

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan desain eksperimen murni pada sampel darah tepi pasien Leukemia Akut di Rumah Sakit Umum Daerah dr.Saiful Anwar (RSSA). Penelitian ini bersifat *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah isolat leukosit dari pasien Leukemia Akut yang diambil dari instalasi lab sentral RSSA dengan studi *in vitro*. 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 sampel:

Kriteria inklusi:

- Pasien telah terdiagnosis Leukemia Akut yang belum mendapatkan kemoterapi
- Hapusan darah perifer $\geq 70\%$ sel blas
- Hapusan BM $\geq 70\%$ sel blas
- Leukosit ≥ 10.000 sel/ μ L

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah delapan perlakuan sehingga sel kultur leukosit pasien Leukemia Akut dibagi menjadi empat kelompok. Pembagian kelompok berdasarkan variasi dosis aspirin dan pemberian pulsasi

listrik yang diberikan. Pada penelitian ini dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok perlakuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian.

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus berikut:

$$P(n-1) > 16 \rightarrow 4(n-1) > 16 \rightarrow n-1 > 4 \rightarrow n > 5$$

Keterangan:

p: jumlah perlakuan

n: jumlah pengulangan

Dari hasil penghitungan didapatkan bahwa pengulangan yang perlu dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 5 kali, maka banyaknya sampel yang digunakan adalah 20 sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variable bebas: Pulsasi listrik dan Aspirin

4.3.2 Variable terikat: Penurunan jumlah leukosit

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan April 2013 hingga bulan Juli 2013 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya di Malang.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

4.5.1.1 Alat untuk pengolahan darah pasien

a) Vacutainer *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) 3 ml

b) Object Glass

4.5.1.2 Alat pembangkit pulsasi listrik

a) Generator elektroporator

b) Power supply

- c) Electroda alumunium
- d) Kuvet elektroporator (BioRad System)
- e) AVO meter
- f) Timer
- g) Kabel
- h) Oscilloscope 19

4.5.1.3 Sysmex 4000i

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Bahan untuk pengolahan darah pasien

- a) Fresh Whole Blood Pasien Leukemia Akut
- b) *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA)

4.5.2.2 Bahan Aspirin

Bahan aktif aspirin dalam bentuk *asetylsalicyl acid* (serbuk kristal) diperoleh Dari Perusahaan Sigma Aldrich, kemudian akan dijadikan dalam bentuk suspensi dengan pelarut normal saline 0,9% dengan konsentrasi stok 3 mg/ml.

4.6 Definisi Operasional

1. Pulsasi listrik: Paparan listrik arus searah (*direct current*) menggunakan frekuensi sebesar 200 Hz selama 5 detik.
2. Aspirin: Aspirin yang digunakan dalam bentuk *asetylsalicyl acid* (serbuk kristal) kemudian dijadikan suspensi menggunakan pelarut normal saline 0.9% dengan konsentrasi stok 180 mg/10ml. Dosis yang digunakan ada 3 macam yakni 2,5 mmol/L, 5 mmol/L, 10mmol/L (Bellosillo, 1998).
3. Induksi Apoptosis: Penurunan prosentase jumlah leukosit yang diukur dengan menggunakan *hematology analyzer sysmex 4000i*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Isolasi Leukosit dari Darah Perifer Pasien

Protokol ini menggunakan Vacutainer berisi 3 ml darah pasien dalam kondisi steril. Darah pasien yang baru diambil dalam vacutainer langsung dibawa ke lab biomedik FKUB untuk dilakukan kulturkan selama 1x24 jam hingga didapatkan kultur sel yang konfluen setelah itu diberi perlakuan dan diinkubasi selama 3x24 jam untuk kemudian dipanen dan dianalisa.

4.7.2 Dosis Pulsasi Listrik

Dosis diberikan dengan besar frekuensi 200 Hz dengan durasi 5 detik. Setting alat menggunakan adapter, timer, dan dengan pengukuran oleh AVO meter dan dikalibrasi oleh *oscilloscope*.

4.7.3 Dosis Paparan Aspirin

Dosis *acetylsalicyl acid* dibagi dalam tiga dosis: dosis 2,5 mmol/L, dosis 5 mmol/L, dan dosis 10 mmol/L yang ditentukan berdasarkan hasil kajian pustaka. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Bellosillo pada tahun 1998 menghasilkan rekomendasi dosis-dosis aspirin yang dapat menginduksi kematian sel. Untuk kemudahan aplikasi, aspirin serbuk dirubah menjadi aspirin cair dengan konversi dosis terlampir.

4.7.4 Perlakuan dan Kontrol

5 Sampel kultur leukosit pasien Leukemia Akut tanpa perlakuan sebagai kontrol.

5 Sampel kultur leukosit pasien Leukemia Akut yang diberi kombinasi perlakuan aspirin dosis 2,5 mmol/L dan pulsasi listrik dengan dengan frekuensi 200Hz selama 5 detik.

5 Sampel kultur leukosit pasien Leukemia Akut yang diberi kombinasi perlakuan aspirin dosis 5 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200Hz selama 5 detik.

5 Sampel kultur leukosit pasien Leukemia Akut yang diberi kombinasi perlakuan aspirin dosis 10 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200Hz selama 5 detik.

4.7.5 Penghitungan Leukosit pada Kultur Leukosit Pasien Leukemia Akut

Setelah diberi perlakuan, tiap sampel kemudian dihitung jumlah leukositnya dengan menggunakan *hematology analyzer sysmex 4000i*

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan: Sampel darah pasien yang didapatkan dari lab sentral RSSA dilakukan isolasi dan dikultur selama 1 hari. Setelah itu kultur leukosit tersebut diberikan beberapa perlakuan seperti: kontrol negatif, kombinasi perlakuan aspirin dosis 2,5 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200Hz selama 5 S, kombinasi perlakuan aspirin dosis 5 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200Hz selama 5 S, dan kombinasi perlakuan aspirin dosis 10 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200Hz selama 5 S. Setelah diberi perlakuan, kultur sel akan diinkubasikan selama 3 hari. Setelah itu dilakukan penghitungan jumlah leukosit melalui *hematology analyzer: sysmex 4000i*

4.9 Analisis Data

Data yang diambil berupa data hasil penghitungan jumlah leukosit yang hidup setelah diberi perlakuan dan jumlah sel yang mengalami apoptosis. Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian sebagai dasar menentukan hipotesis untuk mengetahui adanya sel kultur Leukosit yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Jika sebaran data normal dan varian sama ($p < 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun jika tidak sama ($p > 0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Penelitian ini bermakna bila nilai $p < 0,05$. Teknis pengolahan data dalam penelitian ini dianalisis menggunakan *software statistical product and service solution 16* (SPSS 16).