

BAB III **METODELOGI PENELITIAN**

A. Jenis dan Rancangan penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan penelitian analitik dengan desian penelitian ini adalah Cross-Sectional. Pada rancangan ini. Variabel terikat yang diteliti adalah kadar procalcitonin dan variabel bebasnya adalah limfosit pada penderita pneumonia.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdul Moelok dan Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Imunoserologi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Waktu Penelitian ini dilaksanakan pada bulan juni 2025.

C. Populasi Penelitian dan Sampel

1. Populasi penelitian

Populasi pada penelitian ini berjumlah 29 yang terdiagnosis pneumonia di RSUD H. Abdoel Moeloek

2. Sampel penelitian

Sampel penelitian diperoleh dengan teknik *Total Sampling* sebanyak 29 sampel, total sampling dilakukan dengan mengambil semua subjek yang memenuhi kriteria sebagai berikut:

Populasi yang memenuhi kriteria inklusi, sebanyak berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Pasien yang terdiagnosis pneumonia
- 2) Pasien pneumonia yang telah memiliki hasil jumlah Limfosit di rekam medik.

b. Kriteria Ekslusii

- 1) Penderita penyakit Auto-immune
- 2) Pasien dengan gangguan fungsi ginjal
- 3) Pasien yang memiliki gejala lain seperti tifus

D. Variabel Dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan definisi operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Jenis kelamin	Identitas gender penderita pneumonia yang melakukan pemeriksaan di RSUD Dr. H. ABDUL MOELOEK	Observasi	Rekam Medik	1. Laki-laki 2. perempuan	Nominal
Usia	Usia penderita pneumonia yang melakukan pemeriksaan di RSUD Dr. H. ABDUL MOELOEK	Observasi	Rekam Medik	1-5 tahun 6 -10 tahun >10 tahun	Interval
Variable bebas: Kadar procalcitonin	Kadar procalcitonin dalam serum pasien pneumonia yang diukur dengan metode ELISA (ng/mL)	Metode ELISA	Double sandwich	ng/mL	Rasio
Variable terikat: jumlah limfosit	Jumlah sel limfosit dalam darah (sel/ μ L) sebagai indikator respon imun	Observasi	Alat Hematology otomatis (Hematology Analizer)	sel/ μ L	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

Data yang dipakai terdiri dari data primer dan data sekunder. Data primer diperoleh melakukan pemeriksaan kadar Procalcitonin pada penderita penyakit Pneumonia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek. Sedangkan data sekunder diperoleh dari melakukan permeriksaan darah lengkap yaitu jumlah limfosit,

Hasil data diperoleh dengan cara dan prosedur yaitu:

1. Peneliti mencari sumber pustaka terkait penelitian yang akan diambil.
2. *Pra survey* pada lokasi pengambilan sampel di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek
3. Peneliti melakukan layak etik dan pengajuan surat izin penelitian terhadap direktur poltekkes tanjungkarang.

4. Setelah memperoleh surat izin penelitian, kemudian dilakukan pengambilan sampel di Laboratorium Patologi Klinik Rawat Jalan RSUD Dr H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung.
5. Peneliti memberi penjelasan mengenai informed consent kepada pasien dan wali pasien dan diminta untuk mengisi informed consent jika mereka bersedia menjadi responden.
6. Nama dan hasil pemeriksaan jumlah limfosit pasien diambil dari data rekam medik pasien oleh peneliti.
7. Peneliti melakukan pengambilan serum pasien dan simpan -20°C hingga jumlah sampel memenuhi dan melakukan pemeriksaan kadar procalcitonin menggunakan ELISA Reader di Laboratorium Imunoserologi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.
8. Cara kerja pemeriksaan procalcitonin (PCT)
 - a. Prinsip: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Plat telah dilapisi dengan antibodi PCT Manusia. PCT yang ada dalam sampel ditambahkan dan mengikat antibodi yang dilapisi pada sumur. Kemudian Antibodi PCT Manusia yang terbiotinilasi ditambahkan dan mengikat PCT dalam sampel. Kemudian Streptavidin-HRP ditambahkan dan mengikat antibodi PCT yang terbiotinilasi. Setelah inkubasi, tidak terikat.
 - b. Alat: centrifuge, vortex, tempat penyimpanan sampel sementara yang terdiri dari cool box dan ice gel, mikroplate, ELISA washer, ELISA reader, sealer (penutup plate), mikropipet dan tip, wadah berisi desinfektan, alat pelindung diri (APD) yang terdiri dari jas laboratorium, handscoons, dan masker.
 - c. Bahan: cup serum, plastik zip lock kecil, sampel serum, kit reagen (Mikro ELISA Standard solution (2400pg/ml), standard diluent, streptavidin-HRP, substrat solution A, substrat solution B, biotinylated human PCT antibody Wash Buffer concentrate (25x), user instruction, Stop Solution, dan Plate Sealer, zipper bag) dan aquabidest.

d. Pembuatan Serum

- 1) Darah pada tabung Darah pada tabung merah didiamkan suhu kamar selama 30-60 menit sebelum sentrifugasi
- 2) Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000- 3000 rpm selama 10 menit
- 3) Memisahkan serum dari bekuan dan memasukkan ke dalam cup serum yang telah dilabeli sebelumnya (H.B. WU, 2006).

e. Penyimpanan Sampel

Penyimpanan sampel dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung pada suhu -20°C sampai pemeriksaan kadar Procalcitonin dilakukan.

- f. Transportasi Serum dari Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung ke Laboratorium Imunoserologi Poltekkes Tanjungkarang
 - 4) Setelah waktu pengumpulan sampel selesai, sampel serum dimasukkan ke dalam cool box yang berisi ice gel .
 - 5) Apabila di dalam cool box masih terdapat ruangan kosong maka ditambahkan potongan kertas untuk mencegah terjadinya guncangan pada serum.
 - 6) Menutup cool box dengan rapat
 - 7) Kemudian Lalu membawa serum yang terdapat pada cool box ke Laboratorium Imunoserologi Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan pemeriksaan kadar procalcitonin.

g. Persiapan Reagen:

- 1) Simpan reagen pada suhu ruang (18-25°C) sebelum dipakai. Jika kit tidak langsung habis dalam satu kali pakai, hanya keluarkan strip dan reagen yang diperlukan untuk satu kali percobaan, dan simpan strip serta reagen yang tersisa.
- 2) Washing Buffer: larutkan 20 ml washing buffer concentrate 25x tambahkan 480ml aquabidest. 500 ml untuk menghasilkan washing buffer. Catatan: apabila kristal terbentuk dalam konsentrat,

panaskan dalam waterbath pada suhu 40°C dan aduk sampai kristal sepenuhnya homogen.

- 3) Standar concentration 2400pg/ml: dibuat 6 pengenceran dari standar concentration 2400 pg/ml. Dimulai dari 1200, 600, 300, 150, 75, dan 0 pg/ml (blanko). Ditambahkan 500 μ L *Reference standar* dan *Sample diluent* ke masing-masing tabung.
- 4) Berikut adalah hasil pengenceran yang disarankan: 1200, 600, 300, 150, 75, dan 0 pg/ml. Langkah-langkah pengenceran: ambil 6 tabung EP, pipet 500 μ L *Reference Standar* dan *Sample Diluent* ke tiap tabung. Pipet 500 μ L larutan kerja 2000 pg/ml ke tabung pertama. Aduk larutan sampai menjadi working solution 1000 pg/ml. Pipet 500 μ L larutan dari tabung sebelumnya sampai tabung terakhir. Lakukan tahap ini hingga tabung 75. Biarkan tabung terakhir kosong, dan jangan memindahkan larutan dari tabung sebelumnya ke dalamnya. Diamkan selama 15 menit, dan vortex selama 2 menit sekali untuk menghomogenkan.

h. Prosedur kerja

- 1) Siapkan semua reagen, larutan standar, dan sampel sesuai petunjuk. Biarkan semua reagen mencapai suhu ruangan sebelum digunakan. Pengujian dilakukan pada suhu ruangan.
- 2) Tentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip ke dalam bingkai untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu 2-8°C.
- 3) Tambahkan 50 μ l standar ke dalam sumur standar. Catatan: Jangan tambahkan antibodi terbiotinilasi ke dalam sumur standar karena larutan standar mengandung antibodi terbiotinilasi.
- 4) Tambahkan 40 μ l sampel ke dalam sumur sampel, lalu tambahkan 10 μ l antibodi anti-PCT ke dalam sumur sampel, lalu tambahkan 50 μ l streptavidin-HRP ke dalam sumur sampel dan sumur standar (bukan sumur kontrol kosong). Aduk rata. Tutupi pelat dengan sealer. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.

- 5) Lepaskan sealer dan cuci pelat 5 kali dengan cairan pembersih. Rendam sumur dengan cairan pembersih 300ul selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi atau tuang setiap sumur dan cuci 5 kali dengan cairan pembersih. Keringkan pelat pada tisu atau bahan penyerap lainnya.
- 6) Tambahkan 50 μ l larutan substrat A ke setiap sumur, lalu tambahkan 50 μ l larutan substrat B ke setiap sumur. Inkubasi pelat yang ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37°C dalam keadaan gelap.
- 7) Tambahkan 50 μ l Stop Solution ke setiap sumur, warna biru akan segera berubah menjadi kuning.
- 8) Tentukan kerapatan optik (nilai OD) setiap sumur segera menggunakan pembaca mikroplat yang diatur pada 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan larutan penghenti.

F. Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Pengumpulan Data

Pada penelitian ini pengolahan data menggunakan program komputerisasi dilakukan setelah diperoleh hasil dan melalui pemeriksaan dan observasi dengan tahapan berikut:

- a. *Editing* proses di mana penulis melakukan pemeriksaan terhadap data penderita Pneumonia, hasil pemeriksaan kadar procalcitonin, dan hasil pemeriksaan jumlah limfosit yang diperoleh kemudian memastikan tidak ada kekeliruan dalam pengisian.
- b. *Coding* yaitu tahap merubah data yang diperoleh menjadi code dalam program analisa data dimana data berupa huruf atau kalimat diubah menjadi data angka. Misalnya, 1 = kadar procalcitonin, 2 = jumlah limfosit.
- c. *Procesing* atau memasukkan data (entry data) yaitu data yang telah dicoding selanjutnya diproses ke dalam program atau software computer.
- d. *Cleaning* yaitu memeriksa kembali data yang sudah dientry, hal ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya kemungkinan kesalahan memasukkan data.

2. Analisa data

a. Analisa univariat

Digunakan untuk mengetahui distribusi frekuensi pada masing-masing variable seperti nilai mean, median, maksimum, dan minimum, dimana dalam penelitian ini variable yang akan dianalisis yaitu variable kadar procalcitonin dan variable jumlah limfosit.

b. Analisa bivariat

Penelitian ini menggunakan Analisa Bivariat dalam pengolahan data yaitu untuk mengetahui adanya hubungan antara variabel bebas yaitu kadar Procalcitonin dengan variabel terikat jumlah limfosit yaitu digunakan uji statistik yakni uji Korelasi *Spearman Correlation*.

G. Ethical Cleareance

Penelitian ini telah dilakukan atas izin komisi etik oleh KEPK Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan nomor registrasi No.302/KEPK-TJK/V/2025 pada 03 Mei 2025 karena penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Kerahasiaan identitas dijamin, dan seluruh biaya ditanggung oleh peneliti.