

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *True Experimental* dengan jenis penelitiannya *The Randomized pretest - posttest* secara *in vivo* yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium RSUD. Dr. Iskak Tulungagung. Terdapat empat kelompok eksperimental diberi perlakuan yang seluruhnya diawali dengan pengukuran awal (*pretest*), setelah pemberian perlakuan dilakukan pengukuran kembali (*posttest*). Subjek yang dipilih dalam rancangan penelitian ini menggunakan *Randomized* atau tehnik acak.

Perlakuan / intervensi dalam penelitian ini dilakukan pada wanita usia subur dengan *Bacterial Vaginosis* dengan di berikan Metronidazole, Kombinasi Metronidazole + *Glucomannan Hydrolysates* (GMH), *Balance Active*, serta Kombinasi GMH dan *Balance Active*. Sedangkan parameter yang terjadi akibat adanya perlakuan / intervensi pada penelitian ini adalah jumlah sel Th 2 dan kadar sitokin IFN γ pada wanita usia subur dengan *Bacterial Vaginosis*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah pasien bakterial vaginosis yang berobat ke poli kandungan Departemen Obstetri Ginekologi RSUD Dr. Iskak Tulungagung. Pasien *Bacterial Vaginosis* adalah pasien yang telah didiagnosis *Bacterial Vaginosis* oleh dokter spesialis obstetri dan ginekologi berdasarkan pemeriksaan gram staining di Laboratorium RSUD Dr. Iskak Tulungagung.

Penelitian yang akan dikerjakan setelah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik RSUD Dr. Iskak Tulungagung. Seluruh pasien bakterial vaginosis yang

diikutkan dalam penelitian ini diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (Informed Consent).

4.2.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu pasien dengan keluhan keputihan dan telah didiagnosis *Bacterial Vaginosis* yang datang berobat ke Poli Kandungan RSUD. Dr. Iskak Tulungagung. Pengambilan sampel dilakukan oleh peneliti bersama dengan petugas dari RSUD. Dr. Iskak Tulungagung dan sesuai dengan syarat kriteria inklusi dan eksklusi.

a. Kriteria inklusi

- 1) Wanita usia 20-45 tahun.
- 2) Wanita yang telah menikah atau sudah pernah berhubungan seksual.
- 3) Wanita yang mengalami keputihan encer homogen yang berwarna putih keabu-abuan.
- 4) Wanita dengan hasil gram (+) vaginosis.
- 5) Wanita dengan adanya "*clue cells*" pada pengujian dibawah mikroskop dari sampel yang diambil dari vagina (*swab*).
- 6) Wanita dengan bau "*fishy*" yang makin tajam setelah penambahan 10% KOH (pelepasan amina) pada sampel cairan vagina.
- 7) Wanita yang bersedia menjadi responden penelitian.
- 8) Wanita dengan persetujuan pasangan (suami).
- 9) Wanita dengan siklus menstruasi 28 hari (teratur) dan 1-2 hari post menstruasi.

b. Kriteria eksklusi

- 1) Hasil pemeriksaan direct swab didapatkan bakteri *Gonococcus*.
- 2) Subyek sedang hamil atau menyusui
- 3) Subyek yang menggunakan probiotik atau prebiotik di luar protokol studi ini

- 4) Subyek dengan penggunaan antibiotik jenis apapun untuk pengobatan penyakit lainnya.
- 5) Subyek yang tidak dapat memenuhi ketentuan dan instruksi dari protokol studi.
- 6) Subyek dengan *Immuno-compromise* dan penyakit yang berhubungan dengan sistem imunitas tubuh (HIV/ AIDS, SLE).
- 7) Subyek dengan kontrasepsi hormonal (suntik, pil, implant).
- 8) Wanita dengan penyakit sistemik akut (Diabetes Mellitus).
- 9) Wanita dengan *Bacterial Vaginosis* non spesifik yang tidak bersedia berpartisipasi.

4.2.3 Jumlah Sampel

Besar sampel penelitian yaitu penghitungan besarnya pengulangan pemeriksaan ditentukan berdasarkan rumus :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

Keterangan.

t adalah banyaknya kelompok = 4 kelompok

r adalah replikasi (unit experimental = besar sampel perkelompok)

Pada penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan, sehingga sampel yang diperlukan adalah :

$$(4-1) (r-1) \geq 15$$

$$3 (r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq 18 : 3$$

$$r \geq 6 \text{ orang sampel/ kelompok}$$

Jumlah sampel secara keseluruhan adalah jumlah perlakuan dikalikan jumlah pengulangan $6 \times 4 = 24$ orang.

4.2.4 Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok penelitian masing-masing kelompok terdiri dari 6 Pasien :

a. Kelompok 1 (Metronidazole)

Pasien Hanya di berikan terapi Metronidazole 500 mg 2 kali sehari selama 7 hari. Selama 21 hari diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-11 dan hari ke-22.

b. Kelompok 2 (Metronidazole + *Glucomannan Hydrolysates* (GMH))

Pasien diberikan terapi Metronidazole 2 kali sehari selama 7 hari dan diberikan pessaries berisi *Glucomannan Hydrolysates* (GMH), Pasien menggunakan pessaries selama 21 hari dan profil mikrobiologi vagina (swab) diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-11 dan hari ke-22. Pessaries (300mg) digunakan 3 kali seminggu dan sebaiknya sebelum tidur.

c. Kelompok 3 (*Balance Active*)

Pasien diberikan kombinasi terapi *Balance Active*. Digunakan 1 kali sehari selama 7 hari dan pemberian sebelum tidur. Selama 21 hari diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-11 dan hari ke-22.

d. Kelompok 4 (Kombinasi *Balance Active* + GMH).

Pasien diberikan kombinasi terapi *Balance Active* dan pessaries *Glucomannan Hydrolysates* (GMH). Digunakan 3 kali seminggu dan pemberian sebelum tidur. Selama 21 hari diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan GMH+ *Balance Active*), hari ke-11 dan hari ke-22.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Pengambilan Sampel dilakukan di Poli Kandungan RSUD. Dr. Iskak Tulungagung. Pemeriksaan sediaan darah untuk melihat jumlah sel Th 2 dan kadar sitokin IFN γ dilakukan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang sebagai tempat melakukan pewarnaan secret vagina untuk melihat bakteri *Gonococcus* dan koloni bakteri.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Agustus tahun 2017

4.4 Variabel Penelitian

Variabel adalah suatu atribut atau sifat yang dimiliki oleh obyek dan memiliki variasi tertentu untuk diterapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2012).

a. Variabel tergantung (dependent)

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu sel Th 2 dan sitokin IFN γ

b. Variabel bebas (independent)

Variabel independent dalam penelitian ini adalah Metronidazole, *Balance Active*, dan *Glucomannan Hydrolysates* (GMH).

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yaitu menjelaskan semua variabel dan istilah yang akan digunakan dalam penelitian secara operasional, sehingga mempermudah pembaca/penguji dalam mengartikan makna penelitian (Nursalam, 2013).

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1	Independen : Antibiotik Metronidazole	Metode lama untuk mengatasi BV dengan menggunakan antibiotik Metronidazole peroral dengan dosis 500mg, 2 x sehari selama 7 hari berturut- turun	-	-
2	Independen : <i>Glucosmannan Hydrolysates</i> (GMH)	Prebiotik GMH "pessaries" berisi hasil ekstraksi dari tanaman konjac (sebagai polisakarida). Dalam hal ini digunakan untuk menutrisi dari pertumbuhan bakteri yang menguntungkan berguna untuk menekan pertumbuhan patogen, dengan diproduksinya substansi anti-mikrobia (asam, H ₂ O ₂ dan bacteriocin). (Tester, 2011)	-	Ratio
3	Independen : <i>Balance Active</i>	Substrat prebiotik yang berbentuk <i>tube</i> sebagai prebiotik menguntungkan guna menunjang keseimbangan flora normal di genetalia wanita sehingga dapat menekan perkembangan patogen.	-	Ratio
4	Dependen : IFN γ	IFN γ adalah sitokin yang mengaktifkan makrofag untuk membunuh fagosit. IFN γ merangsang ekspresi MHC I dan MHC II dan konstimulator APC. IFN γ meningkatkan diferensiasi sel CD4+ naif ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2 (Baratawidjaja, 2014).	Human ELISA kit	Interval
5	Dependen : Th2	Th2 adalah mediator untuk reaksi alergi dan pertahanan infeksi terhadap parasite yang juga memproduksi sitokin seperti IL-4, IL-13, dan IL-10 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag (Baratawidjaja, 2014).	Flowcyto metry	Interval
6	Variabel Kendali <i>Bacterial Vaginosis</i>	<i>Bakterial Vaginosis</i> (BV) adalah infeksi polymicrobial ditandai oleh kurangnya H ₂ O ₂ yang diproduksi <i>Lactobacilli</i> dan pertumbuhan berlebih dari organisme anaerob fakultatif <i>Gardnerella vaginalis</i> , (Donders, 2010; O'Hanlon, 2011)	Nugent Score	Ratio Nugent's Score: 1 skor 0-3 : normal 2 skor 4-6 : intermediet 3 scor ≥ 7 : BV
7	Variabel Moderator Wanita Usia Subur	Wanita dengan keadaan organ reproduksi berfungsi dengan baik, usia antara 20-45 tahun	-	Interval

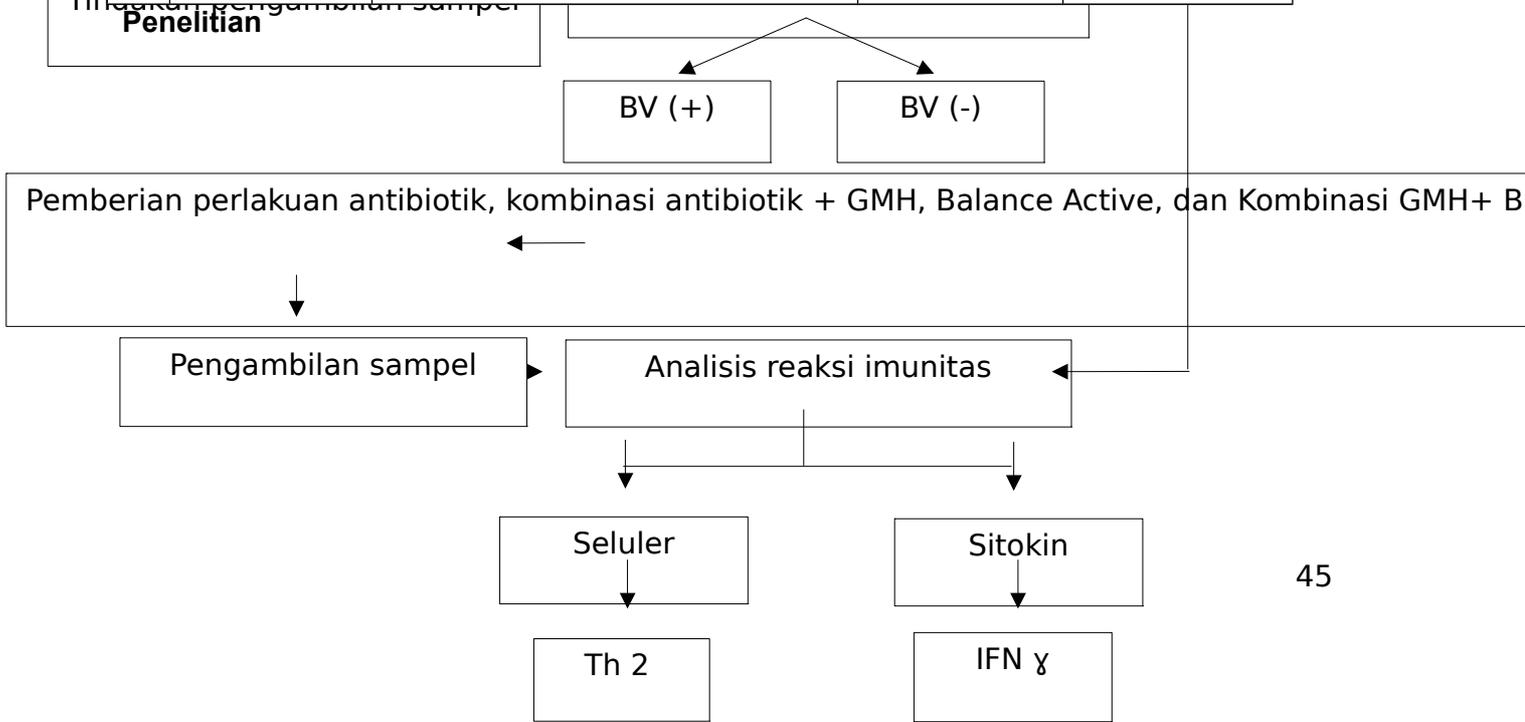
A
l
u
r

4.6

A

Informed C

Tinjauan Pengambilan Sampel
Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

4.7 Pengolahan dan Analisis Data

Pada penelitian ini teknik analisis data dilakukan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu dengan menggunakan uji Shapiro – Wilk sedangkan uji komparasinya menggunakan One Way Annova. Semua perhitungan analisis data tersebut menggunakan software *SPSS for Windows 23*.

4.7.1 Uji Prasyarat Parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dapat dipilih dengan pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik parametrik. Dan sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistik parametrik maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau berdistribusi normal. Jika p-value menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf

signifikan $\alpha = 0.05$ maka dapat ditarik kesimpulan bahwa data berdistribusi normal sehingga uji parametrik dapat digunakan (Sugiyono, 2012)

4.7.2 Uji *Repeated Annova*

Teknik analisis data uji *Anova* ini digunakan untuk membandingkan atau komparasi antara 4 kelompok sampel yang bebas (*independent*). Teknik ini digunakan untuk membandingkan dua nilai rerata variabel terukur (data berskala interval atau rasio) dengan ketentuan bahwa data terdistribusi normal. Adapun kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*, jika *p-value* > $\alpha = 0.05$ maka disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok yang dibandingkan, dan jika *p-value* < $\alpha = 0.05$ maka disimpulkan ada perbedaan yang bermakna antar dua kelompok yang dibandingkan (Dahlan, 2013).

4.8 Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Alat Penelitian

Alat untuk pemeriksaan sitokin dan seluler : Human elisa kit, Human flocytometri kit, Obyek glass, Cawan petri, tabung centrifuse (1,5 ml, 15ml, 50ml) .tabung reaksi, vacutainer BD EDTA, Blue tip, Yellow tip, White tip, Sput (1cc, 5cc), handscoun, Etiket, Plester (untuk Fiksasi), Tabung Anaerob, Ice Box, alat tulis.

4.8.2 Bahan Penelitian

- a. Pasien yang digunakan dalam penelitian ini adalah pasien yang datang ke Poli kandungan RSUD. dr. Iskak dengan keluhan Keputihan.
- b. Metronidazole 500 mg digunakan 2 kali sehari selama 7 hari.

c. Produk *Balance Active* digunakan sesuai petunjuk pabrik pembuatnya yaitu sekali sehari selama 7 hari.

d. Pessaries *Glucomannan Hydrolysates* (GMH) 300 mg digunakan 3 kali seminggu dan sebaiknya sebelum tidur.

e. Pasien dilihat profil mikrobiologi vagina (swab) dan diambil sampel darah kemudian diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan), hari ke-11 dan hari ke-22.

Skor	Morfotipe <i>Lactobacillus sp</i>	Morfotipe <i>Gardnerella sp</i> dan <i>Bacteroides sp</i>	Morfotipe bakteri gram
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ atau 2+
2	2+	2+	3+ atau 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Pengumpulan Sampel Data

Pemeriksaan Gram dilakukan di Laboratorium RSUD Tulungagung untuk mencari morfotipe flora vagina seperti *Lactobacillus sp*, *Gardnerella sp*, *Bacteroides sp*, dan variasi bakteri lainnya. Pengambilan lendir vagina dengan cara mengusap fornix posterior dengan kapas lidi steril yang telah dibasahi dengan larutan garam fisiologis (kontak dengan spekulum dihindari). Lendir vagina dioleskan pada kaca objek yang sudah dibersihkan, dibiarkan kering di udara, dan dilewatkan di atas api spiritus untuk menghilangkan lemak, serta diberi label identitas subjek penelitian. Sampel disimpan pada kotak preperat dan dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk diwarnai dengan pewarnaan Gram kemudian dibaca. Penghitungan skor Nugent untuk diagnosis bakterial vaginosis. Sediaan yang sudah diwarnai dengan pewarnaan Gram di atas akan dinilai dan diberikan skor berdasarkan kriteria Nugent (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Sistem skoring pada pewarnaan gram

Keterangan : Morfotipe diberikan skor berdasarkan jumlah yang dilihat per lapang pandang. 0: tidak terdapat morfotipe abnormal; 1+: tampak <1 morfotipe abnormal; 2+: tampak 1-4 morfotipe; 3+: tampak 5-30 morfotipe; 4+: tampak ≥ 30 morfotipe. Diagnosis BV berdasarkan skor Nugent: normal (skor 0-3), intermediet (skor 4-6), BV (skor ≥ 7) ([Ocviyanti et al., 2009](#)).

4.9.2 Bahan Glucomannan dan Lactid Acid

Glucomannan hydrolysates (GMH) yang digunakan yaitu GMH Pessary (300mg) dari Glycologic Limited, Glasgow, UK, dimanufaktur oleh East Angel, Wuhan, China. *Lactic Acid* yang digunakan yaitu *Balance Activ* $\text{\textcircled{R}}$ BV, dimanufaktur oleh Roll Kullgren AB, Agatan 4, Gnesta, Sweden.

A. Pessaries (Glucomannan Hydrolysates)



B. Lactic Acid (*Balance Activ* $\text{\textcircled{R}}$ BV Gel)



**Gambar 4.2 A). Pessaries (*Glucomannan Hydrolysates*);
B). *Lactic Acid (Balance Activ® BV Gel)***

4.9.3 Pengukuran Presentasi Jumlah Sel Th2

4.9.3.1 Alat

- a. Mikropipet ukuran 200-1000 μL dan 50 μL
- b. Tip warna biru untuk mikropipet ukuran 200-1000 μL dan Tip warna kuning untuk mikropipet ukuran 50 μL
- c. Cell Strainer (filter)
- d. Tabung 10 ml
- e. Tabung Eppendorf 1,5 ml (tabung sentrifuge)
- f. Alat pecampur/pengaduk (vortex)
- g. Bengkok
- h. Pinset dan gunting
- i. *Handschoen*
- j. Mesin sentrifuge (Khusus untuk ukuran tabung besar / 15 mL)
- k. Kuvet baca untuk *flow cytometry*
- l. Mesin *flow cytometry*
- m. Computer

4.9.3.2 Bahan

- a. Sampel darah *whole blood* sebanyak 1 cc
- b. Larutan Cell Staining Buffer (2%) Fetal Bovine Serum (FBS) dalam Phosphat Buffer Saline (PBS) Ph 7,2
- c. Larutan Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer, komposisi:
 - 8,26 g NH_4Cl
 - 1 g KHCO_3
 - 0,037 g EDTAKomposisi itu diencerkan dengan aquades (H_2O) sebanyak 1 L
- d. Larutan Phosphat Buffer Saline (PBS), komposisi :
 - NaCl 8 gr
 - Na_2HPO_4 1,44 gr
 - KH_2PO_4 0,24 gr
 - KCl 0,2 grKomposisi itu diencerkan dengan aquades (H_2O) sebanyak 1 Liter dengan ph 7,2
- e. Larutan campuran antibody FITC anti human CD4 dan PE anti human CD8 dalam *Cell Staining Buffer*
- f. Alcohol 70%

4.9.3.3 Prosedur Flowcytometry

- a. Memasukkan *whole blood* ke dalam cawan petri yang telah diisi dengan 2 ml *Cell Staining Buffer*, dengan tujuan untuk mempertahankan sel supaya tetap hidup.
- b. Pindahkan tampungan sel tersebut ke dalam tabung *Eppendorf* (1,5 ml), sebanyak 1 ml.
- c. Tabung *Eppendorf* yang berisi sel dimasukkan ke dalam alat sentrifugasi dengan posisi no 1 dan 13 supayaimbang sehingga saat dilakukan

- sentrifugasi (diputar) pada 1500 rpm, 4 derajat selama 5 menit terpisah antara pellet sampel dan cairan (supernatant).
- d. Membuang supernatant (cairan) dan menambahkan 1 ml *Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer* ke dalam pellet sampel supaya eritrosit lisis tampak putih, hanya limfosit saja yang tersisa/terextract
 - e. Menghomogenkan tabung *Effendorf* yang berisi sampel hingga sempurna dengan cara divortex atau pipeting
 - f. Melakukan sentrifugasi pada 1500 rpm, 4 derajat selama 5 menit
 - g. Membuang supernatant dan tambahkan pellet sampel dengan 1 ml *Phosphat Buffer Saline (PBS)*, dilakukan *vortex* atau pipeting lagi
 - h. Melakukan sentrifugasi kembali pada 1500 rpm, 4 derajat selama 5 menit
 - i. Membuang supernatant yang terbentuk, dan cuci sekali lagi pellet dengan 1 mL PBS, divortex atau pipeting lagi
 - j. Melakukan sentrifugasi pada 1500 rpm, 4 derajat selama 5 menit
 - k. Membuang supernatant dan pipet 50uL suspensi pellet sampel dan memasukkan ke dalam tabung 1,5 mL baru
 - l. Membuat *Staining Solution* yang terdiri dari campuran antibodi *FITC anti human CD4* dan *PE anti human CD8* dalam *Cell Staining Buffer*, dengan perbandingan 1 : 100 (bila sampel banyak)
 - m. Menambahkan 50 μ L *Staining Solution* ke dalam 50 μ L suspensi sampel di atas, melakukan pipeting hingga homogen. Kemudian inkubasi pada *Room Temperature* dan kondisi gelap, selama 20-30 menit supaya membentuk ikatan antara antibody dan antigen.
 - n. Setelah inkubasi selesai, menambahkan 350 μ L *Cell Staining Buffer* kemudian pindahkan suspensi sampel tersebut ke dalam kuvet kaca, lakukan pipetting lagi supaya tercampur dengan rata.

- o. Kuvet kaca dipasang pada mesin flowcytometry dan segera melakukan analisis flowcytometry dengan BD FACS Calibur pada Mode Cell Quest Pro yang disambungkan dengan computer.

4.9.4 Pengukuran Presentasi Kadar Sitokin IFN γ

4.9.4.1 Alat

- a. Unit Legend Max Human IFN γ ELISA Kit with Pre-coated Plates dengan filter panjang gelombang 450 nm
- b. 1 unit Komputer (untuk mengolah data)
- c. 1 unit shaker mixer
- d. 1 unit vortex
- e. 1 buah Styrofoam box
- f. 1 buah mikro pipet (Yellow tip 20-200 μ L)
- g. 1 buah mikropipet multichannel
- h. 1 buah timer
- i. Bengkok untuk membuang yellow tip

4.9.4.2 Bahan

- a. Sampel plasma
- b. Water for irrigation
- c. Appendorf
- d. Disposable polypropylene or polyethylene test tubes untuk pengenceran sampel dan standar
- e. Yellow tip untuk mikropipet
- f. Hand schoen
- g. Tisu
- h. Human ELISA IFN γ kit.

4.9.4.3 Prosedur Pengukuran dengan ELISA Kit

- a. Cuci tangan dan menggunakan hand scoon
- b. Mempersiapkan alat dan bahan yang digunakan, mengecek tanggal kadaluarsa bahan yang digunakan.

Serum - Gunakan tabung pemisah serum (SST) dan memungkinkan sampel untuk membeku selama 30 menit di suhu ruang. Centrifuge selama 15 menit pada 1000 x g. Hapus serum dan uji segera (prosedur aktivasi sample) atau aliquot dan simpan pada suhu ≤ -70 ° C. Hindari siklus beku-mencair yang berulang.

- c. Prosedur Assay
 1. Membawa semua reagen dan sampel ke suhu kamar sebelum digunakan.
 2. Siapkan semua reagen, pengenceran standar atau standard dilution, dan sampel yang telah diaktifkan.
 3. Hapus kelebihan strip microplate plate frame, mengembalikan ke kantong foil yang berisi paket pengering, dan reseal.
 4. Tambahkan 50 uL Assay Buffer A ke masing-masing well.
 5. Tambahkan 50 uL standar, kontrol, atau diaktifkan sampel per well. Ketuk plate dengan lembut untuk mencampur. Tutup dengan setrip perekat yang disediakan. Inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar sambil lakukan *shaking*.
 6. Aspirasi setiap well dan cuci (*wash*), mengulangi proses tiga kali untuk total empat mencuci. Cuci dengan mengisi masing-masing well dengan Wash Buffer (400 uL) menggunakan botol semprot, berjenis dispenser, atau autowasher. penghapusan lengkap cair pada setiap langkah sangat penting untuk baik kinerja. Setelah mencuci terakhir, menghilangkan sisa Wash Buffer oleh aspirating atau decanting. Membalikkan plate dan hapuskan ke handuk kertas yang bersih.

7. Tambahkan 100 uL IFN γ Conjugate sama dengan baik. Tutup dengan strip perekat baru. inkubasi untuk 2 jam pada suhu kamar sambil lakukan *shaking*.
8. Ulangi aspirasi / mencuci seperti pada langkah 5.
9. Tambahkan 100 uL Avidin-HRP A Solution untuk masing-masing well dengan baik. Inkubasi selama 30 menit di suhu kamar sambil lakukan *shaking*.
10. Ulangi aspirasi / mencuci seperti pada langkah 5.
11. Tambahkan 100 uL Substrat Solusi untuk masing-masing dengan baik. Inkubasi selama 30 menit di ruang suhu. Lindungi dari cahaya.
12. Tambahkan 100 uL Stop Solution untuk setiap sumur. Tekan dengan lembut piring untuk memastikan menyeluruh pencampuran.
13. Tentukan kerapatan optik masing-masing dengan baik dalam waktu 30 menit, menggunakan microplate reader set ke 450 nm.
14. Olah Hasil print out ELISA reader ke dalam program excel untuk perhitungan data selanjutnya.
15. Rata-rata duplikat bacaan untuk setiap standar, kontrol, dan sampel dan kurangi rata-rata nol standar kerapatan optik (O.D.).
Buat kurva standar dengan mengurangi data menggunakan perangkat lunak komputer yang mampu menghasilkan empat parameter logistik (4-PL) kurva fit. Sebagai alternatif, membangun sebuah kurva standar dengan memplot absorbansi rata untuk setiap standar pada sumbu y terhadap konsentrasi pada sumbu x dan menggambar kurva cocok melalui titik-titik pada grafik. Data dapat linierisasi oleh memplot log dari konsentrasi human IFN γ manusia versus log dari O.D. dan kecocokan garis dapat ditentukan dengan analisis regresi.