

### BAB III

#### METODE PENELITIAN

##### A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis metode penelitian yang digunakan adalah penelitian *true experiment* karena peneliti melakukan intervensi terhadap sampel berupa penambahan  $\text{NaN}_3$  2% dan penyimpanan sampel pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *pre test and post test with control*. Aktivitas Alanine Transferase (ALT) serum sapi yang diberi  $\text{NaN}_3$  2% dan serum kontrol komersial sebelum disimpan merupakan *pre test*. Serum sapi yang diberi  $\text{NaN}_3$  2% dan serum kontrol komersial yang disimpan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$  selama 10 minggu kemudian diperiksa aktivitas ALT merupakan *post test* (Notoadmodjo, 2012).

Desain penelitian ditunjukkan pada Tabel 2.

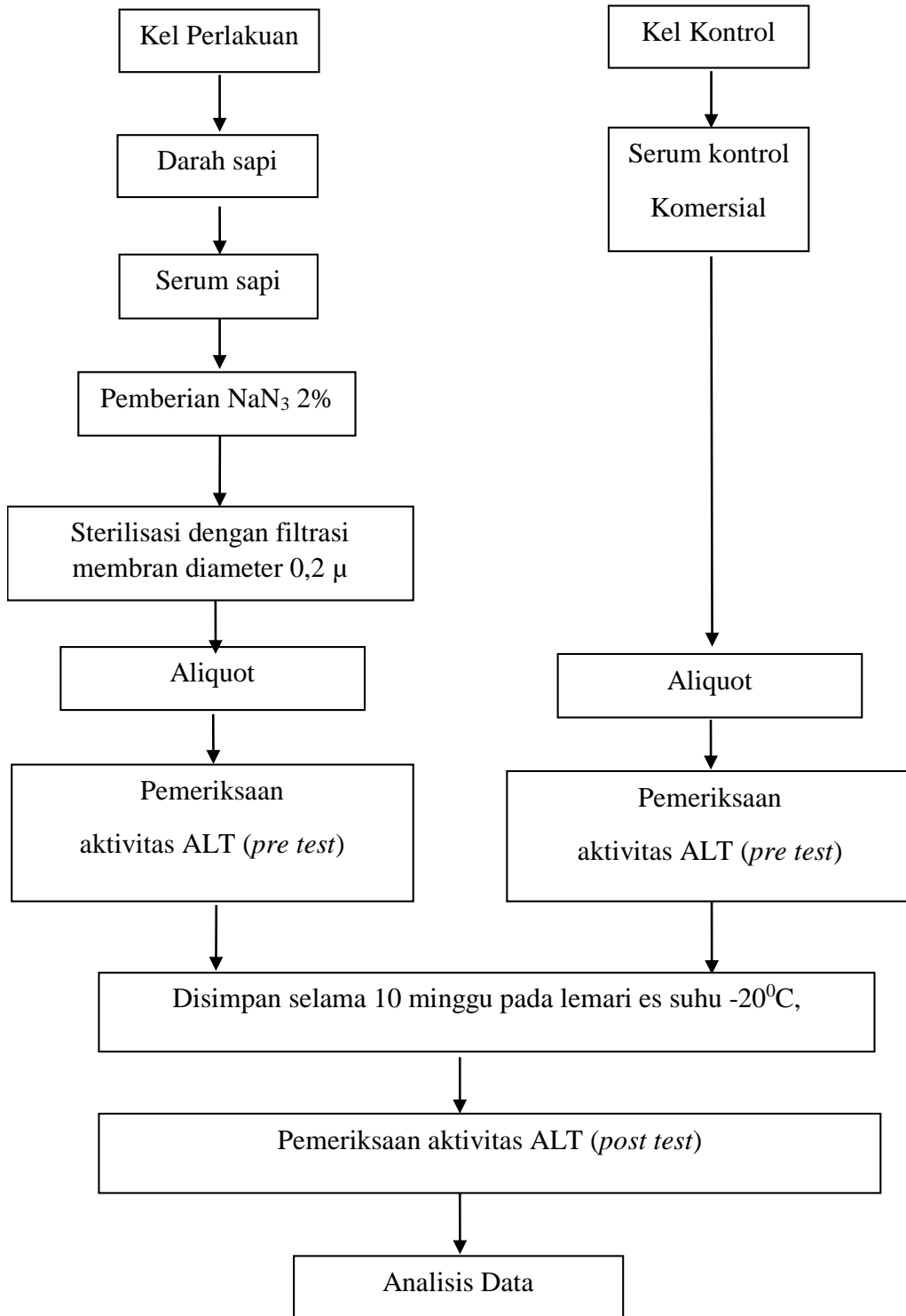
Tabel 2 : Desain Penelitian

Kelompok	Pre	Perlakuan	Post
Perlakuan	$O_1$	X	$O_2$
Kontrol	$O_1'$		$O_2'$

Keterangan :

- $O_1$  = Aktivitas ALT serum sapi sebelum penyimpanan pada kelompok perlakuan
- $O_1'$  = Aktivitas ALT serum kontrol komersial sebelum penyimpanan pada kelompok control
- X = Penyimpanan serum sapi yang diberi  $\text{NaN}_3$  2% dan serum kontrol komersial pada suhu  $-20^\circ\text{C}$  selama 10 minggu
- $O_2$  = Aktivitas ALT serum sapi yang diberi  $\text{NaN}_3$  2% setelah penyimpanan selama 10 minggu pada suhu  $-20^\circ\text{C}$
- $O_2'$  = Aktivitas ALT serum kontrol komersial setelah penyimpanan selama 10 minggu pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

Kelompok perlakuan adalah serum sapi yang diberi pengawet  $\text{NaN}_3$  2% sedangkan kelompok kontrol adalah serum kontrol komersial buatan pabrik. Kelompok kontrol digunakan sebagai pembanding terhadap serum sapi yang diberi pengawet  $\text{NaN}_3$  2%.

**B. Rancangan Penelitian**

Gambar 5. Rancangan Penelitian

### C. Objek Penelitian

Objek dari penelitian ini adalah serum sapi yang diberi pengawet  $\text{NaN}_3$  2 %. Serum sapi dipilih serum yang tidak lisis, tidak keruh, tidak lipemik dan tidak ikterik. Serum sapi sebanyak 100 ml ditambahkan pengawet  $\text{NaN}_3$  sebanyak 2 gram kemudian dihomogenkan. Serum sapi dengan pengawet  $\text{NaN}_3$  dialiquot dan dimasukkan dalam 100 vial masing-masing 1 ml serum. Kemudian dari 100 sampel tersebut akan diambil 10 vial secara acak untuk dilakukan pemeriksaan *pre test* dan dilakukan pengulangan sehingga didapat 20 data. Sisanya disimpan pada suhu  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  selama 10 minggu. Setelah 10 minggu akan diambil 3 sampel secara acak kembali untuk dilakukan pemeriksaan *post test* dengan pengulangan dan didapat 6 data dari uji post test.

### D. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat pengambilan darah sapi di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) desa Segoroyoso, kecamatan Pleret, kabupaten Bantul.
2. Tempat pemrosesan darah sapi menjadi serum sapi di Laboratorium Imunologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta
3. Tempat pemeriksaan ALT di Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Istimewa Yogyakarta
4. Penelitian dilaksanakan dari bulan September sampai Desember 2018

### **E. Variabel Penelitian atau Aspek-aspek yang diteliti/ diamati**

Variabel penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama penyimpanan serum sapi dengan pengawet  $\text{NaN}_3$  2% pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas ALT

3. Variabel pengganggu

a. Suhu tempat penyimpanan dikendalikan dengan penyimpanan pada refrigerator yang suhunya stabil  $-20^\circ\text{C}$  dan terkontrol.

b. Kualitas serum sapi yang akan digunakan untuk penelitian. Dikendalikan dengan menggunakan serum sapi dari sapi sehat dan pemilihan serum yang tidak lisis, tidak keruh, tidak lipemik dan tidak ikterik.

c. Konsentrasi  $\text{NaN}_3$  dikendalikan dengan menambahkan  $\text{NaN}_3$  bubuk sebanyak 2 gr ke dalam 100 ml serum sapi sehingga tidak terjadi pengenceran serum.

### **F. Devinisi Operasional Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas

Lama penyimpanan adalah rentang waktu untuk menyimpan serum sapi setelah dibuat. Lama penyimpanan yang digunakan 10 minggu. Penyimpanan dalam lemari es suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

Satuan : hari

Skala : ordinal

2. Variabel terikat

Aktivitas ALT adalah jumlah unit enzim Alanine Transferase (ALT) per 1 liter serum.

Satuan : U/L

Skala : rasio

3. Variabel pengganggu:

- a. Suhu Penyimpanan
- b. Kualitas Serum
- c. Konsentrasi  $\text{NaN}_3$

### **G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

Penelitian ini menggunakan jenis data primer. Data dikumpulkan oleh peneliti secara langsung dari sumber data. Peneliti melakukan pengumpulan data dengan memeriksakan sampel serum sapi dengan pengawet  $\text{NaN}_3$  2% dan serum kontrol komersial untuk mengukur aktivitas ALT sebelum dan sesudah penyimpanan pada suhu  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  selama 10 minggu.

## H. Alat Ukur/Instrumen dan Bahan Penelitian

### 1. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini meliputi darah sapi, serum kontrol komersial, alkohol 70%,  $\text{NaN}_3$ , reagen pemeriksaan ALT.

### 2. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung sentrifus falcon max 15 ml *polypropylene conical tube*, sentrifus, labu Erlenmeyer, spuit 10 ml, vial 1 ml, penyaring bakteri filter membran 0,2  $\mu$  Minisart, vortex mixer, lemari es, mikropipette/transferpette, tip kuning dan biru, autoclave, kimia *autoanalyzer*.

## I. Uji Validitas dan Reabilitas

### 1. Untuk alat ukur/ instrumen

Uji validitas alat ukur dilakukan dengan melaksanakan pemeriksaan di Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Istimewa Yogyakarta yang telah mendapatkan sertifikat akreditasi KAN sehingga dipastikan sudah menjalankan QC rutin menggunakan serum kontrol sebelum menjalankan pemeriksaan.

### 2. Untuk Pengukur /Enumerator

Pengukur adalah Ahli Teknologi Laboratorium Medik yang kompeten dalam melakukan pemeriksaan dan bekerja sesuai dengan standar operasional prosedur.

## **J. Prosedur Penelitian**

1. Tahap persiapan
  - a. Mengurus kaji etik pada Komisi Etik di Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
  - b. Mengurus izin pengambilan darah sapi di tempat penyembelihan sapi, RPH Segoroyoso, Pleret, Bantul
  - c. Labu Erlenmeyer, tabung reaksi dan tip mikropipet disterilkan.
  - d. Pengadaan alat dan bahan habis pakai untuk penelitian
2. Pembuatan serum sapi
  - a. Darah sapi yang keluar pada waktu disembelih dibiarkan mengalir beberapa saat. Setelah aliran darah yang keluar dari pembuluh vena leher tidak kencang, ditampung dengan tabung sentifus steril 15 ml, ditutup rapat.
  - b. Darah didiamkan 0 menit supaya terjadi jendalan
  - c. Darah yang sudah beku disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.
  - d. Serum sapi dipisahkan dari jendalannya dengan menggunakan pipet
  - e. Serum sapi dikumpulkan dalam labu Erlenmeyer steril. Kondisi serum sapi harus jernih, tidak keruh, tidak hemolisis, tidak ikterik dan tidak lipemik.
  - f. Volume diukur sampai 100 ml, ditambah serbuk  $\text{NaN}_3$  sebanyak 2 gr sehingga kadar  $\text{NaN}_3$  menjadi 2%.



### 3. Sterilisasi serum sapi dan pembuatan aliquot

Sterilisasi serum sapi dilakukan dengan filtrasi menggunakan penyaring membran Minisart 0,2  $\mu$ , dilakukan sebagai berikut :

- a. Serum sapi yang sudah terkumpul dalam labu Erlenmeyer, dihisap dengan spuit 10 ml.
- b. Ujung spuit dipasang penyaring membran Minisart 0,2  $\mu$  pada ujung spuit
- c. Spuit ditekan perlahan, filtrat ditampung dalam vial 1 ml, ditutup rapat.

### 4. Penyimpanan

Serum sapi yang telah disterilisasi dan dibagikan (*aliquot*) kedalam vial dengan volume 1 ml, disimpan dalam *freezer* almari es suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Serum sapi disimpan selama 10 minggu.

### 5. Pemeriksaan aktivitas Alanine Aminotransferase (ALT).

#### a. Pendahuluan

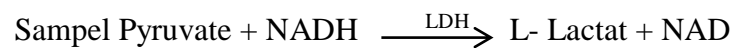
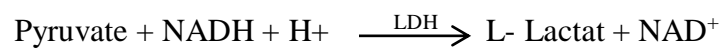
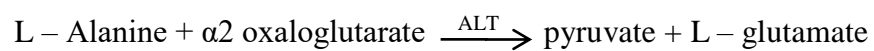
Aminotransferase merupakan indikator yang baik untuk kerusakan hati apabila keduanya meningkat. Cedera akut pada hati, seperti karena hepatitis, dapat menyebabkan peningkatan baik AST maupun ALT menjadi ribuan unit/liter.

Serum yang diperiksa harus bebas hemolisis optimal untuk pemeriksaan aminotransferase, untuk menghindari interferensi oleh hemoglobin pada pengukuran *absorbance* optis dan untuk menghindari peningkatan artefaktual AST akibat enzim yang berasal dari eritrosit.

Sampel dapat didinginkan atau dibekukan apabila tidak segera diperiksa (Sacher dan McPerson, 2012).

b. Metode pemeriksaan: ALT metode IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medic) menggunakan Kimia *Autoanalyzer*.

c. Prinsip pemeriksaan ALT metode IFCC



Kelompok amino secara enzimatik ditransfer oleh ALT yang ada dalam sampel dari alanin ke atom karbon 2-oksoklutarat menghasilkan piruvat dan L-glutamat. Piruvat direduksi menjadi laktat oleh LDH yang ada dalam reagen dengan oksidasi simultan NADH ke NAD. Reaksi diamati dengan mengukur tingkat penurunan absorbansi karena oksidasi NADH pada panjang gelombang 340 nm. Piruvat yang berasal dari sampel direduksi oleh laktat dehidrogenasi secara cepat dan tuntas selama periode inkubasi awal sehingga tidak mempengaruhi pemeriksaan.

Nilai rujukan untuk ALT adalah Laki-laki: 0- 42 U/L Perempuan: 0-32 U/L (Sacher dan McPerson, 2012).

## 6. Alat dan Bahan

*Blue tip, sample cup*, kuvet, aquades, reagen ALT metode IFCC dan Kimia Analyzer.

## 7. Prosedur Pemeriksaan

Prosedur pemeriksaan aktivitas ALT metode IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medic*) menggunakan alat Kimia Analyzer Response 920 DiaSys adalah sebagai berikut:

- a. Alat dan bahan disiapkan terlebih dahulu.
- b. Reagen kerja disiapkan sesuai dengan prosedur dari pabrik pembuat reagen.
- c. Kimia Analyzer Respons 920 dengan menyalakan saklar “*Main Power*” ke saklar “*Power*”.
- d. Reagen dimasukkan pada “*Reagen Tray*”.
- e. Tombol “*ML Respons 920*” diklik kemudian masukkan ID dan password, ditunggu 8 menit kemudian klik “*OK*”.
- f. Program kontrol untuk pemeriksaan ALT dipilih untuk menjalankan kontrol harian.
- g. Kontrol diletakkan pada “*Sample tray*” sesuai posisi yang diprogram.
- h. Tombol “*GO*” diklik maka lampu akan berwarna hijau.
- i. Tombol “*Pre-Run Check*” diklik, kemudian klik “*OK*”
- j. Hasil dapat diketahui pada layar monitor atau pada *print out*.

- k. Hasil kontrol dianalisa, apabila hasil berada di dalam rentang nilai kontrol maka hasil pemeriksaan pada sampel akan tepat sehingga dapat dilakukan pemeriksaan sampel.
- l. ID sampel dan nama pasien diinput ke dalam alat.
- m. Parameter pemeriksaan ALT diklik, kemudian klik “SAVE”.
- n. Sampel diletakkan pada “*Sample Tray*” sesuai posisi yang diprogram.
- o. Tombol “GO” diklik, maka lampu akan berwarna hijau.
- p. Tombol “*Pre-Run Check*” diklik, kemudian klik “OK”
- q. Hasil dapat diketahui pada layar monitor atau pada *print out*.

## K. Manajemen Data

Data yang didapat disajikan dalam bentuk tabel kemudian dilakukan pengolahan data sesuai dengan ISO 13528.

### 1. Uji Homogenitas

Perhitungan uji homogenitas menurut ISO 13528 (2005) sebagai berikut:

- a. Rata-rata hasil uji siplo dan duplo ( $X_t$ ) dihitung dengan rumus  $X_{t.} = (X_{t,1} + X_{t,2})/2$ , dimana hasil uji ke-1 ( $X_{t,1}$ ) dan ke-2 ( $X_{t,2}$ )
- b. Selisih absolut ( $W_t$ ) dari hasil siplo dan duplo dihitung dengan rumus  $W_t = |X_{t,1} - X_{t,2}|$
- c. Rata-rata umum (*general average*) dengan simbol  $X_r$  dihitung dengan rumus  $X_{r.} = \sum X_t / g$ , dimana  $g$  adalah jumlah contoh yang digunakan
- d. Standar deviasi dari rata-rata sampel ( $S_x$ ) dihitung dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\sum (X_{t.} - X_{r.})^2 / (g - 1)}$$

- e. Standar deviasi *within samples* ( $S_w$ ) dihitung dengan rumus:

$$S_w = \sqrt{\sum w_r^2 / (2g)}$$

- f. Standar deviasi *between samples* ( $S_s$ ) dihitung dengan menggunakan rumus:

$$S_s = \sqrt{S_x^2 - (S_w^2 / 2)}$$

Sampel dinyatakan homogen apabila  $S_s < 0.3 \sigma$ ,  $\sigma$  = standar deviasi untuk asesmen profisiensi (SDPA),  $\sigma$  dapat ditetapkan melalui  $CV_{Horwitz}$ . Adapun  $CV_{Horwitz}$  dapat dicari dengan menggunakan rumus sebagai berikut:  $CV_{Horwitz} = 2^{1-0.5 \log C}$ , dimana C adalah konsentrasi yang diukur.

## 2. Uji Stabilitas

Perhitungan yang digunakan pada uji stabilitas menurut ISO 13528 sebagai berikut:

- Pada uji stabilitas dihitung rerata pemeriksaan yang pertama ( $y_{r1}$ ) dan pemeriksaan yang kedua ( $y_{r2}$ ).
- Hasil pemeriksaan yang diperoleh pada uji homogenitas ( $x_r$ ) dengan rata-rata hasil yang diperoleh pada uji stabilitas ( $y_r$ ) dihitung rata-ratanya.
- Bahan kontrol dinyatakan stabil apabila:  $|x_r - y_r| \leq 0,3 \sigma$

#### **L. Etika Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan setelah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta dengan memperoleh Surat Kelayakan Etik Penelitian

#### **M. Kelemahan Penelitian**

Sampel darah sapi diperoleh di malam hari sehingga pemeriksaan harus ditunda beberapa jam karena baru dapat diperiksa di pagi hari. Selama penundaan pemeriksaan sampel disimpan dalam refrigerator untuk mengurangi kerusakan analit dalam sampel.

Peneliti tidak melakukan kontrol terhadap serum sapi yang tidak diberi pengawet  $\text{NaN}_3$  2% sehingga peneliti tidak mengetahui apakah pengawet  $\text{NaN}_3$  2% dapat mempengaruhi stabilitas enzim ALT dalam serum sapi