

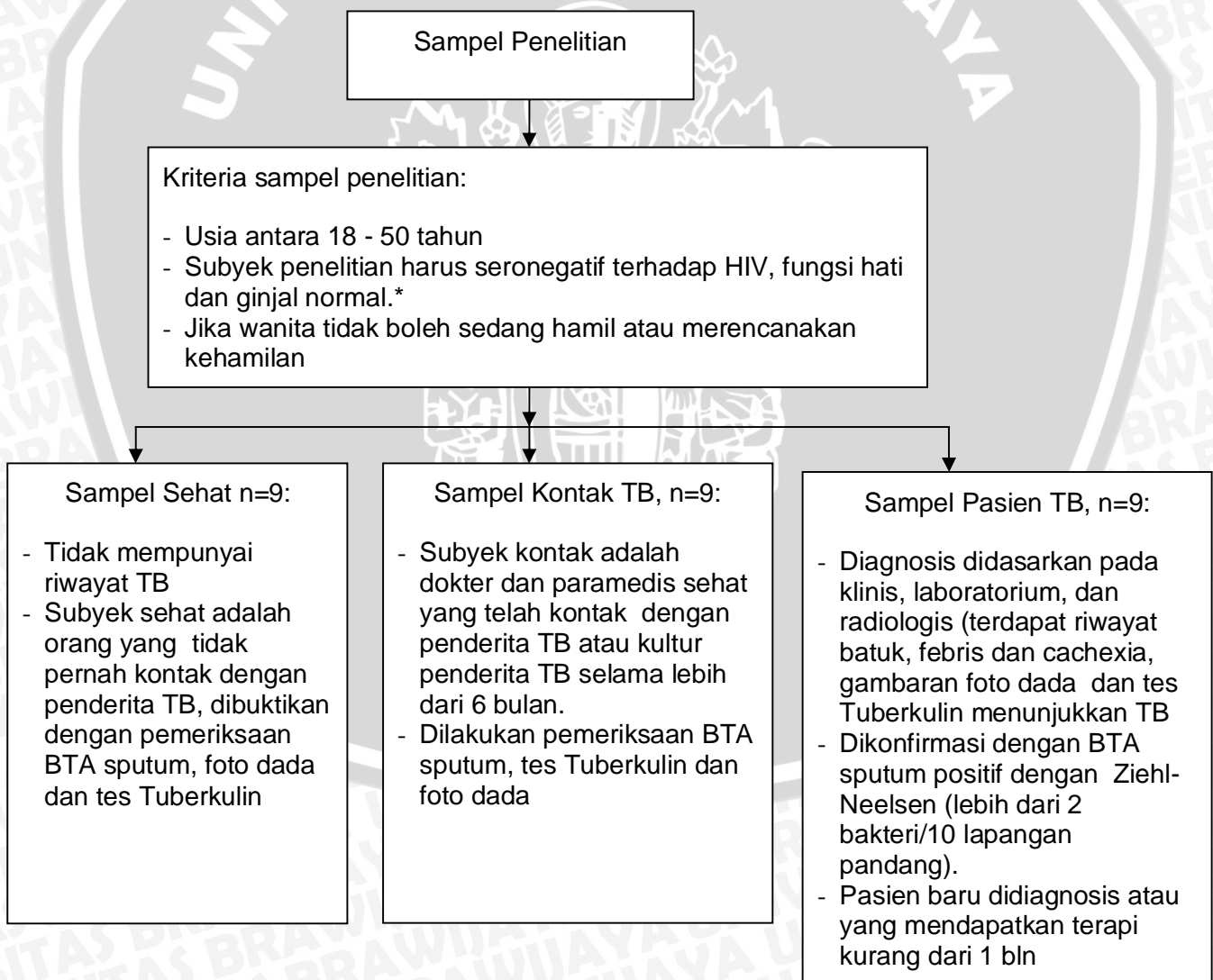
BAB 4

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 serum ketiga kelompok; sehat, kontak, dan pasien TB.

4.2 Populasi dan Sampel



Kriteria Inklusi :

1. Sampel Sehat :

- a. Tidak mempunyai riwayat TB ataupun kontak TB
- b. Hasil BTA sputum (-), foto dada (-), tes tuberkulin menunjukkan indurasi $<5\text{mm}$

2. Sampel Kontak

- a. Mempunyai riwayat kontak/terpapar TB sebelumnya tetapi tidak mempunyai riwayat sakit TB
- b. Hasil BTA sputum (-), foto dada (-), tes tuberkulin menunjukkan indurasi $10\text{mm} < x < 5\text{mm}$

3. Sampel Pasien

- a. Didiagnosis TB
- b. Hasil BTA sputum (+), foto dada (+), tes tuberkulin menunjukkan indurasi <10 bagi pasien dengan sistem imunokompromise atau >10 bagi pasien dengan sistem imunokompeten

Jumlah sampel adalah 27, yang diperoleh dari rumus: $p(n-1) \geq 16$,

dimana n = jumlah sampel tiap-tiap perlakuan, dan p = jumlah perlakuan (Indra, 1999). Jadi total 27 sampel penelitian (9 pasien TB, 9 kontak TB, 9 subjek sehat).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ketiga kelompok sampel yang masuk daftar inklusi :

- Kelompok A : merupakan subjek sehat tanpa riwayat infeksi M. tuberculosis sebelumnya.
- Kelompok B : merupakan kelompok dokter atau paramedis yang pernah kontak dan tidak terdapat riwayat infeksi M. tuberculosis sebelumnya.

- Kelompok C : merupakan sampel yang telah didiagnosis TB oleh dokter spesialis paru.

4.3.1 Variabel tergantung adalah ekspresi Ag-Ab kompleks pada serum.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium yaitu di Laboratorium Sentral RSSA untuk untuk pengambilan sampel darah dan urin, Laboratorium Radiologi RSSA untuk X-Ray, Poli Anak RSSA untuk Tes Mantoux, Laboratorium Mikrobiologi RSSA untuk kultur dan pengecatan sputum, dan Laboratorium Biomedik FKUB untuk *western blotting* serta *dot blotting*.

Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai Desember 2012 sampai Maret 2013

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah :

- a. Subjek penelitian adalah orang-orang yang dibagi menjadi 3 (tiga) kelompok sampel yaitu : kelompok sehat, kelompok kontak, dan kelompok pasien. Masing-masing kelompok mempunyai kriteria inklusi tersendiri.
- b. Serum adalah cairan berwarna bening hasil dari sentrifugasi darah dan tidak mengandung faktor koagulasi. (Murray *et.al*, 2003).
- c. IgG adalah kelompok globulin pada serum yang mempunyai berat 160 kDa, dengan 4 rantai polipeptida, 2 rantai berat (600 asam amino) dan 2 rantai ringan (230 asam amino). Merupakan 75% dari semua komposisi immunoglobulin(Mayer,2003)
- d. Protein 38 kDa *M. tuberculosis* adalah protein yang dihasilkan pada dinding sel, yang mempunyai spesifitas tinggi (95%) pada spesies *M. tuberculosis* strain lokal (Batu, Malang). Dihasilkan dengan cara kloning pada *E. Coli*.

e. Ag-Ab kompleks : Ikatan antara antigen dan antibodi spesifik

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Serum Darah

Serum adalah cairan berwarna bening hasil dari sentrifugasi darah dan tidak mengandung faktor koagulasi. (Murray *et.al*, 2003)

4.6.2 Uji Western Blot

Pemeriksaan westernblotting menggunakan metode dari Towbin (1979). Lembaran gel hasil SDS-PAGE yang mengandung pita protein dipindahkan pada kertas nitroselulosa menggunakan alat semi-dry blotter buatan Biorad. Kertas NC kemudian dipotong menjadi beberapa bagian dikarenakan antibodi primer. Cara memindahkan pita protein kepada kertas nitroselulosa adalah menggunakan aliran listrik sebesar 100 mA pada kurun waktu 120 menit. Setelah waktu pemindahan dicapai, maka dilakukan pengecatan menggunakan pewarna ponco 2% yang mengandung TCA sampai konsentrasi mencapai 30% untuk mengetahui apakah protein sampel telah pindah pada kertas nitroselulosa. Sebagai petanda untuk menentukan bobot molekul protein hasil pemeriksaan western blotting maka menggunakan lajur yang berisi protein petanda. Pada setiap pita protein petanda tersebut ditusuk dengan jarum supaya tidak kehilangan jejak oleh karena pada waktu dibilas dengan air warna tersebut tidak tampak. Untuk menghilangkan warna ponco dibilas dengan H₂O. Selanjutnya dilakukan pada kertas nitroselulose diratakan menggunakan cairan TBE yang mengandung albumin dengan konsentrasi 3% dalam larutan TBE pH 7,4 dan Tween 20 konsentrasi 0,05%, selanjutnya dilakukan inkubasi semalam. Setelah waktu inkubasi cukup maka dilakukan pencucian dengan cairan TBE pH 7,4 yang ditambah Tween 20 konsentrasi 0,05% sampai 2 kali, dimana tiap kali pencucian memerlukan waktu 5

menit. Apabila waktu pencucian selesai maka ditambahkan antibodi primer yang berasal dari serum subjek sehat, kontak, dan penderita dengan konsentrasi 1/1000 dalam TBE pH 7,4 yang mengandung larutan BSA konsentrasi 1%, kemudian digoyang selama 2 jam. Dilakukan pencucian lagi sebanyak 2 kali, dimana setiap pencucian memerlukan waktu 5 menit, sebagai larutan pencuci adalah cairan TBE pH 7,4 yang mengandung Tween 20 konsentrasi 0,05%. Selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder yaitu IgG Anti human AP Conjugate konsentrasi 1/2000 dalam TBE pH 7,4 dan BSA konsentrasi 1%. Digoyang selama 2 jam dan dilindungi terhadap pengaruh sinar. Kemudian dilakukan pencucian 2 kali selama 5 menit dengan menggunakan TBE pH 7,4 Tween 20 konsentrasi 0,05%. Sebagai bahan warna digunakan tablet β Cip yang dilarutkan pada H₂O 10 ml. Larutan ini dituangkan pada kertas nitroselulose dan dilakukan pengamatan reaksi terjadinya warna merah. Jika reaksi cukup kemudian dibilas dengan H₂O dan selanjutnya dikeringkan dengan meletakkan di atas kertas saring.

4.6.3 Uji Dot Blot

Metode *dot blot* dilakukan dengan cara merendam membran *nitrocellulose* dalam *aquadest* selama 30 menit. Membran *nitrocellulose* selanjutnya dirangkaikan pada alat *Bio-dot apparatus Bio-Rad*. Protein rekombinan Mtb yang digunakan diencerkan dalam TBS-Sodium Azida (NaN₃) 1% dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 4, kemudian diteteskan pada tiap sumuran masing-masing 50 μ l. *Blocking* dilakukan dengan meneteskan TBS-Skim Milk 5% pada tiap sumuran kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. *Washing* atau pencucian dilakukan dengan TBS-Tween 0,05% sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Antibodi primer (serum ketiga kelompok penelitian) yang digunakan diencerkan dalam TBS-Skim 1% dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 200, selanjutnya diinkubasi semalam

pada suhu 4°C. Setelah pencucian dilakukan inkubasi dengan antibodi sekunder (*IgG Anti human AP Conjugate*) yang telah diencerkan dalam TBS dengan perbandingan sampel dan pengencer 1 : 2500, selama 1 jam sambil digoyang pelan. Pencucian dilakukan kembali untuk selanjutnya diberikan *substrat Western blue alkaline phosphatase* dalam ruang gelap dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang sambil digoyang pelan. Penghentian reaksi dilakukan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 50 µl pada tiap sumuran.

Hasil yang diperoleh diolah dengan program *Corel photopaint 11* untuk mendapatkan data kuantitatif.

4.7 Pengumpulan dan Pemrosesan Data

Data hasil penelitian dari metode *dot blot* dihitung untuk mendapatkan rerata dan standard deviasi. Perbedaan antar kelompok dianalisis dengan Mann-Whitney U test atau one way ANOVA tergantung distribusi data yang nanti diperoleh, dengan tingkat kebermaknaan $p < 0,05$. Analisis data kuantitatif kadar IgG menggunakan *Corel photopaint 11*. Sedangkan hasil dari metode *western blot* dibandingkan secara kualitatif visual.

4.8 Analisis Data

Data mengenai ekspresi Ag-Ab pada kelompok kontrol dan perlakuan pada penelitian yang diberikan dosis Antigen 38 M.tuberculosis dan Purified Protein Derivat (PPD) dianalisis dengan menggunakan analisis statistik Statistical Product and Service Solution (SPSS) versi 15,0 dengan Uji Statistika Analysis of Variance (ANOVA) Oneway. Sebelum melakukan analisis data dengan uji Anova, Maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan uji One-Way ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok data tidak berpasangan. Syarat uji One-Way ANOVA

adalah populasi yang akan diuji berdistribusi normal, varian dari populasi – populasi tersebut adalah sama (homogen) dan sampel tidak berhubungan dengan yang lain.

Hasil pengukuran tingkat ekspresi ikatan Ag-Ab pada kelompok kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Langkah- langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

- a. Uji deskriptif data bertujuan untuk memberikan gambaran umum, gambaran umum dapat menjadi acuan untuk melihat karakteristik data yang kita peroleh. Gambaran umum berupa, nilai mean, nilai median dan nilai modus.
- b. Uji Normalitas data bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan an penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non-parametrik. Uji normalitas yang digunakan adalah Uji Kolmogornov-Smirnov, dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran normal jika nilai $p>0,05$ (Dahlan,2004)
- c. 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 $p > 0,05$ (Dahlan, 2004)

- d. Uji One-Way ANOVA : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada 2 (dua) kelompok yang berbeda signifikan. Pada uji statistik ini, yang dievaluasi adalah perbedaan tingkat ekspresi ikatana Ag-Ab antar kelompok. Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan tingkat ekspresi ikatan Ag-Ab antar kelompok. Perbedaan dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Pada uji ANOVA ini Hipotesis Null yang diajukan adalah “ Pada keempat kelompok mempunyai tingkat ekspresi ikatan Ag-Ab yang sama”
- e. Post Hoc Least Signifance Difference (LSD): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.
- f. Uji korelasi Pearson: untuk mengetahui apakah perlakuan pemberian Antigen 38 M.tuberculosis terhadap 3(tiga) kelompok berbeda berpengaruh pada masing-masing ikatan Ag-Ab. Agar penafsiran dapat dilakukan sesuai dengan ketentuan, kita perlu mempunyai kriterian yang menunjukkan kuat atau lemah nya korelasi. Kriteria sebagai berikut (Sarwono, 2008)

Nilai korelasi 0 = tidak ada korelasi antara 2 variabel

Nilai korelasi $> 0 - 0,25$ = sangat lemah

Nilai korelasi $> 0,25 - 0,5$ = cukup

Nilai korelasi $> 0,5 - 0,75$ = kuat

Nilai korelasi $> 0,75 - 0,99$ = sangat kuat

Nilai korelasi 1 = sempurna

Korelasi dapat positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang sama hubungan antar variabel, artinya jika variabel 1 besar maka variabel 2 semakin besar pula. Sebaliknya korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan, artinya jika variabel 1 besar, maka variabel 2 menjadi kecil (Sarwono,2008)

Signifikansi hubungan dua variabel dapat dianalisis dengan ketentuan, jika probabilitas atau signifikansi $<0,05$, hubungan kedua variabel signifikan. Jika probabilitas atau signifikansi $>0,05$, hubungan kedua variabel tidak signifikan. Namun, jika output SPSS pada angka korelasi diberi tanda 2 bintang (**), maka probabilitas atau signifikansi menjadi sebesar 0,01 (Sarwono,2008)

