

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu eksperimental dengan menggunakan desain penelitian kuantitatif.

B. Lokasi dan Waktu penelitian

1. Lokasi

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

2. Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2024.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini yaitu 1 kantong darah donor yang diperoleh dari UDD Pembina PMI Provinsi Lampung. Kriteria subyek penelitian harus berbentuk *whole blood* yang dinyatakan positif Hepatitis B (HBV). Sampel tersebut akan diisolasi menggunakan kertas saring *whatman No.3* dan 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 Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Kertas saring <i>whatman No.3</i>	Kertas saring yang memiliki pori-pori halus dan digunakan untuk memisahkan partikel padat dari cairan.	Memotong kertas saring sesuai dengan ukuran yang dibutuhkan	Gunting	cm	Nominal
2.	Waktu penyimpanan 1, 3, dan 7 hari	Sampel yang disimpan selama 1, 3, dan 7 hari	Observasi	Jam	1, 3, dan 7 hari	Ordinal

3.	<i>Value</i> HBV menggunakan <i>Real-Time</i> PCR	Jumlah siklus untuk mencapai ambang batas deteksi	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	<i>Real-Time</i> PCR	<i>Viral Load</i>	Rasio
----	---	---	----------------------------------	----------------------	-------------------	-------

E. Teknik Pengumpulan Data

Data yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah data primer yang didapatkan dari hasil eksperimental. Data yang diperoleh dengan cara dan proses antara lain sebagai berikut:

1. Melakukan penelusuran Pustaka untuk mendapatkan pandangan ilmiah tentang penelitian.
2. Melakukan pre-survey untuk menentukan dan mendapatkan sampel yaitu di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.
3. Melakukan pengajuan surat izin pengambilan sampel yang diajukan ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Kemenkes Poltekkes Tanjungkarang.
4. Setelah didapatkan surat dari Jurusan, peneliti dapat izin mengambil sampel di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung. Perhatikan kondisi tempat penyimpanan, waktu pengambilan, memberikan label dengan mencantumkan tanggal dan waktu pengambilan sampel. Setelah itu dimasukkan kedalam box dan sampel dibawah kelaboratorium Biologi Molekuler di jurusan Teknologi Laboratorium Medis Kemenkes Poltekkes Tanjungkarang.
5. Selanjutnya peneliti dapat mengolah sampel dari sampel dimasukan ke kertas saring *Whatman No.3*, sampel disimpan (selama 1, 3, dan 7 hari), dan diuji menggunakan alat *Real-Time* PCR.
6. Alat dan bahan
 - a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu, handscoon, masker, jas laboratorium, tabung darah, rak tabung, kertas saring, kulkas, tabung microsentrifus, mikrocentrifuge, inkubator, vortex, mikropipet, tip, gunting, dan *Real-Time* PCR.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu, PBS (buffer saline posfat), GB buffer, buffer elusi, etanol absolute, buffer W1, wash buffer, aquabidest, kolom GD dan tabung koleksi.

7. Prosedur Pemeriksaan

a. Metode Pemeriksaan

Metode pemeriksaan 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.

c. Cara kerja

1) Isolasi darah kering (Persiapan sampel)

- a) Sampel darah ditetaskan ke kertas saring yang sudah disiapkan. Bila ingin ditunda pemeriksaan simpan kertas saring pada suhu ruang yang tidak terpapar matahari langsung.
- b) Tunggu kertas saring hingga mengering supaya sampel darah terserap pada kertas saring.
- c) Potong kertas saring yang sudah ditetaskan darah dan sudah kering.
- d) Masukkan potongan kertas tersebut didalam tabung reaksi.
- e) Tambahkan 450 μ l larutan PBS kedalam tabung agar DNA tersuspensi.
- f) Inkubasi 10 menit pada suhu kamar agar DNA tersuspensi dengan baik.
- g) Homogenkan dengan cara dikocok atau menggunakan vortex selama 10 detik.
- h) Ambil kertas saring yang ada ditabung dan buang.
- i) Masukkan sampel tersebut kedalam tabung mikrosentifuge.

- j) Selanjutnya dicentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 xg.
- k) Supernatant dibuang dan menyisahkan endapan (pelet) di tabung.

2) Isolasi 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.
- 2) Running *Real-Time* PCR
- a) Siapkan tube *Real-Time* PCR yang akan digunakan.
 - b) Masukkan 50 μ l sampel kedalam tube *Real-Time* PCR.
 - c) Pasang kabel power dengan menyambungkan sumber listrik ke UPS, untuk menjaga tegangan listrik tetap stabil.
 - d) Nyalakan komputer dengan menekan tombol power CPU.

- e) Nyalakan alat dengan menekan tombol power disebelah kiri alat dan masukkan tube yang berisi sampel ke well *Real-Time* PCR.
- f) Klik aplikasi RTQ-960 lalu login dengan :
User : Admin
Password : admin 123456
- g) Pilih New Experiment, klik Menu “Basic Info” kemudian masukkan data (Name : isi sesuai nama pengerjaan).
- h) Menu “Plate Info” untuk Registrasi program dan jumlah pengerjaan sampel (Program : *Sacace* HBV-Acon, Samole Type : Positive Control, Negative Control, Sampel).
- i) Register data pasien sesuai sampel yang sudah di input pada well *Real-Time* PCR.
- j) Running *Real-Time* PCR, pilih RUN Method kemudian START. (proses running selama 1 jam 30 menit)
- k) Baca hasil dapat dilihat pada tabel interpretasi hasil Acon Promotor RTQ-960.
- l) Jika proses running telah selesai. Keluarkan tube dari block well.
- m) Sebelum menekan powe OFF, kembalikan pengaturan ke posisi semula.
- n) Cabut kabel dari sumber listrik.

Suhu pada *Real-Time* PCR sebagai berikut:

3.2 Tabel Suhu *Real-Time* PCR

<i>Stage</i>	Temp °C	Waktu	Deteksi Fluorescence	Siklus Berulang
<i>Hold</i>	95	15 menit	-	1
	95	5 detik	-	
<i>Cycling</i>	60	20 detik	-	5
	72	15 detik	-	
	95	5 detik	-	
<i>Cycling 2</i>	60	30 detik	FAM/Green, JOE/Yellow/HEX	40
	77	15 detik	-	

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

F. Pengolahan Data dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

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

- a. *Editing Data* merupakan tahapan dimana penulis memeriksa data yang dimasukkan untuk melihat apakah ada kesalahan atau tidak.
- b. *Coding* adalah tahapan pengubahan data yang berupa kalimat atau huruf menjadi data yang berupa angka atau bilangan.
- c. *Entry Data* adalah data yang selesai dikodekan dan diproses menggunakan komputer.
- d. *Procesing Data* merupakan proses mengintegrasikan data dari check list ke program komputer agar dapat dianalisis.
- e. *Cleaning Data* adalah tahapan pengecekan kembali data yang telah dimasukkan apakah ada kesalahan saat memasukkan data kekomputer.

2. Analisa Data

a. Analisa Univariat

Analisa ini digunakan untuk melihat distribusi frekuensi pada setiap variabel penelitian.

b. Analisa Bivariat

Data yang diperoleh kemudian dianalisa menggunakan data bivariat dengan menggunakan uji *One Way Anova*. Uji *One Way Anova* ini digunakan untuk membedakan/membandingkan rata-rata dua kelompok data yang berpasangan/terikat yaitu variasi waktu penyimpanan dan kertas saring *whatman No.3* dilakukan pengujian terhadap nilai CT (*Cycle Threshold*) HBV DNA dengan menggunakan *Real-Time PCR*.

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Keterangan Layak Etik No. 232/KEPK-TJK/II/2023 .Penelitian ini menggunakan sampel manusia sebagai subyek penelitian dan pada penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah

yang dihasilkan dalam penelitian ini akan dikumpulkan dalam penanganan limbah. Limbah berupa sampel darah HBV positif, tabung reaksi sisa sampel, tabung GD dan tabung koleksi akan diperlakukan sebagai limbah infeksius dan akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan.