

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan bersifat eksperimental, dengan desain penelitian yaitu *Quasi eksperiment*. Dengan uji laboratorium menggunakan metode *Real-Time* PCR untuk melihat variasi waktu penyimpanan sampel terhadap *viral load* pada pasien positif Hepatitis B yang diisolasi menggunakan kertas saring *whatman* No.3. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi penyimpanan 1, 3 dan 7 hari pada kertas saring *whatman* No.3. Variabel terikat jumlah *viral load* sampel positif Hepatitis B menggunakan *Real-Time* PCR.

B. Lokasi dan Waktu penelitian

1. Lokasi

Pengambilan sampel darah pasien positif Hepatitis B di RSAM Bandar Lampung. Pemeriksaan sampel darah pasien positif Hepatitis B dilakukan dengan menggunakan *Real-Time* PCR di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2025.

C. Subyek penelitian

Subyek penelitian ini yaitu 1 tabung EDTA darah pasien yang diperoleh dari RSAM Bandar Lampung. Kriteria subyek penelitian harus berbentuk *Whole blood* yang telah dinyatakan positif Hepatitis B. 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

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Waktu penyimpanan 1,3, dan 7 hari	Sampel yang disimpan selama 1, 3, dan 7 hari.	Observasi	Jam	1, 3, dan 7 hari	Ordinal
2.	<i>Viral Load</i> pada pasien positif Hepatitis B menggunakan <i>Real-Time</i> PCR	<i>Copy number</i> 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 yaitu data primer yang diperoleh 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 RSAM Bandar Lampung.
3. Melakukan pengajuan surat izin pengambilan sampel yang diajukan ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
4. Setelah didapatkan surat dari jurusan, penelitian dapat izin mengambil sampel di RSAM Bandar Lampung. Perhatikan kondisi tempat penyimpanan, waktu pengambilan, memberi label dengan mencantumkan tanggal dan waktu pengambilan sampel. Setelah itu dimasukkan kedalam box dan sampel dibawa ke laboratorium Biologi Molekuler di jurusan Teknologi Laboratorium Medis Kemenkes Tanjungkarang.
5. Selanjutnya peneliti dapat mengolah sampel dari sampel ditetaskan 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 ini yaitu, PBS (phosphat buffer saline), GB buffer, buffer elusi, etanol absolut, buffer W1, wash buffer, aquabidest, kolom GD dan tabung reaksi.

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 DNA virus positif Hepatitis B.

b. Cara kerja

1) Isolasi darah kering/persiapan sampel (Grüner et al., 2015)

- a) Siapkan 1 sampel tabung EDTA darah pasien positif Hepatitis B yang didapatkan dari RSAM Bandar Lampung.
- b) Kemudian potong-potong kertas saring membentuk lingkaran dengan diameter ± 2 cm menggunakan gunting yang sudah di sterilisasi.
- c) Kemudian sampel darah ditetaskan sebanyak 100 μ l ke kertas saring yang sudah disiapkan. Bila ingin ditunda pemeriksaan simpan kertas saring pada suhu ruang yang tidak terpapar matahari langsung.
- d) Tunggu kertas saring hingga mengering supaya sampel darah terserap pada kertas saring.
- e) Potong kertas saring yang sudah ditetaskan darah dan sudah kering.
- f) Masukkan potongan kertas tersebut didalam tabung reaksi.
- g) Tambahkan 1000 μ l larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) kedalam tabung agar DNA tersuspensi.

- h) Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar agar DNA tersuspensi dengan baik.
 - i) Homogenkan dengan menggunakan vortex selama 10 detik.
 - j) Ambil kertas saring yang ada ditabung dan buang.
 - k) Masukkan sampel tersebut kedalam tabung mikrosentrifuge.
 - l) Selanjutnya dicentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 xg.
 - m) Sisakan supernatant dan endapan (pelet) di tabung.
- 2) Isolasi DNA (Kit *Geneid/ Genomic DNA Mini Kit*)
- Langkah 1 (Lisis sel)
- a) Tambahkan 200 μ l GB Buffer kemudian kocok tabung mikrosentrifus 1,5 ml dengan kuat.
 - b) Diinkubasi dengan suhu 60⁰ 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 60⁰ C untuk langkah ke 4 elusi DNA).
 - c) Setelah inkubasi 60⁰ 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 kemudian homogenkan dengan cara dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika muncul endapan, pecahkan dengan pipet.
 - b) Tempatkan kolom GD ditabung koleksi 2 ml.
 - c) Lalu pindahkan campuran (termasuk endapannya) ke kolom GD setelah itu dicentrifuge pada 14.000-16.000 xg selama 5 menit.
 - d) Buanglah tabung koleksi 2 ml lalu tempatkan kolom GD dalam tabung koleksi 2 ml yang baru.
- Langkah 3 (Mencuci)
- a) Setelah itu 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) Setelah itu 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 volume Elusi hingga kira-kira 200 μ l.
- c) Pindahkan yang sudah kering ke kolom GD ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml yang bersih.
- d) Tambahkan 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 (Kit PCR *Vector-Best*)

- a) Siapkan sejumlah 9 tube PCR untuk sampel/kontrol. Siapkan 5 tube PCR : 1 untuk NC, 3 untuk PC, dan 1 untuk WPC. Lalu siapkan 6 tube PCR : 3 untuk CS1 dan 3 untuk CS2

- b) Masukkan 50 μ l control, dan 50 μ l calibrator ke dalam masing-masing tube PCR.
- c) Tutup dengan aluminium foil dan pindahkan ke dalam alat *Real-Time* PCR.
- d) Pilih menu *Real-Time* PCR pada komputer.
- e) Pada info eksperimen diisi data pengoperasian.
- f) Klik menu “Plate Edit”.
- g) Pilih program sesuai dengan kebutuhan.
- h) Block well standar lalu pilih auto standar, buat pengulangan sebanyak 9 kali, lalu *applay*.
- i) Pilih *run method*, lihat apakah siklus sudah tepat sesuai dengan instruksi kerja, jika sudah klik *start*. Proses running akan berjalan kira-kira selama 2 jam.

Suhu pada *Real-Time* PCR sebagai berikut :

Tabel 3. 2 Suhu *Real-Time* PCR

<i>Stage</i>	Temp ^o C	Waktu	Deteksi Fluorescence	Siklus Berulang
<i>Hold</i>	50	2 menit	-	1
<i>Cycling</i> 1	94	1 menit	-	1
	94	10 detik	-	
<i>Cycling</i> 2	60	20 detik	FAM/Green, JOE/Yellow/HEX	50

F. Pengolahan Data dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Data yang akan digunakan dalam penelitian adalah data primer, setelah itu, data diproses menggunakan komputerisasi sesuai dengan prosedur berikut:

- a. *Editing Data* yaitu tahap dimana peneliti memeriksa kembali data yang telah mereka kumpulkan untuk memastikan bahwa data tersebut sesuai dan relevan. Untuk mengidentifikasi apakah ada kesalahan, setelah selesai data tersebut dapat diproses lebih lanjut.
- b. *Coding* yaitu tahapan pemberian kode berupa angka atau bilangan untuk memudahkan pengentrian data saat dimasukkan ke komputer.
- c. *Entry Data* yaitu memasukkan data yang sudah dikumpulkan dari berbagai sumber ke dalam program komputer, misalnya program SPSS.

- d. *Procesing Data* yaitu tahapan pengolahan yang menghasilkan informasi dari data ke program komputer untuk dianalisis.
- e. *Cleaning Data* yaitu proses memperbaiki atau menghapus data yang telah dimasukkan apakah ada kesalahan saat memasukkan data kekomputer.
- f. *Skoring* yaitu pemberian skor terhadap variabel yang diperiksa agar mendapatkan nilai yang signifikan.

2. Analisa Data

a. Analisa Univariat

Teknik ini digunakan untuk melihat distribusi frekuensi dari masing-masing variabel yang diteliti.

b. Analisa Bivariat

Data yang diperoleh menggunakan data bivariat dengan menggunakan uji *One Way Anova*. Uji *One Way Anova* digunakan untuk membedakan atau membandingkan rata-rata dua kelompok data yang berpasangan atau terikat yaitu variasi waktu penyimpanan terhadap *viral load* pada pasien positif Hepatitis B dengan menggunakan *Real-Time PCR*.

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian ini menggunakan sampel dari pasien positif Hepatitis B sebagai subyek untuk dijadikan sampel pemeriksaan, sehingga perlu dilakukan proses telaah secara etik dengan menyerahkan naskah proposal kepada Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No.080KEPK-TJK/III/2025 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.