

BAB 4

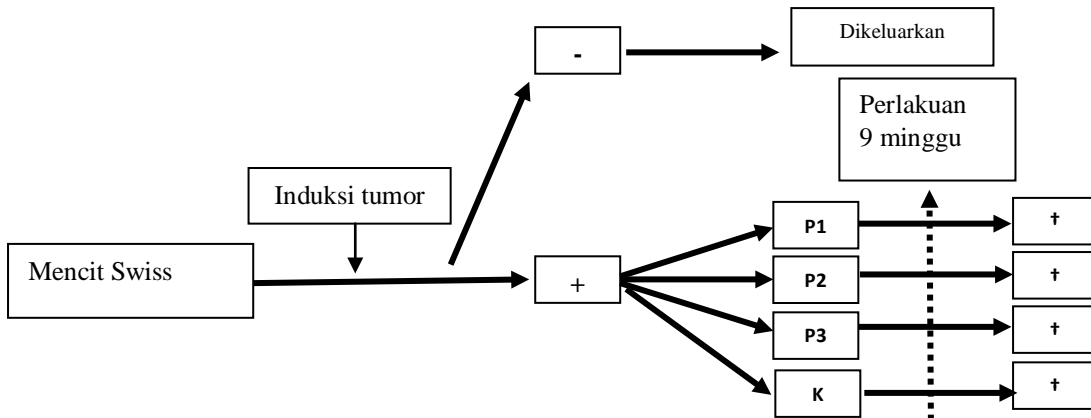
METODE PENELITIAN

4.1. Desain 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 diinduksi karsinoma epidermoid dengan DMBA dan TPA dan timbul benjolan.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang diinduksi karsinoma epidermoid dengan DMBA dan TPA, setelah timbul benjolan mendapat *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg (0,36 ml/hari).
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang diinduksi karsinoma epidermoid dengan DMBA dan TPA, setelah timbul benjolan mendapat kemoterapi *Paclitaxel* 175 mg/m² dan *Cysplatin* 50 mg/m².
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang diinduksi karsinoma epidermoid dengan DMBA dan TPA, setelah timbul benjolan mendapat kombinasi kemoterapi *Paclitaxel* 175 mg/m² dan *Cysplatin* 50 mg/m² dan dengan ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,0715 mg (0,36 ml/hari).

Skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 5. Skema penelitian

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1. 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. Penggunaan mencit umur 8-9 minggu oleh karena dalam umur tersebut mencit mengalami fase istirahat dalam pertumbuhan rambutnya. Digunakan mencit jantan untuk menghindari faktor hormonal, terdapat faktor protektif pada estrogen endogen terhadap paparan zat kimia yang dapat menginduksi terjadinya karsinoma epidermoid kulit.⁽⁵⁰⁾

4.2.2. 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 – 30 gram setelah aklimatisasi.
4. Umur 8 – 9 minggu.
5. Tumbuh tumor setelah dilakukan induksi karsinoma epidermoid.

Kriteria eksklusi :

1. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan induksi karsinoma epidermoid.

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

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit 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. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama kurang lebih sembilan bulan, induksi tumor kurang lebih 26 minggu, dilakukan biopsi, kemudian perlakuan sesuai siklus kemoterapi selama tiga siklus dengan interval siklus tiga 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 IHC, pengukuran kadar sel TCD4 + tumor di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel penelitian

A. Variabel bebas :

1. Pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa*
2. Pemberian kemoterapi *Paclitaxel-Cysplatin*
3. Pemberian terapi kombinasi antara ekstrak *Phaleria macrocarpa* dan kemoterapi *Paclitaxel-Cysplatin*.

B. Variabel tergantung :

1. Kadar sel T CD4 tumor

4.4.2 Definisi operasional

- Ekstrak *Phaleria macrocarpa* adalah 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. Ekstrak tersebut diencerkan sehingga didapatkan kadar *Phaleria macrocarpa* 0,0715mg/0,5ml dan diberikan sebanyak 0,5ml melalui sonde setiap hari selama 9 minggu.
- Kemoterapi *Paclitaxel-cysplatin* diberikan dengan dosis *Paclitaxel* 175 mg/m² dan *Cysplatin* 50 mg/m² dengan BSA 0,024. Hasil tersebut dikonversi dengan dikalikan 0,0026. Sehingga didapatkan kebutuhan *Paclitaxel* 0,01 mg dan *Cysplatin* 0,003mg. Keduanya diencerkan dalam 100 ml NaCl 0,9 %, kemudian disuntikkan melalui IV. Dari 1 vial *Paclitaxel* diambil 1 ml sebanding dengan 0,01 mg dimasukkan kedalam 100 ml NaCl 0,9 % yang telah dibuang 1 ml. Dari 1 vial *Cysplatin* diambil 1 ml sebanding dengan 0,003 mg dimasukkan kedalam 100 ml NaCl 0,9 % yang telah dibuang 1 ml. Kemudian masing-masing dari kedua rejimen tersebut diambil sebanyak 0,17 ml *Paclitaxel* dan 0,3 ml *Cysplatin* dari masing-masing NaCl 0,9% 100 ml dan disuntikkan secara IV pada ekor mencit Swiss.

- Skor sel T CD4 dinilai dengan skor histologi dengan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan monoklonal antibodi anti sel T CD4 dengan pewarnaan metode *streptavidin-biotin* pada preparat eksisi biopsi jaringan tumor pada minggu ke-9 perlakuan. Dengan mikroskop Olympus seri BX 41 yang dilengkapi kamera digital DP-70 dengan pembesaran sampai 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 membran limfosit sebagai nilai histoskor untuk memperoleh ekspresi sel T CD4 secara kuantitas.

4.5. Bahan dan Alat Penelitian

Mencit Swiss diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada. Selama penelitian, setiap mencit ditempatkan pada kandang sesuai kelompoknya. Satu kandang berisi 8 mencit. Pencahayaan, suhu serta kelembaban yang sama. Pakan yang diberikan pelet standar pakan tikus. Pakan dan minum diberikan *ad libitum*. Aklimatisasi untuk adaptasi sebelum perlakuan adalah selama 1 minggu. Kandang dibersihkan setiap hari dengan frekuensi dan tingkat kebersihan yang sama.

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 2x per minggu selama 20 minggu.

Phaleria macrocarpa atau mahkota dewa:

- *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).

Kemoterapi *Paclitaxel-Cysplatin* diberikan dengan dosis *Paclitaxel* 175 mg/m² dan *Cysplatin* 50 mg/m² dengan BSA 0,024. Hasil tersebut dikonversi dengan dikalikan 0,0026. Sehingga didapatkan kebutuhan *Paclitaxel* 0,01mg dan *Cysplatin* 0,003mg. Keduanya diencerkan dalam 100ml NaCl 0,9%, kemudian disuntikkan melalui IV. Dari 1 vial *Paclitaxel* diambil 1 ml sebanding dengan 0,01mg dimasukkan kedalam 100ml NaCl 0,9% yang telah dibuang 1ml. Dari 1 vial *Cysplatin* diambil 1 ml sebanding dengan 0,003 mg dimasukkan kedalam 100ml NaCl 0,9% yang telah dibuang 1 ml. Kemudian masing-masing dari kedua rejimen tersebut diambil sebanyak 0,17 ml *Paclitaxel* dan 0,3 ml *Cysplatin* dari masing-masing NaCl 0,9% 100ml dan disuntikkan secara IV pada ekor mencit Swiss.

Bahan untuk pemeriksaan pengecatan Sel T CD4.

1. Polinized slide
2. Xylol
3. Alkohol absolut
4. Tris Hcl (pH 7,6)
5. Periodic acid 0,5 %
6. 0,3 % H₂O₂ dalam metanol
7. Blok 1 % BSA – PBS
8. Biotinylated Rabbit anti Mouse
9. Ab Sekunder
10. DAB

11. Sel T CD4 mouse Ab
12. Hematoksilin
13. Entelan

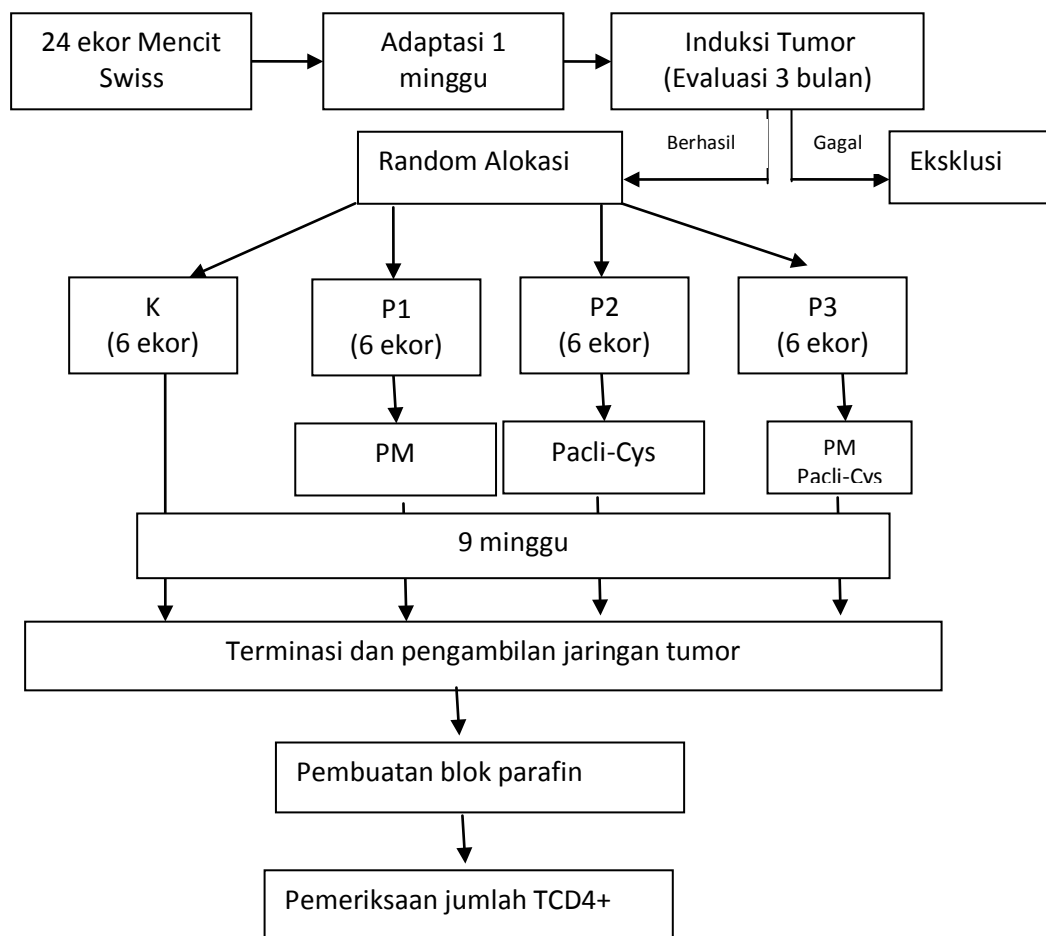
4.6. Prosedur Pemeriksaan Tumor

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 parafin cair selama 2x2 jam.
6. *Embedding*: jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-580 °C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin 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 parafin mencair.

7. Pewarnaan jaringan dengan IHC (imunohistokimia)/ pengecatan sel T CD4
8. Pemeriksaan dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah sel TCD4

4.7. Alur Kerja



Gambar 6. Alur Penelitian

4.8. Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif kadar sel TCD4 tumor epidermoid disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan grafik garis.

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*. Hasil 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*. Hasil uji varian bila 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*.

Batas derajat kemaknaan apabila $P \leq 0.05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan *software SPSS Ver. 18 for Windows*.

4.9. 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.