

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif menggunakan desain eksperimen murni pada sampel darah tepi pasien Leukemia Akut di Rumah Sakit Umum Daerah dr.Saiful Anwar (RSSA). Di mana sebelumnya sudah dilakukan KIE pada pasien dan keluarganya. Sebagai kelengkapan, juga disertakan formulir dan penjelasan kelaikan etik. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah isolat sel mononuklear darah tepi (PBMC) pasien leukemia akut yang diambil dari RSSA-FKUB dengan studi *ex vivo*. Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan.

Berikut ini adalah kriteria inklusi dan eksklusi dari pasien leukemia akut

1. Kriteria inklusi:

- Pasien baru yang telah terdiagnosis leukemia akut (LLA atau LMA)
- Hapusan darah tepi 70% sel blas
- Leukosit ≥ 10.000 sel/ μL
- Usia 7-12 tahun
-

2. Kriteria eksklusi

- Mendapat terapi kemoterapi
- Remisi parsial/komplit

Pada penelitian ini terdapat empat kelompok dengan satu kelompok kontrol positif dan tiga kelompok perlakuan. Pembagian kelompok perlakuan berdasarkan dosis aspirin dan paparan listrik untuk membentuk elektroporasi yang diberikan. Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian.

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel rumus sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15 \quad (p: \text{jumlah perlakuan}, n: \text{jumlah ulangan}), p = 4 \text{ sehingga:}$$

$$4(n-1) \geq 15 \rightarrow 4n-4 \geq 15 \rightarrow n \geq 4,75 \sim n \geq 5$$

Dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali dan jumlah sumuran berisi sel kultur LA yang digunakan sebanyak 20.

4.3 Variabel Penelitian

1. Variable tergantung: Ekspresi NFkB sebagai penanda jumlah kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut yang mengalami apoptosis.
2. Variable bebas: paparan listrik dan dosis aspirin yang diberikan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2013 di Laboratorium Sentral Rumah Sakit Umum Daerah dr. Saiful Anwar, Malang serta Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya di Malang.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Pengumpulan Sampel

Bahan: sampel darah perifer pasien leukemia akut, EDTA

Alat: spuit steril, vacoutainer 3 mL

4.5.2 Isolasi PBMC

Bahan: darah, ficoll, PBS NaCl

Alat: blue tip, mikropipet, tabung falcon, pembakar bunsen, inkubator, sentrifugator

4.5.3 Kultur Sel

Bahan : sel darah tepi/PBMC, PBS, Media (RPMI), alkohol 70 %, Tripsin-EDTA

Alat :blue tip, semprotan alkohol, mikropipet, tisu gulung, korek, spidol marker, pembakar bunsen, inkubator, sentrifugator, sumuran

4.5.4 Perlakuan (Pemberian Aspirin dan/atau Listrik Pulsasi)

Bahan: aspirin

Alat: sumuran, pipet, adapter, timer, AVO meter, *oscilloscope*, generator elektroforator, *power supply*, elektroda alumunium, kuvet elektroforator (BioRad System), kabel

4.5.5 Panen Sel

Bahan: PBS, Tripsin-EDTA 1x (Tripsin 0,25%), MK (DMEM/RPMI)

Alat: Pipet pasteur, Mikropipet 1 ml, Conical tube, Stiker label/ pulpen marker

4.5.6 Pengukuran Tingkat Apoptosis Sel Menggunakan Imunositokimia NFKB p65

Bahan: gel hasil elektroforesis, membran NC, spon, kertas saring, TMB membran, tween, skim 5%, antibodi primer (*rabbit polyclonal antibody* NFkB p65), antibodi sekunder (IgG biotin labellet), SAHRP, TBS.

Alat: chamber, vortex, panceau, falcon 15ml, refrigerator, shaker, micropipet, blue tip, white tip, yellow tip, tempat sampel.

4.6 Definisi Operasional

1. Isolat sel mononuklear darah perifer (PBMC) pasien leukemia akut adalah sel darah perifer pasien leukemia akut yang sebelumnya telah dilakukan sentrifugasi berdasarkan gradien berat jenis dengan persyaratan pasien belum pernah melakukan kemoterapi dan tidak terjadi remisi.
2. Perlakuan elektroporasi adalah paparan listrik arus searah (*direct current*) menggunakan frekuensi sebesar 200 Hz selama 5 s.
3. Apoptosis isolat sel mononuklear darah perifer adalah kematian sel yang terprogram yang ditandai dengan ekspresi NFkB yang dapat diketahui menggunakan imunositokimia
4. Aspirin yang digunakan dalam bentuk asetylsalicylic acid (serbuk kristal) kemudian dijadikan dalam bentuk suspensi menggunakan pelarut normal saline 0,9% dengan konsentrasi stok 3 mg/ml dengan dosis 2,5 mmol/L, 5 mmol/L, 10 mmol/L.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengumpulan Sampel Sel Darah Tepi/PBMC Pasien Leukemia Akut

Sampel yang digunakan merupakan sisa sampel darah yang diambil dari pasien leukemia akut di Laboratorium IKA dan Laboratorium Sentral RSSA.

Protokol flebotomi yaitu darah diambil dengan spuit steril dan vacutainer 3 ml berisi antikoagulan EDTA

4.7.2 Isolasi Sel Darah Tepi/PBMC

1. Mengambil sampel darah dengan mikropipet pindahkan ke tabung falcon
2. Menambahkan PBS NaCl perbandingan 1:1 dengan darah lalu kocok
3. Menambahkan ficoll perbandingan 1:1 dengan darah menggunakan syringe
4. Sentrifugasi 12x100 rpm selama 30 menit
5. Mengambil buffy coat lalu pindahkan ke tabung falcon baru
6. Menambahkan PBS NaCl
7. Sentrifugasi 12x100 rpm selama 5 menit

4.7.3 Kultur Sel Darah Tepi/PBMC

1. Hasil sentrifugasi, buang supernatan
2. Menambahkan media kultur hingga mencapai jumlah volume sumuran yang diinginkan
3. Homogenisasi dengan cara mengocok atau menggunakan pipet
4. Pindahkan ke sejumlah sumuran yang diinginkan dan sudah ditandai lalu diinkubasi selama satu hari sehingga sel stabil untuk dilakukan perlakuan

4.7.4 Perlakuan

Setelah proses inkubasi selama satu hari dan sel siap untuk diberikan perlakuan, sampel diberikan perlakuan kombinasi elektroporasi (menggunakan paparan listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik) dan aspirin. Perlakuan ini bertujuan untuk menginduksi penurunan ekspresi NFKB. Akan ada empat perlakuan, yaitu:

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Sel Kultur Kontrol dan Perlakuan

| Nama Kelompok | Perlakuan yang Diberikan |
|-----------------|--|
| Kontrol Positif | Sel mononuclear darah tepi pasien leukemia akut tanpa diberi perlakuan |
| Kelompok PA1 | Aspirin 2,5 mmol/L + Paparan listrik 200 Hz selama 5 detik |
| Kelompok PA2 | Aspirin 5 mmol/L + Paparan listrik 200 Hz selama 5 detik |
| Kelompok PA3 | Aspirin 10 mmol/L + Paparan listrik 200 Hz selama 5 detik |

Cara pemberian paparan listrik dan aspirin:

- Mengeluarkan kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut yang telah dikultur dan dilakukan inkubasi selama 24 jam
- Memasukkan sel yang telah dikultur tersebut kedalam cuvet kemudian ditambahkan aspirin dengan dosis yang telah ditentukan
- Melakukan paparan listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dengan menempatkan anoda dan katoda pada cuvet.
- Memasukkan sel yang telah diberikan perlakuan kedalam sumuran dan dilakukan inkubasi selama 3x24 jam

4.7.5 Panen dan Fiksasi Sel

Panen sel dilakukan setelah proses inkubasi selama 3x24 jam. Tujuannya adalah melihat hasil dari perlakuan.

- a. Menyiapkan coverslip dengan 1% larutan gelatin-coated selama 2 jam suhu ruangan, bilas dengan air distilasi, dan angin-anginkan semalaman
- b. Membilas lapisan coverslip sampai bersih dengan PBS
- c. Menambahkan 0,5 mL media kultur ke sumuran sel kultur yang sudah ada coverslip
- d. Membilas media kultur tiap sumuran dengan PBS
- e. Menambahkan 4% formaldehid perbandingan volume 1:1 dengan kultur sel dan inkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan
- f. Membilas sumuran dua kali dengan PBS lalu tambahkan 400 μ L wash buffer
- g. Menyimpan hasil fiksasi pada kulkas suhu 4°C

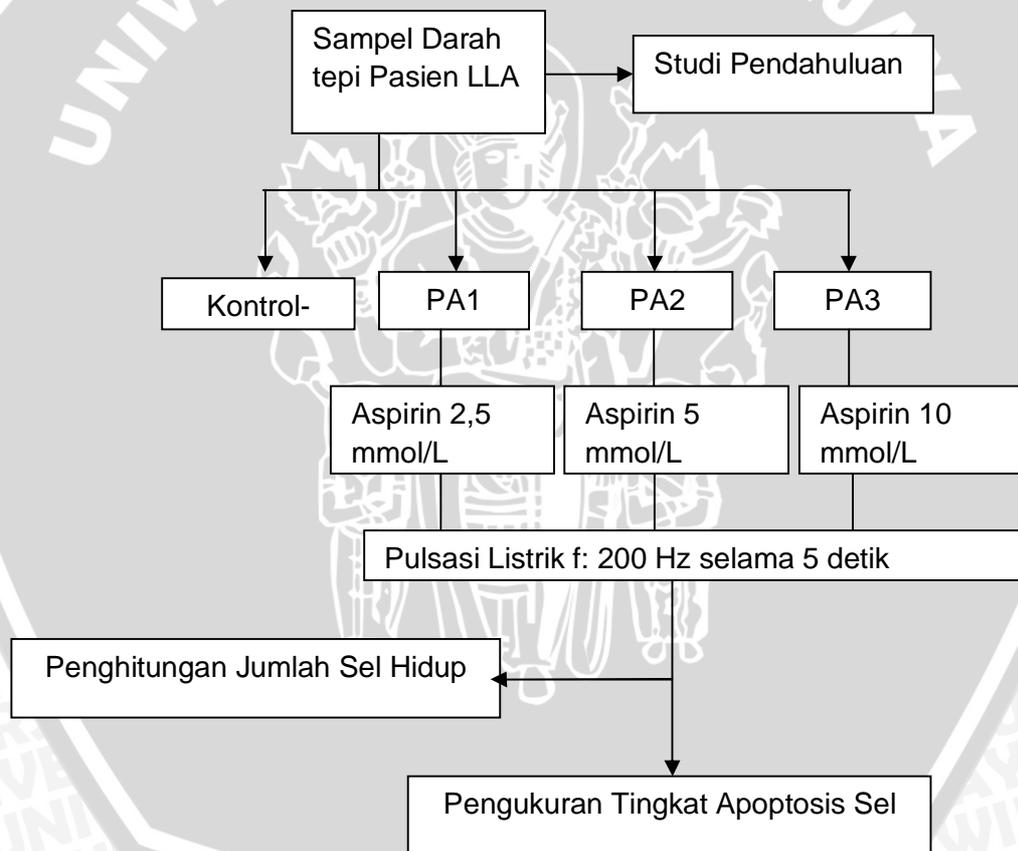
4.7.6 Pengukuran Tingkat Apoptosis Sel Menggunakan Metode Immunositokimia NFkB P65

Setelah dilakukan fiksasi sel, kultur sel darah tepi dapat digunakan untuk pengetesan ekspresi NFkB dengan metode immunositokima.

- a. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit)
- b. Menambahkan H₂O₂ 3% selama 20 menit
- c. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit)
- d. Blocking dengan BSA 1% selama 30 menit
- e. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit)
- f. Menambahkan antibodi primer dalam PBS lalu inkubasi semalaman 4°C
- g. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (2x5 menit)
- h. Menambahkan antibodi sekunder IgG Biotin dalam PBS selama 1 jam pada suhu ruangan
- i. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (2x5 menit)
- j. Menambahkan SA HRP dalam PBS selama 1 jam pada suhu ruangan

- k. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (2x5 menit)
- l. Melakukan pewarnaan dengan Diamino benzidine
- m. Mencuci dengan akuades 2x5 menit
- n. Counter stain dengan Mayer hematoxylen
- o. Mencuci dengan air kran secukupnya
- p. Mounting dengan entelan

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Skema Alur Penelitian

4.9 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

4.9.1 Prosedur Pengumpulan Data

Semua kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol +, PA1, PA2, dan PA3 yang telah diberikan perlakuan sesuai ketentuan alur penelitian, akan dilakukan pengumpulan data dengan cara melakukan pewarnaan pada sel kultur leukemia akut untuk mengetahui ekspresi NFkB pada setiap kelompok menggunakan metode immunositokimia. Data diperoleh dengan menghitung ekspresi NFkB pada inti sel yang berwarna coklat per sepuluh lapang pandang pada setiap kelompok.

4.9.2 Analisis Data

Data mengenai ekspresi NFkB pada kelompok kontrol dan perlakuan pada penelitian yang diberikan kombinasi elektroporasi dan aspirin dianalisis dengan menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 16.0 dengan metode Uji statistika *Analysis of Variance* (ANOVA) *Oneway*. Hipotesis ditentukan melalui H_0 diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh $> 0,05$, sedangkan H_0 ditolak bila nilai signifikansi yang diperoleh $< 0,05$. H_0 dari penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan tingkat ekspresi NFkB antar kelompok. Sedangkan H_1 adalah terdapat perbedaan tingkat ekspresi NFkB antar kelompok. Sebelum melakukan analisa data dengan uji anova, maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan uji *One-way* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok data tidak berpasangan. Syarat uji *One-way* ANOVA adalah populasi yang akan diuji berdistribusi normal, varian dari populasi-populasi tersebut adalah sama (homogen) dan sampel tidak berhubungan dengan yang lain.

Hasil pengukuran tingkat ekspresi NFkB pada kultur sel kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- a. **Uji normalitas data:** bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan *median* dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
- b. **Uji homogenitas varian :** bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Tetapi jika didapatkan varian yang tidak homogen, dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA asalkan memiliki distribusi data yang normal.
- c. **Uji One-way ANOVA :** bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Pada uji statistik ini, yang dievaluasi adalah perbedaan prosentase ekspresi NFkB antar kelompok. Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan prosentase ekspresi NFkB yang menunjukkan adanya perbedaan jumlah sel yang

mengalami apoptosis yang signifikan antar kelompok. Perbedaan dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Pada uji ANOVA ini Hipotesis Null yang diajukan adalah "Keempat kelompok mempunyai tingkat ekspresi NFkB yang sama".

- d. **Post Hoc Tukey Test (uji Least Significant Difference)** : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.
- e. **Uji korelasi Pearson** : untuk mengetahui apakah perakuan aspirin yang terbagi menjadi tiga dosis berpengaruh terhadap tingkat ekspresi NFkB yang menunjukkan tingkat apoptosis kultur sel dalam penelitian ini.
- f. **Uji Regresi** : untuk mengetahui pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan antara variabel tersebut.

