

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen murni (*true experiment*), yaitu penelitian untuk mengetahui besarnya pengaruh yang terjadi sebagai akibat dari suatu perlakuan atau intervensi terhadap suatu variabel (Notoatmodjo, 2005). Ciri utama pada eksperimen murni yaitu sampel yang digunakan untuk kelompok kontrol maupun untuk kelompok perlakuan dipilih secara random dari populasi tertentu (Sugiyono, 2013).

Eksperimen yang dilakukan pada penelitian ini yaitu memberikan intervensi atau perlakuan terhadap serum normal dengan menambahkan hemoglobin dengan variasi kadar yang meningkat secara serial. Hasil atau akibat dari perlakuan tersebut berupa kadar asam urat dalam serum yang diukur menggunakan metode enzimatik fotometri.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *pre and post test with control* atau tes yang dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan menggunakan kontrol. Dalam rancangan ini dilakukan randomisasi, yaitu pengelompokan anggota kontrol dan eksperimen yang dilakukan secara random. Dengan randomisasi, maka kedua kelompok

mempunyai sifat yang sama sebelum dilakukan intervensi. Dengan rancangan ini, memungkinkan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Notoadmodjo, 2010).

Kadar asam urat pada serum yang tidak ditambah hemolisat adalah *pre test*, sedangkan kadar asam urat pada serum yang ditambah hemolisat dengan berbagai variasi yang meningkat secara serial adalah *post test*. Desain penelitian ditunjukkan seperti pada gambar 8.

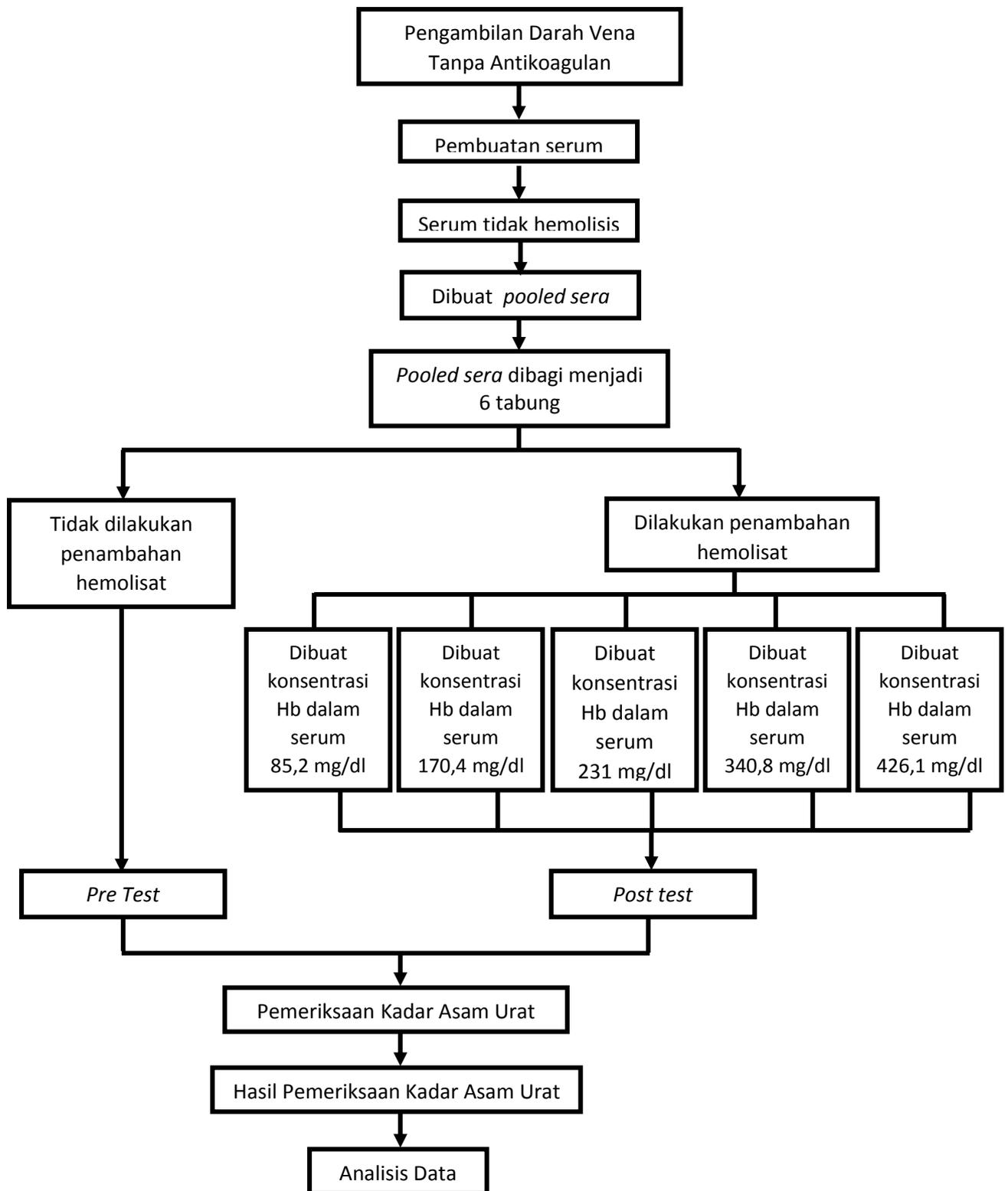
<i>Pretest</i>	Perlakuan	<i>Posttest</i>
O ₀	X ₁	O ₁
	X ₂	O ₂
	X ₃	O ₃
	X ₄	O ₄
	X ₅	O ₅

Gambar 8. Desain Penelitian

Keterangan Gambar 8 :

- O₀ : Kadar asam urat pada serum yang tidak ditambah hemolisat
- X :Perlakuan dengan berbagai variasi penambahan hemolisat dalam serum
- O :Kadar asam urat pada serum yang ditambah hemolisat dengan berbagai variasi

B. Alur Penelitian



Gambar 9. Alur Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah serum, dengan kriteria sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi :
 - a. Serum tidak hemolisis
 - b. Serum diambil dari responden yang tidak memiliki riwayat penyakit seperti anemia hemolitik, *Incompatible Blood Transfusion*
2. Kriteria eksklusi :
 - a. Serum lipemik
 - b. Serum ikterik

Obyek penelitian ini adalah hasil pemeriksaan kadar asam urat yang diukur dengan alat kimia analyzer otomatis.

Pengumpulan sampel dilakukan secara acak lengkap, dimana anggota populasi dibuat homogen. Sampel diambil secara acak tanpa memperhatikan tingkatan sehingga semua anggota populasi memiliki kesempatan yang sama untuk menjadi sampel (Sugiono, 2003).

Sampel dirancang dengan 6 perlakuan. Dilakukan replikasi atau ulangan yang sama untuk setiap anggota sampel. Rumus ulangan yang digunakan adalah sebagai berikut (Hanafiah, 2009) :

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

Keterangan: t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

Jumlah ulangan dianggap telah cukup baik apabila memenuhi persamaan di atas. Menurut Sugiyono (2010), sampel yang layak untuk penelitian minimal

30. Oleh sebab itu, untuk meningkatkan derajat ketelitian, peneliti menetapkan konstanta derajat ketelitian sebesar 30, sehingga jumlah ulangan yang diperlukan adalah:

$$(t-1)(r-1) \geq 30$$

$$(6-1)(r-1) \geq 30$$

$$5(r-1) \geq 30$$

$$(r-1) \geq 6$$

$$r \geq 7$$

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 2-5 Januari 2019.

2. Tempat Penelitian

- a) Pengambilan darah, pembuatan serum normal dan serum hemolisis dilaksanakan di Laboratorium Hematologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta
- b) Pemeriksaan kadar asam urat dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi kadar hemoglobin dalam serum.

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pemeriksaan kadar asam urat.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah suhu dan waktu inkubasi.

F. Definisi Operasional

1. Variabel Bebas : variasi kadar hemoglobin dalam serum

Variasi penambahan kadar hemoglobin dalam serum adalah penambahan hemolisis. Tujuannya untuk membuat kadar hemoglobin dalam serum meningkat 85,2 mg/dl, 170,4 mg/dl, 231 mg/dl, 340,8 mg/dl, 426,1 mg/dl, sehingga dapat diketahui besarnya pengaruh setiap penambahan kadar 85,2 mg/dl hemoglobin terhadap hasil pemeriksaan kadar asam urat.

Satuan : mg/dl

Skala data : Rasio

2. Variabel Terikat : kadar asam urat

Kadar asam urat adalah jumlah miligram asam urat dalam 100 ml serum yang diukur dengan metode enzimatik fotometri.

Satuan : mg/dl

Skala data : Rasio

3. Variabel Pengganggu : suhu dan waktu inkubasi
 - a. Suhu inkubasi : suhu yang digunakan dalam proses inkubasi pada reaksi enzimatik pemeriksaan asam urat. Suhu inkubasi yang digunakan adalah 37°C. Suhu inkubasi dikendalikan dengan menggunakan alat kimia analyzer otomatis.
 - b. Waktu inkubasi : waktu yang digunakan untuk proses inkubasi pada reaksi enzimatik pada pemeriksaan asam urat. Waktu inkubasi yang digunakan adalah 10 menit, dikendalikan dengan menggunakan alat kimia analyzer otomatis.

G. Jenis dan Teknik Penelitian

1. Jenis Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Data primer adalah data yang diambil dan dikumpulkan oleh peneliti secara langsung dari sumber datanya (Riwidikdo, 2008). Data ini diperoleh melalui pemeriksaan kadar asam urat.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini berdasarkan *pre test and post test*. *Pre test* berupa hasil pemeriksaan kadar asam urat pada serum yang tidak ditambah hemolisis, sedangkan *post test* berupa hasil pemeriksaan kadar asam urat pada serum yang ditambahkan hemolisis. Data diperoleh melalui pengukuran sampel setelah diberi perlakuan sesuai jumlah variasi kadar hemoglobin.

H. Alat, Bahan, dan Reagen Penelitian

1. Alat ukur

- a. Perlengkapan sampling : *Tourniquet*, kapas alkohol, jarum vakuitaner, *holder*, plester, tabung penampung darah, kapas kering
- b. Tabung *sentrifuge*
- c. *Sentrifuge*
- d. Mikropipet dan tip
- e. Tabung reaksi dan rak
- f. Pipet tetes
- g. Corong
- h. Kertas saring Whatman No. 1
- i. Kuvet
- j. Spektrofotometer
- k. *Automated clinical analyzer* Respons 920 DiaSys

2. Bahan penelitian

- a. Sampel darah vena
- b. Antikoagulan EDTA
- c. Larutan NaCl
- d. Akuades
- e. Toluol
- f. Larutan drabkins (Riswanto, 2013)
 - 1) Kalium ferisianida ($K_3Fe[CN]_6$) 200 mg
 - 2) Kalium sianida (KCN) 50 mg

- 3) Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)..... 140 mg
 Berfungsi untuk menstabilkan pH 7 – 7,4 dimana reaksi dapat berlangsung sempurna pada saat yang tepat
- 4) Nonionik0,5-1 mL
 Berfungsi mempercepat hemolisis darha serta mencegah kekeruhan yang terjadi oleh protein plasma.
- 5) Aquades..... 1000 mL
- g. Reagen kit pemeriksaan asam urat berisi (DiaSys, 2015) :
- 1) R1 : *Phosphate buffer* pH 7,0 100 mmol/L
 TOOS 1,25 mmol/L
 Ascorbate oxidase $\geq 1,2$ kU/L
- 2) R2 : *Phosphate buffer* pH 7,0 100 mmol/L
 4-aminoantipyrine..... 1,5 mmol/L
 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 50 $\mu\text{mol/L}$
 Peroxidase (POD)..... ≥ 5 kU/L
 Uricase..... ≥ 250 U/L

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Alat ukur yang digunakan untuk mengukur penelitian ini adalah alat ukur yang berada di Balai Laboratorium Kesehatan. Tingkat keandalan dan kesahihan alat ukur sudah terstandar ISO 9001 : 2008. Validitas alat yang digunakan, ditunjukkan dengan grafik kontrol pada bulan dimana pemeriksaan dilakukan. Serum kontrol diperiksa dengan metode *day in day*, dimana pengerjaan kontrol dilakukan setiap hari sebelum alat digunakan.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan

- a. Melakukan perizinan menggunakan Laboratorium Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta sebagai tempat penelitian
- b. Mempersiapkan alat, bahan dan reagen yang akan digunakan
- c. Persiapan responden

Responden didata untuk mendapatkan informasi tentang kondisi tubuh, usia, dan jenis kelamin, serta memberikan penjelasan dan *informed consent* sebelum dilakukan sampling darah
- d. Mempersiapkan formulir pencatatan

2. Tahap pelaksanaan

- a. Tahap pengambilan darah vena
 - 1) Pasien diposisikan duduk dengan posisi lengan pasien lurus dan telapak tangan menghadap keatas, siku tidak boleh dibengkokkan. Dipilih lengan yang lebih banyak melakukan aktivitas
 - 2) Pasien diminta untuk mengepalkan tanganya
 - 3) Memasang *tourniquet* \pm 5-10 cm diatas lipat siku
 - 4) Melakukan palpasi atau perabaan untuk emastikan posisi vena
 - 5) Mendesinfektan dengan menggunakan alkohol 70 % pada kulit yang akan ditusuk dan biarkan kering untuk mencegah terjadinya hemolisis dan rasa terbakar. Kulit yang sudah dibersihkan tidak boleh dipegang lagi

- 6) Menusuk bagian vena yang telah dibersihkan dengan jarum. Lubang jarum menghadap ke atas dengan sudut kemiringan antara jarum dan kulit 15 derajat. Bila jarum berhasil masuk vena, akan terlihat darah masuk dalam semprit. Namun bila darah tidak keluar, ganti posisi penusukan
 - 7) Jika darah berhasil masuk semprit, darah dihisap hingga memperoleh volume ± 5 ml
 - 8) Tourniquet dilepaskan dan pasien diminta membuka kepalan pada tangannya
 - 9) Meletakkan kapas kering pada bekas tusukan lalu jarum ditarik
 - 10) Pasien diminta untuk menekan kapas tersebut selama ± 2 menit. Setelah darah berhenti, bagian bekas tusukan diplester
 - 11) Jarum dilepaskan dari spuit dan darah dimasukkan kedalam tabung penampung melalui dinding tabung secara perlahan untuk menghindari hemolysis
- b. Tahap pembuatan hemolizat
- 1) Mengambil darah vena sebanyak ± 3 ml
 - 2) Darah dituangkan kedalam tabung sentrifus
 - 3) Menambahkan 3 tetes antikoagulan EDTA dan dicampur perlahan
 - 4) Dipusingkan selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm
 - 5) Plasma dengan endapan eritrosit dipisahkan
 - 6) Eritrosit dicuci menggunakan larutan NaCl fisiologi dengan cara:

- a) Menambahkan larutan NaCl fisiologis kedalam tabung sentrifus yang berisi eritrosit dengan perbandingan NaCl : eritrosit = 1 : 1
 - b) Menghomogenkan
 - c) Mempusingkan selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm
 - d) Membuang larutan NaCl (bagian supernatan)
 - e) Mengulangi langkah a) – d) sebanyak 3x untuk memperoleh eritrosit murni
- 7) Mengambil 1 ml eritrosit murni
 - 8) Memasukkan kedalam tabung sentrifus lain yang telah diisi 1,4 ml akuades
 - 9) Mengocok kuat-kuat agar eritrosit lisis total
 - 10) Menambahkan 0,4 ml toluol dan dikocok kuat
 - 11) Mempusingkan selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm
 - 12) Memisahkan larutan toluol dan membuang bagian yang menggumpal
 - 13) Menyaring larutan yang bebas dari toluol dan protein menggunakan kertas saring whatmann No. 1 untuk memperoleh hemolizat.
- c. Tahap pengukuran kadar hemoglobin dalam hemolizat
- 1) Tabung reaksi diisi dengan 5,0 ml larutan drabkins
 - 2) Menambahkan 20 μ l hemolizat
 - 3) Menghomogenkan

- 4) Menginkubasi selama 3-5 menit pada suhu kamar
- 5) Kuvet diisi dengan campuran larutan tersebut
- 6) Membaca absorbansi pada panjang gelombang 540 nm
- 7) Menghitung kadar hemoglobin berdasarkan rumus :

$$\text{Kadar Hb} = \text{Absorbansi sampel} \times \text{Faktor reagen drapkins}$$

Faktor reagen drapkins terdapat pada label yang menempel pada reagen drapkins

Diperoleh data :

Absorbansi sampel : 0,395

Faktor reagen drapkins : 42,61

Kadar Hemoglobin : $0,395 \times 42,61 = 16,8 \text{ g/dl}$

- 8) Membuat hemolisis dengan cara mengencerkan eritrosit murni sebanyak 20 kali, sehingga kadar hemoglobin dalam hemolisis dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Kadar hemolisis} = \frac{16,8 \text{ g/dl}}{20} = 840 \text{ mg/dl}$$

d. Tahap pembuatan serum

- 1) Darah dibiarkan membeku terlebih dahulu dalam wadah penampung pada suhu kamar selama 2-3 jam
- 2) Memusingkan bekuan darah selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm
- 3) Memisahkan serum dari sel-sel darah dengan cara mengambil bagian atas atau supernatan. Serum yang berwarna kuning jernih
- 4) Serum yang telah dipisahkan dicampur menjadi *pooled sera*

e. Tahap pembuatan variasi kadar hemoglobin dalam serum

1) Serum dibagi menjadi 6 tabung

- a) Tabung 1 : tanpa penambahan hemolisat
- b) Tabung 2 : penambahkan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 80 mg/dL
- c) Tabung 3 : penambahkan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 160 mg/dL
- d) Tabung 4 : penambahkan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 240 mg/dL
- e) Tabung 5 : penambahkan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 320 mg/dL
- f) Tabung 6 : penambahkan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 400 mg/dL

- 2) Menghitung jumlah volume hemolisat untuk membuat variasi kadar hemoglobin dalam serum secara serial pada masing-masing tabung. Banyak volume hemolisat yang ditambahkan dihitung berdasarkan rumus (terlampir) :

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

Keterangan :

V1 : Volume hemolisat

V2 : Volume campuran

C1 : Konsentrasi Hb dalam hemolisat

C2 : Konsentrasi Hb dalam campuran

- 3) Menghitung kadar Hb dalam serum masing-masing tabung (terlampir).
 - 4) Serum dengan kadar hemoglobin dalam tabung masing – masing dibagi menjadi 7 kuvet dengan memipet 500 µl.
 - 5) Serum siap untuk dilakukan pemeriksaan kadar asam urat.
- f. Tahap pemeriksaan kadar asam urat

Pemeriksaan kadar asam urat menggunakan alat kimia analyzer Respos 920 dengan cara kerja sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan alat dan bahan
- 2) Menyalakan alat Respos 920 dengan menyalakan “*Main Power*” ke saklar “*Power*”
- 3) Dimasukkan reagen pada ”*Reagen Tray*” pada posisinya
- 4) Diklik tombol “*ML Respos 920*” kemudian dimasukkan ID dan password, ditunggu 8 menit kemudian di klik “*OK*”
- 5) Dimasukkan sampel ID dan nama pasien
- 6) Dipilih parameter pemeriksaan “Asam Urat”, kemudian diklik “*SAVE*”
- 7) Diletakkan sampel pada “*Sampel Tray*” sesuai posisinya
- 8) Diklik “*GO*” kemudian lampu akan berwarna hijau
- 9) Diklik “*Pre-Run Check*”, kemudian diklik “*OK*”

K. Manajemen Data

Data yang terkumpul dalam penelitian ini akan di analisis menggunakan teknik analisis deskriptif dan analisis statistik. Analisis deskriptif merupakan statistik yang digunakan untuk menggambarkan atau menganalisis suatu statistik penelitian, tetapi tidak digunakan untuk menggambarkan atau membuat kesimpulan yang lebih luas (generalisasi) (Sugiyono, 2003). Analisis statistik digunakan untuk mengeneralisasikan data sampel terhadap populasi.

1. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dianalisa secara deskriptif untuk menggambarkan nilai kadar asam urat dalam serum yang mengandung kadar hemoglobin dalam serum meningkat secara serial.

2. Analisis Statistik

Sebelum dilakukan analisis statisik dilakukan analisa data. Data yaitu diperoleh merupakan data primer dengan skala data rasio. Pengujian Analisis Statistik menggunakan program SPSS 17.0 *for windows* untuk mengetahui besarnya pengaruh kadar hemoglobin dalam serum terhadap pemeriksaan kadar asam urat dengan derajat kesalahan (α) sebesar 5%.

a. Uji normlitas data

Data dilakukan uji distribusi untuk mengetahui apakah data tersebut berdistribusi normal atau tidak. Pengujian dilakukan dengan *One Sampel Kolmogorov-Smirnov (K-S)*. Data berdistribusi normal jika nilai signifikan yaitu $p > \alpha$ (0.05). Data berdistribusi tidak normal

jika nilai signifikan yaitu $p < \alpha$ (0.05). Data berdistribusi normal maka dilakukan uji statistik *One-Way ANOVA*, sedangkan jika data tidak berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji non-parametrik menggunakan *Kruskal-walls-H Test*.

b. Uji beda

Uji beda yang digunakan dalam penelitian ini adalah *One-Way ANOVA*. Tujuannya adalah untuk mengetahui ada tidaknya beda antara kelompok perlakuan (eksperimen) dengan kelompok kontrol.

Hipotesis statistik sebagai dasar pengambilan keputusan adalah sebagai berikut:

H_0 : Tidak ada pengaruh kadar hemoglobin dalam serum terhadap hasil pemeriksaan kadar asam urat.

H_a : Ada pengaruh kadar hemoglobin dalam serum terhadap hasil pemeriksaan kadar asam urat.

Dasar pengambilan keputusan berdasarkan penarikan kesimpulan dengan melihat *Sig* untuk mengetahui apakah hipotesis diterima atau ditolak. Jika nilai $Sig \leq 0,05$ maka H_0 ditolak, dan apabila $Sig > 0,05$ maka H_0 diterima (Sugiyono, 2013).

c. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui homogenitas data dalam menentukan jenis uji *post hoc*. Data dikatakan homogen jika nilai $Sig > 0,05$. Sedangkan data dikatakan tidak homogen apabila nilai $Sig < 0,05$.

d. Uji *post hoc*, uji korelasi, dan uji regresi linier

Jika data homogen, maka dilanjutkan uji *post hoc* LSD. Jika data tidak homogen maka dilakukan uji *post hoc tamhanes*. Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji korelasi untuk mengetahui ada tidaknya hubungan antara variabel terikat dengan variabel bebas. Jika diketahui ada hubungan, maka dilanjutkan uji regresi linier untuk mengetahui kuatnya hubungan antara kedua variabel.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan ke komisi etik penelitian kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Berdasarkan Persetujuan Komisi Etik Nomor, LB.01.01/KE-01/XLV/899/2018 Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Poltekkes Kemenkes Yogyakarta menyatakan bahwa penelitian ini dinyatakan memiliki kelaikan etik pada tanggal 26 Desember 2018. Kelaikan etik ini berlaku selama satu tahun sejak tanggal terbit (surat kelaikan etik terlampir).

Sebelum melakukan penelitian, peneliti melakukan pendekatan kepada responden dengan memberikan naskah PSP (Penjelasan Sebelum Persetujuan) dan meminta persetujuan dari responden (*Informed Consent*) untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian yang dilakukan.