

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni (*true experimental*), yaitu penelitian yang sepenuhnya memenuhi prinsip dasar eksperimen, meliputi adanya kontrol terhadap variabel luar, manipulasi variabel bebas, serta penggunaan kelompok pembanding (kelompok kontrol) untuk menguji hubungan sebab–akibat secara lebih akurat (Arib dkk., 2024). Menurut Arib dkk. (2024), penelitian eksperimen murni memiliki validitas internal yang tinggi karena peneliti mampu mengendalikan kondisi eksperimen secara ketat dan memastikan bahwa perubahan pada variabel terikat merupakan akibat dari perlakuan yang diberikan, bukan faktor luar lain.

Dalam penelitian ini, variabel bebas berupa perbedaan waktu pendiaman serum dimanipulasi secara langsung, dan kondisi lain seperti suhu ruang, jenis tabung, alat ukur, serta prosedur penanganan dikontrol secara konsisten.

2. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Design*, yaitu salah satu bentuk *true experimental design* yang melibatkan dua kelompok yang diberi perlakuan berbeda dan hanya

dilakukan pengukuran (*posttest*) setelah perlakuan. Desain ini tidak memerlukan *pretest* (Masriadi, Baharuddin dan Samsualam, 2022).

Pada penelitian ini, setiap responden menghasilkan dua tabung serum yang bertindak sebagai dua kelompok berbeda:

- a. Kelompok Perlakuan (T_1) $\rightarrow$ serum dengan waktu pendiaman 5 menit
- b. Kelompok Kontrol (T_2) $\rightarrow$ serum dengan waktu pendiaman 30 menit

Pengukuran kadar bilirubin total dilakukan setelah perlakuan diberikan, sehingga skema desain dapat digambarkan sebagai berikut (Masriadi, Baharuddin dan Samsualam, 2022):

$$\begin{array}{ccccccc} T_1 & \rightarrow & X & \rightarrow & O_1 \\ T_2 & \rightarrow & - & \rightarrow & O_2 \end{array}$$

Keterangan :

T_1 : kelompok perlakuan (pendiaman 5 menit)

T_2 : kelompok kontrol (pendiaman 30 menit)

X : perlakuan atau intervensi

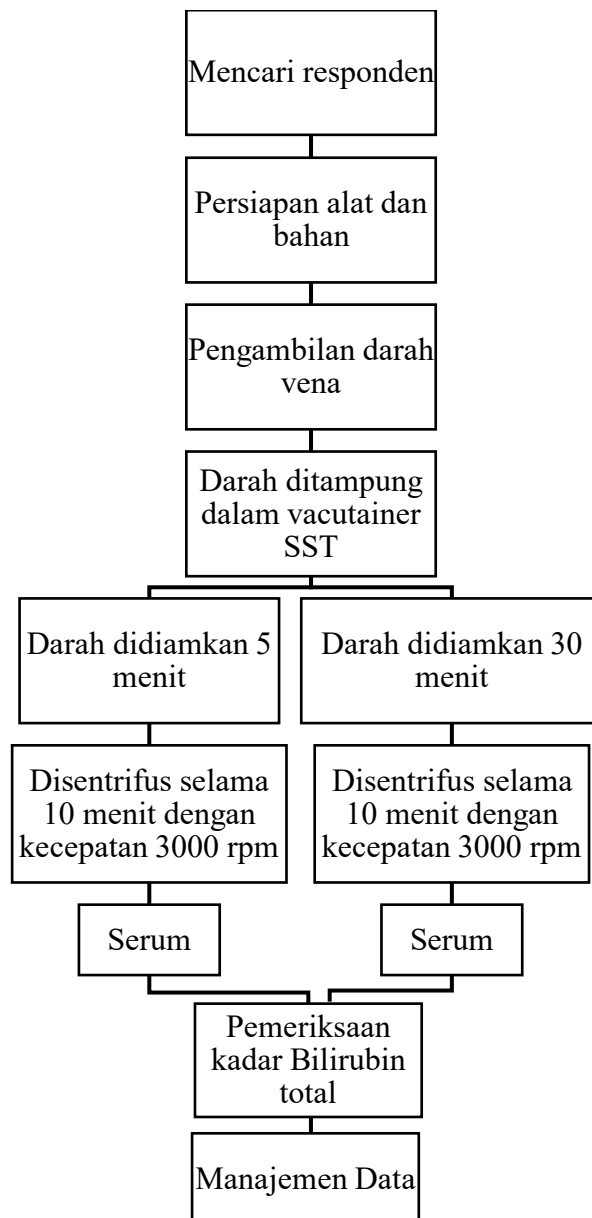
O_1 : nilai *posttest* setelah perlakuan (pendiaman 5 menit)

O_2 : nilai *posttest* kontrol (setelah pendiaman 30 menit)

Desain ini memungkinkan peneliti membandingkan hasil pengukuran antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara langsung setelah diberikan perlakuan, sehingga setiap perbedaan nilai dapat dikaitkan dengan variasi waktu pendiaman serum. Dengan menggunakan desain *Posttest Only Control Design*, penelitian ini dapat

menguji pengaruh perlakuan secara objektif tanpa dipengaruhi nilai awal (*pretest*), serta memberikan tingkat validitas internal yang lebih tinggi (Masriadi, Baharuddin dan Samsualam, 2022; Arib *dkk.*, 2024).

B. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi mencakup seluruh subjek atau objek yang memiliki karakteristik tertentu sesuai tujuan penelitian (Adiputra *dkk.*, 2021). Populasi berfungsi sebagai dasar generalisasi yang memungkinkan peneliti menarik kesimpulan berdasarkan unsur-unsur yang dikajinya. Dengan demikian, populasi tidak hanya mencakup manusia, tetapi juga berbagai objek lain yang memenuhi kriteria penelitian.

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah 274 mahasiswa Semester 2 Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Pemilihan subjek ini didasarkan pada relevansi dalam proses teknis yang menjadi fokus dalam penelitian. Objek dalam penelitian ini adalah darah vena responden yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, lalu ditampung dalam *Serum Separator Tube* kemudian didiamkan selama 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus.

2. Sampel Penelitian

Sampel merupakan sebagian dari populasi yang dipilih untuk mewakili keseluruhan karakteristik populasi dalam suatu penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bagian dari subjek dengan kriteria:

a. Kriteria Inklusi

Bersedia untuk menjadi probandus penelitian dengan mengisi dan menandatangani *informed consent*.

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Serum hemolisis
- 2) Serum ikterik
- 3) Serum lipemik

Teknik pengambilan sampel yang diterapkan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling*. Menurut Sugiyono (2019), *simple random sampling* merupakan metode yang paling sederhana karena proses pemilihan anggota sampel dari populasi dilakukan secara acak tanpa mempertimbangkan kesamaan karakteristik atau stratifikasi tertentu dalam populasi. Teknik ini digunakan apabila populasi penelitian dianggap bersifat homogen, sehingga setiap individu memiliki peluang yang sama untuk terpilih menjadi sampel penelitian (Sugiyono, 2019). Pengambilan sampel acak sederhana pada populasi kecil dapat dilakukan dengan metode undian (Sumantri dan Ekayanti, 2015; Goa, 2022).

Penelitian ini melibatkan 40 responden yang dipilih secara acak melalui undian menggunakan metode *spin* nama 247 calon responden dan telah mengisi lembar persetujuan (*informed consent*). Jumlah 40 sampel ini memenuhi kriteria kelayakan menurut Sugiyono (2019) yang menyatakan bahwa ukuran sampel memadai berada pada rentang 30–500 responden dan jumlah tersebut dinilai layak untuk menghasilkan data yang konsisten dan mampu mewakili kondisi yang diteliti (Budi dan Moran, 2021). CLSI EP09c, merekomendasikan minimal 40 sampel yang

diuji dengan metode uji dan metode referensi untuk studi komparasi (*method comparison*) (Association of Public Health Laboratories, 2024).

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Maret 2026.

2. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu pendiaman sampel darah dalam SST sebelum disentrifus.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar bilirubin total.

3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah penyimpanan sampel darah (suhu dan cahaya).

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel yang menjadi penyebab perubahan pada variabel terikat (Adiputra *dkk.*, 2021). Setiap perubahan pada variabel bebas akan berdampak pada perubahan variabel lainnya (Farhan Arib *dkk.*, 2024).

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu pendiaman sampel darah dalam SST sebelum disentrifus.

Satuan : menit

Skala data : nominal

2. Variabel Terikat

Variabel yang dipengaruhi atau diukur dalam penelitian (Abubakar, 2021). Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar bilirubin total yang diperiksa menggunakan metode Jendrassik-Gorf menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.

Satuan : mg/dL

Skala data : rasio

3. Variabel Pengganggu

Variabel yang berpotensi menimbulkan bias dalam hasil penelitian (Adiputra *dkk.*, 2021). Variabel pengganggu pada penelitian ini adalah penyimpanan sampel darah. Penyimpanan sampel darah untuk pemeriksaan bilirubin memerlukan perhatian khusus, terlebih untuk pengaturan suhu dan cahaya. Darah dalam SST akan disimpan didalam kotak minim cahaya (*sterofoam box*) dan suhu yang terkontrol antara 20–25°C.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data primer adalah sumber data utama yang terdiri atas bukti

langsung atau kesaksian pertama terkait suatu peristiwa, fenomena, atau objek yang diteliti, serta gejala yang diamati di lapangan (Sumantri dan Ekayanti, 2015; Adiputra *dkk.*, 2021). Data ini diperoleh secara langsung dari sumber aslinya dan belum tersedia dalam bentuk kompilasi maupun arsip data sebelumnya. Dengan demikian, pengumpulan data primer dilakukan melalui interaksi langsung dengan responden sebagai sumber informasi utama.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini dengan mengumpulkan data pengukuran bilirubin total menggunakan spektrofotometer yang tersedia di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

Instrumen dan bahan penelitian merupakan seperangkat alat dan bahan yang digunakan untuk memperoleh atau mengumpulkan data yang relevan dengan tujuan penelitian. Adapun instrumen serta bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

1. Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: jarum multisampel, holder, *tourniquet*, SST, kapas, plester, *alkohol swab*, *microtube*, spektrofotometer Mindray BA 88A, sentrifus, tabung reaksi, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*.
2. Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu: aquades, serum darah, kit reagen bilirubin total, dan serum kontrol komersial.

I. Uji Validitas dan Reliabilitas

Penelitian ini menggunakan spektrofotometer sebagai instrumen utama untuk mengukur kadar analit, di mana alat tersebut merupakan fasilitas yang tersedia di Laboratorium Kimia Klinik, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

Uji validitas instrumen dilaksanakan untuk menjamin akurasi dan presisi data yang dihasilkan. Prosedur validitas dilakukan dengan memeriksa serum kontrol satu kali sebelum instrumen digunakan untuk menganalisis sampel penelitian. Validitas alat ukur dianggap terbukti apabila nilai pemeriksaan serum kontrol berada dalam rentang nilai kontrol yang telah ditetapkan sebelumnya. Apabila hasil pemeriksaan serum kontrol berada di luar rentang nilai yang ditentukan, maka diperlukan serangkaian tindakan evaluasi dan korektif.

Tindakan evaluasi mencakup pengecekan menyeluruh terhadap kondisi dan fungsi instrumen yang digunakan (spektrofotometer), pemeriksaan kualitas dan stabilitas reagen yang dipakai, serta peninjauan ulang terhadap langkah-langkah prosedural baku dalam pemeriksaan kadar bilirubin total. Langkah ini krusial sebagai upaya *quality control* internal untuk memastikan hasil penelitian dapat dipertanggungjawabkan keabsahannya secara ilmiah.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Peneliti mengajukan perizinan etik penelitian kepada Dewan Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Yogyakarta secara online melalui website

- b. Peneliti mengajukan perizinan untuk menggunakan Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta
- c. Persiapan alat, bahan dan reagen.
- d. Persiapan responden dengan melakukan pendataan untuk memperoleh informasi tentang nama, usia, riwayat penyakit, konsumsi obat-obatan serta memberikan penjelasan *informed concent* sebelum dilakukan prosedur pengambilan darah

2. Tahap Pelaksanaan

a. Tahap Pelaksanaan *Quality Control*

1) Alat

- a) Spektrofotometer
- b) Tabung reaksi
- c) Mikropipet
- d) *Yellow tip*
- e) *Blue tip*

2) Bahan

- a) Serum kontrol
- b) Kit reagen bilirubin total

3) Cara Kerja

- a) Melakukan pengukuran kadar bilirubin total pada serum kontrol setiap akan dilakukan pemeriksaan

- b) Membandingkan kadar bilirubin total pada serum kontrol yang diperoleh dengan nilai *range control*
- c) Jika hasil kadar bilirubin total yang diperoleh sudah masuk nilai range kontrol maka pemeriksaan dapat dilanjutkan, sedangkan jika kadar bilirubin total yang diperoleh tidak masuk nilai *range control* maka perlu dilakukan evaluasi

b. Tahap Pelaksanaan

- 1) Meminta persetujuan kepada responden melalui pengisian *informed consent* untuk kebersediaan mengikuti penelitian

2) Tahap pengambilan darah vena

a) Alat

- (1) *Tourniquet*
- (2) Holder
- (3) Jarum Multisampel (BD *Vacutainer*)
- (4) *Alkohol swab*
- (5) Plester
- (6) SST (*Serum Separator Tube*)
- (7) *Container box*

b) Cara kerja

- (1) Memasang jarum pada holder dan memastikan jarum terpasang dengan benar
- (2) Memilih vena bagian *median cubital* atau *hepatic*

- (3) Memasang *tourniquet* pada lengan responden dengan jarak kurang lebih 10 cm dari lipatan siku dan meminta responden untuk mengepalkan tangannya
- (4) Melakukan palpasi atau perabaan, lalu membersihkan permukaan kulit pada bagian yang akan diambil darahnya menggunakan *alkohol swab* 70% dan dibiarkan hingga kering untuk mencegah kontaminasi alkohol
- (5) Permukaan kulit yang sudah dibersihkan tidak boleh tersentuh kembali agar terbebas dari kuman
- (6) Menusuk vena responden dengan posisi jarum menghadap ke atas dengan sudut kemiringan antara jarum dan kulit 15°
- (7) Memasukkan tabung *vacutainer* ke dalam holder kemudian tekan, tunggu hingga darah mengalir dengan sendirinya dan minta responden untuk melepaskan kepalan tangan
- (8) Setelah tabung pertama terisi penuh, darah akan berhenti mengalir dengan sendirinya, cabut kemudian ganti dengan tabung yang kedua
- (9) Jika tabung kedua juga sudah terisi penuh, lepas *tourniquet* yang terpasang

(10) Tempat suntikan ditahan dengan kapas dan lepaskan jarum dari lengan responden

(11) Tekan kembali pada daerah bekas tusukan selama beberapa saat dengan alkohol 70% kemudian tutup dengan plester

(12) SST yang sudah berisi sampel darah disimpan dalam *container box*

3) Tahap pengolahan sampel darah

a) Alat

(1) Mikropipet

(2) *Blue tip*

(3) Sentrifus

(4) *Microtube*

b) Bahan

Sampel darah vena

c) Cara kerja

(1) Tabung sampel darah pertama ditunggu 5 menit lalu disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit

(2) Tabung sampel darah kedua ditunggu 30 menit lalu disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit

- (3) Serum yang terbentuk setelah sentrifugasi segera dipisahkan dari endapan sel darah merah menggunakan mikropipet dan dipindahkan dalam *microtube*

4) Tahapan pemeriksaan kadar bilirubin total

a) Alat

- (1) Spektrofotometer
- (2) Kuvet/Tabung reaksi
- (3) Mikropipet
- (4) *Yellow tip*
- (5) *Blue tip*

b) Bahan

- (1) Sampel serum
- (2) Kit reagen pemeriksaan bilirubin total
- (3) Aquades

c) Cara kerja

- (1) Membuat *working reagent* (WR) mencampur R1 dan R2 dengan perbandingan 1 ml R2 (Sodium nitrit) dengan 4 ml R1 (*Sulfanilic acid, hydrochloric acid dan cetrimide*)
- (2) Memipet reagen dan sampel serum ke dalam kuvet atau tabung reaksi dan dilakukan pemeriksaan kadar bilirubin total sesuai dengan tabel 3.1.

(3) Tabel 3.1 Cara Kerja Pemeriksaan Bilirubin Total

Keterangan	Blanko Reagen	Banko Sampel	Sampel
Aquades	100 μ l	-	-
Reagen I	-	1000 μ l	-
WR	1000 μ l	-	1000 μ l
Serum	-	100 μ l	100 μ l

Sumber: One Care, 2023.

- (4) Menghomogenkan, lalu inkubasi 2 menit pada suhu ruang
- (5) Membaca absorbansi blanko dan sampel pada panjang gelombang 546 nm
- (6) Menghitung kadar bilirubin total dengan perhitungan berikut:

$$\text{Bilirubin total (mg/dL)} = \frac{\text{Abs (pemeriksaan-blanko) sampel}}{\text{Abs (pemeriksaan-blanko) standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

- d) Nilai normal

Tabel 3.2 Nilai Rujukan Kadar Bilirubin Total

Keterangan	mg/dL
>5 hari – 60 tahun	0,3 – 1,2
60 – 90 tahun	0,2 – 1,1

Sumber: One Care, 2023.

K. Manajemen Data

Perbedaan kadar bilirubin total menggunakan SST dengan waktu pendiaman 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus dapat diketahui dengan dilakukan uji deskriptif dan uji statistik.

1. Uji Deskriptif

Data yang didapatkan dari hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan diagram batang. Analisis deskriptif dilakukan dengan cara menghitung rata-rata (*mean*), nilai tertinggi, nilai terendah, dan standar deviasi (SD) hasil pemeriksaan kadar bilirubin total menggunakan SST yang didiamkan 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus.

2. Uji Statistik

Data yang didapatkan dari hasil penelitian diuji distribusi terlebih dahulu (*test of normality*) menggunakan *software* SPSS versi 16.0. Uji yang digunakan yaitu uji *Saphiro Wilk*. Hipotesis yang digunakan pada uji distribusi kadar bilirubin total menggunakan SST yang didiamkan 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus yaitu:

H_0 : Data berdistribusi normal

H_a : Data tidak berdistribusi normal

dengan ketentuan:

H_0 diterima jika $Sig (Shapiro-Wilk) \geq 0,05$

H_a ditolak jika $Sig (Shapiro-Wilk) < 0,05$

Apabila data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji t 2 sampel berpasangan atau *Paired Sample T-test*. Hipotesis uji *Paired Sample T-test*. Apabila data tidak berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji non-parametrik menggunakan *Willcoxson*. Uji statistik tersebut menggunakan hipotesis:

H_0 : Tidak ada perbedaan kadar bilirubin total menggunakan SST yang didiamkan selama 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus

H_a : Ada perbedaan kadar bilirubin total menggunakan SST yang didiamkan selama 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus

H_0 : $\mu_1 = \mu_2$

H_a : $\mu_1 \neq \mu_2$

dengan ketentuan

H_0 diterima jika $\text{Sig} \geq 0,05$

H_0 ditolak jika $\text{Sig} < 0,05$

L. Etika Penelitian

Penelitian ini dilakukan sejujur-jujurnya berdasarkan fakta yang terjadi di lapangan. Penelitian ini dilakukan dengan etika penelitian sebagai berikut:

1. Kode Etik

Kode etik penelitian ini telah diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta melalui surat No. DP.04.03/e-KEPK.1/086/2026.

2. Surat Izin Peminjaman Laboratorium

Mengajukan surat perizinan penggunaan Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta pada koordinator laboratorium dengan surat pengajuan penelitian yang ditandatangani oleh dosen pembimbing.

3. Surat penjelasan sebelum persetujuan (PSP)

Peneliti menjelaskan maksud, tujuan dan prosedur penelitian secara singkat dan jelas kepada calon responden. Responden selain membantu peneliti juga akan mendapatkan keuntungan. Identitas calon responden akan dirahasiakan, sehingga calon responden tidak perlu merasa khawatir. Partisipasi calon responden bersifat sukarela.

4. *Informed Consent*

Peneliti menjelaskan maksud, tujuan dan prosedur penelitian kepada calon responden. Apabila calon responden bersedia menjadi responden, maka responden harus mengisi dan menandatangani lembar *informed consent* yang diberikan oleh peneliti. Peneliti tidak melakukan pemaksaan, sehingga semua responden penelitian didapatkan secara sukarela.