

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan desain *Cross-Sectional Analytic*, yang bertujuan untuk mengetahui adanya hubungan protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing ras Protomalaid di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Metode ini melalui 2 tahap, yaitu tahap pewarnaan imunohistokimia pada jaringan bibir sumbing, dan tahap penghitungan jumlah sel endotel pada jaringan bibir sumbing, yang mengekspresikan protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah jaringan sisa operasi bakti sosial bibir sumbing yang diadakan di Provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.2.3 Kriteria Inklusi

Pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur, dengan celah pada bibir, yang mengikuti operasi bakti sosial, yang diadakan oleh tim bedah plastik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.2.4 Kriteria Eksklusi

Pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur, dengan celah pada palatum, yang mengikuti operasi bakti sosial, yang diadakan oleh tim bedah plastik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.2.5 Prosedur Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari jaringan sisa operasi bibir sumbing, yang dilakukan oleh tim bedah plastik Rumah Sakit Umum Saiful Anwar, pada kegiatan bakti sosial, pada tanggal 3, 6, 7, 8, 12 Desember 2012, di Rumah Sakit Umum Daerah Alor, Rumah Sakit Umum Daerah Larantuka, Rumah Sakit Umum Daerah Kupang Provinsi Nusa Tenggara Timur, yang disimpan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini, menggunakan *Non-Random Sampling* dengan metode teknik *Purposive Sampling*.

4.2.6 Jumlah Sampel

Jumlah sampel dalam penelitian ini, adalah sebanyak 30 sampel jaringan bibir sumbing yang berasal dari operasi bibir sumbing pada bakti sosial yang dilakukan oleh tim bedah plastik Rumah Sakit Umum Saiful Anwar, pada tanggal 3, 6, 7, 8, 12 Desember 2012, di Rumah Sakit Umum Daerah Alor, Rumah Sakit Umum Daerah Larantuka, Rumah Sakit Umum Daerah Kupang Provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini, adalah sel endotel jaringan bibir

sumbing ras Protomaid di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Variabel tergantung dalam penelitian ini, adalah protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK.

4.4 Lokasi dan Waktu Pelitian

Penelitian ini dilakukan di :

1. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang,
2. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang,
3. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan
4. Laboratorium Patologi Antomi Rumah Sakit dr. Soetomo Surabaya, pada bulan September hingga November 2013.

4.5 Bahan dan Alat/Instrument Penelitian

4.5.1 Pembuatan Parafin Blok

1. Alat : Rotary Microtome, Object Glass, Holder.
2. Bahan : Phospat Buffer Solution (PBS), Formalin 10%, Alkohol (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan Absolut), Xilol, Parafin, Gelatin 5%, Beaker Glass 250mL.

4.5.2 Proses Deparafinasi

Bahan : Hasil dari Parafin Blok, Xilol, Alkohol berseri (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan Absolut), dH₂O.

4.5.3 Proses Pewarnaan Hematoxilen - Eosin

1. Alat : Preparat jaringan, Cover Glass.
2. Bahan : PBS pH 7,4, Hematoxilen, Tap Water, dH₂O, Alkohol berseri (30%, 50%), Eosin.

4.5.4 Proses Imunohistokimia

1. Alat : Preparat, Cover Glass, Mikroskop Cahaya.
2. Bahan : PBS pH 7,4, H₂O₂ 3%, FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100, Monoklonal Anti sVEGFR-1, Anti Mouse HRP Conjugated, Diamino Benzidine (DAB), Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxilen, Tap Water, dH₂O.

4.5.5 Perhitungan Terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia Dan Histokimia

1. Alat : Mikroskop Cahaya.
2. Bahan : Preparat.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- 1 Jaringan bibir sumbing : jaringan sisa hasil operasi bibir sumbing, yang diambil mulai dari lapisan kulit, sampai lapisan mukosa pada bibir.
- 2 p38 MAPK : protein yang berperan dalam produksi sitokin, dan respon terhadap berbagai macam tekanan pada lingkungan. P38 MAPK berfungsi dalam menghambat progresifitas siklus sel, proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan apoptosis sel (*Cargnello, Roux, 2011*). Secara histopatologi, ekspresi protein p38 MAPK dapat dilihat dengan pewarnaan imunohistokimia,

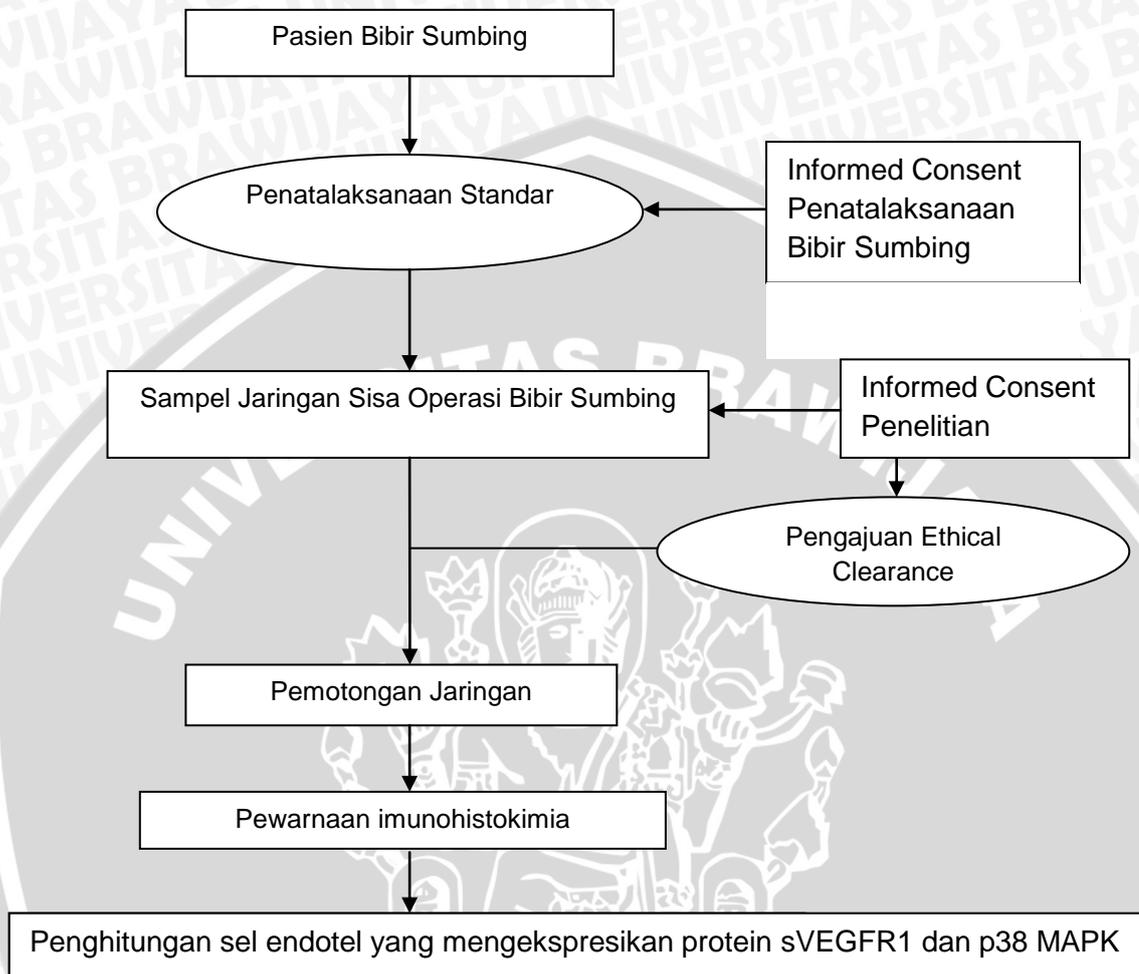
dengan menggunakan Antibodi Monoklonal p38 MAPK, yang ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel.

- 3 sVEGFR-1 : variasi terjemahan genetik dari mRNA VEGFR-1 (Flt-1), yang diproduksi oleh berbagai macam sel. Protein ini berperan sebagai “reseptor perangkap” untuk VEGF (*Vascular Epithelial Growth Factor*), faktor pertumbuhan yang paling berperan dalam proses angiogenesis, khususnya VEGF-A. Terikatnya VEGF-A pada sVEGFR-1 dapat menyebabkan gagalnya pertumbuhan dan perkembangan pembuluh darah baru. sVEGFR-1 tidak hanya dapat mengikat VEGF-A, namun juga dengan VEGF-B dan PlGF (*Placental Growth Factor*).
- 4 Ras Protomalaid : ras yang tersebar di Provinsi Nusa Tenggara Timur, dengan ciri-ciri kulit hitam (gelap), rambut ikal (keriting), dan dengan rambut (bulu) tubuh yang cukup jelas (Glinka, 1978).

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Pengamatan ekspresi protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK pada sel endotel jaringan bibir sumbing ras Protomalayid di Provinsi Nusa Tenggara Timur, dilakukan dengan teknik pewarnaan rutin, dan immunostaining.

4.7.1 Alur Penelitian



4.7.2 Pengambilan Preparat

Jaringan sisa diambil dari hasil operasi pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur yang dikirim ke Malang dan diserahkan ke Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, untuk disimpan, sebelum dipotong, untuk pembuatan parafin blok.

4.7.3 Pembuatan Sediaan Parafin Blok

Jaringan dicuci dengan PBS 3-5x, untuk membersihkan dari kontaminan. Kemudian difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi

menggunakan Alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan Absolut) masing-masing selama 60 menit. Dilakukan Clearing, menggunakan Xilol 2x masing-masing selama 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi, dengan parafin lunak selama 60 menit, pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan block dalam parafin keras, pada cetakan dan didiamkan selama 1 hari. Keesokan harinya, ditempelkan pada Holder, dan dilakukan pemotongan setebal 4-6µm, dengan Rotary Microtome. Dilakukan mounting, pada gelas objek dengan gelatin 5%.

4.7.4 Proses Deparafinisasi

Gelas obyek hasil Parafin Block direndam, di dalam Xilol 2x, masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi, menggunakan Alkohol berseri (Absolut, 96%, 80%, 70%, 50%, dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH₂O, selama 5 menit.

4.7.5 Proses Pewarnaan Hematoxilen - Eosin

Slide dicuci, dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan Hematoxilen, selama 10 menit. Setelah itu, direndam dalam Tap Water selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan dH₂O. Dilakukan dehidrasi, dengan Alkohol berseri 30%, dan 50% masing-masing selama 5 menit. Kemudian diwarnai dengan larutan Eosin, selama 3 menit. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%. Dicuci dengan dH₂O, selama 5 menit, dan dikering anginkan. Kemudian dilakukan mounting, dengan entelan, dan tutup dengan cover glass.

4.7.6 Proses Imunohistokimia

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 1x, selama 5 menit. Bloking Endogenous

Peroksida, menggunakan 3% H₂O₂, selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4, sebanyak 3x, selama 5 menit. Bloking unspezifik protein, menggunakan 5% FBS, yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3x, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan Monoklonal Anti sFLT-1 (LabVision), selama 60 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3x, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan Anti Mouse HRP Conjugated, selama 40 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3x, selama 5 menit. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine), dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3x, selama 5 menit. Cuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit. Counterstaining, menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit, dan cuci menggunakan Tap Water. Bilas menggunakan dH₂O, dan kering anginkan. Mounting menggunakan entelan, dan tutup dengan Cover Glass. Amati pada mikroskop cahaya.

4.7.7 Metode Perhitungan Terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia

Penelitian ini menggunakan jaringan bibir sumbing. Dengan nilai konfidensi interal 90%, dan kekuatan uji 80%, dengan desain studi *Cross-Sectional Analytic*, subjek penelitian harus terdiri dari 30 sampel.

1. Terdapat 60 slide, yang terdiri dari 30 slide x 1 kelompok pewarnaan imunohistokimia dengan Antibodi Monoklonal sFLT-1, dan 30 slide x 1 kelompok pewarnaan imunohistokimia dengan Antibodi Monoklonal p38 MAPK. Setiap sample jaringan, dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 um, kemudian dideteksi :
 - a. Pemeriksaan Hematoxilen - Eosin, pengamatan structural endotel.

- b. Pemeriksaan Immunohistokimia, terhadap ekspresi protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK, untuk melihat jumlah sel endotel yang mengekspresikan protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK.
2. Pemeriksaan, dan perhitungan ekspresi protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK diamati ekspresinya, dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel, yang dihitung menurut Soini et. al. (1998), dan Pizem And Cor (2003) yang dimodifikasi, untuk kepentingan sel endotel, masing-masing slide pada bidang pandang, dengan perbesaran 1.000x, dan sebanyak 20 lapang pandang.
 3. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja, dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang.
 4. Dilakukan pemulasan Hematoxilen - Eosin, yang digunakan sebagai penghitungan jumlah sel immuno kompeten, berdasarkan model structural.
 5. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya.
 6. Dalam rangka menjamin representasi, dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1.000x, yang masing-masing berisi lebih kurang 1.500 sel (*Soini et. al., 1998, Pizem And Cor, 2003*).
 7. Pengumpulan data, data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi preparat jaringan bibir sumbing berdasarkan penghitungan ekspresi protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK, setelah pewarnaan imunohistokimia yang diberi Antibodi Monoklonal sVEGFR-1 dan Antibodi

Monoklonal p38 MAPK, per 20 lapang pandang, dengan perbesaran 1.000x.

4.8 Analisis Data

Data yang didapatkan akan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS. Diperlukan uji normalitas, untuk melihat sebaran normal dari data yang dihasilkan, dengan menggunakan analisis non-parametrik *Kolmogorov Smirnov*. Setelah didapatkan jumlah sel endotel yang mengekspresikan protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK, data dianalisis menggunakan uji statistik *linear correlation*. Uji statistik *linear correlation* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara protein sVEGFR-1 dan protein p38 MAPK, serta bagaimana bentuk hubungan tersebut, apakah dengan tinggi atau rendahnya ekspresi protein sVEGFR-1, juga akan diikuti dengan tinggi atau rendahnya ekspresi protein p38 MAPK