





BAB 4

METODE PENELITIAN

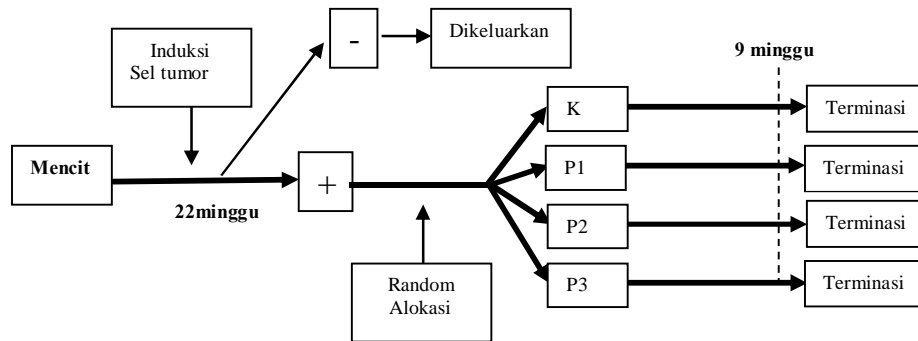
4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorik eksperimental dengan desain “*Randomized post test only control group design*” yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Kelompok penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3). Adapun pembagiannya adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Pembagian kelompok penelitian

K		Kelompok kontrol, mencit yang diinduksi sel kanker, setelah timbul benjolan, tidak mendapat <i>phaleria macrocarpa</i>
P1		Kelompok perlakuan 1, mencit yang diinduksi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat <i>phaleria macrocarpa</i> 0,0715 mg (0,36 ml/hari).
P2		Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinduksi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat sitostatika paclitaxel 175 mg/m ² dan cysplatin 50 mg/m ² .
P3		Kelompok perlakuan 3, mencit yang diinduksi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat sitostatika paclitaxel 175 mg/m ² dan cysplatin 50 mg/m ² dan dikombinasikan dengan <i>phaleria macrocarpa</i> 0,0715 mg (0,36 ml/hari).

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 4. Skema rancangan penelitian

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. 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 kulit.^{35,36} 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 ó 30 gram setelah aklimatisasi.

4. Umur 8 ó 9 minggu.

Kriteria eksklusi :

1. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan induksi.
2. Hasil PA dari biopsi tumor bukan karsinoma epidermoid.

Besar sampel untuk tiap kelompok minimal 5 ekor dengan cadangan 10 %, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor mencit.³⁶ Besar sampel ditetapkan berdasarkan kriteria sampel minimal untuk penelitian binatang berdasarkan persyaratan *World Health Organization* (WHO) untuk penelitian keganasan yaitu minimal 5 ekor mencit untuk tiap kelompok penelitian. Menimbang adanya kemungkinan mencit mati selama penelitian yang besarnya diperkirakan 10% maka besar sampel dengan koreksi drop-out adalah :

$$\text{out adalah : } ndo = \frac{n}{(1 - do)} = \frac{5}{(1 - 0,1)} = 5,56 \approx 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut besar sampel total untuk 4 kelompok penelitian adalah 24 ekor mencit Swiss. Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*.

4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan 1 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 Tunel 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*, paclitaxel dan cisplatin

Variabel Tergantung :

1. Ekspresi enzim caspase 3 sel karsinoma epidermoid kulit
2. Indeks apoptosis sel karsinoma epidermoid kulit

Definisi operasional :

Tabel 4. Definisi operasional

No	Nama Variabel	Definisi Operasional	Skala
1.	<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 ³⁷	Nominal dengan 4 katagori
2.	Ekspresi Caspase 3	Ekspresi enzim caspase 3 dihitung dari sediaan tumor dengan pewarnaan imunohistokimi, di mana sel yang positif (warna coklat yang dominan pada sitoplasma dan beberapa pada inti sel) ³⁸ sesuai kontrol positif dihitung per 100 sel tumor dari area yang signifikan dengan pembesaran 400 kali, pada 5 lapangan pandang besar dari tiap preparat, dalam satu blok parafin. Kemudian diambil hasil rata-rata.	Rasio
3.	Indeks Apoptosis	Kematian sel yang dinyatakan sebagai rasio dari semua sel yang dihitung. Indek apoptosis dihitung sesuai dengan metoda Tunel Dead End Colorimetric (TDEC), pemeriksaan dilakukan secara acak dengan menggunakan mikroskop fluorescent pembesaran 400 kali. ³⁹ Sel yang mengalami apoptosis dihitung pada 100 sel tumor dalam 1 lapangan pandang, sebanyak 5 lapangan pandang. Indek apoptosis dihitung menggunakan rumus : $IA = (\text{sel apoptosis} / \text{sel tumor}) \times 100\%$.	Rasio

4.5. Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan *cleaning*, *coding* dan tabulasi data. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif ekspresi enzim caspase 3 dan indeks apoptosis karsinoma epidermoid, disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median, dan grafik.⁴⁰

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* atau *Mann Whitney*.

Untuk analisa korelasi antara variabel ekspresi caspase 3 dengan indeks apoptosis dilakukan uji korelasi *Pearsons* (jika syarat analisis parametrik terpenuhi) atau uji korelasi *Spearman* (jika syarat analisis parametrik tidak terpenuhi).⁴⁰ Batas derajat kemaknaan apabila $P \leq 0,05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan software SPSS Ver 15.0 for Windows.

4.6. Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1. Bahan

- Mencit jantan strain Swiss dengan umur 8 ó 9 minggu, berat badan 20 ó 30 gram.
- Karsinoma epidermoid kulit 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), yang dilarutkan dalam reagen aseton, dioleskan 2 x seminggu selama 2 minggu dan dioleskan 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 2 x seminggu selama 22 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 ó 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). Kami juga memberikan dosis 0,14 mg (0,7 mL)/hari dan 0,28 mg /hari (1,4 mL /hari).⁴¹

- Kemoterapi paclitaxel-cisplatin diberikan dengan dosis paclitaxel $175\text{mg}/\text{m}^2$ dan cisplatin $50\text{mg}/\text{m}^2$ 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.

4.6.1.1. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

1. Formalin buffer 10%
2. Alkoho 150%, 70%, 80%, 90%, absolute, xylol
3. Parafin cair (Histoplast)
4. Albumin dan Poly-L-Lysine
5. Canada balsam dan Entelan

4.6.1.2. Bahan untuk pemeriksaan apoptosis

TUNEL *assay kit* dan propidium iodide (*double staining*)

4.6.1.3. Bahan untuk pemeriksaan imunohistokimia

1. Formalin buffer
2. Alkohol absolut, 95%, 80%, 70%, 50%.
3. Xylol
4. Parafin

5. Aquadest
6. Buffer sitrat pH 6
7. PBS pH 7,2 - 7,4
8. Metanol H₂O₂ 0,3%
9. Bloking serum
10. Antibodi primer
11. Biotin
12. Streptavidin
13. Substrat enzim peroksidase : DAB
14. Hematoxylin
15. Canada balsam
16. Kapas/tissue

4.6.2. Alat

4.6.2.1. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan imunohistokimia :

1. *Tissue cassette*
2. *Beaker glass*
3. Mikrotom
4. Poly-L-Lysine slides
5. *Deckglass*
6. *Humidity chamber vertikal*
7. *Humidity chamber horisontal*
8. Mikro pipet 10 µl
9. Mikro pipet 100 µl
10. Mikro pipet 1000 µl

11. Mikro tube

12. *Shaker*

4.6.2.2. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan adalah :

1. 1 Unit *Microscope Olympus^R*
2. 1 Unit *Microscope Fluorocent*
3. *Nikon^R Digital Net Camera DN 100 + SD Card*
4. 1 Unit Komputer *Intel Pentium^R Processor*

4.7 Pelaksanaan Penelitian

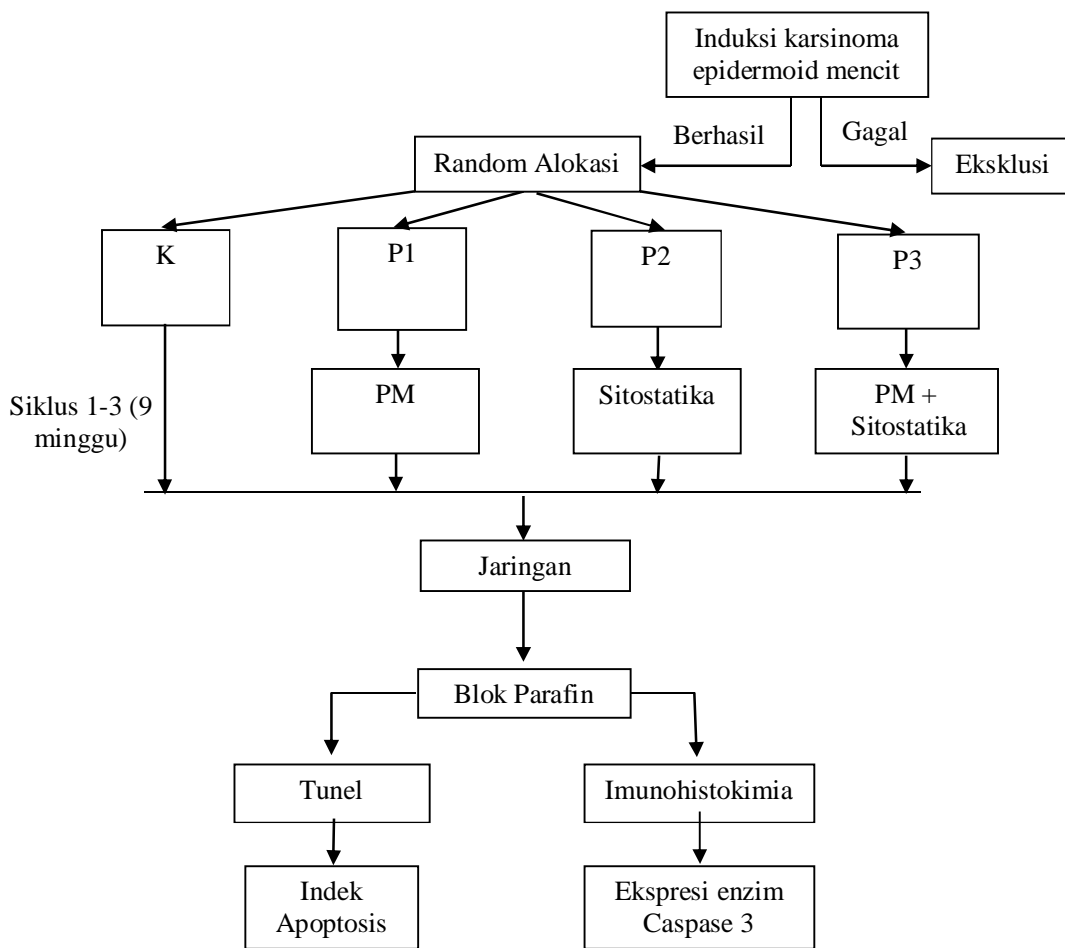
Cara perlakuan

1. 24 ekor mencit jantan strain Swiss dengan umur 3 bulan, dan berat 20 - 30 gram diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi pakan standar selama satu minggu secara ad libitum.
2. Karsinoma epidermoid kulit 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 22 minggu
3. Pada kelompok mencit yang berhasil diinokulasi dan dilakukan pemeriksaan biopsi PA dengan hasil karsinoma epidermoid, dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara

individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum. Kemudian diberikan perlakuan selama 3 minggu, dan pemberian ekstrak yang dilarutkan dengan 0,2 ml aquadest 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 prepat histologik setelah dibuat blok paraffin.

4.8. Alur Kerja



Gambar 5. Skema Alur kerja penelitian

4.9. Prosedur Pemeriksaan

4.9.1. 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 & xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2x2 jam
5. Impregnasi : jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam
6. Embedding : jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58 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 inkubator suhu 56-58 C sampai paraffin mencair.

4.9.2. Prosedur pengecatan preparat Tunel

1. Lakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.
2. Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95 % dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit.
3. Rehidrasi preparat dengan aquadest steril.
4. Tetesi preparat dengan 50 μ l TUNEL *labeling mix* (terdiri dari 5 μ l enzim terminaldeoxynucleotidyl transferase dan 45 μ l fluorescein-dUTP)
5. Tutup preparat dengan *siliconize cover slip*.
6. Inkubasi preparat pada suhu 37° C selama 30 menit di dalam *moist chamber*.
7. Cuci preparat dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 3 kali.
8. Inkubasi dengan *Rnase solution* pada suhu 37°C selama 30 menit.
9. Cuci preparat dengan PBS sebanyak 3 kali.
10. Inkubasi preparat dengan larutan propidium iodide pada suhu ruang selama 10 menit.
11. Cuci preparat dengan PBS sebanyak 3 kali
12. Tutup preparat dengan *cover slide* diameter 18mm.
13. Amati sel apoptosis (fluoresensi hijau) menggunakan mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 400x dan dokumentasi setiap pengamatan.³⁹

4.9.3. Pewarnaan ekspresi enzim caspase 3 dengan pengecatan imunohistokimia

1. Pemotongan blok parafin dengan tebal 4 mikron. Diletakkan pada slides poly-L-lysine selanjutnya dinkubasi pada suhu 37°C selama 1 malam (agar lebih merekat pada slides).

2. Deparaffinisasi :
 - Direndam dalam xylo I selama 5 menit
 - Direndam dalam xylo II selama 5 menit
 - Direndam dalam xylo III selama 5 menit
 - Direndam dalam xylo IV selama 5 menit
 - Direndam dalam alkohol absolut selama 5 menit
 - Direndam dalam alkohol 95% selama 5 menit
 - Direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit
 - Dicuti dengan aquadest selama 5 menit
3. Tetesi dengan endogenus peroksidase metanol H₂O₂ 3% selama 15 menit.
4. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit.
5. Cuci lagi dengan aquadest selama 5 menit.
6. Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit.
7. Retrieval antigen dilakukan pada microwave oven dengan buffer sitrat pH 6 pada suhu tinggi sampai mendidih kemudian dilanjutkan pada suhu rendah hingga menit ke 10.
8. Setelah dingin cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
9. Tetesi dengan bloking serum selama 5-10 menit.
10. Tiriskan, kemudian tetesi dengan antibodi yang telah disiapkan. Inkubasi pada suhu 4°C selama 18 jam.
11. Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
12. Tetesi dengan biotin selama 15 menit.
13. Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
14. Tetesi dengan streptavidin selama 10 menit.
15. Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit

16. Pemberian substrat enzim peroksidase : DAB selama 3-5 menit
17. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit.
18. Tetesi dengan hematoxylin selama 4 menit .
19. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit.
20. Mounting, tutup dengan deckglass.

4.10. Cara Pengumpulan Data

Dari masing-masing kelompok diambil massa tumornya setelah perlakuan, dibuat preparat setebal 4 mikron, diwarnai dengan pengecatan Tunel untuk mengamati indeks apoptosis dan pengecatan imunohistokimia menggunakan *polyclonal antibody* untuk caspase 3, (*Caspase 3 (CPP32) Ab-4 rabbit polyclonal antibody RB-1197-PO, NeoMarkers*) untuk melihat ekspresi enzim caspase 3. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus^R untuk penghitungan ekspresi caspase 3 dan mikroskop fluorocent untuk penghitungan indeks apoptosis, dilakukan oleh peneliti dalam pendampingan seorang ahli patologi anatomi dan oleh satu orang ahli patologi anatomi lain.

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 akan dirawat sesuai standar pemeliharaan binatang.

