

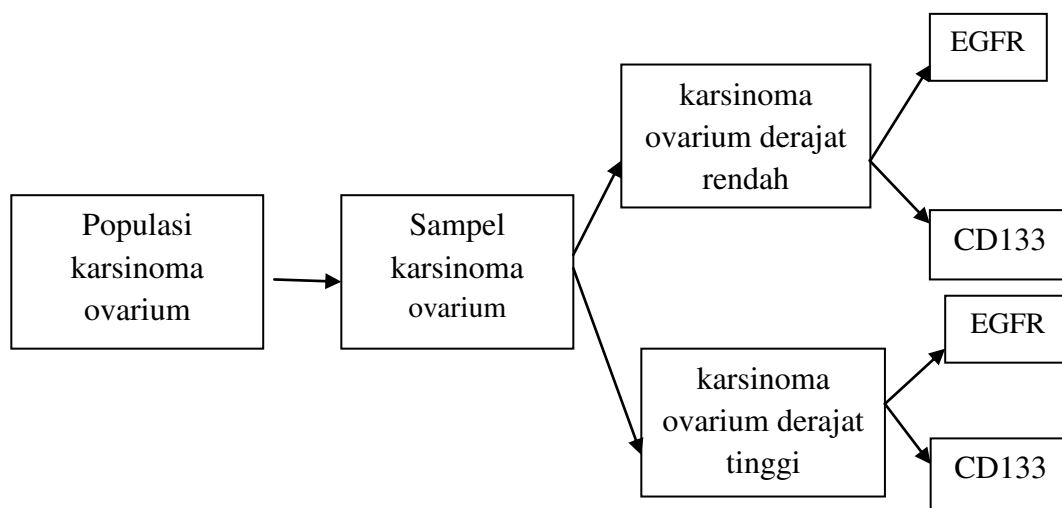
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan dan hubungan antara ekspresi CD133 dan EGFR pada karsinoma ovarium derajat rendah dan karsinoma ovarium derajat tinggi.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*, karena pengamatan variabel dilakukan pada saat yang bersamaan dan peneliti tidak melakukan intervensi pada obyek peneliti.



Gambar 4.1 Skema penelitian

4.2 Populasi dan Sampel Peneliti

Populasi penelitian adalah semua blok paraffin dari penderita karsinoma ovarium yang ditegakkan berdasarkan gambaran histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomik RSUD dr Soetomo Surabaya periode 1 Januari 2017 – 31 Desember 2017.

Sampel penelitian adalah blok paraffin dari penderita karsinoma ovarium yang memenuhi kriteria inklusi sebagai berikut :

1. Blok paraffin berasal dari jaringan tumor ovarium yang diperoleh dari sediaan operasi.
2. Diagnosis histopatologi karsinoma ovarium dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomik RSUD dr Soetomo Surabaya.
3. Blok paraffin berkualitas baik dan masih memiliki sel tumor yang cukup representatif untuk keperluan pemeriksaan Imunohistokimia.

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah : sediaan *second opinion* dari luar rumah sakit Dr Soetomo Surabaya

4.3 Besar Sampel

Sampel diperoleh dengan tehnik simple random sampling, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sampel penelitian (n) diperoleh dengan rumus:

$$n = \left[\frac{Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}}{0,5 \ln \frac{(1+r)}{(1-r)}} \right]^2 + 3$$

Nilai r dari penelitian sebelumnya adalah $r = 0,530$ (Zheng *et al.*, 2017).

Nilai $\alpha = 0,05$, sehingga nilai $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$

Nilai $\beta = 0,2$, sehingga nilai $Z_{1-\beta} = 0,84$

Nilai n (sampel) yang didapat adalah 66 sehingga jumlah sampel setiap kelompok adalah 33 blok paraffin. Pada penelitian ini terdiri dari 2 kelompok yaitu karsinoma ovarium derajat rendah dan karsinoma ovarium derajat tinggi.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti dalam penelitian adalah :

1. Variabel I

Variabel I dalam penelitian ini adalah ekspresi CD133 dan ekspresi EGFR.

2. Variabel II

Variabel II dalam penelitian ini adalah grading pada karsinoma ovarium

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional masing-masing variabel yang akan diteliti diberikan batasan sesuai dengan tujuan penelitian yang dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Definisi operasional variabel penelitian

No	Variabel	Definisi	Alatukur	Hasil ukur	Skala
A. Variabel I					
1.	Ekspresi CD133	Ekspresi CD 133 pada sel tumor karsinoma ovarium, dievaluasi menggunakan metode imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap CD 133 (dilusi 1:1000, <i>Thermo</i>) dan diproses sesuai dengan protokol yang ditentukan. CD 133 terekspresi positif pada membran dan atau sitoplasma sel (Ferandina <i>et al.</i> , 2009; Zang <i>et al.</i> , 2012). Penilaian ekspresi CD 133 menggunakan metode skor <i>immunoreactive</i>	Mikroskop opcahaya binokuler, <i>Olympus CX41RF</i>	Persentase sel positif (A) : 0 : Tidak ada sel yang positif 1 : Sel positif < 10% 2 : Sel positif 10% - 50% 3: Sel positif 51% - 80% 4: Sel positif > 80% Intensitas pewarnaan (B): 0 : tidak berwarna	Interval

score (2014).
 Penilaian akan dinilai oleh satu dokter ahli Patologi Anatomi dan akan dilakukan rerata dari hasil penilaian tersebut.

1: ringan
 2 : sedang
 3 : kuat

- Skor imunoreaktif (AXB):

1. 0-1 = negatif
 2. 2-3 = lemah
 3. 4-8 = sedang
 4. 9-12 = kuat

2.	Ekspresi EGFR	Ekspresi EGFR pada sel tumor karsinoma ovarium, dievaluasi menggunakan metode imunohistokimia dengan antibody monoklonal terhadap EGFR (dilusi 1:100, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>) dan diproses sesuai dengan protokol yang ditentukan. EGFR terekspresi positif pada membran atau sitoplasma sel (Wang <i>et al.</i> , 2016; Zheng <i>et al.</i> , 2017). Penilaian ekspresi EGFR menggunakan metode skor imunoreaktif (<i>Immunoreactive score (IRS)</i>) (Fedchenko and Reifenrath, 2014). Penilaian akan dinilai oleh satu dokter ahli	Mikroskop opcahaya binokuler, <i>Olympus CX41RF</i>	- Persentase sel positif (A) : 0 : tidak ada sel yang positif 1 : Sel positif < 10% 2 : Sel positif 10% -50% 3 : Sel positif 51%-80% 4 : Sel positif > 80% - Intensitas pewarnaan (B): 0 : tidak terwarna 1: ringan 2 : sedang	Interval
----	---------------	---	---	---	----------

Patologi Anatomi dan akan dilakukan rerata dari hasil penilaian tersebut.	3 : kuat - Skor imunoreaktif (AXB): 1. 0-1 = negatif 2. 2-3 = lemah 3. 4-8 = sedang 4. 9-12 = kuat
---	---

B. Variabel II

3.	Karsinoma ovarium	Karsinoma ovarium diperoleh dari bahan operasi pada tipe <i>Low grade serous carcinoma, High grade serous carcinoma, Endometrioid carcinoma, Clear cell carcinoma, Mucinous carcinoma</i>	Mikrosk opcahaya binokuler, Olympus CX41RF	- Karsinoma ovarium <i>low grade</i> - Karsinoma ovarium <i>high grade</i>	Nomina l
----	-------------------	---	--	---	----------

Tabel 4.2 Skor imunoreaktif (IRS)(Fedchenko and Reifenrath, 2014)

A (percentage of Positive cells)	B (intensity of staining)	IRS score (multiplication of A and B)
0 = <i>no positive cells</i>	0 = <i>no color reaction</i>	0 – 1 = <i>negative</i>
1 = <i><10% of</i>	1 = <i>mild reaction</i>	2 – 3 = <i>mild positive cells</i>
2 = <i>10-50% positive</i>	2 = <i>moderate reaction</i>	4 – 8 = <i>moderate cells</i>
3 = <i>51-80% positive</i>	3 = <i>intense reaction</i>	9-12= <i>strongly positive cells</i>
5 = <i>> 80% positive cells</i>		
Final IRS score (A x B): 0-12		

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat pemotong blok paraffin, mikroskop cahaya binokuler Olympus tipe CX41RF, piranti komputer untuk dokumentasi Olympus DP2-BSW, *staining jar*, pipet, kaca objek, kaca penutup, *paraffin bath* merek Leica, dan pinset.

4.6.2 Bahan Penelitian

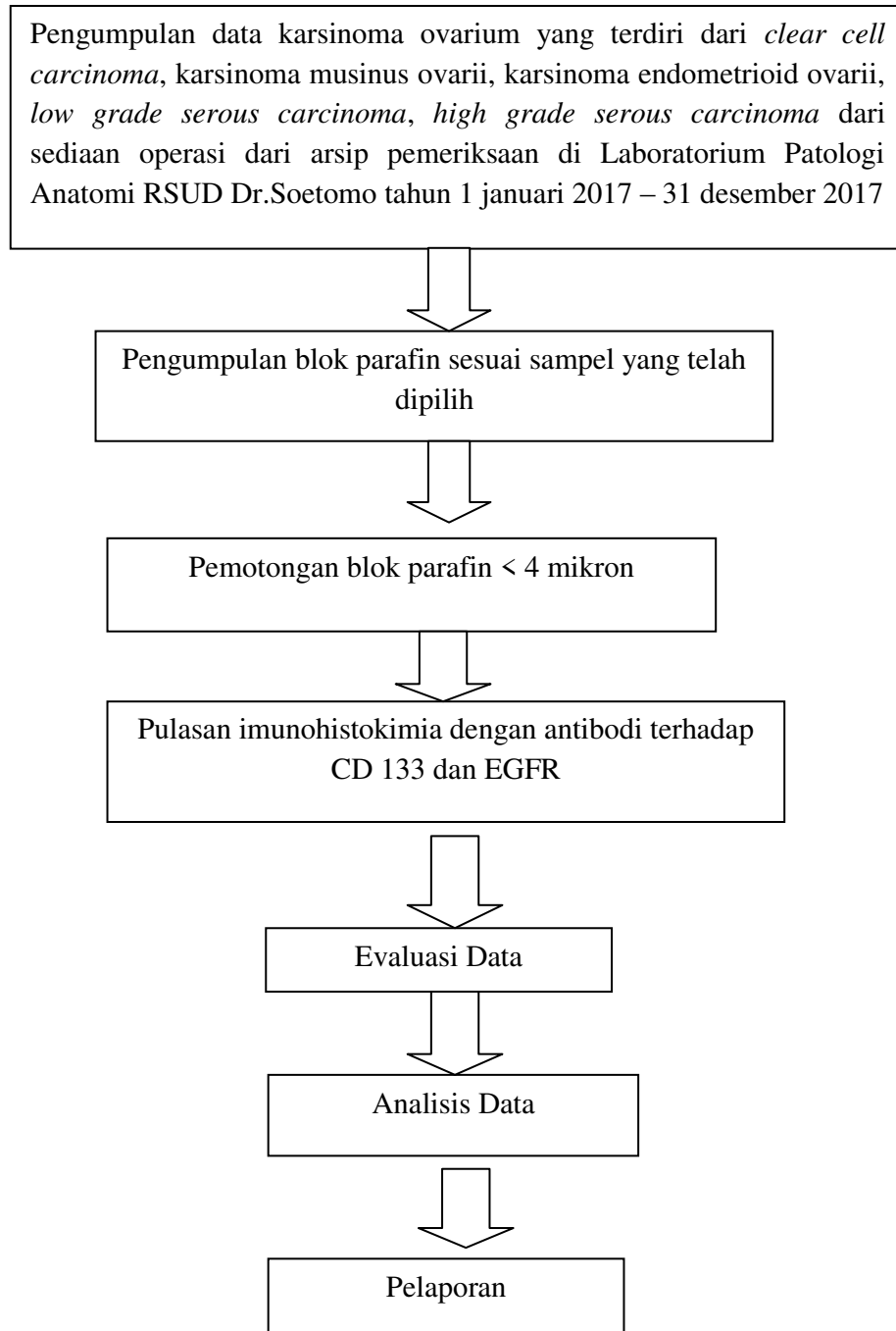
Blok paraffin pasien karsinoma ovarium, yaitu: *clear cell ca*, karsinoma endometrioid ovarii, karsinoma musinus ovarii, *low grade serous carcinoma ovarii*, *high grade serous carcinoma ovarii* dengan pulasan Hematoxilin Eosin dan antibodi yang digunakan antibodi CD133 dan EGFR.

4.7 Prosedur Penelitian

1. Menghubungi Departemen Patologi Anatomi FK Universitas Airlangga/ RSUD Dr Soetomo Surabaya serta Divisi Imunohistokimia Departemen Patologi Anatomi FK Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo.
2. Mengumpulkan slide dan blok parafin sesuai kriteria inklusi dan eksklusi dari nomor pemeriksaan histopatologi karsinoma payudara yang berasal dari arsip formulir pemeriksaan Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo.
3. Dilakukan baca ulang slide untuk menentukan kembali diagnosis histopatologi dan derajat keganasan
4. Dilakukan pemilihan blok parafin yang digunakan sebagai sampel, dan dilakukan potong ulang blok setebal 4 mikron untuk pulasan imunohistokimia.

5. Melakukan pulasan imunohistokimia dengan antibodi terhadap CD133 dan EGFR
6. Melakukan penilaian ekspresi CD133 dan EGFR menurut kriteria pada definisioperasional.
7. Melakukan analisa data menggunakan metode statistik yang sesuai

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur penelitian

4.9. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Departemen Patologi Anatomi FK Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo. Penelitian dimulai pada bulan 1 Januari 2017 hingga 31 Desember 2017.

4.10 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dilakukan uji statistik menggunakan program SPSS. Langkah pertama adalah uji normalitas data. Perbedaan ekspresi CD 133 dan EGFR antara kelompok karsinoma ovarium tipe derajat rendah dan derajat tinggi dilakukan uji T tidak berpasangan. Uji alternatif apabila data tidak berdistribusi normal maka dilakukan uji *Mann-Whitney*. Hasil perbedaan ekspresi CD133 dan EGFR pada masing-masing kelompok dikatakan bermakna apabila didapatkan nilai $p < 0,05$.