

BAB 4**METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

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

4.2 Populasi Dan Sampel**4.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian ini adalah penduduk di Provinsi Nusa Tenggara Timur ras *Protomelayid*.

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

4.2.4 Kriteria Eksklusi

Pasien dengan celah pada palatum, yang mengikuti operasi bakti sosial di Provinsi Nusa Tenggara Timur, 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.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini, adalah protein p38 MAPK. Variabel tergantung dalam penelitian ini, adalah protein FGF-2.

4.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di :

1. Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Laboratorium Patologi Anatomi, Gedung Pusat Diagnostika, Rumah Sakit Dr. Soetomo, Surabaya.
4. Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penelitian ini dilakukan, pada September 2013 sampai dengan November 2013.

4.5 Bahan Dan Alat / Instrumen 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 Deparafinisasi

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 bibir sumbing, 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 FGF-2, 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 Nikon YS100.
2. Bahan : Preparat jaringan bibir sumbing.

4.6 Definisi Istilah / Operasional

1. Jaringan bibir sumbing : jaringan yang tidak digunakan lagi, hasil operasi bibir sumbing, yang diambil mulai dari lapisan kulit, sampai lapisan mukosa pada bibir.

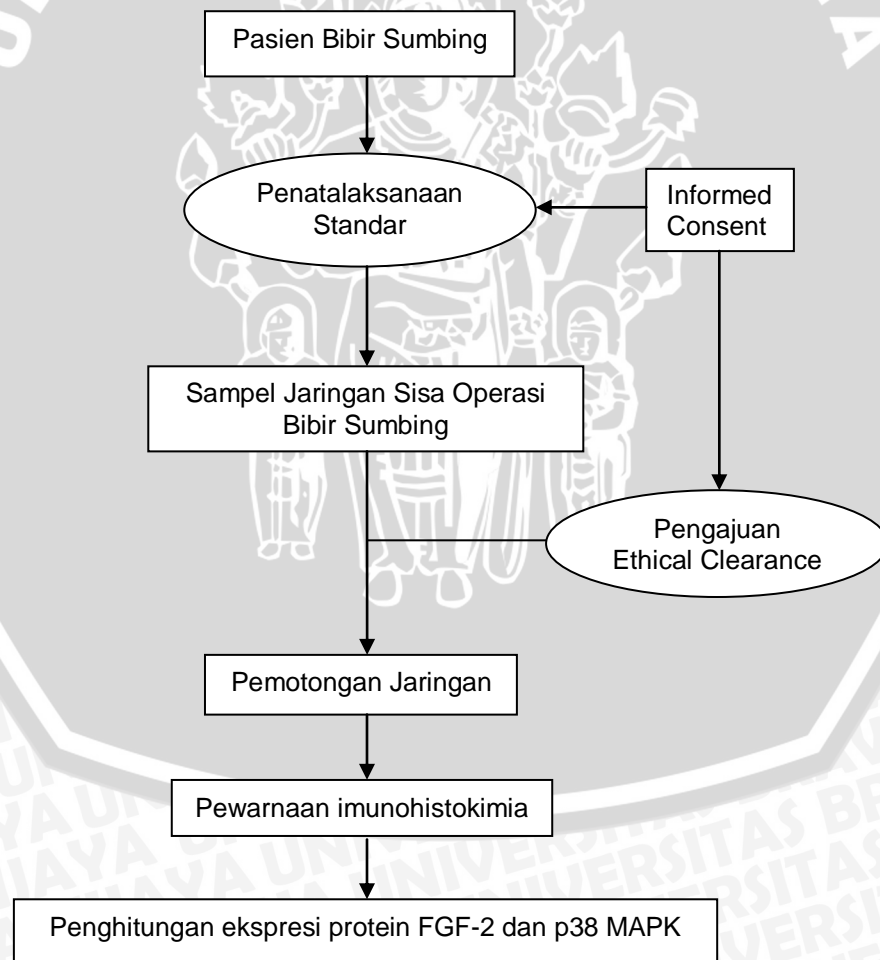
2. Ekspresi Protein p38 MAPK : protein yang berperan dalam produksi sitokin, dan respon terhadap berbagai macam tekanan pada lingkungan, yang berfungsi dalam menghambat progresifitas siklus sel, proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan apoptosis sel. Secara histopatologi, ekspresi protein p38 MAPK dapat dilihat dengan pewarnaan imunohistokimia, dengan menggunakan Antibodi Monoklonal p38 MAPK (diperoleh dari Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang), yang mengikat protein p38 MAPK, dan ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada inti sel. Penentuan warna coklat yang positif, yaitu dengan menyamakan warna coklat, dengan warna coklat dari panduan pewarnaan imunohistokimia, dari *Santa Cruz Biotechnology*.
3. Ekspresi Protein FGF-2 : salah satu anggota dari keluarga protein polipeptida faktor pertumbuhan fibroblast, yang mempunyai fungsi dalam pengaturan proliferasi sel dari berbagai sel mesodermal, ektodermal, dan endodermal, serta migrasi, dan diferensiasi dari sel target (Sabine, *et al.*, 2003). Secara histopatologi, ekspresi protein FGF-2 dapat dilihat dengan pewarnaan imunohistokimia, dengan menggunakan Antibodi Monoklonal FGF-2 (diperoleh dari Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang), yang mengikat protein FGF-2, dan ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel. Penentuan warna coklat yang positif, yaitu dengan menyamakan warna coklat, dengan warna coklat dari panduan pewarnaan imunohistokimia, dari *Santa Cruz Biotechnology*.

4. Ras *Protomelayid* : ras yang tersebar di Provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.7 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data

Pengamatan ekspresi protein FGF-2 dan p38 MAPK pada sel fibroblas jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* 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 FGF-2 (Lab. Vision), 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 Dan Histokimia

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 30x1 (slide) kelompok pewarnaan imunohistokimia dengan Antibodi Monoklonal FGF-2, dan 30x1 (slide) kelompok pewarnaan imunohistokimia dengan Antibodi Monoklonal p38 MAPK. Setiap sample jaringan, dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4-6 μ m, kemudian dideteksi :
 - a. Pemeriksaan Hematoxilen Eosin, pengamatan struktural sel fibroblas.
 - b. Pemeriksaan Immunohistokimia, terhadap ekspresi protein FGF-2 dan p38 MAPK, untuk melihat jumlah sel fibroblas, yang mengekspresikan protein FGF-2 dan p38 MAPK.
2. Pemeriksaan, dan perhitungan ekspresi protein FGF-2 dan p38 MAPK diamati ekspresinya, dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel untuk protein FGF-2, dan pada inti sel untuk protein p38 MAPK, yang dihitung menurut Soini, *et al.* (1998), dan Pizem And Cor (2003) yang dimodifikasi, untuk kepentingan sel fibroblas, 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 imuno kompeten, berdasarkan model struktural.
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 FGF-2 dan p38 MAPK, setelah pewarnaan imunohistokimia yang diberi Antibodi Monoklonal FGF-2 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 fibroblas yang mengekspresikan protein FGF-2 dan p38 MAPK, data dianalisis menggunakan uji statistik *linear correlation (Pearson)*. Uji statistik *linear correlation* digunakan untuk mengetahui adanya hubungan, dan kekuatan hubungan antara ekspresi protein FGF-2 dan p38 MAPK pada kejadian bibir sumbing ras *Protomalayid* di Provinsi Nusa Tenggara Timur.