

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu eksperimen dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji laboratorium menggunakan metode elektroforesis untuk melihat sensitifitas pewarna methylene blue sebagai alternatif pewarna DNA pasien positif penyakit hepatitis B pada proses elektroforesis agarose. Variabel bebas pada penelitian ini yaitu lama waktu pewarnaan dengan methylene blue dan variasi volume sampel. Variabel terikat adalah intensitas warna pita HBV DNA pada proses elektroforesis agarose.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2025.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah methylene blue yang digunakan sebagai alternatif pewarna DNA pada proses elektroforesis. Dengan sampel yang digunakan adalah plasma dari pasien hepatitis B yang diperoleh dari RS Pertamina Bintang Amin.

Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

Adapun perlakuan yang dilakukan yaitu:

Lama kontak pewarnaan dengan Methylene Blue 0.025% selama 10, 15, 20 dan 25 menit.

Variasi volume sampel 2, 4, 6 dan 8 μ L.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Variabel dan Definisi Operasional

| No | Variabel | Definisi | Alat Ukur | Cara Ukur | Hasil Ukur | Skala Ukur |
|----|--|---|--|-----------------|--------------------------|------------|
| 1 | Independent: Lama kontak pewarnaan Methylene Blue | Waktu perendaman gel agarose dalam larutan Methylene blue selama 10,15,20 dan 25 menit. | Stopwatch | Observasi | Menit | Ordinal |
| | Variasi volume sampel | Variasi volume sampel DNA hasil ekstraksi sebanyak 2, 4, 6 dan 8 μ L. | Mikropipet | Observasi | Mikroliter (μ L) | Ratio |
| 2 | Dependent: Warna Pita HBV DNA | Hasil elektroforesis gel agarose berupa pita DNA yang tampak berwarna biru setelah dilakukan pewarnaan menggunakan Methylene Blue. | Visualisasi dengan cahaya tampak (Visible Light) – lampu LED | Gel Analyzer | Arbitrary Unit (a.u.) | Ratio |

E. Pengumpulan Data

1. Metode Pengumpulan Data

Data yang diperoleh adalah data primer. Data primer diperoleh dari visualisasi DNA hasil pewarnaan dengan larutan Methylene Blue. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat peralatan elektroforesis gel agarose, mikropipet, transiluminator UV, wadah plastik, *timer/stopwatch*, beaker glass, erlenmayer, neraca analitik, *hot plate*, tabung mikrosentrifuge, tabung sentrifuge dan gelas ukur.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini RBC Lysis Buffer, GB Buffer, Elution Buffer, Etanol Absolute, Buffer W1, Wash Buffer, aquabidest, kolom GD, collection tube 2 ml, methylene blue, GelRed,

produk PCR DNA, gel agarose, marker DNA, akuades, tisu, sarung tangan, *white tip, yellow tip, blue tip*.

3. Cara Kerja

- 1) Persiapan Sampel
 - a) Sampel *whole blood* dipisahkan terlebih dahulu untuk mendapatkan plasma, disentrifugasi 3000 rpm selama 10-15 menit.
 - b) Segera pisahkan sampel plasma tersebut ke dalam tabung steril untuk mencegah terbawanya sel darah dan komponen darah lainnya (apabila pemeriksaan akan ditunda maka simpan plasma tersebut di freezer dengan suhu penyimpanan -20°C).
 - c) Setelah didapatkan sampel berupa plasma, siapkan tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tambahkan 100 μ l plasma ke dalamnya.
 - d) Tambahkan 300 μ l RBC Lysis Buffer (3x dari volume plasma), lalu campur secara inversi. Jangan di vortex.
 - e) Inkubasi tabung microcentrifuge selama 10 menit di suhu kamar.
 - f) Centrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3.000 xg lalu buang supernatan seluruhnya.
 - g) Tambahkan 100 μ l RBC Lysis Buffer untuk meresuspensi pelet leukosit kemudian dilanjutkan dengan tahap lisis sel.
 - h) Selanjutnya akan dilakukan tahap ekstraksi DNA.
- 2) Ekstraksi DNA (*Genomic DNA Mini Kit*)
Langkah 1 (Lisis Sel)
 - a) Tambahkan 200 μ l GB Buffer ke dalam tabung microcentrifuge 1,5 ml kemudian kocok tabung dengan kuat.
 - b) Inkubasi pada suhu 60°C selama minimal 10 menit untuk memastikan sampel lisat bersih. Saat inkubasi, balikkan tabung setiap 3 menit (saat proses ini, panaskan 200 μ l Buffer Elusi pada suhu 60°C untuk langkah ke 4 elusi DNA).
Langkah 2 (Mengikat DNA)
 - a) Tambahkan 200 μ l Etanol Absolute ke lisat lalu segera homogenkan dengan cara dikocok kuat selama 10 detik. Jika terdapat endapan, pecahkan sebanyak mungkin menggunakan pipet.

- b) Tempatkan kolom GD pada tabung collection tube 2 ml.
- c) Pindahkan campuran (termasuk endapan apapun) ke kolom GD kemudian dicentrifuge dengan kecepatan 14.000-16.000 xg selama 5 menit.
- d) Buang tabung collection tube 2 ml lalu tempatkan kolom GD ke dalam tabung collection tube 2 ml yang baru.

Langkah 3 (Mencuci)

- a) Tambahkan 400 μ l Buffer W1 ke kolom GD lalu centrifuge dengan kecepatan 14.000-16.000 xg selama 30-60 detik.
- b) Buang cairan (flow-through) yang ada ditabung lalu tempatkan ke kolom GD dalam tabung collection tube 2 ml yang baru.
- c) Tambahkan 600 μ l Wash Buffer (pastikan telah ditambahkan etanol) ke kolom GD.
- d) Centrifuge dengan kecepatan 14.000-16.000 xg selama 30-60 detik lalu buang cairan (flow-through) yang ada di tabung collection tube 2 ml.
- e) Tempatkan kembali kolom GD pada tabung collection tube 2 ml.
- f) Centrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 xg untuk mengeringkan matriks kolom.

Langkah 4 (Elusi DNA)

- a) Pindahkan yang sudah kering ke kolom GD dalam tabung microcentrifuge 1,5 ml yang bersih.
- b) Tambahkan 100 μ l Elution Buffer yang telah dipanaskan sebelumnya, lalu tambahkan TE atau aquabidest ke tengah dari matriks kolom.
- c) Diamkan selama minimal 3 menit untuk memastikan Elution Buffer dan TE atau aquabidest diserap seluruhnya.
- d) Centrifuge dengan kecepatan 14.000-16.000 xg selama 30 detik untuk mengelusi DNA murni.
- e) Centrifuge kembali selama 3 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 xg untuk mengeringkan.

- 3) Running *Real-Time PCR* (Kit Vector-Best)
- 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
 - Masukkan 50 μ l sampel, 50 μ l control, dan 50 μ l calibrator ke dalam masing-masing tube PCR.
 - Tutup dengan alumunium foil dan pindahkan ke dalam alat Real-Time PCR.
 - Pilih menu Real-Time PCR pada komputer.
 - Pada info eksperimen diisi data pengoperasian.
 - Klik menu “Plate Edit”.
 - Pilih program sesuai dengan kebutuhan.
 - Block well standar lalu pilih auto standar, buat pengulangan sebanyak 9 kali, lalu apply.
 - 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*

| Stage | Temp $^{\circ}$ C | Waktu | Deteksi Fluorescence | Siklus Berulang |
|-----------|-------------------|----------|------------------------------|-----------------|
| Hold | 50 | 2 menit | - | 1 |
| Cycling 1 | 94 | 1 menit | - | 1 |
| | 94 | 10 detik | - | |
| Cycling 2 | 60 | 20 detik | FAM/Green, JOE/Yellow/HEX | 50 |

- 4) Pembuatan Gel Agarose Konsentrasi 1,5 %
- Buat 250 mL larutan Buffer TAE 1X dengan cara mencampurkan 5mL buffer TAE 50x ke dalam 245 mL akuades.
 - Buat gel agarose 1,5% dengan cara menimbang 0,375 gr gel agarose kemudian dilarutkan dalam 25 mL buffer TAE 1x dan dididihkan hingga larut sempurna.
 - Pasang sisir elektroforesis di salah satu ujung baki dengan posisi hampir menyentuh dasar baki.

- d) Periksa suhu larutan agarose dengan cara menempelkan erlenmayer ke tangan, jika suhunya sudah turun sekitar 60°C, tuangkan larutan agarose ke dalam baki elektroforesis, biarkan hingga larutan berubah menjadi gel yang padat.
 - e) Ambil sisir dengan hati-hati.
- 5) Menjalankan Elektroforesis
 - a) Masukkan baki yang telah berisi gel agarose ke dalam tangki elektroforesis yang telah diisi dengan sisa larutan buffer TAE 1x. (Pastikan bahwa gel agarose terendam seluruhnya dalam buffer TAE).
 - b) Dipipet sebanyak 6 µL DNA sampel, 6 µL marker DNA lalu loading pada well agarose.
 - c) Hubungkan kabel dari sumber arus ke tangki elektroforesis (pastikan bahwa kabel yang tersambung ke kutub negatif berada di dekat sumuran, sedangkan kabel yang tersambung ke kutub positif berada jauh dari sumuran, jika tidak demikian ubahlah posisi baki/gel ke arah sebaliknya).
 - d) Nyalakan sumber arus, atur voltase dan waktu running elektroforesis hingga diperoleh angka 100 volt dan waktu 60 menit.
 - e) Jalankan elektroforesis (lakukan *running*) dengan cara menekan tombol *run* pad sumber arus.
 - f) Elektroforesis akan berhenti apabila waktu yang ditetapkan sudah habis. Ditandai dengan adanya bunyi alarm. Matikan sumber arus listrik dan angkat baki dari tangki elektroforesis.
- 6) Persiapan Larutan Pewarnaan
 - a) Membuat sebanyak 100mL larutan stok methylene blue konsentrasi 1% dengan menimbang sebanyak 1gr serbuk methylene blue lalu dilarutkan dengan 100mL akuades lalu disaring dan dibuat konsentrasi larutan methylene blue 0.025%.
 - b) Memipet sebanyak 2,5mL larutan stok methylene blue 1% yang sudah dibuat tadi, lalu pindahkan ke labu ukur 100mL, kemudian tambahkan akuades hingga tanda batas dan homogenkan.

7) Pewarnaan DNA

a) Kontrol

GelRed ditambahkan saat pembuatan gel agarose lalu setelah itu dilakukan loading sampel dan dijalankan elektroforesis. Setelah elektroforesis selesai, gel agarose yang telah ditambahkan GelRed divisualisasikan di bawah sinar UV dengan meletakkan gel agarose dibawah transilluminator UV. Nyalakan transilluminator UV dan amati pita DNA.

b) Perlakuan

Setelah elektroforesis selesai, selanjutnya yaitu merendam gel agarose pada larutan methylene blue 0,025%, dengan waktu perendaman divariasikan (10, 15, 20 dan 25 menit). Kemudian dilakukan *destaining* menggunakan akuades selama 30 menit. Hasil pewarnaan dengan rendaman methylene blue diamati dengan menggunakan cahaya tampak (*visible light*).

7) Visualisasi DNA

Intensitas warna pita DNA divisualisasikan dengan menggunakan software gel analyzer 23.1.1. Cara menggunakan software gel analyzer:

- a) Buka *software* gel analyzer 23.1.1 yang sudah diunduh pada PC.
- b) *Upload* foto gel agarose yang sudah divisualisasikan baik menggunakan UV transilluminator atau *visible light*.
- c) Buat batasan well dengan memilih icon “*lanes mode*” dan tambah *lane* lalu buat garis pada well yang ingin ditandai (usahakan buat dalam garis lurus)
- d) Lakukan hal yang sama pada well yang lain.
- e) Setelah semua well ditandai, pilih well yang ingin diketahui intensitas warnanya.
- f) Tandai *peak/puncak* pita DNA dengan memilih icon “*add band manually*” dan arahkan pada pita DNA.
- g) Lakukan pada well yang lain
- h) Data terkait intensitas warna, akan muncul pada *software*.

F. Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Setelah data didapat, kemudian data diolah dengan menggunakan program komputerisasi dengan langkah sebagai berikut:

a. Entry Data

Tahapan dimana peneliti memasukan data yang diperoleh dari hasil visualisasi DNA pada proses elektroforesis agarose dengan menggunakan methylene blue 0,025%.

b. Coding

Tahapan dimana peneliti memberikan kode pada atribut penelitian.

c. Processing

Tahapan dimana peneliti melakukan proses pengetikan data dari *checklist* ke program komputer agar data dapat dianalisis.

d. Cleaning.

Tahapan dimana peneliti melakukan pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan untuk melihat apakah ada kesalahan saat proses entry data.

2. Analisis Data

Intensitas warna pita DNA diukur menggunakan *software* Gel Analyzer. Data yang terkumpul dianalisis menggunakan analisis statistika dengan analisis univariat dan bivariat. Analisa univariat yang dilakukan adalah uji normalitas shapiro wilk. Analisis bivariat menggunakan uji non parametrik Kruskal Wallis pada aplikasi *Statistical Program For Social Science* (SPSS).

G. Etika Clearence

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik dengan nomer etik 068/KEPK-TJK/III/2025. Penelitian yang dilakukan tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan. Limbah yang dihasilkan akan dikumpulkan dalam penampung limbah. Limbah berupa pewarna methylene blue dan gel agarose akan diperlakukan sebagai limbah infeksius dan akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu.