

Bab 4

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian adalah bidang obstetri dan ginekologi dan biomolekuler.

4.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Bagian/SMF Obstetri Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS Dr. Kariadi Semarang, Sub Bagian Fetomaternal. Pemeriksaan imunologi dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM. Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai September 2005 sampai Oktober 2005

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan rancangan studi potong lintang (cross sectional study).

4.4 Populasi dan sampel penelitian

4.4.1 Populasi target

Populasi target adalah parturien dengan pre-eklampsia berat atau eklampsia dan non preeklampsia berat dan eklampsia.

4.4.2 Populasi terjangkau

Populasi terjangkau adalah parturien dengan pre-eklampsia berat atau eklampsia yang dirawat dan melahirkan secara pervaginam atau perabdominal di RS Dr Kariadi Semarang.

4.4.3 Sampel

Sampel penelitian ini adalah parturien dengan preeklampsia berat atau eklampsia dan non pre-eklampsia berat atau eklampsia yang dirawat dan melahirkan secara pervaginam atau perabdominal di RS Dr Kariadi Semarang yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

4.4.3.1 Kriteria inklusi

1. Untuk kasus adalah parturien dengan PE-E, sedangkan untuk pembanding adalah parturien non PE-E
2. Janin tunggal hidup intra uterine.

4.4.3.2 Kriteria eksklusi

- Persalinan dengan kecurigaan infeksi intra uterine
- Persalinan dengan kelainan kongenital pada janin/bayi baru lahir.
- Parturien dengan penyakit sistemik dan infeksi yang kronik dan diabetes mellitus.

Sebagai pembanding adalah parturien non PE-E yang melahirkan di RS Dr. Kariadi Semarang dengan persyaratan tidak memiliki riwayat penyakit kehamilan dan tidak mengalami persalinan tindakan pada sebelumnya.

4.4.4 Besar Sampel

Sesuai dengan hipotesis penelitian besar sampel dihitung menggunakan rumus besar sampel untuk uji beda rerata 2 populasi dan besar sampel untuk uji korelasi. Rumus besar sampel uji beda rerata 2 populasi digunakan oleh karena akan dibandingkan kadar TNF- α dan IL-6 pada plasenta penderita PE-E dengan non PE-E. Dari pustaka diketahui rerata kadar TNF- α pada plasenta parturien non PE-E adalah 1.7 dengan SD=1.96, apabila diperkirakan akan ada peningkatan 1 SD yaitu 8.98 dan ditentukan derajat kemaknaan $p=0,05$ maka $Z\alpha=1,96$ dan $Z\beta= 0,842$ ($\beta=0,2$, power=80%) Maka perhitungan besar sampel :

$$n_1 = n_2 = 2 \left(\frac{(Z\alpha + Z\beta)\delta}{x_1 - x_2} \right)^2 = 2 \left(\frac{(1,96 + 0,842)1,96}{8,98 - 1,7} \right)^2$$

$$n_1 = n_2 = 16,8 \approx 17 \text{ subyek}$$

Besar sampel total adalah

$$n_1 + n_2 = 34 \text{ subyek.}$$

Besar sampel untuk uji korelasi digunakan karena akan dicari korelasi antara kadar TNF- α , IL-6 dengan apoptosis trofoblas. Apabila diperkirakan korelasi antara TNF- α , IL-6 dengan apoptosis trofoblas adalah derajat sedang ($r=0.4$), dengan $Z\alpha=1,96$ dan $Z\beta= 0,842$ ($\beta=0,2$, power=80%)

Maka perhitungan besar sampel :

$$n = \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta)}{0.5 \ln\left(\frac{1+r}{1-r}\right)} \right]^2 + 3 = \left[\frac{(1.96 + 0.842)}{0.5 \ln\left(\frac{1+0.4}{1-0.4}\right)} \right]^2 + 3 = 32,3$$

Berdasarkan perhitungan diatas, jumlah sampel terbesar adalah 34 subyek, sehingga total besar sampel yang digunakan adalah 34 subyek.

4.4.5 Cara sampling

Pemilihan subyek penelitian dilakukan secara consecutive sampling berdasarkan datangnya pasien ke RS Dr. Kariadi Semarang.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas adalah status parturien, skala nominal.

- a. Parturien dengan PE-E
- b. Parturien non PE-E

Skala nominal nilai TNF α dan IL-6

4.5.2 Variabel tergantung

- a. Kadar TNF- α plasenta, skala rasio.
- b. Kadar IL-6 plasenta, skala rasio.
- c. Persentase apoptosis sel trofoblas, skala rasio.

4.6 Bahan dan cara kerja

4.6.1 Tata laksana pasien.

Parturien yang diikuti dalam penelitian ini (kasus PE-E dan non PE-E) dikelola sesuai prosedur tetap pelayanan SMF Obstetri-Ginekologi RS Dr Kariadi Semarang. Saat persalinan baik pervaginam atau perabdominal dicatat karakteristik parturinet berat badan bayi, berat dan ukuran plasenta.

Pengambilan sample serum darah

Serum diambil dari sampel darah vena yang diambil melalui vena mediana cubiti pada saat pasien dalam keadaan inpartu. Kadar TNF- α dan IL-6 serum diukur dengan metode ELISA (R & D System, Minneapolis, USA).

Pengambilan dan pemeriksaan plasenta

Pemeriksaan plasenta dilakukan segera setelah plasenta dilahirkan, yaitu \pm 2 menit. Plasenta diletakkan pada baki yang diberi butiran es dan didiamkan beberapa saat agar tidak ada lagi darah yang tersisa didalamnya.

Plasenta di bersihkan, kemudian sisi maternal plasenta diletakkan menghadap ke atas dan ditimbang. Kemudian plasenta pada sisi maternal difoto dan kemudian ditentukan dan diamati kelainan-kelainan makroskopis seperti infark kemudian dianalisa menggunakan AutoCad (perangkat lunak komputer) yang membandingkan seluruh luas plasenta dengan luas infark dalam prosentase yang kemudian dicatat.

Sampling dilakukan paling sedikit 3 tempat, yaitu sampling pertama diambil dari tepi plasenta, sampling ke 2 diambil \pm 3-4 cm dari insersi

umbilical cord dan sampling ke 3 diambil bagian tertebal dari plasenta yang masing-masing diambil dengan diameter 2 cm dengan ketebalan mencakup plasenta sisi maternal dan fetal. Bila daerah infark tidak ada dalam 6 kuadran tersebut maka daerah infark tetap diambil sampelnya.⁴⁰

Sampel jaringan plasenta dibilas dengan larutan NaCl 0,9% dingin sehingga bersih dari sisa-sisa darah. Sampel yang didapat dimasukkan ke dalam botol jaringan sampel yang telah diberi nomor dan tanda untuk kemudian segera dikirim ke Laboratorium Bioteknologi, FK UGM atau disimpan dalam freezer suhu -20°C apabila harus dikirim pada hari berikutnya. Sebagian sampel dimasukkan kedalam tabung yang terpisah untuk pemeriksaan apoptosis. Pemeriksaan dan pengambilan sampel dilakukan ± 2 menit segera setelah plasenta lahir.

4.6.4 Preparasi jaringan plasenta untuk pemeriksaan TNF- α dan IL-6

Jaringan plasenta diletakkan dalam tabung yang berisi protease inhibitor (phenylmethylsulfonylflorida, leupeptin, antipain, pepstatin A dan tripsin inhibitor; Sigma, St. Louis, USA). Tabung diletakkan dalam wadah yang berisi butiran es. Jaringan plasenta diberi larutan buffer homogenisasi (Larutan Tris (pH 7,4) dan 1 mmol/ ethylenediamine tetraacetate; Fisher Scientific; USA) sebanyak 2 X lipat volume jaringan dan dicincang dengan tissue homogenizer (Tekmar, USA) selama 30 detik. Homogenate selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C .

Selanjutnya cairan supernatan diambil dengan pipet gelas dan dipindahkan kedalam tabung lain, sedangkan endapan didasar tabung dibuang. Cairan supernatan di sentrifugasi pada 10 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Cairan supernatan diambil lagi dengan pipet gelas untuk dipindahkan pada tabung lain dan disimpan dalam deep freezer (-80°C) sampai pemeriksaan TNF- α dan IL-6 dilakukan.

4.6.5 Pengukuran kadar TNF- α plasenta

Pengukuran kadar TNF- α menggunakan kit ELISA spesifik buatan R&D System, (Minneapolis; USA) yang terdiri dari mikroplate spesifik yang telah di coating dengan monoklonal antibodi anti TNF- α , Conjugate, standar TNF- α , Diluent RD1A, kalibrator diluent RD5A, kalibrator diluent RD6A, bufer pencuci, Color Reagent A, Color Reagent B dan Stop Solution dan strips perekat.

Mikroplate spesifik yang mengandung monoklonal antibodi anti TNF- α disiapkan pada suhu kamar. Kedalam masing masing sumuran ditambahkan 50 uL diluent RD1F dan kemudian ditambahkan lagi 200 μ L larutan sampel atau standar. Mikroplate kemudian ditutup dengan strip perekat dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan. Isi sumuran mikroplate dibuang, kemudian dicuci 3 kali dengan 200 μ L buffer pencuci dan dikeringkan dengan kertas hisap bersih. Kedalam masing masing sumuran ditambahkan lagi 200 μ L conjugate ke masing-masing sumuran dan ditutup dengan strip perekat yang baru dan diinkubasikan selama 1

jam pada suhu ruangan. Isi sumuran mikroplate dibuang dan dicuci kembali 3 kali. Ditambahkan lagi 200 μL larutan substrat dalam ke masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan. Terakhir, ditambahkan 50 μL stop solution ke masing-masing sumuran. Densitas optik dari masing-masing sumuran dibaca dengan menggunakan micro ELISA Reader dengan panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit. Penghitungan kadar TNF- α dilakukan dengan menggunakan kurva standar yang berupa kurva regresi nilai OD.

Nilai OD yang diperoleh ditempatkan pada sumbu Y dari kurva standar dan selanjutnya ditarik garis tegak lurus dari sumbu Y ke garis regresi, titik potong pada garis regresi tersebut selanjutnya diproyeksikan ke sumbu X untuk mendapatkan kadar TNF- α dalam pg/mL.

4.6.6 Pengukuran kadar IL-6 plasenta

Pengukuran kadar IL-6 menggunakan ELISA kit spesifik (Specific sandwich enzyme-linked immunosorbent assays) buatan R&D Systems (Minneapolis; USA) yang terdiri dari mikroplate yang di coating dengan monoklonal antibodi anti IL-6, Conjugate, IL-6 Standard, Diluent RD1A, Calibrator Diluent RD5A, Bufer pencuci, Color Reagent A, Color Reagent B, stop Solution dan pita perekat.

Kedalam masing masing sumuran mikroplate spesifik yang mengandung monoklonal antibodi anti IL-6 ditambahkan 100 μL diluent RD1A kemudian dilanjutkan dengan penambahan 100 μL larutan standar

atau sampel kedalam masing masing sumuran. Larutan standar menggunakan sumuran A1-H1 dan A2-H2. Untuk sumuran yang lain digunakan untuk sampel. Mikroplate ditutup dengan strip perekat. Mikroplate diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Isi sumuran kemudian di buang dan dicuci dengan bufer pencuci sebanyak 4 kali pencucian. Pencucian dilakukan dengan mengisi setiap sumuran dengan buffer pencuci 300 ml dengan menggunakan pipet multi channel. Pada pencucian yang terakhir, setiap sisa bufer pencuci dibuang dengan mengaspirasi atau dituang. Mikroplate dibalik dan dikeringkan dengan mengelap dengan kertas penghisap yang bersih. Kedalam masing masing sumuran ditambahkan 200 μ L conjugate IL-6 kemudian mikroplate ditutup strip perekat dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan. Mikroplate kemudian dicuci lagi dengan aspirasi, kemudian ditambahkan kembali 200 μ L substrate ke masing-masing sumuran, diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan dan dilindungi dari sinar matahari. Terakhir ditambahkan 50 μ L stop solution ke masing-masing sumuran. Densitas optik dari setiap sumuran dibaca dengan mikro ELISA reader dalam waktu 30 menit pada panjang gelombang 450 nm. Kadar IL-6 selanjutnya dihitung menggunakan kurva standar, yang menunjukkan antara nilai OD dengan kadar IL-6.

Nilai OD yang diperoleh dari masing masing sampel ditempatkan pada sumbu Y dari kurva standar dan selanjutnya ditarik garis tegak lurus dari sumbu Y ke garis regresi, dari titik potong pada garis regresi tersebut

selanjutnya diproyeksikan ke sumbu X untuk mendapatkan kadar IL-6 dalam pg/mL.

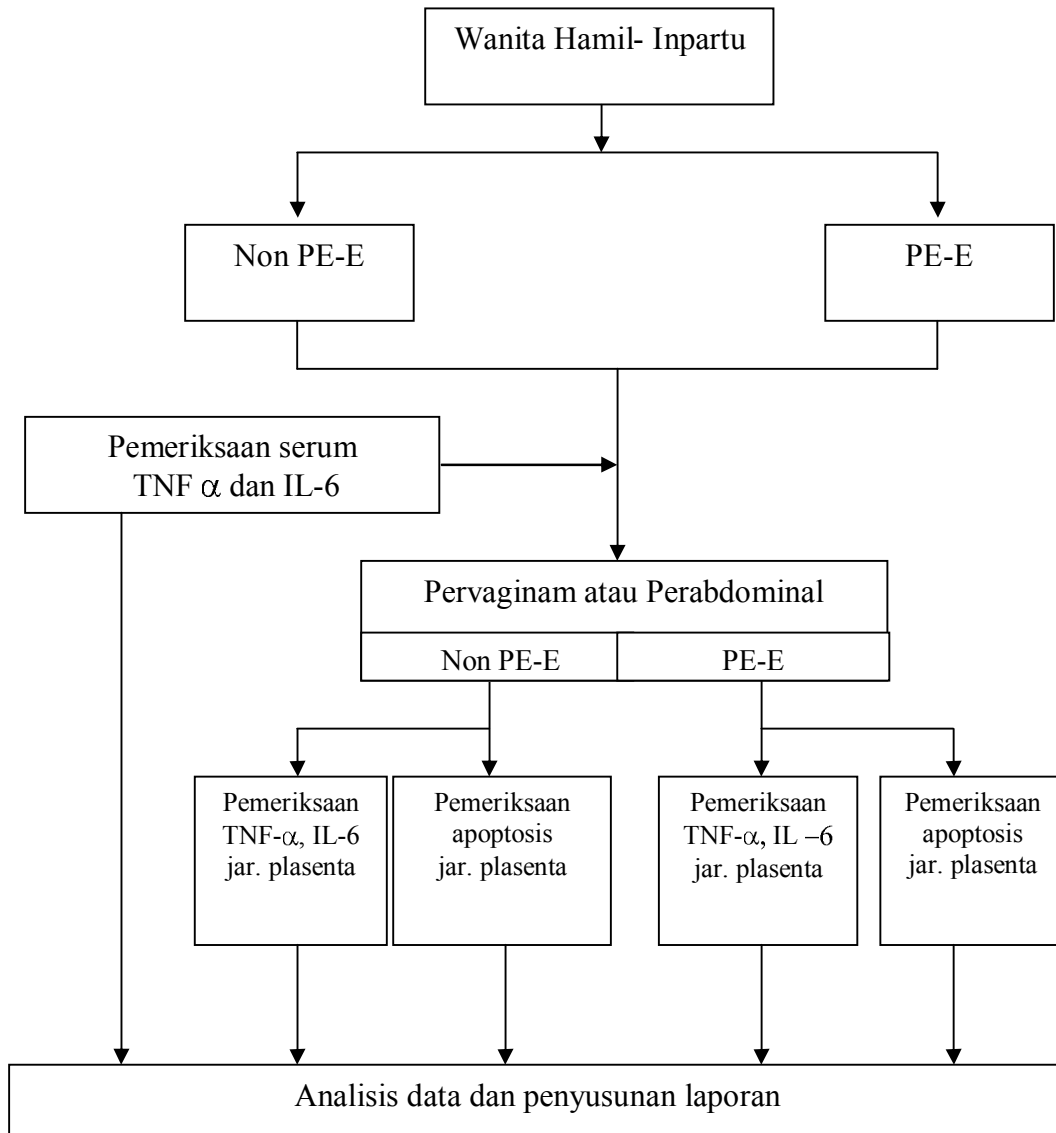
4.6.7 Pemeriksaan Apoptosis

Pemeriksaan viabilitas sel dilakukan untuk membedakan apakah sel plasenta dalam keadaan apoptosis atau tidak. Pemeriksaan dilakukan dengan pengecatan dual staining Acridine Orange (AO) dan Propidium Iodide (PI). Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop fluoresent. Sel berfluoresent terang dihitung sebagai apoptosis, sedangkan sel utuh yang tidak tercat sebagai sel sehat. Apoptosis dinyatakan persentase sel yang mengalami apoptosis per 100 sel sehat.

4.7 Batasan Operasional

No	Variabel	Skala
1.	<p>Status parturien</p> <p>a. PE-E (Preeklampsia berat dan eklampsia) adalah keadaan Preeklampsia dengan tanpa proteinuri yang terjadi pada wanita hamil dengan umur kehamilan setelah 20 minggu atau segera setelah persalinan.</p> <p>PE-E apabila dijumpai kenaikan tekanan darah sistolik > 30 mmHg, kenaikan tekanan darah diastolik > 15 mmHg dan tekanan darah sistolik >140 mmHg atau diastolik >90 mmHg. Pengukuran tekanan darah ini harus dilakukan sekurang-kurangnya 2 kali dengan selang waktu 6 jam dan ibu harus dalam keadaan istirahat duduk selama 10 menit terlebih dahulu.</p> <p>Proteinuri adalah kadar protein dalam urin yang melebihi 0,3 gram/liter dalam 24 jam, melebihi 1 gram/liter dalam 2 kali pengambilan urine selang 6 jam dan dari pemeriksaan kualitatif 2+ (++) pada pengambilan urine sewaktu.</p> <p>b. Parturien non PE-E apabila tidak dijumpai gejala PE-E seperti diatas</p>	Nominal
2.	<p>Karakteristik plasenta yang dimaksud adalah berat plasenta dan luas infark yang diperiksa secara makroskopis.</p>	
	Berat plasenta adalah berat setelah tidak terdapat lagi sisa darah dalam plasenta dan setelah tali pusat dipotong. Berat dinyatakan dalam gram.	Interval
	Luas infark dinyatakan dalam prosentase (%) terhadap keseluruhan luas setelah dihitung dengan program komputer.	Rasio
3.	Kadar TNF- α adalah kadar TNF- α pada serum dan jaringan plasenta diperiksa dengan metode ELISA, dinyatakan dalam pg/mL	Rasio
4.	Kadar IL-6 adalah kadar IL-6 pada serum dan jaringan plasenta diperiksa dengan metode ELISA, dinyatakan dalam pg/mL	Rasio
5.	Infark plasenta	Rasio

4.8 Alur penelitian



4.9 Analisis Data

Variabel karakteristik bayi dan plasenta yang berskala rasio atau interval dinyatakan dalam rerata dan simpang baku, sedangkan yang berskala nominal atau ordinal dinyatakan dalam distribusi frekuensi dan persen.

Uji χ^2 digunakan untuk menguji perbedaan distribusi frekuensi variabel yang berskala kategorial antara kelompok PE-E dengan yang bukan PE-E. Sebelum dilakukan uji beda atau uji korelasi, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan normalitas data dengan uji Uji Shapiro Wilk, sedangkan homogenitas varians diuji dengan uji Levenne. Perbedaan kadar/ekspresi TNF- α , IL-6 (serum dan plasenta) dan luas infark antara parturien non PE-E dengan parturien PE-E oleh karena berdistribusi tidak normal dilakukan dengan uji non-parametrik Mann-Whitney. Hubungan antara kadar TNF- α atau IL-6 pada serum dengan ekspresi TNF- α atau IL-6 plasenta oleh karena distribusi datanya tidak normal dianalisis dengan uji korelasi Spearman.

Pengaruh status parturien, kadar TNF- α serta IL-6 pada serum dan jaringan terhadap luas infark dan persentase apoptosis jaringan plasenta dianalisis dengan uji *multivariat analysis of covariance* (MANCOVA) dengan luas infark dan persentase apoptosis sebagai variabel dependen, status parturien sebagai faktor pembanding (*between subject factors*) dan kadar TNF- α serta IL-6 pada serum dan plasenta sebagai kovariat.

Nilai *cut-off-point* kadar TNF- α dan IL-6 pada serum dan jaringan antara wanita hamil dengan PE-E dan bukan PE-E diperoleh dari *Receiver Operating Curve* (ROC) analisis.

Nilai p dianggap bermakna dengan $p \leq 0,05$ dengan 95 % interval kepercayaan dan power sebesar 80 %.

Analisis data akan menggunakan program SPSS (Statistics Program for Social Science) ver 11,5 for Windows (SPSS Inc, USA).

4.10 Etika penelitian

Penelitian ini hanya menggunakan sedikit jaringan plasenta subyek penelitian baik yang PE-E maupun non PE-E dan tidak melibatkan subyek maupun bayi secara langsung.

Semua subjek pada penelitian ini diberi penjelasan tentang maksud dan tujuan penelitian. Subjek diminta kesediaannya untuk diikutsertakan dalam penelitian dengan informed consent tertulis. Seluruh identitas dan data pasien akan dijamin kerahasiaannya.

Seluruh biaya yang berhubungan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti. Protokol penelitian telah disetujui dari Ketua Bagian/SMF Obstetri-Ginekologi FK UNDIP-RSDK, Direktur RSDK Semarang serta komisi Etik Penelitian FK UNDIP/RSDK.