

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancang Bangun Penelitian

Penelitian ini adalah suatu studi jenis **explorative-observational** yaitu studi asosiasi dengan pendekatan rancangan "**Kasus-Kontrol**" dan berada dalam lingkup penelitian genetik, karena antigen HLA merupakan ekspresi dari gen khromosom nomor 6, sehingga diperlukan pendekatan yang karakteristik berlaku dalam bidang genetik.

Pada penelitian genetik mempunyai suatu asumsi dasar yang perlu dipahami, bahwa resiko sakit yang terletak pada faktor genetik sebenarnya sudah ada atau tercetak sejak **konsepsi** dan terlihat setelah lahir atau beberapa saat setelah lahir (**De Vries, 1979**).

4.2 Populasi Sampel, Besar Sampel dan Kriteria Sampel

4.2.1 Populasi sampel

Populasi yang diteliti adalah penduduk Kotamadya Ujung Pandang (KMUP), Sulawesi Selatan, yaitu daerah dengan insidensi lepra tinggi (7,4/10.000 penduduk, 1994/1995) yang ternyata didiami oleh terbanyak suku Bugis-Makassar. KMUP dipilih sebagai lokasi penelitian sebab mempunyai beberapa kelebihan :

1. Dijumpai banyak variasi kasus.
2. Merupakan pusat pelayanan / rujukan medis dan pusat rehabilitasi, terutama bagi wilayah Indonesia Timur.

4.2.2 Lokasi

Cara penemuan kasus lepra yang akan diteliti dikerjakan secara aktif dan pasif dengan melaksanakan kunjungan rumah, kunjungan ke Poliklinik Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin RSUP Dr Wahidin Sudirohusodo, RS Kusta Regional-Daya, Balai Pengobatan Kusta - Kalimbu dan perkampungan ex-penderita Kusta - Jongaya. Sedangkan kelompok populasi normal (kontrol) diperoleh dari para donor di PMI Cabang KMUP, Sukarelawan karyawan-karyawati berbagai instansi pemerintah dan swasta, mahasiswa Perguruan Tinggi Negeri dan Swasta serta para siswa Kepolisian RI Batua-Ujung Pandang.

4.2.3 Kriteria Sampel

Kriteria penerimaan sampel (*Inclusion Cirteria*) :

1. Penderita yang didiagnosis secara klinis sesuai dengan tanda, "kardinal" lepra ditunjang dengan pemeriksaan bakteriologis, histopatologis dan imunologis.
2. Wanita atau pria, umur tidak dibatasi.
3. Belum pernah berobat (baru) atau sedang dalam program pengobatan atau yang dinyatakan bebas dari program pengobatan.
4. Berasal dari suku Makassar atau dari suku Bugis.
5. Bersedia secara tertulis mengikuti program penelitian ini sampai selesai (*Informed Consent*). Sebelumnya sampel telah diberi penerangan secukupnya, lalu diminta persetujuannya.

Kriteria Penolakan Sampel (*Exclusion Criteria*) :

1. Ada kesulitan / keraguan dalam pemeriksaan klinis, bakteriologis, histopatologis dan imunologis.
2. Keadaan umum penderita dalam keadaan lemah
3. Ada kesulitan dalam pengambilan darah.
4. Penderita tipe BB sebab status imunologis tidak stabil

Kriteria kelompok populasi sampel normal (sebagai kelompok kontrol) :

1. Subyek serta adalah manusia sehat, tidak menderita lepra dan tidak mempunyai riwayat lepra dalam keluarga.
2. Subyek serta adalah orang Indonesia, berasal dari suku Makassar atau dari suku Bugis.

4.2.4 Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus estimasi proporsi (Browner, 1988 dalam Handono, 1998) dimana akan dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kasus dan kelompok kontrol. Pada penelitian ini ditentukan α sebesar 0,05 dan β sebesar 0,20. Berdasarkan perkiraan bahwa frekuensi HLA tertentu yaitu HLA-DR2 pada kontrol sehat (π_1) sama dengan penelitian sebelumnya yaitu sebesar 30% dan 50% pada kasus lepra (Bothamley, 1989 dalam Soebono, 1996), maka perhitungan jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah :

$$n = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{\pi(1-\pi)(1/q_1 + 1/q_2)} + Z_{\beta}\sqrt{\{\pi_1(1-\pi_1)/q_1\} + \{\pi_2(1-\pi_2)/q_2\}}]^2}{(\pi_1 - \pi_2)^2}$$

dimana .

- n = besar sampel total
- α = 0,05 maka $Z_{\alpha} = 1,96$
- β = 0,20 maka $Z_{\beta} = 0,842$
- q = perbandingan dua kelompok sampel
- q_1 = proporsi sampel kontrol adalah 0,5

- q_2 = proporsi sampel kasus adalah 0,5
 π = $q_1 \cdot \pi_1 + q_2 \cdot \pi_2$
 π_1 = HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (= DR2), yang diharapkan pada kontrol sebesar 30%
 π_2 = HLA-DRB1* 1501-1505, 1601-1603, 1605, 1606 (= DR2), yang diharapkan pada kasus lepra sebesar 50%
 sehingga didapatkan n total = 162
 jumlah kontrol minimal = 81
 jumlah kasus lepra minimal = 81

Besarnya sampel didasarkan atas pertimbangan luasnya spesifitas antigen HLA yang ada.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Dalam menilai hubungan antara antigen / gen HLA klas I dan HLA klas II dengan kerentanan timbulnya penyakit lepra, maka :

1. Variabel tergantung : LEPRA/KLINIS (TT / LL)
2. Variabel bebas : Antigen / gen HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB, HLA-DQ.
3. Variabel penyerta : Suku

4.3.2 Karakteristik Variabel Yang Diteliti

VARIABEL	CARA MENGUKUR	DATA
Variabel tergantung Lepra TT / LL	<ul style="list-style-type: none"> • Klinis • Bakteriologi • Histopatologi • Lepromin 	TT / LL 0 – 6+ TT / LL - - +++
Variabel Bebas Antigen/gen HLA-A Antigen/gen HLA-B Antigen/gen HLA-C Antigen/gen HLA-DQ Allel HLA-DRB	Serologi Serologi Serologi Serologi PCR-SSO	Positif / Negatif Positif / Negatif Positif / Negatif Positif / Negatif Positif / Negatif
Variabel Penyerta Suku	Anamnesis + periksa fisik	Bugis / Makassar

4.3.3 Definisi Operasional Variabel

a. Dasar Diagnosis Lepra

Diagnosis lepra ditegakkan oleh ahli Penyakit Kulit dan Kelamin yang bertugas di poliklinik Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin atau ruang rawat inap di rumah sakit tempat penelitian.

Pada pemeriksaan klinis, WHO (1980) menganjurkan penggunaan 4 kriteria untuk mendiagnosis penyakit lepra, sebagai berikut:

1. Ditemukannya lesi kulit yang khas.
2. Adanya gangguan sensasi kulit.
3. Penebalan saran tepi predileksi.
4. BTA positif dari sediaan sayatan kulit.

Diagnosis lepra dapat ditegakkan apabila ditemukan sedikitnya dua dari ketiga kriteria pertama di atas, atau cukup dengan kriteria ke empat saja (Agusni, 1996).

b. Klasifikasi Penyakit Lepra

Klasifikasi didasarkan atas pemeriksaan klinis, bakteriologis, histopatologis dan imunologis (*Lepromin Test*).

Tabel 4.1 Aspek Klinik-Klasifikasi Ridley-Jopling

Observation or test	Type of Leprosy				
	TT	BT	BB	BL	LL
Number of lesions	Single usually	Single or few	Several	Many	Very many
Size of lesions	Variable	Variable	Variable	Variable	Small
Surface of lesions	Very dry, sometimes scaly	Dry	Slightly shiny	Shiny	Shiny
Sensation in lesions (not face)	Absent	Moderately-markedly diminished	Slight-moderately diminished	Slight diminished	Not affected
Hair growth in lesions	Absent	Markedly diminished	Markedly diminished	Slightly diminished	Not affected
AFB in lesions	Nil	Nil or scanty	Moderate numbers	Many	Very many (plus globi)
AFB in Nasal scrapings or in nose	Nil	Nil	Nil	Usually nil	Very many (plus globi)
Lepromin test	Strongly positive (+++)	Weakly positive (+ or ++)	Negative	Negative	Negative

AFB = Acid-fast bacilli; TT = Tuberculoid; BT = Borderline Tuberculoid; BB = Mid-borderline; BL = Borderline lepromatosus; LL = Lepromatosus

c. **Variabel Bebas : Antigen / Gen HLA Klas I dan HLA Klas II**

HLA klas I yang diteliti adalah HLA-A, HLA-B, HLA-C dan HLA klas II adalah HLA-DR serta HLA-DQ. Penelitian dilakukan secara serologis dengan metode *lymphocytotoxicity*. Hasil pemeriksaannya dinyatakan dengan positif atau negatif, dimana nilainya berdasarkan ketentuan menurut prosedur yang lazim digunakan. Khusus gen HLA-DR (HLA-DRB), keberadaan gen tersebut ditetapkan dengan metoda : *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide* (PCR-SSO). Hasil pemeriksaan dinyatakan dalam positif atau negatif.

d. **Faktor Penyerta**

Suku bangsa yaitu berdasarkan pernyataan yang bersangkutan dan periksa pandang (fisik), serta dikonfirmasi dengan keluarga terdekatnya.

e. **Pemeriksaan Bacteriologis (BI)**

Untuk menetapkan seseorang dalam klasifikasi tipe **Pause-Basiler (PB)** : sesuai dengan tipe TT dan BT pada klasifikasi Ridley-Jopling (1966), atau tipe **Multibasiler (MB)** : sesuai dengan tipe BB, BL dan LL pada klasifikasi Ridley Jopling (1966), maka penemuan basil tahan asam (BTA) dari sediaan apus irisan kulit merupakan salah satu syarat utama, sesuai program pengobatan MDT (*Multiple Drugs Therapy*) oleh WHO, 1988 (Soebono, 1998).

Tabel 4.2 Sistem Scoring Bacterial Index

Average Number Of Acid-Fast Bacilli	Bacterial Index (BI)
> 1000 / field	6+
100-1000 / field	5+
10-100/field	4+
1-10/field	3+
1-10/10 field	2+
1-10/100 field	1+
0/100 field	0+

The BI for the patient is the average of the BI at the individual sites
(Dharmendra,1985)

f. Pemeriksaan Lepromin (Mitsuda Test)

Test lepromin ini sangat bermanfaat bagi penggolongan / klasifikasi klinis seseorang yang telah didiagnosis lepra. Caranya dengan menyuntikkan basil lepra dengan dosis 0,1 ml intra dermal di daerah volar pada lengan atas persis seperti Tuberculin test. Tersedia 2 macam konsentrasi bacteria yaitu $4,0 \times 10^7$ dan $1,6 \times 10^8$ AFB/ml. Pembacaan hasil test dilakukan menurut Mitsuda type, yaitu pada minggu ke 3 atau ke 4 berupa nodule yang timbul di daerah suntikan. Besarnya nodule lalu diukur dengan penggaris. *Skin test* ini dianggap mewakili kemampuan tubuh membangkitkan respons imun terhadap kuman lepra. Hasil test positif pada tipe Tuberculoid dan negatif pada tipe Lepromatous (Ress and Young, 1994).

Kriteria penilaian *Skin test* secara Mitsuda adalah berdasarkan atas diameter indurasi pada areal reaksi, sebagai berikut :

- Negative (-) : Tidak ada terlihat atau terasa
- Ragu-ragu (\pm) : Sebuah nodule yang berdiameter lebih kecil dari 3 mm
- Positif + : Sebuah nodule dengan diameter 3-5 mm
- Positif ++ : Sebuah nodule dengan diameter 6-10 mm
- Positif +++ : Sebuah nodule dengan diameter lebih besar 10 mm atau salah satu ukuran diatas yang disertai ulserasi.

g. Pemeriksaan Histopatologis.

Pemeriksaan histopatologis terhadap lesi kulit pada penyakit lepra sangatlah penting artinya (Job, 1994; Kandouw, 1996) untuk :

1. **Diagnosis** : mengklasifikasi penderita ke dalam klasifikasi clinico-pathological spectrum menurut Ridley Jopling (1966).
2. **Pengobatan** : sebagai usaha follow up perjalanan penyakit selama pengobatan.
3. **Kontrol** : utamanya dalam hal terapi uji-coba untuk mendeteksi timbulnya relaps.

Diagnosis histopatologis sesuai standard WHO, 1982 pada lepra yang multibacillair seperti tipe borderline lepramotous leprosy (BL) dan tipe lepramotous leprosy (LL) dengan penemuan BTA tidaklah sulit demikian pula dengan penemuan basil tahan asam (BTA) yang menjadi patokan diagnosis penyakit lepra sesuai Standard WHO, 1982. Tetapi kesulitan yang cukup serius muncul pada kasus lepra paucibacillair seperti tipe Tuberculoid leprosy (TT) dan tipe Borderline Tuberculoid leprosy (BT),

terutama penemuan BTA dalam granuloma, atau di Schwann cells maupun dalam makrofag.

Tabel 4.3 Patokan pemeriksaan histologis sesuai klasifikasi. (WHO, 51,451, 1974).

	TT	BT	BB	BL	LLs	LLp
Epitheloid cell	++	++	++	±/-	-	-
Non-vacuolated giant cells	++/-	+/-	-	-	-	-
Histiocytes/foamy macrophage	-	-	-	++	++	++
Small vesicles	-	-	-	++/-	++/-	++/-
Vacuolated giant cells	-	-	-	-	++/-	±/-
Giant vacuoles	-	-	-	-	+/-	++/-
Lymphocytes	+±/+	+±/±	±	++/++	+/±	±/-
Dermal nerve. maximum diameter (µm)	1000	400	250	200	200	80
Onion-skin perineurium	-	±/-	+/-	++/±	++/-	-
Clear subepidermal zone	±/-	++/-	++	++	++	++
Erosion of epidermis	++/-	±/-	-	-	-	-
Acid-fast bacilli in granuloma (BI)	0/1	0/2½	3/4½	4/5½	5/6½	5½/6½
Acid-fast bacilli in nose	-	-	-	±	++	++
Lepromin (Mitsuda) reaction	3+	2/1+	-	-	-	-
Lymphocyte transformation test (% transformation)	15	6.0	2.8	0.9	0.6	0.4
Leucocyte migration index	0.76	0.83	0.88	0.92	0.92	0.95
Histological index, fall in 6 months (%)	...	100	78	23	14	5.5
Immunological stability	++	±	-	±	+	++
Borderline reactions	-	+	++	+	±	-
Erythema nodosum leprosum	-	-	-	±	++	++
Protection by BCG (7)	-	+	-	-	-	-
Approximate distribution of case (%)	9	24	8	10	31	18

Dalam mengantisipasi kesulitan-kesulitan yang akan terjadi, maka seluruh sampel penelitian lepra khususnya tipe TT dan BT telah dilakukan pewarnaan khusus yaitu **LAM-B (Lipoarabinomannan-B)**, salah satu jenis pewarnaan imunohistokimia terbaru yang telah teruji tingkat sensitivitas maupun spesifitasnya (**Kandouw, 1997**). Proses pewarnaan khusus ini dilakukan di **Divisi Patologi pada National Institute for**

Leprosy Research, Tokyo, Japan. Prosedur kerja metode **LAM-B** dapat dilihat pada lampiran 5. Sebagai standard diagnosa histopatologis tetap digunakan pewarnaan **Haematoxyllin Eosin (H & E)** serta ditunjang dengan pewarnaan **Fite Farraco (FF)** untuk menemukan BTA pada semua sampel biopsi lesi kulit penderita lepra. Hasilnya dapat dilihat pada lampiran 6A dan 6B.

4.3.4 Cara Pengolahan Data

Dalam menentukan asosiasi HLA dan lepra dilakukan analisis frekuensi antigen HLA dalam populasi (*Population Study*) yang bertujuan untuk mengetahui besarnya penampilan / ekspresi masing-masing spesifitas antigen HLA dalam populasi yang akan diteliti. Frekuensi antigen HLA (frekuensi fenotipe) dihitung dengan cara jumlah antigen HLA tertentu yang tampil dibagi jumlah keseluruhan sampel populasi normal (subyek serta).

Sedangkan frekuensi gen HLA (frekuensi genotip) dapat dihitung dengan cara menurut rumus dari **Matiuz (Matiuz, 1970)**.

$$g = 1 - \sqrt{1-f}$$

g : Frekuensi gen

f : Frekuensi antigen

Penilaian terhadap besarnya peluang adanya asosiasi antara suatu penyakit dengan antigen HLA tertentu dinyatakan dalam nilai **resiko relatif (*relative risk - RR*)**, yaitu suatu nilai yang menyatakan peluang seseorang yang memiliki antigen

HLA tertentu untuk mengindap suatu penyakit, dibandingkan dengan orang lain yang tidak memiliki antigen tersebut.

Untuk menghitung **RR** dan **tes kemaknaan** tersebut dapat menggunakan **tabel asosiasi 2 x 2** sebagai berikut (Albert dalam Tiwari dan Terasaki, 1985):

Bagan perhitungan tabel asosiasi 2x2

		Antigen HLA		
		Positif	Negatif	Total
Penyakit Lepra	Positif	a	b	C
	Negatif	c	d	D
	Total	A	B	N

Rumus Khi Kwadrat Kontingensi (Chi Square Test) :

$$X^2 = \frac{(ad-bc)^2 \times N}{A \times B \times C \times D} \quad (df = 1)$$

Rumus perhitungan Relative Risk (resiko relatif = odds ratio / OR) adalah sebagai berikut :

$$RR / OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Keterangan :

- a : frekuensi jumlah Penderita yang memiliki antigen HLA tertentu.
- d : frekuensi jumlah Penderita yang tidak memiliki antigen HLA tersebut.
- b : frekuensi jumlah kontrol yang tidak memiliki antigen HLA tertentu.
- c : frekuensi jumlah kontrol yang memiliki antigen HLA tersebut.

Catatan :

OR > 1 → rentan

OR < 1 → protektif

Untuk menganalisa hasil pada kotak kosong / bernilai nol, maka ditambahkan angka 0,5 pada setiap kotak yang ada. Rumus ini dikenal sebagai **modifikasi Haldane (Tiwari dan Terasaki, 1985)**.

Tingkat kemaknaan yang digunakan pada penelitian ini adalah $\alpha = 0,05$, karena cara-cara pemeriksaan pada penelitian ini mempunyai akurasi yang tinggi.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi metode konvensional serologis dan metode mutahir biologi molekuler, berupa analisa DNA dengan teknik PCR = Polymerase Chain Reaction, Sequence specific Oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot resolusi rendah.

4.4 Cara Pemeriksaan Laboratorium

4.4.1 Bahan pemeriksaan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah penuh (*whole blood*) dari penderita serta dan populasi normal yang sehat. Sampel penelitian ini diolah pada hari pengambilan, tidak pernah disimpan. Ini dimaksudkan untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kerusakan limfosit akibat penyimpanan, terutama limfosit B yang relatif lebih labil daripada limfosit T, sehingga dapat menyukarkan penilaian hasil pembacaan. Hal ini sesuai dengan yang tertera pada HLA Typing Manual dari UCLA, USA.

Bagi mereka yang didiagnosis sebagai penderita lepra yang berasal dari RSWS dan Jongaya diambil sediaan apus irisan kulit lalu dikirim ke bagian ilmu penyakit dan kelamin RSWS. Bagi penderita yang berasal dari BP Kusta-Kalimbu dan perkampungan kusta Jongaya, sampel akan tetap diperiksa ditempat yang sama,

demikian pula bila sampel berasal dari RS Kusta Regional-Daya. Pemeriksaan sediaan apus irisan kulit bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya bakteri tahan asam (BTA). Di samping itu diambil pula irisan jaringan kulit (biopsi kulit), yang selanjutnya spesimen ini disatukan pemeriksaannya di bagian Patologi Anatomi RSWS untuk memperoleh hasil histopatologinya. Pemeriksaan ini bertujuan untuk diagnosa pasti lepra sekaligus klasifikasinya. Selain itu terhadap penderita dilakukan test lepromin, yang bertujuan untuk mengetahui respons imun terhadap *Mycobacterium leprae*. Adapun jumlah darah yang diambil dari tiap individu sebanyak 30 ml, yang dipisahkan dalam 3 tabung yang telah mengandung antikoagulan heparin dengan perbandingan 9 : 1 (darah heparin). Tujuan akhirnya agar bisa diperoleh total sel limfosit B yang sesuai standard untuk menentukan antigen HLA.

Penelitian serologi HLA-typing dilaksanakan di laboratorium **Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Ujung Pandang**, bekerja sama dengan bagian **Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Bandung**, sebagian sampel penelitian serologi lainnya dilakukan di **St Marianna University, Yokohama, Japan**. Sedangkan penelitian Biologi - Molekuler (PCR) dilakukan di laboratorium **Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang**. Untuk mendeteksi adanya BTA (hasil tahan asam) pada kasus sulit (lepra type TT/BT), dilaksanakan di **National Institute for Leprosy Research, Tokyo, Japan** yaitu dengan membawa balok parafin biopsi kulit dan dilakukan pewarnaan khusus secara imunohistokimia, yaitu LAM-B.

Antisera HLA diperoleh dari **Academisch Ziekenhuis, Leiden, The Netherlands** dan **St Marianna University, Yokohama, Japan**. Sedangkan untuk

pewarnaan khusus berupa *immunostaining set* diberikan oleh **National Institute for leprosy Research, Tokyo, Japan.**

4.4.2 Cara Pemeriksaan antigen HLA

a. Metode Serologi

Penentuan antigen HLA dikerjakan dengan cara *Microlymphocytotoxicity test* dengan memakai Oriental Terasaki's Trays dari UCLA, USA sesuai standard prosedur yang ditetapkan oleh National Institut of Health (NIH).

Adapun prosedur kerjanya meliputi tahap-tahap sebagai berikut :

a) Isolasi Limfosit

Pemisahan dan isolasi limfosit dikerjakan dengan perantaraan **Ficoll-Hypaque** (*lymphocyte separation medium, specific gravity, 1,077-1,080* pada suhu kamar), sebagai berikut :

Pusingkan 30 ml darah-heparin (bebas phenol) dalam 3 tabung berbeda pada kecepatan 600 g selama 10 menit. Pisahkan lapisan sel darah putih (*buffy coat*) yang berbentuk cincin putih abu-abu diantara ke 2 cairan menggunakan pipet Pasteur ke tabung yang lain untuk dicuci dengan larutan **Hanks**. Campurkan secara merata dan tuangkan dengan pipet Pasteur secara melingkar ke dalam tabung yang masing-masing berisikan 5 ml larutan **Ficoll-Hypaque**. Memindahkan sel pada perbatasan (*interface*) ke dalam tabung **Fisher** dan dipusingkan pada kecepatan tinggi 3000 selama 2 menit.

Supernatan dipisahkan dan ditambahkan larutan **Hanks balanced salt solution (HBSS)** dengan perbandingan volume yang sama. Pusingkan lagi pada kecepatan 1000 g selama 1 menit untuk memisahkan trombosit. Supernatan yang mengandung sel trombosit dipisahkan dan ditambahkan larutan hanks, serta satu tetes thrombin (100 IU/ml, ortho-731200), lalu dicampurkan secara merata. Tabung dipusingkan selama 2 menit sampai terbentuk gumpalan trombosit. Tabung dipusingkan kembali pada kecepatan 1000 g selama 3 menit untuk mengendapkan gumpalan trombosit. Supernatan yang mengandung limfosit dipisahkan kedalam tabung **Fisher**, dan dipusingkan lagi pada kecepatan 1000 g selama 1 menit. Supernatan dipisahkan dan limfosit dicuci 2 x dengan media **RPMI-1640 (GIBCO 04102400 H)** pada kecepatan 1000 g selama 1 menit. Resuspensikan dalam medium **RPMI-1640** dan **5% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO 01306290 H)**. Teteskan suspensi tersebut sebanyak 1 μ l pada kamar hitung leukosit (**Improved Neubauer Cell Counting Chamber**) di bawah mikroskop standard untuk dihitung jumlah limfositnya.

Cara Perhitungan

Hitung jumlah sel dalam 1 kotak yang berukuran 1 mm^2 ($1/10 \text{ mm}^3$) dibagi 50. Jawaban ini setara dengan jumlah sel dalam 1 ml suspensi $\times 10^6$.

Diusahakan agar konsentrasi limfosit (total limfosit T + B) adalah sebesar $1,0 - 2,0 \times 10^6/\text{ml}$ sesuai ketentuan yang berlaku untuk *cytotoxicity test*. Sel suspensi tersebut selanjutnya dibagi dua bagian. Bagian pertama dilanjutkan untuk penentuan antigen HLA, sedangkan bagian kedua, limfosit total ini disimpan dulu pada suhu 4°C (lemari es) selama 1 jam, lalu pindahkan ke freezer, suhu -70°C selama semalam, kemudian keesokan harinya dibekukan / ditidurkan di dalam tanki Nitrogen Cair (*Nitrogen Liquid tank*) dengan suhu $\pm -157^\circ - -180^\circ\text{C}$. Limfosit yang akan dibekukan harus disimpan khusus dalam cryotubes (**NUNC 3-68632**). Sebelumnya dicampur dengan *freezing mixture* yang terdiri atas : 20% DMSO + 25% FCS + 55% RPMI 1640. Selama proses berlangsung di atas pecahan es batu. Tulis lengkap pada cryotubes identifikasi sampel, tanggal dan jumlah limfosit.

Maksud pembekuan sel ini ialah agar tetap tersedia cadangan limfosit total untuk mengatasi berbagai hal yang terburuk selama penelitian ini berlangsung (pengulangan bisa dilakukan).

Untuk pemeriksaan HLA-A, -B, -C (HLA klas I) digunakan limfosit T dan B, sedangkan untuk pemeriksaan HLA klas II, yaitu HLA,DR dan -DQ hanya menggunakan limfosit B. Untuk mendapatkan limfosit B dilakukan dengan cara memisahkan limfosit T dari limfosit B dengan menggunakan teknik / cara **Nylon wool**. Teknik ini lebih

menguntungkan karena relatif simple, agak cepat dan tidak memerlukan peralatan dan reagens yang spesial (Miller dan Rodey, 1981).

b) Cara kerja Pemisahan limfosit T dan limfosit B

Limfosit B dipisahkan dari limfosit hasil isolasi dengan perantara **Nylon Wool** (Fenwal-Leukopack, Fenwal Division, Baxter-Travenol Laboratories, Deerfield, IL 60015) dan tehnik sedotan (**straw**).

Disiapkan dulu sedotan plastik sepanjang sekitar 12 - 14 cm, salah satu ujung sedotan disegel (seal) dengan sebuah jepitan panas dengan sudut 60°. Lalu masukkan kira-kira 0,1 gr Nylon Wool kedalam sedotan, di mana media RPMI yang dicampur dengan 5% FCS. Wool tidak perlu terlalu padat, mengisi sedotan sepanjang 6 cm. Simpan sedotan dalam lemari es 4°C sampai akan digunakan dalam posisi horizontal agar dapat menahan medium keluar. bila sudah akan digunakan, dengan cepat panaskan sedotan di dalam incubator, suhu 37°C selama 30 menit, letakkan sedotan secara vertikal dalam suatu beakar glass lalu tambahkan 5 ml media RPMI-5 FCS yang hangat, lalu pijat sedotan perlahan. Setelah memotong ujung sedotan yang disegel tadi, kini didapat sel T yang non-adherent. Ulangi penambahan 15 ml media RPMI-5% FCS hangat, lalu pijat sedotan perlahan ke dalam tabung steril yang lain, hindari gelembung udara di dalam wool. Letakkan tetes terakhir pada haemo-cytometer Neubauer dan hitung. Untuk mendapatkan sel B yang melekat pada

wool, maka tambahkan 1,5 ml medium RPMI-5% FCS hangat, lalu pijat sedotan sekuat-kuatnya ke dalam tabung steril lain. Ulangi langkah ini dengan cara tersebut di atas sampai dengan total volume 5 ml media. Pusingkan sel B dalam tube tadi selama 5 menit pada 600 g. Lalu resus-pensi sel ke dalam 0,5 ml medium. Hitung sel dengan haemocytometer Neubaueur. Relative rasio antara sel non-adherent (sel T) dan sel adherent (Sel B) adalah 5 : 1,5 - 2. Bila rasio rendah berarti ada kontaminasi pada populasi sel yang adherent (sel B) dengan sel non-adherent (sel T).

Sel Target

1. Viability - Kelangsungan hidup sel harus sekitar 90% (ditentukan oleh pengeluaran zat warna).
2. Purity - Kebersihan sel harus bebas dari RBC, Platelets, granulocytes, dan monocyte. Sel B harus bersih minimal 85%.
3. Tidak boleh ada kontaminasi baik dengan bakteri ataupun jamur.

c) Penentuan Antigen HLA

Antigen HLA klas I (HLA-A, -B, dan -C) maupun antigen HLA klas II (HLA-DR dan -DQ) ditentukan dengan metode **Complement Dependent Microcytotoxic technique**.

1. Penentuan antigen HLA Klas I (HLA-A, -B, dan -C).

Prinsip dasar pemeriksaan : limfosit hidup diinkubasikan dengan antigen spesifik yang telah diketahui dengan antisera spesifik yang telah diketahui spesifitasnya, kemudian ditambahkan komplemen segar.

Bila antigen HLA-A, -B, dan -C yang sesuai dengan antisera yang spesifik tersebut di atas, maka limfosit akan mengadakan ikatan dengan antisera dan diikuti dengan aktivasi komplemen, sehingga menimbulkan kematian limfosit yang bersangkutan dan akan tampak di bawah inverted phase microscope berbeda dengan limfosit yang masih hidup, yaitu limfosit yang mati akan tampak membengkak dan berwarna kehitam-hitaman.

Cara Kerja

Seperseribu ml suspensi limfosit T yang telah dipisahkan tadi (konsentrasi sel $1,3-2,0 \times 10^6/\text{ml}$) ditambahkan pada tiap sumur Oriental Terasaki's Tray yang telah mengandung 0,001 ml antisera spesifik yang telah diketahui. Inkubasi selama 30 menit pada suhu $20^\circ-25^\circ\text{C}$. Ditambahkan 0,005 ml komplemen kelinci (Rabbit Complement) segar. Inkubasi lagi selama 1 jam pada suhu $20-25^\circ\text{C}$. Tambahkan bahan larutan cat Eosin 5% dalam aquadest sebanyak 2 μl . Hal ini untuk dapat membedakan sel yang beraksi positif dan negatif. Ditunggu sekitar 3-5 menit agar

sel yang lisis / mati dapat menyerap zat warna tersebut. Untuk menghentikan reaksi maka ditambahkan 0,005 ml Formaldehide 40% dengan pH 7,0 -7,3. Tutup tray dengan gelas penutup tray, dan tutup tepi gelas penutup tray dengan petrolatum cair untuk mencegah terjadinya penguapan. Letakkan tray pada suhu kamar sekitar 1 jam agar semua limfosit mengendap, baru kemudian dibaca di bawah inverted phase microscope. Namun dapat pula ditunda pada keesokan harinya, asalkan tray disimpan dalam lemari es, suhu 4°C.

2. Penentuan Antigen HLA klas II (HLA-DR dan HLA-DQ)

Prinsip dasar pemeriksaan : **Complement-Dependent Microcytotoxic Technique**, sama seperti pada penentuan antigen HLA-A, -B dan -C.

Cara Kerja

Beri tanda dengan spidol identifikasi subyek penelitian (nama dan jumlah sel) pada tutup dan sisi tray agar memudahkan pekerjaan selanjutnya. Cuci Hamilton Terasaki dispenser 50 µl, 10 x dengan aquadest sebelum dipakai. Isi Semprit Hamilton dengan suspensi limfosit B yang telah dipisahkan tadi (Konsentrasi $1-2 \times 10^6$ 6/ml), lalu dispense (keluarkan) 1 µl (\pm 2000 sel) dari suspensi sel tersebut secara teliti ke dalam tiap sumur Terasaki tray yang mengandung 0,001 ml (1 µl) antisera

spesifik yang telah diketahui. Campur hati-hati tanpa menyentuh dasar tray. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar (22 - 25°). Lalu tambahkan 0,005 ml (5 µl) komplemen kelinci segar (Rabbit Complement) dengan 250 µl Semprit Hamilton-Terasaki ke dalam setiap sumur dan campur hati-hati. Inkubasi lagi selama 1 jam pada suhu kamar. Tambahkan 5 µl larutan Eosin 5% dalam aquadest, ke dalam setiap sumur dengan 250 µl Semprit Hamilton Terasaki.

Setelah ditunggu sekitar 3 - 5 menit, tambahkan 5 µl Formaldehyde 40%, pH 7,0-7,3 kedalam setiap sumur tray. Lalu campur hati-hati dengan Semprit Hamilton Terasaki, jangan sampai menyentuh dasar tray. Inkubasi tray selama 1 jam pada suhu kamar, agar diharapkan seluruh sel sudah mengendap. Sekarang tray siap dibaca dibawah inverted phase mikroskop.

3. Cara Pembacaan / Penilaian Hasil Test

Pembacaan hasil pemeriksaan antigen HLA-A, -B, -C dan HLA-DR, -DQ dapat menggunakan mikroskop inverted binokuler, phase kontras. Penilaian hasil menggunakan pedoman sebagai berikut, reaksi itu positif bila ditandai dengan limfosit yang membengkak, dindingnya keriput, berwarna gelap kehitaman, karena sel tersebut mengalami lisis / mati karena dinding selnya rusak, dan menyerap warna Eosin. Reaksi negatif bila limfosit

tersebut tampak masih mengkilat, licin serta dindingnya masih utuh, sehingga tidak dapat menyerap warna Eosin.

Nilai tertinggi dimana semua sel mati, diberi nilai positif 8, sedangkan terendah dimana hanya 0 - 10% sel yang mati, diberi nilai 1 (satu) dan diantaranya berturut-turut 6, 4 dan 2.

% sel mati	Nilai
81 - 100	8
31 - 80	6
21 - 30	4
11 - 20	2
0 - 10	1

Catatan : Nilai 6 dan 8 dikelompokkan sebagai nilai positif, sedangkan nilai 1 dan 2 sebagai nilai negatif. Nilai pemeriksaan antigen HLA yang diperoleh selanjutnya dimasukkan ke dalam tabel khusus (lihat lampiran), sehingga tipe antigen HLA-A, -B, -C dan HLA-DR maupun -DQ dapat ditentukan.

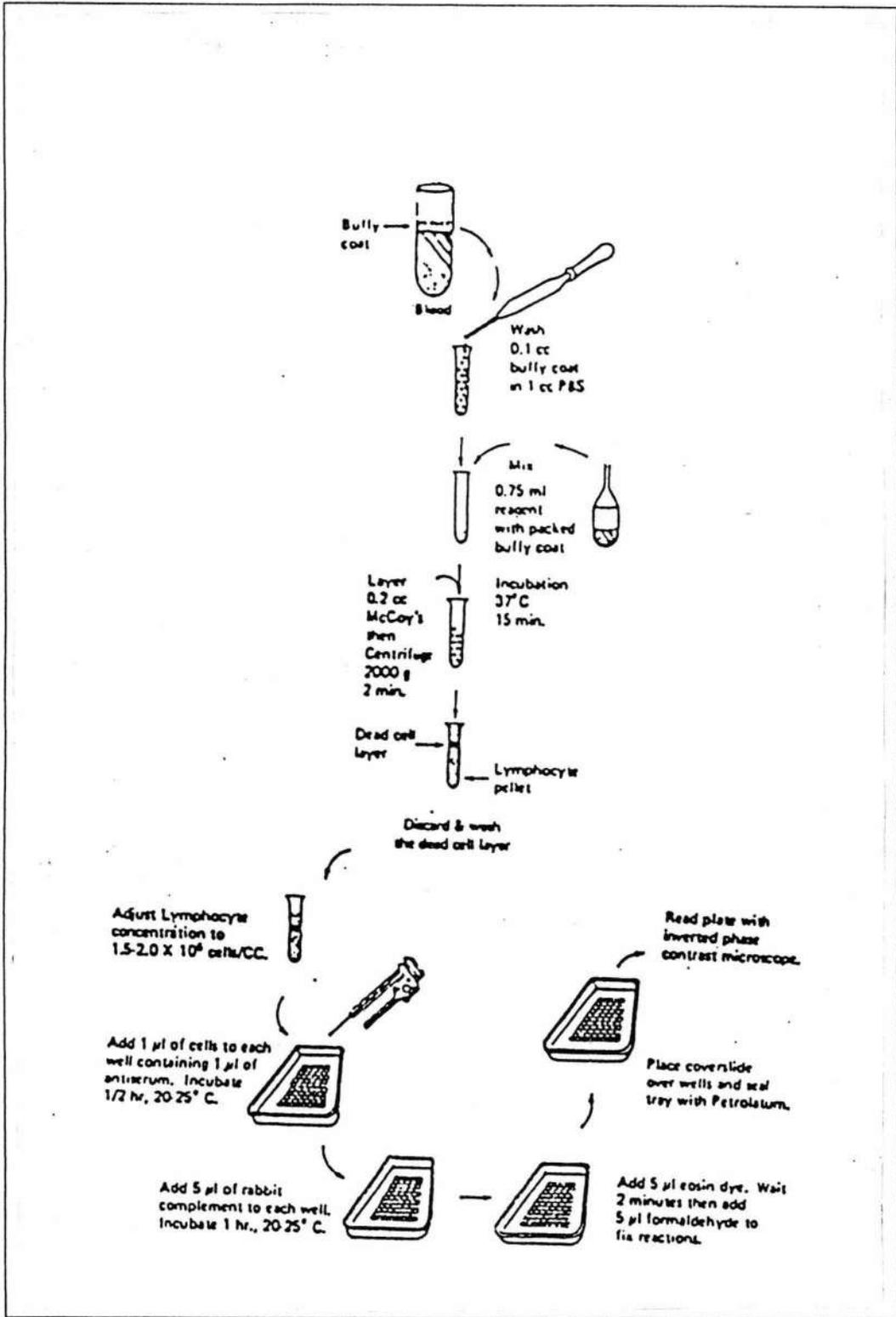
Cara kalkulasi presentase Viability sel suspensi :

$$100 - \frac{\text{Jumlah sel mati} \times 100}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{jumlah sel mati}}$$

4. Pemantapan Mutu

Pemantapan mutu pemeriksaan laboratorium pada penentuan antigen HLA dilakukan dengan menggunakan :

1. Serum kontrol positif dan negatif yang telah tersedia pada Terasaki's tray yang digunakan. Sehingga memudahkan pembacaan dan menghilangkan keraguan.
2. Darah individu yang pernah ditentukan antigen HLA klas I dan II di Reference Laboratory.



Gambar 4.1 Pelaksanaan Teknis Penentuan Antigen HLA Cara Mikrolimfositotoksitas (Tiwari & Terasaki, 1985)

5. Sumber-Sumber Kesalahan

Reaksi **false positif** disebabkan oleh :

- Viabilitiy limfosit yang buruk.
- Kontaminasi dengan antisera positif (*carry over*).
- Anti species antibody yang kuat didalam rabbit complement.
- Over inkubasi.
- Pengenceran anti serum yang tidak tepat.
- Temperatur inkubasi terlalu tinggi.
- Problem preparasi reagens, seperti PH, isotonisitas, kontaminasi bakteri / jamur.
- Kontaminasi berat oleh granulosit (granulosit biasanya dibunuh oleh rabbit complement, tetapi dapat dibedakan dari limfosit).
- Sensitivitas test yang meningkat akibat kerusakan limfosit (bisa timbul bila menggunakan frozen cells).
- Kehilangan zat fixative.

Reaksi **false negatif** disebabkan oleh :

- Kontaminasi yang berlebihan dari platelet atau granulosit (sel bersaing dengan limfosit terhadap antibodi).
- Temperatur inkubasi terlalu rendah.
- Waktu inkubasi terlalu pendek.
- Kehilangan antiserum atau complement dalam test.

- Pencampuran sel dengan antiserum atau dengan complement yang tidak sempurna (bila terlalu banyak minyak dalam sumuran dapat menimbulkan hal ini).
- Keburukan antiserum (inaktif antibodi atau anti complementarity dan kontaminasi bakteri).
- PH antisera yang rendah disebabkan oleh CO₂ dari dry-ice selama transportasi.
- Konsentrasi sel target yang berlebihan (mengurangi sensitivity test).
- Efek pengobatan penderita.
- Kontaminasi yang tinggi dari sel T terhadap sel B untuk typing HLA-DR dan HLA-DQ.

b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Merupakan suatu teknik molekuler terbaru bagi tissue typing (penetapan jenis antigen) untuk typing HLA klas I dan II. Teknik DNA Typing ini mampu memberikan informasi yang lebih banyak tentang variasi genetik.

Keuntungan-keuntungan PCR : **(Dyer dan Middleton, 1993)**

1. Viability sel, tipe sel atau ekspresi sel permukaan tidak terlalu penting.
2. DNA proses dapat diperbaharui, bilamana akan melanjutkan screening terhadap antisera dengan serotyping.
3. Dapat mempertegas / memperjelas homozygosity.

4. Sampel DNA dapat dengan mudah ditransportasikan dari satu lokasi ke lokasi yang lain.
5. Dapat mengurangi keterlibatan subyektifitas dalam menginterpretasikan data.

a) **Ekstraksi DNA**

Digunakan metode “**salting-out**”, yaitu dengan menggunakan “phenol” sebagai organic deproteinizer. Metode ini mempunyai beberapa keunggulan dibanding metode lainnya (misalnya : Chelex - DNA extraction), yaitu :

- DNA yang dihasilkan lebih murni, homogenous dan tidak mengalami degradasi serta volume bisa lebih banyak.
- Bila diresuspensi di dalam larutan buffer maka DNA dapat disimpan pada suhu 4°C untuk pemakaian harian dan dapat pula disimpan pada suhu -80°C untuk penggunaan waktu lama.
- Prosesnya lebih cepat dan ekonomis.

b) **Gen HLA Klas II**

Gen HLA klas II meliputi HLA-DRB, -DQA, -DQB dan -DPB adalah gen yang terletak pada lengan kromosom 6 yang menjadi molekul HLA Klas II rantai α dan β . Keberadaan gen tersebut ditetapkan dengan menggunakan metode **Polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide (PCR SSO) reverse dot blot**. Hasil pemeriksaan dinyatakan dalam positif atau negatif.

c) Pemeriksaan Gen HLA-DRB

Dalam penelitian ini pemeriksaan gen HLA Klas II hanya dilakukan terhadap gen HLA-DRB, dengan alasan :

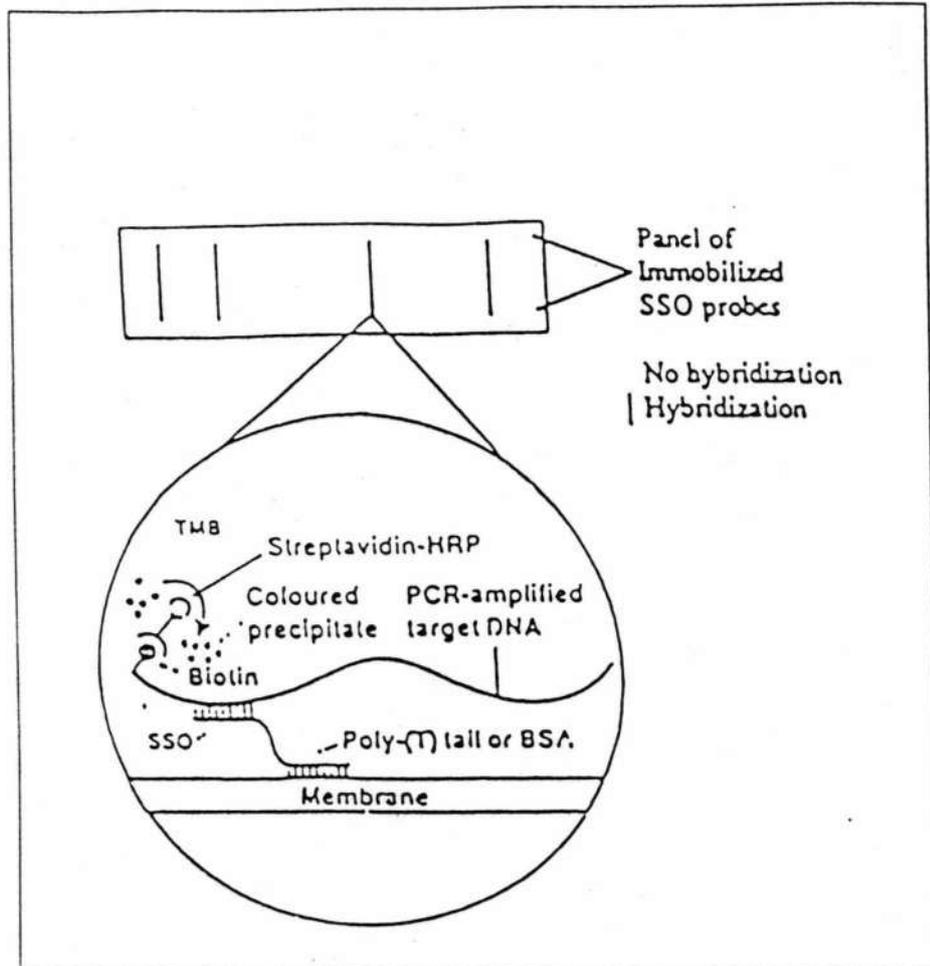
1. Hasil pemeriksaan antigen HLA-DR secara serologi terdahulu, 41,60% untuk kelompok kontrol tidak bisa terlacak (Tabel 5.5).
2. Dari hasil penelitian-penelitian sebelumnya ternyata gen HLA-DRB memainkan peranan penting dalam perkembangan klinis type penyakit lepra.

Pemeriksaan gen HLA-DRB resolusi rendah dilakukan dengan metode **PCR - SSO reverse dot blot** dengan menggunakan **Kit AMPLICOR (ROCHE)**. Pemicu dan pelacak SSO yang digunakan, disintesa di **Academisch Ziekenhuis Leiden, AZL, Laboratorium Immunoematologi**.

Prinsip pemeriksaan gen HLA-DRB resolusi rendah dengan metode PCR - SSO reverse dot blot.

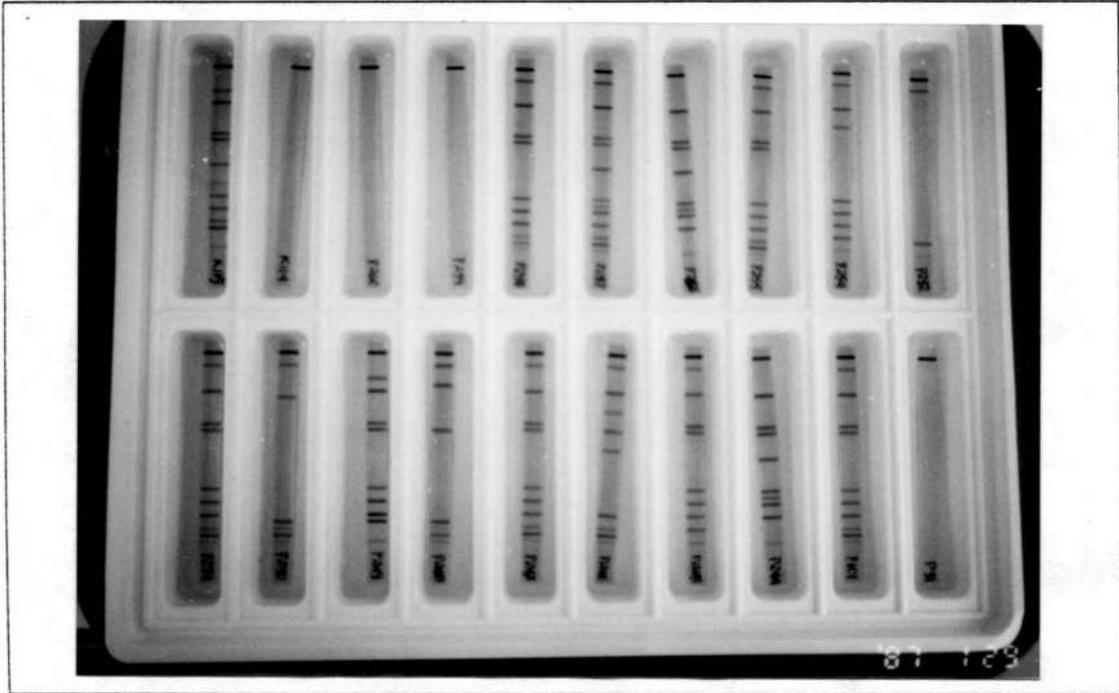
Metode **PCR - SSO reverse dot blot** didasarkan pada 3 proses utama yaitu amplikasi urutan sasaran dengan PCR, hibridisasi produk amplifikasi dengan pelacak oligonucleotida urutan spesifik yang dilekatkan pada membran nilon dan deteksi pelacak yang terikat dengan reaksi pembentukan warna. Pada reaksi amplifikasi, sepasang pemicu yang telah ditandai biotin akan melekat pada regio sasaran dan selanjutnya oleh enzim polimerase akan diperpanjang dari arah 5'

ke arah 3' dengan memanfaatkan kelebihan deoksi nukleosida trifosfat (dNTPs) yang terdapat dalam campuran reaksi. Hasil amplifikasi akan berbentuk urutan komplementer DNA yang tertanda biotin yang disebut **Amplikon**. Sejumlah pelacak oligonukleotide urutan spesifik dilekatkan pada membran nilon untuk mengikat amplikon tertentu. Sistem deteksi pada pemeriksaan ini adalah menggunakan konjugat streptavidin horse radish peroxidase (SA-HRP) yang akan melekat pada ampikon yang terikat pada membran. substrat yang digunakan untuk pembentukan warna adalah hydrogen peroxida (H_2O_2) dan trimethyl benzidine (TMB). Pola pita (bands) dengan warna biru yang berbentuk dibandingkan dengan acuan (template) untuk mengidentifikasi jenis allel pada specimen test.



Gambar 4.2 Prinsip Pemeriksaan gen HLA-DRB dengan metode PCR-SSO Reverse dot blot

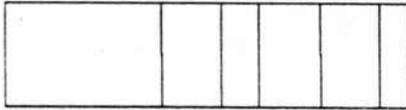
Proses pencairan dan cara isolasi DNA dilampirkan dalam lampiran 1, lampiran 2 dan lampiran 3, sedangkan pemeriksaan gen HLA Klas II (HLA-DRB) resolusi rendah dilampirkan dalam lampiran 4.



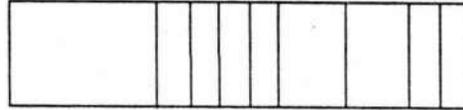
Gambar 4.3 Hasil HLA-DRB typing dengan tehnik “PCR reverse dot blot (resolusi rendah)”

Gambar 4.3 Foto hasil pemeriksaan gen HLA-DRB resolusi rendah dengan menggunakan tehnik PCR-SSO reverse dot blot dari sebagian sampel penelitian, berupa membran nilon yang diletakkan pada suatu nampan dengan cekungan. Garis-garis (pita) pada membran menunjukkan adanya hibridasi yang positif dengan pelacak tertentu. Selanjutnya setiap membran dibandingkan dengan acuan untuk menetapkan adanya kesesuaian posisi pita. Hal ini akan menjadi dasar untuk menetapkan alel HLA-DRB pada sampel yang diteliti.

Beberapa contoh :

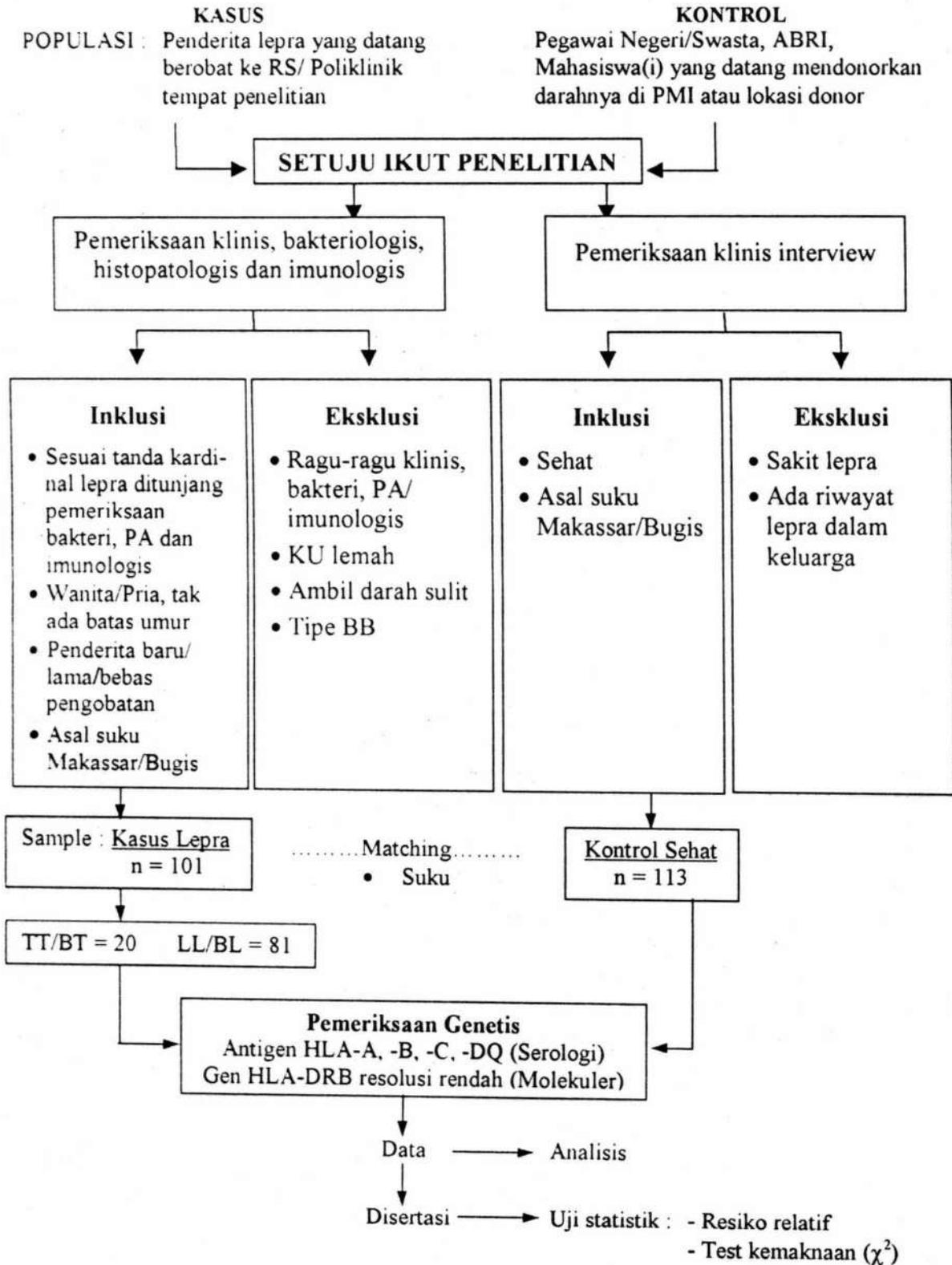


HLA-DRB₁ 1201-1203
 HLA-DRB₃ 0301



HLA-DRB₁ 1501-1504, 1601-1603
 1605-1606
 HLA-DRB₅ 0102, 0201-0203
 HLA-DRB₁ 1201-1203
 HLA-DRB₃ 0301

4.5 Protokol Penelitian



Gambar 4.4 Protokol Penelitian