

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu *eksperimental* dengan menggunakan desain penelitian kuantitatif. Variabel bebas penelitian ini yaitu pengaruh waktu penyimpanan sampel *whole blood* dan variabel terikat adalah kuantitas HBV DNA dengan metode *Real-Time PCR*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel darah HBV positif dilakukan di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung. Pemeriksaan sampel darah HBV positif dilakukan menggunakan *Real-Time PCR* di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2024.

C. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah 1 kantong darah donor yang diperoleh dari UDD Pembina PMI Provinsi Lampung. Kriteria subyek penelitian yaitu berbentuk *whole blood* yang dinyatakan positif Hepatitis B (HBV). Sampel tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan disimpan dalam jangka waktu 1, 3, dan 7 hari.

D. Variabel dan Definisi Operasional

3.1 Tabel Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Waktu penyimpanan 1, 3, 7 hari	Sampel yang disimpan selama 1, 3, 7 hari	Observasi	Jam	1, 3, dan 7 hari	Nominal
2	Kuantitas HBV DNA	Jumlah molekul HBV DNA (+) yang ada didalam sampel darah	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	<i>Real-Time</i> PCR	<i>Viral Load</i> (IU/mL)	Rasio

E. Pengumpulan Data

Data diperoleh dari penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh dari hasil eksperimental yaitu hasil dari pengukuran kuantitas HBV DNA metode *Real-Time PCR* dengan penundaan waktu perlakuan pada sampel whole blood yaitu 1, 3, dan 7 hari.

Pengumpulan data dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Melakukan penelusuran Pustaka untuk mendapatkan pandangan ilmiah tentang penelitian .
2. Melakukan pre-survey pada lokasi penelitian, yaitu di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.
3. Melakukan pengajuan surat izin pengambilan sampel yang diajukan ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
4. Setelah mendapatkan surat dari Jurusan, peneliti mendapat izin mengambil sampel di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung. Setelah menandai tanggal dan jam pengambilan, perhatikan kondisi tempat penyimpanan, pengemasan, kemudian dimasukkan ke dalam box dan dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

5. Selanjutnya peneliti dapat mengolah sampel HBV DNA positif dengan membandingkan waktu penyimpanan yaitu 1, 3, dan 7 hari untuk dilihat kuantitas HBV DNA dengan menggunakan metode *Real-Time PCR*.
6. Alat dan bahan
 - a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, handscoon, masker, jas laboratorium, tabung darah, wadah penyimpanan sampel, kulkas, tabung microsentrifus, centrifuge, inkubator, tabung koleksi, mikropipet, tip, kolom GD, dan *Real-Time PCR*.
 - b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, RBC lysis buffer, GB buffer, buffer elusi, etanol absolute, buffer W1, dan wash buffer.
7. Prosedur Pemeriksaan
 - a. Metode Pemeriksaan

Metode yang digunakan adalah *Real-Time PCR*. *Real-Time PCR* digunakan untuk mendeteksi keberadaan materi genetik virus dalam sampel dan juga dapat menghitung kuantitas jumlah HBV DNA
 - b. Prinsip Pemeriksaan

Metode yang digunakan untuk mendeteksi dan mengamplifikasi RNA menjadi DNA komplementer (cDNA).
 - c. Cara Kerja

Pemeriksaan *Real-Time PCR*.

 - 1) Persiapan sampel *whole blood*
 - a) Siapkan sampel *whole blood* dan masukkan ke dalam tabung EDTA masing- masing sebanyak 3 ml ke dalam 3 tabung. Bila ingin ditunda pemeriksaan simpan *whole blood* dengan suhu penyimpanan 2-8⁰C.

- b) Kemudian sampel *whole blood* dipisahkan terlebih dahulu untuk mendapatkan plasma/ serum dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 10-15 menit.
 - c) Segera pisahkan sampel plasma atau serum ke dalam tabung steril (untuk mencegah terbawanya sel darah dan komponen darah lainnya).
 - d) Setelah didapatkan sampel berupa plasma
 - e) Siapkan microsentrifus 1,5 ml dan tambahkan 300 μ l *whole blood*.
 - f) Tambahkan 3x volume *whole blood* (900 μ l buffer RBC).
 - g) Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.
 - h) Centrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3.000 rpm lalu buang supernatant seluruhnya.
 - i) Menambahkan 100 μ l RBC Lysis Buffer untuk meresuspensi pellet leukosit kemudian dilanjutkan dengan melisiskan sel. Selanjutnya akan dilakukan ekstraksi DNA
- 2) Ekstraksi DNA (Kit *Sacace*)
- Langkah 1 (Lisis sel)
- a) Menambahkan 200 μ l GB Buffer kemudian kocok tabung mikrosentrifus 1,5 ml dengan kuat.
 - b) Inkubasi pada suhu 60°C selama minimal 10 menit untuk memastikan sampel lisat bersih. Selama inkubasi, balikkan tabung setiap 3 menit (pada saat ini, dipanaskan 200 μ l buffer elusi pada suhu 60°C untuk Langkah ke 4 elusi DNA).
 - c) Setelah diinkubasi 60°C tambahkan 5 μ l Rnase kemudian homogenkan dengan kuat.
 - d) Inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit.
- Langkah 2 (Mengikat DNA)
- a) Tambahkan 200 μ l etanol absolut ke lisat lalu segera campurkan dengan cara dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika muncul endapan, pecahkan dengan pipet.

- b) Tempatkan kolom GD ditabung koleksi 2 ml.
- c) Pindahkan campuran (termasuk endapan) ke kolom GD kemudian dicentrifuge pada 14.000-16.000 xg selama 5 menit.
- d) Buang tabung koleksi 2 ml lalu tempatkan kolom GD dalam tabung koleksi 2 ml yang baru.

Langkah 3 (Mencuci)

- a) Tambahkan 400 μ l Buffer W1 ke dalam kolom GD kemudian centrifuge pada 14.000-16.000 xg selama 30-60 detik.
- b) Buang cairan yang ada ditabung koleksi 2 ml lalu tempatkan kolom GD dalam tabung koleksi 2 ml yang baru.
- c) Tambahkan 600 μ l Wash Buffer (pastikan telah di tambahkan etanol) ke kolom GD.
- d) Centrifuge pada 14.000-16.000 xg selama 30-60 detik kemudian buang cairan yang ada ditabung koleksi 2 ml.
- e) Tempatkan kolom GD Kembali ditabung koleksi 2 ml.
- f) Centrifuge selama 3 menit pada 14.000-16.000 xg untuk mengeringkan matriks kolom.

Langkah 4 (Elusi DNA)

- a) Volume elusi standar adalah 100 μ l, jika sampel yang di gunakan lebih sedikit, kurangi volume elusi (30-50 μ l) untuk meningkatkan konsentrasi DNA.
- b) Jika diperlukan DNA lebih tinggi, ulangi langkah Elusi DNA untuk meningkatkan pemulihan DNA dan total voume Elusin hingga kira-kira 200 μ l.
- c) Pindahkan yang sudah kering ke kolom GD ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang bersih.
- d) Menambahkan 100 μ l Buffer Elusi yang telah di panaskan sebelumnya, dan tambahkan TE atau aquabidest ke tengah dari matriks kolom.
- e) Diamkan selama minimal 3 menit untuk memastikan Buffer Elusi dan TE atau aquabidest diserap seluruhnya.

- f) Centrifuge pada 14.000-16.000 xg selama 30 detik untuk mengelusi DNA murni.
- g) Centrifuge kembali selama 3 menit pada kecepatan 14.000-16.000 xg untuk mengeringkan.
- 3) Running *Real-Time PCR*.
- Siapkan tube yang akan digunakan.
 - Masukan tube ke dalam *Real-Time PCR*.
 - Pilih menu *Real-Time PCR* pada computer.
 - Pada info eksperimen di isi data pengoperasian.
 - Klik menu "Plate Edit".
 - Pilih program sesuai dengan kebutuhan.
 - Blok well standar lalu pilih auto standar, buat pengulangan sebanyak 3x, lalu apply.
 - Pilih *run method*, lihat apakah siklus sudah tepat sesuai dengan Intruksi kerja, jika sudah klik start. Proses running sudah berjalan (kira-kira selama 2 jam).

Suhu pada *Real-Time PCR* sebagai berikut:

3.2 Tabel Suhu *Real-Time PCR*

Stage	Temp °C	Waktu	Deteksi Fluorescence	Siklus Berulang
Hold	50	2 menit	-	1
Cycling 1	94	1 menit	-	1
	94	10 detik	-	
Cycling 2	60	20 detik	FAM/Green,JO E/Yellow/HEX	50

8. Hasil pemeriksaan yang telah didapatkan akan diolah oleh peneliti.

F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Data yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, kemudian data tersebut diolah dengan menggunakan program komputer dengan langkah-langkah sebagai berikut :

a) *Editing Data*

Adalah tahap dimana penulis memeriksa data yang dimasukkan untuk melihat apakah ada kesalahan atau tidak.

b) *Entry Data*

Tahap dimana data yang telah decoding kemudian diolah dengan menggunakan program komputer.

c) *Procesing Data*

Proses mengintegrasikan data dari check list ke program komputer agar dapat dianalisis.

d) *Cleanning Data*

Dilakukan pengecekan ulang data yang telah dentry, hal ini bertujuan untuk melihat ada atau tidaknya kemungkinan kesalahan memasukkan data.

2. Analisis Data

a) Analisa Univariat

Analisa ini digunakan untuk melihat distribusi frekuensi pada setiap variabel penelitian

b) Analisa bivariat

Data yang diperoleh kemudian dianalisa menggunakan analisa data bivariat untuk menentukan hubungan linier antara dua variabel dengan menggunakan uji Regresi Linier (sederhana) untuk mendapatkan sejauh mana variabel independen (variabel prediktor) mempengaruhi variabel dependen (variabel respons) yaitu waktu penyimpanan sampel *whole blood* dapat mempengaruhi kuantitas HBV DNA yang diuji dengan metode *Real-Time PCR*.

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian ini menggunakan sampel dari darah donor HBV positif sebagai subyek untuk dijadikan sampel pemeriksaan, sehingga perlu dilakukan proses telaah secara etik dengan menyerahkan naskah proposal kepada Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No.386/KEPK-TJK/IV/2024 untuk dinilai kelayakannya. Peneliti menjaga kerahasiaan mengenai identitas sampel, peneliti tidak mencantumkan nama pada sampel penelitian yang diteliti. Identitas subyek penelitian akan dirahasiakan. Dan seluruh biaya yang berkaitan dengan penelitian ini ditanggung oleh peneliti sendiri.