

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian analitik dengan desain penelitian *cross sectional*. Analisa data yang digunakan adalah analisa univariat dan bivariat kemudian dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan antara lamanya pengobatan ARV terhadap kadar *Interleukin-6* pada pasien *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) di Puskesmas Sukabumi Kota Bandar Lampung. Variabel dependen dalam penelitian yaitu kadar *Interleukin-6* serta variabel independen dalam penelitian ini adalah lamanya pengobatan ARV pada pasien HIV.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Tempat pengambilan sampel serum dilakukan di Puskesmas Sukabumi Kota Bandar Lampung. Kemudian pemeriksaan kadar IL-6 dilakukan di Laboratorium Immunoserologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh pasien yang menjalani pengobatan ARV Di Puskesmas Sukabumi pada bulan Maret-Mei 2024.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah bagian dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

a. Kriteria Inklusi

- 1) Pasien HIV yang bersedia menandatangani informed consent
- 2) Pasien HIV yang sedang menjalani pengobatan ARV selama 1-3 tahun, 4-6 tahun, dan > 6 tahun

b. Kriteria Ekslusi

- 1) Pasien HIV yang menderita diabetes mellitus
- 2) Pasien HIV yang menderita tuberkulosis paru

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel Bebas: Lamanya pengobatan ARV pada pasien HIV.	Pasien HIV yang menjalani pengobatan ARV di Puskesmas Sukabumi Kota Bandar Lampung.	Observasi	Rekam Medis	1-3 Tahun, 4-6 Tahun dan >6 Tahun	Ordinal
2.	Variabel Terikat: Kadar <i>Interleukin-6</i> (IL-6).	Kadar <i>Interleukin-6</i> (IL-6) pada pasien <i>human immunodeficiency virus</i> (HIV) di Puskesmas Sukabumi.	ELISA <i>reader</i>	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	ng/L	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Tahap Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan cara dan prosedur sebagai berikut:

- a. Melakukan penelusuran pustaka untuk memperoleh perspektif ilmiah dari penelitian.
- b. Melakukan kegiatan pra survey ke lokasi penelitian yaitu Puskesmas Sukabumi.
- c. Mengajukan surat izin penelitian dan pengambilan data ke Direktur Poltekkes Tanjungkarang untuk kemudian diteruskan kepada Badan Kesbangpol hingga Puskesmas Sukabumi Kota Bandar Lampung.
- d. Setelah mendapatkan surat izin dari pihak Puskesmas, selanjutnya peneliti melakukan pengambilan data pasien HIV yang menjalani pengobatan ARV di Puskesmas Sukabumi Kota Bandar Lampung.

- e. Memberikan kuisisioner kepada pasien HIV yang menjalani pengobatan ARV untuk penjarangan sampel penelitian.
- f. Memberikan dan menjelaskan *informed consent*. Pasien/wali pasien dapat menandatangani *informed consent* bila bersedia menjadi responden penelitian.
- g. Melakukan pengambilan darah pasien HIV yang menjalani pengobatan ARV untuk kemudian dipreparasi menjadi serum dan dilakukan pemeriksaan kadar *Interleukin-6* di Laboratorium Imunoserologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Cara Pengumpulan Data

a. Langkah Persiapan

1) Alat dan Bahan

a) Alat

Peralatan yang digunakan yaitu spuit, *tourniquet*, tabung bertutup merah (tanpa antikoagolan), *centrifuge*, *vortex*, cup serum, tempat penyimpanan sampel sementara yang terdiri dari *cool box* dan *cool gel*, *mikroplate*, *ELISA washer*, *ELISA reader*, *sealer* (penutup plate), mikropipet dan tip, wadah berisi desinfektan, alat pelindung diri (APD) yang terdiri dari jas laboratorium, sarung tangan, dan masker.

b) Bahan

Bahan yang digunakan yaitu sampel serum, kit reagen (standar *solution*, standar *diluent*, konjugat *streptavidin* HRP, *stop solution*, *substrat solution A*, *substrat solution B*, *wash buffer*, *Biotinylated human IL-6 antibody*) dan *aquadest*.

b. Metode Pemeriksaan

Penelitian ini menggunakan metode *enzyme link immunosorbent assay* (ELISA) *sandwich* antibodi ganda dengan menggunakan alat *ELISA reader* untuk pemeriksian kadar *Interleukin-6*.

c. Prinsip Pemeriksaan

Antibodi yang telah dilapisi sebelumnya pada *plate* adalah antibodi IL-6 manusia. IL-6 yang terdapat di dalam sampel akan berikatan

dengan antibodi IL-6 yang telah dilapisi pada *plate*, kemudian ditambahkan antibodi terbiotinilasi dan berikatan dengan IL-6 sampel. Setelah itu ditambahkan konjugat *streptavidin*-HRP dan berikatan dengan antibodi biotinilasi. Selanjutnya dilakukan inkubasi, *streptavidin*-HRP yang tidak terikat akan hilang pada tahap pencucian. Kemudian ditambahkan dengan *substrat solution* sehingga warna yang timbul sebanding dengan jumlah IL-6 pada sampel. Reaksi kemudian diakhiri dengan penambahan *stop solution* lalu diukur absorbansinya menggunakan ELISA pada panjang gelombang 450 nm (Bioassay Technology Laboratory, n.d.).

d. Cara Kerja

1) Pengambilan Darah Vena

- a) Menyiapkan tabung merah dan peralatan pengambilan darah lainnya sesuai prosedur.
- b) Mencuci tangan kemudian menggunakan sarung tangan/*handscoon*.
- c) Mencari pembuluh darah vena yang akan ditusuk dengan melakukan palpasi pada daerah penusukan.
- d) Membersihkan daerah penusukan menggunakan alkohol swab 70% dengan gerakan melingkar lalu dibiarkan kering.
- e) Memasang *tourniquet* dengan jarak 3-4 inchi diatas *fossa antecubiti* dan meminta pasien agar mengepalkan tangan.
- f) Menusuk pembuluh darah vena dengan sudut 45⁰ dan mencegah pergerakan lengan agar tidak mengubah posisi jarum.
- g) Saat darah telah masuk ke dalam *sputit*, lepaskan *tourniquet* dan meminta pasien untuk dapat membuka kepalan tangannya.
- h) Ketika darah yang dibutuhkan telah cukup, tutup lokasi penusukan menggunakan kapas kering dan bersih lalu keluarkan *sputit* dengan lembut dan diperban menggunakan *adhesive tape*.
- i) Memindahkan darah dari *sputit* ke dalam tabung merah melalui dinding tabung secara perlahan.

2) Pembuatan Serum

- a) Darah pada tabung merah didiamkan menggumpal pada suhu kamar selama 30-60 menit sebelum sentrifugasi.
- b) Melakukan sentrifugasi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 1000-3000 rpm selama 10 menit (harus seimbang).
- c) Memisahkan serum dari bekuan dan memasukkan ke dalam cup serum yang telah dilabeli sebelumnya.
- d) Melakukan penyimpanan serum pada suhu -80°C (6 bulan) sampai pemeriksaan kadar IL-6 dilakukan (H.B. WU, 2006).

3) Pengenceran Standar

- a) Mengeluarkan seluruh reagen pada suhu ruang 30 menit sebelum digunakan.
- b) Menyiapkan 5 tabung untuk pengenceran standar.
- c) Menambahkan masing-masing 120 ul *standar diluent* ke setiap tabung pengenceran.
- d) Menambahkan 120 ul original standar ke tabung 1 dan homogenkan dengan *vortex*.
- e) Memindahkan 120 ul larutan dari tabung 1 ke tabung 2 dan homogenkan dengan *vortex*.
- f) Memindahkan 120 ul larutan dari tabung 2 ke tabung 3 dan homogenkan, lakukan hal yang sama sampai tabung ke 5.
- g) Menyiapkan 1 tabung kembali berisi 120 ul aquadest yang berfungsi sebagai *zero standar*.

4) Pembuatan *Wash Buffer*

- a) Mengencerkan 20 ml *wash buffer concentrate* sebanyak 25 kali menggunakan aquadest agar menghasilkan 500 ml *wash buffer*.

5) Pemeriksaan Kadar *Interleukin-6*

- a) Menyiapkan seluruh reagen, larutan standar dan sampel sesuai petunjuk pada suhu ruang sebelum digunakan.
- b) Menentukan dan menghitung *strip well* yang akan digunakan, lalu pasang pada bingkai *plate*.
- c) Menambahkan masing-masing 50 ul pengenceran standar pada sumur standar (6 sumur).

- d) Menambahkan 40 ul sampel ke dalam sumur sampel.
- e) Menambahkan 10 ul antibodi biotinilasi ke seluruh sumur sampel.
- f) Menambahkan 50 ul konjugat *streptavidin*-HRP ke seluruh sumur sampel dan standar.
- g) Menghomogenkan dengan menggoyangkan sumur, tutup dengan *sealer* kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C.
- h) Membuka *sealer* dan melakukan pencucian menggunakan *ELISA washer* sebanyak 5 x.
- i) Menambahkan 50 ul substrat A ke masing-masing sumur dan tambahkan 50 ul substrat B ke masing-masing sumur lalu tutup dengan *sealer* serta inkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C di tempat gelap.
- j) Menambahkan 50 ul *stop solution* ke masing-masing sumur, warna biru yang timbul akan segera berubah menjadi kuning.
- k) Mengukur absorbansi menggunakan *ELISA reader* paling lambat 10 menit setelah penambahan *stop solution* dengan panjang gelombang 450 nm.
- l) Melakukan penghitungan kadar IL-6 dengan membuat kurva standar menggunakan *computer base curve software* (Bioassay Technology Laboratory, n.d.).

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Setelah data diperoleh, data tersebut kemudian diolah menggunakan suatu program komputerisasi melalui langkah :

a. Memasukkan Data

Data yang telah didapatkan selanjutnya dimasukkan ke dalam program SPSS, data tersebut berupa identitas pasien, lamanya menjalani pengobatan ARV dan kadar *Interleukin-6* (IL-6).

b. *Coding*

Dalam tahap ini, peneliti memberikan kode pada variabel lamanya menjalani pengobatan ARV yaitu “1” untuk 1-3 tahun bulan, “2” untuk 4-6 tahun dan “3” untuk > 6 tahun.

c. *Cleaning*

Memeriksa kembali data yang telah dimasukkan, hal ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya kemungkinan kesalahan dalam *mengentry* data.

2. Analisa Data

Data yang telah diperoleh kemudian dilakukan analisis dengan cara:

a. Analisis Univariat

Data yang dianalisis secara univariat dalam penelitian ini yaitu distribusi frekuensi lamanya pengobatan ARV dan distribusi frekuensi kadar *Interleukin-6* (IL-6) pada pasien HIV yang menjalani pengobatan ARV.

b. Analisis Bivariat

Data dianalisis dengan menggunakan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan antara lamanya pengobatan ARV terhadap kadar *Interleukin-6* pada pasien HIV menggunakan program komputer yaitu SPSS 26.

G. Ethical Clearance

Penelitian ini menggunakan manusia sebagai subyek penelitian, sehingga diperlukan proses telaah secara etik dengan menyerahkan naskah proposal ke Komite Etik Poltekkes Tanjungkarang untuk dapat dinilai kelayakannya. Setelah mendapatkan surat persetujuan etik dengan nomor 372/KEPK-TJK/IV/2024 pada tanggal 01 April 2024, maka penelitian ini dapat dilaksanakan. Subyek dalam penelitian ini adalah pasien HIV yang menjalani pengobatan ARV di Puskesmas Sukabumi Kota Bandar Lampung. Kemudian subyek penelitian diberi penjelasan terkait maksud dan tujuan penelitian baik secara lisan maupun tertulis dengan menggunakan *informed consent*. Subyek penelitian memiliki hak untuk menolak tanpa dikenai sanksi apapun. Identitas subyek penelitian bersifat rahasia. Seluruh biaya yang diperlukan dalam penelitian ditanggung oleh peneliti.