

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pre eksperimen design*. *Pre eksperimen design* merupakan jenis penelitian yang masih terdapat variabel luar dan ikut memengaruhi variabel dependen atau variabel terikat. Sehingga jenis penelitian ini belum cukup kuat untuk menunjukkan sebab-akibat antara variabel bebas dan variabel terikat. Hasil eksperimen ini yang tergolong sebagai variabel terikat tidak dapat dipastikan hanya dipengaruhi oleh variabel bebas. Hal ini disebabkan oleh tidak adanya variabel kontrol dan tidak adanya randomisasi sampel (Sugiyono, 2017).

Penelitian ini menunjukkan variabel bebas berupa lama penyimpanan *pooled* plasma EDTA pada suhu -20°C selama 1, 2, 3 dan 4 minggu terhadap variabel terikat berupa hasil homogenitas dan stabilitas *pooled* plasma pada pemeriksaan ureum. Hal ini dipengaruhi oleh variabel pengganggu berupa lama pendiaman sampel.

Desain penelitian yang digunakan adalah *one grup pretest-posttest*. Desain penelitian ini melibatkan satu kelompok yang diberikan *pretest* sebelum perlakuan dan diberikan *posttest* setelah diberikan perlakuan. Sehingga hasil perlakuan dapat diketahui dengan akurat karena dapat membandingkan hasil sebelum dan sesudah perlakuan (Sugiyono, 2017).

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa sebelum penyimpanan pada suhu -20°C *pooled* plasma EDTA diperiksa kadar ureum merupakan *pretest* (O_1) dan setelah penyimpanan pada suhu -20°C pada minggu ke 1, 2, 3 dan 4 diperiksa kadar ureum merupakan *posttest* (O_1'). Rancangan penelitian ditunjukkan sebagai berikut :

Tabel 2. Rancangan penelitian

Kelompok	<i>Pretest</i>	Perlakuan	<i>Posttest</i>
Eksperimen	O_1	X	O_1'

Sumber : Sugiyono, 2017.

Keterangan :

X = Penyimpanan *pooled* plasma EDTA pada suhu -20°C selama 1, 2, 3 dan 4 minggu.

O_1 = Pengukuran kadar ureum *pooled* plasma EDTA sebelum penyimpanan pada suhu -20°C .

O_1' = Pengukurann kadar ureum *pooled* plasma EDTA setelah penyimpanan pada suhu -20°C selama 1, 2, 3 dan 4 minggu.

B. Subjek dan Objek Penelitian

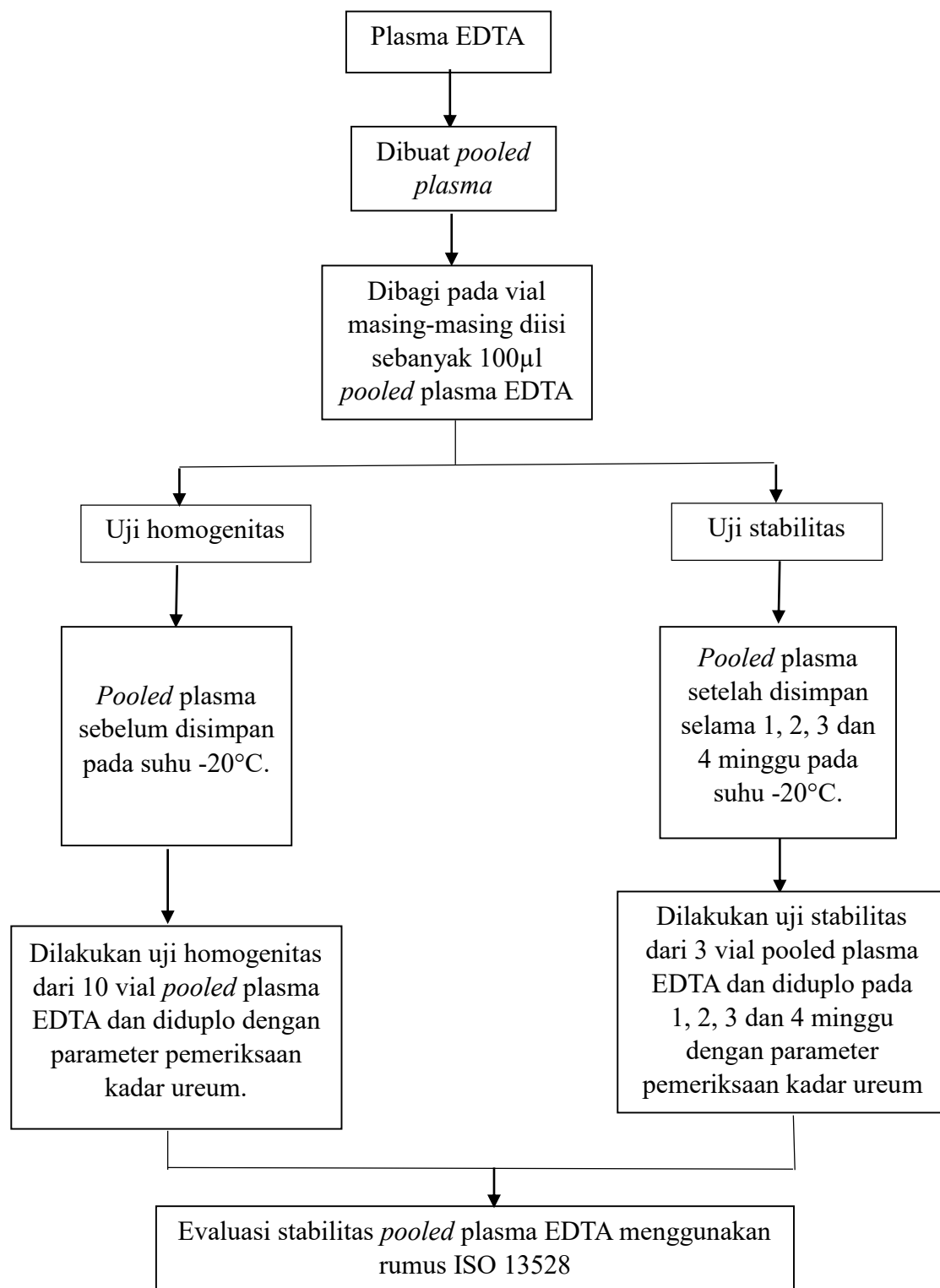
1. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah plasma EDTA yang diambil dari mahasiswa Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta kemudian *dipooled* dengan kriteria inklusi yaitu tidak memiliki riwayat penyakit yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan kadar ureum.

2. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah kadar ureum *pooled* plasma EDTA sebelum dan sesudah 1, 2, 3 dan 4 minggu yang disimpan pada suhu -20°C . Data yang diperoleh sebelum penyimpanan yaitu 20 data untuk dilakukan uji homogenitas. Jumlah data tersebut diperoleh dari 10 data sampel yang diduplo. Data yang diperoleh setelah penyimpanan sebanyak 24 data untuk uji stabilitas. Jumlah data tersebut diperoleh dari 3 data sampel yang diperiksa setiap minggu dan dilakukan duplo. Jumlah data keseluruhan yang dihasilkan adalah 44 data. Kriteria sampel yang diperlukan dengan kriteria eksklusi yaitu merupakan plasma yang tidak hemolisis, tidak lipemik dan tidak ikterik dengan pendiaman sampel 1 jam.

C. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

D. Waktu dan Tempat

Waktu dan tempat penelitian ini, yaitu :

1. Tempat penelitian:

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 15 Februari – 15 Maret 2025.

E. Variabel Penelitian atau Aspek-Aspek yang Diteliti/Diamati

Variabel penelitian ini meliputi :

1. Variabel bebas :

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama waktu penyimpanan *pooled* plasma EDTA sebagai bahan kontrol alternatif pada suhu - 20° C selama 1, 2, 3 dan 4 minggu.

2. Variabel terikat :

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil uji homogenitas dan stabilitas pada pemeriksaan kadar ureum.

3. Variabel pengganggu :

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah lama pendiaman sampel dimana tidak sesuai prosedur yaitu 1 jam, kedatangan probandus yang tidak serentak menyebabkan lamanya pendiaman menjadi 3 jam.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Lama penyimpanan merupakan kurun waktu yang digunakan dalam penyimpanan *pooled* plasma EDTA yang telah dibuat. Lama penyimpanan yang digunakan yaitu selama 1, 2, 3 dan 4 minggu.

Satuan : minggu

Skala : nominal

2. Variabel terikat

Hasil pemeriksaan kadar ureum adalah jumlah milligram ureum per 100 dl plasma yang diperiksa.

Satuan : mg/dl

Skala : rasio

3. Variabel pengganggu

Lama pendiaman sampel yang tidak sesuai prosedur.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini berupa data primer. Data primer merupakan data yang didapat langsung dari subjek penelitian, dalam hal ini peneliti mendapatkan data atau informasi langsung dengan menggunakan instrument-instrumen yang telah ditetapkan. Teknik yang dipakai peneliti yaitu melakukan uji homogenitas *pooled* plasma EDTA dengan mengukur kadar ureum sebelum penyimpanan dan melakukan uji stabilitas *pooled* plasma EDTA dengan mengukur kadar

ureum selama 1, 2, 3 dan 4 minggu berturut-turut setelah disimpan pada suhu -20°C .

H. Alat Ukur/Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung vakutainer EDTA, sentrifus, spuit 3 ml, mikropipet, tip biru dan tip kuning, lemari es, gelas kimia steril, kuvet, rotator, tabung sentrifus, vial 1 ml dan spektrofotometer UV-VIS.

2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini meliputi plasma EDTA dan reagen pemeriksaan ureum.

I. Uji Validitas Instrumen

Uji validitas dilaksanakan dengan melihat kestabilan pada alat ukur yang akan digunakan selama penelitian. Hal ini dapat dilakukan dengan melakukan presisi dan akurasi pada mikropipet. Perhitungan serum kontrol pada parameter ureum dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Pemipetan dan perhitungan dilakukan dengan teliti untuk mengurangi terjadinya kesalahan. Data pada pemeriksaan dihitung menggunakan *Microsoft excel* berdasarkan ISO 13528:2015. Instrumen yang digunakan untuk pemeriksaan di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis telah melalui kontrol kualitas. Sehingga pemeriksaan dilakukan terjamin kualitasnya (ISO 13528, 2015)

J. Manajemen Data

1. Uji homogenitas dan stabilitas

Data yang diperoleh dari penelitian kemudian diuji homogenitas dan stabilitas menggunakan perhitungan yang ditetapkan oleh ISO 13528 tahun 2015 yang dikeluarkan oleh *International Organization for Standardization*.

a. Uji homogenitas

Perhitungan pada uji homogenitas menurut ISO 13528 yaitu :

1) Dihitung dengan rata-rata hasil uji siplo dan duplo (X_t)

dengan rumus $X_t = \frac{(X_{t1} + X_{t2})}{2}$ dimana hasil uji ke-1 (X_{t1})

dan ke-2 (X_{t2}).

2) Dihitung selisih absolut (W_t) dari hasil siplo dan duplo

dengan rumus $W_t = |X_{t1} - X_{t2}|$

3) Dihitung rata-rata umum (*general average*) dengan

simbol (X_r) dengan rumus $X_r = \frac{\sum X_t}{g}$, g merupakan

jumlah sampel yang digunakan.

4) Dihitung standar deviasi dari rata-rata sampel (S_x)

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (X_{t1} - X_r)^2}{g-1}}$$

5) Dihitung standar deviasi *within samples* (S_w)

$$S_w = \sqrt{\frac{\sum W_t^2}{2g}}$$

Standar deviasi *within samples* merupakan standar deviasi antara hasil uji siplo dan duplo

- 6) Dihitung standar deviasi *between samples* (S_s)

$$S_s = \sqrt{S_x^2 - \frac{S_w^2}{2}}$$

Standar deviasi *between samples* merupakan selisih standar deviasi rata-rata sampel dengan standar deviasi *within sample*.

- 7) Sampel dinyatakan homogen apabila $S_s \leq 0,3 \sigma$.

σ merupakan standar deviasi pada asesmen profisiensi (SDPA), σ dapat ditetapkan melalui $CV_{Horwitz}$. Adapun $CV_{Horwitz}$ dapat dicari menggunakan rumus $CV_{Horwitz} = 2^{1-0,5 \log C}$, dimana C merupakan konsentrasi yang diperiksa (Samin dan Susanna, 2016).

b. Uji Stabilitas

Perhitungan yang digunakan dalam uji stabilitas menurut ISO 13528:2015 sebagai berikut :

- a. Dihitung selisih rata-rata hasil dari pemeriksaan yang diperoleh pada uji homogenitas (X_r) dengan rata-rata hasil pemeriksaan yang didapat pada uji stabilitas (Y_r) yaitu setelah bahan kontrol disimpan.
- b. Bahan kontrol dinyatakan stabil apabila $|X_r - Y_r| \leq 0,3\sigma$

2. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel, dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan rerata (*mean*), nilai tertinggi (*max*) dan nilai terendah kadar ureum pada *pooled* plasma EDTA sebelum disimpan (0 minggu) dan setelah disimpan di suhu -20°C pada minggu ke-1, 2, 3 dan 4.

K. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Mengurus Kaji Etik pada komisi etik di Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- b. Mengurus ijin pengambilan sampel darah EDTA di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.
- c. Menyediakan bahan habis pakai yang akan digunakan untuk penelitian

2. Tahap Pelaksanaan

- a. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- b. Menempatkan subjek penelitian duduk dengan lengan lurus dan meminta pasien untuk mengepalkan tangan
- c. Memasang tourniquet pada lengan dengan jarak 3-4 jari pada area lipatan siku
- d. Melakukan palpasi dengan menggunakan jari tangan untuk memastikan letak vena

- e. Mensterilkan area kulit yang akan dilakukan pengambilan darah menggunakan alkohol swab 70%
- f. Menusuk pembuluh darah vena dengan jarum yang mengjadap ke atas dengan kemiringan 45 derajat.
- g. Apabila jarum telah masuk kedalam pembuluh darah vena akan terlihat darah masuk dalam spuit. Lepas tourniquet dan subjek diminta untuk melepaskan kepalan tangannya.
- h. Tarik tuas spuit hingga darah terpenuhi sebanyak 3 ml sesuai volume spuit.
- i. Menarik jarum dan meletakkan kapas kering pada bekas tusukan dan plester bekas area penusukan.

3. Pembuatan plasma EDTA

- a. Diamkan sampel darah selama 60 menit sebelum di sentrifugasi
- b. Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit.
- c. Dipisahkan plasma dari sel-sel darah dengan mengambil supernatan.
- d. Plasma diambil dan masukkan ke dalam *beaker glass*.

4. Pembuatan *pooled* plasma

- a. Gabungkan plasma menjadi satu ke dalam *beaker glass*
- b. Pindahkan ke dalam tabung sentrifus

- c. Sentrifus pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit
- d. Bagi plasma dengan cara memipet plasma sebanyak 100 μ l ke dalam vial dan beri label kode

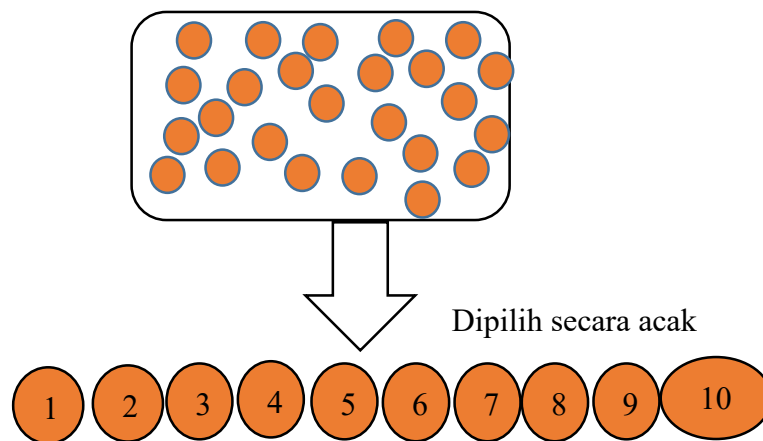
5. Penyimpanan

Plasma yang telah dibagikan kedalam vial dengan volume 100 μ l disimpan dalam *freezer* almari es pada suhu -20° C dan disimpan selama 1, 2, 3 dan 4 minggu.

6. Uji Homogenitas

Berdasarkan ISO 13528, untuk menetapkan batas homogenitas pada suatu bahan dapat digunakan dengan cara berikut:

- a. Sebanyak 10 sampel dipilih secara acak



Gambar 4. Skema Uji Homogenitas

- b. Pemeriksaan pada setiap parameter pemeriksaan dilakukan secara duplo

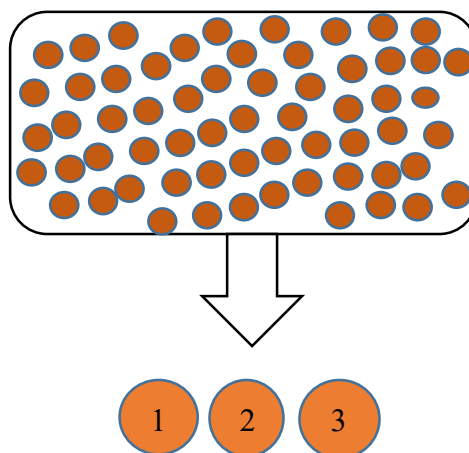
c. Pada setiap parameter, ke-10 sampel dilakukan pemeriksaan:

- 1) Di laboratorium yang sama
- 2) Dilakukan oleh tenaga laboratorium yang sama, pada waktu yang sama dan menggunakan peralatan yang sama sehingga didapatkan 10 pasangan data,
- 3) Data hasil pemeriksaan dihitung secara statistika

7. Uji Stabilitas

Menurut ISO 13528:2015, pelaksanaan uji stabilitas sebagai berikut:

- a. Uji stabilitas harus dilakukan di laboratorium yang sama dengan uji homogenitas
- b. Digunakan metode pemeriksaan yang sama dengan uji homogenitas
- c. Uji stabilitas dilakukan setelah bahan kontrol disimpan pada rentang waktu tertentu
- d. Dipilih sampel secara acak dengan jumlah sampel ≥ 2



Gambar 5. Skema Uji Stabilitas

- e. Setiap sampel dilakukan pemeriksaan secara duplo
- f.. Data hasil pemeriksaan dihitung secara statistika

8. Pemeriksaan Kadar Ureum

a. Pendahuluan

Ureum merupakan produk nitrogen dari katabolisme protein dan asam amino yang diproduksi oleh hati dan didistribusikan melalui cairan intraseluler dan ekstraseluler ke dalam darah untuk kemudian difiltrasi oleh glomerulus. Pemeriksaan ureum digunakan untuk menegakkan diagnosis gagal ginjal akut dan juga untuk mengevaluasi fungsi ginjal, status dehidrasi, menilai keseimbangan nitrogen, menilai progresivitas penyakit ginjal serta menilai hasil hemodialisis.

b. Metode pemeriksaan

Pemeriksaan kadar ureum menggunakan metode enzimatis-kinetik Analyzer dengan alat ukur spektrofotometer UV-VIS.

c. Prinsip pemeriksaan

Urea dihidrolisis dengan adanya air dan urease untuk menghasilkan ammonia dan CO₂. In ammonium akan bereaksi dengan hipoklorit dan salisilat akan membentuk kompleks warna hijau. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan kadar urea.

d. Alat dan bahan

- 1) Spektrofotometer UV-VIS
- 2) Mikropipet
- 3) Tip biru dan tip kuning
- 4) Vial
- 5) *Pooled* plasma EDTA
- 6) Reagen Ureum

Reagen 1	: TRIS Ph 7,8	(150 mmol/L)
	2-Oxoglurate	(9 mmol/L)
	ADP	(0,75 mmol/L)
	Urease	(≥ 7 kU/L)
	GLDH	(≥ 1 kU/L)
Reagen 2	: NADH	(1,3 mmol/L)

e. Cara Kerja

- 1) Menyiapkan sampel yang akan digunakan
- 2) Hidupkan spektrofotometer
- 3) Buat reagen kerja yang terdiri dari reagen 1 sebanyak 4 bagian dan reagen 2 sebanyak 1 bagian.
- 4) Pipet ke dalam kuvet sebanyak 10 μ l *pooled* plasma
- 5) Tambahkan 1.000 μ l reagen kerja
- 6) Campur sampai homogen
- 7) Inkubasi selama 1 menit

8) Baca Absorban pada panjang gelombang 340 nm menggunakan spektrofotometer pada detik ke 30 dan 60.

9) Catat hasil pemeriksaan

h. Pendokumentasian hasil penelitian

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan ureum pada pooled plasma EDTA sebelum penyimpanan -20 C selama 1 minggu, 4 minggu dan 8 minggu sebagai uji homogenitas dan sesudah penyimpanan pada suhu -20° C selama 1 minggu, 4 minggu dan 8 minggu sebagai uji stabilitas.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Poltekkes Kemenkes Yogyakarta dengan memperoleh Surat Kelayakan Etik Penelitian No.DP.04.03/e-KEPK.1/121/2025.

M. Hambatan Penelitian

Hambatan yang terdapat dalam penelitian ini yaitu lama pendiaman sampel. Selain itu, keterbatasan waktu peneliti yang bersamaan dengan jadwal kegiatan lain sehingga mengharuskan penelitian dilakukan selama 1 bulan yang seharusnya dilakukan selama 3 bulan sebagai syarat bahan kontrol.