

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### A. Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah observasional analitik dengan rancangan *unmatched case control*. Karakteristik tertentu dari kasus tidak disesuaikan dengan karakteristik kontrol. Penelitian ini menelaah peran faktor risiko (polimorfisme gen *MTHFR* C665T) dalam kejadian efek (anemia makrositik) pada penderita terinfeksi HIV (etnis Jawa) yang mendapat terapi *zidovudine*.

### B. Subjek Penelitian

#### 1. Populasi

##### a. Populasi Target

Penderita terinfeksi HIV dewasa yang mendapat terapi *zidovudine*.

##### b. Populasi Terjangkau

Penderita terinfeksi HIV yang berobat di Balkesmas Semarang, RSI Sultan Agung Semarang (RSISA), RSUP Dr. Kariadi Semarang (RSDK), RS Pantiwilasa Semarang, RSUD Tugurejo Semarang, RSUD RA Kartini Jepara, RSUD RAA Soewondo Pati, RSUD dr. Loekmono Hadi Kudus, RSUD Sunan Kalijaga Demak, RSUD Dr. R. Soedjati Grobogan, RSUD Dr. H. Soewondo Kendal, dan Puskesmas Halmahera Semarang sejumlah 503 penderita pada tahun 2018.

#### 2. Subjek

Subjek adalah bagian dari populasi terjangkau yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi (Sastroasmoro., 2016).

##### a. Kriteria Inklusi Subjek sebagai Kasus

- Dewasa (usia 20 sampai 59 tahun) (InfoDATIN., 2014; InfoDATIN., 2016; WHO., 2013; WHO., 2010)
- Mendapat terapi rejimen mengandung *zidovudine*  $\geq 4$  minggu. Kriteria lama pemakaian *zidovudine*  $\geq 4$  minggu sesuai hasil penelitian terdahulu bahwa anemia pada pemakaian *zidovudine* dapat terjadi mulai 4 minggu setelah terapi *zidovudine* (Kiragga., 2010).

*commit to user*

- Kadar Hb wanita  $<12$  g/dL, tidak sedang hamil, kadar Hb laki-laki  $<13$ g/dL. Kadar Hb sesuai dengan kriteria anemia (WHO, 2011).
- Nilai MCV  $> 96$  fL (Oririkorang *et al.*, 2016)
- Etnis Jawa.

**b. Kriteria Inklusi Subjek sebagai Kontrol**

- Dewasa (usia 20 sampai 59 tahun).
- Mendapat terapi rejimen mengandung *zidovudine*  $\geq 4$  minggu.
- Kadar Hb wanita  $\geq 12$  g/dL, tidak sedang hamil, kadar Hb laki-laki  $\geq 13$ g/dL.
- Etnis Jawa.

**c. Kriteria Eksklusi Subjek**

- Alkoholisme.
- Penggunaan obat-obatan (antikonvulsan dan kemoterapi).
- Hipotiroid.
- Sirosis hepatis dan hepatitis alkoholik.
- Hemodialisis.
- Sindroma mielodisplasia.
- Anemia aplastik.
- Penyakit ginjal kronik.
- Tidak bersedia menjadi responden (tidak menandatangani *informed consent*)

Kriteria eksklusi didapat dari wawancara dan data sekunder dalam catatan medis pasien.

**d. Teknik Sampling**

Teknik sampling yang digunakan untuk pemilihan kasus dan kontrol adalah *consecutive sampling*, yaitu semua subjek yang datang berobat pada 12 fasyankes yang telah ditentukan dan memenuhi kriteria inklusi sebagai kasus dan kontrol dimasukkan dalam penelitian sampai jumlah subjek yang diperlukan terpenuhi (Sastroasmoro., 2016). Subjek sebagai kasus dan kontrol diambil berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium

hematologi (kadar Hb dan nilai MCV), serta data dari catatan medik 12 fasyankes yang sudah ditetapkan.

#### e. Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus: (Dahlan., 2017)

$$n1 = n2 = \frac{(Z\alpha\sqrt{2PQ} + Z\beta\sqrt{P1Q1 + P2Q2})^2}{(P1 - P2)^2}$$

Proporsi anemia pada HIV: 77% dan *Odds Ratio* (OR) dari penelitian sebelumnya diperoleh 2,91 (Johannessen *et al.*, 2011). Peneliti menetapkan kesalahan tipe 1 ( $\alpha$ ) sebesar 5% dan kesalahan tipe 2 ( $\beta$ ) sebesar 20%. (Dahlan., 2017)

$n1$  : penderita terinfeksi HIV dengan anemia makrositik  
 $n2$  : penderita terinfeksi HIV tanpa anemia  
 $P2$  : perkiraan proporsi anemia pada penderita terinfeksi HIV = 77%  
 $Q2$  :  $1 - P2 = 23\%$   
 $P1 - P2$  : 14%  
 $P1$  : 91%  
 $Q1$  :  $1 - 91\% = 9\%$   
 $P$  :  $\frac{1}{2} (P1 + P2) = \frac{1}{2} (91\% + 77\%) = 84\%$   
 $Q$  :  $1 - P = 16\%$   
 $\alpha$  : 0,05 untuk interval kepercayaan 95%  
 $Z\alpha$  : 1,65  
 $Z\beta$  : Power = 80%

Dari rumus di atas didapatkan jumlah subjek minimal  $n1 = n2 = 106,33 =$  dibulatkan menjadi 106 subjek per kelompok.

Polimorfisme adalah variasi alami dari gen, sekuens DNA, atau kromosom yang tidak menyebabkan efek pada individu dan terjadi dalam jumlah yang cukup besar pada populasi. Polimorfisme dapat dideteksi pada >1% populasi yaitu >1 dari 100 individu (Ismail & Essawi., 2012; Keats & Sherman., 2013). Subjek pada penelitian ini berjumlah 232 subjek yang

terdiri dari 116 subjek sebagai kelompok kontrol dan 116 subjek sebagai kelompok kasus.

### C. Variabel penelitian

#### 1. Identifikasi Variabel Penelitian

##### a. Variabel Bebas

Polimorfisme gen *MTHFR* C665T

##### b. Variabel Terikat

Anemia makrositik

##### c. Variabel Antara

- Kadar homosistein
- Kadar MMA

##### d. Variabel *Co-variati*

Pemakaian *zidovudine*

#### 2. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi operasional	Satuan	Skala Data
<b>Polimorfisme <i>MTHFR</i> C665T</b>	SNPs yang ditandai dengan adanya perubahan basa nukleotida <i>cytosine</i> (C) menjadi <i>thymine</i> (T) pada urutan c.DNA ke 665 gen <i>MTHFR</i> . Identifikasi menggunakan teknik <i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length of Polymorphism</i> (PCR-RFLP). Data dikategorikan menjadi: - Ya (C665C) - Tidak (C665T, T665T)		Nominal
<b>Kadar Hb</b>	Kadar hemoglobin dalam darah subjek penelitian yang diperiksa dengan metode <i>cyanide-free hemoglobin spectrophotometry</i> .	g/dL	Rasio

	<p>Data dikategorikan berdasarkan nilai <i>cut off</i> anemia (WHO., 2011) menjadi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia (kadar Hb &lt;12 mg/dL pada wanita, kadar Hb &lt;13 mg/dL pada pria)</li> <li>- Bukan anemia</li> </ul>	
<b>Nilai MCV</b>	<p>Rata-rata volume/ ukuran eritrosit fL yang diperiksa dengan metode kalkulasi, dengan rumus <math>MCV = \frac{\text{Nilai Hematokrit} \times 10}{\text{Jumlah eritrosit per mm}^3 \text{ darah (juta)}}</math></p> <p>Nilai MCV dikategorikan menjadi: (Obirikorang et al., 2016)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- &gt;96 fL (Makrositosis)</li> <li>- ≤96 fL (Bukan makrositosis)</li> </ul>	Nominal
<b>Anemia Makrositik</b>	<p>Kondisi kadar Hb &lt;12,0 g/dL pada wanita dan &lt;13,0 g/dL pada pria dengan nilai MCV &gt;96fL.</p> <p>Data dikategorikan menjadi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anemia makrositik</li> <li>- Tidak Anemia</li> </ul>	Nominal
<b>Kadar Homosistein</b>	<p>Kadar homosistein dalam darah yang diukur dengan metode ELISA (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>).</p> <p>Data dikategorikan berdasar nilai <i>cut off</i> homosisteinemia (Fenech, 2012; Guo et al., 2015) menjadi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- &gt;10 μmol/L</li> <li>- ≤10 μmol/L</li> </ul>	Nominal.

<b>Kadar MMA</b>	Kadar MMA dalam darah yang diukur menggunakan metode ELISA ( <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> ).  Data dikategorikan sesuai dengan nilai <i>cut off</i> MMA (Jeruszka-bielak <i>et al.</i> , 2017) menjadi: - >24,8 ng/mL - ≤24,8 ng/mL	ng/mL	Nominal
<b>Pemakaian zidovudine</b>	Lama penggunaan <i>zidovudine</i> sejak awal pemakaian <i>zidovudine</i> karena terdiagnosis HIV positif hingga dilakukannya penelitian. Data didapat dari rekam medis subjek penelitian.  Data dikategorikan berdasar nilai <i>cut off</i> 6 bulan (Enawgaw <i>et al.</i> , 2014) menjadi: - >6 bulan - ≤6 bulan	Bulan	Nominal

#### D. Bahan, Instrumen, Prosedur Pemeriksaan

##### 1. Sampel Darah Vena

Darah diambil dari vena mediana cubiti sebanyak 5 cc oleh ATLM (Ahli Teknologi Laboratorium Medik) yang berkompeten dan ditampung masing-masing 2,5 cc ke dalam 1 *EDTA vacutainer* (tabung vakum tutup warna ungu) dan 1 *plain vacutainer* (tabung vakum tutup merah tanpa zat tambahan).

##### 2. Sampel DNA

DNA diekstraksi dari *buffy coat* menggunakan *Genomic DNA Mini Kit Geneaid* sebagai berikut:

*commit to user*



**Instrumen:**

- a. *Microcentrifuge tube* 1,5 ml
- b. *Micropipet* 0,5 - 10 $\mu$ l, 10 - 100 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l
- c. Tip D1000
- d. Tip D200
- e. Tip D10
- f. *Vortex mixer*
- g. *Microcentrifuge*
- h. *Waterbath*

**Bahan:**

- a. *RBC lysis buffer*
- b. *GB buffer*
- c. *Elution buffer*
- d. *Absolute Ethanol*
- e. *Wash buffer*
- f. *W-1 buffer*

**Cara ekstraksi DNA:** (Al-Batayneh *et al.*, 2018)

- a. Preparasi sampel
  - Sebanyak 200  $\mu$ l *buffy coat* dimasukkan ke dalam 1,5 ml *microcentrifuge tube*.
  - *RBC lysis buffer* sebanyak 600  $\mu$ l ditambahkan ke dalam *microcentrifuge tube* yang berisi *buffy coat*, dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tabung, kemudian diinkubasikan dalam suhu ruang selama 10 menit. Tabung dibolak-balikkan setiap 3 menit.
  - Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 16.000g selama 1 menit, kemudian supernatant dibuang sehingga tersisa *pellet*.
- b. Melisiskan Sel
  - Sebanyak 250  $\mu$ l *GB buffer* ditambahkan ke dalam larutan *pellet*, kemudian dihomogenkan.

- *RBC lysis buffer* 200  $\mu$ l ditambahkan ke dalam *microcentrifuge tube* berisi pellet, dihomogenkan/ *resuspend* atau dengan menggunakan *vortex mixer*.
- Larutan diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit, kemudian dihomogenkan tiap 3 menit.
- Sambil menunggu inkubasi, larutan *elution buffer* (sesuai kebutuhan, @sampel 100  $\mu$ l) dihangatkan pada suhu 60 °C.

c. *DNA Binding*

- Ditambahkan 250  $\mu$ l etanol absolut, kemudian tabung dibolak balik sampai larutan homogen selama 10 detik.
- Larutan dipindahkan ke dalam *GD column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 16.000xg selama 5 menit.
- Larutan dibuang dari *collection tube* 2 ml, kemudian pindahkan *GD column collection tube* 2 ml yang baru.

d. *Washing*

- *W1 Buffer* sebanyak 400  $\mu$ l dimasukkan ke dalam *GD column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 16.000xg selama 30 detik.
- Bagian larutan yang ada pada *collection tube* 2ml dibuang kemudian *collection tube* 2ml dipasang kembali ke *GD column*.
- Sebanyak 600  $\mu$ l *Wash Buffer* dimasukkan ke dalam *GD column*.
- Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 16.000xg selama 30 detik, kemudian dibuang bagian larutan yang mengalir ke dalam *collection tube* 2ml.
- *GD column* ditempatkan kembali ke dalam *collection tube* 2ml.
- Dilakukan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 16.000xg selama 3 menit, tujuannya untuk mengeringkan *column matrix*.

e. *DNA Elution*

- *GD column* yang kering dipindah ke dalam tabung 1,5 ml *microcentrifuge tube* yang steril.



- Sebanyak 50  $\mu$ l *elution buffer* yang sudah dihangatkan ditambahkan pada bagian tengah *column matrix*, didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang untuk memastikan *elution buffer* terserap secara sempurna.
- Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 16.000xg selama 30 detik untuk mendapatkan DNA yang terpurifikasi.

f. *Kuantifikasi DNA*

- Konsentrasi DNA diukur menggunakan Nanovue Plus GE Healthcare Bio Sciences AB (UK) 28-9569-66.

3. *Polymerase Chain Reaction*

**Instrumen**

- Mesin PCR merk ProFlex
- Vortex Mixer*
- Minicentrifuge*
- Micropipette P2, P10, P200, P1000*
- PCR tube 0,2 ml, tip D10, D200, D1000*
- Kit PCR Promega*
- Primer MTHFR C665T*

**Cara Kerja**

Gene *MTHFR* diamplifikasi menggunakan mesin PCR ProFlex dengan total volume 25  $\mu$ l. Tiap tube terdiri atas DNA template sebanyak 2  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O sebanyak 8,9  $\mu$ l, *Go Taq Green Master Mix* sebanyak 12,5  $\mu$ l, primer *forward* dan *reverse* konsentrasi 10uM sebanyak 2  $\mu$ l. Tabel 3 menunjukkan kondisi siklus termal pada proses PCR gen *MTHFR*.

Tabel 3. Siklus Termal Proses PCR pada gen *MTHFR*

Program	Temperature (°C)	Waktu (menit)	Siklus
<i>Initial denaturation</i>	95	2	1x
<i>Denaturation</i>	95	0,5	35x
<i>Annealing</i>	64	0,5	
<i>Extention</i>	72	1	
<i>Final extention</i>	72	5	1x
<i>PCR final step</i>	4	$\infty$	1x

#### 4. Elektroforesis gel agarosa 2%

##### Alat dan bahan habis pakai :

- a. Timbangan analitik
- b. Tabung *Erlenmeyer*
- c. *Microwave*
- d. Gelas Ukur
- e. Cetakan gel dan sisiran untuk sumuran
- f. Mikropipet P10, P20
- g. Mesin Elektroforesis
- h. Mesin Foto Gel merek G-Box
- i. Komputer
- j. *TAE IX*
- k. Kertas Timbang
- l. Agarosa
- m. *Florosafe*
- n. *DNA ladder*
- o. Tip D200, Tip D10

##### Prosedur :

- a. Produk hasil PCR di *running* pada gel agarosa 2% pada mesin elektroforesis dengan voltase 100 volt selama 37 menit
- b. Pembuatan gel 2%
  - Sebanyak 20 atau 40 ml *buffer TAE IX* diambil menggunakan gelas ukur, kemudian dituang ke dalam tabung *Erlenmeyer*.
  - Agarosa sebanyak 4 mg atau 8 mg ditimbang menggunakan kertas timbang.
  - Agarosa dimasukkan kedalam tabung *Erlenmeyer* yang berisi *buffer TAE IX*, dicampurkan, kemudian disiapkan cetakan gel dengan sisirannya.
  - Agarosa dipanaskan menggunakan *microwave* sampai larut, didiamkan pada suhu ruang sampai hangat-hangat kuku.
  - *Florosafe* sebanyak 2 ul ditambahkan, dicampur sampai homogen.

- Larutan gel dituangkan ke dalam cetakan gel.
- Gelembung udara dihilangkan dari gel.
- Didiamkan sampai gel mengeras.

c. Elektroforesis

- *Buffer TAE IX* disiapkan ke dalam *chamber* elektroforesis sebanyak 500 ml.
- Gel dilepaskan dari cetakan.
- Gel dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi *TAE IX*.
- Sebanyak 2,5  $\mu$ l produk PCR dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran.
- *DNA ladder* sebanyak 2,5  $\mu$ l dimasukkan ke dalam salah satu sumuran.
- *Chamber* dipasang ke *power supply*.
- Produk di-*running* pada 100 volt selama 37 menit.
- Mesin elektroforesis dimatikan.
- Gel diangkat dari *chamber*.
- Gel dimasukkan ke dalam mesin foto gel.
- Dilakukan pengambilan foto dan gambar disimpan.

- d. Jika hasil elektroforesis menunjukkan *band* yang sesuai target pada 294 bp maka sisa produk PCR dilanjutkan pada proses selanjutnya yaitu digesti RFLP menggunakan enzim restriksi *HinF1*.

## 5. Digesti RFLP Polimorfisme *MTHFR* C665T

### Alat dan bahan habis pakai

- a. Mesin Waterbath 37 °C.
- b. *Micropipete*, *P10*, *P200*, *P20*, *P1000*.
- c. Tabung microsentrifus 1,5 ml.
- d. *Tip D10*, *D200*, *D1000*.

### Cara Kerja

- a. Proses digesti polimorfisme gen *MTHFR* C665T menggunakan enzim *HinF1* dengan total volum 25  $\mu$ l. Tiap *tube* terdiri dari dH<sub>2</sub>O sebanyak 14,5  $\mu$ l, 10x NE *buffer* CS 2,5  $\mu$ l, enzim *HinF1* sebanyak 0,5  $\mu$ l, PP sebanyak 7,5  $\mu$ l. Sampel diinkubasi dalam suhu 37°C selama 1 jam.

b. Sepasang *primer forward* 5'-CCT TGA ACA GGT GGA GGC CAG-3' dan *reverse* 5'-GCG GTG AGA GTG GGG TGG AG-3' untuk mengamplifikasi 294 bp regio target yang melingkupi lokasi *MTHFR* C665T (Elhawary *et al.*, 2015, Ni *et al.*, 2017). Reaksi terdiri dari: *Taq Extra HotStart Readymix* 12,5 µl; 10pg *forward* dan *reverse primer* sebanyak 1 µl; 60-100ng DNA sebanyak 1 µl dan dHPLC H<sub>2</sub>O hingga 25 µl. Pengaturan PCR yaitu 95°C selama 2:00 diikuti 35 siklus 95°C selama 00:30 dan 64°C selama 0:30 diakhiri dengan *final extension* pada 72°C selama 6:00. Elektroforesis produk PCR dilakukan pada gel agarosa 3% dengan *staining* *florosafe* menggunakan voltase 100 volt/cm selama 37 menit (Al-Batayneh *et al.*, 2018).

#### 6. Elektroforesis gel agarosa 3%

##### Alat dan bahan habis pakai

- a. Timbangan analitik
- b. Tabung *Erlenmeyer*
- c. *Microwave*
- d. Gelas Ukur
- e. Cetakan gel dan sisiran untuk sumuran
- f. Mikropipet P10, P20
- g. Mesin Elektroforesis
- h. Mesin Foto Gel merek G-Box
- i. Komputer
- j. *TAE 1X*
- k. Kertas Timbang
- l. Agarosa
- m. *Florosafe*
- n. *DNA ladder*
- o. Tip D200, Tip D10

##### Cara Kerja

- a. Produk hasil Digesti RFLP di *running* pada gel elektroforesis 3 % dengan voltase 100 volt selama 37 menit.

b. Pembuatan gel agarosa 3%

- *Buffer TAE IX* diambil sebanyak 20 atau 40 ml menggunakan gelas ukur, dituangkan dalam tabung *Erlenmeyer*.
- Sebanyak 0.6 gr atau 1,2 gr agarosa ditimbang menggunakan kertas timbang.
- Agarosa dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer* yang berisis *buffer TAE IX*, dicampur.
- Cetakan gel disiapkan dengan sisirannya.
- Campuran agarosa dengan *buffer TAE IX* dipanaskan menggunakan *microwave* sampai agarosa larut, didiamkan pada suhu ruang sampai hangat-hangat kuku.
- *Florosafe* ditambahkan sebanyak 2  $\mu$ l, dicampurkan sampai homogen.
- Larutan gel dituangkan ke dalam cetakan gel.
- Gelembung udara dihilangkan dari gel.
- Didiamkan sampai gel mengeras.

c. Elektroforesis

- *Buffer TAE IX* disiapkan ke dalam *chamber* elektroforesis sebanyak 500 ml.
- Gel dilepaskan dari cetakan.
- Gel dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi *TAE IX*.
- Sebanyak 25  $\mu$ l produk digesti RFLP dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran.
- Sebanyak 5  $\mu$ l produk PCR dimasukkan ke dalam salah satu sumuran sebagai penanda ukuran *band* yang tidak terpotong (UC = *uncut*).
- *DNA ladder* sebanyak 3  $\mu$ l dimasukkan ke dalam salah satu sumuran.
- *Chamber* dipasang ke *power supply*.
- Produk di-*running* pada 100 volt selama 37 menit.
- Mesin elektroforesis dimatikan.
- Gel diangkat dari *chamber* selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin foto gel.
- Diambil foto dan gambar disimpan.



## 7. Identifikasi Genotip *MTHFR* C665T

PCR produk diinkubasi dengan 2U enzim *Hinf I* pada suhu 37°C selama 1 jam. Enzim akan mendigesti produk PCR gen *MTHFR* (294 bp) menjadi 2 fragmen yang berukuran 168 bp dan 126 bp, bila terdapat alel T. Variasi genotip polimorfisme c.665C>T gen *MTHFR* yang didapatkan yaitu CC (294 bp), CT (294 bp, 168 bp dan 126 bp) dan TT (168 bp dan 126 bp) (Al-shahrani *et al.*, 2016). Beberapa sampel DNA dilakukan pemeriksaan sekuensing sebagai konfirmasi hasil identifikasi genotip *MTHFR* C665T menggunakan metode RLFP yang dilakukan di Genetika Science.

## 8. Pemeriksaan Kadar MMA Serum

MMA serum diperiksa menggunakan metoda ELISA (Yasar *et al.*, 2012) menggunakan reagen dari MyBioSource (MyBioSource., 2016)

### Bahan dan instrumen:

- a. *Plate*
- b. Larutan standar
- c. Sampel
- d. *Sample diluent*
- e. *Diluent A* dan B
- f. Reagen A dan B
- g. *Buffer* pencuci
- h. Substrat
- i. *Stop solution*
- j. *Plate sealer*
- k. Spektrofotometer

### Preparasi reagen:

- a. Reagen A dan reagen B: Masing-masing reagen A dan reagen B diencerkan menggunakan masing-masing *diluent A* dan *diluent B* dengan perbandingan reagen : *diluent* = 1 : 100
- b. *Buffer* pencuci: Jika terbentuk kristal pada konsentrat, konsentrat dihangatkan pada suhu ruang dan campur secara *gentle* hingga kristal

*commit to user*



mencair. Sebanyak 30 ml *buffer* diencerkan pencuci menggunakan akuabides hingga volume *buffer* pencuci menjadi 750 ml.

#### **Prosedur pemeriksaan:**

- a. Masing-masing larutan standart, blanko, dan sampel ditambahkan sebanyak 50 µl pada setiap sumuran (*well*).
- b. Segera ditambahkan 50 µl reagen A pada setiap sumuran. Sumuran ditutup dengan *plate sealer*. *Plate* ditekan dengan lembut untuk memastikan pencampuran menyeluruh. Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.
- c. Setiap sumuran diaspirasi dan dicuci, proses diulang sebanyak tiga kali dengan total tiga kali pencucian. Pencucian dilakukan dengan cara mengisi setiap sumuran dengan *buffer* pencuci (sekitar 400 µl) menggunakan botol penyemprot, pipet *multi channel*, *manifold dispenser*, atau *autowasher*, dan dibiarkan selama 1-2 menit. Setelah pencucian terakhir, sisa *buffer* dibuang pencuci dengan cara aspirasi atau *decanting*. *Plate* dibalikkan dan pada kertas tisu.
- d. Sebanyak 100 µl reagen B ditambahkan ke setiap sumuran, kemudian ditutup dengan *plate sealer* yang baru. Inkubasi dilakukan selama pada suhu 37°C 45 menit.
- e. Proses aspirasi/pencucian diulang sebanyak lima kali seperti langkah c.
- f. Sebanyak 90 µl larutan substrat ditambahkan ke setiap sumuran, kemudian ditutup dengan *plate sealer* yang baru. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 15-30 menit. Sumuran dijaga dari paparan cahaya.
- g. Sebanyak 50 µl *stop solution* ditambahkan ke setiap sumuran. Jika perubahan warna tidak terjadi secara seragam, secara halus *plate* ditekan untuk memastikan pencampuran menyeluruh.
- h. Absorbansi dibaca tiap sumuran pada spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 450 nm.

#### **9. Pemeriksaan Kadar Homositein Serum**

Metode pemeriksaan yang digunakan adalah ELISA kompetitif sesuai dengan penelitian terdahulu (Liu *et al.*, 2017). Reagen yang digunakan untuk

memeriksa homosistein adalah Axis *Homocysteine Enzyme Immunoassay* (Axis., 2015).

**Bahan dan Instrumen :**

- a. Axis *Homocysteine Enzyme Immunoassay Kit*
- b. Mikropipet dan tips disposabel *multichanel* (10 – 1.000  $\mu$ l)
- c. Tabung 100 ml dan 1 liter
- d. *Distilled/ deionized water*
- e. Kertas absorben
- f. Inkubator 37 derajat Celcius
- g. *Software* analisis data dan pembuatan grafik
- h. Serum
- i. *Adjustable single channel micropipettes* 10  $\mu$ L - 1000  $\mu$ L dengan *disposable tips*
- j. *Adjustable multichannel micropipette* 10  $\mu$ L - 1000  $\mu$ L dengan *disposable tips*
- k. *Multichannel micropipette reservoir*
- l. *Microplate reader* dengan kemampuan membaca pada panjang gelombang 340nm.

**Prosedur Pemeriksaan:**

- a. Sampel harus dibuat dalam waktu kurang dari 1 jam sebelum pemeriksaan dimulai. Volume yang dibutuhkan untuk setiap 10 sampel (tanpa memperhitungkan *dead volume*) adalah sebagai berikut:
  - 4,5 ml Reagen A
  - 0,25 ml Reagen B
  - 0,25 ml Reagen C (campuran)
- b. Kalibrator dan sampel/kontrol diencerkan pada plastik atau tabung kaca dengan campuran sebagai berikut:
  - 25  $\mu$ L kalibrator/sampel/kontrol dicampur dengan 500  $\mu$ L sampel.
  - Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit (tabung ditutup atau dibungkus dengan parafilm selama inkubasi).
  - Ditambahkan 500  $\mu$ L Reagen D, kemudian dicampurkan dengan baik.

- Dilakukan inkubasi pada suhu 18-25<sup>0</sup>C selama 15 menit.
- Ditambahkan 500  $\mu$ L Reagen E, dan dicampurkan dengan baik, selanjutnya diinkubasi pada suhu 18-25<sup>0</sup>C selama 5 menit.
- *Well* diisi pada strip mikrotiter yang telah dilapisi SAH dengan 25  $\mu$ L kalibrator/sampel/kontrol yang sudah diencerkan.
- Sebanyak 200  $\mu$ L Reagen F ditambahkan pada setiap *well*.
- Dilakukan inkubasi dalam suhu 18-25<sup>0</sup>C selama 30 menit secara tertutup.
- *Well* dicuci dengan larutan *buffer wash* yang telah diencerkan (*buff wash* + air murni) 400  $\mu$ L sebanyak 3 kali. Jika dibutuhkan pencucian secara manual, pencucian dilakukan sebanyak 3 kali dengan volume 350  $\mu$ L dibandingkan 3 x 450  $\mu$ L.
- Setelah dilakukan pencucian, *well* dikeringkan pada kertas tisu.
- Sebanyak 100  $\mu$ L Reagen G ditambahkan pada setiap *well*.
- Dilakukan inkubasi dalam suhu 18-25<sup>0</sup>C selama 20 menit.
- *Well* dicuci dengan larutan *buffer wash* yang telah diencerkan (*buff wash* + air murni) 400  $\mu$ L sebanyak 3 kali. Jika dibutuhkan pencucian secara manual, pencucian lakukan sebanyak 3 kali dengan volume 350  $\mu$ L dibandingkan 3 x 450  $\mu$ L.
- Setelah dilakukan pencucian, *well* dikeringkan pada kertas tisu.
- Sebanyak 100  $\mu$ L Reagen H ditambahkan pada setiap *well*.
- Dilakukan inkubasi dalam suhu 18-25<sup>0</sup>C selama 10 menit.
- Sebanyak 100  $\mu$ L Reagen S ditambahkan pada setiap *well*.
- *Well* dikocok dan dibaca pada gelombang 450 nm selama 15 menit (pengocok otomatis lebih disarankan untuk memastikan sampel terkocok dengan baik).

## E. Lokasi dan Waktu Penelitian

### 1. Lokasi Penelitian

- a. Balkesmas Kota Semarang, RSI Sultan Agung Semarang (RSISA), RSUP Dr.Kariadi Semarang (RSDK), RS Pantiwilasa Semarang, RSUD Tugurejo Semarang, RSUD RA Kartini Jepara, RSUD RAA Soewondo

Pati, RSUD dr. Loekmono Hadi Kudus, RSUD Sunan Kalijaga Demak, RSUD Dr. R. Soedjati Grobogan, RSUD Dr. H. Soewondo Kendal, dan Puskesmas Halmahera Semarang.

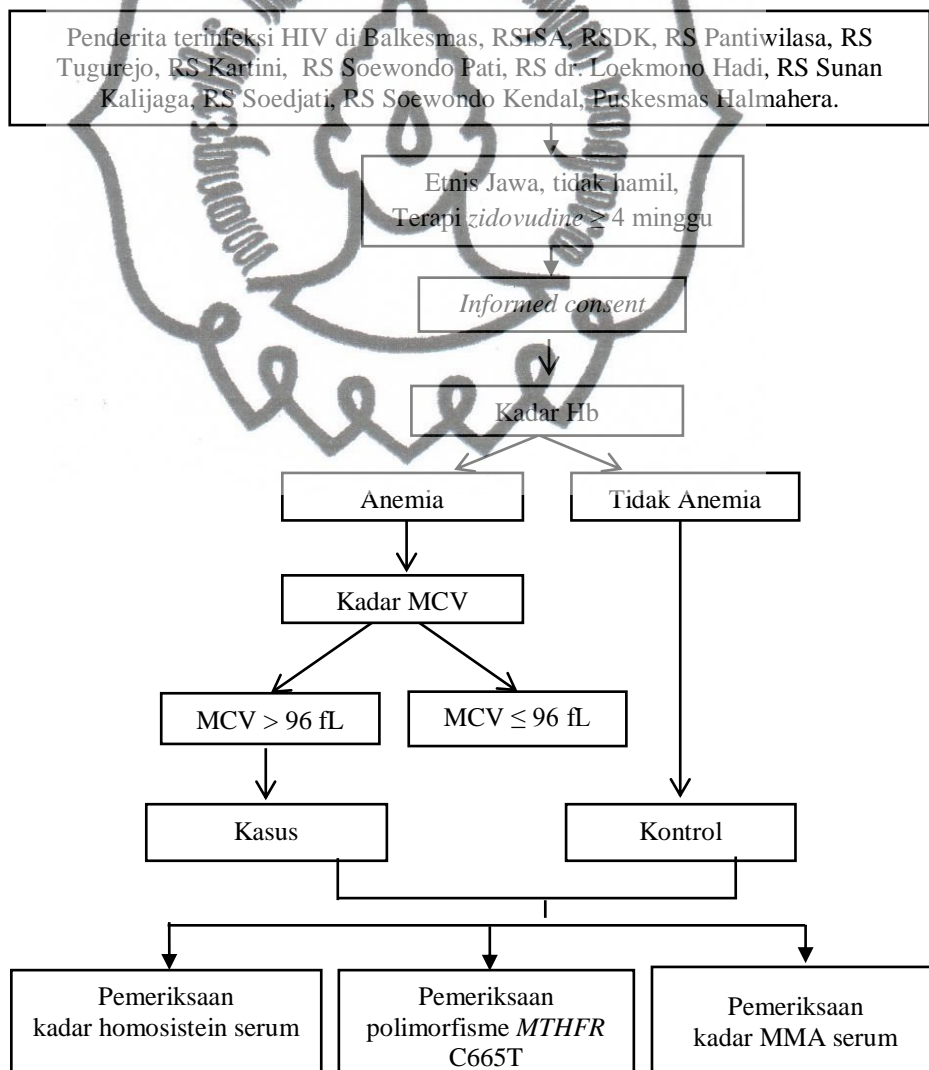
b. Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

## 2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan setelah kelayakan etik disetujui Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Pengambilan dan analisis sampel dilakukan pada Mei - Desember 2018.

## F. Cara Pengambilan/Pengumpulan Data



Gambar 14. Cara pengambilan/pengumpulan data

### G. Prosedur Pengolahan dan Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan karakteristik subjek penelitian. Variabel yang diteliti meliputi: karakteristik subjek penelitian (usia, jenis kelamin, status marital, tingkat pendidikan, perilaku berisiko, status gizi, lama pemakaian *zidovudine*) dan hasil pemeriksaan laboratorium (kadar Hb, nilai MCV, polimorfisme gen *MTHFR* C665T, kadar homosistein/Hcy, kadar MMA). Analisis bivariat dilakukan untuk mengetahui variabel yang berpengaruh dalam kejadian anemia makrositik pada penderita terinfeksi HIV yang mendapat terapi *zidovudine*. Analisis *Chi-square* digunakan untuk mengetahui hubungan variabel yang berskala kategorik (jenis kelamin, usia, status marital, tingkat pendidikan, perilaku berisiko, IMT (status gizi), lama pemakaian *zidovudine*, kadar Hb, MCV, kadar Hcy, polimorfisme gen *MTHFR* C665T). Analisis *Fischer exact* digunakan untuk menguji variabel kadar MMA dan Mann Whitney U digunakan untuk menguji variabel jenis pekerjaan dan genotip karena tidak memenuhi syarat uji *Chi-square* (*expected count* >20%). Selain itu, untuk mengetahui karakteristik subjek penelitian yang berperan sebagai faktor risiko terhadap variabel terikat maka dilakukan analisis multivariat dengan uji regresi logistik ganda. Analisis multivariat dilakukan terhadap karakteristik subjek penelitian yang memiliki nilai  $p < 0,25$  pada analisis bivariat yaitu usia, tingkat pendidikan, pekerjaan, lama pemakaian *zidovudine*, dan kadar homosistein (Sastroasmoro., 2016; Dahlan., 2017).

### H. Etika Penelitian

Penelitian dan hal-hal yang terkait dengan proses pengambilan data dilakukan berdasarkan kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dengan no.: 123/EC/FK-RSDK/III/2018, serta persetujuan dari 12 fasyankes yang telah ditentukan. Persetujuan responden penelitian diperoleh dari *informed consent* tertulis. Informasi yang diperoleh dijamin kerahasiaannya.