

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian non-eksperimental yang dilakukan dengan mendapatkan data primer dan data sekunder dari Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta. Desain penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*, yaitu jenis penelitian yang pengukuran variabel-variabelnya hanya dilakukan pada satu saat. Metode penelitian ini termasuk dalam kriteria penelitian analitik kategorik tidak berpasangan, karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi HIF 1- α terhadap gambaran histopatologis kanker kolorektal.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

a. Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah populasi pasien yang merupakan sasaran akhir penerapan hasil penelitian (Sastroasmoro, 2002). Pada penelitian ini populasi targetnya adalah pasien yang memeriksakan atau mengirimkan hasil operasi ke Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta.

b. Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah bagian dari populasi target yang dapat dijangkau oleh peneliti (Sastroasmoro, 2002). Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah pasien yang memeriksakan atau mengirimkan hasil operasi ke Laboratorium Patologi Anatomi Cito pada bulan Januari 2011 sampai Mei 2012.

2. Sampel

Penetapan besar sampel pada penelitian ini dihitung dari penelitian sebelumnya. Penelitian terdahulu yang dijadikan sebagai acuan untuk menentukan besar sampel adalah jurnal dengan judul "*Expression Of HIF-1 α and VEGF in Colorectal Cancer: Association with Clinical Outcomes and Prognostic Implications*". Jurnal tersebut menyatakan $P = 0.54$, sehingga jumlah sampel minimal yang bisa dihitung untuk satu kelompok adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{Z\alpha^2 \cdot P \cdot Q}{d^2} \\
 &= \frac{\frac{1.96^2}{2} \times 0.54 \times (1 - 0.54)}{(0.2^2)} = \frac{\frac{3.8416}{2} \times 0.54 \times 0.46}{0.0004} \\
 &= \frac{0.477}{0.04} = 11.92 \approx 12
 \end{aligned}$$

Keterangan :

N = jumlah sampel minimal yang diperlukan

Z α = derajat kepercayaan

P = proporsi prevalensi kejadian

$$Q = 1 - P$$

d = limit dari error atau presisi absolut

C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Dalam pemilihan sampel terbagi menjadi dua kriteria pemilihan yaitu kriteria inklusi dan eksklusi.

1. Kriteria inklusi

Merupakan persyaratan umum yang harus dipenuhi oleh subyek agar dapat diikutsertakan dalam penelitian. Kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu :

- a. Pada rekam medis (RM) terdiagnosis menderita adenokarsinoma kolorektal yang telah mengirimkan hasil operasi ke Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta pada Januari 2011 sampai Mei 2012.
- b. Pada rekam medis (RM) terdapat data yang lengkap mengenai jenis tumor atau data pemeriksaan penunjang PA di Laboratorium Patologi Anatomi Cito pada Januari 2011 sampai Mei 2012.

2. Kriteria eksklusi

Merupakan keadaan yang mengakibatkan subjek yang memenuhi kriteria inklusi tidak dapat diikutsertakan dalam penelitian. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah pasien adenokarsinoma kolorektal yang melakukan pemeriksaan sampel dengan cara biopsi.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2012

Tempat penelitian :

1. Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
2. Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta
3. Laboratorium Patologi Anatomi RS Sardjito Yogyakarta

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah *Hypoxia Inducible Factor* (HIF 1- α).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian kali ini adalah jenis tumor kanker kolorektal.

F. Definisi Operasional

1. HIF 1- α adalah *hypoxia Inducible Factor-1* adalah suatu protein yang diekspresikan pada sel karsinoma dalam kondisi yang hipoksia. Ekspresi HIF 1- α dikategorikan menjadi (-) apabila sediaan tidak menunjukkan ekspresi HIF 1- α sama sekali atau terdapat $\leq 49\%$ pada sediaan, (+) apabila ekspresi HIF 1- α terdapat $> 50\%$ pada sediaan.
2. Kanker kolorektal adalah suatu proses proliferasi abnormal yang terjadi di kolon atau rektum.

3. Jenis tumor kolorektal yang digunakan sesuai dengan kriteria WHO (2000) *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System* (NOS, *Mucinous Adenocarcinoma* dan *Signet Ring Cell Carcinoma*) dan hasil pemeriksaan patologi anatomi pada Rekam Medis pasien.
4. Slide/preparat diambil dari arsip Laboratorium Patologi Anatomi Cito Yogyakarta yang telah diperiksa oleh dokter spesialis patologi anatomi.

G. Alat dan Bahan

1. Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah : mikrotom, waterbath, hot plate, freezer, inkubator, staining jar, rak kaca objek, kaca objek, rak inkubasi, Pap Pen, pipet mikro, timbangan bahan kimia, kertas saring, pengukur waktu, gelas Erlenmeyer, gelas beker, tabung sentrifuge, microwave, thermolyte stirrer, entelan dan mikroskop cahaya.

2. Bahan Penelitian

- a. Blok parafin yang telah didiagnosa dengan pulasan Hematoksin Eosin sebagai *kanker kolorektal* pada pasien post *hemicolectomy*.
- b. Pulasan imunohistokimia menggunakan metode The EnVision+ Dual Link System kit, teknik pulasan imunohistokimia . Antibodi primer yang digunakan adalah Rabbit Polyclonal *Hu-antibody Hypoxia-Inducible Factor 1- α* dengan pengenceran 1 : 100.
- c. Detection kit terdiri dari :
 - 1 botol endogenous enzyme block

- 1 botol Normal Horse Serum 5%
- 1 botol Dako REAL En VISION
- 1 botol DAB+ substrat chromogen

d. Larutan Buffer sitrat

e. Larutan PBS pH7,4 terdiri dari :

Natrium Chloride : 80 gram

Kalium chloride : 2 gram

Na₂HPO₄ : 11 gram

KH₂PO₄ : 2 gram

Tambahkan aquadest : 1000 ml

f. Larutan Tween 20

g. Larutan DAB + substrat buffer (1 ml larutan cukup untuk 10 jaringan)

Langkah 1: masukkan 1 ml aliquot substrat buffer secukupnya kedalam container (tergantung dari jumlah spesimen yang akan dikerjakan)

Langkah 2 : untuk setiap 1 ml buffer, tambahkan satu tetes (20 mikroliter) cairan DAB + substrat chromogen dan campurkan segera.

h. Larutan counterstain Mayers Haematoxillin

i. Larutan lithium karbonas 50 gram lithium karbonas ditambah dengan aquadest 1000 ml

j. Etanol absolute 96%,80%,70%

k. Larutan xylol.

H. Prosedur Kerja dan Alur Penelitian

Pada penelitian ini pembuatan sediaan mikroskopis hingga pemulasan *Hypoxia-Inducible Factor 1- α* (Pengecatan imunohistokimia) dikerjakan oleh tenaga ahli yang telah terlatih. Adapun prosedur kerja dan alur penelitian sebagai berikut :

1. Pembuatan Sediaan Mikroskopis

Sediaan mikroskopis dibuat dengan cara sebagai berikut :

- a. Blok parafin yang telah dikumpulkan, disimpan dalam freezer sampai cukup dingin, selanjutnya dipotong tipis dengan menggunakan mikrotom dengan tebal 4 μm . Setiap blok parafin, dipotong ulang 2 kali untuk pulasan imunohistokimia *Hypoxia-Inducible Factor 1- α*
- b. Sampel blok parafin yang sudah dipotong tipis (4 μm) ditempelkan pada kaca objek. Pada pulasan imunohistokimia *Hypoxia-Inducible Factor 1- α* digunakan kaca objek yang telah dicoating dengan poly-L-lysine atau Silanized slide agar jaringan dapat menempel pada kaca objek selama proses pulasan imunohistokimia. Cara menempelkan potongan tipis pada kaca objek coated adalah menggunakan ujung pisau atau pinset yang runcing. Potongan tipis dipisahkan dan diratakan dengan memasukkannya ke dalam air hangat. Setelah mengembang, pindahkan ke atas kaca objek. Selanjutnya, kaca objek diletakkan di atas alat pemanas (*hot plate*) 50-60 $^{\circ}\text{C}$. Setelah parafin melunak, kaca objek dikeringkan dan potongan jaringan siap untuk dipulas.

2. Prosedur sebelum pulasan antibodi primer.
 - a. Siapkan preparat berupa potongan tipis jaringan 4 μm yang sudah ditempelkan pada kaca objek silanized.
 - b. Deparafinisasi dengan mencelupkan preparat ke dalam cairan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
 - c. Rehidrasi dengan cara mencelupkan secara berurutan dalam etanol 98% sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit, kemudian alkohol 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit.
 - d. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
 - e. Blocking preparat dengan mencelupkannya kedalam Endogen Peroksidase 0,5% (Methanol + H_2O_2) selama 30 menit. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
 - f. Masukkan preparat ke dalam buffer sitrat dan dipanaskan kedalam microwave:
 - 1) Cook I, power level 8 selama 5 menit.
 - 2) Cook II, power level 1 selama 5 menit.
 - g. Dinginkan \pm 30 menit dalam suhu ruangan.
 - h. Bilas dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit dan keringkan air disekitar potongan jaringan.
 - i. Tandai di sekeliling jaringan yang ingin dipulas dengan Pap Pen.
 - j. Blocking preparat dengan meneteskan Normal Horse Serum 5% dan dibiarkan selama 15 menit didalam bak inkubasi.

3. Protokol Pemulasan *Hypoxia-Inducible Factor* 1- α dengan menggunakan The Envision + Dual Link System dari Dako.
 - a. Bersihkan preparat dari Normal Horse Serum.
 - b. Teteskan preparat dengan antibodi primer *Hypoxia-Inducible Factor* 1- α dan biarkan selama 60 menit dalam rak inkubasi.
 - c. Cuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 menit.
 - d. Teteskan preparat dengan Dako REAL En Visison secukupnya dan dibiarkan selama 30 menit dalam rak inkubasi.
 - e. Cuci dalam PBS pH 7,4 + Tween 20.
 - f. Teteskan preparat dengan DAB + substrat buffer (Dako) dan biarkan selama 2-5 menit.
 - g. Bilas dengan air mengalir selama 10 menit.
 - h. Counterstain preparat dengan pewarnaan Hematoxillin selama 1-2 menit.
 - i. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
 - j. Masukkan preparat kedalam larutan lithium carbonat jenuh (5% dalam aquadest) selama 2 menit.
 - k. Bilas dengan air mengalir selama 5 menit.
 - l. Dehidrasi dengan cara mencelupkan preparat secara berurutan dalam etanol 70%,80%,96% dan etanol absolut, masing-masing selama 5 menit.
 - m. Clearing dengan cara mencelupkan preparat ke dalam larutan xylol sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit.

n. Lakukan mounting dan tutup dengan kaca penutup.

4. Validitas dan Realibilitas

Instrumen penelitian yang digunakan adalah hasil pulasan imunohistokimia *Hypoxia-Inducible Factor* 1- α terhadap sampel sediaan jaringan nasofaring. Untuk penilaian terhadap pulasan imunohistokimia *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF) 1- α adalah sebagai berikut :

- a. Kontrol positif : jaringan yang telah diketahui positif terhadap hypoxia-inducible factor 1 α pada penelitian terdahulu (dalam hal ini kanker payudara dan sel trofoblast)
- b. Kontrol negatif : menghilangkan antibody primer
- c. Positif : warna coklat yang tertampil pada inti dan membrane sitoplasma sel tumor.

5. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan uji hipotesis komparatif dengan skala pengukuran ekspresi HIF 1- α adalah nominal dan jenis tumor adalah kategorik sehingga uji statistik analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah uji *chi-square*.