

BAB 4

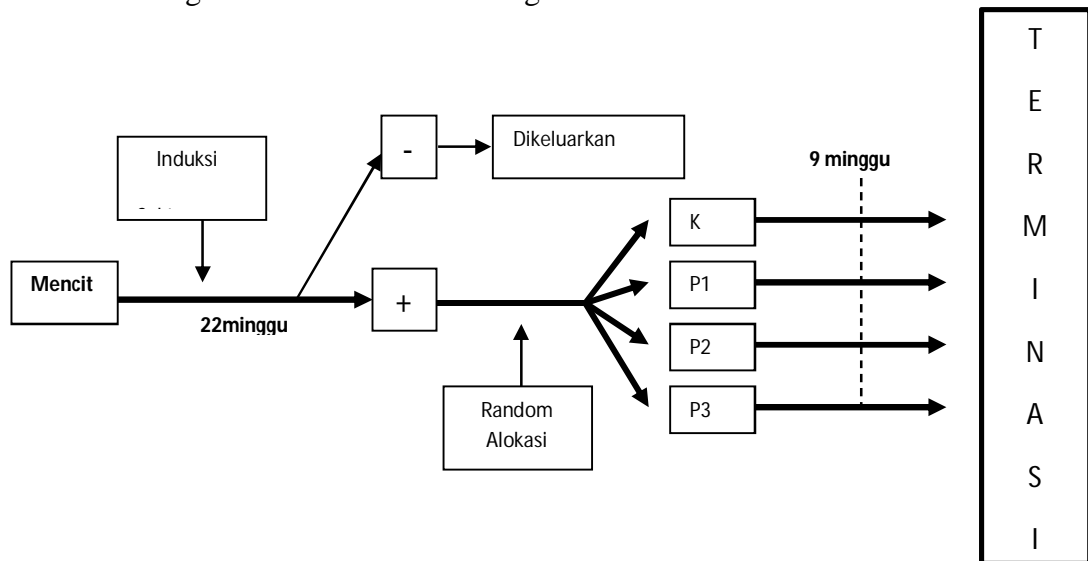
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dengan pendekatan “*pre and the 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 diinduksi karsinoma epidermoid.
- P1 : kelompok perlakuan 1, mencit yang diinduksi karsinoma epidermoid, setelah timbul tumor mendapat *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg (0,36 ml/hari).
- P2 : kelompok perlakuan 2, mencit yang diinduksi karsinoma epidermoid, setelah timbul tumor mendapat sitostatika Paclitaxel 175 mg/m² dan cisplatin 50 mg/m².
- P3 : kelompok perlakuan 3, mencit yang diinduksi karsinoma epidermoid, setelah timbul tumor mendapat sitostatika Paclitaxel 175 mg/m² dan cisplatin 50 mg/m² dan dikombinasikan dengan *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg (0,36 ml/hari).

Skema Rancangan Penelitian adalah sebagai berikut :



4.2 Populasi dan sampel

4.2.1 Populasi

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. Penggunaan mencit umur 8-9 minggu oleh karena dalam umur tersebut mencit mengalami fase istirahat dalam pertumbuhan rambutnya.

4.2.2 Sampel

Hewan coba adalah mencit jantan strain Swiss yang diperoleh dari laboratorium LPPT (Lembaga Penelitian dan Pengujian terpadu) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Kriteria inklusi :

1. Mencit jantan strain Swiss.

2. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.
3. Berat badan 20 – 30 gram setelah aklimatisasi.
4. Umur 8 – 9 minggu.

Kriteria eksklusi :

1. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan induksi.

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 10% (1 ekor).²⁸ 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. Kemudian mencit yang tumbuh tumor dilakukan biopsi dan pemeriksaan patologi anatomi, dan selanjutnya mencit yang telah tumbuh karsinoma epidermoid 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 Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan 2 kali sesuai dengan siklus kemoterapi selama 3 siklus dengan interval siklus 3 minggu. Kemoterapi dan pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa* dilakukan di laboratorium LPPT (Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, proses pembuatan blok parafin dan pewarnaan HE di Laboratorium Patologi anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas :

1. Pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa*, Paclitaxel dan Cisplatin

4.4.2 Variabel Tergantung :

1. Indek mitosis
2. Perkembangan diameter tumor, diukur diameter tumor sebelum dan sesudah perlakuan selesai dengan menggunakan alat pengukur diameter tumor (caliper)

4.5 Definisi operasional :

Tabel 2. Definisi operasional

No	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	Ekstrak Mahkota Dewa	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.	Nominal dengan 4 kategori
2.	Indek mitosis	dihitung sesuai dengan metode yang digunakan oleh Aihara M et al, dimana sediaan tumor yang dilakukan pengecatan dengan Hematoxylin Eosin dihitung jumlah sel yang sedang mengalami mitosis per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400x, pada 5 lapangan pandang dari tiap preparat dalam satu blok parrafin, kemudian diambil nilai rata – ratanya. Satuannya adalah persen. Cara pembacaan : preparat dibaca mulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah	Rasio

		<p>mulai dari kiri lagi berurutan.</p> <p>Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan seorang ahli patologi anatomi dengan Clinical agreement 95 %.</p>	
3.	Perkembangan diameter tumor	<p>didapat dengan menghitung ukuran diameter tumor menggunakan alat caliper tumor (CaliPror), diukur pada diameter terbesar tumor. Alat ukur caliper dengan ketepatan sampai 10⁻², kita ukurkan pada diameter yang paling lebar dengan pengukuran satu dimensi, sebelum dan sesudah perlakuan. Satuan ukuran adalah centimeter. Untuk melakukan identifikasi terhadap perbedaan perkembangan diameter tumor, pada mencit di setiap kelompok perlakuan dilakukan penandaan menggunakan asam pikrat berwarna kuning pada area kepala, kaki depan, kaki belakang, ekor, dan tanpa tanda.</p>	Rasio

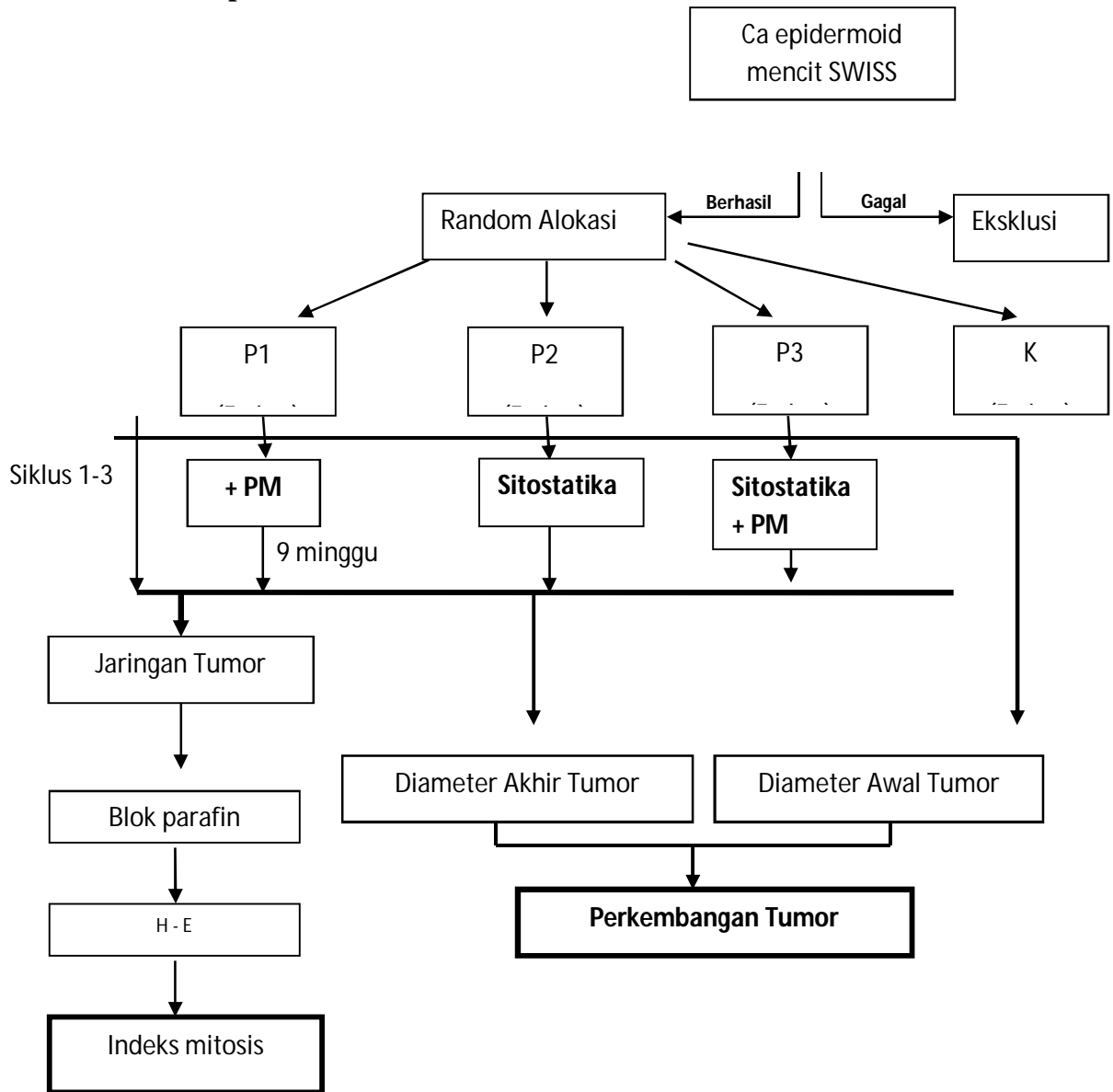
4.6 Bahan dan Alat

- 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 acetone per ekor mencit 2 x seminggu selama 22 minggu.²⁹
- *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)
 - 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 %) dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2 mg/ml
- e. 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).
- Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin :
 - a. Formalin buffer 10 %
 - b. Alkohol 50%, 70 %, 80 %, 96 %, absolute
 - c. Xylol
 - d. Paraffin cair (histoplast)
 - e. Albumin dan Poly-L-Lysine
 - f. Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE)
 - g. Canada balsam dan Entelan
 - Kemoterapi Paclitaxel-Cisplatin diberikan dengan dosis Paclitaxel 175mg/m^2 dan Cisplatin 50mg/m^2 dengan BSA 0,024. Hasil 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 intra vena. 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.

4.7 Skema penelitian



PM = ditambahkan ekstrak *phaleria macrocarpa*

4.8 Prosedur Pemeriksaan

4.8.1 Prosedur pemeriksaan tumor

1. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan di atas es
2. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil 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 di cawan petri kecil lainnya.
3. Fiksasi : potongan tumor dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10 % dalam buffer natrium asetat sampai mencapai pH 7) selama 18-24 jam. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam aquadest selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.
4. Dehidrasi : potongan karsinoma epidermoid dimasukkan ke dalam larutan alkohol – xylool selama 1 jam dan kemudian larutan xylool murni selama 2x2 jam
5. Impregnasi : jaringan dimasukkan dalam parrafin cair selama 2x2 jam
6. Embedding :jaringan ditanam dalam parrafin padat yang mempunyai titik lebur 56-580 C, ditunggu sampai parrafin padat. Jaringan dalam parrafin 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 56-580 C sampai parrafin mencair.

7. Pewarnaan jaringan dengan H&E

4.9 Cara pengumpulan data

Pengukuran diameter tumor pada setiap kelompok dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan dan diambil massa tumornya setelah perlakuan.

Tumor dari setiap kelompok dibuat preparat, diwarnai dengan pengcatan HE kemudian diamati indek mitosisnya. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus^R dengan pembesaran 400 x dan dilakukan dengan penghitungan indek mitosis oleh peneliti dalam pendampingan seorang ahli patologi anatomi dan oleh satu orang ahli patologi anatomi lainnya.

4.10 Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan data cleaning, coding dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif indeks mitosis dan perkembangan tumor epidermoid disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median, dan grafik garis.

Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test* didapatkan Data yang didapat mempunyai distribusi yang normal dan homogen, tetapi karena syarat uji parametrik tidak terpenuhi maka uji selanjutnya dengan menggunakan uji non parametrik

Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan Mann Whitney pada variabel perkembangan diameter tumor. Sedangkan pada variabel indeks mitosis dilakukan uji *Mann Whitney*. Untuk uji korelasi antara variabel indeks mitosis dengan ukuran diameter tumor setelah perlakuan diuji dengan uji korelasi *Spearman*.

Batas derajat kemaknaan apabila $P \leq 0,05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan software *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) Ver. 15 for Windows.

4.11 Persyaratan etik

Penelitian mengikuti *animal ethics* dalam mengelola hewan coba. Sebelum penelitian ini dilaksanakan, dimintakan persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Seluruh hewan coba dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang.