

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik yang bersifat retrospektif untuk mengetahui korelasi antara indeks ekspresi Ki-67 dengan *grading* karsinoma prostat di Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang. Penelitian ini dilakukan dengan mencatat semua penderita karsinoma prostat yang telah diketahui derajat keganasannya (*grading*) dikorelasikan dengan indeks ekspresi Ki-67 mulai periode Januari 2013 sampai Desember 2014.

4.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang pada tahun 2015.

4.3 Cara Pengambilan Sampel

Sampel pemeriksaan histopatologi yang diperoleh dari pengolahan data sekunder dari rekam medis pasien bedah dengan karsinoma prostat yang sudah tertera derajat keganasannya (*grading*) dan dilakukan pengecatan imunohistokimia Ki-67 di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang periode Januari 2013 – Desember 2014. Subjek penelitian diambil secara *total sampling*, yaitu mengambil semua sampel yang memenuhi kriteria penerimaan.

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau penelitian ini adalah penderita karsinoma prostat pasien bedah yang telah dilakukan pemeriksaan histopatologi di Rumah Sakit dr.

Saiful Anwar Malang periode Januari 2013 – Desember 2014

Kriteria inklusi:

- Penderita karsinoma prostat yang dilakukan pemeriksaan histopatologi yang telah diketahui derajat keganasannya (*grading*) dan dilakukan pengecatan imunohistokimia Ki-67.
- Diperiksa di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang.
- Kurun waktu periode Januari 2013 – Desember 2014.

4.4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah semua sediaan blok paraffin dari penderita karsinoma prostat periode Januari 2013 – Desember 2014 yang memenuhi kriteria inklusi yang telah dilakukan pemeriksaan histopatologi dan pengecatan imunohistokimia Ki-67 di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang.

Seluruh penderita karsinoma prostat yang telah dilakukan pemeriksaan histopatologi yang diambil secara *total sampling* di Malang Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang periode Januari 2013 sampai dengan Desember 2014.

4.5 Variabel Penelitian

- **Variabel Bebas:** Derajat keganasan atau status *grading* pada karsinoma prostat.
- **Variabel Tergantung:** Tingkat indeks ekspresi Ki-67 pada pemeriksaan imunohistokimia.

4.6 Definisi Operasional

- **Karsinoma Prostat:** adalah kanker yang berasal dari kelenjar dan saluran dalam prostat. Sembilan puluh lima persen dari tumor ini merupakan jenis adenokarsinoma dan lebih dari 75% muncul pada zona perifer.
- **Grading:** adalah derajat keganasan pada sel kanker yang ditentukan berdasarkan skor *Gleason* pada karsinoma prostat. Berdasarkan Sistem *grading Gleason* tingkat histopatologi dari karsinoma prostat menjadi *well-differentiated*, *moderate-differentiated*, dan *poorly-differentiated* (Epstein *et al.*, 2005)
- **Ekspresi Ki-67:** Ki-67 merupakan suatu protein yang dapat dijadikan penanda adanya proliferasi sel. Dengan teknik pengecatan imunohistokimia bisa dinilai ekspresi Ki-67. Sel yang mengekspresikan Ki-67 akan tampak berwarna coklat pada inti sel. (Dowsett *et al.*, 2011).
- **Indeks Ki-67:** adalah presentase berdasarkan inti sel tumor yang tercat positif berwarna coklat pada 1000 sel total yang diamati dengan pembesaran 400x di mikroskop
- **Cut-off:** Nilai ambang batas suatu ukuran atau suatu rentangan nilai yang menunjukkan terhadap suatu parameter.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Bahan Penelitian

1. Xilol
2. Alkohol absolut, alkohol 90%, alkohol 80%
3. Metanol 0,5%
4. Etanol
5. Air
6. *Poly-L-lysine* merk Sigma
7. Akuades
8. *Background sniper*
9. PBS (*phosphate buffer saline*)
10. Antibody primer
11. Antibodi sekunder
12. Reagen DAB (Diaminobenzidin)
13. Mayer Hematoksilin
14. TrekAvidin-HRP *label*
15. Litium Karbonat (Lab. Patologi Anatomi FKUB, 2015)

4.7.2 Alat Penelitian

1. Gelas obyek
2. Mikroskop
3. *Cover glass*
4. Inkubator
5. *Microwave*
6. *Deckloaking chamber*
7. *Water bath*

8. *Hot plate*
9. *PAP pen* (Lab. Patologi Anatomi FKUB, 2015)

4.8 Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan data pasien karsinoma prostat dan preparat yang sudah dilakukan pemeriksaan histopatologi dari Januari 2013 – Desember 2014 di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang.
2. Preparat hasil pulasan Hematoksilin dan Eosin (H&E) dikumpulkan dan dievaluasi ulang supaya memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sehingga didapat kelompok data yaitu grading kanker prostat. Preparat yang sulit dievaluasi dilakukan potong ulang blok dan dipulas dengan pulasan rutin menggunakan Harris's Hematoksilin dan Eosin.
3. Mengumpulkan blok parafin dari sediaan H&E terpilih.
4. Blok parafin dipotong setebal 4 mikrometer dengan mikrotom untuk pulasan imunohistokimia.
5. Melakukan pulasan imunohistokimia Ki-67 yang sesuai dengan prosedur pemeriksaan imunohistokimia di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB:
 - a. Sediaan dipotong dengan mikrotom setebal 4 sampai dengan 5 mikron.
 - b. Lekatkan pada gelas obyek yang telah di lakukan *coating* dengan memperhatikan penomoran preparat dan nama antibodi, lama waktu saat dalam *waterbath*, dan suhu *waterbath* 56 – 57 derajat selsius.

- c. Simpan dalam inkubator 38 – 40 derajat selsius semalam agar melekat lebih kuat. Sebelum proses perwarnaan keringkan dan panaskan di atas *hot plate* selama 1 jam.
- d. Deparafinisasi dengan xylol I, II, III masing-masing 3 menit
- e. Masukkan dalam etanol, alcohol 90%; 80% masing-masing 2 – 3 menit.
- f. Cuci dengan air mengalir 2 – 3 menit.
- g. Masukkan dalam H₂O₂ dalam metanol 0,5% (100 ml metanol + 1,6 ml H₂O₂) selama 20 menit.
- h. Cuci dengan air mengalir 2 – 3 menit.
- i. *Antigen Retrieval* rendam dalam larutan DIV A, panaskan dalam *decloaking chamber*.
- j. Dinginkan dalam suhu ruangan 20 – 30 menit.
- k. Rendam dengan PBS 2 – 5 menit.
- l. Letakkan slide dalam *moisture chamber* dan beri pembatas pada sekeliling sediaan dengan *PAP pen*, teteskan *background sniper* 10 – 15 menit.
- m. Teteskan antibodi primer, dan inkubasi selama 60 menit.
- n. Cuci dengan PBS 3 – 5 menit.
- o. Teteskan antibodi sekunder, inkubasi 10 menit.
- p. Cuci dengan PBS 3 – 5 menit.
- q. Teteskan TrekAvidin-HRP *label* dan inkubasi 10 menit.
- r. Cuci dengan PBS 3 – 5 menit.
- s. Teteskan DAB, inkubasi 2 – 4 menit (1 ml *betazoid DAB substrate buffer*, tambahkan 1 – 2 tetes DAB *Chromogen*).

- t. Cuci dengan air mengalir 5 – 7 menit.
- u. *Counterstain* dengan mayer hematoksin 2 – 3 menit.
- v. Rendam dalam litium karbonat jenuh 2 – 3 menit.
- w. Cuci dengan air mengalir 5 – 7 menit.
- x. Dehidrasi dengan alkohol 80%; 90%; alkohol absolut – xylol I; II; III masing-masing 3 menit.
- y. *Mounting*

6. Interpretasi dan penghitungan persentase pulasan Ki-67 dilakukan oleh peneliti dengan menggunakan mikroskop olympus CX 21. Penghitungan dilakukan secara manual (penghitungan langsung) di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Penilaian indeks ekspresi Ki-67 dihitung secara kuantitatif berdasarkan inti sel tumor yang tercatat positif berwarna coklat pada 1000 sel total yang diamati.
7. Pencatatan dan pengumpulan data.
8. Analisis data.

4.9 Pengolahan Data

Analisa statistik untuk uji korelasi antara variabel indeks ekspresi protein Ki-67 dengan *grading* karsinoma prostat diuji dengan uji Regresi. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p < 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisis data dilakukan dengan *software* Microsoft Excel 2007.

4.10 Jadwal Kegiatan

Kegiatan	Bulan																							
	Juli				Agustus				September				Oktober				November				Desember			
	Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
I. Persiapan																								
1.1 Penyerahan proposal penelitian		■																						
1.2 Pengurusan surat tugas dan perizinan							■																	
1.3 Persiapan <i>ethical clearance</i>							■																	
1.4 Pengumpulan sampel (rekam medis dan hapusan)											■													
II. Pelaksanaan																								
2.1 Pengamatan hasil imunohistokimia														■										
III. Pengumpulan Data dan Evaluasi Hasil																								
3.1 Evaluasi hasil																								
3.2 Pengumpulan data																								
3.3 Pengolahan data dan analisis																								
3.4 Penarikan kesimpulan dan penyusunan laporan kegiatan																								

