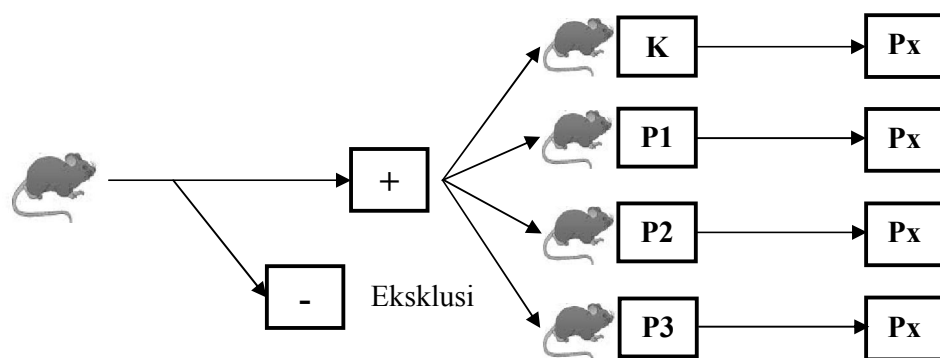


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain “*Post test only control group design*”. Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3), dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Keterangan

- K : Kelompok kontrol, tikus yang diinduksi karsinogen.
- P1 : Kelompok perlakuan 1, tikus yang diinduksi karsinogen, setelah timbul benjolan, mendapat kemoterapi 5FU-leucovorin
- P2 : Kelompok perlakuan 2, tikus yang diinduksi karsinogen, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0,495 mg /hari (0,99 mL /hari).

P3 : Kelompok perlakuan 3, tikus yang diinduksi karsinogen, setelah timbul benjolan mendapat kemoterapi 5FU-leucovorin dan *Phaleria macrocarpa* 0,495 mg /hari (0,99 mL /hari).

Px : Terminasi tikus yang kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus putih strain *Sprague dawley* yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penentuan jenis kelamin betina yang dipakai pada penelitian ini dilakukan untuk memudahkan pemeliharaan karena jenis kelamin betina tidak begitu agresif sehingga menghindari cedera karena perkuliahan yang dapat menimbulkan kerancuan dalam penilaian.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus putih strain *Sprague dawley* betina dengan berat badan 200 gram dengan syarat sesuai kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria Inklusi

1. Tikus betina
2. Strain *Sprague dawley*
3. Berat badan 200 gram
4. Timbul tumor pada kolon

Kriteria Eksklusi

1. Berat badan kurang dari 200 gram
2. Selama observasi 7 hari tampak sakit
3. Terdapat kelainan anatomis

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor.⁵⁸

Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok 6 ekor tikus.

4.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Pemeliharaan dan intervensi hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pemeliharaan semenjak masa seleksi sampai masa perlakuan berlangsung dalam waktu 5 bulan. Pemeriksaan histopatologi mulai dari pembuatan blok parafin sampai pewarnaan imunohistokimia - dengan teknik *Streptavidin-Biotin-peroxidase Complex* yang dipakai pada *paraffin embedded tissue* dengan fiksasi buffer formalin - dilakukan di Laboratorium PA FK UGM dan Laboratorium PA RS Dr Sardjito Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah pemberian 5FU-Leucovorin dan ekstrak *Phaleria macrocarpa*.

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah proliferasi sel dan diameter massa tumor

4.4.3. Definisi operasional

1. Ekstrak *Phaleria macrocarpa* adalah crude extract yang diekstraksi dengan pelarut etanol dengan menggunakan metoda sokletasi, dengan konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,5 mg/mL, yang mengandung 3,4,5-trihydroxybenzoic acid 10%, diberikan dengan dosis 0,495 mg/hari (0,99 mL /hari) per oral. 5FU diberikan dosis 0.27 mg intravena, dan Leucovorin dosis 0.27 mg intravena sesuai *Rosswell Park Regiment*.⁶⁰

Skala variabel : Nominal

2. Proliferasi sel diukur dengan cara menghitung jumlah sel yang mempresentasikan antigen Ki-67 pada 100 sel dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, pada 10 lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri lagi, kemudian diambil rata-rata hasilnya. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi dengan *clinical agreement* 95%.

Skala variabel : Rasio

3. Pengecilan diameter massa tumor adalah dengan cara membandingkan diameter massa tumor antar kelompok perlakuan yang diberi kemoterapi 5FU – Leucovorin, ekstrak *Phaleria macrocarpa* atau kombinasi keduanya dengan kelompok kontrol. Cara pengukuran dengan menggunakan alat caliper tumor, dengan akurasi ketelitian 10^{-3} cm dan diukur pada diameter terbesar tumor satu dimensi, satuannya (cm).

Skala variabel : Rasio

4.5. Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1. Bahan Untuk Perlakuan

1. Tikus betina strain *Sprague dawley* dengan berat badan 200 gram.
2. Pakan standart yang diberikan berupa pakan berbentuk pellet jenis AD II (produksi PT. Japfa Comfeed Indonesia Tbk) diberikan secara *ad libitum*.
3. Kanker kolon diperoleh dengan cara induksi *1,2-dimethylhidrazine* dosis 30 mg/kgBB/minggu selama 15 minggu sejak pemberian induksi pertama. Pada minggu ke-10, 13 dan 16 tikus yang diinduksi dikorbankan masing-masing dua ekor tikus untuk mendeteksi pertumbuhan kanker kolorektal.
4. 5FU-Leucovorin dengan merek dagang Fluorouracyl dan Rescuvolin dari Kalbe farma.
5. *Phaleria macrocarpa* yang digunakan adalah *crude extract Phaleria macrocarpa*, diperoleh dengan cara :
 - a. 1 kg buah *Phaleria macrocarpa* yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat soklet (kapasitas 50 g) dan

dilakukan ekstraksi dengan cara sokletasi menggunakan pelarut etanol dengan siklus 8 – 10 kali.

- b. Hasil ekstrak dimasukkan 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%), yang mengandung *3,4,5-trihydroxybenzoic acid* 10%, dan hasil ekstrak diencerkan dengan aquabidest sampai tercapai konsentrasi 0,5 mg/ml.

Dosis yang digunakan disetarakan dengan dosis yang telah digunakan pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram/hari,¹² dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (tikus) yaitu 0,018 dikalikan konstanta hasil ekstrak 0,0055, sehingga dosis yang diberikan adalah $5000 \times 0,018 \times 0,0055 = 0,495$ mg/hari (0,99 ml/hari).

4.5.2. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin H&E dan IHC Ki-67

- a. Phospat *Buffered formalin* 10%
- b. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, *absolute*
- c. Xylol
- d. Parafin cair (Histoplast)
- e. Albumin dan *poly-L-lysine*
- f. Bahan Pengecatan H&E
- g. Antibody *rapid monoclonal* Ki-67 (SP6) merk “abcam”
- h. *Canada balsam* dan entelan

- i. Kit Universal Streptavidin-Biotin (EnVision-DakoCytomation®)

4.5.3. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan IHC Ki-67:

- a. *Digital Tissue Processor* Leica^R
- b. *Tissue Blocking* Leica^R EG-1160
- c. Inkubator suhu 56 °C Memmert^R
- d. Mikrotom Leica^R RM-2135
- e. *Auto Stainer* Leica-XL^R
- f. Kaca obyek dan kaca penutup
- g. Centrifuge
- h. Refrigerator
- i. Micropipet
- j. Timer

4.5.4. Alat untuk pengukuran diameter tumor

Caliper Tumor dengan akurasi ketelitian 10^{-3} cm

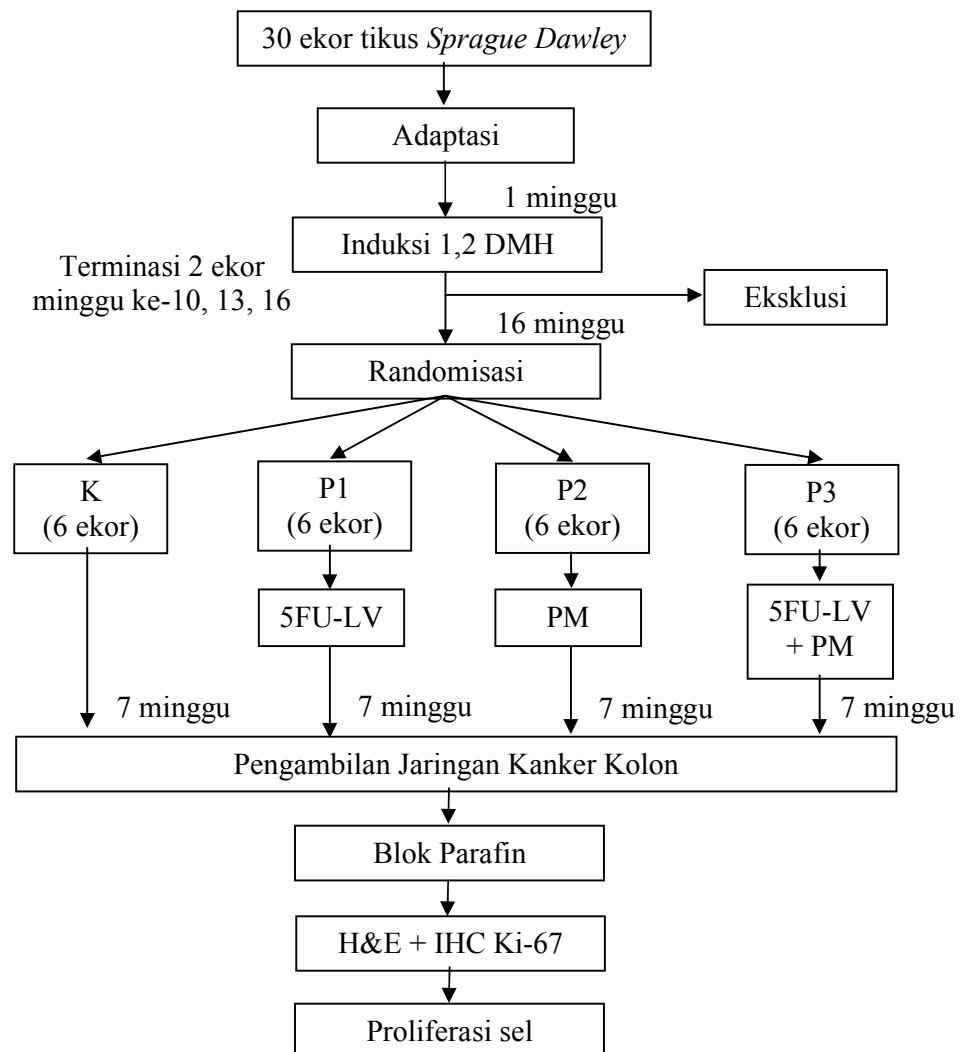
4.5.5. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan

- a. 1 unit *multi head microscope* Olympus^R
- b. *Sony Cybershoot^R digital camera + SD Card*
- c. 1 unit netbook *Intel Atom^R Processor*

4.6. Prosedur pengumpulan data

Sebanyak 30 ekor tikus putih strain *Sprague Dawley* usia dengan berat badan 200 gram diaklimatisasi di laboratorium selama satu minggu. Hal ini diharapkan terjadi penyesuaian hewan coba terhadap kondisi lingkungan yang ada sehingga tidak terjadi *drop out*. Tiga puluh ekor tikus tersebut kemudian diinduksi karsinogen selama 15 minggu. Pada minggu ke-10, 13 dan 16 tikus yang diinduksi dikorbankan masing-masing dua ekor tikus untuk mendeteksi pertumbuhan kanker kolorektal. Setelah kanker kolorektal terbukti tumbuh secara histopatologis, dilakukan randomisasi, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yang ditentukan secara *simple random sampling* sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar yang sama dan minum *ad libitum*. Perlakuan yang diberikan sesuai alur kerja. Setelah minggu ke-16 perlakuan, dilakukan terminasi tikus menggunakan anestesi dengan ether kemudian diambil jaringan tumor. Diameter jaringan tumor diukur kemudian diproses menjadi preparat blok parafin. Dilakukan pengecatan H&E untuk mengkonfirmasi tumor yang tumbuh berupa adenokarsinoma oleh 2 orang ahli patologi, setelah terkonfirmasi dilakukan pengecatan IHC Ki-67 untuk penilaian proliferasi sel.

4.7 Alur Kerja



Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus strain *Sprague Dawley* dengan pakan standart yang diberi perlakuan induksi *1,2-dimethylhidrazine* dengan dosis 30 mg/kgBB/minggu s.c selama 16 minggu. Pada minggu ke-10, 13 dan 16 tikus yang diinduksi dikorbankan masing-masing dua ekor tikus untuk mendeteksi pertumbuhan kanker kolorektal. Setelah kanker kolorektal terbukti tumbuh secara histopatologi, dilakukan random alokasi dengan metode *simple random sampling*

dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Kelompok I sebagai kelompok kontrol, tikus *Sprague Dawley* dengan kanker kolon yang diberi pakan standart selama 7 minggu tanpa diberi perlakuan khusus. Kelompok II sebagai kelompok perlakuan 1, tikus *Sprague Dawley* dengan kanker kolon yang diberi kemoterapi 5FU-Leucovorin. Kelompok III sebagai kelompok perlakuan 2, tikus *Sprague Dawley* dengan kanker kolon yang diberi pakan standart dan diberi ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan dosis 0,495 mg/hari (0,99 ml/hari). Kelompok IV sebagai kelompok perlakuan 3, tikus *Sprague Dawley* dengan kanker kolon yang diberi pakan standart dan pemberian kemoterapi 5FU-Leucovorin, juga diberi ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan dosis 0,495 mg/hari (0,99 ml/hari). Pada minggu ke-23 dilakukan terminasi, dilanjutkan isolasi jaringan kanker kolon, dilakukan pengukuran diameter tumor dan pembuatan sediaan blok paraffin. Sediaan diperiksa secara mikroskopis untuk konfirmasi sel adenokarsinoma dengan pengecatan H&E, kemudian dilanjutkan dengan pengecatan IHC Ki-67.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1. Prosedur pengukuran diameter tumor

Massa tumor diukur menggunakan caliper tumor dengan ketepatan 10^{-3} cm.

Tumor diukur pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi.

4.8.2. Prosedur pembuatan preparat blok parafin

a. Fiksasi

Potongan kanker kolon dimasukkan dalam larutan *formalin buffer* (larutan formalin 10% dalam *buffer Natrium Phosphat* sampai mencapai pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Kemudian jaringan dimasukkan dalam larutan *aquadest* selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

b. Dehidrasi

Potongan kanker kolon dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2 x 2 jam.

c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2 x 2 jam.

d. 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.

4.8.3. Prosedur pengecatan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam:

1. Xylol	1 menit	11. Air	15 detik
2. Xylol	2 menit	12. Alkohol 80%	15 detik
3. Xylol	2 menit	13. Alkohol 96%	30 detik
4. Alkohol 100%	2 menit	14. Alkohol 100%	45 detik
5. Alkohol 96%	2 menit	15. Xylol	1 menit
6. Alkohol 80%	2 menit	16. Xylol	1 menit
7. Air	1 menit		
8. Mayer HE	7,5 menit		
9. Air	7,5 menit		
10. Eosin (0,5%)-alcohol-asam asetat	1 menit		

4.8.4 Prosedur pengecatan jaringan dengan IHC Ki-67

- Xylol I 5-10 menit
- Alkohol absolut 10 menit
- Alkohol 95% 5-10 menit
- Alkohol 70% 5-10 menit
- Cuci air (celup-celup) 1-2 menit
- H₂O₂ 3 % 15-20 menit
- Cuci air (celup-celup) 1-2 menit
- Panaskan slide dalam Tris EDTA (pH = 9)..... 20 menit
- Dinginkan 30 menit

- Cuci dengan air (celup – celup)
- Bersihkan sekitar jaringan slide
- Hydrophobic barrier di sekitar slide jaringan dengan Super PAP pen dengan jarak \pm 30-48 mm
- Cuci slide dengan PBS (Phospat Buffer Saline pH 7,2) 1 kali @ 1-2 menit
 - Cuci dengan PBS (Phospat Buffer Saline)
 - Slide ditata dalam wadah gelas.
 - Background eraser (protein blocker)..... 20 menit
 - Antibody *rapid monoclonal* Ki-67 (SP 6) merk “abcam”... 60 menit
 - Cuci slide dengan PBS (*Phospat Buffer Saline*) 2 kali @ 1-2 menit
 - Antibody Biotinlated 15 menit
 - Cuci slide dengan PBS (*Phospat Buffer Saline*) 2 kali @ 1-2 menit
 - Streptavidin HRP 10 menit
 - Cuci slide dengan PBS (*Phospat Buffer Saline*) 2 kali @. 1-2 menit
 - *Diaminobenzidine* (DAB) 3 menit
 - Cuci air mengalir kemudian dicelup di tempat berisi aquadest (jaringan terlihat coklat).
 - Slide ditata dalam tempat.
 - Counterstain dengan H&E 30’-1 menit
- Hematoxylin dibuang, cuci air mengalir kemudian dicelup di aquadest.
 - Entellan kemudian tutup deck glass.

4.8.5. Prosedur penghitungan proliferasi sel

Dari masing-masing kelompok diambil massa tumornya, selanjutnya dibuat preparat histopatologi setebal 4 mikron, diwarnai dengan pengecatan Ki-67 untuk mengamati aktifitas proliferasinya

Aktivitas proliferasi sel dihitung dengan melihat jumlah inti sel yang berwarna coklat pada 100 sel. Tiap slide dinilai 10 lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri lagi, kemudian diambil rata-rata hasilnya, menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Dilakukan penilaian jumlah/persentase sel yang tereksperesi positif.

4.9. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada analisa deskriptif aktivitas proliferasi sel dan diameter massa kanker kolon disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median dan box plot.

Variabel bebas menggunakan skala nominal dan variabel tergantung pada penelitian ini menggunakan skala rasio berupa aktivitas proliferasi sel dan diameter massa tumor. Data yang didapat diuji normalitas data, didapatkan data normal sehingga dilanjutkan uji parametrik menggunakan *One-way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* menggunakan LSD. Uji korelasi antara variabel proliferasi sel dengan diameter massa tumor menggunakan uji parametrik dengan uji *Pearsons*. Batas derajat kemaknaan $p \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%. Analisa data dilakukan dengan software SPSS Ver. 17.0 *for Windows*.