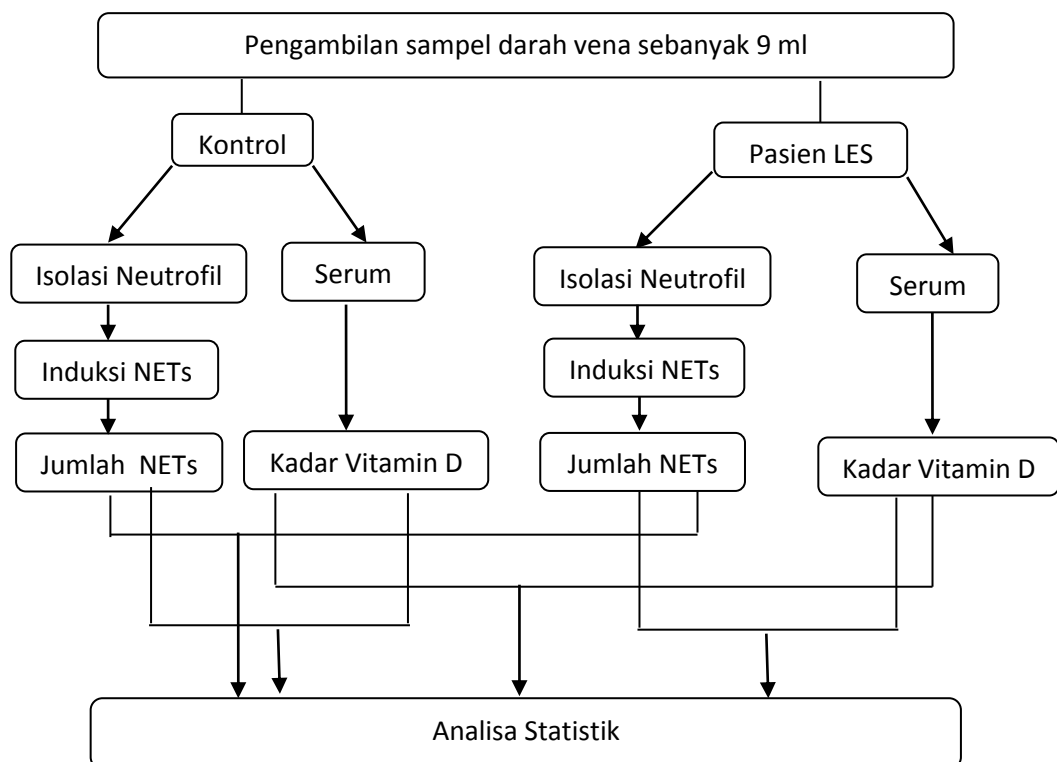


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *analytic observational*, studi kasus kontrol dengan metode pengambilan sampel yang digunakan yaitu *cross sectional*. Penelitian ini membandingkan jumlah pembentukan NETs pada pasien LES dan kontrol, membandingkan kadar vitamin D serum pada pasien LES dan kontrol, serta mengkorelasikan kadar vitamin D serum dengan jumlah NETs yang terbentuk pada pasien LES. Secara skematis, desain penelitian tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.1



Gambar 4.1. Bagan alur penelitian

Subyek penelitian adalah pasien Lupus Eritematosus Sistemik (LES) dan sukarelawan sehat (kontrol) yang diambil sampel darah vena sebanyak 9 ml, terbagi dalam 2 vacutainer EDTA 3 ml dan 1 vacutainer untuk serum 3 ml. Selanjutnya, vacutainer EDTA tersebut diisolasi netrofil untuk diinduksi PMA dan diukur pembentukan NETs melalui MPO-DNA. Sedangkan, vacutainer serum 3ml untuk diperiksa kadar vitamin D. Hasil dari kedua pemeriksaan tersebut dianalisa statistik.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang menjadi target penelitian ini adalah pasien Lupus Eritematosus Sistemik (LES) yang sedang berobat di Rumah Sakit Umum Saiful Anwar Malang dan individu sehat. Kriteria sampel penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut:

4.2.1 Kriteria Kelompok Kontrol

Subyek yang termasuk sebagai kelompok kontrol adalah individu sehat di kota Malang.

4.2.2 Kriteria Kelompok Pasien

Subyek yang termasuk sebagai kelompok pasien adalah individu dengan Lupus Eritematosus Sistemik. Pasien yang berobat ke Poliklinik Ilmu Penyakit Dalam atau ruang rawat inap Penyakit Dalam di Rumah Sakit Umum Saiful Anwar dalam kurun waktu tertentu, yang telah didiagnosis LES oleh dokter ahli Penyakit Dalam Konsultan Rematologi berdasarkan kriteria ACR 1997.

4.2.3 Kriteria Inklusi pada Kelompok Kontrol

- Wanita usia 18 – 45 tahun dan belum menopause.
- Individu sehat dengan hasil laboratorium darah lengkap dalam batas normal.

- Individu bersedia mengikuti penelitian penelitian (menandatangani *informed consent*) .

4.2.4 Kriteria Inklusi pada Kelompok pasien

- Pasien LES wanita
- Pasien yang baru atau telah didiagnosis LES dalam waktu 6 bulan.
- Penyakit LES dalam keadaan aktif dengan skor MEX-SLEDAI > 5
- Pasien berusia 18 – 45 tahun dan belum menopause.
- Pasien bersedia mengikuti penelitian penelitian (menandatangani *informed consent*)

4.2.5 Kriteria Eksklusi pada Kelompok Pasien

- Pasien menderita infeksi berat (sepsis) dengan peningkatan CRP (*C-Reactive Protein*).
- 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*. *Purposive Sampling* adalah teknik penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu.

Penelitian dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pasien LES maupun kontrol diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*Informed Consent*).

4.2.6 Jumlah Subyek Penelitian

Ukuran sampel dalam penelitian adalah antara 30 sampai dengan 500. Bila sampel terbagi dalam kategori maka jumlah anggota sampel setiap kategori minimal 30. (Roscoe, 1982)

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2013 di Laboratorium Sentral RS. Umum Saiful Anwar Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan SMF Ilmu Penyakit Dalam Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar vitamin D serum.

4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai pada pembentukan *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) yang dinyatakan dalam besarnya persentase peningkatan absorbansi MPO-DNA dibanding kontrol.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Pasien Lupus Eritematosus (LES) adalah pasien yang didiagnosis LES oleh dokter ahli penyakit dalam konsultan reumatik berdasarkan kriteria ACR 1997.
2. Kadar Vitamin D serum yang digunakan untuk menentukan status vitamin D adalah bentuk 25-hidroksivitamin D [25(OH)D] di sirkulasi yang diukur dengan 25-OH-VD ELISA Kit, Alegria ; Orgentec Diagnostica GmbH-Germany. Kadar vitamin D yang diukur dinyatakan dalam satuan ng/ml.
3. *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) adalah protein sitoplasma yang berisi protein granular (MPO) yang dikeluarkan membentuk jaring-jaring yang berikatan dengan DNA. Pembentukan NETs diukur dengan membandingkan

absorbansi MPO-DNA yang dikeluarkan dari neutrofil terstimulasi dan neutrofil tidak terstimulasi (kontrol) menggunakan metode ELISA (Cell Death ELISA PLUS, Roche; dilution 1:25) dengan absorbansi panjang gelombang 405nm. Antibodi yang digunakan untuk meng-coating adalah anti-MPO mAb (Upstate, catalog no.07-496). Nilai pada pembentukan NETs dinyatakan dalam besarnya persentase peningkatan absorbansi diatas kontrol (Caudrillier et al., 2012).

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 2 jam (untuk isolasi).

4.6.2 Alat dan Bahan Pengukuran Kadar Vitamin D

Human 25 Hydroxy Vitamin D, 25-OH-VD ELISA Kit, Alegria; Orgentec Diagnostica GmbH-Germany. Vortex mixer, Pipettes for 80 µl, Measuring cylinder for 1000 ml and 2500 ml, Distilled or deionized water.

4.6.3 Alat dan Bahan Isolasi dan Kultur Neutrofil

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

4.6.4 Alat dan Bahan Induksi NETs

Pipette, PMA 20 nm, inkubator suhu 37°.

4.6.5 Alat dan Bahan Pengukuran NETs

Pipete, appendorf, lemari pendingin -40°, antibodi anti MPO mAB (upstate, catalog no 07-496), peroxdized labeled anti DNA mAB (Cell death kit elisa plus, Roche), buffer and substral 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* (kapasitas 3 cc, 3 buah) dilengkapi dengan antikoagulan pada suhu 25⁰ C dan tidak lebih dari 2 jam (untuk isolasi).

4.7.2 Pemeriksaan vitamin D

Sampel yang digunakan berupa sampel darah vena yang dimasukan dalam *vacutainer* serum, selanjutnya di sentrifugasi pada 1000 g selama 20 menit. Sampel serum diuji segera atau disimpan pada temperatur -20°C sampai -80 °C. Pemeriksaan kadar vitamin D menggunakan 25-OH-VD ELISA Kit, Alegria ; Orgentec Diagnostica GmbH-Germany.

Adapun prinsip pemeriksaan vitamin D adalah sebagai berikut. Pemeriksaan dengan Alegria® menggunakan *barcoded 8-well-microstrips*, disebut Alegria® *Test Strips*. Setiap bidang didesain untuk menentukan kadar vitamin D untuk satu sampel pasien. The Alegria® Test Strip terdiri atas satu set reagen komplit diantaranya *enzyme conjugate, enzyme substrate, sample buffer* dan sebuah tes untuk kontrol spesifik. Dua wells dari Alegria® Test Strip dilapisi dengan antibodi 25-OH vitamin D3/D2 dan bertindak sebagai *well* reaksi untuk satu kontrol dan satu sampel pasien. Dua wells lagi dari Alegria® Test Strip

dilapisi dengan 25-OH vitamin D *tracer* atau berturut-turut merupakan suatu kontrol 25-OH vitamin D. Penentuan kadar vitamin D berdasarkan pada uji enzim yang berhubungan dengan *immunosorbent* secara kompetitif (ELISA) dengan langkah-langkah sebagai berikut.

1. Sampel dimasukkan dalam well no.1 menggunakan pipet. Di dalam Alegria® *Random Access Analyser*, sampel dicampur dengan *tracer reagent* dan 25-OH vitamin D₃/D₂ diantar dari vitamin D yang berikatan dengan protein.
2. 25-OH vitamin D dan *tracer reagent* yang dilapisi pada well No 2 disuspensikan dengan *buffer*.
3. Sampel dan kontrol kemudian dipindahkan pada reaksi well no.3 dan 4 dimana 25-OH vitamin D₃/D₂ dan 25-OH vitamin D *tracer reagent* bersaing untuk berikatan dengan *coated* 25-OH vitamin D₃/D₂ antibody.
4. Selanjutnya akan terbentuk kompleks antara 25-OH vitamin D₃/D₂ dan antibody or 25-OH vitamin D.
5. Setelah inkubasi, langkah pencucian pertama adalah memindahkan molekul yang tidak terikat dan molekul yang terikat tetapi tidak spesifik.
6. Setelah itu, tambahkan konjugate enzim untuk berikatan pada *immobilized tracer-antibody complexes*.
7. Setelah inkubasi, langkah pencucian kedua adalah memindahkan konjugate enzim yang tidak terikat.
8. Penambahan *solution* substrat enzim menghasilkan *hydrolisation* dan warna perkembangan selama inkubasi. Intensitas dari warna biru diukur secara fotometrik dengan panjang gelombang 650nm. Intensitas dari warna biru berhubungan terbalik dengan konsentrasi vitamin D pada sampel. Kadar vitamin D yang diukur dinyatakan dalam satuan ng/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 pada *PolymorphprepTM Application Sheet* sebagai berikut :

1. Sampel yang digunakan berupa *whole blood* yang ditambahkan EDTA sebagai anti-koagulan.
2. Menambahkan 6 ml Polymorphrep pada 15 ml tabung Falcon 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 (*Polimorphonuclear cell*) (Ferrante *et al.*,1982)
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 μ l untuk hitung sel dengan *hemocytometer*.
9. Sementara itu, medium complete disiapkan dari medium RPMI 1640 yang telah difilter 0,2 μ m, ditambahkan *Fetal Bovine Serum*.
10. Memasukkan medium complete 500 μ l ke dalam *TC well plate*
11. Mensuspensi pelet ke dalam medium complete dengan estimasi masing-masing well terdapat 2×10^5 sel.

12. Masukkan pada inkubator selama 18-24 jam.

4.7.4 Induksi Pembentukan NETs

Kultur sel menggunakan medium RPMI 1640 selama 18-24 jam. 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

NETs diukur dengan menghitung jumlah absorbansi MPO-DNA yang dikeluarkan dari neutrofil saat terjadi NETs dengan ELISA. Cell culture supernatan 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, Roche; 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 substrat peroxidase (ABTS) ditambahkan. Absorbansi pada panjang gelombang 405nm diukur setelah 20 menit inkubasi pada suhu ruangan dalam keadaan gelap. Pembentukan NETs diukur dengan membandingkan absorbansi MPO-DNA yang dikeluarkan dari neutrofil terstimulasi dan netrofil tidak terstimulasi (kontrol). Nilai pada pembentukan NETs dinyatakan dalam besarnya persentase peningkatan absorbansi diatas kontrol (Caudrillier *et al.*, 2012)

4.8 Analisa Statistik

Data yang terkumpul akan dianalisa dengan bantuan program SPSS versi 16. Pengukuran kadar vitamin D dan pembentukan NETs pada kelompok pasien LES dan kelompok kontrol akan diuji dengan uji beda (uji t-independen). Signifikansi statistik ditentukan jika nilai P kurang $< 0,05$. Hubungan kadar vitamin D serum dengan pembentukan NETs yang diukur melalui MPO-DNA pada kelompok pasien LES akan diuji dengan uji korelasi (Korelasi Pearson). Signifikansi statistik ditentukan jika nilai P kurang $< 0,05$.