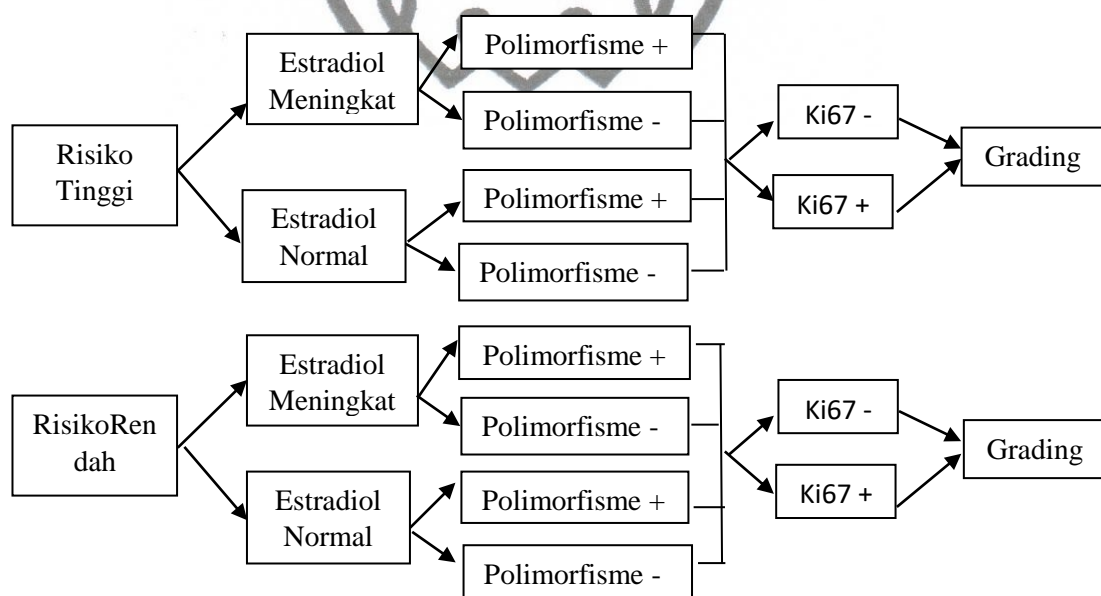


BAB III. METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *crosssectional* dengan menggunakan sampel pasien kanker payudara yang berobat atau dirawat di Sub Bagian Bedah Onkologi RS Dr Muwardi. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi faktor risiko kanker payudara meliputi usia pasien, usia partus, jumlah anak, riwayat menyusui, usia menarche, menopause, riwayat KB dan riwayat keluarga.

Dilakukan pemeriksaan jaringan kanker dilihat Patologi Anatomi dengan hasil Karsinoma payudara, pemeriksaan Ki67 dan menilai grading dari kankernya, kemudian dilakukan pemeriksaan darah untuk identifikasi kadar estradiol plasma darah, dan melihat adanya polimorfisme COMT.



B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Sub Bagian Bedah Onkologi Rs Dr Muwardi, dengan cara mengambil data pasien, dilakukan anamnesis untuk melihat faktor risiko kanker payudara, memeriksa imunohistokimia Ki67, mencatat hasil grading Patologi Anatomi, dan mengambil sampel darah.

Pemeriksaan serum estradiol dilakukan di Lab Biomedik FK UNS, pemeriksaan imunohistokimia Ki67 dan grading di Lab Patologi Anatomi FK UNS, sedangkan pemeriksaan polimorfisme COMT di Lab Prodia Surakarta.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian diambil dari pasien yang terdiagnosis sebagai karsinoma payudara dengan dibuktikan dengan hasil Patologi Anatomi.

1. Kriteria Inklusi

- a. Semua pasien karsinoma payudara yang berobat atau dirawat di Sub Bagian Bedah Onkologi RS Dr Moewardi , dengan hasil ER dan PR positif.
- b. Dapat dilakukan anamsesis untuk faktor risiko.
- c. Mempunyai blok paraffin untuk pemeriksaan imunohistokimia Ki67 dan grading.
- d. Dapat diambil sampel darah untuk pemeriksaan kadar estradiol dan polimorfisme COMT

2. Kriteria Eksklusi

- a. Pasien dengan karnofsky < 50
- b. Kanker payudara residif ataupun rekuren

D. Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan melihat besar sampel minimal dengan menggunakan rumus dari www.openepi.com/SampleSize/SSCohort.com. Berdasarkan penelitian dari Largent et al., 2005 didapatkan prosentasi untuk unexposed dalam hal ini adalah grading I sebanyak 3% dan prosentasi exposed dalam hal ini grading III sebanyak 42%, dengan ratio of sample size unexposed / exposed adalah 2, dengan Odds ratio 23, prevalence ratio 14 dan prevalence difference 39, dengan nilai $1 - \alpha$ adalah 95 dan power 80, didapatkan besar minimal sampel exposed (grading III) sebanyak 11 dan unexposed (grading I) sebanyak 22.

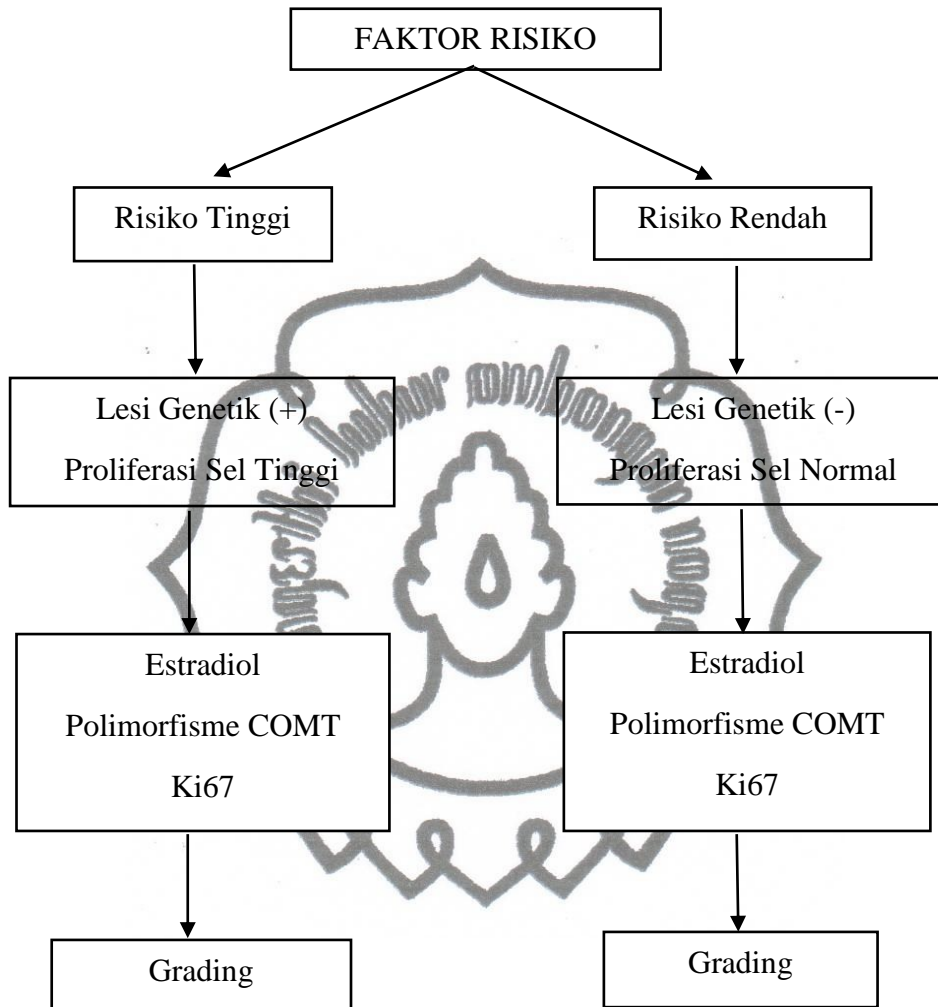
Dengan melihat jumlah sampel minimal, sampel yang akan digunakan adalah semua pasien yang terdiagnosis karsinoma payudara, yang berobat atau dirawat di Sub Bagian Bedah Onkologi RS Dr Moewardi, mulai bulan Maret 2016 sampai dengan Mei 2016, sehingga didapatkan sampel yang melebihi jumlah sampel minimal.

E. Teknik Sampling

Semua pasien yang terdiagnosis kanker payudara yang berobat atau dirawat di Sub Bagian Bedah Onkologi RS Dr Moewardi sejak bulan Maret 2016 sampai dengan bulan Mei 2016, dilakukan pendataan, dengan melihat kriteria inklusi dan eksklusi, semua pasien diikuti sertakan dalam penelitian ini bila pasien masih survive dan berkenan untuk dilakukan pemeriksaan darah dalam rangka pengambilan data.

F. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *Cross Sectional Study*. Obyek penelitian adalah jaringan kanker berupa blok paraffin dan serum darah pasien kanker payudara yang berobat atau dirawat di Sub Bagian Bedah Onkologi RS Dr Moewardi.

Bagan Rancangan Penelitian**G. Identifikasi Variable Penelitian****1. Variabel Bebas**

- Risiko Tinggi Kanker Payudara
- Risiko Rendah Kanker Payudara
- Polimorfisme COMT
- Kadar Estradiol
- Ekspresi Ki67

commit to user

2. Variabel Tergantung

Grading Kanker Payudara

H. Definisi Operasional Variable

1. Variabel Bebas : Faktor Risiko Kanker Payudara

Definisi faktor risiko : berupa anamnesis pada pasien dan keluarga pasien, meliputi usia, usia partus, jumlah anak, riwayat menyusui, usia menarche, usia menopause, riwayat KB, dan riwayat keluarga.

Berdasarkan hal itu, peneliti menentukan untuk definisi operasional risiko tinggi dan risiko rendah :

- Usia
 - Definisi : usia pada saat terdiagnosis pertama kali sebagai kanker payudara dan dibuktikan secara histopatologi
 - Alat ukur : anamnesis
 - Skala pengukuran : nominal
 - Kategori :
 - Risiko tinggi usia >50 tahun.
 - Risiko rendah bila usia ≤ 50 tahun (Purwanto et al., 2015).
- Usia partus
 - Definisi : usia saat melahirkan anak pertama
 - Alat ukur : anamnesis
 - Skala pengukuran : nominal

- Kategori :

- Risiko tinggi : melahirkan anak pertama usia ≥ 30 tahun
- Risiko rendah : melahirkan anak pertama usia < 30 tahun

(Purwanto et al, 2015).

- Jumlah anak

- Definisi : jumlah anak kandung baik yang masih hidup / meninggal.
- Alat ukur : anamnesis
- Skala pengukuran : nominal
- Kategori :
 - Risiko tinggi : anak kandung ≤ 2
 - Risiko rendah : anak kandung > 2 (Purwanto et al., 2015).

- Riwayat menyusui

- Definisi : lama menyusui anak , dihitung dalam tahun
- Alat ukur : anamnesis
- Skala pengukuran : nominal
- Kategori :
 - Risiko tinggi : menyusui < 2 tahun
 - Risiko rendah : menyusui ≥ 2 tahun (Purwanto et al., 2015).

- Usia menarche

- Definisi : umur menarche pertama kali

- Alat ukur : anamnesis
- Skala pengukuran : nominal
- Kategori :
 - Risiko tinggi : Menarche < 12 tahun
 - Risiko rendah : menarche \geq 12 tahun (Purwanto et al., 2015).
- Menopause
 - Definisi : umur pada saat mengalami menopause pertama kali
 - Alat ukur : anamnesis
 - Skala pengukuran : nominal
 - Kategori :
 - Risiko tinggi : menopause > 55 tahun
 - Risiko rendah : Menopause \leq 55 tahun (Purwanto et al., 2015).
- Penggunaan KB hormonal
 - Defisini : penggunaan kontrasepsi hormonal lebih dari 10 tahun, berupa KB suntik, pil ataupun implant
 - Alat pengukuran : anamnesis
 - Skala pengukuran : nominal
 - Kategori :
 - Risiko tinggi : menggunakan KB hormonal \geq 10 tahun
 - Risiko rendah tidak menggunakan KB hormonal < 10 tahun (Purwanto et al., 2015).

- Riwayat keluarga dan genetik
 - Definisi : Adanya mutasi gen BRCA₁ DAN BRCA₂, dua atau lebih keluarga inti menderita kanker payudara, satu keluarga inti atau beberapa keluarga jauh menderita kanker payudara
 - Alat ukur : anamnesis
 - Skala pengukuran : nominal
 - Kategori :
 - Risiko tinggi : bila didapat riwayat keluarga atau adanya mutasi gen.
 - Risiko rendah : tidak didapatkan mutasi gen atau tidak ada riwayat keluarga (Purwanto et al., 2015).

2. Variabel Bebas : Polimorfisme COMT

Definisi : Penyimpangan genetik pada titik Val158Met yang menyebabkan perubahan fungsi protein dalam tubuh dari valin menjadi methionin. Dan dikatakan terdapat polimorfisme bila didapat mutasi yang sama pada titik Val158Met bila frekuensinya lebih dari 1% dari total populasi sampel.

Alat ukur : Alat PCR yang digunakan adalah CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) dengan software CFX Biorad Manager (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA)

Skala Pengukuran : Nominal

Kategori : Positif : AA

Negatif : GG, GA

3. Variabel Bebas : Kadar Estradiol

- Definisi : Estradiol merupakan salah satu dari estrogen yang banyak terdapat dalam plasma darah, dan paling berperan dalam proses karsinogenesis kanker payudara. Kadar estradiol diukur melalui serum darah, pada wanita pre menopause dilakukan pada hari ke 21 – 22 dari siklus menstruasi, dengan perkiraan siklus normal 28 hari. Pada wanita dengan menstruasi tidak normal atau pengguna KB dan wanita post menopause level serum estradiol diperiksa sewaktu – waktu. Pengambilan darah dilakukan pagi hari sebelum jam 10 dan pasien tidak perlu puasa (Gruber et al., 2002).
- Alat Ukur : estradiol Elisa
- Skala Pengukuran : Nominal
- Kategori :
 - Normal : 89 – 269
 - Tinggi : 270 – 561

4. Variabel Bebas : Ekspresi Ki67

Definisi : adanya proliferasi dan pertumbuhan yang berlebihan pada pertumbuhan kanker. Proliferasi seluler dapat diukur dengan menghitung jumlah mitosis pada preparat imunohistokimia, dengan pemeriksaan

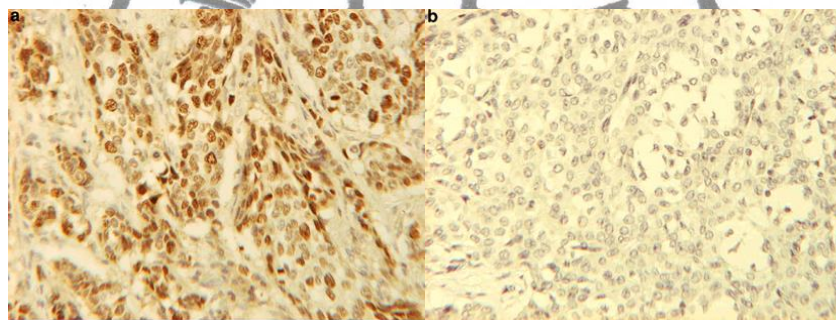
monoclonal antibody mengevaluasi aktifitas proliferasi dan pertumbuhan dari tumor (Muftah et al.,2017).

Alat ukur : Imunohistokimia

Skala pengukuran : nominal dengan cut off 20%

Kategori :

- positif bila nukles terwarna menjadi lebih gelap
- negatif bila nucleus tidak terwanai.



Ekspresi Ki67 Positif

Ekspresi Ki67 Negatif

Gambar 4.1. Ekspresi Ki67 Pada Pemeriksaan Imunohistokimia

5. Variabel Tergantung : Grading Kanker Payudara

Definisi : Grading kanker payudara menggunakan dasar Nottingham Grade System, berdasarkan pemeriksaan histopatologi, dan dibaca oleh 2 orang dokter Patologi Anatomi. Dengan kriteria sebagai berikut :

i. Differensiasi Glandular (acinar) / Tubuler

- Skor 1 : >75 % dari tumor terdiri dari struktur glandular / tubuler
- Skor 2 : 10 – 75% dari tumor berbentuk struktur glandular / tubuler

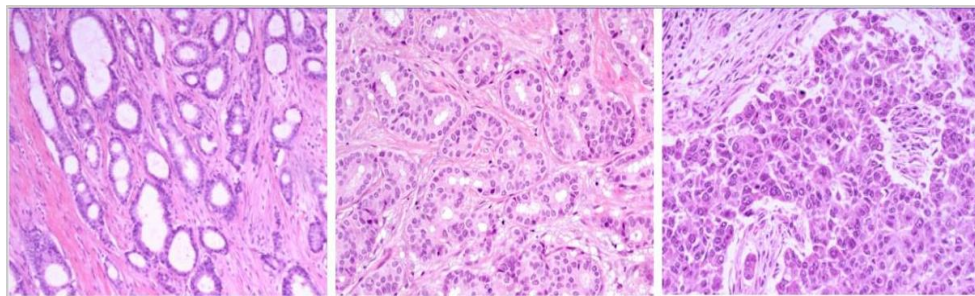
- Skor 3 : < 10% dari tumor terdiri dari struktur glandular / tubuler
- ii. Pleomorphisme Nuklues
- Skor 1 : Inti kecil dengan sedikit peningkatan ukuran dibandingkan dengan sel normal payudara epitel, garis tepi regular, nukleus kromatin seragam, sedikit variasi dalam ukuran.
 - Skor 2 : Sel-sel yang lebih besar dari normal dengan inti terbuka vesikular, nukleolus terlihat, dan variabilitas moderat baik dalam ukuran dan bentuk
 - Skor 3 : inti vesikular, sering dengan nukleolus menonjol, menunjukkan variasi dalam ukuran dan bentuk, kadang-kadang dengan bentuk yang sangat besar dan aneh
- iii. Jumlah Mitosis
- Skor 1 : kurang dari atau sama dengan 7 mitosis per 10 lapang pandang
 - Skor 2 : 8 – 14 mitosis per 10 lapang pandang
 - Skor 3 : sama atau lebih besar dari 15 mitosis per 10 lapang pandang

Alat Ukur : mikroskop

Skala pengukuran :

- Grade 1 : skor 3,4 dan 5
- Grade 2 : skor 6 atau 7
- Grade 3 : skor 8 atau 9

(Gracio and Bracko, 2002; Rakha et al, 2008; Rakha et al, 2010)



Grade 1

Grade 2

Grade 3

Gambar 4.2. Grading Kanker Payudara Berdasarkan Nottingham Grading System

I. Alat Dan Bahan Penelitian

1. Faktor Risiko Kanker Payudara

Untuk melihat faktor risiko kanker payudara, dilakukan anamnesis pada pasien dan keluarga pasien meliputi usia, usia partus, jumlah anak, riwayat menyusui, usia menarche, menopause, riwayat KB dan riwayat keluarga dan genetik.

2. Polimorfisme COMT

- a. Pengambilan darah sebanyak 5 – 10 cc
- b. Primer squences
 - Forward 5' GGAGCTGGGGGCCTACTGTG-3'
 - Reverse 5' GGCCCTTTTCCAGGTCTGACA-3' (Selek S et al, 2011).
- c. Reagen High Pure PCR template preparation Kit (Roche Applied Science)
- d. Primer & Probe : TaqMan SNP Genotyping Assay rs4680, Applied Biosystem, Thermo Scientific

- e. Reagen PCR : TaqMan GTXpress Master Mix, Applied Biosystem, Thermo Scientific
- f. C1000 Thermal Cyclor CFX96 Real Time System, BioRad

3. Kadar Estradiol

- a. Darah vena sebanyak kurang lebih 5 cc
- b. Ekstraksi DNA menggunakan reagen *DRG Estradiol ELISA Kit* (kotak *DRG Estradiol ELISA*), suatu enzim immunoassay untuk pengukuran dianostik in vitro kuantitatif estradiol dalam serum dan plasma.
- c. *Microtiterwells*, 12x8 strip (break apart, 96 well); *Well-well* yang dilapisi dengan antibodi anti-Estradiol (poliklonal).
- d. *Standar* (Standar 0 – 6), 7 botol kecil, 1 mL, siap digunakan; Konsentrasi: 0, 25; 100; 250; 500; 1000; 2000 pg/mL.
Konversi: $1 \text{ pg/mL} = 3,67 \text{ pmol/L}$
mengandung 0,03 Proclin 300 + 0,005% gentamicin sulfat sebagai pengawet.
- e. *Konjugat Enzim*, 1 botol kecil, 25 mL,
Estradiol yang dikonjugasi pada peroksidase horseradish (semacam lobak); *mengandung 0,03% Proclin 300, 0,015% BND dan 0,010% MIT sebagai pengawet.
- f. *Larutan Substrat*, 1 botol kecil, 14 mL, siap digunakan; Tetrametilbenzidin (TMB).

- g. *Stop Solution*, 1 botol kecil, 14 mL, siap digunakan; mengandung H_2SO_4 0,5M
- h. *Larutan Cuci*, 1 botol kecil, 30 mL (konsentrasi 40 X);

4. Ekspresi Ki67

- a. Blok paraffin
- b. Antibody Ki67

5. Grading Kanker Payudara

- a. Blok paraffin
- b. Pewarna hematoxylin

J. Cara Kerja

1. Faktor Risiko Kanker Payudara

Untuk melihat faktor risiko kanker payudara, dilakukan anamnesis pada pasien dan keluarga pasien meliputi usia, usia partus, jumlah anak, riwayat menyusui, usia menarche, menopause, riwayat KB dan riwayat keluarga dan genetik.

2. Polimorfisme COMT

a. Prosedur Pengambilan Sampel Darah

- Pengambilan darah sebanyak 5 – 10 cc
- Masukkan ke 2 tabung EDTA tutup ungu 3 cc
- Bolak balik tabung perlahan sekitar 10 kali hingga homogen
- SEGERA , sentrifuge 3000 rpm 15 menit, plasma tidak perlu dipisahkan

commit to user

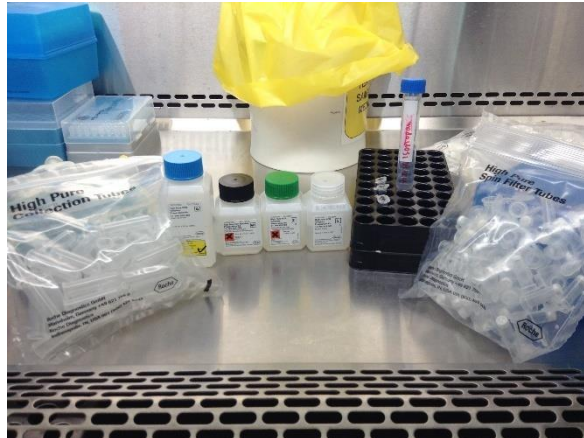
- SEGERA, simpan di freezer -70°C (sementara -20°C)
- Kondisi penyimpanan tabung dalam keadaan tegak agar tidak bercampur lagi

b. Prosedur Pemeriksaan Polimorfisme COMT

Ekstraksi DNA (Spin Column Method)

- Masukkan 200 μL whole blood ke dalam cup sampel, tambahkan 200 μL Binding Buffer dan 40 μL proteinase K, campur dan inkubasi pada suhu 70°C selama 10 – 15 menit
- Tambahkan 100 μL Isopropanol, vortex selama 15 detik.
- Pisahkan Elution Buffer secukupnya ke dalam cup sampel steril, inkubasi pada suhu 70°C .
- Siapkan High Filter Tube, masukkan ke dalam Collection Tube.
- Masukkan sampel ke dalam Filter Tube, usahakan agar tidak mengenai dinding bagian atas tube, sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 X g.
- Lepaskan Filter Tube dari Collection Tube, buang cairan berikut Collection Tube-nya.
- Masukkan Filter Tube ke dalam Collection Tube baru, tambahkan 500 μL Inhibitor Removal Buffer ke dalam Filter Tube, sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 X g.

- Lepaskan Filter Tube dari Collection Tube, buang cairan berikut Collection Tube-nya.
- Masukkan Filter Tube ke dalam Collection Tube baru, tambahkan 500 μ L Wash Buffer ke dalam Filter Tube, sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 X g.
- Lepaskan Filter Tube dari Collection Tube, buang cairan berikut Collection Tube-nya.
- Masukkan Filter Tube ke dalam Collection Tube baru, tambahkan 500 μ L Wash Buffer ke dalam Filter Tube, sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 X g.
- Buang cairan dari Collection Tube, sentrifugasi kembali selama 10 detik pada kecepatan tinggi, buang Collection Tube.
- Masukkan Filter Tube ke dalam cup sampel steril, tambahkan 200 μ L Elution Buffer yang sebelumnya sudah dipanaskan.
- Buang Filter Tube, simpan ekstrak DNA yang ada di dalam cup sampel pada suhu -70 $^{\circ}$ C.



Gambar 4.3. Reagen High Pure PCR Template Preparation Kit

Prosedur PCR

Reaction mixture utk PCR menggunakan reagen TaqMan GTXpress Master Mix (2X) dengan volume total 25 μL yang terdiri dari 12.5 μL TaqMan GTXpress Master Mix (2X), ditambahkan 20X working stock SNP Genotyping Assay 1.25 μL , serta 11.25 μL DNA template (ekstrak DNA) dengan konsentrasi 1-20 ng/well. Amplifikasi dilakukan menggunakan alat C1000 Thermal Cycler CFX96 Real Time System (BioRad) dengan standard protokol sebagai berikut: 10 menit aktivasi enzim pada 95 $^{\circ}\text{C}$, diikuti dengan 40 siklus amplifikasi yang terdiri dari denaturasi selama 15 detik pada 92 $^{\circ}\text{C}$, dan annealing/extension 1 menit pada 60 $^{\circ}\text{C}$.



Gambar 4.4. C1000 Thermal Cycler CFX96 Real Time System (BioRad)

3. Kadar Estradiol

a. Prosedur pengambilan sampel darah

- Mengambil darah vena pasien sebanyak 5 cc
- Dimasukkan ke dalam tabung SST, posisi tabung tegak lurus, isimpan dalam suhu ruang (maksimal 3 jam)
- Cool box, dibersihkan dengan alkohol 70%. Dilapisi plastik bersih
- Tabung SST dimasukan, letakkan es gel di atas tabung
- Diantar ke Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UNS

b. Prosedur Pemeriksaan Kadar Estradiol

Prosedur Pengujian

1. Simpan jumlah well Microtiter didalam *frame holder*.
2. Salurkan 25 μ L dari masing-masing *Standar*, *Kontrol* dan *sample* dengan ujung-ujung sekali pakai yang baru kedalam well yang tepat.

commit to user

3. Salurkan 200 μ L Konjugat Enzim kedalam masing-masing well.

Aduk dengan seksama selama 10 menit. Penting untuk melakukan pengadukan yang sempurna pada tahap ini.

4. Inkubasi selama 120 menit pada suhu ruang (tanpa menutup *plate*-nya).

5. Kocok dengan cepat isi well.

Bilas well sebanyak 3 kali dengan *Wash Solution* (larutan cuci) yang encer (400 μ L per well). Coretkan well dengan tajam diatas kertas abrosbent untuk melepaskan sisa-sisa tetesan.

4. Ki67

a. Persiapan reagen

- H₂O₂ 3% (digunakan untuk menghilangkan aktifitas endogenous peroksidase).
- Trypsin 0,025% dalam PBS (digunakan untuk membersihkan debris protein yang kemungkinan menutup epitope dari bahan yang akan dideteksi).
- Larutan kerja DAB (digunakan sebagai indicator warna pada reaksi enzimatik).
- Aquadestilata 1 ml
- Buffer substrat H₂O₂ 50 tetes
- Larutan DAB stok 1 tetes

b. Cara kerja

Lakukan deparafinisasi, caranya adalah dengan memasukkan sayatan jaringan berturut-turut kedalam :

- xylol : 2 menit
- xylol : 2 menit
- etanol absolute : 1 Menit
- etanol absolute : 1 menit
- etanol 95% : 1 menit
- etanol 95% : 1 menit
- etanol 80% : 1 menit
- etanol 70% : 1 menit
- air mengalir : 10-15 menit
- Masukkan kedalam larutan H₂O₂ 30% : 30 menit
- Cuci dengan PBS 3 kali (a : 2 menit)
- Trypsin 0,025% selama 6 menit pada 37°C
- Cuci dengan PBS (a : 2 menit)
- Masukkan kedalam antibodi monoklonal dilabel enzim (misalnya untuk mendeteksi IgG pada mencit, maka monoklonal antibodi yang dilabel dengan enzim adalah IgG anti mencit) : 30 menit
- Cuci dengan PBS 3 kali (a : 2 menit)
- Masukkan kedalam substrat kromogen : 5 menit
- Cuci dengan PBS 3 kali (a : 2 menit)
- Cuci dengan aquadestilata

- Masukkan ke dalam Mayer's Haematoksin : 6 menit
- Cuci dengan air mengalir, sampai bersih
- Dehidrasi – Clearing – Mounting

5. Grading Kanker Payudara

a. Prosedur Pemeriksaan Grading

1) Processing

- Memilih potongan jaringan yang representatif.
- Jaringan diberi gel cryometrix dan dibiarkan beku selama kurang lebih 2 menit.
- Potong jaringan samapi diperoleh ketebalan 4 – 6 mm.
- Meletakkan jaringan yang sudah dipotong pada objek glass.

2) Pewarnaan

- Merendam sediaan pada hematoxylin selama 1 menit.
- Mencelupkan pada alkohol 70% sebanyak 10 kali celupan.
- Mencelupkan pada eosin alkohol 70% sebanyak 10 kali celupan.
- Mencelupkan pada 4 larutan alkohol masing – masing sebanyak 10 kali celupan.
- Mencelupkan dalam xylol sebanyak 10 kali celupan.
- Mengeringkan sediaan dengan cara diangin – anginkan.
- Setelah preparat kering, meneteskan 2 tetes entellan yang berfungsi sebagai perekat dan menutup preparat dengan deckglass.
- Memberi identitas pasien pada preparat sediaan.

b. Proses Pembacaan Hasil Grading

Dilakukan pemeriksaan histopatologi pada blok paraffin pasien kanker payudara dengan pewarnaan hematoxylin eosin, menilai dan menghitung dalam 10 lapang pandang :

- Differensiasi Glandular (acinar) / Tubuler
- Pleomorphisme Nuklues
- Jumlah Mitosis

K. Alur Penelitian

