

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan desain *cross sectional*. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar *Interleukin-6* sedangkan variabel bebas dalam penelitian ini adalah derajat positvitas basil tahan asam. Analisa data yang digunakan adalah analisa bivariat dengan uji korelasi *Spearman* untuk menentukan hubungan derajat positvitas basil tahan asam terhadap kadar *Interleukin-6* pada pasien tuberkulosis paru sebelum pengobatan di Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim Kota Bandar Lampung.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Tempat pengambilan sampel serum dan pemeriksaan mikroskopis basil tahan asam dilakukan di Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim Kota Bandar Lampung. Kemudian pemeriksaan kadar *Interleukin-6* dilakukan di Laboratorium Imunoserologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Mei 2024.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini terdiri dari 46 pasien tuberkulosis paru BTA positif yang baru terdiagnosis dan belum menjalani pengobatan Di Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim pada bulan Januari-April 2024.

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini terdiri dari 30 pasien tuberkulosis paru BTA positif yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklus.

a. Kriteria Inklusi

- 1) Pasien baru TB paru yang bersedia menjadi responden dengan menandatangani *inform consent*
- 2) Pasien baru TB paru yang belum pernah menjalani pengobatan TB sebelumnya

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Pasien baru TB paru yang menderita hipertensi
- 2) Pasien baru TB paru yang menderita diabetes mellitus
- 3) Pasien baru TB paru yang menderita HIV
- 4) Pasien baru TB paru yang menderita penyakit jantung koroner

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel Bebas: Derajat positivitas basil tahan asam pasien baru TB paru sebelum pengobatan di Puskesmas Panjang, Kampung Sawah dan Way Halim	Derajat positivitas basil tahan asam pasien baru TB paru sebelum pengobatan di Puskesmas Panjang, Kampung Sawah dan Way Halim	Mikroskop	Pengamatan dan pencatatan	1. Scanty 2. 1+ 3. 2+ 4. 3+ (Kemenkes, 2017)	Ordinal
2.	Variabel Terikat: Kadar <i>Interleukin-6</i> pasien baru TB paru sebelum pengobatan di Puskesmas Panjang, Kampung Sawah dan Way Halim	Kadar <i>Interleukin-6</i> pasien baru TB paru sebelum pengobatan di Puskesmas Panjang, Kampung Sawah dan Way Halim	ELISA <i>reader</i>	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	ng/L	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dari hasil pemeriksaan mikroskopis BTA yang dilakukan oleh enumerator pada pasien TB paru sebelum pengobatan di Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah, dan Puskesmas Way Halim Kota Bandar Lampung serta hasil pemeriksaan kadar IL-6 menggunakan metode *sandwich* ELISA di Laboratorium Imunoserologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

1. Tahap Pengumpulan Data

Data diperoleh melalui prosedur sebagai berikut:

- a. Melakukan penelusuran pustaka tentang tuberkulosis dan *Interleukin-6* untuk mendapatkan perspektif ilmiah dari penelitian.
- b. Melakukan kegiatan *pra survey* ke lokasi penelitian, yaitu Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim.
- c. Mengajukan surat izin penelitian ke Direktur Poltekkes Tanjungkarang untuk kemudian diteruskan kepada Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Satu Pintu, selanjutnya diteruskan kepada Kepala Dinas Kesehatan Kota Bandar Lampung setelah itu ke Kepala Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim Kota Bandar Lampung.
- d. Setelah mendapatkan surat izin dari pihak Puskesmas, selanjutnya peneliti melakukan penelusuran terhadap hasil pemeriksaan mikroskopis BTA pada pasien baru TB paru sebelum pengobatan yang telah dilakukan oleh enumerator di Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim Kota Bandar Lampung.
- e. Memberikan kuisioner kepada pasien baru TB paru pada saat pasien melakukan pengambilan hasil pemeriksaan mikroskopis BTA sebelum menjalani pengobatan untuk penjarangan sampel penelitian.
- f. Memberikan dan menjelaskan *informed consent*. Pasien/wali pasien dapat menandatangani *informed consent* bila bersedia menjadi responden penelitian.
- g. Melakukan pengambilan sampel darah pasien baru TB paru untuk kemudian dipreparasi menjadi serum dan dilakukan pemeriksaan kadar IL-6 di Laboratorium Imunoserologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Cara Pengumpulan Data

a. Langkah Persiapan

1) Alat dan Bahan

a) Alat

Peralatan yang digunakan dalam pemeriksaan ini yaitu 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, *handscoon*, dan masker.

b) Bahan

Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan ini yaitu alkohol swab, kapas kering, plaster, spuit, tabung bertutup merah (tanpa antikoagulan), cup serum, plastik *zip lock* kecil, sampel serum, kit reagen (*standar solution*, *standar diluent*, *konjugat streptavidin HRP*, *stop solution*, *substrat solution A*, *substrat solution B*, *wash buffer*, *Biotinylated human IL-6 antibody*) dan aquabidest.

b. Metode Pemeriksaan

Penelitian ini menggunakan metode *enzyme link immunosorbent assay* (ELISA) sandwich antibodi ganda dengan menggunakan alat ELISA *reader* untuk pemeriksanan kadar IL-6.

c. Prinsip Pemeriksaan

Antibodi yang telah dilapisi sebelumnya pada plate adalah antibodi IL-6 manusia. IL-6 yang terdapat di dalam sampel akan berikatan dengan antibodi IL-6 yang telah dilapisi pada plate, kemudian ditambahkan antibodi terbiotinilasi dan berikatan dengan IL-6 sampel. Setelah itu ditambahkan konjugat streptavidin-HRP dan berikatan dengan antibodi biotinilasi. Selanjutnya dilakukan inkubasi, streptavidin-HRP yang tidak terikat akan hilang pada tahap pencucian. Kemudian ditambahkan dengan substrat solution sehingga warna yang timbul sebanding dengan jumlah IL-6 pada sampel. Reaksi kemudian diakhiri dengan penambahan stop solution lalu diukur absorbansinya menggunakan ELISA pada panjang gelombang 450 nm (Bioassay Technology Laboratory, no date).

d. Cara Kerja

1) Pra Analitik

a) Persiapan Pasien Baru TB Paru Yang Memenuhi Kriteria Dan Bersedia Menjadi Responden Dalam Penelitian

- (1) Mengatur posisi pasien dalam keadaan nyaman untuk dilakukan pengambilan darah vena.
- (2) Petugas mencuci tangan kemudian menggunakan sarung tangan.

- (3) Memasang tourniquet pada lengan pasien dengan jarak 3-4 inchi diatas fossa antecubiti lalu meminta pasien mengepalkan tangan.
 - (4) Mencari pembuluh darah vena yang akan ditusuk dengan melakukan palpasi pada daerah penusukan. Vena *median cubiti* adalah pilihan utamanya kemudian pilihan kedua adalah vena *cephatica* diikuti vena *basilica* yang sebisa mungkin dihindari.
 - (5) Melepaskan tourniquet dari lengan pasien (Kiswari, 2014).
- b) Pengambilan Darah Vena
- (1) Menyiapkan tabung merah dan peralatan pengambilan darah lainnya sesuai prosedur.
 - (2) Membersihkan daerah penusukan menggunakan alkohol swab 70% dengan gerakan melingkar lalu dibiarkan kering.
 - (3) Ulangi pemasangan tourniquet dengan jarak 3-4 inchi diatas fossa antecubiti dan meminta pasien agar mengepalkan tangan.
 - (4) Menusuk pembuluh darah vena dengan sudut 45° dan mencegah pergerakan lengan agar tidak mengubah posisi jarum.
 - (5) Saat darah telah masuk ke dalam spuit, lepaskan tourniquet dan meminta pasien untuk dapat membuka kepalan tangannya.
 - (6) Ketika darah yang dibutuhkan telah cukup, tutup lokasi penusukan menggunakan kapas kering dan bersih lalu keluarkan spuit dengan lembut dan diperban menggunakan *adhesive tape*.
 - (7) Memindahkan darah dari spuit ke dalam tabung merah melalui dinding tabung secara perlahan.
 - (8) Memberi identitas pasien menggunakan label yang ditempelkan pada tabung.
 - (9) Melepaskan sarung tangan lalu mencuci tangan (Kiswari, 2014).
- c) Pembuatan Serum
- (1) Darah pada tabung merah didiamkan menggumpal pada suhu kamar selama 30-60 menit sebelum sentrifugasi
 - (2) Melakukan sentrifugasi menggunakan centrifuge dengan kecepatan 1000-3000 rpm selama 10 menit (harus seimbang)

- (3) Memisahkan serum dari bekuan dan memasukkan ke dalam cup serum yang telah dilabeli sebelumnya (H.B. WU, 2006).
- d) Transportasi dan Penyimpanan Serum di Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung
 - (1) Memasukkan cup serum ke dalam plastic *zip lock* kecil.
 - (2) Memasukkan *cool gel* dengan kondisi yang beku ke dalam *cool box* lalu susun dengan rapi.
 - (3) Memasukkan serum yang telah dibungkus dengan plastik *zip lock* ke dalam *cool box*, lalu posisikan di antara *cool gel*.
 - (4) Menutup *cool box* dengan rapat.
- e) Lalu mengantarkan serum yang terdapat pada *cool box* ke Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung untuk disimpan pada suhu -40°C sampai pemeriksaan kadar IL-6 dilakukan.
- f) Transportasi Serum dari Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. H. Abdul Moeloek Provinsi Lampung ke Laboratorium Imunoserologi Poltekkes Tanjungkarang
 - (1) Setelah waktu pengumpulan sampel selesai, sampel serum dimasukkan ke dalam *cool box* yang *berisi ice gel*.
 - (2) Apabila di dalam *cool box* masih terdapat ruangan kosong maka ditambahkan potongan kertas untuk mencegah terjadinya guncangan pada serum.
 - (3) Menutup *cool box* dengan rapat.
 - (4) Lalu membawa serum yang terdapat pada *cool box* ke Laboratorium Imunoserologi Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan pemeriksaan kadar IL-6.
- 2) Analitik
 - a) Pengenceran Standar
 - (1) Mengeluarkan seluruh reagen pada suhu ruang 30 menit sebelum digunakan.
 - (2) Menyiapkan 5 tabung untuk pengenceran standar.
 - (3) Menambahkan masing-masing 120 ul standar diluent ke setiap tabung pengenceran.

- (4) Menambahkan 120 ul original standar ke tabung 1 dan homogenkan dengan vortex.
 - (5) Memindahkan 120 ul larutan dari tabung 1 ke tabung 2 dan homogenkan dengan vortex.
 - (6) Memindahkan 120 ul larutan dari tabung 2 ke tabung 3 dan homogenkan, lakukan hal yang sama sampai tabung ke 5.
 - (7) Menyiapkan 1 tabung kembali berisi 120 ul aquadest yang berfungsi sebagai zero standar (Bioassay Technology Laboratory, no date).
- b) Pembuatan Wash Buffer
- (1) Mengencerkan 20 ml wash buffer concentrate sebanyak 25 kali menggunakan aquadest agar menghasilkan 500 ml wash buffer.
- c) Pemeriksaan Kadar IL-6 Pasien Baru TB Paru Yang Memenuhi Kriteria Dan Bersedia Menjadi Responden Dalam Penelitian
- (1) Menyiapkan seluruh reagen, larutan standar dan sampel sesuai petunjuk pada suhu ruang sebelum digunakan.
 - (2) Menentukan dan menghitung strip well yang akan digunakan, lalu pasang pada bingkai plate.
 - (3) Menambahkan masing-masing 50 ul pengenceran standar pada sumur standar (6 sumur).
 - (4) Menambahkan 40 ul sampel ke dalam sumur sampel.
 - (5) Menambahkan 10 ul antibodi biotinilasi ke seluruh sumur sampel.
 - (6) Menambahkan 50 ul konjugat streptavidin-HRP yang akan berikatan dengan antibodi biotinilasi, ke seluruh sumur sampel dan standar.
 - (7) Menghomogenkan dengan menggoyangkan sumur, tutup dengan *sealer* atau penutup plate kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C.
 - (8) Membuka *sealer* atau penutup plate dan melakukan pencucian menggunakan ELISA washer sebanyak 5 x.
 - (9) Menambahkan 50 ul substrat A ke masing-masing sumur dan tambahkan 50 ul substrat B yang berfungsi menimbulkan reaksi warna biru, ke masing-masing sumur lalu tutup dengan *sealer* serta inkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C dalam gelap.

(10) Menambahkan 50 ul stop solution ke masing-masing sumur, warna biru yang timbul akan segera berubah menjadi kuning.

(11) Mengukur absorbansi menggunakan ELISA reader paling lambat 10 menit setelah penambahan stop solution dengan panjang gelombang 450 nm (Bioassay Technology Laboratory, no date).

3) Pasca Analitik

a) Melakukan penghitungan kadar IL-6 dengan membuat kurva standar menggunakan *computer base curve software* (Bioassay Technology Laboratory, no date).

Menurut Siagian (2018), nilai normal IL-6 adalah <4 ng/L. Apabila kadar IL-6 ≥ 4 ng/L maka menandakan terjadi peningkatan kadar IL-6.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Setelah data diperoleh, data tersebut kemudian diolah menggunakan suatu program komputerisasi melalui langkah :

a. Memasukkan Data

Data yang telah didapatkan selanjutnya dimasukkan ke dalam program SPSS, data tersebut berupa karakteristik pasien, derajat positivitas basil tahan asam dan kadar *Interleukin-6*.

b. Coding

Dalam tahap ini, peneliti memberikan kode pada variabel derajat positivitas basil tahan asam yaitu “1” untuk scanty, “2” untuk 1+, “3” untuk 2+, dan “4” untuk 3+.

c. Cleaning

Memeriksa kembali data yang telah dimasukkan, hal ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya kemungkinan kesalahan dalam mengentry data.

d. Editing

Data yang telah di coding berikutnya dilakukan pengolahan dengan menggunakan program SPSS.

2. Analisis Data

Data yang telah terkumpul kemudian dianalisis dengan cara:

a. Analisis Univariat

Data yang dianalisis secara univariat dalam penelitian ini yaitu karakteristik pasien tuberkulosis paru sebelum pengobatan berdasarkan usia dan jenis kelamin, distribusi frekuensi derajat positività basil tahan asam dan distribusi frekuensi kadar *Interleukin-6* pada pasien baru tuberkulosis paru sebelum pengobatan.

b. Analisis Bivariat

Data dianalisis menggunakan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan derajat positività basil tahan asam terhadap kadar *Interleukin-6* melalui program komputer yaitu SPSS versi 26.

G. Ethical Clearance

Penelitian ini melibatkan partisipasi manusia sebagai subyek penelitian, oleh karena itu proses telaah secara etik diperlukan melalui penyerahan naskah proposal ke Komite Etik Poltekkes Tanjungkarang untuk dinilai kelayakannya. Setelah mendapatkan surat persetujuan laik etik dengan nomor 381/KEPK-TJK/IV/2024 pada tanggal 05 April 2024, maka penelitian ini dapat dilaksanakan. Subyek dalam penelitian ini adalah pasien baru TB paru sebelum pengobatan di Puskesmas Rawat Inap Panjang, Puskesmas Rawat Inap Kampung Sawah dan Puskesmas Way Halim. Kemudian subyek penelitian diberi penjelasan terkait maksud dan tujuan penelitian baik secara lisan maupun tertulis dengan menggunakan *informed consent*. Subyek penelitian memiliki hak untuk menolak tanpa dikenai sanksi apapun. Identitas subyek penelitian akan dirahasiakan. Seluruh biaya yang diperlukan dalam penelitian ditanggung oleh peneliti.