

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Ruang Lingkup Penelitian

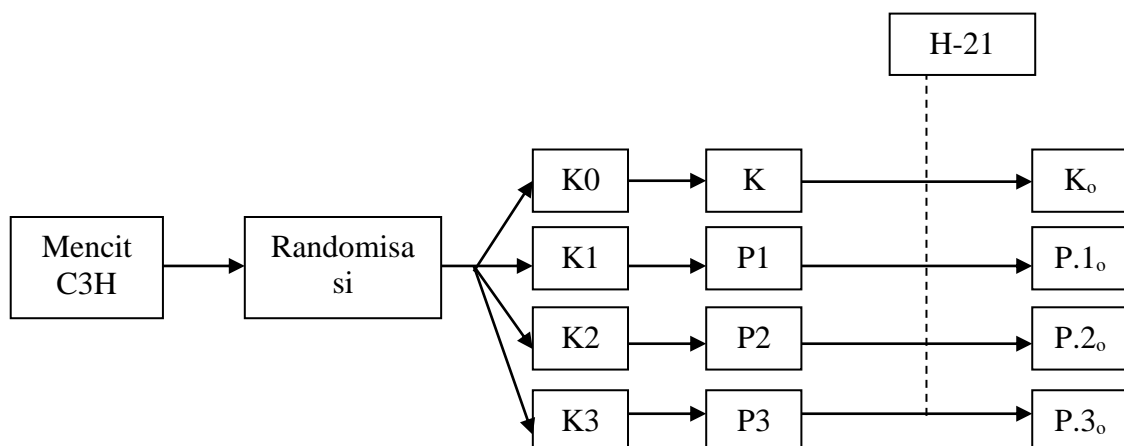
Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu bedah, ilmu patologi anatomi, biologi molekuler dan farmakologi.

#### 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama lebih kurang 3 minggu.

#### 4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan : ” *Post test control group design*”.



**Ket:**

K0 = kelompok kontrol

K1 = kelompok 1

K2 = kelompok 2

K3 = kelompok 3

K = makan minum standard

P1 = makan minum standard, dan perlakuan dengan kencur dosis 1

P2 = makan minum standard, dan perlakuan dengan kencur dosis 2

P3 = makan minum standard, dan perlakuan dengan kencur dosis 3

K<sub>o</sub> = kelompok kontrol setelah 21 hari perlakuan

P.1 = P1 setelah 21 hari perlakuan

P.2 = P2 setelah 21 hari perlakuan

P.3 = P3 setelah 21 hari perlakuan

#### **4.4 Populasi dan Sampel**

##### **4.4.1 Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain C<sub>3</sub>H yang terdapat di laboratorium Patologi FKUI yang telah diinokulasikan dengan bubur tumor dan tumbuh tumor. Mencit betina strain C<sub>3</sub>H. *Strain* ini dipilih karena selain sudah sering digunakan untuk penelitian kanker juga dapat diamati respon selulernya. Penentuan jenis kelamin mencit yang dipakai pada penelitian ini dilakukan untuk memudahkan pemeliharaan karena jenis kelamin betina tidak begitu agresif dibandingkan jenis jantan sehingga dapat mengurangi resiko terjadinya cedera karena perkuliahan. Adanya cedera ini akan menimbulkan kerancuan dalam menilai respon imunitasnya.

#### 4.4.2 Sampel

Metode pengambilan sampel dari penelitian ini adalah *systematic random sampling*. Penentuan besar sampel yaitu jumlah sampel minimal 6 ekor perkelompok sesuai Rumus Frederer  $(t-1)(n-1) \geq 15$  t = jumlah kelompok perlakuan; n = jumlah subjek tiap kelompok. Jumlah kelompok dalam penelitian adalah 4 kelompok, sehingga jumlah total yaitu terdapat 24 ekor mencit C<sub>3</sub>H.

##### Kriteria Inklusi

- a. Mencit betina umur 3 bulan
- b. Strain C3H.
- c. Berat badan 20-30 gram setelah aklimatisasi.
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.
- e. Tumor yang diinokulasikan jenis Adenokarsinoma Mammae

##### Kriteria Droop Out

- a. Selama perlakuan mencit tidak ada yang mati.

##### Kriteria Ekslusi

- a. Tidak tumbuh tumor setelah dilakukan inokulasi.
- b. Selama inokulasi dan perlakuan mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif).

Sampel dibagi dalam 4 kelompok :

- i. Kelompok I (K)

Terdiri dari 6 ekor mencit bertumor sebagai kontrol positif.

- ii. Kelompok II (P1)

Terdiri dari 6 ekor mencit bertumor yang mendapatkan perlakuan pemberian ekstrak etanol kencur secara lokal dengan dosis 100 mg/kgBB.

- iii. Kelompok III (P2)

Terdiri dari 6 ekor mencit bertumor yang mendapatkan perlakuan pemberian ekstrak etanol kencur secara lokal dengan dosis 150 mg/kgBB

iv. Kelompok IV (P3)

Terdiri dari 6 ekor mencit bertumor yang mendapatkan perlakuan pemberian ekstrak etanol kencur secara lokal dengan dosis 200 mg/kgBB

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 3hari. Selama dalam pemeliharaan mencit diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan mencit sebelum mendapat perlakuan.

## **4.5 Variabel Penelitian**

### **4.5.1 Variabel – variabel penelitian**

#### 4.5.1.1 Variabel Bebas

Kencur (*Kaempferia galangal L*)

#### 4.5.1.2 Variabel Terikat

Ekspresi *COX-2* dan ukuran tumor pada adenocarcinoma mammae

## **4.6 Definisi Operasional**

### **4.6.1 Ekstrak Kencur (*Kaempferia Galanga L*) :**

Ekstrak kencur (*Kaempferia galangal L*) adalah sediaan cair yang dibuat dari rimpang kencur dengan menarik kandungan kimia menggunakan pelarut etanol. Ekstrak kencur dengan 3 dosis berbeda diperoleh dari dosis standar kencur yang dikonversikan dari manusia ke mencit.

Dosis manusia: 250 g *dryroot decoction*/hari ( BB manusia 50 kg)<sup>75</sup>

→  $250/50 = 5 \text{ gram/kgBB} = 5 \text{ mg/g BB}$

Dosis tikus : BB: 20 g →  $5 \times 20 = 100 \text{ mg}$

BB: 30 g →  $5 \times 30 = 150 \text{ mg}$

Dosis yang digunakan dalam penelitian: 100 mg, 150 mg, dan 200 mg untuk melihat efek peningkatan dosis.

Skala : Nominal dengan 4 kategori

#### **4.6.2 COX-2**

Jaringan dalam blok parafin dipotong ukuran 5 mikron dan direkatkan pada kaca obyektif poly-L-lysine dan kemudian dilakukan deparafinisasi. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan metode standar protokol Detection Kit dari BioGenex. Slide yang belum diwarnai diinkubasi dalam larutan trypsin 0,1% dalam buffer sitrat pH 6 selama 10 menit dalam microwave bersuhu 37°C, kemudian dilanjutkan dengan prosedur standar Immunostaining menggunakan antibodi monoclonal COX-2 (BioGenex) USA, dengan dilusi 1:100. Hasil pewarnaan imunohistokimia dievaluasi dengan menggunakan mikroskop cahaya .

#### **4.6.3 Ukuran Tumor**

Ukuran tumor didapat dengan menghitung ukuran diameter tumor dimensi panjang dan lebar, keduanya dijumlah dan hasilnya dibagi dua sehingga didapatkan nilai rata – rata diameter tumor. Alat pengukur yang digunakan adalah

alat caliper tumor (*CaliPro<sup>R</sup>*). Pengukuran dilakukan sebelum dan setelah pemberian ekstrak kencur. Satuan cm.

#### **4.7 Analisis Data**

Hasil yang diperoleh diuji normalitas dengan menggunakan Shapiro – Wilk test untuk mengetahui apakah distribusi data normal dan homogen. Analisis statistik untuk uji beda mean variabel menggunakan *Anova*, dilanjutkan dengan *Post Hoc test*. Uji korelasi Spearman dilakukan terhadap ekspresi COX-2 dan selisih diameter tumor. Batas kemaknaan adalah apabila  $p < 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer.

#### **4.8 Instrumen dan Bahan Penelitian**

##### **4.8.1 Bahan Transplantasi Jaringan Tumor pada Mencit**

- a. Alkohol 70 %
- b. Larutan Garam Fisiologik
- c. Es batu
- d. Mencit donor bertumor
- e. Mencit resipien

##### **4.8.2 Alat Transplantasi Jaringan Tumor pada Mencit**

- a. Cawan petri ukuran 6 Cm
- b. Cawan petri ukuran 15 Cm
- c. Cawan ukuran 10 Cm

- d. Spuit 1 cc
- e. Jarum suntik insulin
- f. Gunting lurus 10 Cm
- g. Gunting bengkok 10 Cm
- h. Pinset anatomi 10 Cm
- i. Alat fiksasi

#### **4.8.3 Alat untuk pembuatan ekstrak kencur**

- a. Alamari pengering
- b. Pengaduk magnetic
- c. Vacum rotary evaporator
- d. Pemanas water bath
- e. Corong Buchner
- f. Kompor
- g. Tabung erlemeyer
- h. Gelas ukur
- i. Cawan
- j. Termometer
- k. Jam / stop watch

#### **4.8.4 Alat untuk pengukuran diameter tumor**

Alat caliper tumor (CaliPro<sup>R</sup>)

## **4.9 Cara Penelitian**

### **4.9.1 Pembuatan Ekstrak Kencur**

Rimpang kencur yang akan dijadikan sampel dibersihkan lalu dirajang-rajang tipis sebanyak 1 kg dan dikeringkan. Ekstraksi dilakukan secara maserasi menggunakan etanol 96% dalam botol kaca berwarna gelap, maserasi dilakukan selama 5 hari ditempat yang terlindung dari cahaya dan ampasnya kembali di maserasi dengan cara yang sama sampai 3 kali, kemudian pindahkan maserat ke dalam wadah tertutup, biarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian endapkan, tuang dan saring. Seluruh maserat yang diperoleh dikentalkan dengan *rotatory evaporator* sehingga didapat ekstrak kental kemudian simpan ditempat sejuk dan terlindung dari cahaya. Hasil ekstraksi diidentifikasi kandungan fitokimianya dan digunakan untuk uji aktifitas pada kanker payudara dengan cara dibuat larutan dengan dosis 100mg/kgBB, 150mg/kgBB, 200mg/kgBB.

### **4.9.2 Prosedur Transplantasi Jaringan Tumor pada Mencit**

- a. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.
- b. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
- c. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.



- d. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong 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 dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk "bubur tumor" yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
- e. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml menggunakan spuit insulin dengan ketepatan  $10^{-1}$ .
- f. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.
- g. Masing-masing mencit diberi nomor ditelinganya dan dimasukkan ke dalam kandang berbeda yang diberi label berisi : jenis kelompok perlakuan, tanggal transplantasi.

#### **4.9.3 Prosedur pengukuran diameter tumor**

Massa tumor diukur menggunakan caliper (CaliPro<sup>R</sup>) dengan ketepatan  $10^{-2}$ . Kita ukur diameter tumor dimensi panjang dan lebar, keduanya dijumlah dan hasilnya dibagi dua sehingga didapatkan nilai rata – rata diameter tumor. Alat pengukur yang digunakan adalah alat caliper tumor (CaliPro<sup>R</sup>). Pengukuran dilakukan sebelum dan setelah pemberian ekstrak kencur. Satuan cm.

#### **4.9.4 Pemberian Perlakuan**

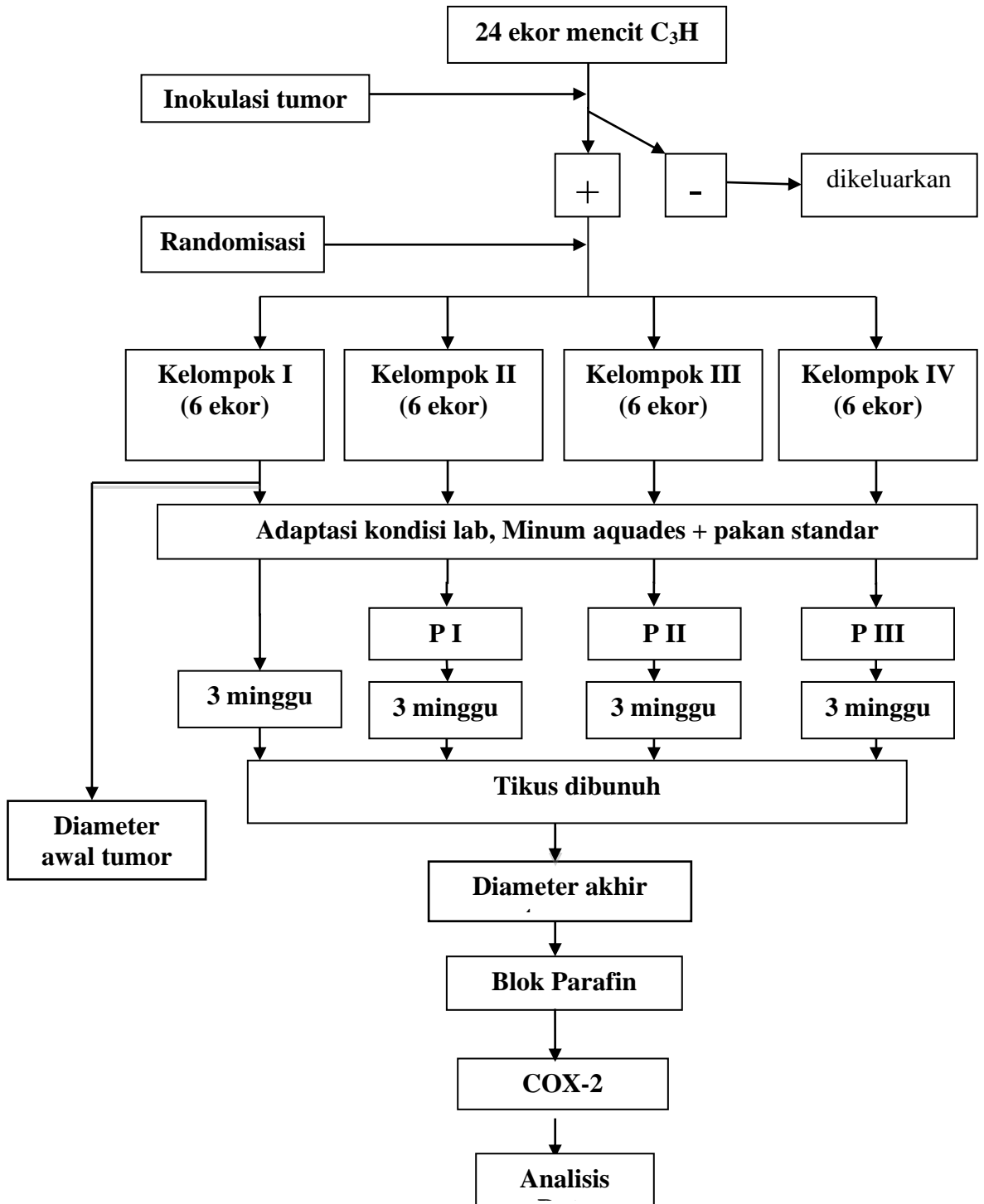
- Cara perlakuan

Dua puluh empat ekor mencit strain C3H diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.

Dua puluh empat ekor mencit tersebut kemudian diinokulasi tumor, diamati selama 4 hari. Pada kelompok mencit yang berhasil diinokulasi dibagi menjadi 4 kelompok ( Kelompok K, P1, P2, P3) yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum dan diukur diameter awal tumornya. Kemudian diberikan perlakuan selama 3 minggu, dan pemberian ekstrak dilakukan dengan pipet mikro. Sedangkan kelompok K tidak mendapat perlakuan

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 diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok paraffin.

#### 4.10. Kerangka Kerja



- P I :Ekstrak kencur dosis 100mg/kgBB/hr
- P II :Ekstrak kencur dosis 150mg/kgBB/hr
- P III :Ekstrak kencur dosis 200mg/kgBB/hr