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 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). Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk mencari keterkaitan hubungan sebab akibat dengan cara melakukan perlakuan atau intervensi terhadap suatu kelompok, kemudian hasil (akibat) dari perlakuan tersebut dibandingkan dengan suatu kelompok yang tidak dikenakan perlakuan (Notoatmojo, 2005).

Eksperimen yang dilakukan pada penelitian ini yaitu memberikan intervensi atau perlakuan terhadap serum normal dengan menambahkan hemolisat dengan variasi kadar hemoglobin yang meningkat secara serial. Hasil atau akibat dari perlakuan tersebut berupa aktivitas enzim Gamma GT dalam serum yang diukur secara fotometri berdasarkan Szasz/Persijn kemudian hasilnya dibandingkan dengan serum yang tidak ditambah hemolisat.

2. Desain penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *posttest only control grup design* atau melakukan pengukuran setelah diberi perlakuan dengan menggunakan kontrol. Rancangan ini dilakukan randomisasi, yaitu pengelompokan anggota kontrol dan eksperimen yang dilakukan secara random, sehingga kedua kelompok mempunyai sifat yang sama sebelum dilakukan intervensi. Rancangan ini, memungkinkan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Notoadmodjo, 2010).

Aktivitas enzim Gamma GT pada serum yang tidak ditambah hemolisat adalah *control*, sedangkan aktivitas enzim Gamma GT pada serum yang ditambah hemolisat dengan berbagai variasi kadar hemoglobin adalah *post test.* Desain penelitian ditunjukkan seperti pada gambar 6.

Perlakuan	*Posttest*
	O_2
X_1	$O_{2.1}$
X_2	$O_{2.2}$
X_3	$O_{2.3}$
X_4	$O_{2.4}$
X_5	$O_{2.5}$

Gambar 6. Desain Penelitian

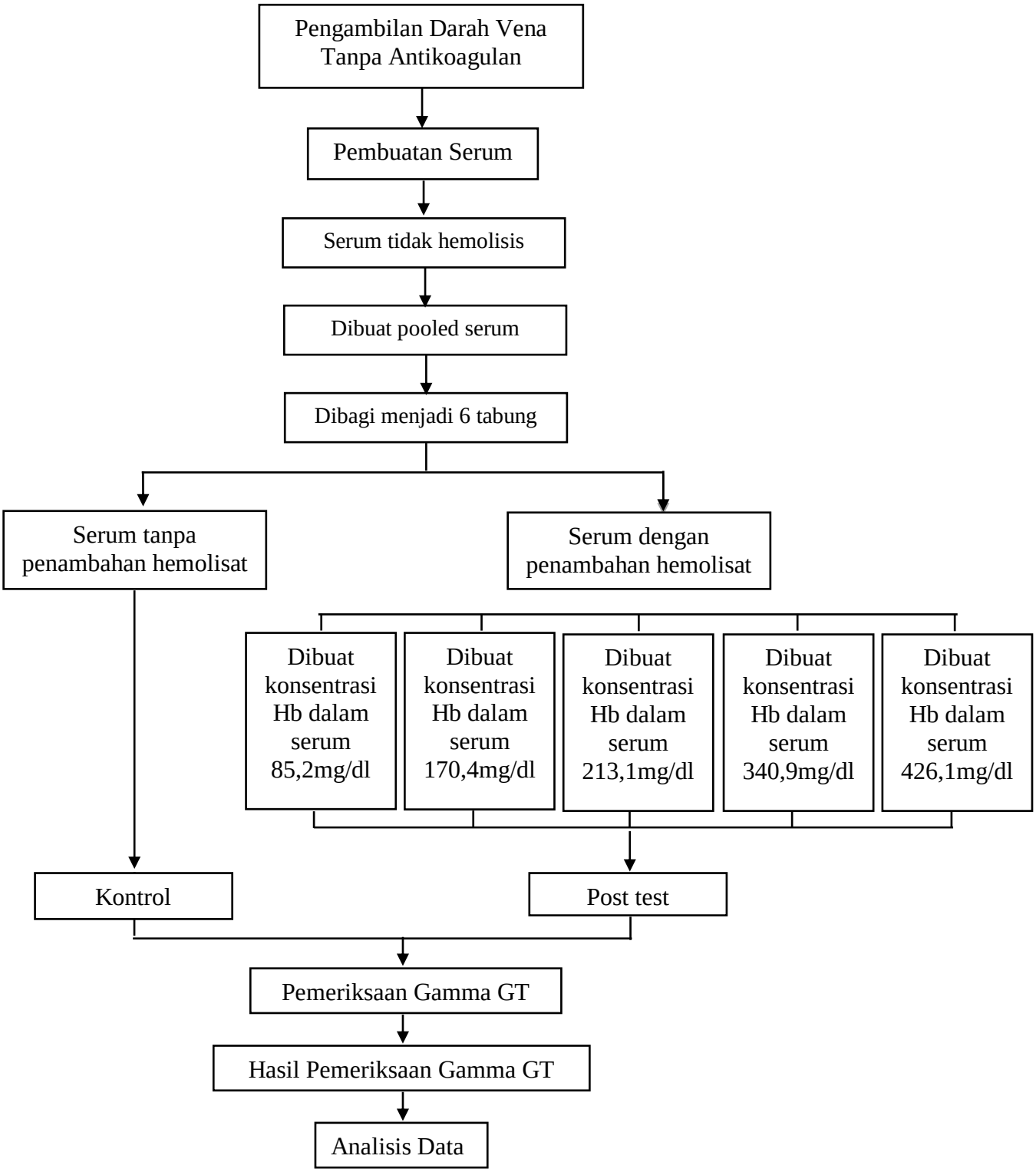
Keterangan :

O_2 : Aktivitas enzim Gamma GT pada serum yang tidak ditambah hemolisat

X : Perlakuan dengan berbagai variasi penambahan hemolisat dalam serum

$O_{2.1}$ - $O_{2.5}$: Aktivitas enzim Gamma GT pada serum yang ditambah hemolisat dengan berbagai variasi

B. Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan serum yang diambil dari mahasiswa Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta dengan kriteria sebagai berikut:

Kriterian inklusi : serum diambil dari orang yang tidak merokok, tidak mengonsumsi alkohol, tidak memiliki riwayat penyakit yang dapat memengaruhi hemolisis serum, seperti anemia hemolitik, vena rapuh dan *Incompatible Blood Transfusion*

Kriteria eksklusi : serum lipemik dan serum ikterik

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

Subjek penelitian dibagi dengan 6 perlakuan. Dilakukan replikasi atau ulangan yang sama untuk setiap anggota kelompok perlakuan. Rumus ulangan yang digunakan adalah sebagai berikut (Hanafiah 2010) : $(t-1)\,(r-1) \geq 15$

Keterangan: t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

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

penelitin minimal 30. Peneliti menetapkan konstanta derajat ketelitian sebesar 30 untuk meningkatkan derajat ketelitian, sehingga jumlah ulangan yang diperlukan adalah:

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

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

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

$(r-1) \geq 6$

$r \geq 7$

Berdasarkan perhitungan diatas, didapatkan pengulangan sebanyak 7 kali. Dilakukan 6 perlakuan dan setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan 7 kali, sehingga data yang diperoleh sebanyak 7 x 6 = 42 data.

2. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah aktivitas enzim Gamma GT.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 2-5 Januari 2019.

2. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hematologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta dan 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 aktivitas enzim Gamma GT dalam serum.

3. Variabel penganggu

   Variabel penganggu pada penelitian ini adalah serum lipemik dan serum ikterik.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : variasi penambahan kadar hemoglobin dalam serum

   Variasi penambahan kadar hemoglobin dalam serum dibuat melalui penambahan hemolisat. Tujuannya untuk membuat kadar hemoglobin dalam serum meningkat yaitu 85,2 mg/dl; 170,4 mg/dl; 213,1 mg/dl; 340,9 mg/dl; dan 426,1 mg/dl sehingga dapat diketahui besarnya pengaruh setiap penambahan kadar hemoglobin terhadap aktivitas enzim Gamma GT.

   Skala : rasio

   Satuan : mg/dl

2. Variabel terikat : aktivitas enzim Gamma GT

   Nilai aktivitas enzim gamma GT adalah banyaknya enzim gamma GT yang dapat mengkatalisis transformasi 1µmol substrat dalam 1

menit pada kondisi tertentu yang dinyatakan dalam nilai angka satuan U/L pada 37^0C (Widman, 1995).

Skala : rasio

Satuan : U/L

3. Variabel pengganggu : serum lipemik dan serum ikterik

   a. Serum lipemik

      Serum lipemik adalah serum yang secara visual berwarna putih keruh (Ghaedi, dkk, 2016). Pengendalian yang dilakukan adalah dengan tidak menggunakan serum lipemik sebagai sampel penelitian.

   b. Serum ikterik

      Serum ikterik adalah serum yang secara visual berwarna kuning coklat (Ghaedi, dkk, 2016). Pengendalian yang dilakukan adalah dengan tidak menggunakan serum ikterik sebagai sampel penelitian.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

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 aktivitas enzim Gamma GT.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengukuran berdasarkan *post test. Post test* berupa hasil pemeriksaan aktivitas enzim Gamma GT. Data diperoleh melalui pengukuran sampel penelitian setelah diberi perlakuan sesuai jumlah variasi kadar hemoglobin.

H. Alat ukur dan Bahan Penelitian

1. Alat ukur
   a. Perlengkapan sampling: tourniquet, kapas alkohol, jarum vakutainer, holder, plester, tabung vakutainer tanpa antikoagulan dan kapas kering
   b. Tabung sentrifus
   c. Sentrifus
   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. *Automatic* Kimia *analyzer* Respons 920
2. Bahan penelitian
   a. Sampel darah vena

b. Antikoagulan EDTA

c. Larutan NaCl

d. Akuades

e. Toluol

f. Larutan drabkins (Riswanto, 2013)

   1) Kalium ferrisianida (K3Fe[CN]6) 200 mg

   2) Kalium sianida (KCN) 50 mg

   3) Kalium dihidrogen fosfat (KH2PO4) 140 mg yang berfungsi untuk menstabilkan pH 7 – 7,4 dimana reaksi dapat berlangsung sempurna pada saat yang tepat

   4) Non ionik 0,5 – 1 ml yang berfungsi mempercepat hemolisis darah serta mencegah kekeruhan yang terjadi oleh protein plasma

g. Reagen pemeriksaan enzim Gamma GT (DiaSys, 2009)

   1) Reagen 1 :

      a) TRIS pH 8,25 135 mmol/L

      b) *Glycylglycine* 135 mmol/L

   2) Reagen 2

      L-Gamma-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 22 mmol/L

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan
    a. Melakukan perizinan menggunakan laboratorium Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta sebagai tempat penelitian
    b. Mempersiapkan alat dan bahan 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 pengambilan 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 ke atas, siku tidak boleh dibengkokkan. Dipilih lengan yang lebih banyak melakukan aktivitas.
        2) Pasien diminta untuk mengepalkan tangannya
        3) Memasang tourniquet ± 5-10 cm di atas lipat siku
        4) Melakukan palpasi atau perabaan untuk memastikan posisi vena
        5) Mendesinfeksi 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 30 – 45 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 yang diperlukan
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 apas tersebut selama ± 2 menit. Setelah darah berhenti, bagian bekas tusukan diplester.

b. Tahap pengukuran hemoglobin untuk pembuatan hemolisat

1) Mengambil darah vena sebanyak ± 3 ml dan ditampung pada tabung vacutainer dengan antikoagulan EDTA
2) Tabung reaksi diisi dengan 5,0 mL larutan drabkins
3) Menambahkan 20 µl darah EDTA
4) Menghomogenkan
5) Inkubasi selama 3-5 menit pada suhu kamar
6) Mengisi kuvet dengan campuran larutan tersebut
7) Membaca absorbansi pada panjang gelombang 540 nm

8) Menghitung kadar hemoglobin berdasarkan rumus :

Kadar Hb = Absorbansi sampel X faktor koreksi

Faktor sudah diketahui pada label yang tertera pada botol larutan drabkins. Diperoleh data sebagai berikut:

Absorbansi sampel : 0,398

Faktor : 42,61

Kadar hemoglobin : 0,398 x 42,61 = 16,9 gram/dl

c. Tahap pembuatan hemolisat

1) Darah EDTA dipusingkan selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm
2) Plasma dengan endapan eritrosit dipisahkan
3) Eritrosit dicuci menggunakan larutan NaCl fisiologi dengan cara :
   a) Menambahkan larutan NaCl fisiologis kedalam tabung 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
4) Mengambil 1 ml eritrosit murni

5) Memasukkan kedalam tabung sentrifus lain yang telah diisi 1,4 ml akuades
6) Mengocok kuat-kuat agar eritrosit lisis total
7) Menambahkan 0,4 ml toluol dan dikocok kuat
8) Mempusingkan selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm
9) Memisahkan larutan toluol dan membuang bagian yang menggumpal
10) Menyaring larutan yang bebas dari toluol dan protein menggunakan kertas saring whatmann No. 1 untuk memperoleh hemolisat
11) Melakukan pengenceran 20 kali dengan akuades sehingga kadar hemoglobin setelah pengenceran dapat dihitung sebagai berikut:

Kadar hemoglobin = $\frac{16{,}9 \text{ gram/dl}}{20}$

= 0,845 gram/dl

= 845 mg/dl

d. Tahap pembuatan serum

1) Mengambil darah vena ± 5 ml kemudian ditampung pada tabung vakutainer tanpa antikoagulan
2) Darah dibiarkan membeku terlebih dahulu dalam wadah penampung pada suhu kamar selama 20-30 menit
3) Mempusingkan bekuan darah selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm

4) Mempisahkan serum dari sel-sel darah dengan cara mengambil bagian atas atau supernatan. Serum yang berwarna kuning jernih

e. Tahap pembuatan variasi kadar hemoglobin dalam serum

1) Serum dibagi menjadi 6 tabung

2) Menghitung jumlah volume hemolisat untuk membuat variasi kadar hemoglobin dalam serum pada masing-masing tabung dengan cara :

a) Tabung 1 : tanpa penambahan hemolisat

b) Tabung 2 : penambahan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 80 mg/dl

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 845 = 700 x 80

V1 = 66,27 µl ➔ 65 µl

c) Tabung 3 : penambahan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 160 mg/dl

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 845 = 700 x 160

V1 = 132,54 µl ➔ 130 µl

d) Tabung 4 : penambahan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 240 mg/dl

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 845 = 700 x 240

V1 = 198,81 µl ➔ 195 µl

e) Tabung 5 : penambahan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 320 mg/dl

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 845 = 700 x 320

V1 = 265,09 µl ➔ 260 µl

f) Tabung 6 : penambahan hemolisat untuk serum yang mengandung Hb sebanyak ± 400 mg/dl

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 845 = 700 x 400

V1 = 331,36 µl ➔ 325 µl

3) Mengukur kadar hb dalam serum

a) Kelompok 1 : 0 mg/dl

b) Kelompok 2

Kadar hb = Absorbansi sampel x faktor

= 0,002 x 42,61

= 0,0852 g/dl

= 85,2 mg/dl

c) Kelompok 3

Kadar hb = Absorbansi sampel x faktor

= 0,004 x 42,61

= 0, 1704 g/dl

= 170,4 mg/dl

d) Kelompok 4

Kadar hb = Absorbansi sampel x faktor

= 0,005 x 42,61

= 0,2131 g/dl

= 213,1 mg/dl

e) Kelompok 5

Kadar hb = Absorbansi sampel x faktor

= 0,008 x 42,61

= 0,3409 g/dl

= 340,9 mg/dl

f) Kelompok 6

Kadar hb = Absorbansi sampel x faktor

= 0, 010 x 42,61

= 0,4261 g/dl

= 426,1 mg/dl

f. Tahap pemeriksan

Melakukan pemeriksaan enzim Gamma GT menggunakan alat Respons 920 dengan cara kerja sebagai berikut:

1) Menyiapkan alat dan bahan
2) Menghidupkan alat Respons 920 dengan menyalakan "*main power*" ke saklar "*power*"
3) Memasukkan reagen pada "*reagen tray*" pada posisinya

4) Menekan tombol "*ML Respons 920*" kemudian memasukkan ID dan password. Tunggu 8 menit kemudian klik "*OK*"
5) Memasukkan sampel ID dan nama pasien
6) Memilih parameter pemeriksaan Gamma GT kemudian klik "*SAVE*"
7) Meletakkan sampel pada "*sample tray*" sesuai posisinya
8) Menekan "*GO*" kemudian lampu akan berwarna hijau
9) Menekan *pre run check*, kemudian di klik "*OK*"

J. Manajemen Data

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan teknik analisis deskriptif dan analisis statistik. Analisis deskriptif digunakan untuk menggambarkan atau menganalisis suatu statistik penelitian, tetapi tidak digunakan untuk mengambarkan atau membuat kesimpulan yang lebih luas (generalisasi) (Sugiyono,2003). Analisis statistik digunakan untuk mengeneralisasikan data.

1. Analisis Deskriptif

   Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dianalisa secara deskriptif untuk mengambarkan nilai aktivitas enzim Gamma GT dalam serum yang hemolisis.

2. Analisis Statistik

   Sebelum dilakukan analisis statisik dilakukan analisa data. Data yaitu diperoleh merupakan data primer dengan skala data rasio. 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 siginifikan yaitu $p > \alpha$ (0.05). Selanjutnya dilakukan uji beda menggunakan *one-way ANOVA* dan regresi linier. Pengujian Analisis Statistik menggunakan program SPSS 16.0 *for windows* untuk mengetahui besarnya pengaruh kadar hemoglobin dalam serum terhadap pemeriksaan aktifitas enzim Gamma GT dengan derajat kesalahan (α) sebesar 5%.

Hipotesis statistik sebagai dasar pengambilan keputusan adalah sebagai berikut:

H_0: tidak ada pengaruh hemolisis pada serum terhadap hasil pemeriksaan aktifitas enzim Gamma GT.

Ha: ada pengaruh hemolisis pada serum terhadap hasil pemeriksaan aktifitas enzim Gamma GT.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini telah diajukan ke Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Persetujuan Komisi Etik Nomor LB.01.01/KE-01/XLV/904/2018, menyatakan bahwa penelitian ini dapat dibebaskan dari persetujuan etik (*Extempted)*. Pembebasan ini berlaku sejak penelitian mulai dilaksanakan sampai dengan selesai.

Sebelum melakukan penelitian, peneliti melakukan pendekatan kepada responden dengan memberikan naskah Penjelasan Sebelum

Persetujuan (PSP) dan meminta persetujuan dari responden (*informed consent*) untuk ikut berpartisipasi dalam penelitian yang dilakukan.