

BAB III

METODE DAN CARA PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan penelitian *quasi experimental studies* dengan pendekatan *pre test* dan *post test* pada kelompok perlakuan dan kontrol. Subjek pada penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

1. Kelompok perlakuan yang mendapat terapi standar dan terapi tambahan inhalasi MgSO_4
2. Kelompok kontrol yang hanya mendapat terapi standar..

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Instalasi Gawat Darurat (IGD) dan laboratorium Patologi Klinik RSUD dr Moewardi (RSDM) di Surakarta. Waktu penelitian bulan September sampai Oktober 2017.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi dan Sampel

Populasi target penelitian adalah pasien PPOK eksaserbasi akut. Populasi terjangkau adalah pasien PPOK eksaserbasi akut yang menjalani perawatan di IGD dan melakukan pemeriksaan di laboratorium Patologi Klinik RSDM di Surakarta pada bulan September sampai Oktober 2017.

Sampel penelitian adalah semua pasien PPOK eksaserbasi akut yang menjalani perawatan di RSDM di Surakarta. Pemilihan sampel kontrol dan perlakuan dilakukan dengan cara *simple random sampling* yaitu memilih subjek penelitian yang datang dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dimasukkan pada penelitian sampai jumlah subjek yang diperlukan terpenuhi.

Tidak terdapat data dari penelitian sebelumnya mengenai pengaruh inhalasi MgSO_4 terhadap respon bronkodilator, kadar serum substansi P dan TNF- pada pasien PPOK eksaserbasi akut maka besar sampel pada jenis penelitian eksperimental mempunyai sampel minimum 15 sampel setiap kelompok (Kasjono dan Yasril, 2013).

Berdasarkan pernyataan tersebut direncanakan minimal sebanyak 15 sampel tiap kelompok terdiri dari 15 pasien PPOK eksaserbasi diberikan terapi standar dan inhalasi MgSO_4 dan 15 pasien PPOK eksaserbasi akut diberikan terapi standar tanpa pemberian inhalasi MgSO_4 sebagai kontrol. Koreksi besar sampel untukantisipasi *drop-out* sebesar:

$$n = n/(1-f)$$

n' = Besar sampel

n = Besar sampel yang dihitung

f = Perkiraan proporsi *drop-out* (10%)

$n' = 15/(1-0,1)$

$n' = 16,66$ dibulatkan menjadi 17

Untuk penelitian ini dipakai besar sampel terdiri dari 17 subjek kelompok perlakuan dan 17 subjek kelompok kontrol (Kasjono dan Yasril, 2013).

2. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

a. Pasien terdiagnosis PPOK eksaserbasi akut secara klinis. Diagnosis PPOK eksaserbasi pada penelitian ini ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan klinis dan radiologi oleh klinisi. Gejala klinis PPOK eksaserbasi adalah perburukan gejala (sesak bertambah, peningkatan jumlah sputum, dan purulensi sputum) dibandingkan kebiasaan kondisi harian. Pada foto toraks terdapat gambaran hiperinflasi, hiperlusen, diafragma mendatar, corakan bronkovaskuler, jantung pendulum. Eksaserbasi akut dibedakan menjadi 3 tipe yaitu :

1. Tipe I (eksaserbasi berat), bila pasien memiliki 3 gejala diatas
2. Tipe II (eksaserbasi sedang), bila pasien memiliki 2 gejala diatas
3. Tipe III (eksaserbasi ringan), bila pasien memiliki 1 gejala diatas ditambah infeksi saluran nafas atas lebih dari 5 hari, demam tanpa sebab lain, peningkatan batuk, peningkatan *wheezing* atau peningkatan frekuensi pernafasan >20% dari *baseline* (12-20 kali per menit), atau frekuensi nadi >20% dari *baseline* (70-80 kali per menit).

b. Umur lebih dari 18 tahun pada saat penelitian.

- c. Bersedia untuk ikut dalam penelitian dan menandatangani lembar persetujuan

Kriteria Eksklusi meliputi:

- a. Riwayat penyakit inflamasi kronik seperti artritis reumatoid, *chron disease*, *ankylosing spondylitis*, psoriasis yang didapatkan dari rekam medis.
- b. Riwayat gagal ginjal yang didapatkan dari rekam medis.
- c. Gagal jantung yang didapat dari pemeriksaan dan rekam medis.
- d. Riwayat asma bronkial yang didapat dari rekam medis.
- e. Menggunakan obat antiinflamasi lain diluar terapi standar selama penelitian berlangsung yang didapatkan dari anamnesis dan rekam medis.
- f. Alergi $MgSO_4$ dan terapi standar didapatkan dari rekam medis dan anamnesis.

Kriteria diskontinu meliputi:

- a. Mengundurkan diri atau meninggal dunia.
- b. Muncul efek samping terhadap pemberian inhalasi $MgSO_4$ yaitu hipotensi, pandangan kabur, palpitasi, tremor, letargi, dan penurunan *deep tendon reflexes* selama penelitian berlangsung yang memerlukan penghentian pemberian inhalasi $MgSO_4$. Jika terjadi efek samping dapat diberikan kalsium glukonas 10% 1gr (10% dalam 10 cc) secara intravena dalam waktu 3 menit untuk pencegahannya.

D. Bahan Dan Alat

1. Bahan

- a. Serum subjek penelitian.
- b. Kit reagen *Substance P Assay* ELISA dari R&D systems United States of American (USA) & Canada.
- c. Kit reagen *Human- (tumor necrosis factor-)* ELISA kit Elabscience USA.

2. Alat :

- a. *Microplate reader* Rayto RT2100 dengan absorbansi 450 nm untuk pemeriksaan substansi P dan TNF- serum.
- b. *Microplate washer* RT2600C untuk pemeriksaan substansi P dan TNF- .
- c. Tabung dengan *clot activator*.
- d. Tabung tanpa antikoagulan.
- e. Tabung reaksi.
- f. *Aliquot*.
- g. Mikropipet ukuran 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 500 μ L.
- h. *Aqua destilata*.

E. Cara, Prosedur dan Skema Alur penelitian

1. Cara Penelitian

- a. Subjek dengan diagnosis PPOK eksaserbasi akut tanpa komplikasi, usia 18 tahun, melakukan pemeriksaan di IGD RSDM di Surakarta yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Data identitas subjek dicatat dalam formulir penelitian. Pengambilan darah di ruang gawat darurat

RSDM di Surakarta, meliputi 3 cc darah tanpa antikoagulan untuk pemeriksaan substansi P dan TNF- α . Sampel darah dibiarkan selama 30 menit hingga terbentuk klot, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 *revolutios per minute* (rpm). Serum yang terbentuk dimasukkan ke dalam *aliquot* dan disimpan pada kulkas -80⁰C hingga dianalisis untuk diperiksa substansi P dan TNF- α serum.

b. Terapi standar adalah terapi yang diberikan sesuai dengan gejala klinis, jenis penyakit dan dosis terapi. Terapi standar PPOK eksaserbasi akut adalah oksigenisasi dan farmakologis. Terapi standar yang dilakukan adalah:

i. Oksigenisasi : 2-3 liter/menit

ii. Nebulisasi : *fenoterol hydobromide* (Berotec[®]) dosis 1 mg, pemberian 3 kali dalam waktu 1 jam, atau *ipratpromen bromide* (Atropen) dengan dosis 0,25 mg pemberian 3 kali dalam 1 jam.

iii. Antibiotika diberikan jika terjadi peningkatan purulensi sputum. Antibiotika yang diberikan *levofloxacin* 750mg/24 jam atau *ceftriaxon* 2 gr/24 jam

iv. Kortikosteroid : prednisolon 40 mg/ 24 jam (PDPI, 2016).

Pengambilan darah untuk pemeriksaan *post* perlakuan setelah 90 menit dilakukan prosedur terapi standar.

c. Magnesium sulfat merupakan obat yang dapat digunakan pada pengobatan PPOK eksaserbasi akut. Efek yang didapat dari magnesium sulfat adalah sebagai bronkodilator dan anti inflamasi. Magnesium sulfat

berbentuk cair dengan konsentrasi 20% volume 25 ml. Magnesium sulfat diberikan dalam bentuk inhalasi dengan dosis 150 mg/ml (Edwards, 2012). Pembuatan dosis 150 mg/ml dengan melakukan pengenceran MgSO_4 200 mg/ml dengan 1,55 ml akuades yang bertujuan agar tidak mengganggu homeostasis tubuh. Magnesium sulfat yang digunakan adalah Otsu MgSO_4 20 iv diproduksi oleh pabrik PT Otsuka Indonesia dengan lisensi Otsuka, Jepang. Nomor registrasi DKL0318700643B 1. Satuan MgSO_4 yaitu mg/ml, dosis terapi yang diberikan adalah 150 mg/ml dan cara pemberian dengan nebulisasi sebanyak 3 kali pada menit ke 30, 60 dan 90. Pengambilan darah *post* perlakuan adalah setelah pemberian nebulisasi menit ke 90 untuk dianalisis.

2. Prosedur Penelitian

a. Prosedur *phlebotomy*

i. Persiapan

Siapkan tabung *vacutainer* tanpa antikoagulan, jarum, sarung tangan, *needle holder*, *torniquet*, *handsrub*, plester, dan *alcohol swab*.

ii. Langkah-langkah (WHO, 2010)

- Identifikasi pasien dengan minimal dua identitas (nama, nomor rekam medik, atau tanggal lahir).
- Cuci tangan dan gunakan sarung tangan.
- Cari vena yang akan ditusuk (superfisial, cukup besar, lurus, tidak ada peradangan/bengkak, tidak diinfus). Letakkan tangan lurus

serta ekstensikan dengan bantuan tangan kiri operator atau diganjal dengan telapak tangan menghadap keatas sambil mengepalkan tangan.

- Lakukan desinfeksi daerah yang akan ditusuk dengan *alcohol swab* dari arah dalam keluar dan biarkan sampai kering (30 detik). Kulit yang sudah dibersihkan jangan dipegang lagi.
- Lakukan pembendungan pada daerah proksimal lengan kira-kira 3 jari (± 10 cm) dari tempat penusukan agar vena tampak lebih jelas (bila *tourniquet* berupa ikatan simpul terbuka dan arahnya keatas), pembendungan tidak boleh terlalu lama (maksimal 1 menit).
- Buka tutup jarum dengan cara pegang bagian tutup yang berwarna dengan satu tangan, kemudian putar dan lepaskan bagian yang berwarna putih dengan tangan lainnya, pasang dengan cara memutar jarum pada *holder* dan putar jarum dengan rapat ke dalam *holder*.
- Lakukan penusukan jarum vena dengan sudut 15° - 30° lalu difiksasi untuk menghindari pergeseran jarum. Bila jarum berhasil masuk vena, akan terlihat darah masuk ke dalam jarum indikator.
- Masukkan tabung pertama ke dalam *holder*, dorong tabung ke jarum sampai ujung *holder*, gunakan ibu jari untuk mendorong tabung, sementara jari telunjuk dan jari tengah memegang ujung tepi *holder*. Darah akan mengalir ke dalam tabung.

- *Tourniquet* dilepas segera setelah darah mengalir, pasien diminta melepaskan kepalan tangan, lalu tabung diisi sesuai dengan kapasitas tabung vakum dan apabila dibutuhkan darah dengan antikoagulan yang berbeda dan volume yang lebih banyak dapat digunakan tabung vakum yang lain dan sesuai *order of draw*.
- Tekan secara perlahan pinggiran holder dengan ibu jari untuk melepaskan tabung vakum dari *holder*, kemudian jarum ditarik perlahan.
- Letakkan kapas/kasa steril diatas jarum, cabut jarum dengan menekan kapas, tekan kapas dengan telunjuk dan ibu jari penderita selama 15 menit.
- Jika menggunakan antikoagulan homogenisasi atau bolak balik tabung beberapa menit agar antikoagulan tercampur dengan darah dan tidak terjadi bekuan.
- Luka tempat pengambilan darah ditutup dengan plester.

b. Metode pemeriksaan substansi P

Metode yang untuk pemeriksaan substansi P menggunakan ELISA kit *substance P assay* dengan *catalog number* KGE007. Prinsip pemeriksaan pada penelitian ini menggunakan ELISA *competitive*.

i. Persiapan sampel

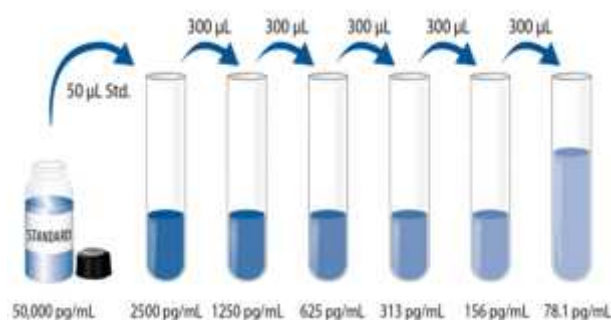
- a) Sampel yang digunakan adalah serum, stabilitas sampel pada suhu -20°C sampai 3 bulan, pada suhu -80°C sampai 6 bulan. Tidak disarankan pada sampel yang lipemik, hemolisis dan ikterik.
- b) Hindarkan *repeated freeze thaw cycles*.

ii. Persiapan reagen

Kit reagen *substance P assay* ELISA dari R&D systems USA & Canada

- a) *Wash buffer*.
- b) *Substrate solution*.
- c) *Substance P standard*.

Pipet 950 μL *calibrator diluent* RDS-45 ke dalam tabung 2500 pg/mL. Pipet 300 μL *calibrator diluent* RD5-45 kedalam tabung yang tersisa. Gunakan 50000 pg/mL *standard stock* untuk pengenceran. Campur masing-masing tabung secara menyeluruh dan digunakan pipet tip yang berbeda setiap melakukan pemindahan standar 2500 pg/mL (persiapan dilakukan harus dalam kurang satu jam sebelum digunakan). Pengenceran serial untuk kalibrasi dapat dilihat pada gambar 10 dibawah ini.



Gambar 10. Pengenceran serial untuk kalibrasi (R and D system, 2014)

iii. Prosedur pemeriksaan

- a) Menyiapkan semua reagen, *working standard* dan sampel.
- b) Membuka strip dari *plate frame* dan kembalikan ke *foil punch*.
- c) Tambahkan 100µL *calibrator diluents* RD5-45 pada sumuran *non specific binding* (NSB).
- d) Tambahkan 50µL *calibrator diluents* RD5-45 pada sumuran *zero standard*.
- e) Tambahkan 50µL standar, kontrol atau sampel pada sumuran yang tersisa.
- f) Tambahkan 50µL pada *primary antibody* (Ab) *solution* pada tiap sumuran (kecuali sumuran NSB). Semua sumuran akan berwarna biru kecuali sumuran NSB.
- g) Tambahkan 50µL *substance P conjugate* pada tiap sumuran. Semua sumuran akan berwarna violet kecuali sumuran NSB.
- h) Inkubasi selama 3 jam pada suhu kamar, diletakkan *horizontal orbital* di *microplate shaker* dengan kecepatan 500 ± 50 rpm.
- i) Aspirasi tiap tabung dan cuci, ulangi proses tiga kali dan lakukan empat kali pencucian. Cuci tiap isi tabung dengan 400µl *buffer*, menggunakan *autowasher*. Sesudah pencucian terakhir hilangkan *wash buffer* yang tersisa dengan aspirasi menggunakan kertas handuk bersih.

- j) Tambahkan 200 μ L *substrate solution* pada tiap sumuran. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar di *benchtop*. Lindungi dari cahaya.
- k) Tambahkan 50 μ L *stop solution* pada semua sumuran dan akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Apabila terjadi warna hijau atau tidak terjadi warna kuning secara menyeluruh maka dilakukan pencampuran secara lembut dan perlahan.
- l) Tentukan *optical density* (OD) dari setiap sumuran dalam 30 menit, menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Sensitivitas analitik reagen *substance P assay* ELISA dari R&D systems USA & Canada adalah 31,5 pg/mL, dengan nilai rujukan substansi P adalah 402-1576 pg/mL.

c. Metode pemeriksaan TNF-

Pemeriksaan TNF- dengan *human TNF-a ELISA kit catalog no: E-EL- H0109 Elabscience* USA, prinsip pemeriksaan pada penelitian ini adalah menggunakan metoda *sandwich* ELISA.

i. Persiapan sampel

- a) Sampel yang digunakan adalah serum, stabilitas sampel pada suhu 2-8⁰C sampai 7 hari, suhu -20⁰C sampai 1 bulan, dan pada suhu -80⁰C dapat bertahan sampai 6 bulan. Tidak disarankan sampel lipemik, hemolisis dan ikterik

b) Hindarkan *repeated freeze thaw cycles*

ii. Persiapan reagen

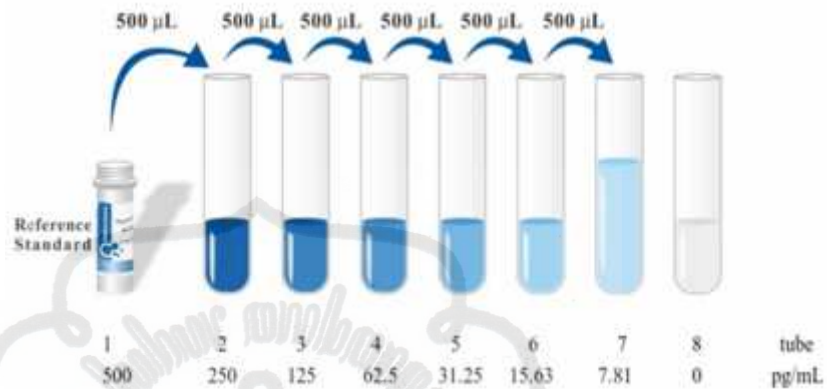
Tumor necrosis factor alpha dengan *human* TNF- α ELISA kit USA.

a) Letakkan semua reagen pada suhu kamar (18-25°C) sebelum digunakan

b) Encerkan 30 mL konsentrat *wash buffer* pada tabung 750 mL. Cuci *buffer* dengan air suling. Letakkan kembali larutan yang tidak digunakan pada suhu 4°C. Jika terbentuk kristal dalam konsentrat, dihangatkan pada suhu 40°C di *waterbath*. Homogenkan sampai kristal benar-benar larut. Larutan harus didinginkan sampai suhu kamar sebelum digunakan.

c) Siapkan standar dalam waktu 15 menit sebelum digunakan. *Centrifuge* pada 10.000 \times g selama 1 menit, dan buat standar dengan 1,0 mL *reference standar* lalu tutup, biarkan selama 10 menit, homogenkan. Setelah larut sepenuhnya, campurkan dengan pipet. Hasil pembuatan larutan yaitu 500 pg/mL. Lalu buat pengenceran serial sesuai kebutuhan. Konsentrasi yang direkomendasikan adalah sebagai berikut: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 0 pg/mL.

Pengenceran serial untuk kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 11 dibawah ini.



Gambar 11. Pengenceran serial untuk kalibrasi (Elabscience, 2017)

- d) *Biotinylated detection Ab*, lakukan sentrifus sebelum digunakan. Konsentrasi untuk *biotinylated detection Ab* dikerjakan dengan menggunakan *biotinylated detection Ab diluent* pada pengenceran 1:100.
- e) *Concentrated horseradish peroxidase (HRP) conjugate*, digunakan *concentrated HRP conjugate diluent* (1:100).
- f) *Substrate Reagent*.

iii. Prosedur pemeriksaan

Dimkan reagen dan sampel pada suhu kamar sebelum digunakan. Sebelum melakukan uji sampel disentrifus ulang setelah mencair. Semua reagen harus dicampur sampai homogen. Hindari busa pada pemipetan.

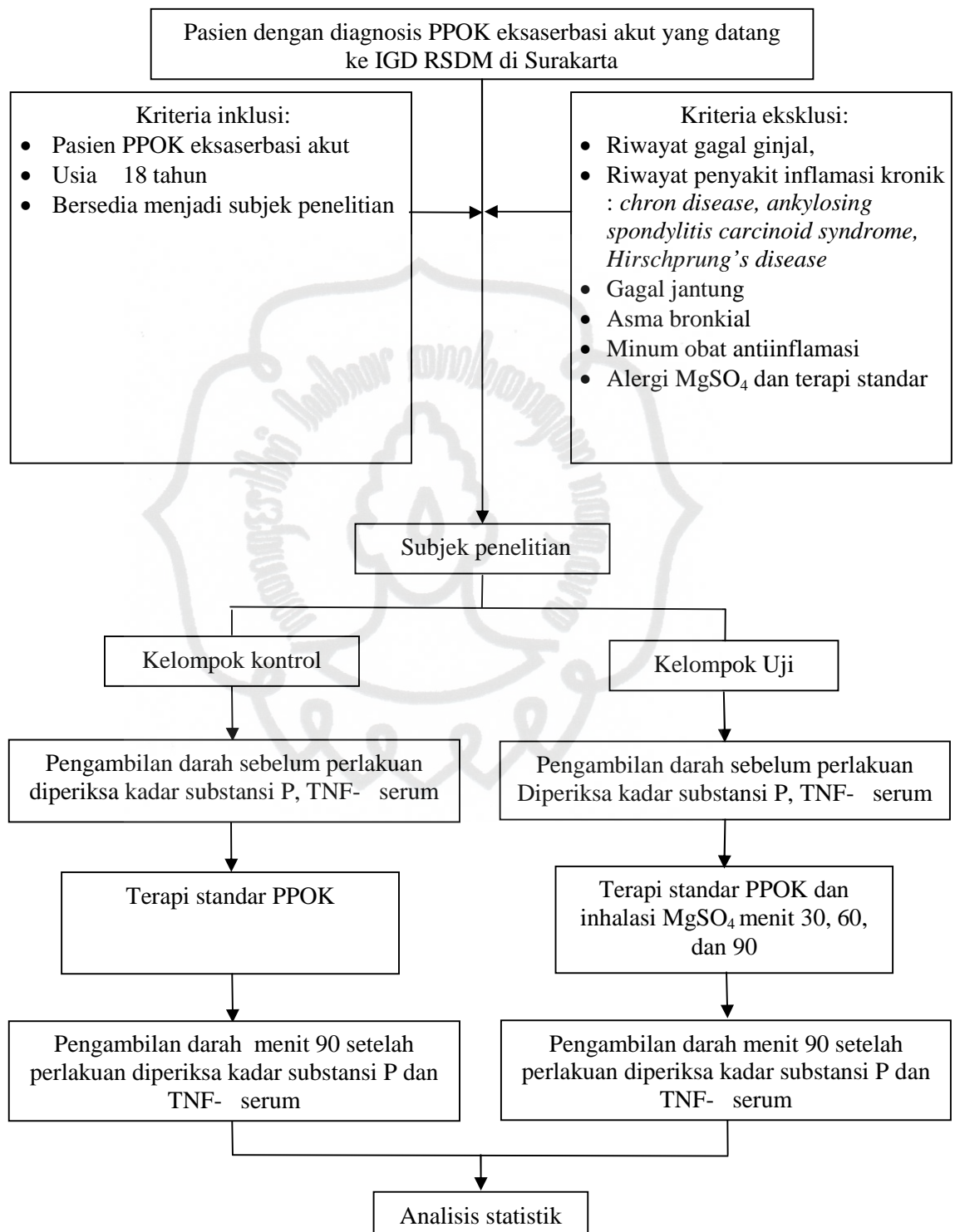
- a) Tambahkan 100µL standar, *blank*, atau sampel kedalam tiap sumuran. Pada sumuran *blank* ditambahkan *reference standard* dan *sample diluent. Solution* ditambahkan ke dasar mikro *plate* ELISA, hindari menyentuh dinding dalam dan berbusa. Campur perlahan, inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.
- b) Keluarkan cairan masing-masing sumur, jangan dicuci. Segera tambahkan 100µL *biotinylated detection Ab solution* pada tiap sumuran. Tutup dengan *plate sealer*, inkubasi selama 1jam pada 37°C.
- c) Aspirasi tiap sumuran dan cuci, ulangi prosesnya sebanyak tiga kali. Cuci dengan mengisi masing-masing sumur dengan *wash buffer* (kira-kira 350µL). Setelah dicuci terakhir, buang *wash buffer* dengan aspirasi atau *decanting*. Lalu membalikkan *plate* dan dikeringkan dengan kertas *absorbent* yang bersih.
- d) Tambahkan 100µL cairan HRP *conjugate working solution* pada tiap sumuran. Tutup dengan *plate sealer*. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- e) Ulangi proses pencucian lima kali seperti yang dilakukan pada langkah c.
- f) Tambahkan 90µL larutan substrat pada tiap sumuran. Tutup dengan *plate sealer*. Inkubasi kira-kira 15 menit pada suhu 37° C. Lindungi *plate* dari cahaya. Waktu reaksi bisa dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan perubahan warna yang sebenarnya, tapi tidak lebih

dari 30 menit. Bila terlihat gradien muncul di sumuran standar, reaksi dihentikan.

- g) Tambahkan 50 μ L *stop solution* ke masing-masing sumuran. Warna segera berubah menjadi kuning. Peambahan *stop solution* harus sama dengan *substrate solution*
- h) Pengukuran *optical density*, menentukan OD pada tiap sumuran, dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.
- i) Simpan kembali reagen yang tidak digunakan dalam kulkas dengan suhu yang telah ditentukan.

Sensitivitas analitik untuk reagen TNF- dengan *human* TNF- α ELISA Kit USA adalah 4,69 pg/mL dengan nilai rujukan TNF- adalah <7,81 pg/mL (Elabscience, 2016).

3. Skema Alur Penelitian



Gambar 12. Skema Alur Penelitian

F. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel terikat: kadar substansi P dan TNF- serum
2. Variabel bebas: inhalasi MgSO₄
3. Variabel lain yang mempengaruhi: terapi standar

G. Definisi operasional variabel dan pengukuran

1. Substansi P

Substansi P adalah neuropeptida saluran napas dengan berat molekul 1348 dalton. Substansi P diukur dengan metode ELISA menggunakan *substance P ELISA kit* pada alat *reader Rayto RT2100*. Kadar substansi P dalam satuan pg/ml. Skala pengukuran menggunakan skala numerik. Nilai rujukan: 402-1576 pg/ml.

2. TNF-

Tumor necrosis factor alpha adalah sitokin pleotropik dengan berat molekul 17 KDa. *Tumor necrosis factor alpha* diukur menggunakan metode ELISA dengan *human TNF-a ELISA kit USA* pada alat *reader Rayto RT2100*. Kadar TNF- diukur dalam satuan pg/ml. Skala pengukuran menggunakan skala numerik. Nilai rujukan: <7,81 pg/mL.

H. Kontrol Kualitas Internal

Pemeriksaan validitas uji analitik dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan pemeriksaan sampel penelitian. Pemeriksaan laboratorium untuk validasi uji analitik meliputi uji presisi (ketelitian) dan akurasi (ketepatan)

analitik sehingga mutu hasil pemeriksaan dapat dipertanggung jawabkan. Uji presisi meliputi uji presisi sehari (satu contoh sampel diulang sepuluh kali secara berurutan pada hari yang sama, dan uji presisi hari ke hari (contoh sampel diulang sepuluh kali secara berurutan pada hari yang berbeda atau saat dilakukan kontrol harian. Presisi diukur dengan rerata, simpang baku (SB) dan koefisien variasi (KV). Rumus $KV = [(SB/rerata) \times 100\%]$, $d = \text{selisih}$. Presisi sehari dilakukan pada parameter substansi P dan TNF- α . Semakin kecil nilai KV(%), semakin teliti metode tersebut.

Akurasi adalah kedekatan hasil pemeriksaan dengan nilai yang sesungguhnya yaitu nilai kontrol/rujukan/rentang yang ditentukan. Akurasi dinilai dari hasil pemeriksaan bahan kontrol dan dihitung sebagai nilai biasanya ($d\%$). Nilai $d\%$ dapat positif atau negatif, nilai positif menunjukkan nilai yang lebih tinggi dari seharusnya dan nilai negatif menunjukkan nilai yang lebih rendah dari seharusnya. Rumus $d\% = [(rerata - NA)/NA]$, NA= nilai aktual atau sebenarnya dari bahan kontrol (Wijono *et al.*, 2004; Linnet dan Boyd, 2006).

Kalibrasi peralatan sangat diperlukan untuk mendapatkan hasil pemeriksaan laboratorium yang terpercaya dan menjamin penampilan hasil pemeriksaan. Kalibrasi alat ELISA meliputi kalibrasi ELISA *reader* (linearitas alat, stabilitas pembacaan, ketepatan pembacaan), ELISA *washer* (volume dispenser, sisa yang tertinggal dalam sumur, posisi sumur), inkubator, dan *heating block*. Kalibrasi alat spektrofotometer meliputi ketepatan pengukuran absorban, ketepatan panjang gelombang dan linearitas alat (Wijono *et al.*, 2004).

I. Analisis Statistik

Analisis data dilakukan dengan memakai program komputer. Definisi pengaruh disini adalah pengaruh nilai kadar serum substansi P, dan TNF- antara sampel yang mendapat terapi standar dan inhalasi MgSO_4 dengan terapi standar saja. Perbandingan antara variabel bebas dan terikat menggunakan uji beda atau komparatif. Uji beda digunakan untuk mengetahui perbedaan nilai kadar serum substansi P dan TNF- antara kelompok yang mendapat terapi standar dan inhalasi MgSO_4 dengan kelompok terapi standar.

Pasien PPOK eksaserbasi akut sebelum dan sesudah pemberian inhalasi MgSO_4 :

1. Dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk*.
2. Data tidak berpasangan (kelompok kontrol dan kelompok perlakuan).

Analisis data dengan melakukan transformasi data. Bila data hasil transformasi berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik dengan uji *independent sample T test*. Bila data hasil transformasi tidak berdistribusi normal maka dilakukan uji nonparametrik untuk kelompok tidak berpasangan yaitu dengan uji *Mann wihtney* (Dahlan, 2014).

3. Data berpasangan (pada kelompok *pre* dan *post* terapi). Bila data hasil transformasi berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik dengan uji *paired T test* berpasangan. Bila data hasil transformasi berdistribusi tidak normal dilakukan uji nonparametrik untuk kelompok tidak berpasangan menggunakan uji *Wilcoxon*. Batas kemaknaan: $p < 0,05$, Interval kepercayaan 95% (Dahlan, 2014).

4. Dilakukan perhitungan delta (perbedaan/ selisih hasil) untuk kadar substansi P dan TNF- α serum pada kelompok kontrol dan perlakuan sebelum dan sesudah terapi.

J. Pertimbangan Etik

Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etika penelitian biomedis Fakultas Kedokteran UNS/RSDM di Surakarta dan persetujuan pasien. Pernyataan bersedia sebagai subjek penelitian diperoleh dengan terlebih dahulu menerangkan secara singkat latar belakang, tujuan, manfaat penelitian, serta teknik pengambilan sampel darah kepada pasien. Pasien menandatangani surat pernyataan bersedia menjadi subjek penelitian yang telah disediakan.