

## **BAB 3**

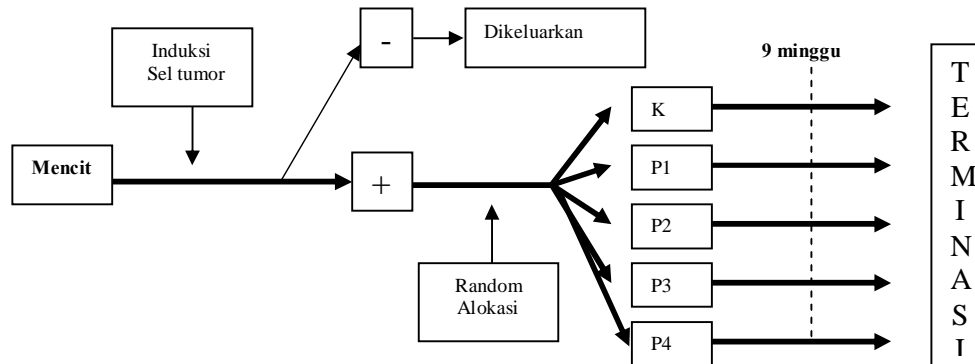
### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain "*Pre and post test control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1) , Perlakuan 2 (P2), Perlakuan 3 (P3), Perlakuan 4 (P4). Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok Kontrol, mencit yang di induksi tumor, setelah timbul tumor, tidak mendapat Mahkota dewa
- P1 : Kelompok Perlakuan 1, mencit yang di induksi tumor, setelah timbul tumor, mendapat Mahkota dewa 0,035mg /hari (0,175 mL /hari)
- P2 : Kelompok Perlakuan 2, mencit yang di induksi tumor, setelah timbul tumor mendapat Mahkotadewa 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari)
- P3 : Kelompok Perlakuan 3, mencit yang di induksi tumor, setelah timbul tumor mendapat sitostatika paclitaxel dan cisplatin
- P4 : Kelompok Perlakuan 4, mencit yang di induksi tumor, setelah timbul tumor mendapat Mahkotadewa 0,0715 mg /hari (0,36 mL /hari) dan sitostatika paclitaxel dan cisplatin

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



**Gambar 7.** Skema rancangan penelitian

### 3.2. Sampel penelitian

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 ó 30 gram setelah aklimatisasi.
4. Umur 8 ó 9 minggu.

Kriteria eksklusi :

1. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan induksi.
2. Mencit yang tumbuh tumor setelah induksi, setelah dilakukan insisi biopsi dan pemeriksaan patologi anatomi tidak menunjukkan gambaran karsinoma epidermoid kulit.

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10% (1 ekor)<sup>31</sup>, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor tikus.

Randomisasi: 30 mencit dan 6 ekor mencit cadangan diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. yang sudah berhasil diinduksi dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok yaitu:

Kelompok K : 6 mencit

Kelompok P1 : 6 mencit

Kelompok P2 : 6 mencit.

Kelompok P3 : 6 mencit

Kelompok P4 : 6 mencit

### **3.3. Lokasi Penelitian**

Perlakuan pada mencit dan proses pengambilan jaringan dilakukan di laboratorium LPPT (Lembaga Penelitian dan Pengujian terpadu) Universitas

Gajah Mada Yogyakarta, proses pembuatan blok parafin dan pewarnaan imunohistokimia ó dengan teknik *Avidin-Biotin-peroxidase Complex* (ABC) yang dipakai pada *paraffin embedded tissue* dengan fiksasi buffer formalin dan pewarnaan *antibody monoclonal anti-granzyme* ó dilakukan di Lab Patologi Anatomi FK Universitas Gajah Mada / RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

### 3.4. Variabel penelitian

#### 3.4.1. Variabel bebas

Ekstrak Mahkotadewa, sitostatika paclitaxel dan cisplatin

#### 3.4.2. Variabel perantara

Ekspresi *granzyme* sel mononuklear.

#### 3.4.3. Variabel tergantung

Perkembangan diameter tumor.

#### 3.4.4. 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 kategori 4
2.	Ekspresi <i>granzyme</i>	dihitung dari jumlah semua sel mononuklear yang berwarna coklat pada setiap 100 sel mononuklear dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x dengan metode Aihara <sup>30,32</sup> .	Interval

3.	Diameter tumor	didapat dengan menghitung ukuran diameter tumor menggunakan alat caliper tumor (CaliPro <sup>R</sup> ), diukur pada diameter terbesar tumor. Satuan ukurannya adalah <i>centimeter</i> . 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.	Rasio
----	----------------	--	-------

### 3.5. Bahan dan alat penelitian

#### 3.5.1. Bahan untuk perlakuan

- Mencit jantan strain SWISS dengan umur 8 ó 9 minggu, berat badan 20 ó 30 gram.
- Mahkotadewa yang digunakan adalah ekstrak Mahkotadewa , diperoleh dengan cara <sup>33</sup> :
- 1 kg daging buah Mahkotadewa yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50gr) dan dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 ó 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 5,5gr ekstrak pada setiap 1 kg bahan (0,55%), dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,2mg/mL .
- Dosis yang digunakan adalah disetarakan dengan dosis yang telah digunakan 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<sup>34,36</sup> 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 (0,18 mL)/hari dan 0,14 mg (0,72 mL)/hari.
- Kemoterapi Paclitaxel-Cisplatin diberikan dengan dosis Paclitaxel  $175\text{mg/m}^2$  dan Cisplatin  $50\text{mg/m}^2$  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.

### 3.5.2. Bahan induksi tumor pada mencit

- 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 34 minggu

### 3.5.3. 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 Hematoksin-Eosin (HE)
- f. Canada balsam dan Entelan

### 3.5.4. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia

- a. Antibodi primer: *Mouse Monoclonal Antibody (MoAb) anti-granzyme (Novocastra visionbiosystem<sup>R</sup>)*
- b. *Kit Universal Streptavidin-Biotin (EnVision-DakoCytomation<sup>R</sup>)*

### 3.5.5. 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<sup>R</sup>*
- i. Tabung plastic dan pipet *Ependorf*
- j. *Epismikrometer sekuler*

### 3.5.6. Alat untuk pengukuran diameter tumor

Caliper merk Calipro<sup>R</sup> dengan ketepatan  $10^{-2}$

### 3.5.7. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah :

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



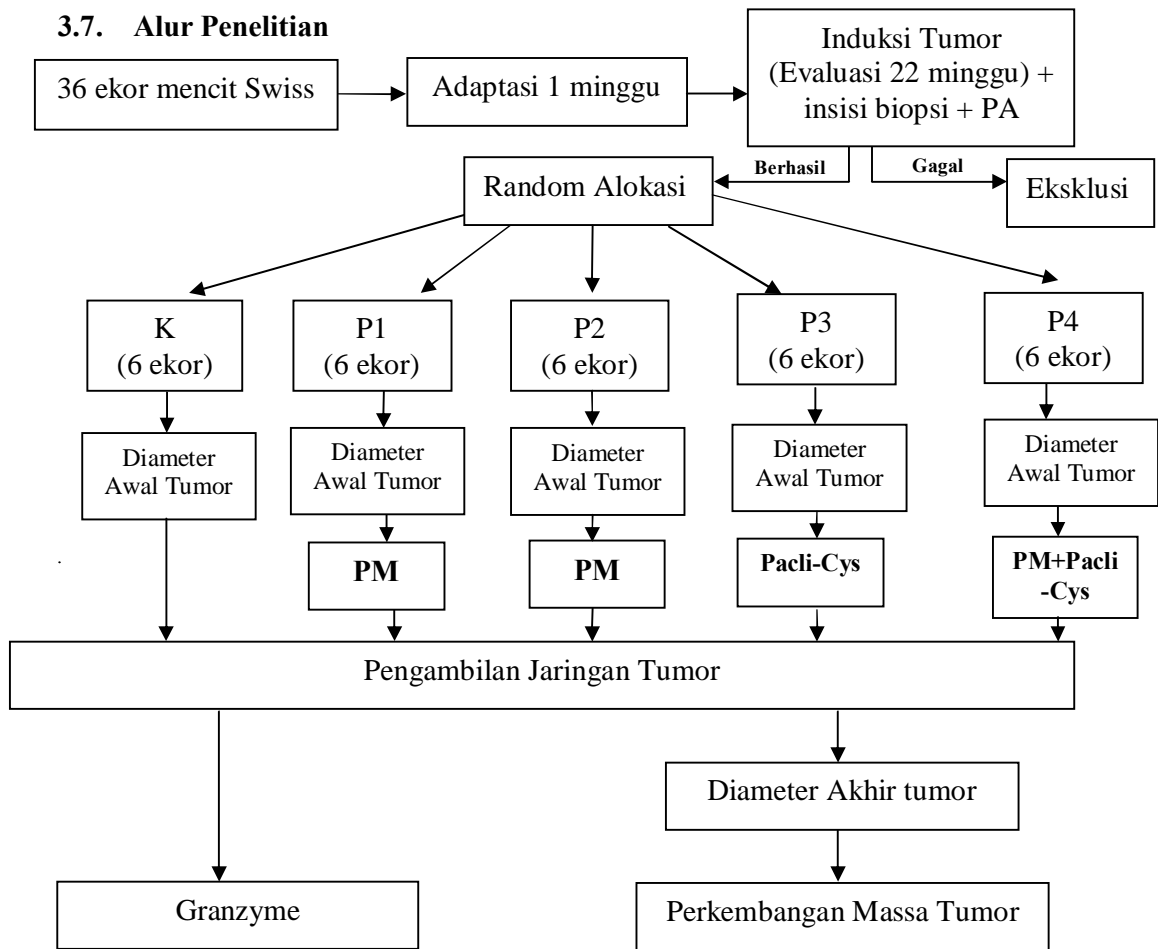
### **3.6. Pelaksanaan penelitian**

Cara perlakuan :

Tiga puluh enam ekor mencit jantan strain Swiss diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

Tiga puluh enam ekor mencit tersebut kemudian diinduksi tumor, diamati selama 24 minggu. Pada kelompok mencit yang berhasil diinduksi dilakukan insisi biopsi dan pemeriksaan patologi anatomi. Mencit yang menunjukkan gambaran PA karsinoma epidermoid kulit dibagi menjadi 6 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum dan diukur diameter tumornya. Kemudian diberikan perlakuan selama 9 minggu, dan pemberian ekstrak dilakukan dengan pipet mikro dan sitostatika diberikan secara injeksi pada pembuluh darah vena di ekor mencit.

Setelah perlakuan selesai, diameter tumor diukur kembali. Mencit di anaestesi dengan ether selanjutnya mencit dibunuh dengan cara di dislokasi cervical-nya, kemudian diambil jaringan tumor. Jaringan tumor di proses menjadi preparat histologi setelah di buat blok paraffin.



**Gambar 8.** Alur penelitian

### 3.8. Prosedur pemeriksaan

#### 3.8.1. Prosedur induksi tumor

- a. 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 aseton per ekor mencit 2 x seminggu selama 20 minggu.<sup>34</sup>

- b. Pada mencit di setiap kelompok perlakuan dilakukan penandaan menggunakan asam pikrat berwarna kuning pada area kepala, kaki depan, kaki belakang, ekor, dan tanpa tanda dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal induksi.

### 3.8.2. Prosedur pengukuran diameter tumor

Massa tumor diukur menggunakan caliper (CaliPro<sup>R</sup>) dengan ketepatan 10<sup>-35</sup>. Kita ukur tumor pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi.

### 3.8.3. Prosedur pembuatan preparat histopatologi

- a. Fiksasi

Potongan karsinoma epidermoid 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 karsinoma epidermoid 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 56-58<sup>0</sup>C, 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 56-58<sup>0</sup>C sampai paraffin mencair.

e. *Prosedur pewarnaan Mo Ab Anti granzyme*

- Xylool I í í í í í í í ....í í í í .í í í .....5-10 menit
- Xylool II ....í í í í í í í ....í í í í í í í .....5-10 menit
- Alkohol absolut ...í .....í í ....í í í í .....10 menit
- Alkohol 95% í í .....í ...í í ....í í í .í .....5-10 menit
- Alkohol 70% í í í í í í í í ....í í í .....5-10 menit
- Cuci air (celup-celup) í í .í í í í í í í .í .....1-2 menit
- Cuci dengan Phospat buffer saline (PBS) celup-celup í .1-2 menit
- Slide dimasukkan kedalam tempat yang lembab dan tertutup

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% dalam methanol í í í í í .....í .....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) í í ..í í í í í ..í í ..í .....2 menit

Slide ditata didalam tempat yang lembab dan tertutup.

Blocking Agent (Kit) í í .í í í í í í í í í í .í .....10 menit

Bloking agent dibuang (tanpa dicuci)

Inkubasi MoAb primer 10 ul (diencerkan pakai PBS-BSA) overnight

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

Cuci PBS (celup-celup) í í í í í í í í í í í .....10 menit

Cuci PBS í í í í í í í í í í í .í í í í í í .....2-3 menit

Streptavidin í í í í í í í í í í ...í í í í í .....10 menit

Cuci PBS í í í í í í í í í .í í í ..í í í í í .....2-3 menit

DAB í í í í í í í í í í í í í í í í í í .....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 Mayer-Hematoksilin í í í í ....í .20ø-1 menit  
Hematoksilin dibuang, cuci air mengalir kemudian dicelup di aquadest  
Entellan kemudian tutup deck glass.<sup>34,37</sup>

### 3.9. Cara mengumpulkan data

Dari masing-masing kelompok diukur diameter tumor sebelum dan sesudah perlakuan, dan diambil massa tumornya setelah perlakuan yang selanjutnya dibuat preparat setebal 6 mikron, diwarnai dengan pengecatan Immunohistokimia dengan metoda *Avidin-Biotin Peroksidase Complex* dengan *mouse MoAb anti-granzym* kemudian di amati ekspresi granzyme-nya.

### 3.10. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hypothesis. Pada analisa deskriptif ekspresi *granzyme* dan perkembangan tumor adenokarsinoma payudara disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD dan median.

Pada penelitian ini karena ada satu variabel *independent discreet* yaitu pemberian dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa, dan dua variabel *dependent* berskala interval yaitu ekspresi *granzyme* dan diameter tumor. Bila data dari

variabel tergantung tidak normal maka kedua variabel tersebut dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* , yang dilanjutkan dengan *Uji Mann Whitney* bila hasilnya berbeda bermakna. Uji korelasi antara variabel ekspresi *granzyme* dengan diameter tumor dilakukan dengan uji korelasi *Spearman's*.<sup>39-41</sup>

Batas derajat kemaknaan adalah apabila  $P \leq 0,05$ . Analisa data dilakukan dengan *software SPSS Ver. 15.0 for Windows*.