

### **BAB III**

#### **METODE PENELITIAN**

##### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

###### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Departemen Obstetri dan Ginekologi, Bagian Patologi Anatomi dan Radiologi Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr Moewardi – Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

###### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan setelah melalui proses kelaikan etik yang didapat dari komisi etik penelitian ilmu dasar/klinik di RSUD Dr Moewardi – Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret dengan lama penelitian selama 6 bulan yaitu dari bulan Januari – Juni 2021.

##### **B. Bahan dan Alat Penelitian**

1. Blok parafin yang berisi sediaan biopsi serviks sebelum diberikan radioterapi secara lengkap dan berurutan.
2. Preparat jaringan dari biopsi serviks sebelum diberikan radioterapi secara lengkap dan berurutan untuk pemeriksaan imunohistokimia.
3. Larutan Xylol I, II, III
4. Alkohol 95%
5. Aquades
6. Larutan Citrate buffer pH 6/Tris EDTA pH 9
7. *Phosphate buffer saline*
8. PAP Pen
9. Larutan *background blocker*
10. Reagen antibodi monoklonal Caspase-7
11. Diaminobenzidine (DAB) Plus (*Chromogen*)

12. Hematoxylin meyer
13. Mikroskop Olympus CX22
14. Alat ultrasonografi GE Voluson S8. BT15VS8.
15. Pesawat simulator HMD-1B
16. Mesin radioterapi pesawat teleterapi Cobalt GWXJ80

### **C. Tatalaksana Penelitian**

#### **1. Jenis, Karakteristik, dan Rancangan Penelitian**

Jenis dan bentuk penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional kohort retrospektif pada penderita kanker serviks stadium IIB-IIIB yang mendapat radioterapi lengkap berupa radioterapi eksternal dilanjutkan radioterapi intrakaviter. Dosis radiasi eksterna (*External Beam radiotherapy whote pelvic* 50 Gy yang terbagi dalam 25 fraksi pemberian), dan radiasi intrakaviter (*brachytherapy*) dengan 20 Gy (dalam dua fraksi).

Pada penelitian ini dinilai karakteristik subjek penelitian berdasarkan umur, pendidikan, paritas, pekerjaan, histopatologi dan *grading* sel kanker.

#### **2. Populasi, Subjek Penelitian dan Besar Subjek**

##### **a. Populasi Target**

Populasi target adalah penderita kanker serviks stadium IIB – IIIB yang mendapatkan radioterapi di kota Surakarta.

##### **b. Populasi Terjangkau**

Populasi terjangkau adalah semua penderita kanker serviks stadium IIB – IIIB yang mendapatkan radioterapi di RSUD Dr Moewardi – Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret mulai bulan Januari 2021 sampai dengan bulan Juni 2021.

##### **c. Subjek Penelitian**

Subjek penelitian adalah populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

a. Kriteria Inklusi

- 1) Penderita kanker serviks stadium lanjut (Stadium IIB - III B) yang mendapatkan terapi radiasi secara lengkap dan berurutan.
- 2) Belum pernah mendapatkan pengobatan kemoterapi dan atau radioterapi sebelumnya.
- 3) Hasil Patologi Anatomi (Biopsi): Karsinoma squamosa serviks uteri, karsinoma adenoskuamosa serviks uteri, dan adenokarsinoma uteri.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Terdapat keganasan lain pada penderita kanker serviks IIB.
- 2) Memiliki kontraindikasi pemberian terapi radiasi
  - i. Sepsis akut berat .
  - ii. Kaheksia berat (hilangnya massa jaringan tanpa lemak yang melibatkan penurunan berat badan sebesar lebih dari lima persen dalam waktu 12 bulan atau kurang dengan adanya penyakit kronis, atau  $IMT < 20 \text{ kg/m}^2$ ).
  - iii. Miokardial infark.

d. Besar Sampel

Pada penelitian ini menggunakan *Rule of thumb* untuk menentukan besar sampel, dimana setiap penelitian yang datanya akan dianalisis secara statistik dengan analisis bivariat membutuhkan sampel minimal 30 subjek penelitian (Murti, 2013).

3. Cara Pengambilan Subjek

Pemilihan subjek dilaksanakan secara *consecutive sampling* yaitu pemilihan semua penderita kanker serviks stadium IIB – IIIB yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sampai besar subjek terpenuhi.

#### 4. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Caspase-7  
Variabel tergantung : Respons terapi/ penurunan ukuran tumor

#### 5. Definisi Operasional

##### a. Ekspresi Caspase-7

###### 1) Batasan Operasional

Akumulasi persentase ekspresi protein Caspase-7 yang tampak dengan pewarnaan immunohistokimia dari seluruh lapangan pandang pada pembesaran 100x.

###### 2) Cara Pemeriksaan

Immunohistokimia diekspresikan pada sitoplasma.

###### 3) Skala

Kontinu.

##### b. Respons Radioterapi

Penilaian respons terhadap radioterapi dapat diklasifikasikan berdasarkan penurunan ukuran tumor menurut penelitian Udiyanto *et al* tahun 2020. Ukuran tumor adalah data kontinu berupa volume tumor dengan satuan centimeter kubik (cm<sup>3</sup>) yang diukur menggunakan alat ultrasonografi GE Voluson S8. BT15VS8.

###### 1) Respons Radioterapi:

Terjadi penurunan ukuran tumor > 70 % setelah diberikan radioterapi.

###### 2) Tidak respons Radioterapi:

Terjadi penurunan ukuran tumor  $\leq$  70 % setelah diberikan radioterapi (Udiyanto *et al.*, 2020).

## 6. Prosedur Penelitian

### a. Cara pengumpulan data

Sampel penelitian diperoleh dari penderita kanker serviks uteri stadium lanjut (Stadium IIB - IIIB) yang datang di Poliklinik Ginekologi Onkologi, Poliklinik Cendana ataupun di Ruang perawatan RSUD Dr. Moewardi, Surakarta, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, sampai dengan jumlah sampel terpenuhi. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan *pretest* pengukuran besar lesi secara klinis dan USG serta pemeriksaan biomarker Caspase-7. Kemudian diberikan perlakuan berupa pemberian radiasi secara lengkap dan berurutan. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan *posttest* yaitu 2 minggu hingga 4 minggu pasca radiasi secara lengkap dan berurutan, meliputi pengukuran kembali besar lesi secara klinis dan USG.

### b. Cara kerja

- 1) Penderita kanker serviks stadium lanjut (Stadium IIB - III B) yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan pemeriksaan *pretest* berupa pengukuran besar lesi secara klinis dan USG serta pemeriksaan biomarker Caspase-7 secara imunohistokimia.
- 2) Seluruh subjek penelitian mendapatkan radioterapi secara lengkap dan berurutan berupa radioterapi eksternal sesuai dengan *Standard Operational Procedure* pemberian radioterapi eksternal Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta dan dilanjutkan radioterapi brakiterapi intrakaviter sesuai dengan *Standard Operational Procedure* pemberian radioterapi brakiterapi intrakaviter Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta. Dosis radiasi eksterna (*External Beam radiotherapy whote pelvic* 50 Gy yang terbagi dalam 25 fraksi pemberian), dan radiasi intrakaviter (*brachytherapy*) dengan 20 Gy (dalam dua fraksi) berupa pemasangan aplikator intrakaviter dan dua aplikator intravaginal (aplikator ovoid).
- 3) Selanjutnya dilakukan pemeriksaan *posttest* yaitu 2 minggu hingga 4 minggu pasca radiasi secara lengkap dan berurutan, meliputi pengukuran kembali besar lesi secara klinis dan USG, untuk menilai respons terapi.

- 4) Seluruh sampel penelitian dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok respons terapi (terjadi penurunan ukuran tumor lebih dari atau sama dengan 70%) dan kelompok tidak respons terapi (terjadi penurunan ukuran tumor kurang dari 70%). Data yang diperoleh dicatat dalam lembar data yang dirancang khusus dan dianalisis menggunakan uji *independent T test*, uji *mann whitney*, uji *chi square*, analisis bivariat, dan penentuan *cut off point* menggunakan kurva *Receiver Operating Characteristics* (ROC).

#### c. Cara Pemeriksaan USG

Kanker serviks uteri pada penelitian ini meliputi Stadium IIB dan IIIB berdasarkan kriteria FIGO 2018. Cara mengukur lesi serviks dengan ultrasonografi, meliputi :

- 1) Diameter anteroposterior : potongan koronal
- 2) Diameter latero-lateral : potongan transversal
- 3) Diameter proksimal-distal : potongan sagital

Hasil pengukuran adalah data kontinu berupa volume tumor dengan satuan centimeter kubik (cm<sup>3</sup>) yang diukur menggunakan alat ultrasonografi GE Voluson S8. BT15VS8.

#### d. Cara pengecatan imunohistokimia

- 1) Pemotongan blok parafin dengan tebal 4-5 mikron. Diletakkan pada slides poly-L-lysine selanjutnya dinkubasi pada suhu 37°C selama 1 malam (agar lebih merekat pada slides).
- 2) Deparafinisasi :
  - a) Direndam dalam xylol I selama 5 menit
  - b) Direndam dalam xylol II selama 5 menit
  - c) Direndam dalam xylol III selama 5 menit
  - d) Direndam dalam xylol IV selama 5 menit
  - e) Direndam dalam alkohol absolut selama 5 menit
  - f) Direndam dalam alkohol 95% selama 5 menit
  - g) Direndam dalam alkohol 70% selama 5 menit



- h) Dicuci dengan aquadest selama 5 menit
- 3) Cuci dengan air mengalir selama 5 menit.
- 4) Cuci lagi dengan aquadest selama 5 menit.
- 5) Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit.
- 6) Retrival antigen dilakukan pada microwave oven dengan Tris EDTA pH 9 pada suhu 90°C selama 3 menit kemudian dilanjutkan pada suhu rendah 10 menit.
- 7) Setelah dingin cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
- 8) Tetesi dengan endogenous peroksidase metanol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 20 menit.
- 9) Cuci dengan air mengalir selama 5 menit
- 10) Tetesi dengan bloking serum selama 10 menit.
- 11) Tiriskan, kemudian tetesi dengan reagen antibodi poliklonal Caspase-7 yang telah disiapkan. Inkubasi pada suhu 4°C selama 18 jam.
- 12) Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
- 13) Tetesi dengan biotin selama 15 menit.
- 14) Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
- 15) Tetesi dengan streptavidin selama 10 menit.
- 16) Cuci dengan PBS selama 2 X 5 menit
- 17) Pemberian substrat enzin peroksidase : DAB selama 3-5 menit
- 18) Cuci dengan air mengalir selama 10 menit.
- 19) Tetesi dengan hematoxylin selama 4 menit .
- 20) Cuci dengan air mengalir selama 10 menit
- 21) Mounting, tutup dengan *deckglass*

## 7. Metode Penghitungan Ekspresi Caspase-7

- 1) Slide diletakkan dibawah mikroskop KCC REM OLY 032400001 model CX22RFS1 kemudian dilakukan pembesaran 100x pada seluruh lapang pandang tumor.
- 2) Kemudian jumlah sel yang mengekspresikan Caspase-7 yang berwarna coklat pada sitoplasma dihitung dan dibandingkan dengan semua sel tumor.
- 3) Perhitungan dilakukan secara manual oleh ahli Patologi Anatomi.

## 8. Instrumen Pengumpulan Data

- a. Rekam medis pasien
- b. Reagen pemeriksaan imunohistokimia Caspase-7
- c. Alat pemeriksaan USG

## 9. Teknik Analisis Data

Uji karakteristik meliputi usia, BMI, paritas, pendidikan, pekerjaan, stadium, histopatologi, dan *grading* menggunakan uji *independent t test*, *mann whitney*, dan uji *chi square*. Uji *independent t test* digunakan untuk membandingkan data numerik yang berdistribusi normal. Uji *mann whitney* digunakan untuk membandingkan data kategorik ordinal. Uji *Chi square/fischer exact test* digunakan untuk membandingkan data kategorik ordinal. Nilai  $P < 0,05$  dianggap signifikan secara statistik. Penentuan *cut off point* dilakukan dengan menggunakan kurva ROC dengan menilai sensitivitas dan spesifisitas. Seluruh analisis statistik dilakukan dengan IBM SPSS versi 23.0 untuk Windows.

## D. Pembiayaan

Penelitian ini bersifat mandiri sehingga seluruh pembiayaan dari penelitian ini ditanggung oleh peneliti.



### E. Alur Penelitian



