

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* untuk membuktikan bahwa antibodi anti HMGB-1 hasil poliklonal secara *in vivo* dapat digunakan untuk mendeteksi komplikasi Lupus Nefritis pada pasien LES dengan membuat Kit *Dipstick* untuk deteksi dini Lupus Nefritis pada pasien LES .

4.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah urin dari pasien LES yang telah didiagnosis oleh dokter spesialis penyakit dalam konsultan rheumatologi di RS Dr.Syaiful Anwar Malang berdasarkan kriteria ACR tahun 1997. Seluruh pasien LES yang akan diambil urinnnya telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Berikut ini adalah kriteria pasien yang akan diambil urinnnya:

1. Pasien dengan diagnosis LES, oleh dokter spesialis penyakit dalam konsultan rheumatologi di RS. Dr.Syaiful Anwar Malang berdasarkan kriteria ACR tahun 1997
2. Pasien dengan diagnosis Lupus Nefritis, oleh dokter spesialis penyakit dalam konsultan rheumatologi bersama konsultan ginjal-hipertensi di RS. Dr.Syaiful Anwar Malang berdasarkan kriteria ISN/RPS tahun 2003
3. Wanita usia 18-43 tahun
4. Status LES aktif (LESDAI >3)

5. Lama penyakit < 6 bulan atau maksimal 2 tahun sejak pertama kali terdiagnosis
6. Tidak sedang hamil atau menyusui
7. Tidak sedang mengonsumsi steroid atau batasan konsumsi steroid (Methylprednisolone) <7000mg/tahun
8. Tidak sedang mengonsumsi obat immunosuppresant (Cyclophosphamide, Mycophenolate Mofetil, dan Azathioprine)
9. Tidak sedang menderita penyakit infeksi berat, seperti ISPA, TBC, pneumonia, tifoid, DF, dan DHF

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15 \text{ (Solimun, 2001)}$$

(p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan), p = 3 (urin manusia normal, urin pasien LES, urin pasien *Silent* Lupus Nefritis, urin pasien LES dengan Lupus Nefritis)

sehingga :

$$3(n-1) \geq 15 \rightarrow n-1 \geq 3,75 \rightarrow n \geq 4,75.$$

sehingga jumlah sampel urin yang digunakan untuk setiap grup adalah 5 pasien sehingga total sampel sebanyak 20 sampel urin.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Februari sampai dengan Agustus 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel Bebas

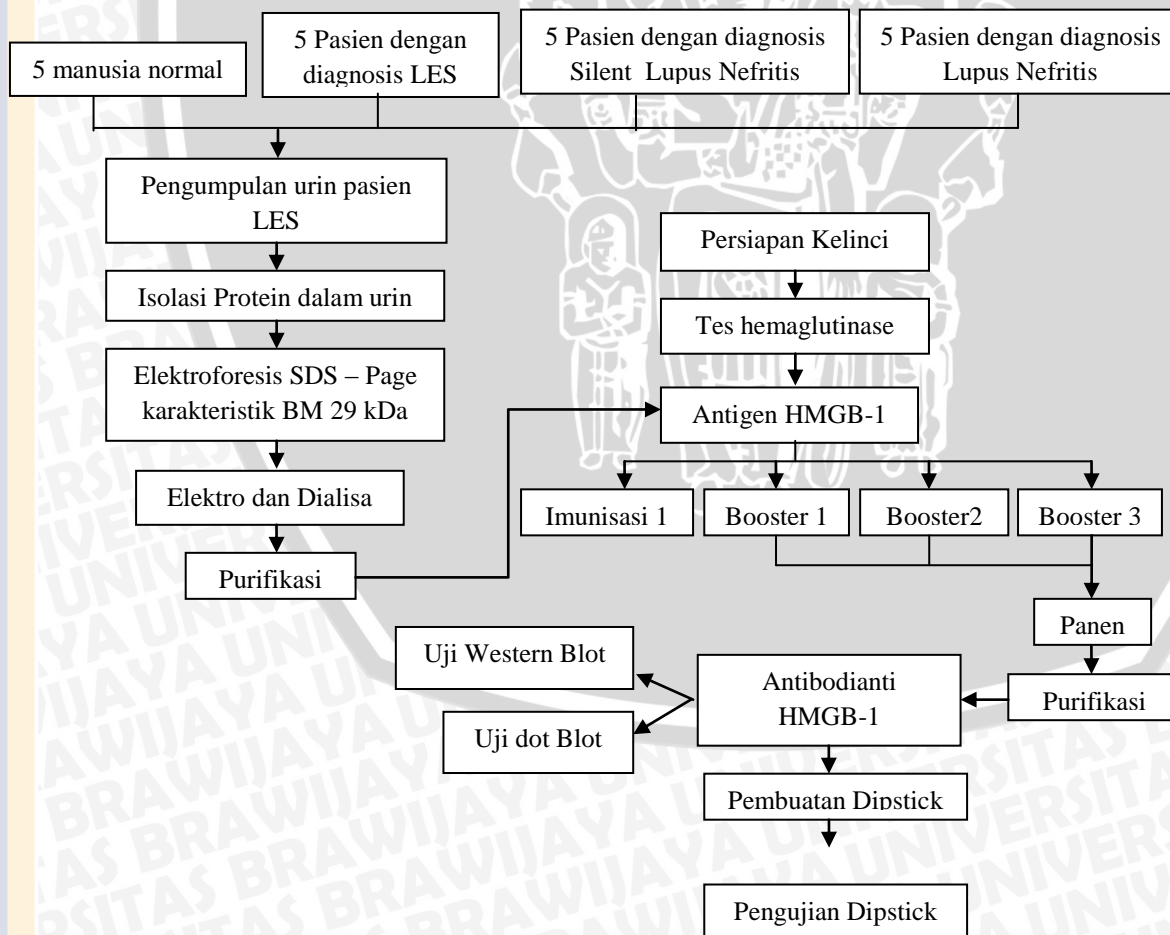
Variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

1. Urin pasien yang terdiagnosis LES
2. Urin pasien yang terdiagnosis LES dengan Lupus Nefritis
3. Urin pasien *Silent* Lupus Nefritis
4. Urin manusia normal

Variabel Terikat

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah titer antibodi HMGB-1 urin pasien yang terdiagnosis LES dengan komplikasi Lupus Nefritis.

4.5 Alur Kerja Penelitian



4.6 Prosedur dan Instrument Penelitian

1. Metode Pengumpulan urin

Sebelumnya pasien telah dijelaskan dan menyetujui *informed consent* tentang prosedur serta efek dan manfaat pengambilan urin. Urin pasien ditampung pada tabung sampel.

Alat : Tabung sampel, termos es, pendingin suhu – 40°C.

Bahan : Sampel urin penderita LES.

2. Metode Isolasi Protein dari Sampel urin

Sampel urin dimasukkan eppendorf, dipresipitasi dengan menambahkan etanol absolute dingin/ aseton dingin 1 : 1 per 500 ml sampel. Sampel disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Supernatant dibuang dan pellet diambil, kemudian dilanjutkan dengan *running* sampel urin.

Alat : Sentrifuge, eppendorf.

Bahan : Etanol absolute dingin.

3. Metode Elektroforesis SDS- PAGE Sampel urin

Running sampel dilakukan dengan mempersiapkan gel dan protein dalam eppendorf, dengan volume maksimal 20 µL, ditambahkan *Reducing Sample Buffer* (RSB) dengan perbandingan 1:1. Kemudian protein dan RSB dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Sampel dimasukkan dalam sumuran/ well gel SDS PAGE, *running* sampel pada 120 V selama 60 – 90 menit, setelah itu gel diambil kemudian *distaining* di atas *shaker* selama 20 – 30 menit dengan *Coomasie Brilliant Blue*. Gel kemudian di *-scan* dan dikarakterisasi dengan berat molekul HMGB-1 yaitu 29 kDa.

Alat : *Gel caster*, kaca, penjepit kaca, eppendorf 1,5 mL, well SDS – PAGE, sumber listrik \pm 120V, wadah plastik, *shaker*.

Bahan : *Separating gel* 12,5%: Acrylamide 30%, Tris-HCl 1 M pH 8,8, H₂O, SDS 10%, APS 10%, TEMED. *Stacking gel* 12,5%: Acrylamide 30%, Tris-HCl 1 M pH 6,8, H₂O, SDS 10%, APS 10%, TEMED. *Tracking dye*: Tris HCl pH 6,8, Gliserol, SDS 10%, β mercaptoetanol, Bromophenol blue 1%, Aquadest. *Running Buffer*: Glycine, Tris Base, Aquadest Steril, SDS. *Staining Solution*: Coomassie Brilliant Blue R250, Methanol, Asam Asetat Glacial, Aquadest.

4. *Metode Elektroelusi, Dialisa, dan Purifikasi Sampel*

Potong selofan sepanjang 6-8 cm, dididihkan bertahap dalam 5% Na₂CO₃ selama 15 menit, 50 mM EDTA pH 8 selama 15 menit, dan Aquades steril mendidih selama 15 menit. Siapkan cawan petri sejumlah jenis pita yang dipotong, dan isi dengan *running buffer*. Pertama – tama potong band 29 kDa pada pita hasil *running* elektroforesis, kemudian masukkan hasil potongan ke masing masing cawan petri berlabel, dibagi 3, dan dimasukkan ke dalam satu cawan petri, dilanjutkan dengan elektroelusi, bilas selofan dengan *running buffer* sebelum diisi dengan potongan pita protein, isi selofan yang sudah dijepit di salah satu sisinya dengan *running buffer*, kemudian isi dengan potongan pita protein, jepit lagi di sisi yang lainnya.

Alat : Cawan petri, sumber listrik 120 V, *eppendorf*, *sentrifuge*.

Bahan : Preparasi selofan: Na₂CO₃ 5%, EDTA pH 8, Aquadest Steril, *Running buffer*. Elektroelusi: *Running Buffer*. Dialisa: Aquadest Steril/ PBS steril dingin, Etanol absolute dingin/ aseton dingin, TRIS Cl 0,5 M pH 8

5. *Metode Pembuatan Antibodi anti HMGB-1 dengan Metode Poliklonal*

Kelinci yang digunakan adalah kelinci jantan *strain* lokal, telinga panjang, berat 3,5 – 4 kg, dan tidak boleh terkena infeksi. Kelinci dipelihara dalam kandang dengan makanan pellet. Imunisasi dilakukan dengan cara menyuntikkan antigen HMGB-1 secara intraperitoneum. Penyuntikkan dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval waktu penyuntikkan selama 3 minggu. Pada satu minggu pertama, antigen HMGB-1 dicampur dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1. Penyuntikan *booster* (*booster* 1 dan 2) dilakukan penyuntikan ulang dengan antigen HMGB-1 yang dicampur dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA).

Alat : Tabung *sentrifuge*, botol serum, *syringe* injeksi.

Bahan : Kelinci *strain* lokal jantan, sampel stok antigen HMGB-1, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), *Incomplete Freund's Adjuvant* (CFA), Larutan gliserol.

6. *Metode Purifikasi Antibodi anti HMGB-1*

Pemurnian antibodi dilakukan dengan teknik presipitasi Sodium Ammonium Sulfat (SAS) 50% jenuh. Pembuatan SAS 50%: Ammonium sulfat ditambahkan dengan H₂O hingga 10 ml. 100 ml serum ditambahkan dengan 100 ml SAS 50% dengan perbandingan 1:1. Vortex tiap 10 – 15 menit selama 15 – 60 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C. selanjutnya vortex 1 menit dan inkubasi 4°C selama 5 – 10 menit dilanjutkan sentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. setelah itu ambil pellet dan buang supernatant kemudian tambahkan SAS 50% dengan perbandingan 1:2 dan kemudian homogenkan dilanjutkan sentrifuge pada 6.000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Buang supernatant dan ambil pellet kemudian pellet

dilarutkan dengan 100 ml buffer fosfat 0,05 M pada pH 7 sebanyak 1.000 ml pada suhu 4°C selama semalam, kemudian dialysis dengan selofan.

7. *Metode Uji Spesifisitas Antibodi dengan Teknik Dot Blot*

Membran NC dipotong – potong dengan ukuran 5 x 7 cm² kemudian dimasukkan dalam alat blot dot. Basahi dengan 50 µL Tris Buffer Saline (TBS) per sumur, lalu dilakukan degas. Kemudian membrane NC diinkubasi dengan larutan penghambat (*blocking*) TBS – skim 5% selama 1 jam dan bilas membran NC dengan TBS – T 0,05% sebanyak 3 x 3 menit. Selanjutnya tambahkan antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase – conjugated antibody* 1:200 dalam TBS) selama 60 menit pada suhu ruang sambil di – shaker, kemudian bilas dengan TBS – T 0,05% sebanyak 3 x 3 menit. Selanjutnya beri substrat untuk pewarnaan (reaksi enzimatik), yaitu *Western Blue substrate solution* selama 10 – 30 menit pada ruangan gelap. Reaksi dihentikan dengan dibilas aquadest apabila terjadi perubahan warna ungu muda sampai ungu tua pada bekas tetesan. Warna ungu menunjukkan reaksi positif, bila tidak terjadi perubahan warna pada bekas tetesan, reaksi dianggap negatif.

Alat : Kit *dot blot*, inkubator.

Bahan : *Tris Buffer Saline (TBS)*, Antibodi sekunder (*Rabbit IgG Alkaline phosphatase – conjugate antibody*), *Western Blue substrate solution*.

8. *Metode Uji Spesifisitas Antibodi dengan Teknik Western Blot*

Rendam membrane blotting dan gel elektroforesis SDS-PAGE masing – masing dalam transfer buffer 30 menit (dishaker). Kemudian setting alat : trans-blot semi *dry* merk Bio rad. Susun secara *sandwich* dari bawah ke atas: kertas saring, membrane NC, gel SDS-PAGE, dan kertas saring.

Sampel kemudian di - *running* pada 300MA, 20 Volt selama 2 jam untuk proses transfer. Setelah 2 jam, angkat membran NC dan cuci dengan akuades, rendam dalam *ponceau* selama 1 menit, dan bilas aquades untuk konfirmasi keberhasilan. Transfer pita protein dari gel SDS-PAGE ke membrane NC. Bloking dengan TBS-SKIM milk 5% inkubasi *overnight* 4°C. Selanjutnya sampel dikeluarkan sampai suhu ruang tercapai, kemudian di-*shaker* dilanjutkan pencucian NC dengan TBS-tween 0,05% 2 x 10 menit, *shake* pelan. Inkubasi dengan Antibodi primer yang dilarutkan dalam TBS-Skim Milk 1% selama 2 jam pada suhu ruang selanjutnya cuci NC dengan TBS-tween 0,05% 2 x 10 menit dan di - *shaker* pelan. Inkubasi dengan antibodi sekunder-berlabel yang dilarutkan dalam TBS selama 1 jam pada suhu ruang kemudian cuci NC dengan TBS tween 0,05% 1x10 menit, *shaker* pelan. Inkubasi dengan substrat *Western blue* untuk *AP conjugate* sampai muncul pita protein kemudian stop reaksi dengan dd H₂O, kering anginkan membrane NC, scan hasilnya.

Alat : Inkubator, kertas, *shaker*.

Bahan : Kertas saring, Membrane NC, Gel SDS – PAGE: Tris Base Solution (TBS), Tris Base 50 mM, NaCl 0,2M, Dd H₂O pH 7,4. Transfer buffer: Tris Base 25mM, Glycine 192 mM, Methanol 20%, Dd H₂O.

9. *Metode Pembuatan Kit Dipstick dengan Kandungan Antibodi anti HMGB-1*

Dipstick yang digunakan berupa kertas VPDF yang bersifat high capacity Antibodi – Anti HMGB-1 hasil poliklonal dilabel dengan antibodi konjugat AP kemudian dilekatkan langsung pada fase padat pada ujung dari *dipstick*, dan biarkan selama semalam. Lapisi dengan plastik pelindung untuk mencegah oksidasi. Ikatan antigen dan antibodi dapat dilacak dengan menggunakan reaksi Antibodi anti HMGB-1 dengan antibodi yang berlabel enzim alkaline

fosfatase (AP) dan ditambahkan substrat kromogen BCIP/ NBT. Substrat kromogen DAB diletakkan dalam tabung tersendiri sehingga *dipstick* yang telah dilekati Antibodi anti HMGB-1 dan telah dilabel dengan antibodi konjugat AP digunakan dengan memasukkan *dipstick* dalam urin penderita LES kemudian dimasukkan dalam larutan kromogen DAB sehingga keluar warna sebagai penanda positif LES.

Alat : Kertas VPDF *high capacity*, tabung larutan kit.

Bahan : Antibodi sekunder *conjugate* berlabel enzim alkalinefosfatase (AP), substrat kromogen DAB: BCIP/NBT, bahan pelapis stik.

10. *Metode Pengujian Kit Dipstick pada Pasien dengan diagnosis LES*

Tampung urin pasien pada cawan petri atau tabung. Masukkan *dipstick* pada cawan/ tabung berisi urin, tunggu selama 5 menit. Pindahkan *dipstick* pada tabung yang berisi substrat kromogen DAB, kemudian lihat warna yang tampak. Pengujian *dipstick* dilakukan pada 10 sampel agar representatif, dengan membuat gradien warna dan menginterpretasinya. Interpretasi berupa positif atau negatif sesuai warna yang keluar. Hasil deteksi dengan *dipstick* dibandingkan dengan uji titer ELISA atau uji trombosit dari rekam medik pasien.

Alat : Kit Dipstick

Bahan: Sampel urin

