuk pewarnaan IHC

- a. Antibodi primer : *Mouse monoclonal antibody (MoAb) anti-VEGF (Novocastra-Vision Biosystem^R)*⁸⁵
- b. Kit *universal streptavidin-biotin (EnVision-DakoCytomation^R)*

4.6.5. Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit:

- a. Cawan petri ukuran 6 cm
- b. Cawan petri ukuran 15 cm
- c. Cawan ukuran 10 cm
- d. Spuit 1cc
- e. Jarum suntik trocar
- f. Gunting lurus 10 cm
- g. Gunting bengkok 10 cm
- h. Pinset anatomi 10 cm
- i. Alas fiksasi

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

- a. *Digital tissue processor Leica^R*
- b. *Tissue blocking Leica^R EG-1160*
- c. Inkubator suhu 56⁰ C *Memmert^R*
- d. Mikrotom *Leica^R RM-2135*
- e. *Autostainer Leica-XL^R*
- f. Kaca obyek dan kaca penutup

4.6.7. Alat tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia:

- a. Pensil PAP
- b. *Waterbath*

- c. Tempat pewarnaan dan pencucian
- d. *Timer*
- e. Pipet serologic
- f. Kertas saring
- g. *Freezer*
- h. *Microwave Toshiba^R*
- i. Tabung plastic dan pipet *Ependorf*

4.6.8. Alat untuk pengukuran diameter tumor:

- Alat caliper tumor (CaliPro^R)

4.6.9. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah :

- 1 Unit *multi head microscope Olympus^R*
- *Nikon^R digital net camera DN 100 + SD card*
- 1 Unit personal computer *Intel Pentium^R processor*

4.7. Pelaksanaan penelitian

Cara perlakuan.

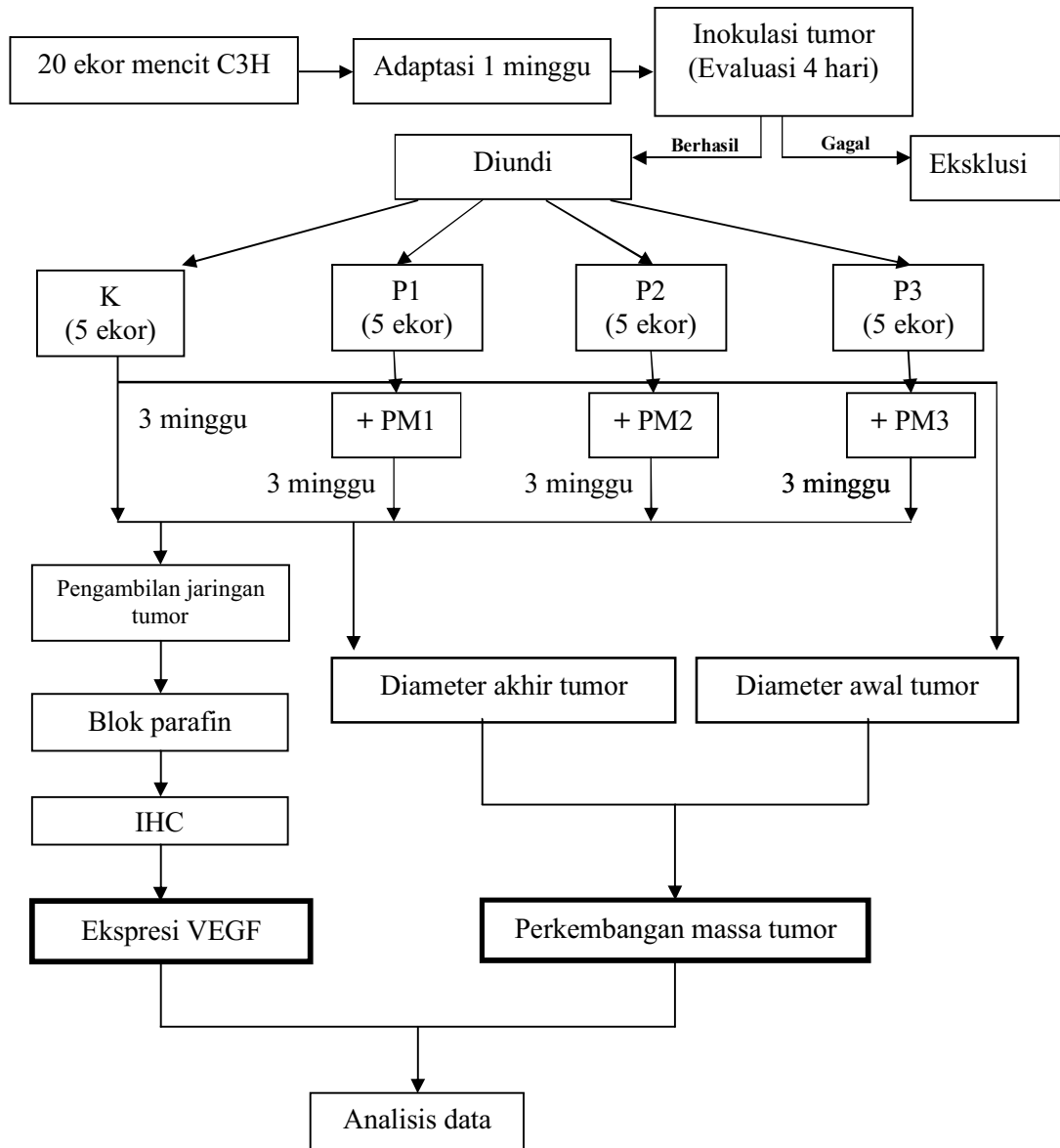
Dua puluh ekor mencit betina strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama 1 minggu secara *ad libitum*.

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 undian (kelompok K, P1, P2, P3). Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum *ad libitum* dan diukur diameter awal tumornya.

Kemudian diberikan perlakuan kepada kelompok P1, P2, P3. Perlakuan diberikan selama 3 minggu. Pemberian ekstrak kepada mencit dilakukan dengan pipet mikro. Sedangkan kelompok K tidak diberikan perlakuan.

Setelah perlakuan selesai, diameter tumor diukur kembali. Mencit di anestesi dengan ether selanjutnya mencit dibunuh dengan cara di dislokasi tulang lehernya, kemudian diambil jaringan tumor. Jaringan tumor diproses menjadi preparat histologik dengan pengecatan H&E dan IHC setelah dibuat blok paraffin.

4.8. Alur kerja



K = kelompok kontrol P2= kelompok perlakuan 2
 P1= kelompok perlakuan 1 P3= kelompok perlakuan 3

PM1=Ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,2mg/mL dosis 0,175 mL/hari
 PM2=Ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,2mg/mL dosis 0,36 mL/hari
 PM3=Ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,2mg/mL dosis 0,70 mL/hari

4.9. Prosedur penelitian

4.9.1. Prosedur transplantasi tumor

- a. Mencit donor dibius dengan eter, didislokasi leher 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.

4.9.2. Prosedur pengukuran diameter tumor

Massa tumor diukur menggunakan caliper (CaliPro^R) dengan ketepatan 10^{-2} . Kita ukur tumor pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi, sebelum dan sesudah pemberian ekstrak. Satuan ukurannya adalah cm.

4.9.3. Prosedur pembuatan preparat histopatologi teknik *Avidin-Biotin-peroxidase Complex (ABC)*

a. Fiksasi

Potongan adenokarsinoma dimasukkan dalam larutan formalin *buffer* (larutan formalin 10% dalam *buffer natrium phospat* sampai mencapai pH 7,0). 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 2 jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam.

d. *Embedding*.

Jaringan ditanam dalam paraffin yang mempunyai titik lebur 56-58⁰C, 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 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E – Mayer's.

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 70	1 menit	16. Xylol	1 menit
7. Air	1 menit		
8. H&E	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. Eosin (0,5%)–alcohol–asam asetat	1 menit		

f. Prosedur pewarnaan *monoclonal antibody anti VEGF (Mo Ab Anti VEGF)* ⁸⁵

Xylol I5-10 menit

Xylol I5-10 menit

Alkohol absolut10 menit

Alkohol 95%5-10 menit

Alkohol 70%5-10 menit

Cuci air (celup-celup)1-2 menit

Cuci dengan *phosphat buffer saline* (PBS) celup-celup...1-2 menit

Slide dimasukkan kedalam tempat yang lembab dan tertutup

H₂O₂ 0,3% dalam methanol 10 menit

Masuk rak berdiri.

Cuci PBS 3 kali @ 1-2 menit.

Slide ditata dalam wadah gelas.

Rendam dengan *citrat buffer*.

Masukkan dalam microwave 2 kali @ 5 menit (sampai mendidih).

Keluar dari microwave didiamkan sampai dingin selama 20-40 menit.

Slide ditata dirak.

Cuci PBS (celup-celup)2 menit

Slide ditata didalam tempat yang lembab dan tertutup.

Blocking agent (Kit)10 menit

Blocking agent dibuang (tanpa dicuci).

Inkubasi MoAb primer 10 ul (diencerkan pakai PBS-*bovine serum albumin* [BSA])overnight

Simpan dalam tempat lembab tertutup dan simpan dalam lemari es bawah supaya tidak mengering.

Cuci PBS (celup-celup) 10 menit

Cuci PBS2-3 menit

Streptavidin10 menit

Cuci PBS2-3 menit

Diaminobenzidine (DAB)3 menit

DAB dibuang.

Slide ditata pada rak.

Cuci air mengalir kemudian dicelup di tempat berisi aquadest (jaringan terlihat coklat).

Slide ditata dalam tempat.

Counterstain dengan H&E20'-1 menit

Hematoxylin dibuang, cuci air mengalir kemudian dicelup di aquadest.

Entellan kemudian tutup *deck glass*.

Ekspresi VEGF dilakukan dengan pengecatan IHC dihitung semua sel tumor yang berwarna coklat (mengekspresikan VEGF) per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x pada 5 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil rata-rata persentasenya. Penghitungan

dengan melihat preparat berurutan dari kiri ke kanan sesuai metoda Takao Kato. Penghitungan dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli patologi anatomi dengan *clinical agreement* 95%.⁸⁶

4.10. Analisis data

Data dikumpulkan kemudian dilakukan pengolahan. Analisis data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisis deskriptif, ekspresi VEGF dan perkembangan massa tumor adenokarsinoma mamma disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, dan boxplot.

Normalitas data diuji dengan uji normalitas Shapiro-Wilk. Perbedaan perkembangan massa tumor dan ekspresi VEGF antar kelompok diuji menggunakan uji *One Way ANOVA* karena data terdistribusi normal, dan dilakukan *post hoc test* Bonferroni. Uji korelasi antara variabel ekspresi VEGF dengan perkembangan massa tumor dilakukan dengan uji korelasi Pearsons.

Batas derajat kemaknaan adalah apabila variabel yang dianalisis mempunyai nilai $p \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Seluruh analisis data dilakukan dengan program komputer *statistical product and service solutions* (SPSS) *Ver. 15.0 for Windows*.^{87,88}

4.11. Etika penelitian

Pengelolaan hewan coba dalam penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Sebelum penelitian dilaksanakan, proposal telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP. Seluruh

hewan coba dirawat sesuai standar pemeliharaan hewan. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian dengan judul Pengaruh ekstrak mahkota dewa terhadap skor ekspresi perforin CTL dan sel NK serta indeks apoptosis pada adenokarsinoma mamma mencit C3H.