

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan desain *Cross-Sectional Analytic*, yang bertujuan untuk mengetahui adanya hubungan protein MMP-3 dan protein AP-1 pada kejadian bibir sumbing ras Protomalayid di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Metode ini melalui 2 tahap, yaitu tahap pewarnaan imunohistokimia pada jaringan bibir sumbing, dan tahap penghitungan jumlah epitel pada jaringan bibir sumbing, yang mengekspresikan protein MMP-3 dan protein AP-1.

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 ras protomalayid 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 pada kegiatan bakti sosial tanggal 3,6,7,8 dan 12 Desember 2012 Di RSUD Larantuka Kupang, RSUD Kupang, dan RSUD Alor Nusa Tenggara Timur.

4.2.4 Prosedur Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari jaringan sisa operasi bibir sumbing (epidermis dan endodermis), 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*.

4.2.5 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 epitel jaringan bibir sumbing ras Protomalayid di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Variabel tergantung dalam penelitian ini, adalah protein MMP-3 dan protein AP-1.

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 (Lampiran 1).

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 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 MMP-3, 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

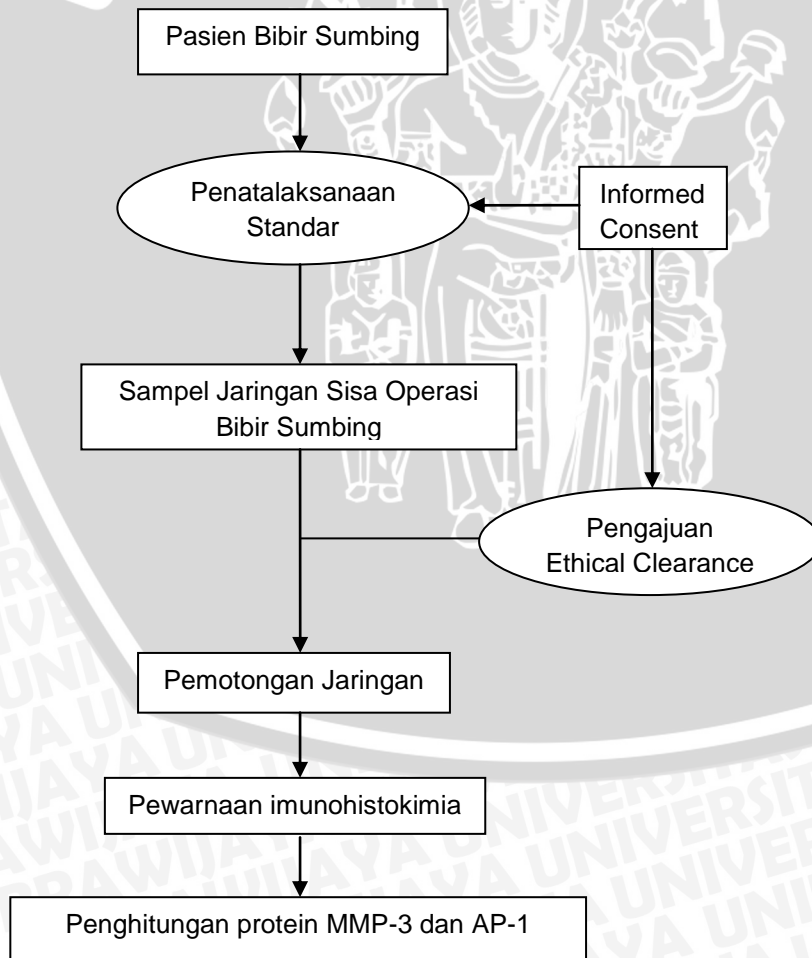
1. Jaringan bibir sumbing : jaringan sisa hasil operasi bibir sumbing, yang diambil mulai dari lapisan kulit, sampai lapisan mukosa pada bibir.
2. AP-1 : Protein yang berperan dalam apoptosis dan remodelling sel. Memiliki kedua efek baik pada tahap proliferasi, karena bekerja pada growth factor, ataupun pada proses apoptosis. Secara histopatologi, ekspresi protein AP-1 dapat dilihat dengan pewarnaan imunohistokimia, dengan menggunakan Antibodi Monoklonal AP-1, yang ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel.

3. MMP-3 : salah satu anggota dari keluarga protein stromelysin yang memiliki fungsi pada remodelling matriks ekstraselular. Secara histopatologi, ekspresi protein MMP-3 dapat dilihat dengan pewarnaan imunohistokimia, dengan menggunakan Antibodi Monoklonal MMP-3, yang ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel.
4. Ras Protomalayid : ras asli Provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.7 Prosedur Penelitian / Pengumpulan Data

Pengamatan ekspresi protein MMP-3 dan protein AP-1 pada epitel 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 4-6 μ m, 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 MMP-3 (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 Dan Histokimia

Penelitian ini menggunakan jaringan bibir sumbing. Dengan nilai konfiden interfal 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 MMP-3, dan 30 slide x 1 kelompok pewarnaan imunohistokimia dengan Antibodi Monoklonal AP-1. Setiap sample jaringan, dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 um, kemudian dideteksi :
 - a. Pemeriksaan *Hematoxilen - Eosin*, pengamatan struktural epitel.
 - b. Pemeriksaan Immunohistokimia, terhadap ekspresi protein MMP-3 dan protein AP-1, untuk melihat jumlah sel epitel, yang mengekspresikan protein MMP-3 dan protein AP-1.
2. Pemeriksaan, dan perhitungan ekspresi protein MMP-3 dan protein AP-1 diamati ekspresinya, dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel, 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 MMP-3 dan protein AP-1, setelah pewarnaan imunohistokimia yang diberi Antibodi Monoklonal MMP-3 dan Antibodi Monoklonal AP-1, 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 epitel yang mengekspresikan protein MMP-3 dan protein AP-1, data dianalisis menggunakan uji statistik *linear correlation*. Uji statistik *linear correlation* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara protein MMP-3 dan protein AP-1, serta bagaimana bentuk hubungan tersebut, apakah dengan tinggi atau rendahnya ekspresi protein MMP-3, juga akan diikuti dengan tinggi atau rendahnya ekspresi protein AP-1.

