

BAB IV

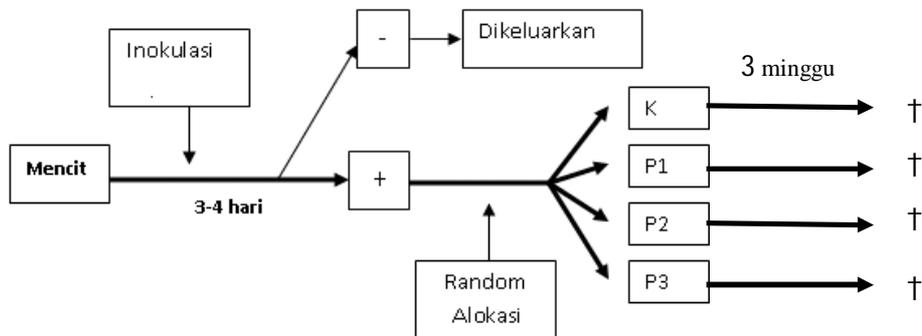
METODE PENELITIAN

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) , Perlakuan 3 (P3) Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat NS 0,175 mL/hari
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat NS 0,36 mL/hari
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat NS 0,7 mL/hari

Skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 6: Skema rancangan penelitian

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 berusia 3 bulan
- b. Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi dan
- c. Tidak ada abnormalitas anatomis.

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 dengan cadangan 10% tiap kelompok, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit.

Randomisasi: 24 mencit yang sudah berhasil diinokulasi dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 6 mencit

Kelompok P1 : 6 mencit

Kelompok P2 : 6 mencit.

Kelompok P3 : 6 mencit

4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 2 bulan. Perlakuan pada mencit dan proses pengambilan jaringan dilakukan di Laboratorium Histologi FK Universitas Indonesia, proses pembuatan blok 28lympus28 sampai pewarnaan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Gajah Mada / RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah pemberian dosis bertingkat ekstrak *Nigella sativa*.

4.4.2. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah : jumlah sel T CD 4⁺ dan sel T CD 8⁺ jaringan kanker

4.4.3. Definisi operasional

1. Ekstrak NS adalah ekstrak yang berasal dari biji *Nigella sativa*, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi diberikan dengan dosis bertingkat 0,175 mL/hari, 0,36 mL/hari dan 0,7 mL/hari, hasil skala variabel : rasio
2. Jumlah sel T CD4⁺ dinilai dengan skor histologi dengan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan monoklonal antibodi sel T CD4⁺ dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada preparat eksisi biopsi jaringan tumor pada minggu ke-3. Dengan mikroskop olympus seri BX 41 yang dilengkapi kamera digital DP-70 dengan pembesaran 400X. Masing-masing sediaan diteliti sebanyak lima lapang pandang dan nilai dari setiap lapang pandang yang akan dihitung sel limfosit yang tampak ekspresi coklat pada sitoplasma dan membrane limfosit sebagai nilai histoskor untuk memperoleh ekspresi sel T CD4⁺ .
3. Jumlah sel T CD8⁺ dinilai dengan skor histologi dengan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan monoklonal antibodi sel T CD8⁺ dengan pewarnaan metode streptavidin-biotin pada preparat eksisi biopsi jaringan tumor pada minggu ke-3. Dengan mikroskop olympus seri BX 41 yang dilengkapi kamera digital DP-70 dengan pembesaran 400X. Masing-masing sediaan diteliti sebanyak lima lapang pandang dan nilai dari setiap lapang pandang yang akan dihitung sel limfosit yang tampak ekspresi coklat pada sitoplasma dan membrane limfosit sebagai nilai histoskor untuk memperoleh ekspresi sel T CD8⁺ .

4.5. Bahan dan alat penelitian

4.5.1 Bahan untuk perlakuan

Hewan coba adalah mencit betina strain C3H dengan umur 3 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 diinsisi biopsi dan dilakukan pemeriksaan histologi untuk mengkonfirmasi jenis tumornya.

NS yang digunakan adalah Ekstrak *Nigella sativa*, diperoleh dengan cara :

- 1 kg *Nigella sativa* 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.

Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk biji 5 gram 1 x sehari⁸, dikalikan konstanta uji

terapi pada hewan coba (mencit) yaitu $0,0026^{20}$ 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 Hematosiklin eosin
- f. Canada balsam dan Entelan

4.5.4. 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. Alas fiksasi

4.5.5. 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*

4.6. Pelaksanaan penelitian

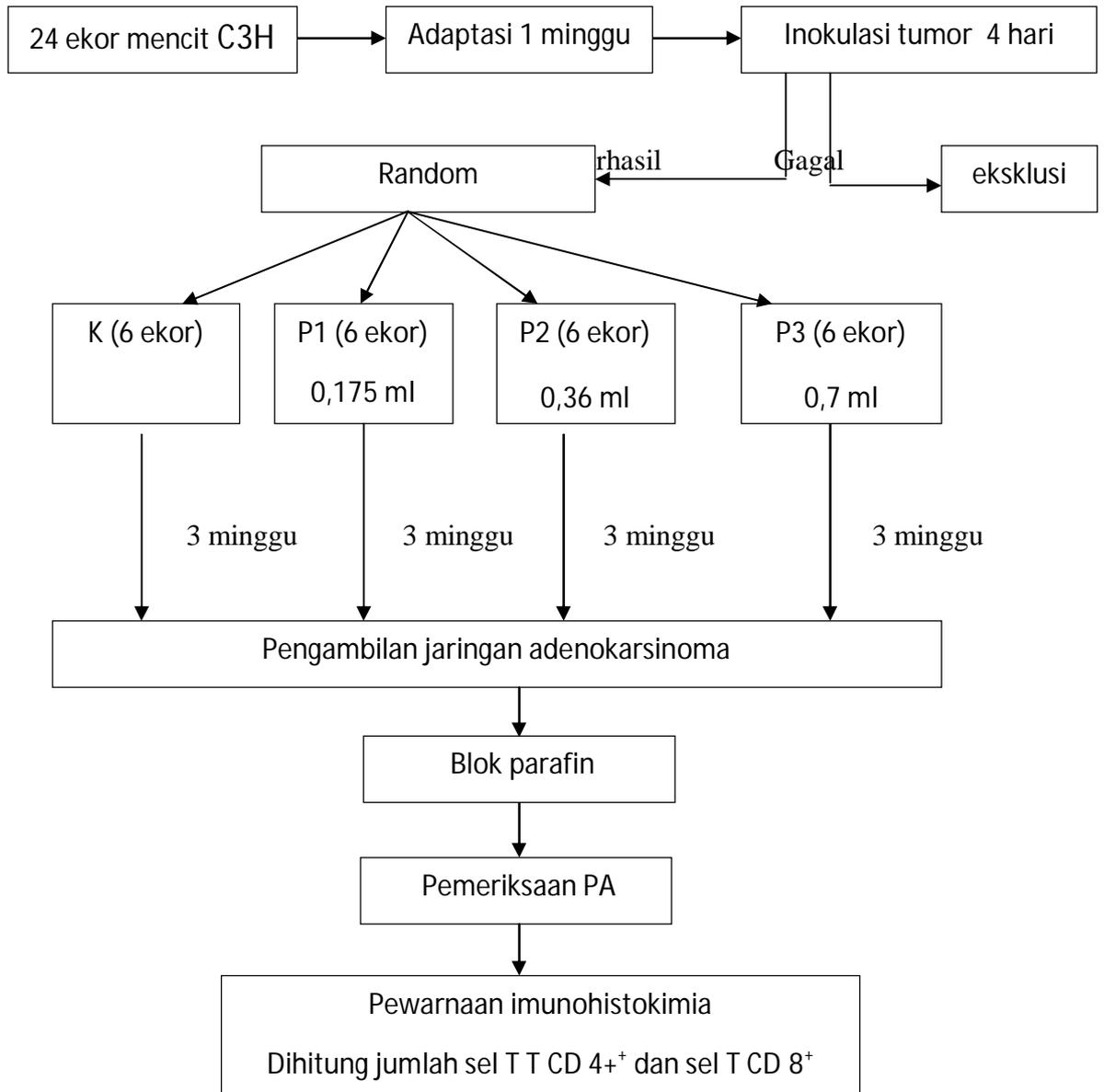
Cara perlakuan

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. Pada kelompok mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum *ad libitum*. Kemudian diberikan perlakuan, perlakuan yang diberikan selama 3 minggu, dan pemberian ekstrak dilakukan dengan pipet mikro.

Setelah perlakuan selesai, 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



Gambar 7. Alur kerja

4.8. Prosedur penelitian

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 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-xylool selama 1 jam dan kemudian larutan xylool 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 56-58⁰C, 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 incubator suhu 56-58⁰C sampai paraffin mencair.

e. Pewarnaan jaringan dengan IHC untuk sel T CD 4⁺

1. Deparafinisasi jaringan dengan dihangatkan selama 3 menit
2. Hidrasi dengan gradasi Alkohol (100%, 95%, 70%) , kemudian cuci dengan air murni
3. Tambahkan 4 tetes H₂O₂ 3 % dalam methanol selama 15- 20 menit
4. Panaskan slide dengan direbus dalam buffer sitrat selama 20 menit, cuci dengan air
5. Cuci dengan 50 M Tris – HCl selama 5 menit
6. Cuci dengan 1 % BSA – PBS selama 30 menit
7. Inkubasi primer Ab CD4⁺ selama 1 jam
8. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 2 menit, 2 X
9. Inkubasi dengan Ab Sekunder selama 15 menit
10. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 2 menit
11. Teteskan 4 tetes Streptavidin HRP. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan
12. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 2 menit
13. Teteskan 4 tetes DAB chromogen substrat, tunggu 3-5 menit
14. Cuci dengan air murni
15. Couterstain Hematoksilin selama 1 menit, cuci dengan air
16. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 1 menit
17. Cuci dengan air murni

18. Dehidrasi dengan alkohol 100 % dan bersihkan dengan xylene

19. Mounting dengan Entelan

f. Pewarnaan jaringan dengan IHC untuk sel T CD 8⁺

1. Deparafinisasi jaringan dengan dihangatkan selama 3 menit
2. Hidrasi dengan gradasi Alkohol (100%, 95%, 70%) , kemudian cuci dengan air murni
3. Tambahkan 4 tetes H₂O₂ 3 % dalam methanol selama 15- 20 menit
4. Panaskan slide dengan direbus dalam buffer sitrat selama 20 menit, cuci dengan air
5. Cuci dengan 50 M Tris – HCl selama 5 menit
6. Cuci dengan 1 % BSA – PBS selama 30 menit
7. Inkubasi primer Ab CD 8⁺ selama 1 jam
8. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 2 menit, 2 X
9. Inkubasi dengan Ab Sekunder selama 15 menit
10. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 2 menit
11. Teteskan 4 tetes Streptavidin HRP. Inkubasi selama 10 menit pada suhu ruangan
12. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 2 menit
13. Teteskan 4 tetes DAB chromogen substrat, tunggu 3-5 menit
14. Cuci dengan air murni
15. Counterstain Hematoksilin selama 1 menit, cuci dengan air
16. Cuci dengan 1X PBS buffer selama 1 menit
17. Cuci dengan air murni

18. Dehidrasi dengan alkohol 100 % dan bersihkan dengan xylene

19. Mountain dengan Entelan

4.9. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Analisa deskriptif jumlah limfosit sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺, disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik box plot.

Normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Data berdistribusi normal kemudian dilakukan uji *One Way Anova* untuk melihat adanya perbedaan dalam kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan antar kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Bonferroni*. Untuk melihat adanya korelasi antara sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺, dianalisis dengan menggunakan uji korelasi *Pearson's product moment* (distribusi normal). Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p \leq 0,05$.

4.10. Persyaratan Etik

Penelitian ini mengikuti animal ethics dalam mengelola hewan coba. Sebelum melaksanakan penelitian, proposal telah disetujui Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP. Seluruh hewan coba dirawat sesuai standar pemeliharaan hewan. *Ethical Clearance* no. 294/EC/FK/RSDK/2012.