

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

1. Jenis penelitian

Penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observatif analitik. Penelitian observatif analitik merupakan penelitian yang dilakukan tanpa memberikan perlakuan atau intervensi terhadap subjek penelitian, tetapi bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar variabel yang diteliti. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar bilirubin total menggunakan spesimen serum, plasma heparin, dan plasma EDTA pada bayi dengan ikterus neonatus, kemudian hasil pemeriksaan dibandingkan untuk mengetahui perbedaan kadar bilirubin total serta spesimen yang memberikan hasil paling mendekati serum (Sugiyono, 2019).

2. Desain Penelitian

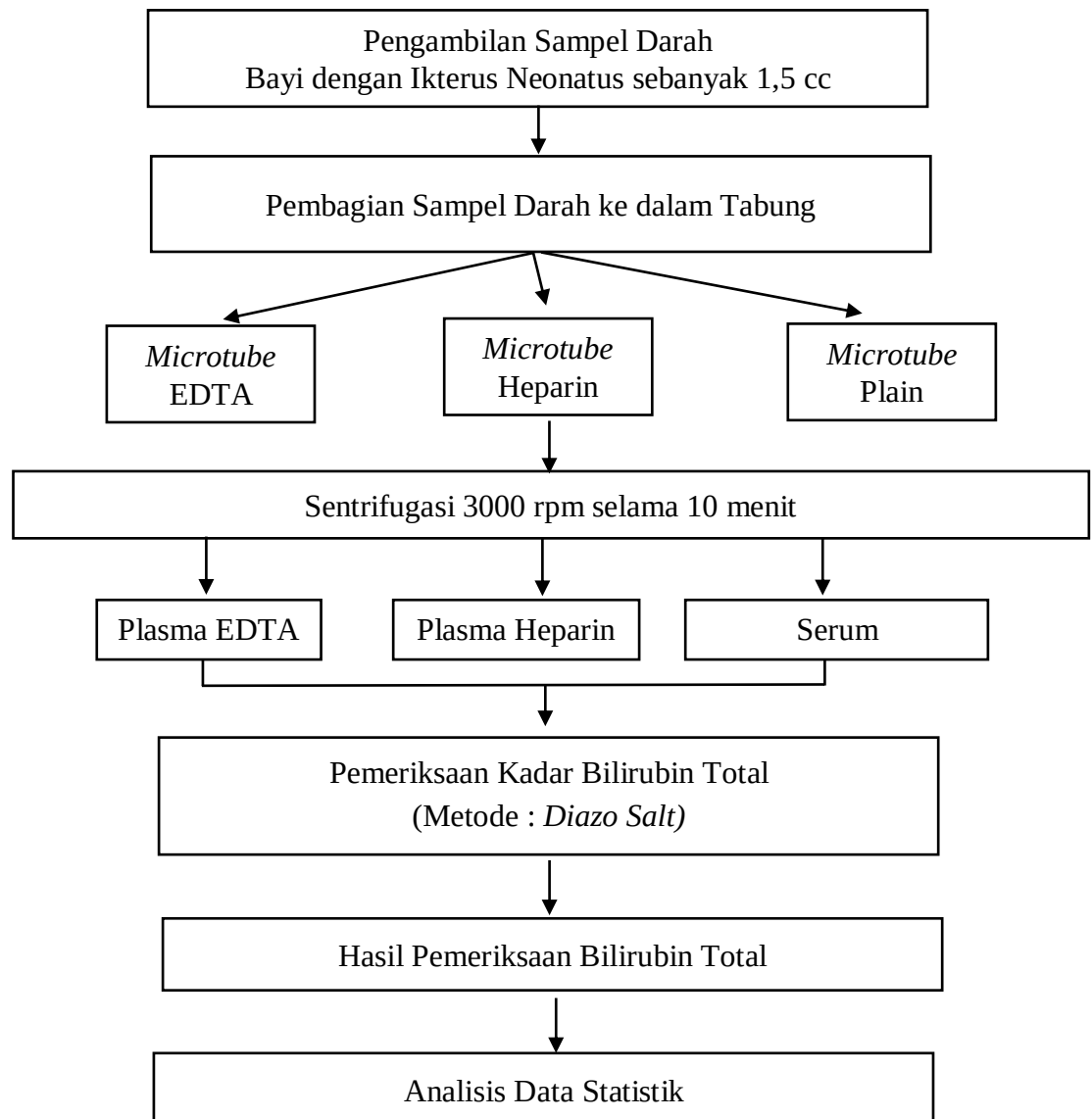
Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah cross sectional dengan pendekatan komparatif laboratorik. Desain cross sectional merupakan penelitian yang dilakukan pada satu waktu pengamatan tanpa adanya tindak lanjut terhadap subjek penelitian, sehingga pengambilan dan pemeriksaan sampel dilakukan dalam waktu yang sama. Pendekatan komparatif laboratorik digunakan karena penelitian ini bertujuan membandingkan hasil pemeriksaan

kadar bilirubin total menggunakan spesimen serum, plasma heparin, dan plasma EDTA pada bayi dengan ikterus neonatus.

Perbedaan jenis spesimen dan antikoagulan dalam penelitian ini merupakan bagian dari prosedur pemeriksaan laboratorium, kemudian hasil pemeriksaan dibandingkan untuk mengetahui perbedaan kadar bilirubin total serta spesimen yang memberikan hasil paling mendekati serum (Sugiyono, 2019; Burtis & Bruns, 2018)

B. Rancangan Percobaan

Rancangan Percobaan pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar 6 (Gambar 6).



Gambar 6. Desain Penelitian

C. Subjek dan Objek

1. Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah bayi dengan ikterus neonatus yang menjalani rawat jalan di Rumah Sakit Khusus Ibu dan Anak Rachmi, dengan kriteria sebagai berikut:

a. Kriteria Inklusi :

- 1) Bayi baru lahir (neonatus) dengan kecurigaan ikterus neonatus berdasarkan penilaian klinis dan advis dokter yang menjalani pemeriksaan bilirubin total.
- 2) Usia bayi antara 0 hari hingga 30 hari.
- 3) Bayi yang mendapatkan persetujuan dari orang tua atau wali untuk mengikuti penelitian.
- 4) Bayi yang tidak menerima transfusi darah dalam 24 jam terakhir sebelum pengambilan sampel darah.
- 5) Bayi dengan kondisi stabil (tidak dalam kondisi kritis atau menggunakan alat bantu napas).

b. Kriteria Eksklusi :

- 1) Sampel hemolisis
- 2) Sampel lipemik

2. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah kadar bilirubin total pada sampel darah bayi dengan ikterus neonatus. Dari setiap subjek diambil satu kali sampel darah yang kemudian dibagi untuk pemeriksaan kadar

bilirubin total menggunakan empat jenis spesimen, yaitu plasma dari tabung EDTA, heparin, serta serum tanpa antikoagulan sebagai kelompok kontrol.

3. Teknik Sampling

Teknik Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah *random sampling*, yaitu pengambilan sampel secara acak dari seluruh bayi yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak termasuk dalam kriteria eksklusi, sehingga setiap anggota populasi memiliki kesempatan yang sama untuk terpilih sebagai subjek penelitian (Sugiyono, 2019). Setelah diperoleh persetujuan tertulis (*informed consent*) dari orang tua atau wali, dilakukan pengambilan sampel darah sebanyak satu kali dari setiap bayi yang terpilih. Penggunaan random sampling bertujuan untuk meminimalkan bias seleksi serta memperoleh sampel yang homogen dan representatif sesuai dengan tujuan penelitian (Notoatmodjo, 2018).

4. Besar Sampel

Penentuan Penentuan besar sampel dalam penelitian ini mengacu pada pendapat Sugiyono (2020) yang menyatakan bahwa dalam penelitian kuantitatif, khususnya penelitian analitik komparatif sederhana, jumlah sampel minimal yang dapat digunakan adalah 30 subjek agar data yang diperoleh dapat dianalisis secara statistik dan dianggap mewakili populasi penelitian. Berdasarkan ketentuan tersebut, maka besar sampel dalam penelitian ini ditetapkan sebanyak 30 bayi

dengan ikterus neonatus. Setiap subjek akan dilakukan pemeriksaan kadar bilirubin total menggunakan tiga jenis sampel, yaitu serum, plasma heparin, dan plasma EDTA. Jumlah sampel tersebut diharapkan telah memenuhi syarat minimal penelitian kuantitatif analitik komparatif serta mampu memberikan hasil yang representatif dalam membandingkan kadar bilirubin total berdasarkan jenis sampel yang digunakan di laboratorium.

D. Waktu dan Tempat

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret tahun 2026.

2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Rumah Sakit Khusus Ibu dan Anak Rachmi Yogyakarta.

E. Aspek-Aspek yang Diteliti/ Diamati

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis spesimen darah berdasarkan tabung atau antikoagulan, yaitu plasma EDTA, plasma heparin, serta serum (tanpa antikoagulan).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar bilirubin total pada bayi dengan ikterus neonatus.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis spesimen darah, yaitu spesimen yang digunakan dalam pemeriksaan kadar bilirubin total berdasarkan jenis tabung atau antikoagulan. Jenis spesimen yang digunakan meliputi serum (tanpa antikoagulan), plasma EDTA, dan plasma heparin.

Skala : Nominal

Satuan : -

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar bilirubin total, yaitu konsentrasi bilirubin total yang terdapat dalam darah bayi dengan ikterus neonatus, diperoleh dari pemeriksaan laboratorium menggunakan serum atau plasma, dan dianalisis dengan metode kimia klinik (metode diazo/Jendrassik–Grof) untuk menilai tingkat peningkatan bilirubin.

Skala : Nominal

Satuan : mg/dL

G. Jenis dan Teknis Pengumpulan Data

1. Jenis Pengumpulan Data

Jenis penelitian ini menggunakan data primer yaitu data hasil pemeriksaan kadar bilirubin total yang diperoleh secara langsung dari

proses analisis laboratoirum terhadap sampel darah bayi dengan kondisi ikterus neonatus.

2. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data yang dilakukan untuk mendapatkan data primer pada penelitian ini dengan melakukan pengambilan spesimen darah vena dari bayi dengan ikterus neonatus kemudian ditampung ke dalam empat jenis tabung yang berbeda, yaitu tabung antikoagulan (kuning), EDTA (ungu), dan heparin (hijau). Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar bilirubin total menggunakan alat fotometer dengan metode diazo.

H. Instrumen dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

a. Perlengkapan sampling :

- 1) *Tourniquet*
- 2) Alkohol swab
- 3) *Sputit* 3cc
- 4) Jarum suntik (*Needle*) 23-25G
- 5) Kapas kering
- 6) Hipafix
- 7) Label identitas pasien
- 8) Sentrifuse
- 9) *Microtube* Merah, Ungu, Hijau, Biru
- 10) *Handscoon*

b. Perlengkapan Pemeriksaan Bilirubin

- 1) Yellow Tip
- 2) Blue Tip
- 3) Tabung *disposable* atau tabung reaksi
- 4) Alat Fotometer URIT-880
- 5) *Tissue*
- 6) Mikropipet (20–200 μ L dan/atau 100–1000 μ L)
- 7) *Stopwatch / timer*
- 8) Rak tabung reaksi
- 9) Kertas label dan spidol permanen
- 10) *Handscoon*

2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian ini adalah serum dan plasma yang diperoleh dari darah bayi dengan ikterus neonatus. Plasma diperoleh menggunakan tabung dengan antikoagulan EDTA dan heparin, sedangkan serum diperoleh dari darah tanpa antikoagulan. Ketiga jenis spesimen tersebut digunakan untuk pemeriksaan kadar bilirubin total sebagai bahan perbandingan dalam penelitian.

3. Reagensia Penelitian

Reagen bilirubin total yang digunakan dalam penelitian ini berupa Dirui Bilirubin Total Kit, yang terdiri dari dua larutan reagen utama: R1 sebagai larutan buffer/stabilisasi dan R2 yang mengandung komponen diazo untuk reaksi pembentukan azobilirubin.

I. Uji Validasi

Alat ukur yang digunakan pada penelitian ini adalah alat fotometer URIT 880 yang ada di laboratorium Rumah Sakit Khusus Ibu dan Anak Rachmi Yogyakarta. Uji validitas dilakukan dengan Quality Control (QC) menggunakan serum kontrol dengan metode *day to day* atau dilakukan satu kali sebelum alat digunakan untuk pemeriksaan sampel. Alat ukur dinyatakan *in control* dan valid digunakan jika hasil pengukuran berada dalam rentang kontrol yang telah ditentukan.

J. Prosedur Penelitian

1. Tahapan Persiapan Penelitian

- a. Peneliti mengajukan permohonan Etika Penelitian atau *Ethical Clearance* di Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- b. Peneliti mengajukan perizinan kepada Kepala Instalasi Laboratorium RSKIA Rachmi Yogyakarta untuk penggunaan alat fotometer URIT 880 di Laboratorium sebagai instrumen penelitian
- c. Peneliti membuat Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP) dan formulir persetujuan responden (*Informed Consent*)
- d. Peneliti menyiapkan alat, bahan dan reagen yang akan digunakan
- e. Peneliti membuat formulir pencatatan hasil

2. Tahap Pengambilan Sampel

- a. Pendataan dan Persetujuan Responden

Responden dalam penelitian ini adalah bayi dengan ikterus neonatus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Sebelum

pengambilan sampel darah, orang tua/wali bayi diberikan penjelasan mengenai tujuan dan prosedur penelitian serta diminta untuk menandatangani formulir persetujuan tertulis (*informed consent*)

b. Pengambilan sampel darah vena

- 1) Bayi diposisikan dengan aman
- 2) Pemilihan bagian vena (venipuncture) yang akan ditusuk yaitu antecubitus lengan, pilih vena yang besar dan tidak mudah bergerak.
- 3) Desinfeksi area venipuncture dengan kapas alkohol 70 % dengan gerakan memutar dari tengah ke tepi, biarkan 30 detik untuk pengeringan alkohol.
- 4) Tourniquet dipasang 7.5 – 10 cm di atas bagian venipuncture.
- 5) Jarum ditusukan ke dalam vena, posisi lubang jarum menghadap ke atas dengan sudut 15 – 30 derajat.
- 6) Tourniquet dilepaskan setelah darah mengalir (jangan biarkan tourniquet terpasang lebih 1 menit).
- 7) Darah dibiarkan mengalir sesuai dengan kebutuhan pemeriksaan yaitu sebanyak 1,5 cc.
- 8) Jarum ditarik perlahan-lahan sambil menaruh kapas dibekas tusukan
- 9) Plester dipasang pada bagian venipuncture.

- 10) Darah dimasukkan ke dalam tabung berwarna merah,ungu, biru dan hijau.
 - 11) Spesimen darah diberi label pada tabung
3. Cara pembuatan serum dan plasma
 - a. Pembuatan serum
 - 1) Tabung yang telah terisi darah dibiarkan membeku selama kurang lebih 10 menit kemudian disentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm.
 - 2) Serum dipisahkan dari bekuan darah.
 - b. Pembuatan Plasma
 - 1) Tabung ungu, hijau, dan biru yang berisi darah vena disentrifuge selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm.
 - 2) Plasma dipisahkan dari bekuan darah
 4. Tahap Pemeriksaan Bilirubin Total (DIRUI, 2023)
 - a. Prinsip Pemeriksaan

Bilirubin terkonjugasi dan tidak terkonjugasi dalam serum atau plasma yang telah disolubilisasi oleh surfaktan akan bereaksi dengan bereaksi langsung dengan *diazotized sulfanilic acid* membentuk *azobilirubin* berwarna. Intensitas warna yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 570 nm, dan sebanding dengan konsentrasi bilirubin.
 - b. Prosedur Pemeriksaan Bilirubin Total

1) Reagen kerja dibuat dengan mencampurkan reagen R1 dan R2 dengan perbandingan 50:1. Sebagai contoh, 500 μL R1 dicampurkan dengan 10 μL R2. Campuran diaduk perlahan hingga homogen sebelum digunakan.

2) Pipet Reagen dan Sampel

Sebanyak 250 μL reagen kerja dimasukkan ke dalam cuvette atau tabung reaksi, kemudian ditambahkan 25 μL serum pasien.

3) Inkubasi

Campuran reagen dan serum diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit.

4) Homogenisasi

Setelah inkubasi, larutan diaduk atau dihomogenkan hingga merata untuk memastikan warna larutan seragam sebelum pembacaan absorbansi.

5) Pembacaan Absorbansi

Larutan kemudian disedot untuk dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

6) Perhitungan Hasil :

Hasil dihitung otomatis oleh alat berdasarkan rumus :

$$\text{Total Bilirubin Total} = \frac{\text{Abs. Sampel}}{\text{Abs. Kalibrator}} \times \text{Konsentrasi Kalibrator}$$

7) Nilai normal kadar bilirubin total pada neonatus : 4,0 -12,0 mg/dL

8) Hasil pemeriksaan bilirubin total dicatat pada lembar hasil pemeriksaan.

K. Manajemen Data

1. Pengolahan Data

Data Manajemen data pada penelitian ini mencakup beberapa tahap, yaitu pengumpulan, pengolahan, dan penyajian data. Data yang diperoleh berasal dari hasil pemeriksaan kadar bilirubin total pada tiga jenis spesimen, yaitu serum, plasma EDTA, dan plasma heparin yang diambil dari bayi dengan ikterus neonatus. Seluruh data kemudian dicatat secara terstruktur dalam lembar pengumpulan data (*data collection sheet*) dan selanjutnya diolah menggunakan aplikasi pengolahan statistik. Proses analisis dilakukan dengan menyesuaikan jenis uji statistik berdasarkan distribusi data untuk menilai perbedaan kadar bilirubin total antar ketiga jenis spesimen. Hasil akhir analisis disajikan dalam bentuk tabel dan uraian naratif agar memudahkan dalam interpretasi data penelitian.

2. Analisis Statistik

a. Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data kadar bilirubin total dari masing-masing kelompok tabung berdistribusi normal. Uji yang digunakan adalah *Uji Shapiro-Wilk* (karena jumlah sampel <50).

b. Uji Friedman

Apabila hasil uji normalitas menunjukkan data tidak berdistribusi normal, maka analisis dilanjutkan menggunakan uji

Friedman untuk mengetahui perbedaan kadar bilirubin total antara sampel serum, plasma EDTA, dan plasma heparin yang berasal dari pasien yang sama. Uji ini digunakan sebagai alternatif nonparametrik dari uji *One Way ANOVA Repeated Measures* karena terdapat lebih dari dua kelompok sampel berpasangan. Analisis statistik dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Jika nilai p (p -value) $< 0,05$, maka H_0 ditolak dan terdapat perbedaan yang bermakna, sedangkan jika nilai p (p -value) $\geq 0,05$, maka H_0 diterima dan tidak terdapat perbedaan yang bermakna.

L. Etika Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan memperhatikan prinsip-prinsip etika penelitian. Persetujuan etik (*ethical clearance*) diperoleh dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta. Berdasarkan persetujuan Komite Etik Nomor DP.04.03/e-KEPK.1/490/2026, Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta menyatakan bahwa penelitian ini memenuhi Standar 7 WHO sehingga memiliki kelayakan etik pada tanggal 16 Maret 2026.

Peneliti melakukan pendekatan kepada responden dengan memberikan naskah Penjelasan Sebelum Persetujuan (PSP) dan meminta persetujuan responden (*Informed Consent*) untuk berpartisipasi dalam penelitian ini. Kerahasiaan identitas dan data responden dijaga sepenuhnya dan hanya digunakan untuk kepentingan penelitian, serta seluruh prosedur

pengambilan dan pemeriksaan sampel dilakukan sesuai dengan standar operasional yang berlaku.