

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan desain penelitian *cross-sectional* analitik untuk mengetahui hubungan antara protein IGF-1 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 IGF-1 dan 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 IGF-1 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), dH₂O.

4.5.3 Alat dan Bahan Proses Pewarnaan Hematoxilen-Eosin

Alat: Preparat jaringan, *cover glass*.

Bahan: PBS pH 7,4, *hematoxilen*, *tap water*, dH₂O, 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, H₂O₂ 3%, FBS 5% yang mengandung 0,25% Triton X-100, monoklonal antibodi IGF-1 dan ERK-1, *anti mouse HRP*

conjugated, Diamino Benzidine (DAB), dH₂O, 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).
- IGF-1 merupakan suatu protein yang dikode oleh gen IGF-1 yang memiliki struktur molekul mirip insulin dan berperan penting dalam pertumbuhan anak serta efek anabolik pada orang dewasa. Secara histopatologi, ekspresi IGF-1 dapat dilihat dengan pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal IGF-1 yang ditunjukkan dengan 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 embryogenesis, 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 antibody monoklonal ERK-1, protein ERK-1 dapat dilihat adanya warna

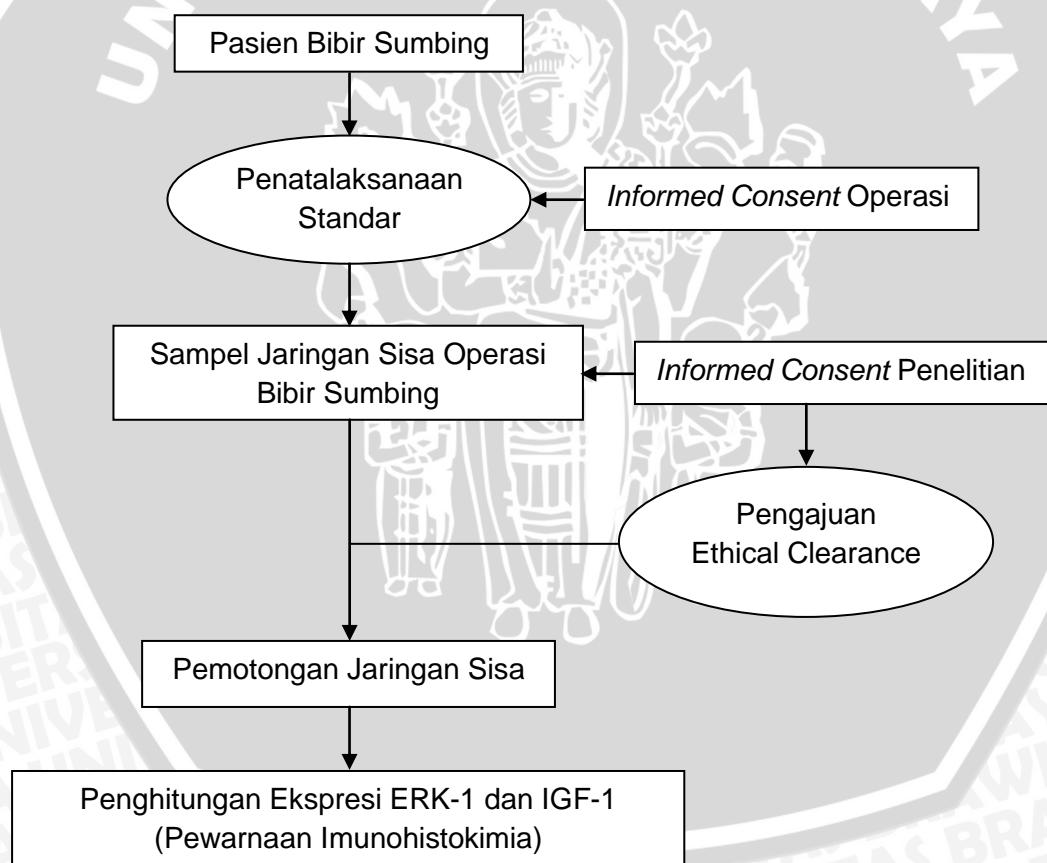
coklat pada inti sel

- Ras Protomalayid merupakan ras yang tersebar di Provinsi Nusa Tenggara Timur.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Pengamatan ekspresi IGF-I 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



4.7.2 Pengambilan Jaringan Preparat

Jaringan sisa diambil dari hasil operasi pasien bibir sumbing di Provinsi Nusa Tenggara Timur lalu dikirim ke Malang dan 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 μm 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 dH_2O 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 dH₂O. 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 dH₂O 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 H₂O₂ 3% selama 20 menit lalu dicuci menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan bloking unspezifik 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 IGF-1 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 dH₂O selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan *counterstaining* menggunakan *mayer hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water* lalu dibilas menggunakan dH₂O 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 IGF-1 dan 30 slide pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal ERK-1. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μm , kemudian dideteksi:
 - a. Pemeriksaan *Hematoxilen-Eosin* untuk pengamatan struktur epitel.
 - b. Pemeriksaan imunohistokimia terhadap ekspresi IGF-1 dan ERK-1 untuk melihat jumlah sel epitel yang mengekspresikan protein IGF-1 dan ERK-1.
2. Pemeriksaan dan penghitungan ekspresi protein IGF-1 ditentukan dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel dan untuk protein ERK-1 ditentukan dengan melihat adanya warna coklat pada inti 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. Penghitungan dilakukan sebanyak dua kali. 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 ± 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi ± 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 Protomalayid berdasarkan penghitungan ekspresi protein IGF-1 dan ERK-1 setelah dilakukan pewarnaan imunohistokimia yang diberi antibodi monoklonal IGF-1 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 uji Kolmogorov-Smirnov. Setelah diperoleh jumlah sel yang mengekspresikan protein IGF-1 dan ERK-1, data-data tersebut dianalisis menggunakan uji statistik parametrik *linear correlation*. Uji statistik *linear correlation* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara protein IGF-1 dan ERK-1 dan bagaimana hubungan tersebut, apakah dengan tingginya ekspresi protein IGF-1 akan diikuti juga dengan tingginya ekspresi protein ERK-1.