

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini bersifat *eksperimental* menggunakan desain penelitian Quasi Eksperimen. Variabel bebas penelitian ini adalah lama waktu penyimpanan plasma pasien positif hepatitis B. Variabel terikat adalah kuantitas HBV DNA menggunakan metode *Real-Time* PCR.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdoel Moeloek Provinsi Lampung. Analisa pemeriksaan pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juni tahun 2025.

C. Subyek Penelitian

Sampel pada penelitian ini berjumlah 12 dengan menggunakan sampel hasil pemeriksaan positif hepatitis B yang diperoleh dari Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdoel Moeloek Provinsi Lampung. Kriteria sampel penelitian ini yaitu berbentuk plasma pasien yang dinyatakan positif hepatitis B (HBV). Dalam penelitian ini, sampel plasma pasien positif hepatitis B yang sebelum disimpan (0 hari) akan diperiksa terlebih dahulu sebanyak 3 kali untuk dijadikan sebagai kontrol. Sementara itu, sampel plasma pasien positif hepatitis B yang telah disimpan pada hari ke-1 (24 jam), hari ke-3 (72 jam), dan pada hari ke-7 (168 jam) di suhu -20°C akan diperiksa dengan pengulangan sebanyak 3 kali menggunakan metode *Real-Time* PCR.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Lama waktu penyimpanan pada hari ke-0, 1, 3, dan 7	Sampel plasma pasien positif hepatitis B yang disimpan pada hari ke-0, 1, 3, dan 7	Observasi	Jam	Jam	Interval
2.	Kuantitas HBV DNA	Jumlah molekul HBV DNA (+) yang ada dalam sampel plasma	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	<i>Real-Time</i> PCR	<i>Viral Load</i> (IU/mL)	Rasio

E. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini berupa data primer yang didapatkan dari hasil eksperimen yaitu hasil dari pengukuran kuantitas HBV DNA menggunakan metode *Real-Time* PCR dengan penundaan waktu perlakuan pada sampel plasma pasien positif hepatitis B yaitu pada hari ke-0, 1, 3, dan 7.

Prosedur pengumpulan data primer dan pengambilan sampel dilakukan dengan beberapa langkah meliputi:

1. Peneliti melakukan penelusuran pustaka terkait judul penelitian yang akan diambil untuk mendapatkan pandangan ilmiah.
2. Peneliti melakukan pre-survey untuk menentukan dan mendapatkan sampel di Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdoel Moeloek Provinsi Lampung.
3. Peneliti melakukan pengajuan surat terkait izin pengambilan sampel yang diajukan ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
4. Setelah mendapatkan surat dari jurusan, peneliti mendapatkan izin mengambil sampel dan langsung segera menghubungi bagian Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdoel Moeloek Provinsi Lampung. Setelah diizinkan peneliti langsung mengambil sampel dengan memberi label pada sampel berupa tanggal dan jam pengambilan, tidak lupa juga peneliti harus memperhatikan kondisi tempat penyimpanan dan pengemasan. Kemudian jika semua sudah siap sampel dimasukkan ke dalam box dan dibawa ke Laboratorium

Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

5. Peneliti melakukan pengajuan surat terkait izin pengambilan sampel yang diajukan ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
6. Setelah mendapatkan surat dari jurusan, peneliti mendapatkan izin mengambil sampel dan langsung segera menghubungi bagian Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. H. Abdoel Moeloek Provinsi Lampung. Setelah diizinkan peneliti langsung mengambil sampel dengan memberi label pada sampel berupa tanggal dan jam pengambilan, tidak lupa juga peneliti harus memperhatikan kondisi tempat penyimpanan dan pengemasan. Kemudian jika semua sudah siap sampel dimasukkan ke dalam box dan dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
7. Jika telah dikonfirmasi dan disetujui peneliti selanjutnya dapat mulai melakukan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan mengolah sampel plasma HBV DNA positif yaitu membandingkan waktu penyimpanan yaitu 1, 3, dan 7 hari yang disimpan di suhu -20°C untuk dilihat kuantitas HBV DNA menggunakan metode *Real-Time* PCR.
8. Menyiapkan Alat dan Bahan
 - a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu handscoon, masker, jas laboratorium, tabung darah EDTA, centrifuge, pinset, wadah penyimpanan sampel, freezer, tabung microcentrifuge 1,5 ml, inkubator, mikropipet, beaker glass, timer dan *Real-Time* PCR.
 - b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu RBC Lysis Buffer, GB Buffer, Elution Buffer, RNase, Etanol Absolute, Buffer W1, Wash Buffer, TE atau aquabidest, kolom GD, collection tube 2 ml, tip, dan tissue.

9. Prosedur Pemeriksaan

a. Metode Pemeriksaan

Metode yang digunakan adalah *Real-Time* PCR yang berguna untuk mendeteksi keberadaan materi genetik virus dalam sampel dan juga dapat menghitung kuantitas jumlah HBV DNA.

b. Cara Kerja

1) Persiapan Sampel

- a) Siapkan sampel darah pasien positif hepatitis B yang didapatkan dari Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSAM Bandar Lampung.
- b) Kemudian sampel darah pasien tersebut dipisahkan terlebih dahulu untuk mendapatkan plasma disentrifugasi 3000 rpm selama 10-15 menit.
- c) Segera pisahkan sampel plasma tersebut ke dalam 4 tabung microsentrifuge 1,5 ml masing-masing sebanyak 900 μ l (untuk mencegah terbawanya sel darah dan komponen darah lainnya).
- d) Simpan 3 tabung microcentrifuge 1,5 ml yang berisi plasma ke dalam *freezer* dengan suhu -20°C untuk dilakukan penyimpanan selama 1, 3, dan 7 hari. Sedangkan 1 tabung microcentrifuge 1,5 ml yang berisi plasma tanpa penyimpanan (0 hari) langsung dilakukan pemeriksaan untuk dijadikan sebagai kontrol.
- e) Setelah didapatkan sampel berupa plasma, siapkan tabung microcentrifuge 1,5 ml dan tambahkan 300 μ l plasma ke dalamnya.
- f) Tambahkan 900 μ l RBC Lysis Buffer (3x dari volume plasma), lalu campur secara inversi. Jangan di vortex.
- g) Inkubasi tabung microcentrifuge selama 10 menit di suhu kamar.
- h) Centrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3.000 xg lalu buang supernatan seluruhnya.
- i) Tambahkan 100 μ l RBC Lysis Buffer untuk meresuspensi pelet leukosit kemudian dilanjutkan dengan tahap lisis sel.
- j) Lalu tambahkan 30 μ l Internal Control (IC) ke dalam tabung microcentrifuge 1,5 ml.
- k) Selanjutnya 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 µl 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 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 µl sampel, 50 µl PC, NC, WPC, dan 50 µl CS1 dan CS2 ke dalam masing-masing tube PCR.
- c) Tutup dengan alumunium 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

Stage	Temp °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

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data yang akan digunakan pada penelitian ini adalah data primer, setelah itu data tersebut akan diolah menggunakan program komputer dengan langkah sebagai berikut:

a) *Entry Data*

Peneliti memasukkan data yang diperoleh berupa data yaitu kadar kuantitas HBV DNA (nilai Cn) pada kontrol dan kadar kuantitas HBV DNA (nilai Cn) pada sampel plasma pasien positif hepatitis B yang disimpan pada hari ke-0, 1, 3, dan 7 ke dalam program SPSS.

b) *Cleaning Data*

Pengecekan ulang data yang telah di *entry* untuk melihat apakah terjadi kesalahan dalam memasukkan data atau tidak.

c) *Processing Data*

Peneliti mengubah data mentah menjadi informasi yang bermakna untuk membantu dalam pengambilan keputusan yang valid dengan mengintegrasikan data dari check list ke program komputer menggunakan SPSS untuk dianalisis.

2. Analisis Data

a) Analisa Univariat

Analisa ini digunakan untuk melihat distribusi frekuensi dari setiap variabel penelitian.

b) Analisa Bivariat

Data yang diperoleh selanjutnya akan dianalisa menggunakan analisa data bivariat dengan uji *Regression Linier* (sederhana) untuk mengetahui sejauh

mana variabel independen (lama waktu penyimpanan plasma pasien positif hepatitis B) dapat mempengaruhi variabel dependen (kuantitas HBV DNA menggunakan metode *Real-Time* PCR). Namun sebelum melakukan uji *Regression Linier* (sederhana) dilakukan uji asumsi klasik terlebih dahulu yaitu uji normalitas, uji linearitas, dan uji heteroskedastisitas.

G. *Ethical Clearance*

Penelitian dilakukan atas izin komisi etik dengan nomor etik No.077/KEPK-TJK/III/2025 yang tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan serta limbah yang dihasilkan dalam penelitian ini akan dikumpulkan dalam penanganan limbah. Limbah berupa sampel virus dan bahan habis pakai lainnya akan diperlakukan sebagai limbah infeksius dan akan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan. Identitas subyek pada penelitian ini akan dirahasiakan dan seluruh biaya yang dipergunakan dalam penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti.