

BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1. Disain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan pendekatan “*post test only control group design*” yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Terdapat empat kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) dengan pembagian sebagai berikut :

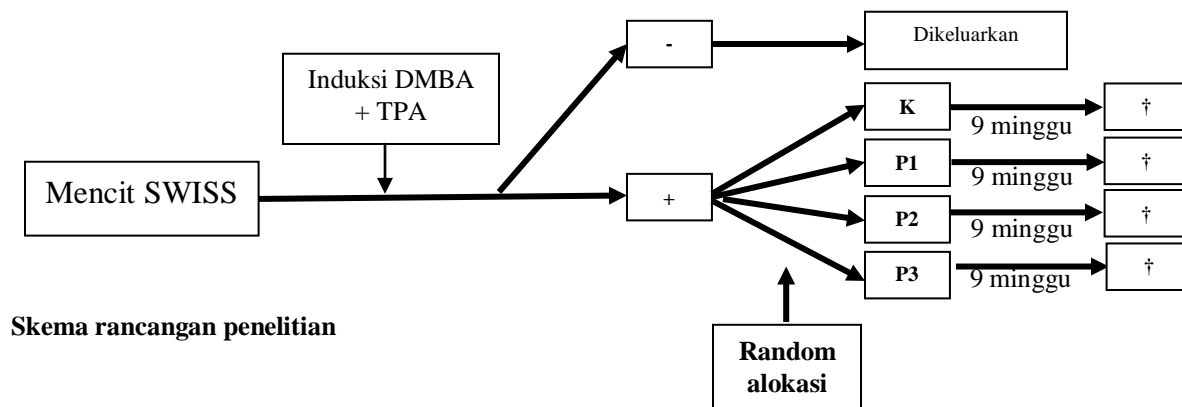
K : kelompok mencit yang setelah tumbuh tumor kulit, tidak mendapatkan perlakuan apapun.

P1: kelompok perlakuan 1, mencit yang setelah tumbuh tumor kulit mendapat *Phaleria Macrocarpa* 0,0715 mg (0,36 ml/hari)

P2: kelompok perlakuan 2, mencit yang setelah tumbuh tumor kulit mendapat kemoterapi paclitaxel 175 mg/m² dan cisplatin 50 mg/m²

P3: kelompok perlakuan 3, mencit yang setelah tumbuh tumor kulit mendapat sitostatika paclitaxel 175 mg/m² dan cisplatin 50 mg/m² dan dikombinasikan dengan *Phaleria Macrocarpa* 0,0715 mg (0,36ml/hari)

Skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



4.2. Populasi dan Sampel

Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan strain SWISS dengan umur 8-9 minggu, strain ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian kanker juga dapat diamati respon imunologiknya. Digunakan mencit jantan untuk menghindari faktor hormonal, dimana pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa adanya faktor protektif pada estrogen endogen terhadap paparan zat kimia yang dapat menginduksi terjadinya karsinoma epidermoid pada kulit. Penggunaan mencit umur 8-9 minggu oleh karena dalam umur tersebut mencit mengalami fase istirahat dalam pertumbuhan rambutnya.

Sampel Penelitian

Hewan coba adalah Mencit SWISS usia 8-9 minggu, dengan berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi dan tidak ada abnormalitas anatomis. Mencit SWISS ini diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Coba (UPHP) Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada.

Kriteria inklusi :

1. Mencit jantan strain SWISS
2. Anatomi normal
3. Berat badan 20 – 30 gram setelah aklimatisasi.
4. Umur 8 – 9 minggu.
5. Hasil histopatologis : karsinoma sel skuamosa kulit
6. Tikus aktif dan nafsu makan baik

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 10% (1 ekor).⁽⁴⁰⁾ Jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok yaitu 6 ekor mencit.

Sebelum digunakan dalam penelitian, 20 ekor mencit dan 4 ekor mencit cadangan 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 K : 6 mencit

Kelompok P1 : 6 mencit

Kelompok P2 : 6 mencit

Kelompok P3 : 6 mencit

4.3. Lokasi Penelitian

Pemeliharaan mencit SWISS , induksi sel tumor , pemberian kemoterapi dan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dilakukan di LPPT (Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, proses pembuatan blok paraffin dan pewarnaan IHC di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas

1. Pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa*
2. Pemberian Kemoterapi Paclitaxel-Cisplatin
3. Pemberian kombinasi antara ekstrak *Phaleria macrocarpa* dan Kemoterapi Paclitaxel-Cisplatin.

Variabel tergantung

1. IFN γ
2. Sebaran sel mononuklear disekitar sel kanker

Definisi operasional

No	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	Ekstrak <i>Phaleria Macrocarpa</i>	Ekstrak yang berasal dari daging buah kering, yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi, dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,2 mg/ml. Dan ekstrak tersebut diencerkan sehingga didapatkan kadar <i>Phaleria Macrocarpa</i> 0,0715mg/0,5cc dan diberikan sebanyak 0,5cc melalui sonde setiap hari selama 9 minggu.	Nominal
2	Kemoterapi Paclitaxel-Cisplatin	Dosis Paclitaxel 175mg/kgBB dan Cisplatin 50mg/kgBB dengan BSA 0,024. Hasil	Nominal

		<p>tersebut dikonversi dengan dikalikan 0,0026. Sehingga didapatkan kebutuhan Paclitaxel 0,01mg dan Cisplatin 0,003mg. Keduanya diencerkan dalam 100cc NaCl 0,9%, kemudian disuntikkan melalui IV. Dari 1 vial Paclitaxel diambil 0,17cc sebanding dengan 0,01mg dimasukkan kedalam 100cc NaCl 0,9% yang telah dibuang 1cc. Dari 1 vial Cisplatin diambil 0,3cc sebanding dengan 0,003mg dimasukkan kedalam 100cc NaCl 0,9% yang telah dibuang 1cc. Kemudian masing-masing dari kedua rejimen tersebut diambil sebanyak 1cc dari NaCl 0,9% 100cc dan disuntikkan secara IV pada ekor mencit SWISS.</p>	
3.	Kadar IFN- γ	<p>Mengukurnya dengan menggunakan metode imunohistokimia yaitu dengan menghitung jumlah sel yang memberikan reaksi positif terhadap anti IFN-γ</p>	Rasio
4.	Sebukan sel mononuklear	<p>Diperiksa secara patologi anatomi. Sebukan mononuklear sekitar kelompok sel karsinoma epidermoid dilihat dibawah</p>	Rasio

		mikroskop dengan pembesaran 400x dan dihitung persentase jumlah sel mononuklear tiap lapangan pandang besar.	
--	--	--	--

Tabel 2. Definisi Operasional

5.5. Bahan dan Alat Penelitian

- Mencit jantan strain SWISS dengan umur 8 – 9 minggu, berat badan 20-30 gram.
- Karsinoma epidermoid diinduksi pada kulit mencit dengan cara mencukur bersih rambut area interscapular dengan ukuran 1,5 x 1,5 cm. Karsinogen yang digunakan adalah 9, 12-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) 100 nmol (0,025 mg), yang dilarutkan dalam 0,1 ml reagen aseton per ekor mencit. DMBA dioleskan 2 kali perminggu selama 2 minggu, kemudian dilanjutkan dengan pengolesan 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) secara topikal pada regio interscapular dengan dosis 1,7 nmol (0,001 mg) dalam 0,1 ml aceton per ekor mencit 2x per minggu selama 34 minggu.
- *Phaleria macrocarpa* yang digunakan adalah ekstrak *Phaleria macrocarpa*, diperoleh dengan cara :
 - a) 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.
 - b) Hasil ekstrak dimasukkan ke dalam labu rotary evaporator dan dilakukan destilasi

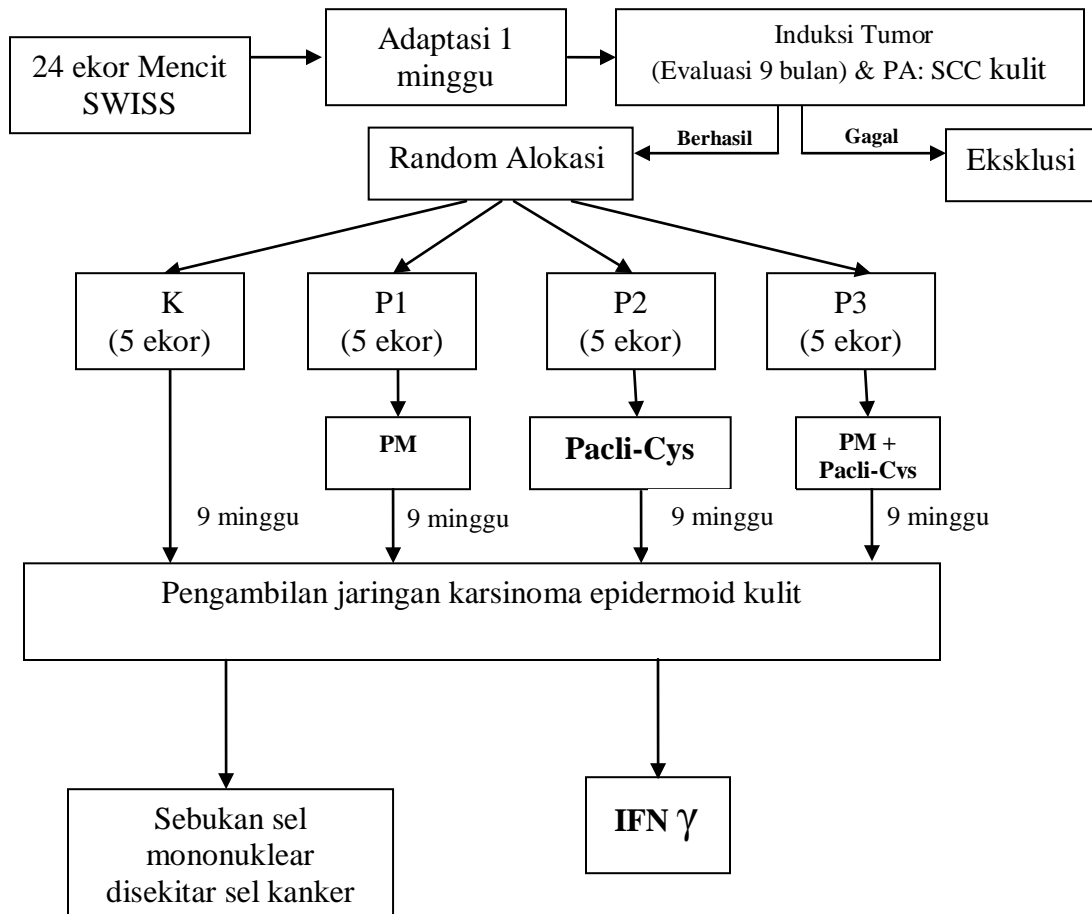
vakum hingga menjadi pekat (suhu 40°C) sampai diperoleh “crude” ekstrak.

- c) Didapatkan hasil 5,5 mg ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55 %) dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2 mg/ml
- d) Dosis yang digunakan adalah dosis pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram 1 x sehari, dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026 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).
- e) Ekstrak *Phaleria Macrocarpa* kemudian diberikan secara oral, sebanyak 3 kali (satu x per tiga minggu)

- Protokol pemberian kemoterapi *Cysplatin* dan *Paclitaxel*

- a) Timbang berat badan dan panjang mencit SWISS, kemudian hitung Body Surface Area (BSA) yaitu berat badan / (panjang²) mencit SWISS.
- b) Dosis Cisplatin : 50mg / BSA , dan dosis Paclitaxel : 175mg / BSA
- c) Dosis konversi : 0,0026 x dosis Cisplatin & Paclitaxel
- d) Kemudian Cysplatin dan Paclitaxel diberikan secara intravena pada ekor mencit SWISS
- e) Kemoterapi diberikan selama 3 siklus dengan interval 3 minggu

Alur Kerja



4.6. Bahan dan Pemeriksaan Tumor

Bahan & cara untuk pemeriksaan sebukan sel mononuklear secara histopatologis :

- Bahan :
 1. Formaldehid 10%
 2. Ethanol 70 %
 3. Ethanol 80%
 4. Ethanol 90%

5. Larutan Xylol
 6. Paraffin wax
 7. Mikrotom
 8. Albumin
- Cara kerja
 1. Jaringan tumor yang telah dipindahkan dari Mencit difiksasi dengan formaldehid 10 % selama 24 jam pada suhu kamar.
 2. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam ethanol 70% selama 1,5 jam pada suhu kamar
 3. Jaringan dimasukkan ke dalam ethanol 80% selama 1,5 jam pada suhu kamar
 4. Jaringan dimasukkan ke dalam ethanol 90% selama 1,5 jam pada suhu kamar
 5. Setelah proses dehidrasi, jaringan tumor dipindahkan ke dalam larutan xylol sehingga bersih
 6. Jaringan ditempatkan pada parafin wax
 7. Jaringan dipotong dengan mikrotom
 8. Slide dimountain dengan albumin
 9. Dilakukan pengecatan dengan hematoxilin eosin
 10. Dilakukan pembacaan dengan mikroskop dengan pembesaran 400x

Bahan & cara untuk pemeriksaan IFN- γ dengan pewarnaan imunohistokimia :

- Bahan :
 1. Mouse monoclonal Ig.G1 (anti IFN- γ)
 2. H₂O₂ 3%

3. Buffer citrat (Ph 6)
 4. Background Sniper
 5. Trekkie universal link
 6. Trekkie avidin HRP
 7. Betazoid DAB Substrat (1:50)
 8. Hematoxylin mayer
 9. Alkohol 70%, 96%, 100%, Xylol.
- Cara kerja :
 1. Jaringan blok parafin dipotong dengan ketebalan 3 mikron. Letakkan diatas obyek glass Poly L Lysin.
 2. Letakkan obyek glass di inkubator suhu 45 derajat Celsius ,biarkan semalam.
 3. Diparafinisasi.
 4. Cuci dengan air kran mengalir,cuci aguadest.
 5. Inkubasi dengan H₂O₂ 3% selama 15 menit.
 6. Cuci dengan air kran mengalir.Cuci dengan aquadest.
 7. Retrivel dengan buffer citrat Ph 6 selama 45 menit pada 95 derajat celcius dengan Decloaking.
 8. Dinginkan kurang lebih selama 30 menit.
 9. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
 10. Inkubasi dengan Background Sniper selama 15 menit.
 11. Tiriskan,bersihkan tepi2nya.
 12. Inkubasi dengan IFN- γ mouse monoclonal Ig G1 dengan pengenceran 1: 300 ,
biarkan selama 1 jam.

13. Cuci PBS 2x selama 3-5 menit.
14. Inkubasi dengan trekkie universal link selama 20 menit.
15. Cuci PBS 2x selama 3 - 5 menit.
16. Inkubasi dengan trekkie avidin HRP selama 10 menit.
17. Cuci PBS 2x selama 3 - 5 menit.
18. Teteskan Betazoid DAB Substrat (1:50) , biarkan selama 2 menit.
19. Cuci air
20. Counterstain dengan Hematoxylin mayer 2 menit.
21. Cuci air.
22. Celupkan ke Alkohol bertingkat 70%, 96%, 100% dan Xylol
23. Mounting
24. Dilakukan pembacaan dengan mikroskop dengan pembesaran 400x

4.7. Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan *tabulasi*. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif Ekspresi IFN- γ dan sebulan sel mononuklear sekitar tumor epidermoid disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, dan median.

Syarat dari uji parametrik adalah (1) Masalah skala pengukuran variabel harus numerik, (2) Distribusi data harus normal dan (3) Varians data wajib sama pada > 2 kelompok tidak berpasangan.

Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. Jika uji *Shapiro-Wilk* menghasilkan $p > 0,05$ maka distribusi data yang didapat

adalah normal. Untuk mengetahui 4 kelompok data mempunyai varian yang sama atau tidak dilakukan Uji *varians levene's test*. Jika uji varian menghasilkan $p > 0,05$ maka varian dari data yang diuji adalah sama.

Untuk analisa komparatif antara variabel bebas dengan variabel tergantung dapat dilakukan uji *one way ANOVA* (jika syarat analisis parametrik terpenuhi) atau Uji *Kruskal-Wallis* (jika syarat analisis parametrik tidak terpenuhi). Dan jika hasil dari uji *one way ANOVA* atau Uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil $p < 0,05$ maka untuk mengetahui besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test (parametrik)* atau *Mann Whitney (nonparametrik)*.

Untuk analisa korelasi antara variabel ekspresi IFN- γ dengan sebulan sel mononuklear dilakukan uji korelasi *Pearsons* (jika syarat analisis parametrik terpenuhi) atau uji korelasi *Spearman* (jika syarat analisis parametrik tidak terpenuhi).

Batas derajat kemaknaan apabila $P \leq 0,05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan software SPSS Ver 15 for Windows.