

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup

Penelitian ini mencakup bidang ilmu pediatri dan ilmu Genetika Dasar.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Pusat Penelitian Biomedik CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Waktu penelitian ini dilaksanakan dalam periode 3 bulan yaitu Maret 2015 sampai Juli 2015 dan data pasien yang dikumpulkan dimulai dari Januari 2006 – April 2015.

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan ialah penelitian bersifat deskriptif retrospektif dan prospektif dimana jenis metode yang digunakan ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana hasil analisis kromosom dan distribusi kelainan kromosom pada penderita anomali kongenital multipel yang terdata di Pusat Penelitian Biomedik CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang sejak periode Januari 2006 – April 2015.

4.4 Populasi dan Sampel

4.4.1 Populasi Target

Populasi target dalam penelitian ini adalah semua pasien yang lahir dengan anomali kongenital multipel yang memeriksakan kromosom di laboratorium CEBIOR.

4.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau adalah pasien dengan anomali kongenital multipel yang dilakukan analisis di laboratorium Pusat Penelitian Biomedik CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang sejak periode Januari 2006 - April 2015.

4.4.3 Sampel

Sampel adalah populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusif

a. Kriteria Inklusi

- a) Pasien anomali kongenital multipel
- b) Pasien yang diperiksa dan dilakukan analisis kromosom di laboratorium CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang sejak periode Januari 2006-April 2015.

b. Kriteria Eksklusif

- a) Pasien anomali kongenital tunggal seperti celah bibir, *club foot*, stenosis pilorus, dislokasi sendi panggul kongenital dan penyakit jantung bawaan

4.4.4 Cara Sampling

Cara pengambilan sampel adalah metode *consecutive sampling*, yaitu semua pasien anomali kongenital multipel yang datang secara berurutan dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusif sampai jumlah sampel terpenuhi.

4.4.5 Besar Sampel

Semua pasien anomali kongenital multipel dengan kelainan kromosom yang diperiksa di laboratorium CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro,

Semarang sejak periode Januari 2006-April 2015 dan telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.5 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Anomali kongenital multipel
- b. Variabel terikat : Kariotip

4.6 Definisi Operasional

- a. *Anomali kongenital multipel* : kelainan struktur atau fungsi pada dua atau lebih sistem organ yang terjadi sejak dalam kandungan dan muncul saat lahir yang diketahui melalui data rekam medis pasien.
- b. *Kariotip* : gambaran simbolik satu set kromosom dari suatu individu.

4.7 Cara Pengumpulan Sampel⁴⁴

47.1 Bahan

Bahan yang diperiksa: darah vena dengan heparin

Media yang dibutuhkan antara lain :

1. Media kultur kromosom

Media yang digunakan adalah:

- 1) TC199 (tissue culture199), merupakan media rendah asam folat dengan pH 7,6
- 2) MEM (minimum esensial medium), merupakan medium dengan sedikit amino acid dengan vitamin, dengan pH 7,2-7,4

2. Bahan pemicu mitosis yaitu PHA (Phytohaemagglutinin), jenis PHA-P (pure) /PHA-M (mixture).

3. Fetal Bovine Serum (FBS) 10 % sebagai suplemen.

4. Colchicine atau colcemid untuk menghentikan mitosis (Spindle Inhibitor).
5. Thymidin sebagai folat inhibitor, digunakan khusus pada kultur dengan media MEM untuk ekspresi *fragile site*.
6. KCl 0,075 M sebagai larutan hipotonik untuk melisiskan membran sel inti.
7. Larutan Carnoy's (3 methanol: 1 acetic acid) untuk memfiksasi.

47.2 Alat

1. S spuit untuk mengambil sampel darah
2. Tabung gelas, tabung tertutup/botol untuk kultur
3. Pipet tetes, pipet ukur
4. Sentrifuse, inkubator, waterbath
5. Freezer
6. Object glass
7. Mikroskop cahaya, mikroskop fotografi
8. Komputer dengan program Stastitical Product and Service Solution (SPSS)

4.7.3 Jenis Data

Jenis data yang digunakan merupakan data yang didapat dari hasil anamnesis, pemeriksaan klinis dan analisis kromosom yang terdapat dalam rekam medis pasien yang diperiksa di laboratorium Pusat Penelitian Biomedik FK UNDIP Semarang sejak periode Januari 2006 - April 2015.

4.7.4 Cara Kerja

Data penelitian diperoleh dari hasil anamnesis, pemeriksaan klinis, analisis kromosom, dan rekam medis pasien anomali kongenital multipel di CEBIOR FK Undip Semarang. Data sampel harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Dari data sampel akan dilihat prevalensi dan pola kelainan kromosom anomali kongenital

multipel. Selanjutnya data akan dianalisis dan ditabulasi. Masing-masing variabel akan dicari hubungannya. Hasil dari penelitian akan ditulis dalam bentuk laporan.

Analisis kromosom ini dilakukan melalui tahapan⁴⁴ :

1. Penanaman

- a. Meneteskan masing-masing 7 tetes “buffy coat” atau 10 tetes darah dalam 2 tube berisi 5 ml media yang berbeda (TC 199 dan MEM) yang mengandung 10% Fetal Bovine Serum dan 10 μ l Phytohaemagglutinin-P
- b. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam dengan sudut kemiringantabung \sim 45° agar memberi peluang pada tumbuhnya sel dipermukaan, dalam inkubator yang mengandung 5% CO₂.

2. Pemanenan

- a. Menambahkan 0,1 Thymidine (konsentrasi akhir 0,3 μ g/ml) dan 3 tetes colchicine (konsentrasi akhir 1 μ g/ml) masing-masing selama 24 jam dan 25 menit sebelum pemanenan sel pada tabung dengan media MEM. Tabung dengan media TC 199 ditambahkan Colchicine (konsentrasi akhir 1 μ g/ml)
- b. Kemudian memusingkan tabung selama 10 menit pada 1000 rpm
- c. Membuang supernatan dan meresuspensikan endapan dan menambahkan larutan hipotonik hangat KCl 0,075M sebanyak 5 ml, kemudian meresuspensikan kembali agar terbentuk larutan homogen dan inkubasi 37° dan menginkubasinya pada suhu 37°C dalam waterbath selama 15-30 menit
- d. Memusingkan tabung kembali pada 1000 rpm selama 10 menit, membuang supernatan dan menambahkan 5 ml larutan fiksasi Carnoy’s pelan-pelan melalui dinding tabung, kemudian mengocoknya. Pemberian larutan fiksasi diulangi 3 kali sampai didapatkan presipitat yang jernih.

- e. Mensuspensikan residu dengan larutan Carnoy's secukupnya sesuai dengan banyaknya pelet. Sebarkan pada gelas object dengan meneteskan 2 tetes suspensi pada lokasi yang berbeda.

3. Pengecatan

a. Pengecatan Giemsa (pengecatan solid)

Mengecat preparat dengan Giemsa 10% dalam larutan buffer Phosphat pH 6,8 selama 1 menit. Pembuatan larutan Giemsa selalu baru untuk setiap periode pengecatan (1 staining jar). Pengecatan Giemsa hanya dipakai untuk skrining sel, tidak digunakan untuk analisis/ diagnosis.

b. Pengecatan *Banding* dengan "Hot Tripsin"

Reagen yang dibutuhkan antara lain

1. H₂O₂ 30%,
2. Larutan tripsin 1% Stok dalam buffer Hanks,
3. Larutan buffer Hanks (HBSS) pH 6,8-7,2 dan
4. Larutan phosphate buffer saline pH 6,8.

Cara kerja:

1. Membiarkan slide menjadi tua kurang lebih selama 3-5 hari
2. Mencucinya dengan air dan mendinginkannya dengan es
3. Memasukkan slide dalam larutan H₂O₂ 15% dingin selama 10 menit
4. Mencuci slide dengan air dan memasukkan dalam larutan Hanks hangat(37oC)
5. Memasukkan slide dalam larutan tripsin 0.1% (dalam buffer Hanks) hangat selama 10-15 detik tergantung sensitivitas dan umur slide, kemudian segera mencuci slide dengan air
6. Mencat dengan Giemsa 10% dalam buffer phosphat pH 6,8 selama 1

Menit

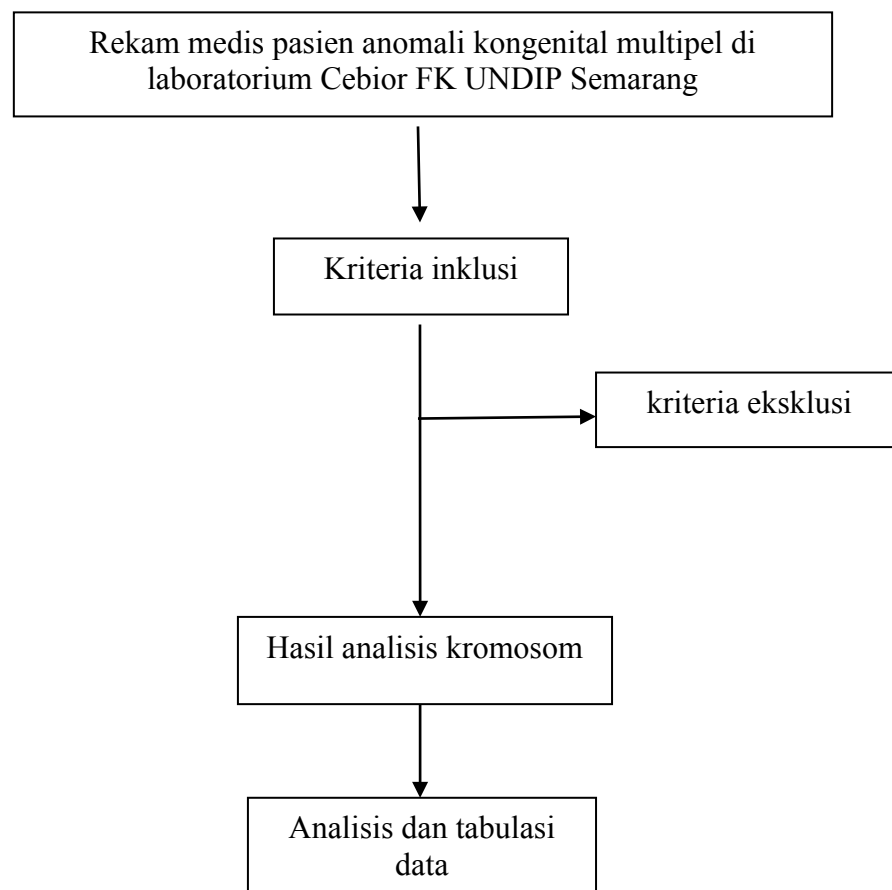
4.8 Prosedur Laporan/ Diagnosis⁴⁴

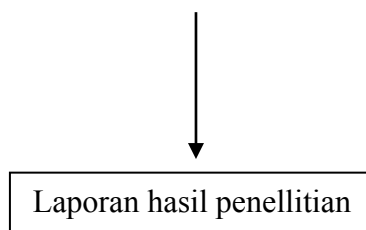
Cara melaporkan bentuk atau konstitusi kromosom adalah mengikuti cara yang diharuskan oleh ISCN 2005 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). Standar penulisan konstitusi kromosom adalah pertama kali tulis jumlah kromosom kemudian diikuti koma dan jenis kromosom seks, diikuti koma lagi dan selanjutnya jenis kelainan struktural (bila terdapat kelainan struktural). Bila pada kelainan kromosom yang melibatkan 2 kromosom maka ditulis jenis kromosom secara urut nomer yang kecil.

Semua metafase yang sudah dianalisis difoto dengan menggunakan kamerayang dipasang pada mikroskop. Software Leica membantu mengurutkan kromosom sesuai dengan urutan-urutan nomornya, dan hasil kariotiping dirapihkan pada form kariotiping yang telah tersedia.

4.9 Alur Penelitian

Gambar 4. Diagram alur penelitian





4.10 Analisis Data

Data yang terkumpul akan diproses dan diolah dengan menggunakan program *SPSS For Windows* kemudian akan disajikan dalam bentuk tabel dan diagram serta dilakukan analisis dengan cara deskriptif untuk mengetahui distribusi hasil analisis kromosom dan distribusi hasil kelainan kromosom pasien anomali kongenital multipel di Semarang. Data output dan analisisnya akan dibahas dan disimpulkan pada artikel berdasarkan referensi dari jurnal maupun sumber lainnya.

4.11 Etika Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peneliti akan mengajukan permohonan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.