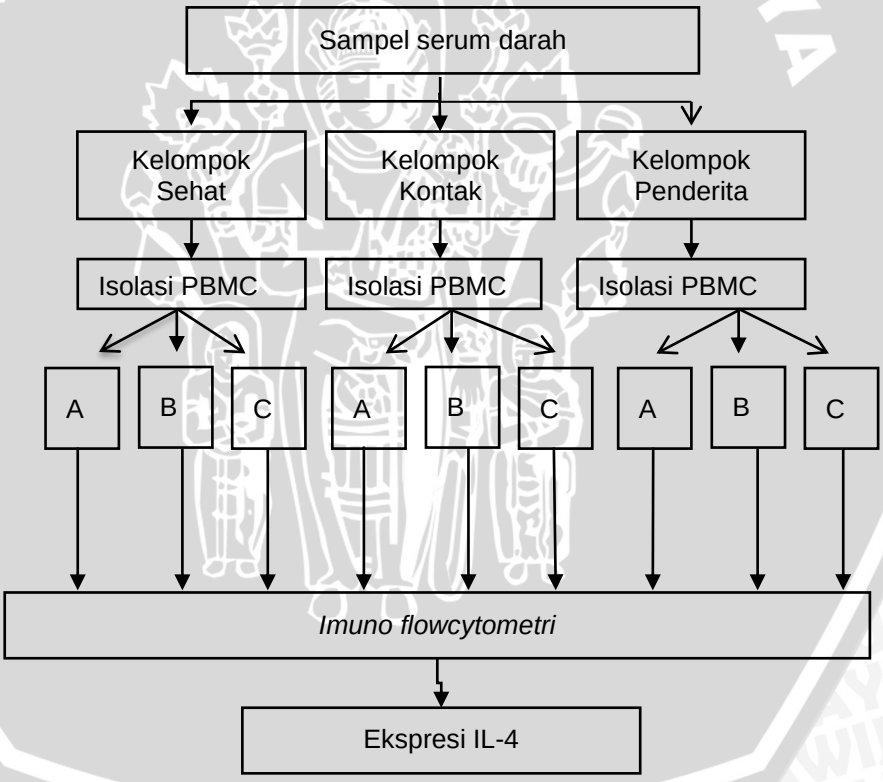
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *ex vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada kultur peripheral blood mononuclear cell (PBMC) pada ketiga kelompok sampel yang telah diinduksi dengan protein 38 kDa *M. tuberculosis* sebelumnya.



Keterangan :

A	Tanpa diinduksi dengan PPD maupun protein 38 kDa *M.tuberculosis* (kontrol)
B	Diinduksi dengan PPD
C	Diinduksi dengan protein 38 kDa *M.tuberculosis*

Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

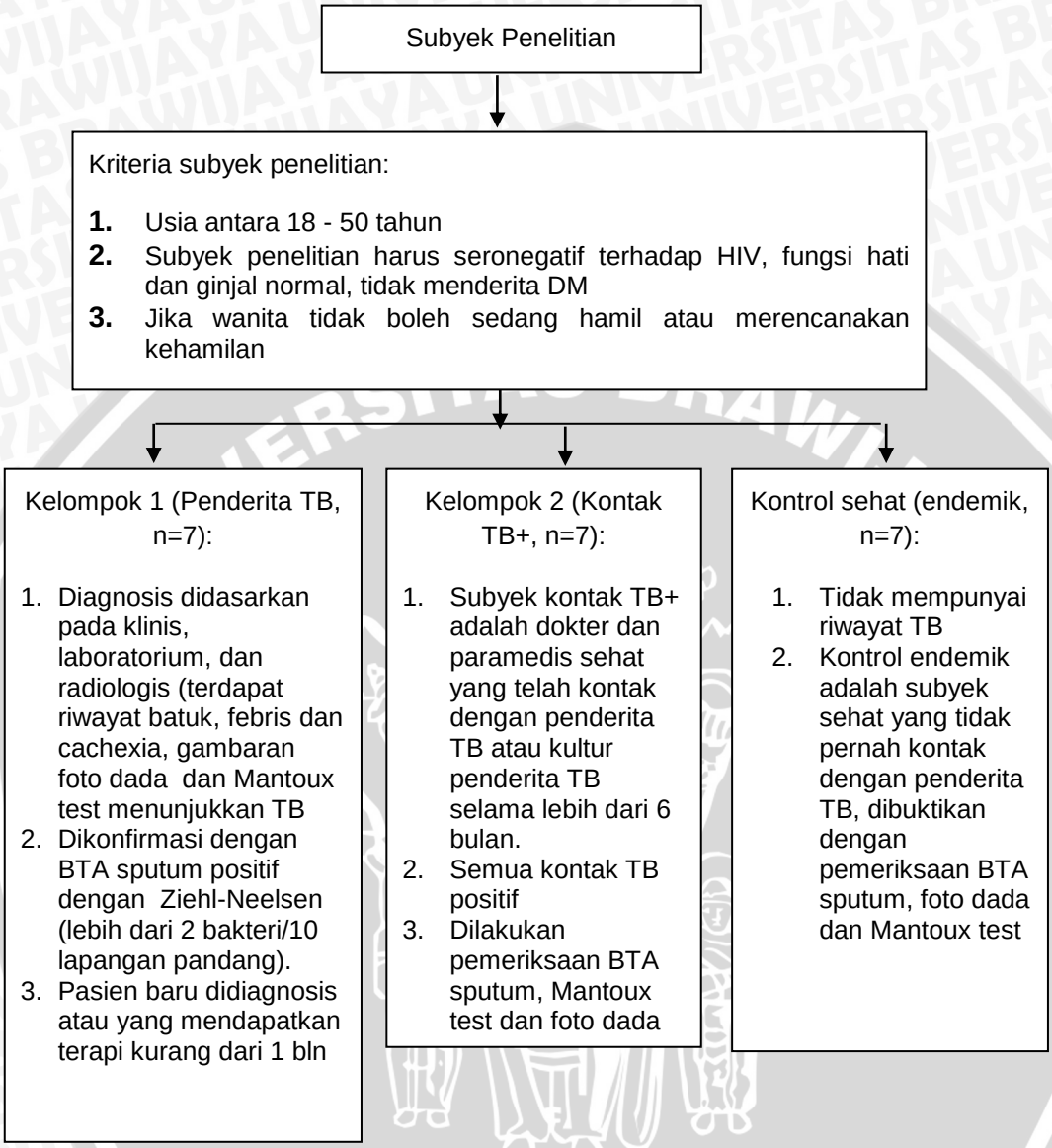
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

1) Tempat : Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sentral RSSA untuk untuk pengambilan darah dan urin, Laboratorium Radiologi RSSA untuk mengambil foto thoraks, Poli Anak RSSA untuk melaksanakan Tes Mantoux, Laboratorium Mikrobiologi RSSA untuk kultur dan pengecatan sputum, dan Laboratorium Biomedik FKUB untuk isolasi PBMC, pemanenan PBMC dan uji ekspersi IL-4.
2) Waktu : Penelitian ini dilaksanakan mulai Desember 2012 – 14 September 2013

4.3 Populasi dan Sampel

Subyek penelitian adalah penderita TB yang berobat ke RSUD dr.Saiful Anwar Malang. Kontak TB positif adalah perawat yang bekerja merawat penderita TB di bangsal RSSA selama 6 bulan. Sedangkan kontrol/normal adalah para sekarelawan sehat. Ketiga kelompok subyek penelitian tersebut telah menandatangani *informed consent* untuk terlibat di dalam penelitian ini.

Darah subyek penelitian diambil sebanyak 10 cc dengan antikoagulan heparin. Whole blood kemudian akan dikultur PBMCnya dan selanjutnya diberi 3 perlakuan yaitu; diberi protein 38 kDa, diberi PPD dan tanpa diberi protein 38kDa dan PPD (kontrol), setelah di inkubasi 3 hari kemudian dilihat ekspresi IL-4-nya.



Gambar 4.2 Subyek Penelitian

. Subyek penelitian harus seronegatif terhadap HIV dan hasil pemeriksaan laboratorium darah lengkap, uji fungsi hati dan ginjal normal. Wanita yang ikut terlibat dalam penelitian ini tidak boleh sedang hamil atau merencanakan kehamilan. Usia subyek penelitian antara 18 - 50 tahun (Sander, 2009).

Untuk kelompok penderita TB, diagnosisnya didasarkan pada klinis dan radiologis. Terdapat riwayat batuk, febris dan *cachexia*, dan gambaran foto

dadanya menunjukkan TB. Penyakit aktif dikonfirmasi dengan BTA sputum positif dengan pengecatan Ziehl–Neelsen (lebih dari 2 bakteri/10 lapangan pandang). Semua penderita selanjutnya memberikan respon bagus terhadap pengobatan dengan anti-tuberkulosis (Sable, 2005).

. Subyek dengan kontak TB positif adalah dokter dan paramedis sehat yang telah kontak langsung dengan penderita TB atau sampel biologis atau kultur dari penderita TB selama lebih dari 6 bulan. Semua kontak TB positif dan kontrol endemik tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya. Kontrol endemik adalah subyek sehat yang tidak pernah kontak dengan penderita TB sebelumnya (Sable, 2005).

Jumlah sampel untuk setiap kelompok adalah 7, yang diperoleh dari rumus: $p(n-1) \geq 16$, dimana n = jumlah sampel tiap-tiap perlakuan, dan p = jumlah perlakuan (Indra, 1999). Di tambah 2 sampel untuk tiap perlakuan untuk menghindari *bias error*. Jadi total 27 subyek penelitian (9 penderita TB, 9 kontak positif, 9 kontrol normal/individu sehat).

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas dalam penelitian ini adalah tiga kelompok sampel yaitu sampel sehat, sampel kontak dan sampel penderita. Dari tiap sampel yang dikultur PBMCnya akan dibagi menjadi tiga kelompok dan masing-masing akan diberi perlakuan yang berbeda, yaitu:

1. Kultur PBMC tanpa diberi PPD atau protein 38 kDa *M.tuberculosis* (kontrol)
2. Kultur PBMC dengan PPD
3. Kutur PBMC dengan protein 38 kDa *M.tuberculosis*

4.4.2 Variabel tergantung adalah ekspresi IL-4 pada kultur PBMC.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah :

a. Protein 38 kDa *M.tuberculosis* adalah protein yang didapat dari Gen pab yang diisolasi dari pasien TB paru di Malang, diklon ke plasmid pGEM-Teasy menjadi pMB38. Dibuat di lab Biomedik FKUB oleh Dra. Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc, Ph.D.

b. Kultur PBMC adalah kultur sel darah manusia dimana hanya sel yang mempunyai nukleus bulat saja (limfosit, monosit, makrofag). Dikultur pada kondisi tertentu dan dipanen pada saat tertentu.

c. Pengukuran jumlah IL-4 pada penelitian ini menggunakan persentase IL-4 pada setiap *gated* dari PBMC yang diserap oleh mesin *flow cytometry*.

4.6 Bahan dan Alat

4.6.1 Pemeriksaan Umum

a. Pengambilan darah dan urin

Alat : vacutainer, manset, bantalan tangan, tempat urin dan identitas

b.Foto X-Ray

Alat : form permintaan foto, foto rontgen.

c. Tes Mantoux

Alat : spuit 5 ml, bantalan tangan, form tes mantoux, bolpoint penggaris

Bahan : PPD RT 23-2 TU

d. Pemeriksaan Sputum

Alat : botol sputum 3 buah : sewaktu, pagi dan sewaktu (SPS), preparat, erlsenmeyer, korek api, mikroskop, pinset

Bahan : minyak emersi, alkohol 95%, methylen blue, carbol fuhsin, sputum

e. Informed consent

Alat : form *informed consent* (terlampir)

4.6.2 Isolasi PBMC

Alat : Botol sentrifus 15 ml, *Micropipette*, *Swing Centrifugated*

Bahan : Ficoll-Hipaque d=1.077 g/mL, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Sample darah yang dimasukkan dalam vacutainer EDTA

4.6.3 Kultur PBMC

Alat : cawan petri, Inkubator

Bahan : kultur PBMC ketiga kelompok sampel, protein 38 kDa *M.tuberculosis,* PPD, media kultur

4.6.4 Flow Cytometry

Alat : Tabung eppendorf 1,5 ml, sentrifus suhu dingin, *micropipette*

Bahan : *Cell staining buffer,* larutan *fox fix perm buffer*, larutan *fox perm buffer,* Antibodi intraseluler Fox P3

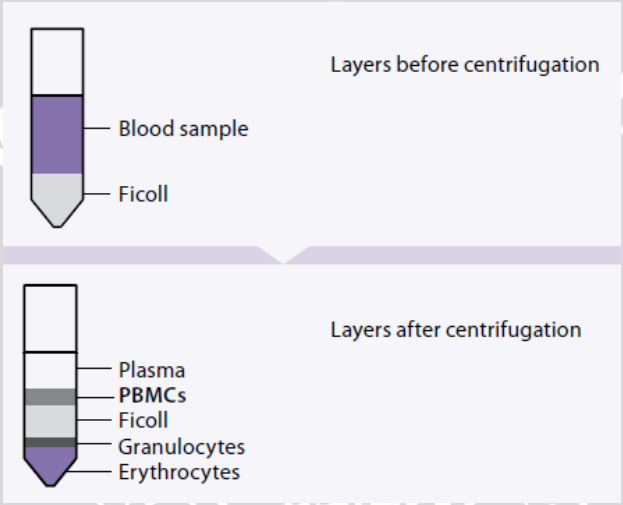
4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Isolasi PBMC

1) Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan sampai suhu ruang.
2) Disiapkan botol sentrifus 15 ml dan diisi dengan *Ficoll-Hipaque* d=1.077 g/mL
3) Sampel darah dalam vacutainer heparin yang akan diuji dibolak-balik perlahan agar homogen kemudian dicampur 1:1 dengan PBS. Kemudian diambil dengan *micropipette* dan disalutkan secara perlahan pada dinding falcon yang sudah diisi *Ficoll-Hipaque* d=1.077 g/mL. Perbandingan volume

antara *Ficoll-Hipaque* dengan sampel darah adalah 1:1. Akan terbentuk 2 lapisan.

4) kemudian disentrifus dalam suhu ruang dengan kecepatan 1600 rpm selama 30 menit.
5) Setelah disentrifus akan terpisah menjadi 5 lapisan, yaitu plasma, PBMC, *Ficoll-Hipaque*, granulosit dan sel darah merah.



Gambar 4.3 Tabung Sentrifugasi

6) Cincin PBMC yang terbentuk diambil secara perlahan menggunakan *micropipette* dan diletakkan dalam botol sentrifus 15 ml yang baru.
7) Larutan PBMC kemudian dicuci dengan PBS 10 ml dan disentrifus suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit.
8) Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan disentrifus kembali pada suhu ruang 1200 rpm selama 10 menit.
9) Setelah disentrifus maka akan terbentuk pelet (sel PBMCs) pada dasar Botol sentrifus 15 ml.
10) Supernatan di buang.

4.7.2 Kultur PBMC

1) Jumlah PBMC dihitung menggunakan *hematology analiser sysmex*.
2) Sebanyak 10^5-10^6 sel PBMC dari masing-masing sampel (sehat, kontak dan penderita) dalam 100 µl IMDM dikultur dengan protein 38 kDa *M.tuberculosis*. Ada 3 perlakuan yaitu: sebagai kontrol negatif PBMC dikultur tanpa protein 38 kDa dan PPD, kemudian sebagai pembanding PBMC di kultur dengan PPD, dan sebagai kontrol positif PBMC dikultur dengan protein 38 kDa 4 µl.
3) PBMC dikultur selama 3 hari. PBMC dikultur dalam incubator 37C 5% CO2.

4.7.3 Pengujian *flow cytrometri*

1) Pelet kultur PBMC yang telah diinkubasi selama 3 hari di sentrifus pada suhu 4^0C 2500 rpm selama 3 menit.
2) Supernatan dibuang, kemudian dicuci dengan 500 µl *sel staining buffer*, disentrifus pada suhu 4^0C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
3) Supernatan dibuang, kemudian pelet yang terbentuk dicuci dengan 500 µl larutan *fox fix buffer*, dihomogenkan dan disentrifuge pada suhu 4^0C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
4) Supernatan dibuang, kemudian pelet difiksasi dengan 500 µl *fox fix perm buffer* lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
5) Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifus pada suhu 4^0C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
6) Supernatan dibuang, pelet yang terbentuk dicuci dengan larutan *fox perm buffer* disentrifus pada suhu 4 ^{0}C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
7) Supernatan dibuang,kemudian pelet ditambahkan dengan 500 µl fox perm buffer lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.

8) Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifus pada suhu 4^0C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
9) Supernatan dibuang,kemudian pelet siap untuk di*staining* dengan antibodi intraselluler
10) Masing-masing larutan di*staining* dengan 50 µl antibodi yang telah diencerkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.
11) Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 µl *larutan perm wash buffer* dan disentrifus pada suhu 4 ^{0}C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
12) Supernatan dibuang dan ditambahkan 350 µl *sel staining buffer*, dihomogenkan
13) Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *flow cytometry*.

4.8 Pengumpulan dan Analisis Data

Data mengenai ekspresi IL-4 masing-masing kelompok perlakuan dengan induksi protein 38 kDa, perlakuan dengan induksi PPD dan kontrol dianalisis dengan menggunakan analisis statistik dengan langkah-langkah sebagai berikut :

a. Uji Normalitas data : bertujuan untuk mengintepretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik (ANOVA). Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non-parametrik (Kruskall Wallis). Uji normalitas yang digunakan adalah Uji Kolmogornov-Smirnov, dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran normal jika nilai p>0,05.

b. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidak nya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Tetapi jika didapatkan varian yang tidak homogen, dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA asalkan memiliki distribusi data yang normal. Pada uji homogenitas Levene data dikatakan memiliki varians yang normal bila signifikansi $p>0,05$.

c. Uji One-Way ANOVA : syarat untuk melakukan One-Way ANOVA adalah jika sebaran data normal dan homogen. bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada 2 (dua) kelompok yang berbeda signifikan. Perbedaan dianggap bermakna jika nilai $p<0,05$.

d. Post Hoc Least Signifance Difference (LSD): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.

e. Kruskall Wallis : analisis statistik dapat menggunakan Kruskall Wallis jika sebaran data tidak normal dan homogen walaupun sudah dilakukan tranformasi data. Perbedaan dianggap bermakna jika nilai $p<0,05$.

f. Mann Whitney Test : bila nilai signifikansi $p<0,05$, maka dilakukan Mann Whitney Test untuk membandingkan antara 2 perlakuan, untuk mengetahui perbandingan antar mana saja yang hasilnya berbeda secara signifikan.

Hasil pengukuran ekspresi pada kelompok dengan perlakuan pemberian protein 38 kDa, PPD dan kontrol dianalisis secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).