

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *analytic observational* dengan metode pengambilan sampel yang digunakan yaitu *cross sectional*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi antara pembentukan NETs dengan kadar antibodi anti dsDNA pada pasien LES. Subyek penelitian yakni pasien lupus eritematosus sistemik yang diambil sampel darah vena perifer sebanyak 9 ml yang terbagi dalam 2 tabung vacutainer EDTA kapasitas 3 ml dan 1 tabung vacutainer serum kapasitas 3 ml. Sampel darah sejumlah 6 ml digunakan untuk isolasi neutrofil. Neutrofil yang telah diisolasi kemudian akan dikultur dan diinduksi PMA untuk menghasilkan NETs. Pembentukan NETs diukur secara kuantitatif melalui peningkatan persentasi absorbansi MPO-DNA yang dikeluarkan oleh neutrofil saat NETosis dibandingkan dengan neutrofil yang tidak diinduksi PMA menggunakan metode ELISA. Serum yang didapatkan digunakan untuk pemeriksaan kadar antibodi anti dsDNA dengan metode ELISA. Hasil dari kedua pemeriksaan tersebut kemudian akan dianalisa statistik dengan SPSS versi 17.0.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang menjadi subyek penelitian adalah pasien LES (Lupus Eritematosus Sistemik) yang berobat di Kota Malang. Sampel penelitian adalah individu dengan lupus eritematosus sistemik yang berobat ke poliklinik rheumatologi bagian penyakit dalam atau ruang rawat inap penyakit dalam di Rumah Sakit Saiful Anwar dalam kurun waktu tertentu, yang telah didiagnosis

LES oleh dokter ahli penyakit dalam konsultan reumatik berdasarkan kriteria ACR 1997. Subyek yang menjadi sampel penelitian memenuhi kriteria sebagai berikut:

#### 4.2.1 Kriteria Inklusi Sampel Penelitian

- Pasien LES wanita
- Bersedia mengikuti penelitian (menandatangani *informed consent*)

#### 4.2.2 Kriteria Eksklusi Sampel Penelitian

- Pasien menderita infeksi berat (sepsis)
- Pasien menderita penyakit liver yang berat (kadar SGOT dan SGPT 2.5 x di atas normal)
- Pasien dalam keadaan hamil atau menyusui.

Subyek dipilih dengan menggunakan metode *purposive sampling*. Pemilihan anggota sampel dengan *purposive sampling* didasarkan atas adanya tujuan dan pertimbangan tertentu dari peneliti misalnya alasan keterbatasan waktu, tenaga, dan dana (Arikunto, 2010).

Penelitian dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Subyek penelitian diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*Informed Consent*)

#### 4.2.3 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel yang didapatkan dalam penelitian ini adalah sejumlah 28 sampel.

### 4.3 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2013 di laboratorium patologi klinik, laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan laboratorium penyakit dalam Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah nilai pembentukan NETs pada pasien LES.

#### 4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kadar antibodi anti dsDNA pada pasien LES.

### 4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Pasien Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penderita yang didiagnosis LES oleh dokter ahli penyakit dalam konsultan reumatik berdasarkan kriteria ACR 1997.
2. *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) adalah sel neutrofil yang pengeluaran protein sitoplasma yang berisi kromatin dengan protein granular yang membentuk jaring-jaring. Sel neutrofil didapatkan dari fraksi PMN (*Polymorphonuclear*). Pembentukan NETs diukur secara kuantitatif sebagai peningkatan persentasi absorbansi salah satu protein granular yang dikeluarkan yakni MPO (*Myeloperoxidase*). terhadap kontrol yakni neutrofil yang tidak diinduksi PMA menggunakan metode ELISA seperti

yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Caudrillier *et al.* (2012).

3. Kadar antibodi anti dsDNA adalah antibodi spesifik pada pasien LES yang diukur kadarnya dalam serum dengan metode ELISA. Kadar antibodi anti dsDNA diukur dalam satuan IU/ml.

#### **4.6 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.6.1 Alat dan Bahan Pengambilan Sampel darah**

Torniquet, alcohol swab, spuit, plester, tabung vacutainer EDTA kapasitas 3 cc 2 buah untuk masing-masing sampel dan tabung vacutainer serum kapasitas 3 cc 1 buah untuk masing-masing sampel pada suhu 25° C dan tidak lebih dari 8 jam (untuk isolasi).

##### **4.6.2 Alat dan Bahan Isolasi dan kultur Neutrofil**

*Whole blood*, polymorphrep, PBS, filter 0,2 µm, tabung falcon, sentrifugator, *disposable pippete*, medium RPMI 1640, FBS (*Fetal Bovine Serum*), TC *well plate*, hemocytometer, mikroskop, inkubator suhu 37°.

##### **4.6.3 Alat dan Bahan Induksi NETs**

*Pippete*, PMA 20 nm, inkubator suhu 37°.

##### **4.6.4 Alat dan Bahan Pengukuran NETs**

*Pippete*, appendorf, lemari pendingin -40°, antibodi anti MPO mAB (upstate, catalog no 07-496), *peroxdized labeled* anti DNA mAB (Cell death kit elisa plus, Rosche), buffer and substrate solution, 96 *well plate* elisa, elisa *reader*.

#### 4.6.5 Alat dan Bahan Pengukuran Anti dsDNA

Antigen dsDNA sintetik, Anti dsDNA ELISA kit *Diagnostic Automation Inc.*, catalog number: 2553-1Z, wash buffer, enzyme conjugate (*Goat anti-human IgG antibody conjugated with HRP*), *Tetraethyl benzidine* (TMB) substrate solution, stop solution, 96 well plate elisa, elisa reader.

#### 4.7 Metode Pengumpulan Data

##### 4.7.1 Prosedur Pengambilan Darah Sampel

Sampel darah yang diperlukan sejumlah 9 ml darah segar diambil dari vena *mediana cubiti* pasien kemudian dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* EDTA (kapasitas 3 cc, 2 buah) dan tabung *vacutainer* serum (kapasitas 3 cc, 1 buah) pada suhu 25<sup>0</sup> C dan tidak lebih dari 2 jam (untuk isolasi).

##### 4.7.2 Prosedur Pemeriksaan Antibodi Anti dsDNA

Pemeriksaan antibodi anti dsDNA dilakukan dengan metode ELISA-*indirect* menggunakan ELISA kit *Diagnostic Automation Inc.* Antigen dsDNA sintetik yang telah dilekatkan pada sumur ditambahkan serum penderita yang telah diencerkan sebanyak 100x, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit. Berikutnya dilakukan pencucian untuk membuang antigen-antigen yang tidak terikat. Ditambahkan enzyme conjugate (*Goat anti-human IgG antibody conjugated with HRP*) dan diinkubasi kembali selama 30 menit. Setelah dilakukan ikubasi dan pencucian, ditambahkan *Tetraethyl benzidine* (TMB) substrate solution dan diinkubasi kembali selama 15 menit. Tahap selanjutnya adalah penambahan stop solution dan perubahan warna yang terjadi diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm. Data kadar anti dsDNA diukur dalam satuan IU/ml.

#### 4.7.3 Prosedur Isolasi dan Kultur Neutrofil

Neutrofil diisolasi dengan menggunakan teknik sedimentasi dekstran pada pelet eritrosit dengan tahap-tahap seperti yang dijelaskan Caudrillier A., *et al.* (2012) sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan dapat berupa sampel darah (*whoel blood*) yang ditambahkan EDTA
2. Menambahkan 6 ml Polymorphrep pada tabung falcon 15 ml dan melapisi bagian atas campuran tersebut dengan 6 ml darah.
3. Sentrifugasi selama 33 menit pada 1400 rpm.
4. Akan terbentuk 2 lapisan cincin, lapisan bagian atas adalah PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) dan lapisan bagian bawah adalah PMN.
5. Aspirasi dan membuang lapisan atas yang jernih kekuningan dan memindahkan lapisan cincin yang mengandung PMN pada tabung falcon yang lain.
6. Membilas sel dengan mengisi tabung dengan PBS sampai 10 ml dan sentrifugasi selama 10 menit pada 1200 rpm.
7. Supernatan dibuang kemudian dicuci kembali dengan PBS sampai 5cc dan sentrifuge 1200 rpm 10 menit, lalu buang supernatan.
8. Diambil 10  $\mu$ l untuk hitung sel dengan hemocytometer.
9. Sementara itu, medium complete disiapkan dari medium RPMI 1640 yang telah difilter 0,2  $\mu$ m, ditambahkan Fetal Bovine Serum.
10. Memasukkan medium complete 500  $\mu$ l ke dalam TC well plate
11. Mensuspensi pelet ke dalam medium complete dengan estimasi masing-masing well terdapat  $2 \times 10^5$  sel.

12. Masukkan pada inkubator selama 18-24 jam.

#### 4.7.4 Induksi Pembentukan NETs

Kultur sel yang telah diinkubasi diinduksi dengan PMA 20 nM pada masing-masing well plate, selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator suhu 37°C selama 2 jam. Kemudian supernatan kultur diambil.

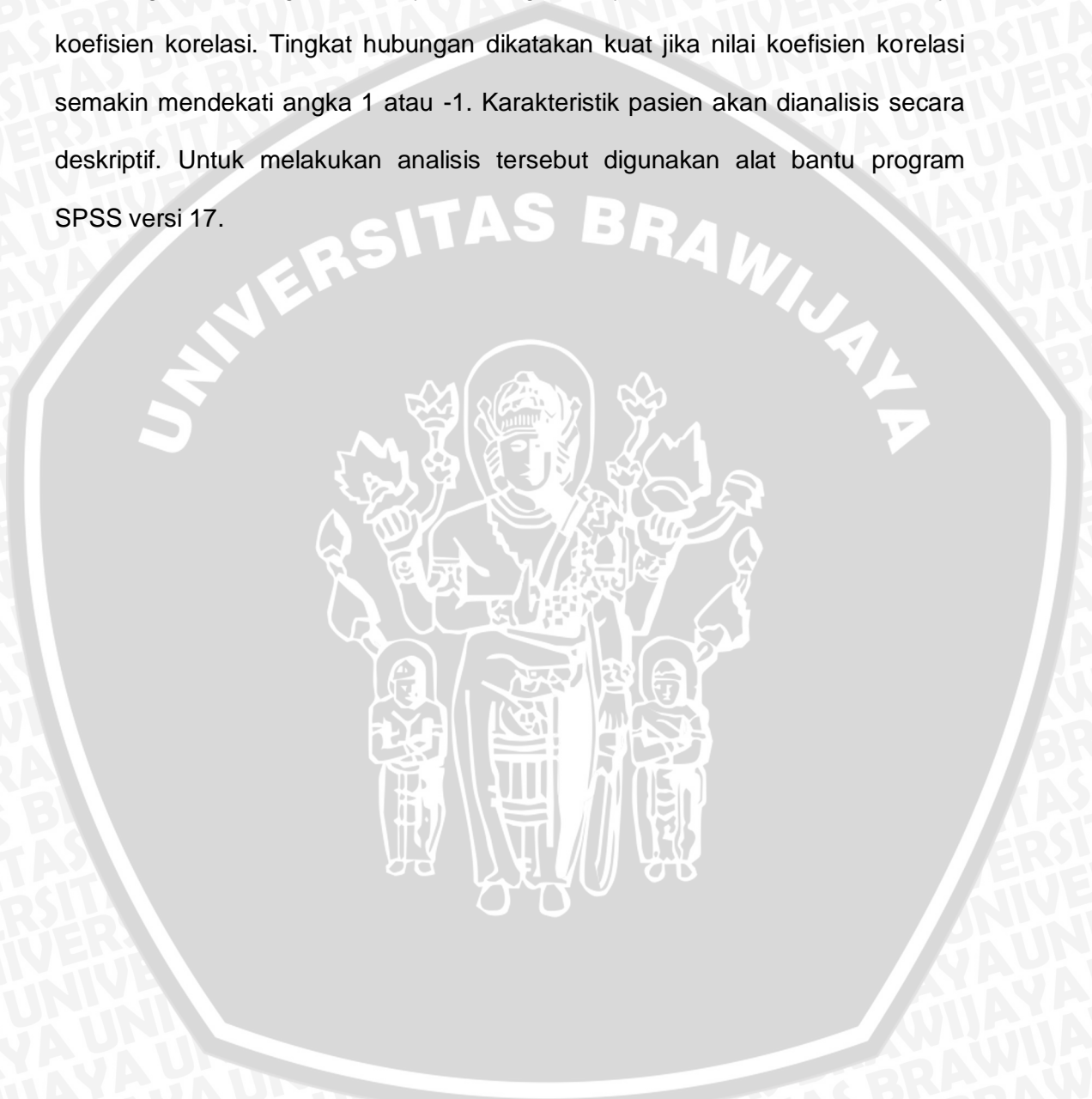
#### 4.7.5 Pengukuran NETs

Supernatan dari kultur sel diambil untuk dijadikan sampel. Antibodi yang digunakan adalah, 5 µg/ml anti-MPO mAb (Upstate, catalog no. 07-496) yang dicoating pada 96-well plates (dilution 1:500 in 50 µl) overnight at 4°C. Setelah dicuci 3 kali (300 µl masing-masing), 20 µl sampel ditambahkan pada well dengan 80 µl *incubation buffer* yang mengandung peroxidase-labeled anti-DNA mAb (Cell Death ELISAPLUS, Rosche; dilution 1:25). Plate diinkubasi selama 2 jam, dengan *shaking* 300 rpm pada suhu ruangan. Setelah 3 kali pencucian (300 µl masing-masing), 100 µl peroxidase substrate (ABTS) ditambahkan. Absorbansi pada panjang gelombang 405-nm diukur setelah 20 menit inkubasi pada suhu ruangan dalam keadaan gelap. Nilai dari NETs yang terbentuk diekspresikan sebagai persentasi bertambahnya jumlah di atas kontrol (neutrofil tanpa induksi PMA) (Caudrillier *et al.*, 2012).

#### 4.8 Pengolahan Data

Data yang terkumpul akan dianalisis dengan menggunakan analisis korelasi spearman. Analisis korelasi spearman digunakan karena pengambilan sampel secara *purposive* tidak memenuhi syarat random sehingga data diuji dengan uji statistik non parametrik (Arikunto, 2010). Analisis dilakukan dengan

tujuan untuk mengetahui korelasi antara pembentukan NETs dengan kadar antibodi anti dsDNA. Arah korelasi dinyatakan dalam bentuk hubungan positif atau negatif, sedangkan kuatnya hubungan dinyatakan dalam besar kecilnya koefisien korelasi. Tingkat hubungan dikatakan kuat jika nilai koefisien korelasi semakin mendekati angka 1 atau -1. Karakteristik pasien akan dianalisis secara deskriptif. Untuk melakukan analisis tersebut digunakan alat bantu program SPSS versi 17.



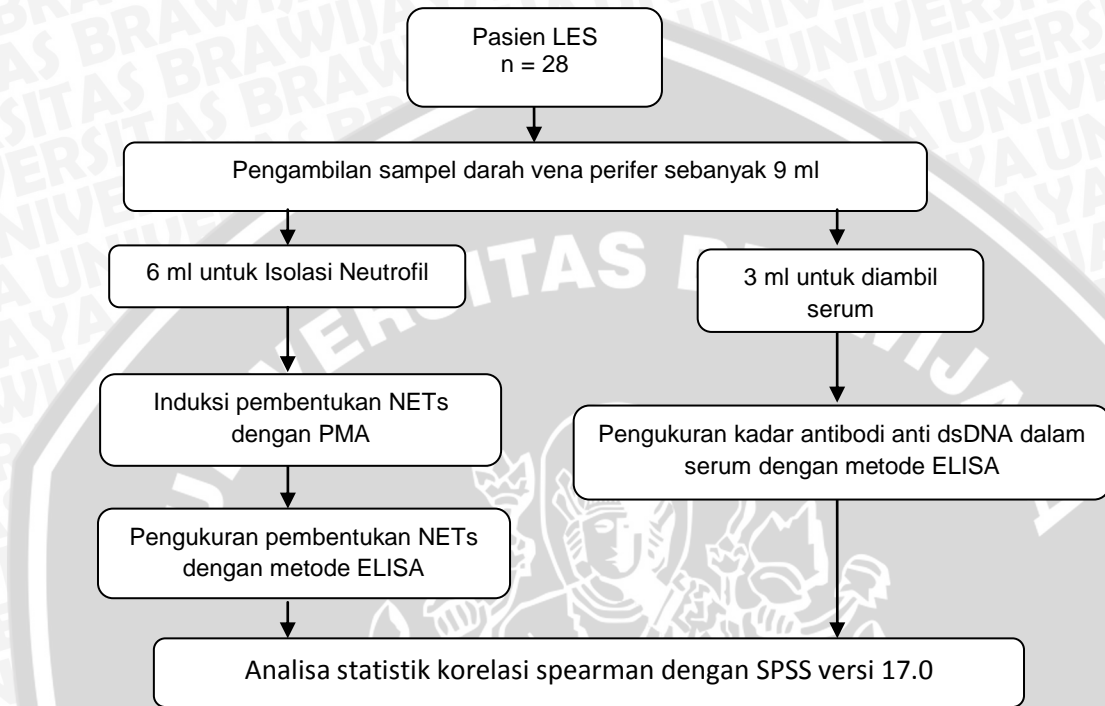


### 4.9 Jadwal Kegiatan

Kegiatan	Bulan I				Bulan II				Bulan III			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>I. Persiapan</b>												
1.1 Persiapan Lab. Biomedik												
1.2 Pembelian bahan												
1.3 Kordinasi poliklinik Reumatologi bagian Penyakit Dalam RSSA Malang												
<b>II. Pengumpulan data</b>												
2.1 Pengambilan darah sampel												
2.2 Pemeriksaan klinis sampel												
2.4 Kultur sel												
2.5 Pemeriksaan NETs MPO-DNA												
2.6 Pemeriksaan antibodi anti dsDNA												
<b>III Analisa Hasil</b>												
3.1 Evaluasi Hasil												
3.2 Pengumpulan data												
3.3 Analisa dan pengolahan data												
3.4 Penulisan laporan penelitian												

#### 4.10 Alur Penelitian

Alur penelitian secara skematis dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 4.1 Bagan alur penelitian.