

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan desain penelitian *cross-sectional* analitik untuk mengetahui hubungan antara protein TGF- $\alpha$  dan ERK-1 pada kejadian bibir sumbing ras *Protomalayid* di Provinsi Nusa Tenggara Timur. Pendekatan yang digunakan adalah pendekatan histopatologi.

Metode penelitian ini menggunakan pewarnaan imunohistokimia untuk menghitung jumlah sel-sel epitel pada jaringan bibir sumbing yang mengekspresikan protein TGF- $\alpha$  dan protein ERK-1.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

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

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

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

##### 4.2.3 Kriteria Inklusi

Pasien celah bibir di Provinsi Nusa Tenggara Timur yang mengikuti

operasi bakti sosial yang diadakan oleh tim bedah plastik FKUB.

#### 4.2.4 Kriteria Eksklusi

Pasien celah palatum di Provinsi Nusa Tenggara Timur yang mengikuti operasi bakti sosial yang diadakan oleh tim bedah plastik FKUB.

#### 4.2.5 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

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

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan *non random sampling* dengan metode teknik *purposive sampling*.

#### 4.2.6 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 30 sampel.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sel epitel jaringan bibir sumbing ras *Protomalayid* di Provinsi Nusa Tenggara Timur.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah protein TGF- $\alpha$  dan protein ERK-1.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia FKUB, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya.

##### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan September 2013 sampai November 2013 (lampiran 1).

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Parafin Blok

Alat: *Rotary microtome, object glass, holder.*

Bahan: *Phospat Buffer Solution (PBS), formalin 10%, alkohol (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut), xilol, parafin, gelatin 5%, dan beaker glass 250 mL.*

##### 4.5.2 Alat dan Bahan Proses Deparafinasi

Bahan: Hasil parafin blok, *xilol, alkohol berseri (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut), dH<sub>2</sub>O.*

##### 4.5.3 Alat dan Bahan Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin

Alat: Preparat jaringan, *cover glass.*

Bahan: PBS pH 7,4, *hematoxilen, tap water, dH<sub>2</sub>O, alkohol berseri (30% dan 50%), eosin.*

#### 4.5.4 Alat dan Bahan Proses Imunohistokimia

Alat: Preparat, *cover glass*, mikroskop cahaya.

Bahan: PBS pH 7,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100, monoklonal antibodi COL1 dan p38 MAPK, *anti mouse HRP conjugated*, *Diamino Benzidine* (DAB), dH<sub>2</sub>O, *counterstaining* menggunakan *mayer hematoxilen*, *tap water*.

#### 4.5.5 Alat dan Bahan Penghitungan terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia

Alat: Mikroskop cahaya

Bahan: Preparat jaringan

#### 4.6 Definisi Operasional

- Preparat merupakan jaringan sisa operasi pasien bibir sumbing pada kegiatan bakti sosial tanggal 3, 6, 7, 8, dan 12 Desember 2012 di Rumah Sakit Umum Daerah Alor, Rumah Sakit Umum Daerah Larantuka, dan Rumah Sakit Umum Daerah Kupang Provinsi Nusa Tenggara Timur yang diamati pada bagian sel epitel epidermis (*pars cutanea*).
- TGF- $\alpha$  mengkode *growth factor* yang merupakan ligan untuk *epidermal growth factor receptor*, yang mengaktifkan jalur sinyal untuk proliferasi, diferensiasi dan perkembangan sel. Protein ini juga merupakan ligan-pengikat transmembran atau ligan terlarut (NCBI, 2013). Dalam pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal TGF- $\alpha$ , ekspresi protein TGF- $\alpha$  dapat dilihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel.
- ERK-1 merupakan protein serine/threonin kinase yang ikut serta dalam

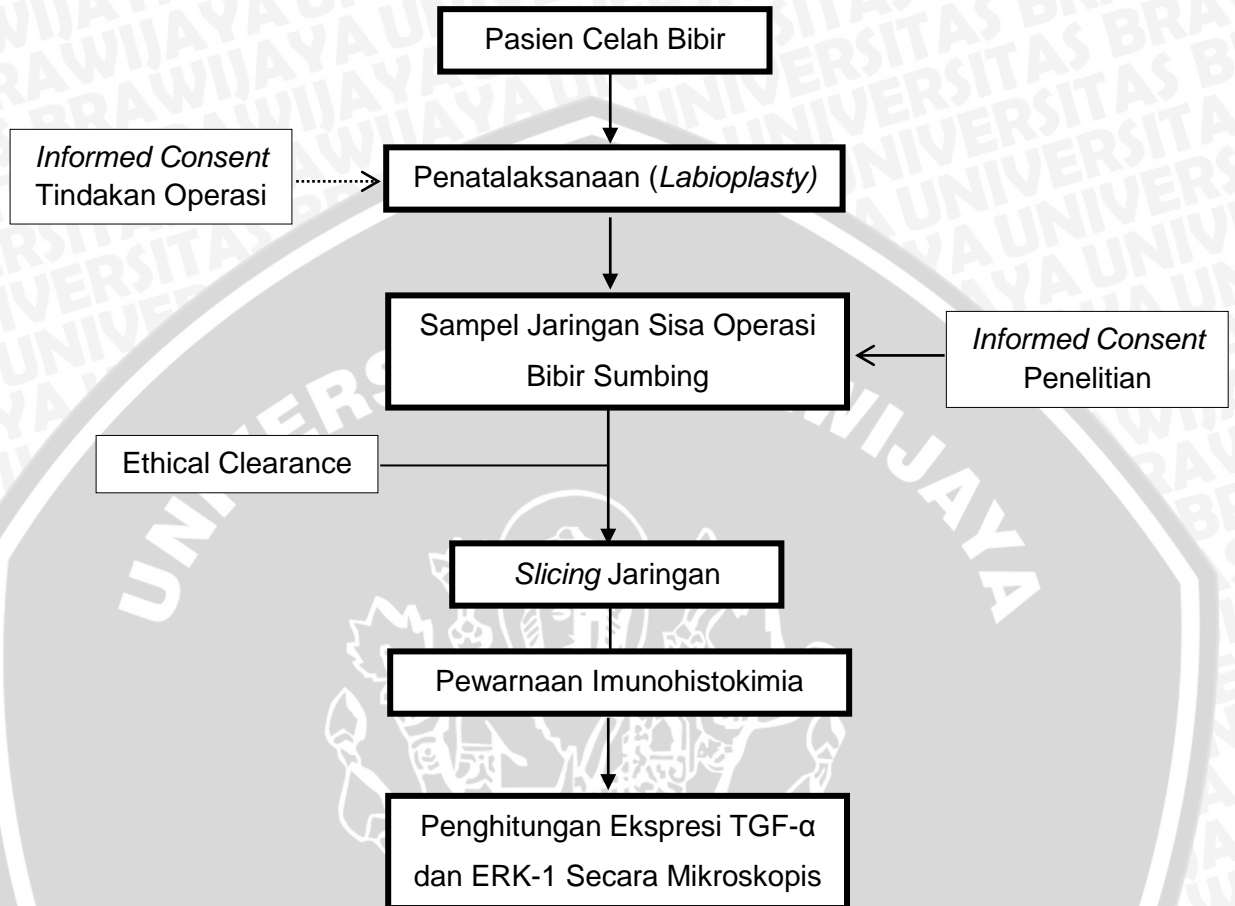
kaskade transduksi sinyal Ras-Raf-MEK-ERK. Kaskade ini berperan dalam proses regulasi termasuk pengatur jalur embriogenesis, adhesi sel, kemajuan siklus sel, migrasi sel, ketahanan sel, diferensiasi, metabolisme, proliferasi dan transkripsi (Roskoski, 2012. Pearson et al, 2001).

- Dalam pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal ERK-1, ekspresi protein ERK-1 dapat dilihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel.
- Ras Protomalayid merupakan ras penduduk asli Provinsi Nusa Tenggara Timur.

#### 4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Pengamatan ekspresi protein TGF- $\alpha$  dan ERK-1 pada sel epitel jaringan bibir sumbing ras Protomalayid di Provinsi Nusa Tenggara Timur dilakukan dengan teknik pewarnaan rutin *Hematoxilen-Eosin* (HE) dan teknik *immunostaining*.

#### 4.7.1 Alur Penelitian



**Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian**

#### 4.7.2 Pengambilan Jaringan Preparat

Jaringan sisa diambil dari hasil operasi pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur dan dibawa ke Malang lalu diserahkan ke Laboratorium Biokimia FKUB untuk disimpan sebelum dipotong untuk pembuatan parafin blok.

#### 4.7.3 Pembuatan Sediaan Parafin Blok

Jaringan dicuci dengan PBS 3-5 kali 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 60 menit lalu dilakukan *clearing* menggunakan *xilol* 2 kali masing-masing 60 menit. Setelah selesai melakukan *clearing*, dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Setelah itu, dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya, ditempelkan pada *holder* dan dilakukan pemotongan setebal 4-6  $\mu\text{m}$  dengan *rotary microtome*. Kemudian dilakukan *mounting* pada *object glass* dengan gelatin 5%.

#### 4.7.4 Proses Deparafinisasi

*Object glass* hasil *parafin block* direndam dalam *xilol* sebanyak 2 kali, 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  $\text{dH}_2\text{O}$  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 lalu dibilas dengan  $\text{dH}_2\text{O}$ . Kemudian dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri, 30% dan 50%, masing-masing selama 5 menit lalu diwarnai dengan larutan eosin selama 3 menit. Setelah itu, dibilas menggunakan alkohol 30% kemudian dicuci dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  selama 5 menit dan dikering-anginkan. Kemudian dilakukan *mounting* dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*.

#### 4.7.6 Proses Imunohistokimia

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit kemudian dilakukan bloking endogenous peroksida menggunakan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% selama 20

menit lalu dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan bloking unspezifis protein menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 lalu dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama 5 menit. Kemudian dilakukan inkubasi menggunakan antibodi monoklonal TGF- $\alpha$  atau ERK-1 (LabVision) selama 60 menit lalu dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan inkubasi menggunakan *anti mouse HRP conjugated* selama 40 menit lalu dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali selama 5 menit. Kemudian ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan dilakukan inkubasi selama 10 menit. Lalu dicuci kembali menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama 5 menit kemudian dicuci menggunakan dH<sub>2</sub>O selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan *counterstaining* menggunakan *mayer hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water* lalu dibilas menggunakan dH<sub>2</sub>O dan dikering-anginkan. Setelah itu, dilakukan *mounting* dengan menggunakan entelan lalu ditutup dengan *cover glass* dan diamati pada mikroskop cahaya.

#### 4.7.7 Metode Penghitungan terhadap Hasil Pewarnaan Imunohistokimia

Penelitian ini menggunakan jaringan kulit bibir sumbing. Dengan nilai konfiden interfal 95% dan kekuatan uji 80%, maka dengan desain *cross-sectional* analitik, subjek penelitian terdiri dari 30 sampel.

1. Terdapat 60 slide, yang terdiri dari 2 kelompok pemeriksaan, yaitu 30 slide pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal TGF- $\alpha$  dan 30 slide pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal ERK-1. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4  $\mu$ m, kemudian dideteksi:
  - a. Pemeriksaan *Hematoxilen-Eosin* untuk pengamatan struktur epitel.



- b. Pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi TGF- $\alpha$  dan ERK-1 untuk melihat jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein TGF- $\alpha$  dan ERK-1.
2. Pemeriksaan dan penghitungan ekspresi protein TGF- $\alpha$  ditentukan dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel dan untuk protein ERK-1 ditentukan dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel, yang dihitung menurut Soini *et al.*, (1998) dan Pizem and Cor (2003), masing-masing slide diamati secara langsung menggunakan mikroskop cahaya pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x 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 akan digunakan sebagai konfirmasi struktural sel epitel jaringan bibir sumbing.
5. Analisis statistik dilakukan bila semua hasil sudah dicari nilai rerata dan dicatat.
6. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada  $\pm 20$  lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi  $\pm 1500$  sel (Soini *et al.*, 1998; Pizem and Cor, 2003).

Pengumpulan data:

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi preparat jaringan bibir sumbing ras *Protomelayid* berdasarkan penghitungan ekspresi protein TGF $\alpha$  dan ERK-1 setelah dilakukan pewarnaan imunohistokimia yang diberi antibodi monoklonal TGF- $\alpha$  atau ERK-1 per 20 lapang pandang dengan

perbesaran 1000x.

#### 4.8 Analisis Data

Untuk langkah awal diperlukan uji normalitas untuk melihat sebaran normal dari data yang dihasilkan menggunakan analisis non parametrik *Kolmogorov-Smirnov*. Setelah diperoleh jumlah sel yang mengekspresikan protein TGF- $\alpha$  dan ERK-1, data-data tersebut dianalisis menggunakan uji statistik korelasi *Pearson*. Uji statistik korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui seberapa kuat hubungan antara protein TGF- $\alpha$  dan ERK-1 dan bagaimana hubungan tersebut, positif atau negatif dan apakah dengan rendahnya ekspresi protein TGF- $\alpha$  akan diikuti juga dengan rendahnya ekspresi protein ERK-1.

