

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Berdasarkan sifat permasalahannya maka penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik (M. Zainuddin, 1995).

4.2 Matrik Penelitian

Kelompok kontrol (tanpa mikrowave) —→ dihitung jumlah RE
 Kelompok perlakuan (mikrowave) —→ dihitung jumlah RE

Tabel 4.2

VARIABEL	KELOMPOK KONTROL (tanpa mikrowave)	KELOMPOK PERLAKUAN (mikrowave)
RE	-	-

Keterangan :

Jumlah RE positif terhadap sel kanker payudara per 100 sel, dengan metode pemeriksaan imunohistokimia yang menggunakan mikrowave dan tanpa menggunakan mikrowave.

4.3 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah penderita karsinoma payudara jenis "infiltrating ductal" (NOS) yang diperiksa di RSUD. Dr. Soetomo mulai bulan Maret 1998 sampai dengan bulan September 1998. Sampel diambil dari pemeriksaan yang telah didiagnosis histopatologi sebagai karsinoma payudara jenis "infiltrating ductal" (NOS).

Rumus untuk mencari besar sampel (Higgins dan Kinbant, 1985) :

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot S_c^2}{(X_c - X_t)^2}$$

Keterangan : $\alpha = 5\%$

$\beta = 10\%$

$n =$ jumlah sampel

$f =$ proporsi yang gagal

$X_c =$ nilai rata-rata kelompok kontrol

$X_t =$ nilai rata-rata kelompok perlakuan

$S_c =$ standar deviasi

Dari hasil penelitian pendahuluan diperoleh :

$$Z_{\alpha} = 1,98 \quad X_c = 29$$

$$Z_{\beta} = 1,28 \quad X_t = 68$$

$$f = 0,05 \quad S_c = 14,491376$$

$$\begin{aligned} n &= \frac{1}{(1 - 0,05)} \times \frac{2(1,98 + 1,28)^2 \cdot (14,49138)^2}{(68 - 29)} \\ &= \frac{1}{0,5} \times \frac{46363,592}{1521} \end{aligned}$$

n = 2 X 3,067
 n = 6,314
 n = 6
 =====

Pada penelitian ini diambil sebanyak 33 sampel

4.4 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini yang diamati adalah jumlah reseptor estrogen pada karsinoma payudara jenis " *infiltrating ductal* " (NOS).

4.4.1 Klasifikasi variabel

Variabel terikat adalah jumlah reseptor estrogen. Variabel bebas adalah perlakuan mikrowave. Variabel kendali adalah suhu, waktu, dan pH.

4.4.2 Definisi variabel

Variabel terikat adalah jumlah reseptor estrogen yang dihasilkan pada metode imunohistokimia.

Variabel bebas adalah terdiri dari perlakuan dengan mikrowave.

4.5 Bahan Penelitian

Bahan-bahan penelitian yang dipakai adalah jaringan hasil biopsi/operasi dari penderita karsinoma payudara, jenis "*infiltrating ductal*" (NOS), polilisin (Sigma), ethanol absolut, ethanol 96%, ethanol 90%, ethanol 80%, dan ethanol 70%, xylol, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, mayer hematoxylin, dan akuades steril.

4.6 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beker, *mikrowave*, *timer*, *staining jar*, *inkubator*, *microtom*, *water bath*, *tissue prosessor*, pipet serologis, *freezer*, *object glass*, *cover glass*, entelan, timbangan analitik, mikroskop cahaya, gelas ukur, kamera, dan film.

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.7.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan RSUD Dr. Soelomo Surabaya.

4.7.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan bulan Maret 1998 sampai bulan September 1998.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Prosedur pengambilan bahan dan pemeriksaan sediaan

Setelah sediaan diterima kemudian diproses sampai menjadi blok parafin, 1 blok dipotong menjadi 3 sediaan dengan ukuran 4 sampai 6 mikron, 2 sediaan untuk diwarnai imunohistokimia, 1 sediaan untuk kontrol positif yang diambil dari pemeriksaan yang sudah pernah dilakukan dengan hasil yang menunjukkan reseptor estrogen positif.

4.8.2 Cara Pembuatan Sediaan Bahan Penelitian

Bahan sediaan dimasukkan larutan fiksasi berupa formalin atau larutan formalin 10% dalam bufer Natrium Asetat sampai mencapai pH 7.0. Waktu fiksasi jaringan hasil operasi selama 18 jam sampai 24 jam dan untuk bahan biopsi selama 4 sampai 6 jam pada suhu kamar. Potongan ini kemudian dimasukkan ke dalam fiksasi tersebut.

Pengolahan Jaringan

Penelitian ini menggunakan alat *autotech nikon histokinet 2000* untuk proses jaringan.

Prosedur pewarnaan Mayer Hematoksilin :

Xilol I selama 5 menit

Xilol II selama 5 menit

Alkohol absolut selama 2 menit

Alkohol absolut selama 2 menit

Air mengalir selama 2 menit

Mayer Hematoxilin selama 5 menit

Alkohol asam 0,4% selama 2 - 3 celup

Air mengalir selama 5 menit

Lithium karbonat jenuh selama 2 - 3 celup

Air mengalir selama 2 menit

Eosin selama 1 menit

Alkohol absolut selama 2 menit

Alkohol absolut selama 2 menit

Alkohol absolut selama 2 menit

Xilol selama 5 menit

Xilol selama 5 menit

Xilol selama 5 menit

Mounting

4.8.3 Pembuatan media

a. PBS (Phosphat Buffer Saline) 10 X

NaCl sebanyak 87,5 gr, KH_2PO_4 1,92 gr, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15,33 gr. Masing-masing dilarutkan dalam akuades dan dicampurkan. Akuades ditambahkan hingga mencapai 800 ml. Diaduk-aduk sampai rata selanjutnya ditambahkan akuades hingga mencapai 1 liter.

b. Tris buffer

1,21 gr Tris ditambah 170 ml akuades serta ditambahkan HCl 1 N sampai pH 7,6. Setelah pH mencapai 7,6 maka ditambahkan lagi akuades hingga mencapai 200 ml.

Cara membuat HCl 1 N :

1,25 ml HCl 25% ditambahkan 6,75 akuades kemudian diaduk sampai larut.

c. Larutan DAB (*Diamino benzidine*)

Satu tablet DAB sama dengan 10 mg DAB. Satu tablet DAB ditambah 10 ml larutan Tris pH 7,6 kemudian diaduk sampai larut. Dan ditambahkan 10 μ l H₂O₂ 30%.

d. Larutan PBS + 1% BSA

BSA yang tersedia adalah 20% BSA sama dengan 200 grol per liter BSA. Jadi membuat BSA 1% sebanyak 10 ml adalah $X=10/20=0,5$.

Jadi BSA 20% diambil 0,5 ml ditambah dengan 9,5 ml PBS sama dengan 10 ml PBS 1%.

Untuk antibodi sekunder dan streptavidin diencerkan dengan PBS + 1% BSA.

Caranya :

Mengambil 9,75 ml PBS kemudian ditambah 0,25 ml BSA 1% maka sama dengan PBS + BSA 1%.

e. Larutan PBS + 0,5 % BSA

BSA 1% yang tersedia diambil 5 ml ditambah 5 ml PBS maka sama dengan 10 ml BSA 0,5%.

Keterangan :

Untuk mengencerkan monoklonal antibodi dengan PBS + BSA 0,5%.



Caranya :

Ambil 9,75 ml PBS + 0,25 ml BSA 0,5% sama dengan PBS + BSA 0,5%.

f. Larutan blocking

Ambil 80 ml methanol ditambah 0,8 ml H₂O₂ 3%.

Keterangan : Untuk membuat H₂O₂ 3% adalah kita mengambil 9 ml akuades lalu ditambah 1 ml H₂O₂ 30%.

g. Larutan pepsin

20 ml pepsin ditambah 4950 µl akuades dilarutkan terlebih dulu, kemudian ditambah 1 N. Membuat larutan HCl 1 N sebanyak 10 ml. 1,25 ml HCl 25% ditambah 8,75 ml akuades dicampur sampai larut.

4.8.4 Penanaman jaringan dalam blok parafin

Tahap rehidrasi :

Sediaan jaringan dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, dan 90% masing-masing selama 2 jam, kemudian pada 96% dan alkohol absolut masing-masing selama 1 jam.

Tahap penjernihan/klining :

Sediaan dimasukkan dalam xilol alkohol 1 : 1 selama 1 jam. Dimasukkan dalam xilol I selama 2 jam dan selanjutnya dalam xilol II selama 2 jam.

Tahap embedding :

Dimasukkan dalam parafin cair I bershu 56 - 58°C selama 2 jam.

Dimasukkan dalam parafin cair II dalam suhu yang sama selama 1 jam.

Tahap pemblokiran/penanaman jaringan :

Jaringan dimasukkan dalam parafin untuk dijadikan blok.

4.8.5 Pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan mikrowave

Deparafinisasi :

Xilol sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit; alkohol absolut sebanyak 1 kali selama 5 menit; alkohol 96% sebanyak 1 kali selama 5 menit; dan alkohol 80% sebanyak 1 kali selama 5 menit.

Dilakukan bloking dengan H_2O_2 dalam metanol selama 30 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan air mengalir selama 1 menit

Dilakukan tahap mikrowave :

Slide diletakkan dalam staining jar yang berisi buffer sitrat pH 6,0 dan ditutup. Kemudian ditaruh dalam beker glass yang berisi buffer sitrat pH 6,0, permukaan buffer sitrat dalam beker glass harus lebih tinggi dari permukaan buffer sitrat pada staining jar. Kemudian dimasukkan dalam mikrowave ditekan waktu selama 10 menit dalam *high level*. Setelah mendidih pertama kemudian dimatikan.

Kemudian dinyalakan lagi dengan *med low level* selama 10 menit. Dikeluarkan dari mikrowave dan diletakkan di atas meja. Tutup staining jar dibuka dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu ruang. Staining jar diambil dari beker

glass dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruang.

Diberi garis *pap pen* kemudian dimasukkan dalam PBS selama 5 menit.

Dilakukan *blocking* serum dengan 3% NHS (*Normal Horse Serum*) selama 20 menit pada suhu ruang.

Dibuang dari sisa NHS tidak usah dicuci, kemudian ditetesi antibodi primer (estrogen reseptor) selama 30 menit.

Dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 3 menit.

Ditetesi antibodi sekunder (E 354) yang diencerkan dengan NHS 3% selama 30 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing 3 menit.

Ditetesi peroksidase conjugate streptavidin selama 60 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan PBS 2 kali selama 3 menit.

Ditetesi larutan peroksidase DAB selama 15 menit.

Dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 3 menit.

Dilakukan *counter staining* dengan Mayer hematoxylin selama 5 menit pada suhu ruang.

Air mengalir selama 15 menit.

Dilakukan dehidrasi dengan : alkohol 80%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam xilol I, II, dan III yang masing-masing selama 5 menit.

Dilakukan mounting dengan entelan.

4.8.6 Pemeriksaan imunohistokimia tanpa menggunakan mikrowave

Deparafinisasi :

Xilol sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit; alkohol absolut sebanyak 1 kali selama 5 menit; alkohol 96% sebanyak 1 kali selama 5 menit; dan alkohol 80% sebanyak 1 kali selama 5 menit.

Dilakukan bloking dengan H_2O_2 0,3% dalam metanol selama 30 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan PBS 4 kali selama 5 menit

Diberi garis *pap pen*.

Ditetesi antibodi primer selama 60 menit pada suhu ruang.

Ditetesi antibodi sekunder (E 354) selama 40 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 3 menit.

Ditetesi *streptavidin* 1/1000 berlabel peroksidase dengan PBS + BSA 1% selama 60 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 3 menit.

Ditetesi larutan peroksidase DAB selama 15 menit.

Dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 5 menit.

Dilakukan *counter staining* dengan Mayer hematoxylin selama 5 menit pada suhu ruang.

Air mengalir selama 15 menit.

Dilakukan dehidrasi dengan : alkohol 80%, 96%, dan alkohol absolut masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam ke xilol i,

II, dan III yang masing-masing selama 5 menit.

Dilakukan mounting dengan entelan.

4.8.7 Pemeriksaan munohistokimia dengan menggunakan reagen kit

Deparafinisasi :

Xilol sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit; alkohol absolut sebanyak 1 kali selama 5 menit; alkohol 96% sebanyak 1 kali selama 5 menit; dan alkohol 80% sebanyak 1 kali selama 5 menit.

Dicuci dengan PBS/Tris selama 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Teteskan botol 2 (H_2O_2) secukupnya untuk menutupi jaringan dan diinkubasi selama 10 menit.

Disemprot dengan PBS/Tris 2 - 3 kali.

Menyiapkan cairan target retrieval 10 kali (1 ml cairan target retrieval ditambah 9 ml akuades).

Merendam sediaan jaringan ke dalam staining jar yang berisi cairan target retrieval 10 menit.

Kemudian staining jar dimasukkan dalam beker glass yang berisi akuades, dengan permukaan beker glass harus lebih tinggi dari permukaan staining jar.

Dimasukkan dalam mikrowave pada posisi *med high* selama 6,5 menit dan dilanjutkan dengan *low level* selama 27 menit. Beker glass dikeluarkan dari mikrowave dan diletakkan di atas meja. Tutup staining jar dibuka dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu ruang. Staining jar diambil dari beker glass

dibiarkan selama 15 menit pada suhu ruang.

Dicuci dengan PBS /Tris di sekitar jaringan sebanyak 2- 3 kali.

Hilangkan kelebihan PBS/Tris di sekitar jaringan dan diseka dengan hati-hati.

Ditetesi botol 3 yaitu antibodi primer (estrogen dan progesteron reseptor) selama 20 menit pada suhu ruang.

Disemprot dengan PBS/Tris 2 - 3 kali.

Ditetesi botol 4 (yellow drop) selama 20 menit pada suhu ruang.

Disemprot PBS/Tris 2 - 3 kali.

Ditetesi botol 5 (red drop) *streptavidin* selama 20 menit pada suhu ruang.

Disemprot dengan PBS/Tris 2 - 3 kali.

Ditetesi larutan substrat chromogen selama 10 menit.

Caranya : 1 tetes DAB Chromogen pada botol 7 ditambahkan 1 ml buffer substrat pada botol 6.

Dibilas dengan akuades dari botol pencuci.

Dilakukan *counter staining* dengan Mayer hematoxylin selama 3 menit pada suhu ruang.

Bilas atau rendam dalam akuades selama 30 detik sampai 2 menit.

Dilakukan mounting dengan *aquadest based mounting medium* atau *non aquadest permanent mounting* .

Sediaan ditutup dengan coover glass.

4.8.8 Penghitungan jumlah reseptor estrogen

Pemeriksaan penghitungan jumlah reseptor estrogen dengan *stratified random sampling*. Yaitu dalam 4 tempat pada sediaan lapangan pandang. Untuk menghitung jumlah reseptor estrogen karsinoma payudara jenis *infiltrating ductal not otherwise specified* (NOS) pada setiap 100 sel pada 4 tempat lapangan pandang. Untuk melakukan perhitungan dilakukan bersamaan dengan pembimbing, yang menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 X. Untuk menentukan hasil reseptor estrogen. Kemudian hasil yang telah diperoleh akan dimasukkan dalam rumus.

4.9 Teknik Analisis Data

Untuk mengetahui peningkatan jumlah reseptor estrogen pada sel karsinoma payudara seberapa banyak jumlah kenaikan reseptor estrogen pada karsinoma payudara dengan metode imunohistokimia dengan menggunakan mikrowave, dengan menggunakan analisis statistik *student T test*, yang menurut Suryadi (1983) adalah :

$$B = \frac{\sum B_1}{n}$$

$$S_B = \sqrt{\frac{n \sum B_i^2 - (\sum B_i)^2}{n(n-1)}}$$

Keterangan :

B_1 = perlakuan kelompok kontrol

B_2 = kelompok perlakuan

B = beda rata-rata

sB = simpangan baku rata-rata

Untuk pengujian hipotesis digunakan rumus :

$$t = \frac{B}{sB/\sqrt{n}}$$