

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

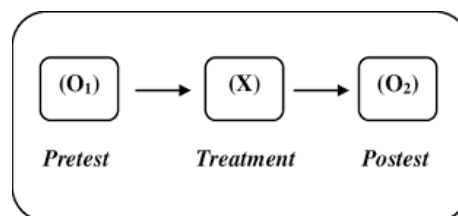
Penelitian ini merupakan pre-eksperimental laboratorium yaitu penelitian yang bersifat uji coba awal untuk menilai efektivitas suatu metode atau bahan dalam kondisi tertentu. Jenis ini dipilih karena penelitian bertujuan untuk menilai pemanfaatan *pooled* serum yang diproses kering beku sebagai kontrol kualitas laboratorium pada parameter *Aspartate Aminotransferase (AST)*. Dalam penelitian ini peneliti melakukan pengukuran atau pengujian langsung pada satu kelompok sampel, sehingga lebih menekankan pada observasi awal terhadap performa *pooled* serum.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan Adalah *One Group Pretest Posttest without control*. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati kestabilan *pooled* serum kering beku selama masa penyimpanannya sehingga dapat dinilai kelayakannya sebagai bahan kontrol kualitas laboratorium medis.

Pretest ini dilakukan dengan melakukan uji kadar *AST* sebanyak 20 kali dengan bahan kontrol *pooled* serum yang telah diproses kering beku (liofilisat) sebelum dilakukan penyimpanan. Penyimpanan *pooled* serum 2 bulan dengan suhu 2-8°C merupakan sebuah intervensi. Posttest ini dilakukan dengan melakukan uji kadar *AST* setelah dilakukan penyimpanan 2 bulan pada suhu 2-8°C.

Desain penelitian ini memungkinkan peneliti memperoleh gambaran yang sistematis mengenai performa *pooled* serum setelah diproses kering beku, termasuk kestabilan nilai enzim dan konsistensi hasil dari sebuah bahan kontrol. Penelitian disusun secara bertahap mulai dari persiapan sampel, pemrosesan *freeze drying*, rehidrasi, pemeriksaan *AST*, hingga pengujian stabilitas jangka pendek dan jangka panjang.



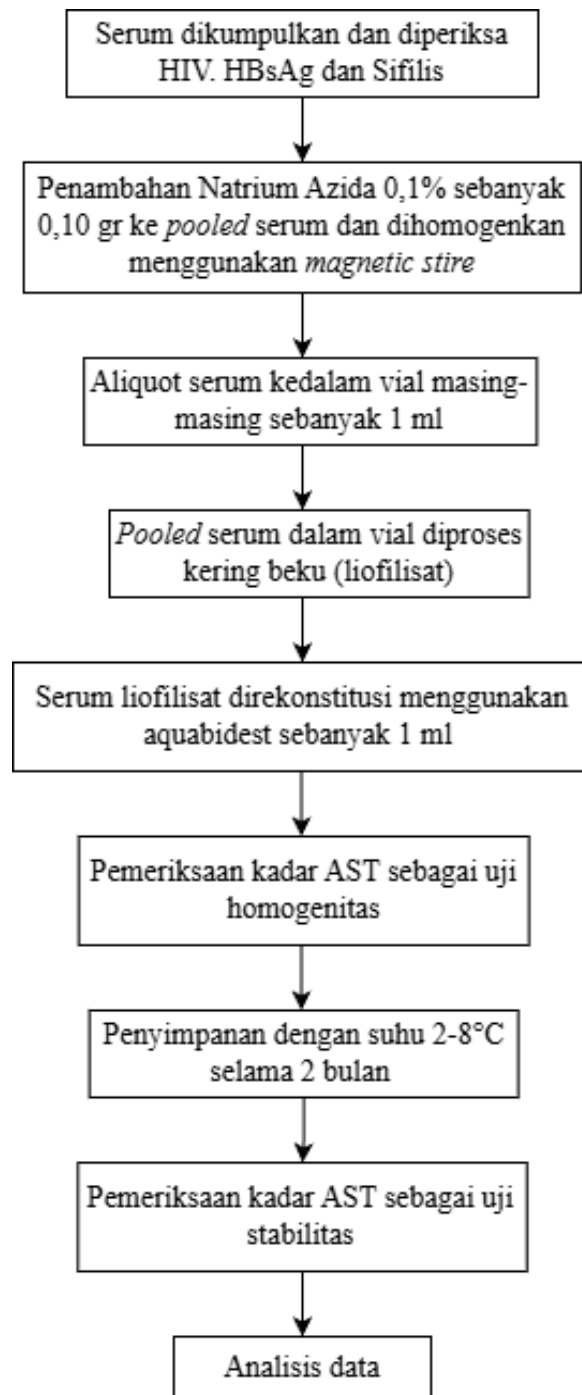
Gambar 3. Rancangan Penelitian

Keterangan :

O1 : Kadar *AST pooled* serum yang diproses kering beku sebelum dilakukan penyimpanan selama 2 bulan pada suhu 2-8°C.

X : Penyimpanan *pooled* serum yang diproses kering beku selama 2 bulan pada suhu 2-8°C.

O2 : Kadar *AST pooled* serum yang diproses kering beku sesudah dilakukan penyimpanan selama 2 bulan pada suhu 2-8°C.

B. Alur Penelitian

Gambar 4. Alur Penelitian

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek Penelitian

Subjek pada penelitian ini adalah sisa sampel darah pasien yang terbebas dari penyakit menular seperti HIV, HBsAg, dan Sifilis. Dengan kriteria sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi

- 1) Serum dari sisa pemeriksaan rutin di laboratorium kimia klinik.
- 2) Terbebas dari penyakit menular seperti HIV, HBsAg, dan Sifilis
- 3) Serum tidak mengalami hemolisis, lipemik dan ikterik
- 4) Volume serum cukup untuk *pooling*

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Serum yang hemolisis, lipemik dan ikterik
- 2) Serum tidak mencukupi untuk dilakukan *pooling*

2. Objek Penelitian

Objek pada penelitian ini adalah kadar *Aspartate Aminotransferase (AST)* pada *pooled* serum yang diproses kering beku (liofilisat) yang diperiksa sebelum disimpan pada suhu 2 - 8°C dan setelah disimpan selama 2 bulan dengan suhu yang sama yang dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan April tahun 2026.

2. Tempat Penelitian

- a. Serum diperoleh dari Gadjah Mada Medical Center (GMC) UGM.
- b. Pemrosesan darah menjadi *pooled* serum yang diproses kering beku (liofilisat) dilakukan di Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.
- c. Pemeriksaan kadar *Aspartate Aminotransferase (AST)* untuk uji homogenitas dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.
- d. Penyimpanan serum selama 2 bulan yang disimpan pada suhu 2 - 8°C dilakukan di Laboratorium Imunologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Kemenkes Yogyakarta.
- e. Pemeriksaan kadar *Aspartate Aminotransferase (AST)* untuk uji stabilitas dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah *pooled* serum yang diproses dengan metode kering beku pada uji homogenitas dan disimpan selama 2 bulan pada suhu 2-8°C pada uji stabilitas.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil pemeriksaan *Aspartate Aminotransferase (AST)* sebagai parameter kontrol kualitas.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *pooled* serum diproses kering beku (*Freeze Drying*) hingga diperoleh serum liofilisat kemudian dilakukan uji homogenitas dan disimpan selama 2 bulan pada suhu 2-8 °C pada *freezer* kemudian dilakukan uji stabilitas.

Satuan : Bulan

Skala : Rasio

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil pemeriksaan *AST* sebagai parameter kontrol kualitas. Aktivitas enzim *AST* diukur melalui nilai aktivitas enzim dalam serum kontrol liofilisat.

Satuan : U/L

Skala : Rasio

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Pengumpulan Data

Jenis pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer. Data primer yaitu data yang langsung didapatkan dari sumber dan diberi kepada peneliti. Data ini diperoleh dari pemeriksaan kadar enzim *AST* pada *pooled* serum yang diproses kering beku sebelum dan sesudah disimpan selama 2 bulan.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang akan digunakan untuk memperoleh data

primer pada penelitian ini adalah pengukuran kadar enzim *AST* pada uji homogenitas kemudian setelah 2 bulan dilakukan pengukuran kadar enzim *AST* untuk uji stabilitas.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Instrumen Penelitian

- a) *Analyzer* kimia klinik otomatis untuk *AST* 1 unit.
- b) *Lyophilizer (freeze-dryer)* yang mampu mengeringkan 1 unit.
- c) *Freezer* -20°C dan -70°C untuk penyimpanan 1 unit.
- d) *Centrifuge* untuk pemisahan serum 1 unit.
- e) *Magnetic stirrer* 1 unit.
- f) Mikropipet 10–1000 μL 1 unit.
- g) Tip steril secukupnya.
- h) Pipet volumetrik atau dispenser besar untuk pembuatan pool 1 unit.
- i) Neraca analitik (untuk bahan tambahan/stabilizer) 1 unit.
- j) *Refrigerator* ($2-8^{\circ}\text{C}$) 1 unit.
- k) Alat pencatat suhu/monitor suhu penyimpanan (data logger) 1 unit.
- l) Alat steril untuk aliquoting (1 labu erlenmeyer, 100 vial kaca steril, 2 labu ukur, 1 *beaker glass* dan 1 batang pengaduk).

2. Bahan Penelitian

- a) Natrium Azida 0,1% sebanyak 0,10 gr.
- b) *Pooled* serum 100 ml.
- c) Aquabidest 100 ml.
- d) Reagen *AST* untuk *analyzer* sebanyak 1 kit.

I. Uji Validasi Instrumen

1. Untuk alat ukur atau instrumen

Uji validitas dapat diketahui melalui penilaian terhadap keandalan alat ukur yang digunakan dalam penelitian. Instrumen yang dipakai di Laboratorium Kimia Klinik Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta telah melalui prosedur pengendalian mutu yang dilaksanakan setiap hari. Pengendalian mutu tersebut mencakup *quality control* pada periode pendahuluan dan periode kontrol. Dengan demikian mutu instrumen yang digunakan telah terjamin, sehingga data yang dihasilkan dapat dianggap valid.

Uji reliabilitas dilaksanakan dengan melakukan pemeriksaan yang sama terhadap sampel uji sebanyak 10 kali, sesuai dengan ketentuan ISO 13528: 2015 mengenai uji profisiensi. Pada penelitian ini, pemeriksaan dilakukan sebanyak 20 kali. Pendekatan ini diharapkan mampu menunjukkan tingkat reliabilitas instrumen melalui konsistensi hasil yang diperoleh.

2. Enumerator

Pengukur adalah Ahli Teknologi Laboratorium Medis yang kompeten dalam melaksanakan pemeriksaan dan bekerja sesuai dengan Standar Operasional Prosedur (SOP).

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a) Peneliti terlebih dahulu mengurus dokumen permohonan izin penelitian beserta pengajuan *Ethical Clearance* melalui Administrasi Akademik dan Kemahasiswaan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. Berkas

tersebut kemudian disampaikan kepada Laboratorium Kimia Klinik Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta sebagai lembaga tempat penelitian akan dilaksanakan.

- b) Peneliti menyiapkan seluruh instrumen, bahan, serta reagen yang digunakan pada pemeriksaan parameter *Aspartate Aminotransferase (AST)*.

2. Tahap Pengumpulan Serum

- a) Ambil sisa serum pasien dari Laboratorium Kimia Klinik yang telah selesai diperiksa rutin.
- b) Pastikan serum memenuhi kriteria yaitu : tidak hemolisis (warna merah muda tidak tampak), tidak ikterik (warna kuning pekat tidak terlihat), tidak lipemik (tidak tampak keruh susu).
- c) Periksa setiap serum secara visual dengan lampu latar.
- d) Catat kode sampel, tanggal pengambilan, dan kondisi fisik serum.
- e) Simpan serum sementara pada suhu 2–8°C sebelum proses *pooling* (maksimal 24 jam).

3. Tahap Pembuatan *Pooled Serum*

- a) Siapkan tabung penampung steril berkapasitas 100 ml.
- b) Tuangkan serum dari beberapa sampel pasien ke dalam tabung secara aseptik.
- c) Lakukan homogenisasi dengan mengaduk perlahan secara manual selama 3–5 menit.
- d) Lakukan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit.

- e) Pindahkan bagian supernatan jernih ke tabung steril lain dan tambahkan Natrium Azida 0,1 % sebanyak 0,10 gram.
 - f) Catat volume akhir *pooled* serum.
 - g) Bagikan serum ke dalam vial - vial kaca steril, dan tutup menggunakan penutup khusus *freeze-dryer*.
 - h) Beri label pada setiap vial (tanggal pembuatan dan volume).
4. Tahap Kering Beku (*Freeze Drying*)
- a) Masukkan vial dalam *freezer* -4°C , -20°C , -70°C masing-masing selama 24 jam hingga beku sempurna.
 - b) Nyalakan alat *freeze dryer* dan menunggu hingga suhu ruang pengering mencapai -70°C .
 - c) Masukkan vial beku ke dalam alat *freeze dryer*.
 - d) Lakukan proses liofilisasi sesuai tahapan:
 - 1) *Primary drying*
Suhu -40°C , tekanan 0.05–0.1 mBar, durasi 12 jam.
 - 2) *Secondary drying*
Suhu dinaikkan ke -70°C , tekanan tetap 0.05–0.1 mBar, durasi 6–12 jam.
 - e) Keluarkan vial setelah alat selesai dan tekanan kembali normal.
 - f) Pastikan bentuk serum menjadi bubuk kering berwarna putih/krem.
 - g) Simpan serum kering beku pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$.
5. Tahap Rehidrasi Serum Kering Beku
- a) Ambil vial serum kering beku.

- b) Tambahkan aquabidest steril sebanyak volume awal (misalnya 1 mL).
 - c) Tutup vial dan tunggu selama 30 menit agar larut.
 - d) Homogenkan dengan membolak-balik vial secara perlahan.
 - e) Pastikan tidak ada partikel yang belum larut.
6. Tahap Uji Homogenitas
- a) Kadar *AST* diperiksa pada *Analyzer* Kimia Klinik dengan mengambil 10 sampel secara acak dan dilakukan pemeriksaan secara duplo terhadap setiap sampel.
 - b) Hitung homogenitas berdasarkan ISO 13528 tahun 2015.
7. Tahap Uji Stabilitas
- a) Simpan sampel pada suhu 2-8°C selama 2 bulan.
 - b) Setelah 2 bulan lakukan pemeriksaan *AST* pada alat *Analyzer* Kimia Klinik pada 5 sampel dan dilakukan duplo.
 - c) Lakukan perhitungan sesuai rumus uji stabilitas ISO 13528 tahun 2015.

K. Manajemen Data

1. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan pengujian pada 10 sampel yang dilakukan secara duplo atau pengulangan. Perhitungan uji sebagai berikut :

- a) Hitung rata-rata hasil siplo dan duplo (X_t) dengan rumus:

$$X_t = \frac{(X_{t1} + X_{t2})}{2} \text{ dimana } X_{t1} \text{ adalah hasil uji ke-1 dan } X_{t2} \text{ hasil uji ke-2.}$$

- b) Hitung selisih absolut (W_t) yang didapatkan dari hasil siplo dan duplo dengan rumus: $W_t = |X_{t1} - X_{t2}|$.

- c) Hitung rata-rata umum ($\bar{X}_r$) dengan rumus: $\bar{X}_r = \frac{\sum X_t}{g}$, dimana g adalah jumlah sub sampel yang digunakan.

Keterangan:

- a) X_t 1 : hasil siplo (hasil uji 1)
 b) X_t 2 : hasil duplo (hasil uji 2)
 c) g : jumlah subsample yang digunakan

- d) Hitung standar deviasi rata-rata pada subsampel (S_x) dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X}_r)^2}{g - 1}}$$

- e) Hitung standar deviasi *within samples* (S_w) dengan rumus:

$$S_w = \sqrt{\frac{\sum (wt^2)}{2g}}$$

- f) Hitung standar deviasi *between samples* (S_s) dengan rumus:

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

- g) Sampel pemeriksaan dapat dikatakan homogen jika: $ss \leq 0,3 \sigma_{pt}$. Dalam konteks tersebut di mana σ merupakan standar deviasi untuk penilaian profisiensi (SDPA), nilai σ dapat ditentukan menggunakan CV Horwitz.
- h) Menentukan CV Horwitz menggunakan rumus: $2^{(1-0,5 \log C)}$, dimana C merupakan konsentrasi yang akan diukur.

2. Uji Stabilitas

Uji stabilitas diambil sebanyak 5 sampel dan diduplo untuk dilakukan perhitungan. Adapun uji stabilitas dapat dilakukan sebagai berikut:

- a) Bandingkan jumlah rata-rata umum hasil dari pengukuran yang diperoleh dalam pemeriksaan sebelum distribusi/ uji homogenitas (X_r) dengan rata-rata umum hasil yang diperoleh dalam pemeriksaan stabilitas (Y_r).
- b) Lakukan perhitungan dengan cara menghitung selisih antara uji homogenitas (X_r) dengan uji stabilitas (Y_r).
- c) Sampel dapat dikatakan stabil apabila: $|X_r - Y_r| \leq 0,3 \sigma_{pt}$.

3. Analisis Deskriptif

Pada penelitian ini menggunakan analisis deskriptif atau analisis data mengukur perhitungan rata-rata (mean), nilai tertinggi (max), nilai terendah (min), standar deviasi (SD) pada *pooled* serum yang diproses secara kering beku terhadap kadar *AST* sebelum dilakukan penyimpanan dan setelah dilakukan penyimpanan pada suhu 2-8°C selama 2 bulan.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta. Persetujuan tersebut dibuktikan dengan diterbitkannya Surat Keterangan Layak Etik Nomor DP.04.03/e-KEPK.1/113/2026 pada tanggal 28 Januari 2026. Berdasarkan surat tersebut, penelitian dinyatakan memenuhi kelayakan etik sesuai dengan tujuh standar etika penelitian yang ditetapkan oleh WHO tahun 2011.