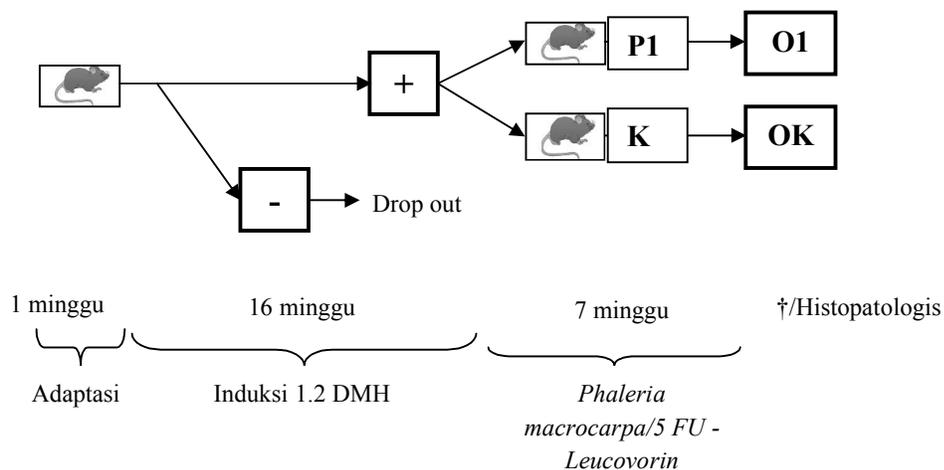


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain “*Post test only control group design*”. Kelompok penelitian dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok Kontrol (K), Kelompok Perlakuan (P), dengan rancangan penelitian sebagai berikut :



Gambar 6. Rancangan penelitian

Setelah dilakukan adaptasi 1 minggu 20 ekor tikus betina strain *Sprague Dawley* diinduksi *1,2-dimethylhydrazine* dengan dosis 30 mg/kgBB/minggu s.c selama 16 minggu. Setelah timbul adenokarsinoma kolorektal kemudian dilakukan random alokasi dengan metode *simple random sampling* menjadi 2 kelompok. Kelompok I sebagai kelompok kontrol atau K, dan kelompok II sebagai kelompok perlakuan atau P1. Pada minggu ke-23 setelah induksi pertama dilakukan terminasi, dilanjutkan isolasi jaringan adenokarsinoma kolorektal, dan pembuatan sediaan histopatologi

Keterangan

K : Kelompok kontrol, tikus yang diinduksi karsinogen , setelah timbul benjolan diterapi dengan 5FU-Leucovorin serta diberi plasebo aquabidest 0,99 mL /hari peroral

P1 :Kelompok perlakuan , tikus yang diinduksi karsinogen, setelah timbul benjolan diterapi dengan 5FU-leucovorin dan. diberi *Phaleria macrocarpa* 0,495 mg /hari (0,99 mL /hari) peroral

O1: Terminasi kelompok perlakuan dilanjutkan pemeriksaan histopatologi

OK: Terminasi kelompok kontrol dilanjutkan pemeriksaan histopatologi

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi target adalah tikus putih strain *Sprague dawley*, populasi terjangkau adalah tikus putih strain *Sprague dawley* sia 6-7 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Jenis kelamin tikus putih betina dipilih karena tidak begitu agresif.

4.2.2 Sampel

Sampel diambil secara acak dari populasi terjangkau yaitu tikus putih strain *Sprague dawley* usia 6-7 minggu (sesuai usia eksperimental) dengan syarat memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria Inklusi:

1. Berat badan 200 gram
2. Timbul adenokarsinoma kolon

Kriteria Eksklusi:

- 1 Terdapat kelainan anatomis pada saat dilakukan perlakuan
- 2 Perubahan perilaku (tidak nafsu makan, tidak lincah)

Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan menurut WHO minimal 5 ekor.⁶²

Pada penelitian ini sampel tiap kelompok berjumlah 6 ekor tikus. Penelitian yang dilakukan Nauss et al (1984) berupa pemberian *1,2-dimethylhidrazine* pada 40 ekor tikus putih strain *Sprague dawley* dengan dosis 65 mg/kgBB/minggu selama 5 minggu, sebanyak 33 ekor berkembang menjadi adenokarsinoma kolorektal setelah 16 minggu sejak pemberian pertama.⁶³ Penelitian yang dilakukan oleh Samiasih (2010) menunjukkan bahwa induksi *1,2-dimethylhidrazine* dosis 20 mg/kgBB/minggu, tumor kolorektal sudah muncul 12 minggu sejak pemberian induksi pertama. Pada penelitian ini, sebanyak 20 ekor tikus putih strain *Sprague dawley* dilakukan proses adaptasi selama 1 minggu, kemudian diinduksi oleh *1,2-dimethylhidrazine* dosis 30 mg/kgBB/minggu selama 16 minggu.⁶⁴ Proses randomisasi dilakukan dengan metode *Simple Random Sampling* dan dibagi menjadi 2 kelompok.

4.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dipilih sebagai tempat pemeliharaan dan intervensi hewan coba, semenjak masa seleksi sampai masa perlakuan yang berlangsung selama 24 minggu. Sedangkan pemeriksaan histopatologi mulai dari pembuatan blok parafin sampai pewarnaan H&E dan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS Dr Sardjito Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa*.

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah densitas sel NK dan ekspresi *granzym B*

4.4.3. Definisi operasional

1. Ekstrak *Phaleria macrocarpa* adalah ekstrak yang berasal dari daging buah 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 melalui sonde. Diberikan setiap hari secara berurutan selama 49 hari (7 minggu).

Skala variabel : Nominal

2. 5FU dan Leucovorin merupakan regiment kemoterapi lini pertama pada kanker kolorektal, dengan masing – masing dosis yang diberikan adalah 0.27 mg secara intravena setiap minggu selam 6 minggu secara berurutan, sesuai *Rosswell Park Regiment*.⁵⁹

Skala variabel : Nominal

3. Densitas sel NK dihitung dengan menggunakan mikroskop. Pengecatan preparat menggunakan pewarnaan hematoksilin & eosin (HE) dipastikan secara histologis adalah tumor colon, kemudian dibuat preparat yang sama dengan pewarnaan imunohistokimia cluster differentiated-56 (IHC CD-56) dimana sel NK dihitung per 100 sel tumor menggunakan pembesaran 400x,

dari 5 lapangan pandang tiap preparat, dalam satu blok paraffin, hasil diambil rata-ratanya. Lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan. Penghitungan dilakukan pada daerah yang bukan sentral nekrosis. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

Skala variabel : rasio

4. Ekspresi *granzyme B* dihitung sesuai dengan modifikasi metoda yang digunakan oleh Kato *et al*, di mana dihitung dari jumlah semua sel mononuclear yang berwarna coklat dengan pewarnaan antibody monoclonal anti *granzyme B* pada setiap 100 sel tumor, dan dilihat dengan mikroskop cahaya (LPB/40x10) lalu dihitung jumlah sel limfosit di sekitar sel kanker yang memproduksi *granzyme B* yang berwarna coklat dengan pada 5 lapangan pandang kemudian diambil rata-rata persentasenya. Dilihat dari kiri ke kanan. Perhitungan dilakukan di daerah yang bukan sentral nekrosis dan dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

Skala variabel : rasio

5. Aquabidestilata adalah air kemasan steril yang biasa digunakan sebagai placebo, untuk kepentingan farmasi atau kimia dengan dosis 0,99 mL /hari peroral dengan sonde selama 49 hari.

4.5. Bahan dan Peralatan Penelitian

4.5.1. Bahan Untuk Perlakuan

1. Tikus betina strain *Sprague dawley* dengan umur 6-7 minggu, berat 200 gram.
2. Pakan standart berbentuk palet.
3. aquabidestilata
4. Kanker kolon diperoleh dengan cara induksi *1,2-dimethylhidrazine* dosis 30mg /kgBB/minggu.
5. *5FU-Leucovorin* dengan merek dagang Fluorouracyl dan RescuvoLin dari Kalbe farma.
6. *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 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. Diperoleh 5,5 mg ekstrak dari setiap 1 kg bahan (0,55%), yang mengandung *3,4,5-trihydroxybenzoic acid* 10%, kemudian diencerkan sampai konsentrasi 0,5 mg/mL .

Dosis hewan coba disetarakan dengan dosis pada manusia yaitu dari serbuk daging buah 5 gram/hari,²⁴ dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (tikus) yaitu 0,018⁶⁵ 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 jaringan

- a. *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 TDEC
- g. *Canada balsam* dan entelan

4.5.3. Alat untuk perawatan tikus:

Kandang, alat sonde, disposable sringe, timbangan

4.5.4. Alat untuk prosesing jaringan:

Peralatan bedah mikro untuk terminasi tikus, parafin, basket cetakan block

4.5.5. Alat untuk pemeriksaan jaringan:

- a. preparat obyek dan deck glass
- b. *Staining Jar*
- c. Inkubator suhu 56 °C Memmert^R
- d. Mikrotom Leica^R RM-2135
- e. Mikroskop

4.5.6. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan

- a. 1 unit *multi head microscope Olympus^R*
- b. *Nikon^R digital net camera DN 100 + SD Card*
- c. 1 unit netbook *Intel Atom^R Processor*

4.6. Tehnik pengumpulan data

4.6.1. Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Sebanyak 20 ekor tikus dikandangkan secara individual dengan ventilasi yang cukup, suhu dipertahankan pada suhu 28-32°C dengan kelembaban sekitar $56 \pm 5\%$. Dan dibersihkan 2 hari sekali. Pakan yang diberikan dalam bentuk pakan standart yang sama dan minum *ad libitum*. Selama penelitian tidak ada tikus yang mati.

4.6.2. Prosedur pemberian pakan dan Perlakuan

Semua tikus yang telah diaklimatisasi selama satu minggu kemudian di induksi *1,2-dimethylhidrazine* dosis 30 mg/kgBB/minggu selama 16 minggu. Pada minggu ke 16 semua tikus dibagi menjadi 2 kelompok yang sama secara *simple random sampling*. 6 kelompok kontrol (K) dan 6 kelompok perlakuan (P1). Kelompok (K) diberi pakan dan minum standart selama 24 minggu, kemudian mendapat 5FU dosis 0.27 mg dan Leucovorin dosis 0.27 mg, masing –masing secara intravena setiap minggu selama 6 minggu secara berurutan dan pemberian placebo aquabidest 0.99ml/hari peroral dengan sonde selama 49 hari (7 minggu). Kelompok (P1) diberi pakan dan minum standart selama 24 minggu, kemudian mendapat perlakuan pemberian 5FU dosis 0.27 mg dan Leucovorin dosis 0.27 mg, masing –masing secara intravena setiap minggu selama 6 minggu secara

berurutan dan pemberian ekstrak *Phaleria macrocarpa* 0.99ml/hari peroral dengan sonde selama 49 hari (7 minggu).

4.6.3. Prosedur Pembedahan Hewan Coba

Prosedur pembedahan dilakukan setelah timbulnya adenokarsinoma kolorektal dapat dikonfirmasi dan dilakukan terminasi pada semua tikus. Pembedahan, dimulai dari bagian perut, kemudian organ yang mengandung tumor di pisahkan dan dibersihkan. Organ dimasukkan kedalam pot yang sudah diberi formalin 4-10 %. Pot diberi label sesuai nomer tikus yang dibedah. kemudian diproses menjadi preparat histologik setelah dibuat blok parafin. Bagian dari sisa organ hewan uji yang tidak terpakai di masukkan ke plastik, kemudian dimusnahkan dengan insinerasi. Kemudian peralatan yang telah terpakai di cuci dengan sabun, bila perlu dengan alkohol.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1. Aklimatisasi

Sebanyak 20 ekor tikus putih strain *Sprague Dawley* usia 6-7 minggu 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*.

4.7.2. Jaringan Adenokarsinoma kolorektal

Jaringan Adenokarsinoma kolorektal yang sudah diisolasi kemudian dilakukan fiksasi formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium asetat sampai mencapai pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah dimasukkan dalam alkohol bertingkat sampai dehidrasi, kemudian dilakukan *clearing*, *Impragnating*,

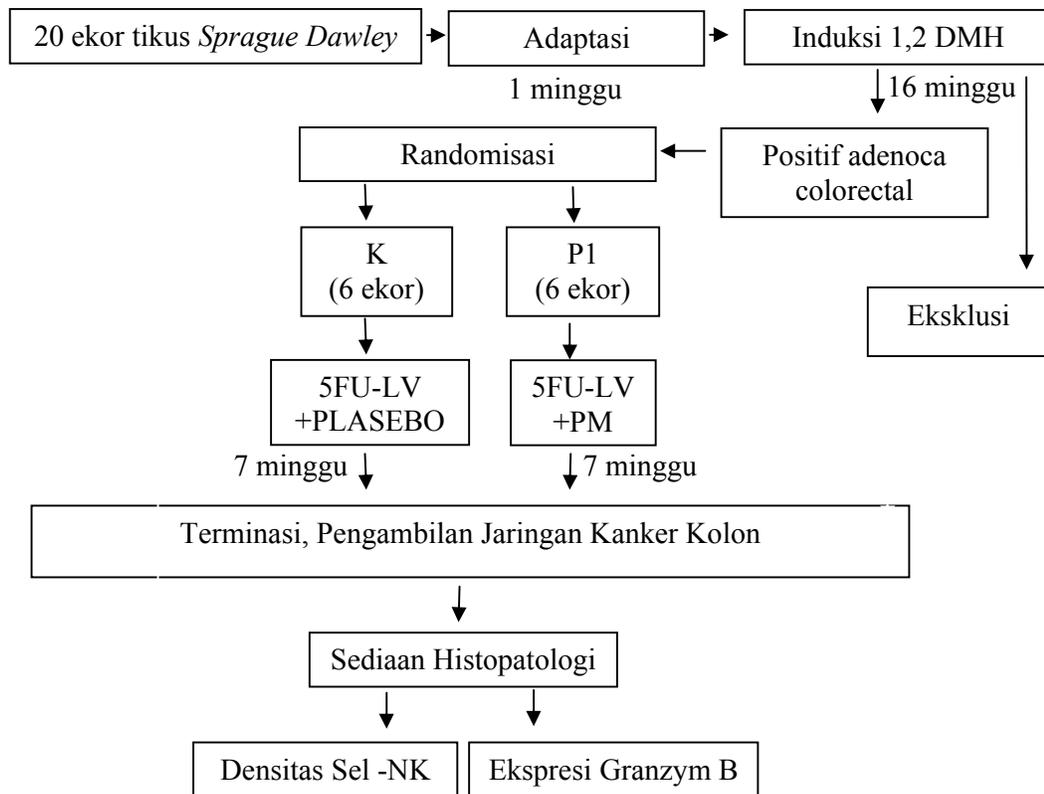
imbedding dan *mountin*. Setelah dilakukan prosesing, kemudian dilakukan pembacaan jumlah densitas sel NK dan Granzyme B pada semua kelompok.

4.7.3. Prosedur penghitungan densitas sel NK dan ekspresi *granzym B*

- Pembacaan preparat dengan pewarnaan imunohistokimia cluster differentiated-56 (IHC CD-56) dimana sel NK dihitung per 100 sel tumor menggunakan pembesaran 400x, dari 5 lapangan pandang tiap preparat, dalam satu blok paraffin, hasil diambil rata-ratanya. Lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri lagi. Penghitungan dilakukan pada daerah yang bukan sentral nekrosis. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

- Ekspresi *granzyme B* dihitung sesuai dengan modifikasi metoda yang digunakan oleh Kato *et al*, di mana dihitung dari jumlah semua sel mononuclear yang berwarna coklat dengan pewarnaan antibody monoclonal anti granzyme B pada setiap 100 sel tumor, dan dilihat dengan mikroskop cahaya (LPB/40x10) lalu dihitung jumlah sel limfosit di sekitar sel kanker yang memproduksi granzyme B yang berwarna coklat dengan pada 5 lapangan pandang kemudian diambil rata-rata persentasenya. Dilihat dari kiri ke kanan. Perhitungan dilakukan di daerah yang bukan sentral nekrosis dan dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95 %.

4.8. Alur Kerja



Gambar 7. Alur Penelitian

Setelah dilakukan adaptasi 1 minggu 20 ekor tikus betina strain *Sprague Dawley* diinduksi 1,2-dimethylhidrazine dengan dosis 30 mg/kgBB/minggu s.c selama 16 minggu. Setelah timbul adenokarsinoma kolorektal kemudian dilakukan random alokasi dengan metode *simple random sampling* menjadi 2 kelompok. Kelompok I sebagai kelompok kontrol atau K, tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma kolorektal yang diberi kemoterapi 5FU-Leucovorin dosis 0,27 mg s.c. tiap minggu selama 6 minggu dan plasebo berupa aquabidest 0,99 ml/hari peroral. Kelompok II sebagai kelompok perlakuan atau P1, tikus *Sprague Dawley* dengan adenokarsinoma kolorektal yang diberi pakan standart dan pemberian kemoterapi 5FU-Leucovorin dengan cara dan dosis yang sama dan ekstrak *Phaleria macrocarpa* dengan dosis 0,495 mg/hari (0,99 ml/hari) peroral tiap hari selama 7 minggu. Pada minggu ke-23 dilakukan terminasi, dilanjutkan isolasi jaringan adenokarsinoma kolorektal, dan pembuatan sediaan histopatologi. Kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat densitas sel NK dan granzym B sel adenokarsinoma kolorektal.

4.9. Analisis data

Data yang terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dan uji hipotesis. Pada uji hipotesis densitas sel NK dan *Granzyme B* sel adenokarsinoma kolorektal disajikan dalam bentuk tabel rerata, SD, median, grafik garis dan box plot.

Analisa statistik menggunakan *t - test independent* untuk mengetahui perbedaan kedua kelompok, bila data yang didapat mempunyai distribusi yang normal. Untuk uji korelasi antara variabel dilakukan uji korelasi Pearsons, batas derajat kemaknaan $p \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%. Analisa data dilakukan dengan software SPSS *for Windows*.

4.10. Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan sebagai obyek penelitiannya, sehingga penalaksanaannya sesuai *animal ethics*. Karena penelitian ini merupakan penelitian payung maka *Ethical clearance* diajukan secara bersama kepada komisi etik pemeliharaan kesehatan FK UNDIP/ RS Dr. Kariadi Semarang.

4.11. Keterbatasan Penelitian

Peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih menggunakan ekstrak *Phaleria macrocarpa* yang belum dimurnikan sehingga belum mampu menilai efek masing –masing komponen baik yang bersifat sinergis maupun sebaliknya. Selain itu penelitian ini tidak menilai komponen imunitas lain yang terkait dalam *immunosurveillance*. Kekurangan pada penelitian ini yang harus diperbaiki sehingga dapat menjadi dasar ilmiah yang bermanfaat untuk penelitian – penelitian selanjutnya.