





## BAB IV

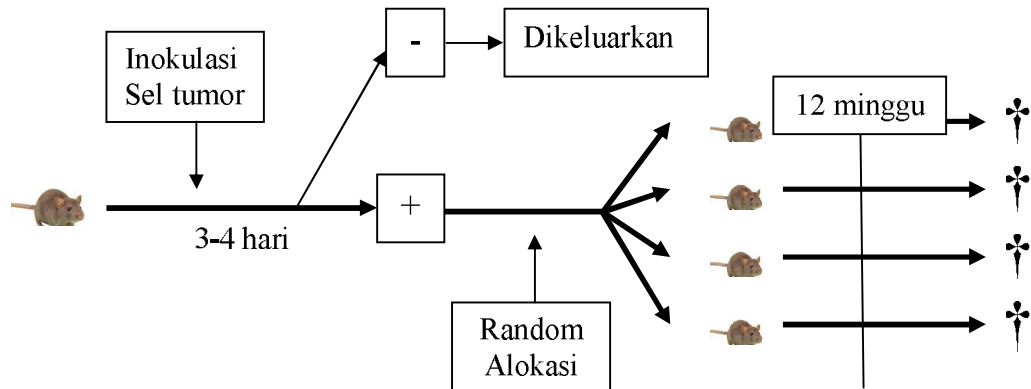
### METODE PENELITIAN

#### 4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan pretest – posttest dengan kelompok kontrol yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian, dilakukan random alokasi ke dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (K1), Perlakuan 1 (K2), Perlakuan 2 (K3) , Perlakuan 3 (K4) Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

|    |   |  |
|----|---|--|
| K1 |  | Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker.   |
| K2 |  | Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat Adriamycin, Cyclophosphamide  |
| K3 |  | Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Adriamycin, Cyclophosphamide, dan <i>Phaleria macrocarpa</i> 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari) |
| K4 |  | Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat Adriamycin, Cyclophosphamide, dan <i>Phaleria macrocarpa</i> 0,14 mg /hari (0,7 mL /hari)    |

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



## 4.2. POPULASI DAN SAMPEL

### 4.2.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit betina strain C3H yang berusia 8 minggu dengan berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi dan tidak ada abnormalitas anatomis, yang tidak sakit selama perlakuan dan yang berhasil diinokulasi tumor. Strain ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian kanker juga dapat diamati respon imunologiknya. Jenis kelamin mencit betina 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 perkuliahan. Adanya cedera ini akan menimbulkan kerancuan dalam menilai respon imunitasnya. Besar sampel tiap kelompok adalah 6 (enam) ekor.

#### 4.2.2. SAMPEL

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

Kriteria Inklusi:

- a. Mencit betina yang tumbuh tumor Adenocarcinoma Mamma.
- b. Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi.
- c. 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 untuk tiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10 %, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara ad libitum. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan. Selanjutnya mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara acak , masing-masing terdiri dari 6 ekor yaitu:

Kelompok K1 : 6 mencit

Kelompok K2 : 6 mencit

Kelompok K3 : 6 mencit.

Kelompok K4 : 6 mencit

#### **4.3. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN**

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 3 bulan. Perlakuan pada mencit dilakukan dilaboratorium Histologi FK UNDIP. Proses pembuatan blok parafin dilakukan dilaboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Pemeriksaan indeks apoptosis dilakukan dilaboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada Yogyakarta.

#### **4.4. VARIABEL PENELITIAN**

##### ***Variabel bebas***

Pemberian Adriamycin, Cyclophosphamide, dan Ekstrak *Phaleria macrocarpa*

##### ***Variabel tergantung***

Apoptosis, Masa tumor, serta leukosit dan trombosit

##### ***Definisi operasional***

1. Ekstrak *Phaleria macrocarpa* adalah ekstrak yang berasal dari daging buah *Phaleria macrocarpa* kering.
2. Indeks apoptosis adalah jumlah peristiwa apoptosis atau kematian sel yang dinyatakan sebagai rasio dari semua sel yang dihitung. Indeks apoptosis

dihitung sesuai dengan metoda *TUNEL Dead End Colorimetric (TDEC)*

dan dibaca peneliti setelah mendapat pelatihan dari ahli patologi anatomi

Skala variabel : rasio.

3. Perkembangan ukuran massa tumor payudara dihitung diameter tumornya sesuai hasil pengukuran dengan caliper tumor dengan satuan cm.

Skala variabel : cm

4. Jumlah leukosit diukur dengan metoda menghitung dalam kamar hitung dengan satuan /mm<sup>3</sup>.

Skala variabel : rasio.

5. Jumlah trombosit diukur dengan metoda Rees dan Ecker dengan satuan /mm<sup>3</sup>

Skala variabel : rasio.

#### **4.5. BAHAN DAN ALAT**

1. Mencit betina strain C3H dengan umur 3 bulan, berat 20 - 30 gram.
2. 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.
3. Cyclophosphamide dengan dosis yang diberikan 0,0156mg iv setiap 3 minggu sebanyak 4 siklus.
4. Adriamycin dengan dosis yang diberikan 0,013mg iv setiap 3 minggu sebanyak 4 siklus

5. *Phaleria macrocarpa* yang digunakan adalah Ekstrak *Phaleria macrocarpa*,

diperoleh dengan cara :

- a. Satu kilogram daging buah *Phaleria macrocarpa* yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50g) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.
- b. Hasil ekstrak dimasukkan dalam labu rotary evaporator dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C).
- c. Ekstrak dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 jam untuk menguapkan etanol.
- d. Didapatkan hasil 5,5 mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), yang mengandung *3,4,5-trihydroxybenzoic acid* 10%, dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2 mg/mL .

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram 1 x sehari<sup>44</sup>, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026<sup>52</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). Kami juga memberikan dosis 0,14 mg (0,7 mL)/hari.

**Bahan transplantasi jaringan tumor pada mencit.**

1. Alkohol 70 %
2. Larutan Garam fisiologik
3. Es batu
4. Mencit donor bertumor
5. Mencit resipien

**Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin.**

1. Formalin buffer 10%
2. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolute
3. Xylol
4. Parafin cair (Histoplast)
5. Albumin dan Poly-L-Lysine
6. Bahan pengecatan Hematoksilin-Eosin (HE)
7. Canada balsam dan Entelan

**Bahan untuk pemeriksaan apoptosis**

BioVision's Apo-BrdU-IHC Kit, two color TUNEL

**Bahan untuk pemeriksaan darah rutin.**

1. Darah mencit donor bertumor
2. Larutan Turk
3. Larutan Rees dan Ecker

**Alat transplantasi jaringan tumor pada mencit**

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm

3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Spuit 1cc
5. Jarum suntik trocar
6. Gunting lurus 10 Cm
7. Gunting bengkok 10 Cm
8. Pinset anatomi 10 Cm
9. Pinset biasa 12 Cm
10. Alas fiksasi

**Alat untuk menghitung jumlah leukosit dan trombosit:**

1. Mikroskop
2. Kaca obyek kamar hitung
3. Pipet darah leukosit dan trombosit

**Alat untuk mengukur masa tumor**

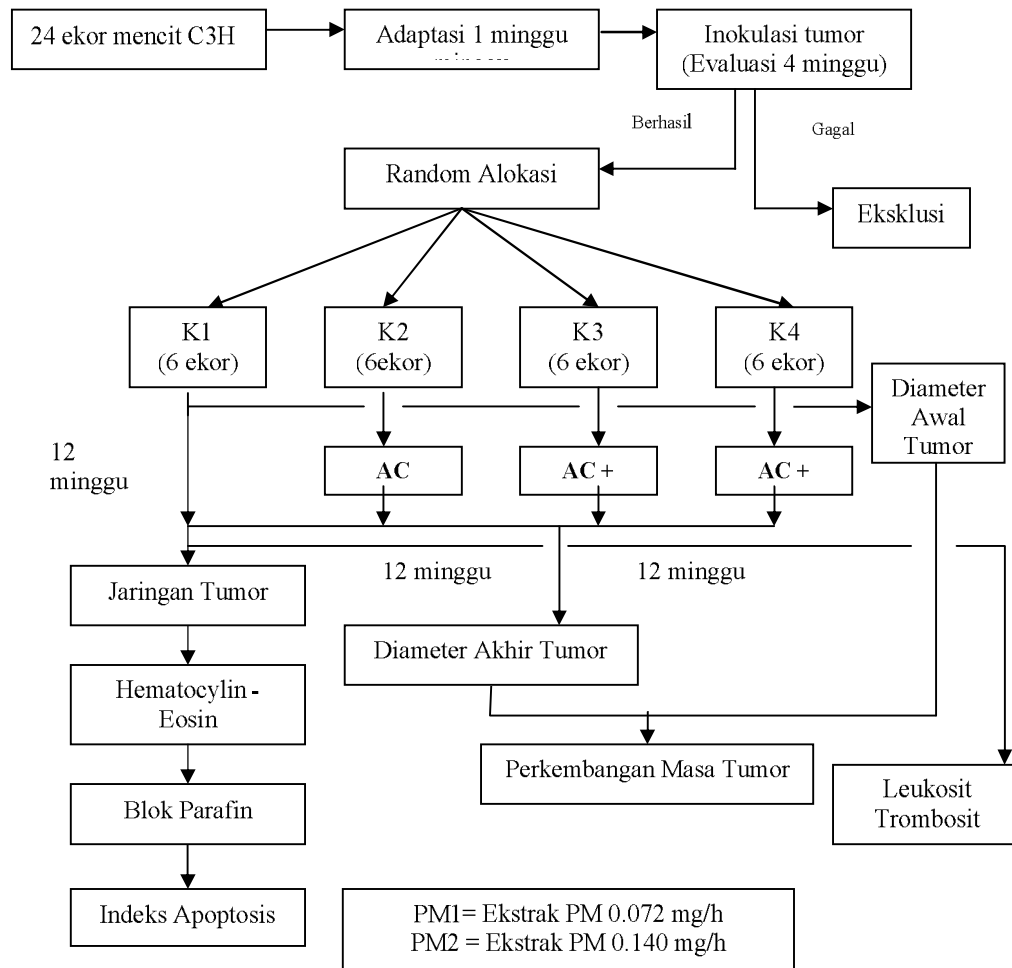
Caliper tumor dengan satuan cm.

**Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah**

1. 1 Unit *Multi Head Microscope Olympus<sup>R</sup>*
2. *Nikon<sup>R</sup> Digital Net Camera DN 100 + SD Card*
3. 1 Unit Personal Computer *Intel Pentium<sup>R</sup> Processor*



#### 4.6. ALUR KERJA



#### 4.8. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

##### Cara perlakuan

Dua puluh empat 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 empat ekor mencit tersebut kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari, dan jaringan tumor yang disuntikkan tidak mengalami regresi. Mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum ad libitum selama 3 minggu. Perlakuan yang diberikan sesuai alur kerja.

Kemudian mencit di anaestesi dengan ether, dibunuh dengan dislokasi vertebra cervical, dan diambil darah diambil dari plexus retroorbita dan jaringan tumornya. Jaringan tumor diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok paraffin.

#### **4.9. PROSEDUR – PROSEDUR LABORATORIUM**

##### **4.9.1. PROSEDUR TRANSPLANTASI TUMOR**

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
2. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
3. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
4. 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.

5. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
7. 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 PEMBUATAN PREPARAT HISTOLOGI**

##### **a. Fiksasi**

Potongan adenocarcinoma 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 adenocarcinoma 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.

e. Pemeriksaan Apoptosis

Tumor TACS insitu TUNEL-based kit TA5411 (R&D Sistem Eropa, Abingdon, Inggris) digunakan untuk mendeteksi apoptosis pada potongan blok parafin setebal 4 mikron. Potongan jaringan dari blok parafin ditempatkan pada slide, kemudian dideparafinasi dengan xylol (PA) 2 kali masing – masing selama 3 menit, direhidrasi dengan alkohol bertingkat (absolut 95%, 90%, 80%,70%) dan air masing – masing selama 5 menit. Slide dicuci dengan aquabides steril. Ditambahkan 50 ul *tunnel label mix* dengan TdT. Inkubasi 30 menit pada suhu 37°C dalam *chamber*. Slide dicuci 3 kali dengan PBS. Inkubasi slide dengan propidium iodide ( 1 ul/ml). Cuci dengan PBS 3 kali. Ditungkup dengan *cover slide* 18 mm kemudian diamati dibawah mikroskop *fluorescence*.

Indeks apoptosis dihitung sesuai dengan metoda yang digunakan oleh Aihara M et al, di mana badan apoptotik dihitung per 100 sel tumor dengan pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil rata-rata hasilnya. Lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri

lagi. Bila ada daerah nekrosis atau epitel kelenjar dihindari. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

#### **4.9.3. PROSEDUR PEMERIKSAAN LEUKOSIT**

Darah diencerkan dalam pipet leukosit, kemudian dimasukkan kedalam kamar hitung. Jumlah leukosit dihitung dalam volume tertentu; dengan mengenakan faktor konversi jumlah jumlah leukosit per  $\text{mm}^3$  darah dapat diperhitungkan.

Larutan pengencer ialah larutan Turk yang mempunyai susunan sebagai berikut : Larutan gentianviolet 1 % dalam air 1 ml, asam asetat glacial 1 ml, aqua dest ad 100 ml. Larutan disaring sebelum dipakai.

- a. Mengisi pipet leukosit .
  1. Darah ( kapiler, EDTA atau oxalate ) diisap sampai garis tanda 0,5 ml tepat.
  - 2 . Kelebihan darah yang melekat pada ujung pipet dihapus.
  3. ujung pipet dalam larutan Turk dimasukkan , sambil menahan darah pada garis – garis tadi. Pipet dipegang dengan sudut  $45^\circ$  , dan larutan Turk dihisap perlahan – lahan sampai garis tanda 11.
  4. Pipet dari cairan diangkat , tutup ujung pipet dengan ujung jari lalu lepaskan karet penghisap.
  5. Pipet dikocok selama 15 – 30 detik. Jika tidak segera akan dihitung, diletakkan dalam sikap horizontal.

b. Mengisi kamar hitung.

1. Kamar hitung yang bersih diletakkan dengan kaca penutupnya terpasang mendatar di atas meja.
2. Pipet yang diisi dikocok selama 3 menit terus menerus, dijaga jangan sampai ada cairan terbuang dari dalam pipet itu di waktu mengocok.
3. Semua cairan yang ada di dalam batang kapiler pipet ( 3 atau 4 tetes ) dibuang dan ujung pipet disentuh dengan sudut  $30^\circ$  pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Kamar hitung dibiarkan terisi cairan perlahan – lahan dengan daya kapilaritasnya sendiri.
4. Kamar hitung dibiarkan selama 2 atau 3 menit supaya leukosit dapat mengendap .

c. Menghitung jumlah sel.

1. Dengan memakai lensa obyektif kecil, yaitu dengan pembesaran 10 x. Lensa kondensor atau kecilkan diafragma diturunkan. Meja mikroskop harus datar sikapnya.
2. Kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah obyektif dan fokus mikroskop diarahkan kepada garis – garis bagi. Dengan sendirinya leukosit – leukosit jelas terlihat.
3. Semua leukosit yang terdapat dalam keempat “ bidang besar “ pada sudut – sudut “ seluruh permukaan yang dibagi “ dihitung.

a. Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kakanan , kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri, lalu turun lagi ke bawah dan dimulai lagi dari kiri ke kanan. Cara seperti ini dilakukan pada keempat “ bidang besar “.

b. Kadang – kadang ada sel – sel yang letaknya menyinggung garis batas sesuatu bidang. Sel – sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas, dihitung. Sebaliknya sel – sel yang menyinggung garis – garis batas sebelah kanan atau bawah, tidak dihitung.

d. Perhitungan.

Pengenceran yang terjadi dalam pipet ialah 20 kali. Jumlah semua sel yang dihitung dalam keempat bidang itu dibagi 4 menunjukkan jumlah leukosit dalam  $0,1 \text{ mm}^3$ . Angka tersebut dikalikan dengan 10 ( untuk tinggi ) dan 20 ( untuk pengenceran ) untuk mendapat jumlah leukosit dalam  $1 \text{ mm}^3$  darah. Secara singkat, jumlah sel yang dihitung dikalikan 50 = jumlah leukosit per  $\text{mm}^3$  darah.

#### **4.9.4. PROSEDUR PEMERIKSAAN TROMBOSIT**

Darah diencerkan dalam larutan Rees Eckerd dan jumlah trombosit dihitung dalam kamar hitung. Larutan Rees Ecker terdiri atas : natriumsitrat 3,8 g, larutan formaldehida 40 % 2 ml, brilliantcresylblue 30 ml, aqua dest ad 100 ml. Larutan harus disaring sebelum dipakai.

1. Cairan Rees Ecker dihisap kedalam pipet eritrosit sampai garis tanda “ 1 “ dan cairan tersebut dibuang.
2. Darah dihisap sampai garis tanda “ 0,5 “ dan cairan Rees Ecker sampai tanda “ 101 “ kemudian dikocok selama 3 menit.
3. Penghitungan jumlah trombosit sama seperti penghitungan jumlah leukosit dalam kamar hitung.
4. Biarkan kamar hitung yang telah diisi dengan sikap datar dalam cawan petri yang tertutup selama sepuluh menit agar trombosit mengendap.
5. Hitunglah semua trombosit dalam seluruh bidang besar ditengah – tengah ( 1 mm<sup>2</sup> ) memakai lensa obyektif yang besar.

Jumlah itu dikalikan 2.000 menghasilkan jumlah trombosit per mm<sup>3</sup> darah.

#### **4.10. CARA MENGUMPULKAN DATA**

Dari masing-masing kelompok diukur diameter tumor sebelum dan sesudah perlakuan, dengan cara menghitung ukuran diameter tumor menggunakan alat caliper tumor (CaliPro<sup>R</sup>), diukur pada diameter terbesar tumor. Alat ukur caliper dengan ketepatan sampai 10<sup>-2</sup>, diukurkan pada diameter yang paling lebar dengan pengukuran satu dimensi.

Darah diambil untuk pemeriksaan jumlah leukosit dan trombosit serta diambil massa tumornya setelah perlakuan dan selanjutnya dibuat preparat setebal 4 mikron, diwarnai dengan pengecatan TUNEL kemudian diamati Indeks Apoptosisnya.



#### **4.11. ANALISIS DATA**

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan Shapiro-Wilk test didapatkan distribusi data normal dan homogen. Analisis statistik untuk uji beda mean variabel Indeks apoptosis dan ukuran tumor menggunakan One way ANOVA, yang dilanjutkan dengan Post Hoc Test. Uji korelasi dengan *Pearson* test dilakukan terhadap keempat kelompok perlakuan. Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $P \leq 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer.

#### **4.12. ETIKA PENELITIAN**

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti animal ethics. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya.

Penelitian ini dimintakan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RS Dr. Kariadi Semarang untuk mendapatkan Ethical Clearance.