

BAB III

METODE DAN CARA PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional* (potong lintang) untuk menganalisis korelasi NT-proBNP dan SGPT pada pasien hepatitis B kronik dengan sirosis hepatis.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSDM yang dimulai pada bulan Mei – Juni 2019.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi Penelitian

Populasi target dalam penelitian ini adalah semua pasien hepatitis B kronik di RSDM. Populasi terjangkau adalah pasien hepatitis B kronik dengan sirosis hepatis dan tanpa sirosis hepatis yang menjalani rawat jalan dan rawat inap di bagian Gastrohepatoenterologi RSDM di Surakarta, mulai bulan Mei – Juni 2019, sesuai kriteria inklusi dan eksklusi dan setuju untuk ikut serta dalam penelitian ditunjukkan dengan menandatangani *informed consent*.

2. Besar Sampel Penelitian

Perkiraan besar sampel berdasarkan rumus besar sampel untuk rancangan penelitian analisis korelatif menurut Dahlan (2009) yaitu :

$$N = \left[\frac{Z\alpha + Z\beta}{0,5 \ln [(1+r) / (1-r)]} \right]^2 + 3$$

Kesalahan tipe I ditetapkan sebesar 5% sehingga $Z\alpha = 1,64$. Kesalahan tipe II ditetapkan sebesar 10%, maka $Z\beta = 1,28$ (Dahlan, 2009). Penelitian Cozma *et al.* (2018) mengenai NT-proBNP pada pasien *Chronic Liver Disease* mendapatkan korelasi yang signifikan antara NT-proBNP dengan *prothrombin* dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,546, dengan menggunakan rumus didapatkan besar sampel minimal yang diperlukan adalah 26 menggunakan teknik pengambilan *consecutive sampling*, jadi besar sampel pada pemeriksaan ini adalah sebanyak 62 sampel.

3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi penelitian ini adalah :

- i. Pasien rawat inap dan rawat jalan yang di diagnosis hepatitis B kronik dengan sirosis hepatis dan tanpa sirosis hepatis
- ii. Pasien berusia 18 – 75 tahun, laki-laki dan perempuan
- iii. Bersedia mengikuti penelitian ini dengan menandatangani *informed consent*

b. Kriteria Eksklusi penelitian ini adalah :

- i. Pasien dengan riwayat peminum alkohol
- ii. Pasien dengan riwayat penyakit jantung sebelumnya
- iii. Pasien dengan riwayat penyakit paru sebelumnya
- iv. Pasien dengan riwayat penyakit hepatitis C

D. Bahan dan Alat

1. Bahan

- a. Sampel berupa serum

- b. *Human NT-proBNP ELISA kit*
- c. Kit reagen SGPT *Advia Chemistry Systems, Bayer HealthCare LLC*

2. Alat

- a. *Microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm
- b. *Advia 1800 Chemistry System*
- c. Alat sentrifus
- d. Tabung *vacutainer* tanpa antikoagulan
- e. *High-precision transferpettor* atau mikropipet ukuran 100 µl
- f. Tips *disposable*
- g. *Cup sample*
- h. *Vortex*
- i. *Distilled water*
- j. Sarung tangan *disposable*

E. Cara, Prosedur dan Alur Penelitian

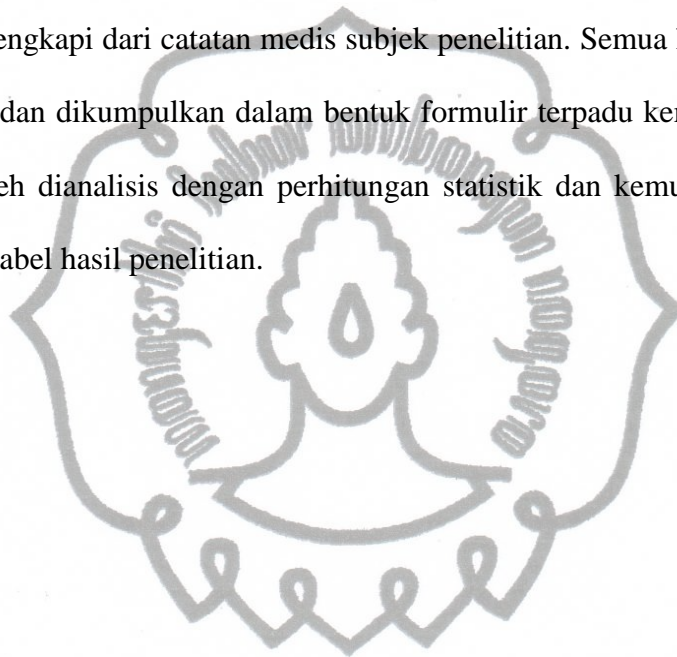
1. Cara Penelitian

Subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dengan diagnosis hepatitis B kronik dengan sirosis hepatis dan tanpa sirosis hepatis di poli rawat jalan dan ruang rawat inap RSDM dipilih secara konsekutif atau berurutan. Sampel darah vena tanpa antikoagulan diambil sebanyak 6 cc darah untuk pemeriksaan kadar NT-proBNP dan SGPT. Sampel darah vena disentrifugasi dengan kecepatan 4000 *revolutions per minute* (rpm) selama 10 menit untuk memisahkan serum dari komponen darah untuk kemudian

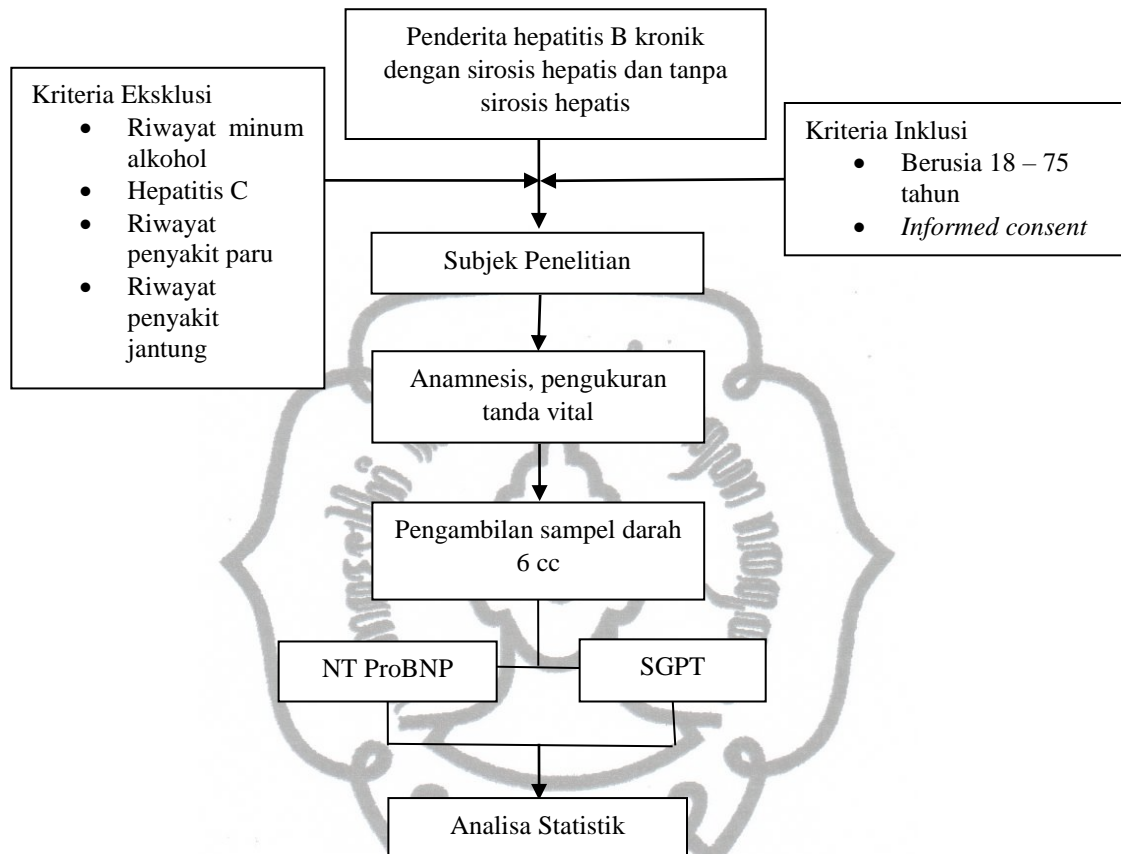
ditampung dalam *aliquot* dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu - 80°C sampai terkumpul seluruh sampel hingga pemeriksaan dilakukan.

2. Prosedur Penelitian

Identitas dan data subjek penelitian dicatat dalam formulir penelitian, dilakukan pengisian *informed consent* dan subjek dianamnesis. Data diperiksa dan dilengkapi dari catatan medis subjek penelitian. Semua hasil pemeriksaan dicatat dan dikumpulkan dalam bentuk formulir terpadu kemudian data yang diperoleh dianalisis dengan perhitungan statistik dan kemudian ditampilkan dalam tabel hasil penelitian.



3. Skema Alur Penelitian



Gambar 9. Skema alur penelitian

F. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel : NT ProBNP dan SGPT

G. Definisi Operasional Variabel

1. Kadar NT-proBNP

- a. Definisi : NT-proBNP adalah salah satu hormon yang termasuk kelompok *natriuretic peptide* (NP) dan berada dalam bentuk tidak aktif yang

merupakan pemecahan pro BNP (108 asam amino) serta memiliki 76 asam amino (Weber dan Hamm, 2006).

- b. Alat ukur : *Human NT-proBNP immunoassay* dengan metode ELISA (*microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm)
- c. Satuan : pg/ml
- d. Skala pengukuran : skala numerik
- e. Nilai rujukan : berdasarkan rekomendasi FDA usia <75 tahun adalah 125 pg/ml, dan usia > 75 tahun 450 pg/ml (Tietz, 2015)

2. SGPT

- a. Definisi : enzim hepatosit yang mengkatalisa perubahan *alanine* menjadi piruvat yang digunakan sebagai marker kerusakan hepar (Kaplan dan Pesce, 2010).
- b. Alat ukur : *Advia 1800 Chemical Analyzer*
- c. Metode : IFCC yang dimodifikasi
- d. Satuan : U/L
- e. Skala pengukuran : skala numerik
- f. Nilai rujukan : 10 – 49 U/L (Anonim, 2007)

H. Prosedur Kerja Laboratorium

1. *Phlebotomy* (WHO, 2010)

a. Persiapan

Yang harus disiapkan adalah tabung *vacutainer* tanpa koagulan, jarum, *needle holder*, sarung tangan, *handsrub*, *alcohol swab*, *tourniquet*, kasa/kapas steril dan plester.

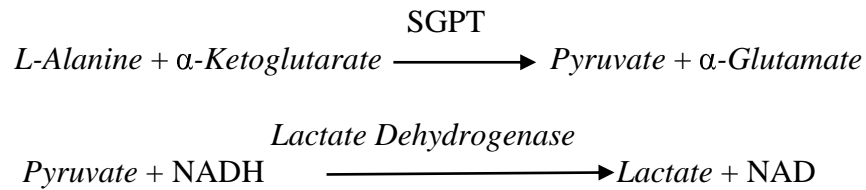
b. Langkah-langkah

- Pastikan identitas pasien benar dengan minimal 2 identitas : nama, nomor rekam medis atau tanggal lahir
- Cuci tangan dan gunakan sarung tangan
- Cari vena yang cukup besar, lurus dan tidak ada tanda peradangan pada lengan pasien. Luruskan lengan dan ekstensikan dengan bantuan tangan operator atau diganjal dengan telapak tangan menghadap ke atas. Kepalkan tangan pasien.
- Desinfeksi daerah penusukan dengan *alcohol swab* secara melingkar dari arah dalam ke luar dan keringkan selama 30 detik.
- Pada 3 jari proksimal daerah penusukan dilakukan pembendungan menggunakan *tourniquet* dengan waktu pembendungan yang tidak lebih lama dari 1 menit.
- Tutup jarum dibuka dengan cara memegang bagian tutup yang berwarna dengan 1 tangan, putar dan lepaskan bagian yang berwarna putih dengan tangan lainnya, pasang dengan cara memutar jarum pada *holder* dan putar jarum sampai rapat ke dalam *holder*.

- Lakukan penusukan vena dengan sudut 15° - 30° , bila jarum tepat masuk ke dalam vena maka akan terlihat darah masuk ke dalam jarum, kemudian fiksasi jarum tersebut.
- Masukkan tabung *vacutainer* ke dalam *holder*, dorong tabung ke jarum sampai ke ujung *holder*. Darah secara otomatis akan mengalir masuk ke dalam tabung.
- Lepaskan *tourniquet* dan kepala tangan. Tabung akan terisi darah sesuai dengan kapasitas vakum tabung. Bila masih diperlukan sampel darah, ganti tabung baru sesuai dengan *order of draw*.
- Tekan secara perlahan tepi *holder* untuk melepas tabung dari holder.
- Tempelkan kapas/kasa steril di atas jarum. Tarik jarum secara perlahan dari tempat penusukan dengan menekan kapas, dengan menggunakan ibu jari atau telunjuk pasien, tekan kapas selama 15 menit.
- Homogenisasi sampel darah beberapa menit agar *clot activator* tercampur dengan darah.
- Tutup luka tusukan dengan plester.

2. Pemeriksaan SGPT (Bayer, 2006)

- a. Metode : IFCC yang dimodifikasi
- b. Tujuan : Pengukuran kuantitatif *in vitro* untuk SGPT dalam serum dan plasma
- c. Prinsip tes : *Enzymatic activity assay*



d. Reagen :

R1 berisi : *L-Alanine* 610 mmol/L, LD (*pig heart*) $\geq 1,2$ KU/L, *Sodium azide* 0,09%

R2 berisi : α -Ketoglutarate 93 mmol/L, NADH 1,41 mmol/L, *Sodium azide* 0,09%

e. Penanganan reagen : R1 dan R2 siap pakai

f. Penyimpanan dan stabilitas

Kit yang belum dibuka stabil hingga tanggal kadaluwarsa pada suhu 2-8°C. Kit yang sudah dibuka stabil sampai 60 hari dalam pendingin alat.

g. Alat yang digunakan : Advia 1800 *automated chemistry analyzer*, *sample cup*, *cuvette*, *pipette tip*

h. Persiapan sampel :

Sampel pada pemeriksaan SGPT metode enzimatik ini dianjurkan menggunakan serum atau plasma dengan antikoagulan heparin. Pemeriksaan dianjurkan dilakukan pada hari itu juga, tetapi apabila diperlukan sampel dapat disimpan pada suhu 25°C selama 24 jam dengan penurunan kadar SGPT 10%, pada suhu -4°C dengan penurunan kadar SGPT 10% setiap 3-4 hari, pada suhu -20°C dapat

disimpan selama 7 hari, pada suhu -70°C dapat disimpan selama 1 bulan (Anonim, 2012; Panteghini dan Bais, 2012)

i. Prosedur pemeriksaan sampel :

Sampel dimasukkan ke dalam *sample cup*, diurutkan pada rak sampel. Reagen R1 dan R2 akan bereaksi dengan sampel dalam *cuvette*, kemudian dibaca dengan panjang gelombang 340/410 nm.

j. Kalibrator :

Menggunakan *fixed system factor value* (FV), berdasarkan *molar extinction coefficient* yang telah ditetapkan dari NADH pada 340 nm, disesuaikan dengan korelasi sampel pasien dengan metode referensi IFCC. Satu unit didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk membentuk NAD sebanyak satu μmol per menit.

k. Kontrol : *Biorad Lipocheck assayed chemistry control*

l. Rentang pengukuran : 0 – 1100 U/L

3. Pemeriksaan NT-proBNP (Anonim, 2015)

Penelitian ini menggunakan kit reagen NT-proBNP ELISA *kit* dari *Elabscience* yang merupakan pemeriksaan kuantitatif untuk mengukur kadar NT-proBNP serum, plasma atau cairan biologis lain dengan prinsip pemeriksaan *sandwich*-ELISA. Tiap sumuran *microplate* dilapisi antibodi spesifik Nt-proBNP dan ditambahkan sampel yang akan diperiksa pada tiap sumuran dan akan terikat dengan antibodi spesifik yang telah dilapisi pada sumuran. Langkah berikutnya antibodi *biotinylated* terikat pada kompleks

NT-proBNP-poliklonal antibodi spesifik dan enzim *avidin-horse radish peroxidase* (HRP) *conjugate* ditambahkan dan diinkubasi, dilakukan pencucian berulang untuk menghilangkan substansi yang tidak terikat, setelah pencucian ditambahkan substrat pada tiap sumuran. Reaksi substrat-enzim akan menghilang jika ditambahkan solusi asam sulfur dan merubah warna menjadi kuning. Pengukuran intensitas warna/*optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 ± 2 nm. Nilai OD proporsional dengan konsentrasi NT-proBNP. Konsentrasi NT-proBNP dalam sampel dapat dihitung dengan membandingkan nilai OD dengan kurva standar.

Spesimen pemeriksaan NT-proBNP dapat berasal dari serum maupun plasma (EDTA dan *lithium heparin*). Tidak disarankan untuk menggunakan sampel lipemik, hemolisis, dan ikterik.

Human NT-proBNP kit ini mempunyai rentang deteksi 0,625 – 40 ng/ml dengan batas terendah yang dapat dideteksi adalah 0,375 ng/ml. Tidak terdapat *cross reactivity* atau *interference* yang signifikan. Sampel harus jernih tidak lipemik, ikterik atau hemolisis.

Komposisi kit :

- a. *Micro ELISA plate*
- b. Larutan standar
- c. *Diluent*
- d. *Concentrated biotinylated detection antibody (Ab)*
- e. *Biotinylated detection Ab diluent*

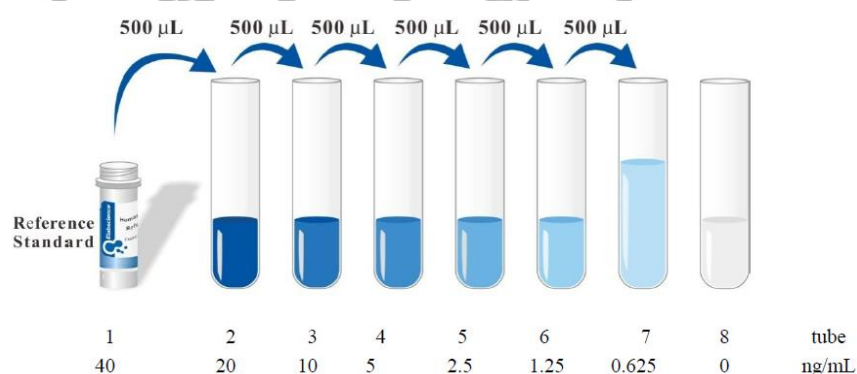
- f. *Concentrated HRP conjugate*
- g. *HRP conjugate diluent*
- h. *Concentrated wash buffer*
- i. *Substrate reagent*
- j. *Stop solution*

Prosedur pemeriksaan kadar NT-proBNP adalah sebagai berikut :

- Keluarkan semua reagen dari tempat penyimpanan ke suhu ruang (18-25⁰) sebelum digunakan.
- Semua reagen harus dicampur secara menyeluruh sebelum *pipetting*. Hindari berbusa.
- Siapkan *wash buffer* dengan melarutkan 30 ml konsentrat *wash buffer* dalam 750 ml air destilata. Larutan yang tidak digunakan disimpan kembali pada suhu 4⁰C. Jika terbentuk kristal dalam konsentrat, hangatkan dengan 40⁰C air rendaman (suhu pemanasan tidak boleh melebihi 50⁰C) sampai kristal telah benar-benar larut, kemudian didinginkan sampai suhu kamar sebelum digunakan.
- Siapkan larutan standar 15 menit sebelum digunakan. Lakukan sentrifugasi pada 10.000 g selama 1 menit. Biarkan selama 10 menit dan lakukan homogenisasi beberapa kali. Setelah larut sepenuhnya, aduk rata dengan pipet. Rekonstruksi ini menghasilkan larutan 40 ng/mL. Pengenceran serial (Gambar 10) dibuat sesuai keperluan (membuat pengenceran serial di sumuran secara langsung tidak diijinkan). Konsentrasi yang dianjurkan adalah sebagai berikut : 40,

20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0 ng/ml. Standar yang belum diencerkan berfungsi sebagai standar tertinggi (40 ng/ml).

- Siapkan *biotinylated detection antibody* dengan melakukan sentrifugasi lalu dilarutkan menggunakan pelarut *biotinylated Ab diluent* dengan perbandingan 1:100.
- Siapkan konjugat (*concentrated HRP conjugate*) dengan melarutkan dalam *diluent* dengan perbandingan 1 : 100.
- Siapkan reagen substrat. Karena peka terhadap cahaya dan kontaminan, maka sebaiknya jangan membuka botol sampai akan dilakukan pemeriksaan.



Gambar 10. Pengenceran serial larutan standar (Anonim, 2015)

- Persiapan sampel
 - Sampel berupa serum dapat disimpan selama 7 hari pada suhu 2-8°C, ≤ 1 bulan pada suhu -20°C atau ≤ 6 bulan pada suhu -80°C.
 - Hindari *freeze-thaw* berulang. Siapkan sampel pada suhu ruang (18-25°C) sebelum dilakukan pemeriksaan.
 - *Centrifuge* sampel lagi setelah dicairkan sebelum pengujian.

- Persiapan alat Rayto ELISA *reader*
- Masukkan 100 μ l larutan standar atau sampel dalam masing-masing sumuran. Inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.
- Tambahkan 100 μ l *biotinylated detection antibody* dalam masing-masing sumuran. Tutup *microplate* dengan *plate sealer*. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
- Aspirasi dan cuci sebanyak 3 kali. Pencucian dengan mengisi sumuran dengan *wash buffer* sebanyak 350 μ l.
- Tambahkan 100 μ l HRP konjugat pada masing-masing sumuran. Tutup *microplate* dengan *plate sealer*. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- Aspirasi dan cuci sebanyak 5 kali.
- Tambahkan 90 μ l reagen substrat. Tutup *microplate* dengan *plate sealer*. Inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C.
- Tambahkan 50 μ l *stop solution*. Baca pada panjang gelombang 450 nm.

I. Kontrol Kualitas Internal

Agar hasil pemeriksaan yang dilakukan valid dan dapat dipertanggungjawabkan, maka terlebih dahulu perlu dilakukan uji presisi (ketelitian) dan akurasi (ketepatan).

1. Uji Presisi/Ketelitian

Uji presisi merupakan suatu hasil yang didapatkan dari beberapa kali pengukuran dengan bahan yang sama. Uji presisi dilakukan untuk melihat konsistensi beberapa hasil pemeriksaan. Uji presisi dilakukan dengan melakukan pemeriksaan 1 contoh bahan sebanyak 10x secara berurutan pada hari yang berbeda atau saat dilakukan kontrol harian (*between day*) dengan menggunakan reagen kontrol yang tersedia. Presisi diukur dengan rerata (*mean*), simpangan baku (SB), dan koefisien variasi (KV). Rumus $SB = \sqrt{\sum d^2 / 2n}$, sedangkan rumus $KV = [(SB / \text{rerata}) \times 100\%]$, d = selisih dan n = jumlah sampel. Semakin kecil nilai KV (%), akan semakin teliti metode yang dipakai (Wiyono *et al.*, 2004; Linnet dan Boyd, 2006).

Uji presisi yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji presisi sehari (*within day*) yaitu dengan pemeriksaan satu contoh bahan diulang sepuluh kali pada hari yang sama untuk parameter NT-proBNP serum. Sedangkan untuk uji presisi parameter SGPT secara *between day* dengan menggunakan kontrol harian selama sebulan. Hasil yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung KV dengan menggunakan rumus seperti di atas.

2. Uji Akurasi/Ketepatan

Akurasi merupakan suatu kedekatan hasil pemeriksaan dengan nilai yang sebenarnya dari nilai aktual (Turgeon, 2012), didapatkan dari hasil pemeriksaan bahan kontrol dan dihitung sebagai bias ($d\%$) dengan rumus $d\% = [(\text{rerata} - NA) / NA]$, NA = nilai aktual dari bahan kontrol (Wiyono *et al.*, 2004). Nilai $d\%$ dapat positif atau negative, nilai positif menunjukkan nilai

yang lebih tinggi dari seharusnya dan nilai negative menunjukkan nilai yang lebih rendah dari seharusnya (Wiyono *et al.*, 2004; Linnet dan Boyd, 2006). Pada penelitian ini uji akurasi akan dilakukan pada parameter SGPT, sedangkan untuk NT-proBNP tidak dilakukan karena tidak adanya reagen kontrol.

J. Analisis Statistik

Analisis data terdiri dari :

1. Uji distribusi

Karakteristik dasar subjek penelitian disajikan dalam bentuk deskriptif. Variabel dengan skala nominal seperti jenis kelamin dideskripsikan sebagai frekuensi dan persentase. Data dengan jumlah sampel <50 diuji dengan *Shapiro wilk*, dan disajikan dalam bentuk tabel berisi rerata \pm SB bila terdistribusi normal dan dalam bentuk median (persentil 25 – persentil 75) bila tidak terdistribusi normal. Bila terdapat data tidak terdistribusi normal maka dilakukan transformasi data dengan menggunakan fungsi log 10 agar data terdistribusi normal. Kemudian akan dilakukan uji beda antara data pasien hepatitis B kronik dengan sirosis hepatis dan hepatitis B kronik tanpa SH dengan menggunakan *Independent sample T test* bila data terdistribusi normal dan *Mann Whitney* bila data terdistribusi tidak normal. Nilai p bermakna jika $p < 0,05$.

2. Uji korelasi

Uji korelasi menggunakan uji korelasi *Spearman's* disebabkan distribusi data tidak normal, dengan nilai p bermakna jika $p < 0,05$.

K. Pertimbangan Etik

Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etika penelitian biomedis FK UNS/RSDM dan persetujuan pasien. Pernyataan bersedia sebagai subyek penelitian diperoleh setelah sebelumnya mendapat penjelasan singkat mengenai tujuan dan manfaat penelitian, serta teknik pengambilan sampel darah kepada pasien. Pasien menandatangani surat pernyataan bersedia menjadi subyek penelitian yang telah disediakan.

