

BAB 4

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratory* pada kultur PBMC dari 3 kelompok subyek, yaitu: Pasien, kontak TB, dan subyek sehat yang diinduksi dengan protein rekombinan 38 kDa M.tb dan PPD sebagai kontrol positif. PBMC dikultur selama 3 hari kemudian dipanen. Setelah dipanen, masing-masing sampel akan dilakukan pengecatan dengan marker IL-2 kemudian dibaca dengan flow cytometri. Kemudian dianalisis dengan menggunakan software SPSS versi 18.

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 ekspresi IL-2.
- 2) Waktu : Penelitian ini dilaksanakan mulai Desember 2012 – 14 September 2013

Populasi dan sampel

Subyek penelitian harus seronegatif terhadap HIV, tidak menderita *Diabetes mellitus* (DM), 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). Kriteria sampel adalah sebagai berikut :

1. Untuk kelompok pasien tuberkulosis, diagnosis nya didasarkan pada klinis, radiologis dan laboratorium. Terdapat riwayat batuk, *febris* dan *cachexia*, dan gambaran foto dadanya menunjukkan tuberkulosis. Penyakit aktif dikonfirmasi dengan BTA sputum positif dengan pengecatan Ziehl-Neelsen (lebih dari 2 bakteri/10 lapangan pandang). Semua pasien selanjutnya memberikan respons bagus terhadap pengobatan dengan antituberkulosis (Sable, 2005). Serta harus pasien yang masih baru didiagnosis atau yang mendapatkan terapi kurang dari 1 bulan.
2. 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 (Sable, 2005).
3. Kontrol endemik adalah subyek sehat yang tidak pernah kontak dengan penderita TB sebelumnya (Sable, 2005) dan dari tes mantoux hasilnya negatif, selanjutnya dilakukan pemeriksaan BTA sputum, Mantoux test dan foto dada untuk mengetahui apakah ada riwayat TB dan infeksi yang lain.

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 1 sampel pada tiap perlakuan untuk menghindari *bias error*. Jadi total 24 subyek penelitian (8 pasien TB, 8 kontak positif, 8 kontrol normal/individu sehat).

Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas dalam penelitian ini adalah protein rekombinan 38 kDa dengan menggunakan bahan yang dibagi dalam kelompok:

- Kelompok A : merupakan kontrol negatif dari sampel pasien, kontak, dan individu sehat yang tidak diberikan apa-apa.
- Kelompok B : merupakan kelompok perlakuan di mana pada sampel pasien, kontak, dan sehat diberikan PPD dengan dosis 2 µg/mL.
- Kelompok C : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan protein 38 kDa dengan dosis 2 µg/mL pada kultur PBMC pada pasien Tuberkulosis.
- Kelompok D : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan protein 38 kDa dengan dosis 2 µg/mL pada kultur PBMC pada kontak Tuberkulosis.
- Kelompok E : merupakan kelompok perlakuan yang diberikan protein 38 kDa dengan dosis 2 µg/mL pada kultur PBMC pada orang yang sehat.

4.4.2 Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah limfosit yang mengekspresikan IL-2 pada kultur PBMC.

Definisi Operasional

Definisi operasional:

- a. Protein rekombinan 38 kDa M.tb: 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 Dr.rer.nat Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc.

- b. Kultur PBMC adalah kultur sel darah manusia di mana hanya sel yang mempunyai nukleus bulat saja (limfosit, monosit, makrofag). Dikultur dalam inkubator 37°C 5% CO₂ dan dipanen setelah 3 hari.
- c. Pengukuran jumlah IL-2 pada penelitian ini menggunakan persentase IL-2 pada setiap *gate* limfosit dari PBMC dengan *flow cytometry*.
- d. Kelompok sampel penelitian merupakan kelompok subyek yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: subyek sehat, kontak, dan pasien.

Bahan dan Alat

4.6.1 Pemeriksaan Umum

a. Pengambilan darah dan urin

Alat : vacutainer set, hanscoen, torniket, kapas alkohol, kassa steril, plester, bantalan tangan, wadah sampel urin, sharp container, form permintaan, dan label identitas

b. Foto X-Ray

Alat : form permintaan foto, foto rontgen.

c. Tes Mantoux

Alat : S spuit 0,5 ml, bantalan tangan, form tes mantoux, ballpoint, penggaris

Bahan : PPD RT 23-2 TU

d. Pemeriksaan Sputum

Alat : botol sputum 3 buah: sewaktu, pagi dan sewaktu (SPS), object glass, erlenmeyer, korek api, mikroskop, pinset

Bahan : minyak imersi, alkohol 95%, methylene blue, carbol fuhsin, sputum

e. *Informed consent*

Alat : form *informed consent* (Terlampir)

4.6.2 Isolasi PBMC

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

Bahan : *Ficoll-Hipaque* d=1.077 g/mL, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), Sampel darah dalam vacutainer heparin

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, putar suhu dingin, *micropipette*

Bahan : Larutan penyangga pewarna sel, larutan *perm wash buffer*, larutan *fix buffer*, marker antibodi anti-IL-2.

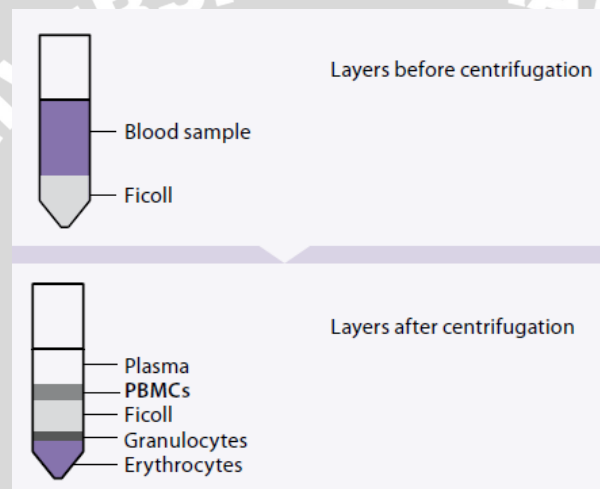
Prosedur Penelitian

4.7.1 Isolasi PBMC

1. Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan sampai suhu ruang.
2. Disiapkan tabung 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 diputar dalam suhu ruang dengan kecepatan 1600 rpm selama 30 menit.
5. Setelah diputar akan terpisah menjadi 5 lapisan, yaitu plasma, PBMC, *Ficoll-Hipaque*, granulosit dan sel darah merah.



Gambar 4.3 Separasi larutan sebelum dan setelah diputar (Abdelaziz, 2013)

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 diputar suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit.
8. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan diputar kembali pada suhu ruang 1200 rpm selama 10 menit.
9. Setelah diputar 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 4000*.
- 2) Sebanyak 10^6 sel PBMC dari masing-masing subyek (sehat, kontak dan pasien) dalam 100 μ l RPMI dikultur dengan antigen *M.tuberculosis*. Ada 3 perlakuan yaitu: sebagai kontrol negatif PBMC dikultur tanpa antigen dan PPD, kemudian sebagai pembanding PBMC di kultur dengan PPD, dan sebagai kontrol positif PBMC dikultur dengan protein 38 kDa *M. tuberculosis* 2 μ g/mL.
- 3) PBMC dikultur selama 3 hari. PBMC dikultur dalam inkubator 37 °C 5% CO₂.
- 4) 6 jam sebelum dipanen kultur PBMC diberikan Brefeldin A

4.7.3 Proses pewarnaan dan persiapan *flowcytometry*

1. Pellet PBMC ditambahkan dengan larutan penyangga pewarna sel, dan dibagi dalam beberapa *Eppendorf* sesuai dengan banyaknya perlakuan. Larutan penyangga pewarna sel merupakan larutan yang dibuat dari 2% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dalam PBS.
2. Pellet siap untuk diwarnai dengan antibodi *cell surface marker* (yang telah diencerkan dengan larutan penyangga pewarna sel dengan perbandingan tertentu).
3. Antibodi yang telah diencerkan kemudian diambil sebanyak 50 μ l dan di campurkan dengan pellet PBMC dan dihomogenkan.
4. Pellet yang telah diberi antibodi diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.

5. Setelah inkubasi ditambahkan larutan penyangga pewarna sel sesuai dengan kebutuhan, dihomogenkan.
6. Pellet yang telah diinkubasi dengan antibodi *cell surface marker* kemudian dicuci dengan 500 µl larutan penyangga pewarna sel, diputar pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
7. Supernatan dibuang, kemudian pellet yang terbentuk dicuci dengan 500 µl larutan *fix buffer*, dihomogenkan dan diputar pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
8. Supernatan dibuang, kemudian pellet difiksasi dengan 500 µl *fix buffer* lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
9. Setelah inkubasi selesai, larutan diputar pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.
10. Supernatan dibuang, pellet yang terbentuk dicuci dengan larutan *perm wash buffer* diputar pada suhu 4 °C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit. Larutan *perm wash buffer* tersedia dalam 10x konsentrasi, jd apabila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu dengan *deionized water*.
11. Supernatan dibuang, kemudian pellet siap untuk distaining dengan antibodi intraseluler *interleukin 2* (yang telah diencerkan dalam *perm wash buffer* dengan perbandingan tertentu).
12. Masing-masing larutan diwarnai dengan 50 µl antibodi (IL-2) yang telah diencerkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.
13. Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 µl larutan *perm wash buffer* dan diputar pada suhu 4 °C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

14. Supernatan dibuang dan ditambahkan 350 μ l larutan penyangga pewarna sel, dihomogenkan.
15. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *Flowcytometry*.

Pengumpulan dan Analisis Data

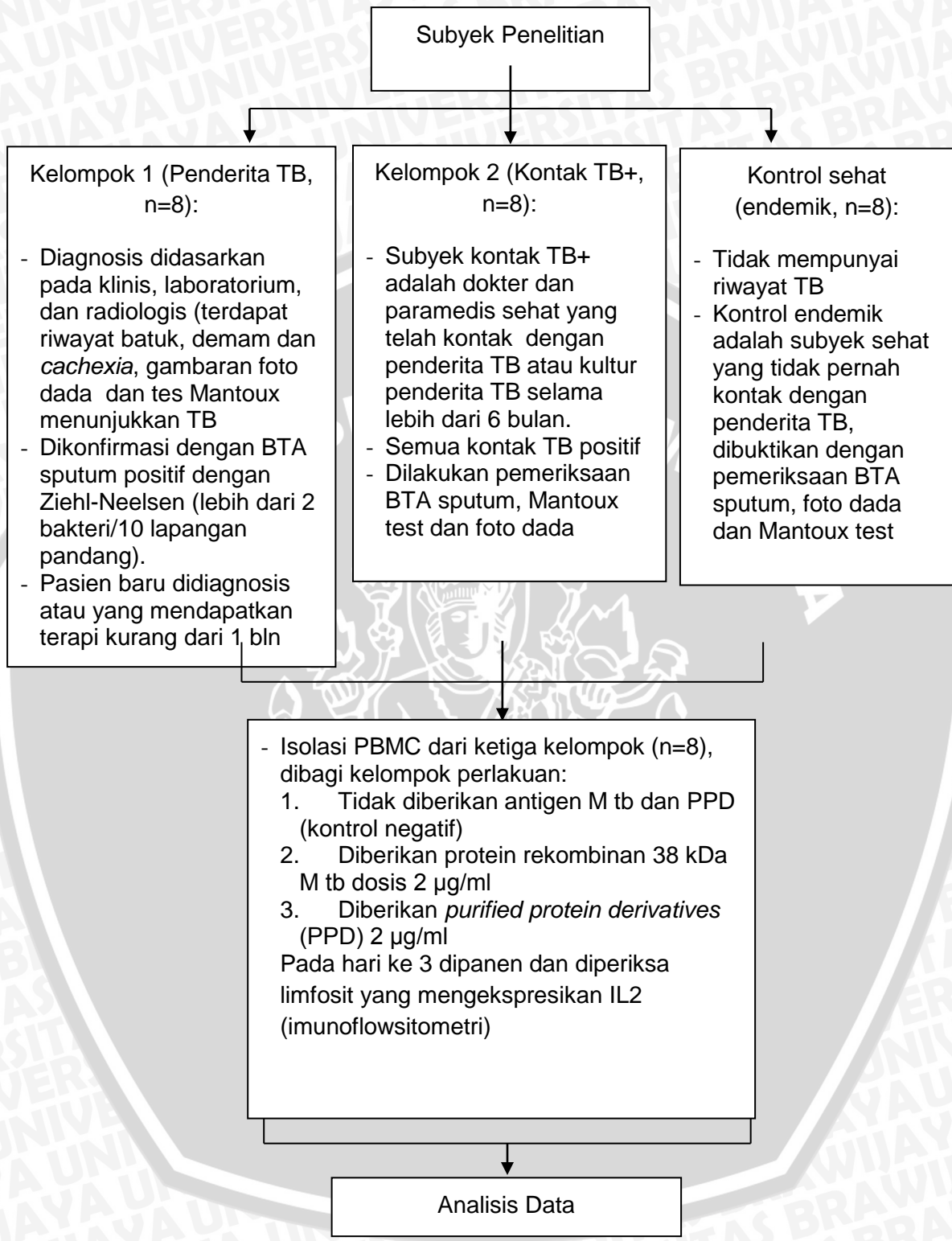
Data mengenai ekspresi IL-2 masing-masing kelompok perlakuan dengan induksi Protein 38 kDa, perlakuan dengan induksi PPD dan kontrol dianalisis dengan menggunakan analisis statistik *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi

18. Langkah-langkah dalam melakukan analisis statistik adalah sebagai berikut:

- a. Uji Normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan 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 Kolmogorov-Smirnov, di mana suatu data dikatakan memiliki sebaran normal jika nilai $p > 0,05$.
- b. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya 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 Significance Difference (LSD): bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.
- e. 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. Signifikan jika asymp. Sig. $< 0,05$.

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% ($\alpha = 0,05$).



Gambar 4.7 Alur Penelitian

Keterangan:

Penelitian ini menggunakan 3 kelompok sampel yaitu : subyek sehat, kontak, dan pasien yang masing-masing diberi 3 perlakuan, yaitu: kontrol negatif (tanpa perlakuan), pemberian PPD dan pemberian protein rekombinan 38 kDa M.tb. Masing-masing kelompok sampel berjumlah 8 buah sampel. Setelah didapatkan hasil *flowcytometry* dari ke-24 sampel selanjutnya dilakukan analisa data dengan menggunakan SPSS versi 18.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

