

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis Penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan desain penelitiannya adalah Rancangan Acak Lengkap dengan uji laboratorium menggunakan metode elektroforesis untuk melihat perbedaan kemampuan pemisahan pita DNA baik menggunakan larutan SupperBuffer maupun buffer TAE (*Tris-Acetate-EDTA*) berdasarkan variasi lama waktu dan voltase elektroforesis. Variabel bebas berupa SuperBuffer dan buffer TAE dengan variasi lama waktu dan voltase elektroforesis, sedangkan variabel terikat berupa kemampuan pemisahan pita DNA.

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April-Mei 2025

C. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah larutan buffer TAE sebagai buffer yang umum digunakan pada proses elektroforesis, akan dibandingkan dengan SupperBuffer yang digunakan sebagai alternatif buffer pada proses elektroforesis gel agarosa dengan pewarnaan GelRed. Sampel yang akan digunakan adalah DNA ladder 100 bp. Pada penelitian ini terdapat 12 perlakuan, dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Penentuan jumlah pengulangan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer sebagai berikut Keterangan :

$n =$ Banyaknya pengulangan

$t =$ Jumlah perlakuan

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(12-1)(n-1) \geq 15$$

$$11(n-1) \geq 15$$

$$11n - 11 \geq 15$$

$$11n \geq 15 + 11$$

$$n \geq 26/11$$

$$n \geq 2$$

D. Variabel Dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Independent: Variasi waktu elektroforesis	Lama waktu elektroforesis yang optimal	Observasi	Elektroforesis	Menit	Rasio
	Larutan Supperbuffer dan Buffer TAE	menggunakan larutan SupperBuffer dengan yang menggunakan buffer TAE			10 menit 30 menit 60 menit	
2.	Variasi voltase elektroforesis	Voltase elektroforesis yang paling optimal menghasilkan pemisahan pita DNA terbaik.	Observasi	Elektroforesis	Volt (V) 25 V 100 V	Rasio
	Dependent: Kemampuan Pemisahan Pita DNA	Pita (band) DNA hasil elektroforesis diukur melalui keberhasilan pemisahan pita DNA, kejelasan pita atau intensitas pita DNA yang terlihat		UV Transluminator	Skor Visual: 1. Tidak Jelas 2. Buram 3. Cukup Jelas 4. Jelas	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh adalah data primer. Data diperoleh dari visualisasi pita DNA menggunakan proses elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa yang direndam dalam larutan SupperBuffer sebagai buffer alternatif dan dibandingkan dengan direndam dalam buffer TAE. Kemudian hasilnya dilihat pada UV Transluminator. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Pendahuluan

- a. Pengajuan surat izin penelitian ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Serta Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang
- b. Melakukan pengumpulan bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian
- c. Melakukan persiapan peralatan dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian
- d. Menentukan jumlah sampel penelitian menggunakan rumus Federer

3. Persiapan Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah seperangkat peralatan elektroforesis gel agarosa, mikropipet, white tip, UV transluminator, gelas ukur, labu ukur, erlenmeyer, beaker glass, corong kaca, spatula, batang pengaduk, neraca analitik, hotplate, pipet volume, pipet tetes, botol limbah.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Buffer TAE, GelRed, gel agarosa, DNA Ladder 100 bp, aquabidest, dan larutan SupperBuffer dengan kandungan (Asam Borat, NaOH) dilakukan pembelian bahan bahan tersebut di market place dan toko bahan laboratorium

4. Prosedur Kerja

a. Pembuatan Larutan SuperBuffer 50x (Al-Daim, 2023)

- 1) Timbang 2 gram NaOH dan 11,25 gram Asam Borat dengan menggunakan neraca analitik.

- 2) Tambahkan 80 ml dari 100 ml aquabidest ke dalam beaker glass terlebih dahulu
 - 3) Masukkan 2 gram NaOH kedalam aquabidest tersebut
 - 4) Tambahkan 11,25 gram asam borat aduk hingga larut sempurna
 - 5) Setelah NaOH dan Asam Borat terlarut sempurna pindahkan larutan kedalam kelabu ukur 100 ml
 - 6) tambahkan Aquabidest hingga mencapai 100 ml pada labu ukur, kemudian dihomogenkan
 - 7) pH larutan diukur menggunakan indikator pH, diperoleh nilai pH larutan SuperBuffer adalah 8 mendekati 9.
- b. Pembuatan buffer 1x
- 1) Buat 250 ml larutan buffer TAE 1x dengan cara mencampurkan 5 mL buffer TAE 50x kedalam 245 ml aquadest.
 - 2) Buat 250 ml larutan buffer SupperBuffer 1x dengan cara mencampurkan 5 mL SupperBuffer 50x kedalam 245 ml aquadest.
- c. Pembuatan Gel Agarosa konsentrasi 1,5%.
- 1) Buat gel agarosa 1,5% dengan cara menimbang 0,375 gr gel agarosa Masing-masing dilarutkan dalam 25 mL buffer TAE 1x dan 25 mL SupperBuffer 1x dan didihkan hingga larut sempurna.
 - 2) Tambahkan 1 uL GelRed 10.000x dalam 25 mL larutan agarosa yang telah larut
 - 3) Pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki dengan posisi hampir menyentuh dasar baki.
 - 4) Periksalah suhu larutan agarosa dengan menempelkan erlenmeyer ke tangan, jika suhunya sudah turun hingga 60 °C, tuangkan larutan agarosa ke dalam baki elektroforesis, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.
 - 5) Ambil sisir dengan hati-hati.
- d. Menjalankan Elektroforesis
- 1) Masukkan baki yang telah berisi gel agarosa ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan sisa larutan SupperBuffer 1x atau

larutan buffer TAE 1x. (pastikan bahwa gel agarosa terendam seluruhnya dalam buffer TAE atau SupperBuffer).

- 2) Dipipet 6 μ L masing-masing DNA Ladder 100 bp masukkan kedalam lubang-lubang yang terbentuk oleh sisir.
- 3) Hubungkan kabel dari sumber arus ke tanki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada didekat sumuran, sedangkan kabel yang tersambung ke kutub positif berada jauh dari sumuran, jika tidak demikian ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya).
- 4) Nyalakan sumber arus, aturlah voltase dan waktu running elektroforesis.
- 5) Jalankan elektroforesis (lakukan running) dengan cara menekan tombol run pada sumber arus.
- 6) Elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis, yang ditandai dengan adanya bunyi alarm. Matikan sumber arus listrik dan angkatlah baki dari tanki elektroforesis.

e. Visualisasi DNA

Visualisasikan pita DNA menggunakan UV transluminator

- 1) Gel diletakkan kedalam UV transluminator
- 2) Lihat terbentuknya pita pita DNA dengan UV transluminator
- 3) Foto menggunakan kamera hasil pita DNA yang terlihat

F. Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Setelah data didapatkan kemudian data diolah dengan menggunakan program komputeriasi dengan langkah sebagai berikut :

a. Entry Data

Tahap dimana peneliti memasukkan data yang diperoleh berupa hasil visualisasi pita DNA pada proses elektroforesis agarosa dengan menggunakan SuperBuffer dan buffer TAE.

b. Coding

Tahap dimana peneliti memberikan kode pada atribut penelitian

c. Prosesing

Tahap dimana peneliti melakukan proses pengetikan data dan checklist ke program komputer agar dapat dianalisis.

d. Cleaning

Tahap dimana peneliti melakukan pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan, untuk melihat apakah ada kesalahan saat memasukkan data.

2. Analisis Data

Data yang terkumpul selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis statistika dengan menggunakan analisa univariat dan bivariat. Analisa bivariat dilakukan menggunakan uji *Independent T-Test* menggunakan aplikasi Statistical Program For Social Science (SPSS).

G. Etika Clearence

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik dengan nomer etik 325/KEPK-TJK/V/2025, berlaku selama kurun waktu tanggal 14 Mei 2025 sampai dengan tanggal 14 Mei 2026. Penelitian yang dilakukan tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dalam penelitian ini akan dikumpulkan dalam penanganan limbah. Limbah berupa SupperBuffer, gel agarosa, buffer TAE, akan diperlakukan sebagai limbah infeksius dan akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu.