

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Ruang Lingkup Penelitian

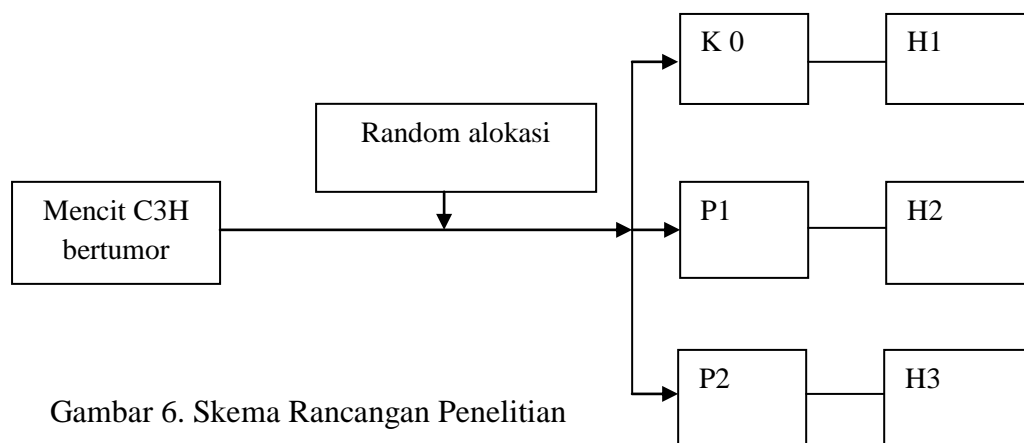
Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu Patologi Anatomi, Farmakologi dan Biologi Molekuler.

4.2. Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Eksperimental Universitas Indonesia Jakarta, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr.Kariadi Semarang, Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Elisabeth Semarang, Laboratorium Patologi Anatomi “Waspada” Semarang.

4.3. Jenis Dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium, dengan rancangan penelitian *randomized post test only controlled group design* untuk melihat ekspresi protein p53 dan Bcl2 karsinoma mammae pada hewan percobaan mencit C3H betina, dengan bagan skema penelitian sebagai berikut :



Gambar 6. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

K0 : Kelompok perlakuan kontrol negatif, dengan perlakuan pemberian ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 0mg/KgBB/hari

P1 : Kelompok perlakuan 1, dengan perlakuan pemberian ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 60mg/KgBB/hari

P2 : Kelompok perlakuan 2, dengan perlakuan pemberian ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 180mg/KgBB/hari

H1 : Mencit C3H kelompok K0 setelah 21 hari perlakuan, diterminasi.

H2 : Mencit C3H kelompok P1 setelah 21 hari perlakuan, diterminasi

H3 : Mencit C3H kelompok P2 setelah 21 hari perlakuan, diterminasi

4.4. Populasi dan Sampel Penelitian

4.4.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah mencit C3H betina bertumor yang diperoleh dan dipelihara di Laboratorium Unit Pengembangan Hewan Coba (UPHN) Universitas Indonesia Jakarta.

4.4.2. Sampel Penelitian

a. Besar Sampel

Penelitian dilakukan menggunakan tiga kelompok perlakuan. Jumlah mencit tiap kelompok dihitung dengan menggunakan rumus WHO, dimana tiap kelompok terdiri dari 5 mencit C3H betina bertumor, ditambah 1 ekor sebagai cadangan, sehingga jumlah sampel minimal untuk 3 kelompok adalah 15 ekor mencit, dengan ditambah 1 ekor mencit

cadangan tiap kelompok. Sehingga jumlah mencit yang digunakan adalah 18 ekor mencit.

b. Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dari populasi mencit secara randomisasi, di mana semua obyek atau elemen populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai sampel, dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut :

Kriteria inklusi :

1. Mencit C3H betina bertumor tampak sehat dan aktif
2. Berusia 6-8 minggu
3. Berat badan 20-30 gram
4. Tidak ada kelainan anatomi

Kriteria Drop Out :

1. Mencit mati dalam masa perlakuan

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Ekstraks akar *Salvia miltiorrhizae Bunge*

4.5.2. Variabel Tergantung

1. Ekspresi p53
2. Ekspresi Bcl2

4.6. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge*

2. Mencit C3H betina bertumor yang diperoleh dari Laboratorium Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Indonesia Jakarta. Tumor mencit C3H dipastikan dengan melakukan terminasi 1 ekor mencit C3H, dan eksisi tumor yang tumbuh, kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan histopatologis jaringan yaitu 14 hari setelah inokulasi bubur tumor, dengan hasil pemeriksaan histopatologi adalah adenokarsinoma mammae.
3. Bahan-bahan perlengkapan untuk penatalaksanaan jaringan sediaan histopatologi konvensional.
4. Bahan-bahan pengecatan rutin *Hematoxyllin-Eosin* (HE).
5. Bahan-bahan pengecatan imunohistokimia protein p53 dan Bcl-2.

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Kandang tikus
2. Sonde untuk memasukkan peroral
3. Alat-alat penatalaksanaan jaringan dan pembuatan sediaan rutin (HE)
4. Alat-alat penatalaksanaan staining imunohistokimia p53 dan Bcl-2
5. Mikroskop binokuler

4.7. Cara Kerja

4.7.1. Pembuatan sediaan peroral ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge*

Dosis yang digunakan adalah 60mg/KgBB dan 180 mg/KgBB diberikan per oral setiap hari sekali.

4.7.2. Penatalaksanaan sediaan histopatologi (Lampiran 1)

4.7.3. Pengecatan rutin jaringan dengan HematoxyllinEosin(HE) (Lampiran 2).

4.7.4. Pengecatan Imunohistokimia dengan p53 (Lampiran 3)

4.7.5. Pengecatan Imunohistokimia dengan Bcl2 (Lampiran 3)

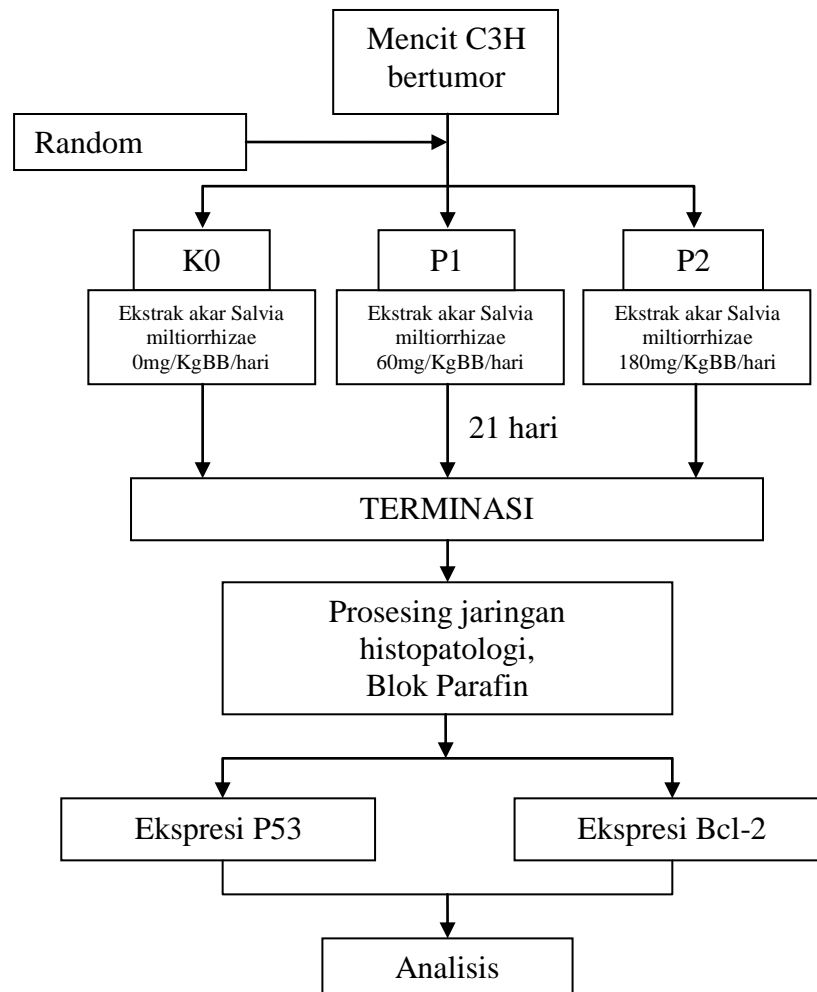
4.7.6. Data yang dikumpulkan

1. Skor ekspresi p53 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang tidak diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* yang dinilai dengan metode *Allred score*, diperiksa menggunakan pembesaran 400x pada 4 daerah kuadran tumor, dan 1 daerah sentral. Skala ordinal.
2. Skor ekspresi p53 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 60mg/KgBB/hari, dinilai dengan metode *Allred score*, diperiksa menggunakan pembesaran 400x pada 4 daerah kuadran tumor, dan 1 daerah sentral. Skala ordinal.
3. Skor ekspresi p53 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 180mg/KgBB/hari, yang dinilai dengan metode *Allred score*, diperiksa menggunakan pembesaran 400x pada 4 daerah kuadran tumor, dan 1 daerah sentral. Skala ordinal.
4. Skor ekspresi Bcl2 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang tidak diberi ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* yang dinilai dengan metode *Allred score*, diperiksa menggunakan

pembesaran 400x pada 4 daerah kuadran tumor, dan 1 daerah sentral. Skala ordinal.

5. Skor ekspresi Bcl2 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 60mg/KgBB/hari, yang dinilai dengan metode *Allred score*, diperiksa menggunakan pembesaran 400x pada 4 daerah kuadran tumor, dan 1 daerah sentral. Skala ordinal.
6. Skor ekspresi Bcl2 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 180mg/KgBB/hari, yang dinilai dengan metode *Allred score*, diperiksa menggunakan pembesaran 400x pada 4 daerah kuadran tumor, dan 1 daerah sentral. Skala ordinal.

4.7.7. Alur Kerja



Gambar 7. Alur Kerja

4.8. Analisis Data

Sebelum dilakukan uji hipotesis, data yang terkumpul terlebih dulu dilakukan proses *editing*, *coding*, *entrying*, dan *cleaning* data.

Analisa statistik uji beda dilakukan dengan menggunakan uji non parametric Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* Mann-Withney U. Nilai p dianggap bermakna jika $p \leq 0,05$ dengan derajat kepercayaan 95% dan power 80%.

4.9. Definisi Operasional

Ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge*

Ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* diperoleh dalam bentuk bubuk warna merah, dibeli dari Tianjin Tasly Pharmaceutical Co., Ltd. (Tasly), yang merupakan salah satu anak perusahaan sub divisi farmasi dari Tasly Group Co., yang berlokasi di pusat dari Bohai Sea Economic Development Circle, Tianjin Beichen Science & Technology Garden. Skala ordinal.

p53 adalah :

Protein yang diekspresikan oleh sel-sel karsinoma mammae yang menandakan adanya reaksi pro apoptotik, tampak positif ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel, dinilai menggunakan metode allred skor. Skala ordinal.

Bcl2 adalah :

Protein yang diekspresikan oleh sel-sel karsinoma mammae yang menandakan adanya proliferasi sel, anti apoptotik, tampak positif ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma sel, dinilai dengan metode allred skor. Skala ordinal.

Allred Score

Allred Score adalah cara penilaian sediaan imunohistokimia, dengan aspek penilaian meliputi proporsi dan intensitas, yang nantinya akan dijumlahkan untuk mendapatkan hasil.

1. *Proportion Score* (PS)

PS adalah jumlah sel yang memiliki ekspresi positif, terhadap anti p53 atau pun Bcl2, yang ditunjukkan dengan adanya warna coklat, dipersentasikan dalam lapangan pandang besar, pembesaran 400x.

PS protein p53 adalah tampak warna coklat dalam inti sel

PS protein Bcl2 adalah tampak warna coklat dalam sitoplasma maupun membran inti sel.

Kriteria penilaian PS adalah :

Skor 0 : tak tampak sama sekali warna coklat

Skor 1 : tampak positif warna coklat pada 1% lapangan pandang

Skor 2 : tampak positif warna coklat pada 1-10% lapangan pandang

Skor 3 : tampak positif warna coklat pada 10-33% lapangan pandang

Skor 4 : tampak positif warna coklat pada 33-66% lapangan pandang

Skor 5 : tampak positif warna coklat pada 66-100% lapangan pandang

2. *Intensity Score (IS)*

IS adalah derajat intensitas ekspresi warna coklat yang dinilai dengan melihat kepadatan warna pada sel yang mengekspresikan protein tersebut.

Kriteria penilaian :

Skor 0 : negatif

Skor 1 : intensitas warna ringan, tipis

Skor 2 : intensitas warna sedang

Skor 3 : intensitas warna berat/ kuat

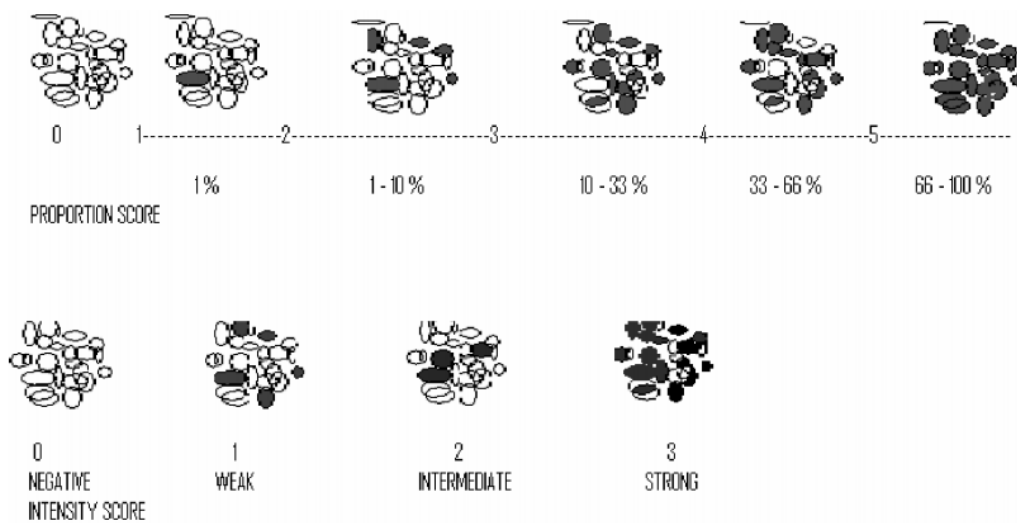
Intepretasi *Allred Score* = PS +IS

0 – 1 : tidak ada efek

2 – 3 : sedikit, 20% perubahan

4 – 6 : sedang, 50% perubahan

7 – 8 : baik, 75% perubahan



Gambar 8. Representasi Diagramatik Interpretasi *Allred Score*⁶²

4.10. *Ethical Clearance*

Penelitian ini dilakukan setelah diperiksa oleh komisi *Ethical Clearance* Universitas Diponegoro (lampiran).