

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian bersifat analitik dengan desain penelitian *cross sectional*. Variabel bebas adalah kadar HBsAg metode CLIA dan variabel terikat adalah kadar HBV DNA metode *Real Time* PCR.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian untuk pemeriksaan kadar HBsAg metode CLIA dan pengambilan sampel darah donor dilaksanakan di Instalasi Laboratorium IMLTD UDD Pembina PMI Provinsi Lampung, Sedangkan lokasi penelitian untuk pemeriksaan kadar HBV DNA metode *Real Time* PCR dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai Juni 2024.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah sampel darah donor bulan Maret – April tahun 2024 yang berasal dari UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sampel darah donor bulan Maret-April dengan kriteria sampel dilakukan pemeriksaan terlebih dahulu dengan metode CLIA alat Mindray CL-6000i, kemudian dilihat hasilnya dan dipilih 20 sampel yang memenuhi kriteria sampel yaitu sampel berupa plasma, sampel darah donor dengan jumlah donasi donor pertama kalinya, dan hasil pemeriksaan metode CLIA memiliki hasil reaktif rendah kadar HBsAg dan non reaktif HBsAg.

Teknik sampling yang digunakan *accidental sampling* yaitu pengambilan sampel secara aksidental dengan mengambil kasus atau responden yang kebetulan ada atau tersedia di suatu tempat sesuai dengan konteks penelitian (Notaatmodjo, 2010).

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Metode CLIA	Kadar HBsAg metode CLIA	Kuantitatif menggunakan metode CLIA	CLIA Mindray 6000i	IU/ml	Rasio
Metode Real Time PCR	Kadar HBV DNA metode <i>Real Time</i> PC	Kuantitatif menggunakan metode Real Time PCR	Real Time PCR promotor	<i>Viral Load</i> IU/ml	Rasio

D. Pengumpulan Data

1. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan berupa data primer berasal dari data penelitian. Data hasil pemeriksaan HBsAg metode CLIA mencakup kadar HBsAg kuantitatif dan interpretasi hasil yang dilakukan pemeriksaannya di Instalasi Laboratorium IMLTD UDD Pembina PMI Provinsi Lampung. Data hasil pemeriksaan HBV DNA metode *Real Time* PCR mencakup kadar HBV pada sampel darah donor reaktif hepatitis B yang dilakukan pemeriksaannya di Laboratorium Biologi Molekuler Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

Prosedur pengambilan data primer dan pengambilan sampel reaktif di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung sebagai berikut :

- a. Peneliti melakukan pra-survei penelitian di UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.
- b. Peneliti melakukan penelusuran pustaka terkait judul penelitian yang akan diambil.
- c. Peneliti mengajukan surat izin penelitian dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.
- d. Peneliti dengan membawa surat izin penelitian menghubungi bagian Laboratorium IMLTD UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.

- e. Setelah disetujui, peneliti dapat melakukan penelitian pemeriksaan kadar HBsAg metode CLIA di Laboratorium IMLTD UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.
 - f. Data yang diperoleh selanjutnya diolah sesuai dengan variabel yang diteliti, dan sampel plasma yang diambil untuk dilanjutkan pemeriksaan HBV DNA dengan metode *Real Time* PCR dikumpulkan menjadi *pooled sera* di *freezer* suhu -25°C Laboratorium IMLTD UDD Pembina PMI Provinsi Lampung.
 - g. Hasil penelitian yang diperoleh kemudian disimpulkan.
Prosedur pengambilan data primer penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang sebagai berikut :
 - a. Peneliti melakukan penelusuran pustaka terkait judul penelitian yang akan diambil.
 - b. Peneliti mengajukan surat izin penelitian dari Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.
 - c. Peneliti dengan membawa surat izin penelitian menghubungi bagian Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.
 - d. Setelah disetujui, peneliti dapat melakukan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler terhadap sampel reaktif hepatitis B menggunakan metode *Real Time* PCR.
 - e. Setelah dilakukan penelitian didapatkan data berupa data primer yaitu kadar hepatitis B metode *Real Time* PCR, Kemudian data yang diperoleh selanjutnya diolah sesuai dengan variabel yang diteliti.
 - f. Hasil penelitian yang diperoleh kemudian disimpulkan.
2. Pemeriksaan Laboratorium
- a. Pemeriksaan Kadar HBsAg Metode CLIA
 - 1) Persiapan Reagen:

Sebelum memasukkan kit reagen HBsAg ke dalam alat untuk pertama kalinya, balikkan botol reagen yang belum dibuka secara perlahan setidaknya 30 kali untuk mensuspensikan kembali mikropartikel yang telah mengendap selama pengiriman atau

penyimpanan. Periksa botol secara visual untuk memastikan mikropartikel telah terhomogenisasi. Jika mikropartikel masih menempel pada botol, lanjutkan membalik hingga mikropartikel tersuspensi kembali sepenuhnya. Jika botol reagen sudah homogen buka penutup reagen pada alat lalu masukkan reagen dan tutup kembali setelahnya alat akan menghitung otomatis reagen yang sudah ditambahkan (Mindray, 2021).

2) Preparasi Sampel:

Sentrifuge tabung sampel dengan kecepatan 4000 RPM selama 10 menit, lalu lihat apakah sampel tidak terdapat fibrin/clot, pastikan plasma pada tabung sampel cukup.

3) Prosedur *running* sampel metode CLIA mindray:

Pastikan alat CLIA mindray 6000-I siap digunakan, input data sampel yaitu berupa scan barcode pada layar computer dibagian program sampel id dan pilih parameter pemeriksaan yang akan di uji, lalu tekan tombol "*Run*" pada alat mindray 6000-i dan tunggu hingga 45 menit untuk melakukan interpretasi hasil pengujian.

b. Pemeriksaan kadar HBV DNA metode *Real Time* PCR

1) Ekstraksi Sampel dengan kit ekstraksi :

- a) Siapkan microsentrifus 1,5 ml dan tambahkan 100 µl plasma.
- b) Tambahkan 3x volume whole blood (300 µl buffer RBC).
- c) Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.
- d) Centrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3.000 rpm lalu buang supernatant seluruhnya.
- e) Menambahkan 100 µl RBC Lysis Buffer untuk meresuspensi pellet leukosit kemudian dilanjutkan dengan melisiskan sel.
- f) Menambahkan 200 µl GB Buffer kemudian kocok tabung mikrocentrifus 1,5 ml dengan kuat.
- g) Inkubasi pada suhu 60°C selama minimal 10 menit untuk memastikan sampel lisat bersih. Selama inkubasi, balikkan tabung setiap 3 menit.

- h) Tambahkan 200 μ l etanol absolut ke lisat lalu segera campurkan dengan cara dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika muncul endapan, pecahkan sebanyak mungkin dengan pipet.
- i) Letakkan sebuah kolom GD disebuah tabung koleksi 2 ml.
- j) Pindahkan campuran (termasuk endapan) ke kolom GD kemudian disentrifuge pada 14.000-16.000 rpm selama 5 menit.
- k) Buang tabung koleksi 2 ml lalu tempatkan kolom GD dalam tabung yang baru koleksi 2 ml.
- l) Tambahkan 400 μ l Buffer W1 ke dalam kolom GD kemudian centrifuge pada 14.000-16.000 rpm selama 30- 60 detik.
- m) Buang *flow-through* lalu tempatkan ke kolom GD di tabung pengumpul 2 ml.
- n) Tambahkan 600 μ l Wash Buffer (pastikan telah di tambahkan etanol) ke kolom GD.
- o) Centrifuge pada 14.000-16.000 rpm selam 30-60 detik kemudian buang *flow-through*.
- p) Tempatkan kolom GD Kembali ditabung koleksi 2 ml.
- q) Centrifuge selam 3 menit pada 14.000-16.000 rpm untuk mengeringkan matriks kolom.
- r) 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.
- s) Jika diperlukan DNA lebih tinggi, ulangi langkah Elusi DNA untuk meningkatkan pemulihan DNA dan total voume Elusin hingga kira-kira 200 μ l.
- t) Pindahkan yang sudah kering ke kolom GD ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang bersih.
- u) Menambahkan 100 μ l Buffer Elusi yang telah di panaskan sebelumnya ke tengah dari matriks kolom.
- v) Diamkan selama minimal 3 menit untuk memastikan Buffer Elusi diserap seluruhnya.

w) Centrifuge pada 14.000-16.000 rpm selama 30 detik untuk mengelusi DNA murni.

2). Prosedur Sampel *Running Real Time* PCR:

- a) Siapkan tube PCR sejumlah 20 tube PCR untuk sampel, 5 tube PCR 1 untuk NC, 3 PC, dan 1 WPC, 6 tube PCR 3 untuk CS1 dan 3 untuk CS2.
- b) Tambahkan 100µl sampel, 100µl control dan 100µl calibrator ke dalam masing-masing tube PCR.
- c) Tutup dengan aluminium foil dan pindahkan ke dalam instrumen *Real Time* PCR.
- d) Pilih menu *Real Time* PCR pada computer.
- e) Pada info eksperimen di isi data pengoperasian.
- f) Klik menu "*Plate Edit*".
- g) Pilih program sesuai dengan kebutuhan.
- h) Blok well standar lalu pilih auto standar, buat pengulangan sebanyak 3x, lalu apply
- i) 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).

E. Pengolahan dan Analisis 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 dientry, hal ini bertujuan untuk melihat ada atau tidaknya kemungkinan kesalahan memasukkan data

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan yaitu analisis univariat untuk mengetahui distribusi frekuensi kadar HBsAg metode CLIA dan kadar HBV DNA metode *Real Time* PCR pada darah donor, dan analisis bivariat menggunakan uji *Chi Square* tabel uji silang 2x2 untuk mengetahui validitas diagnostik sensitivitas dan spesifisitas metode CLIA dengan metode *Real Time* PCR untuk diagnosis virus hepatitis B pada darah donor.

F. Etika Cleareance

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik dengan nomer etik No.061/KEPK-TJK/II/2024 penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dalam penelitian ini akan dikumpulkan dalam penanganan limbah. Limbah berupa sampel virus dan bahan habis pakai lainnya akan diperlakukan sebagai limbah infeksius dan akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan. Subyek pada penelitian dirahasiakan dan seluruh biaya yang dibutuhkan dalam penelitian ini ditanggung oleh peneliti.