

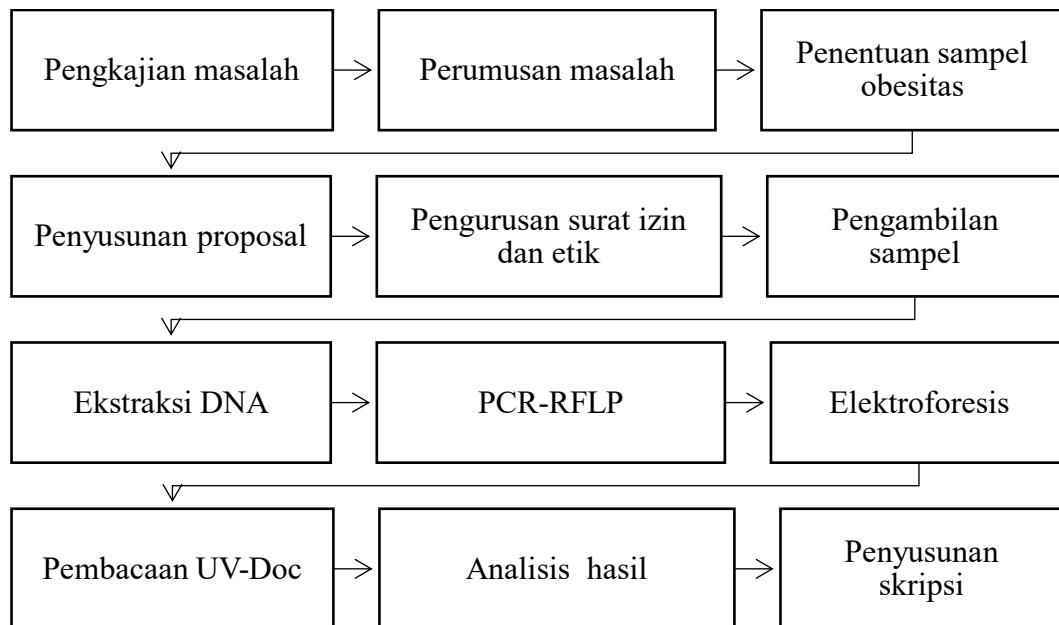
## BAB IV METODE PENELITIAN

### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu deskriptif kuantitatif. Pendekatan ini merupakan suatu bentuk analisis yang berfokus pada perkembangan sesuatu yang diteliti (Alfatih, 2022). Penelitian ini digunakan untuk mengetahui gambaran polimorfisme gen *APOC3* pada kasus obesitas menggunakan PCR-RFLP yang memungkinkan deteksi spesifik polimorfisme melalui pemotongan DNA pada situs pengenalan enzim restriksi AluI.

### B. Alur Penelitian

Berikut merupakan alur penelitian pada penelitian ini :



**Gambar 5 Bagan Alur Penelitian**

## **C. Tempat dan Waktu Penelitian**

### **1. Tempat penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar yang beralamat di Jl. Pulau Moyo No. 33, Pedungan, Denpasar Selatan. Sementara itu, proses pengambilan sampel dilaksanakan di UPTD Puskesmas II Denpasar Utara, yang berlokasi di Jl. Gunung Agung Gang II No. 8x, Pemecutan Kaja, Denpasar Utara.

### **2. Waktu penelitian**

Penelitian ini berlangsung dari bulan September 2024 hingga Mei 2025, mencakup seluruh tahapan mulai dari penyusunan proposal hingga penyelesaian skripsi.

## **D. Populasi dan Sampel**

### **1. Unit analisis**

Unit analisis dalam penelitian ini adalah gen *APOC3* pada kasus obesitas yang berkunjung ke UPTD Puskesmas II Denpasar Utara.

### **2. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini terdiri dari individu dengan indeks massa tubuh (IMT)  $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  (obesitas I dan obesitas II) yang terdaftar di UPTD Puskesmas II Denpasar Utara. Berdasarkan hasil studi pendahuluan pada bulan September 2024, tercatat sebanyak 372 individu dalam kategori tersebut.

### **3. Sampel**

Sampel merupakan bagian dari populasi yang memiliki karakteristik tertentu sesuai dengan kriteria penelitian (Sugiyono, 2019). Dalam penelitian ini, jumlah sampel yang digunakan adalah 15 sampel darah EDTA dari individu yang memiliki IMT  $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  (obesitas I dan obesitas II).

#### 4. Besar sampel

Besar sampel dalam penelitian ini adalah 15 sampel obesitas yang memiliki  $IMT \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  (obesitas I dan obesitas II). Penentuan besar sampel disesuaikan dengan jumlah reagen, biaya dari penelitian, dan mengikuti acuan jurnal penelitian terdahulu mengenai polimorfisme gen (Angria & Susanti, 2024).

##### a. Kriteria inklusi

- 1) Individu yang memiliki  $IMT \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ .
- 2) Individu yang bersedia menjadi responden dengan menandatangani *informed consent*.

##### b. Kriteria eksklusi

- 1) Individu yang tidak bersedia menjadi subjek penelitian
- 2) Individu yang membatalkan menjadi subjek penelitian

#### 5. Teknik pengambilan sampel

Dalam penelitian ini, teknik yang digunakan adalah *nonprobability sampling* yaitu *purposive sampling*. Teknik ini dilakukan dengan menentukan sampel berdasarkan pertimbangan tertentu, seperti pemenuhan kriteria sampel yang telah ditetapkan (Syapitri dkk., 2021).

##### a. Alat dan bahan

Adapun alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *thermal cycler* (Biometra GmbH), mikropipet (Socorex), *UV-documentation* (Analytik Jena AG), elektroforator (Biometra GmbH), cetakan agarose dan sisir (Biometra GmbH), vortex (Gemmy Industrial Corp), spindown (Hermle), *incubator* (Esco Isotherm), microcentrifuge (Hanil Scientific Inc), *refrigerator* (Haier Biomedical), *freezer* (LG), *laminar air flow* (Analytik Jena AG), Erlenmeyer (Schott), *beaker glass* (Pyrex), gelas ukur (Pyrex),

neraca analitik (*Radwag*), spatula, *hotplate* (*Jisico*), *magnetic stirrer*, rak tabung, tempat limbah padat, dan limbah cair.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel darah EDTA, *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (*Promega*), reagen PCR *master mix* (*Ampliqon* IIII), TAE *buffer* (*Thermo Scientific*), enzim restriksi *AluI* (*Thermo Scientific*), primer *forward APOC3* 5'- CTC ATC ATA ACC TGA AGA ACA TGG A -3' (*Integrated DNA Technologies*), primer *reverse APOC3* 5'- GAA GCA CTC ACG GGC TTG AA -3' (*Integrated DNA Technologies*), *microtube* (*Genfollower*), PCR *tube* (*Biologix*), *yellow tip* (*Biologix*), *blue tip* (*Biologix*), *white tip* (*Biologix*), *isopropanol* (*Emsure*), *ethanol* 70% (*OneMed*), *Nuclease Free Water* (*Invitrogen*), *loading dye* (*Qiagen*), *DNA ladder* 100 bp (*Geneaid*), *staining gel agarose* (*1st BASE*), bubuk *agarose* (*Cleaver Scientific*), *aquadest* (*WaterOne*), tisu dan *shield/parafilm* (*Bemis*).

## b. Prosedur kerja

### 1) Pre-analitik

#### a) Desain Primer

##### (1) Pencarian sekuens gen pada NCBI

(a) Buka situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

(b) Ubah opsi pencarian dari "*All databeses*" menjadi "*gene*", lalu ketik nama gen target *APOC3* dan tekan enter.

(c) Pilih hasil yang sesuai dengan spesies yang diinginkan yaitu *Homo sapiens*.

(d) Cari bagian *FASTA sequence* dan salin urutan nukleotida (ATGC) (NCBI, 2024).

##### (2) Analisis *restriction site* dengan website benchling

(a) Buka benchling, klik *create project* untuk membuat proyek baru.

- (b) Pilih *new DNA/RNA sequence* dan tempelkan urutan FASTA yang telah disalin sebelumnya.
- (c) Buka bagian *settings* dan aktifkan opsi *cut sites* untuk melihat lokasi pemotongan enzim restriksi, kemudian identifikasi lokasi pemotongan enzim AluI (AG↓CT) pada urutan nukleotida.
- (3) Desain primer dengan aplikasi *primer express* 3.0.1
  - (a) Buka aplikasi *primer express*, tempelkan urutan DNA gen *APOC3* dari benchling
  - (b) Tentukan lokasi primer yang akan mengagipit daerah yang mengandung situs pemotongan AluI.
  - (c) Pastikan panjang primer sekitar 18-25 bp, dengan *GC content* 40-60%, dan suhu *annealing* (TA) optimal 50-60°C.
  - (d) Simpan file primer forward dan reverse yang telah didesain.
- (4) Verifikasi primer
  - (a) Buka situs NCBI *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).
  - (b) Pilih Primer-BLAST untuk mengevaluasi spesifisitas pasangan primer.
  - (c) Tempelkan urutan *primer forward* dan *primer reverse* yang telah didesain dan pada kolom yang tersedia.
  - (d) Pilih *RefSeq Representative Genomes* untuk memastikan hasil spesifik pada database referensi.
  - (e) Ketik dan pilih *Homo sapiens* agar pencarian terbatas pada genom manusia.
  - (f) Klik BLAST dan tunggu hasil analisis primer.
  - (g) Hasil akan menunjukkan apakah primer hanya menargetkan satu lokasi pada genom manusia atau lebih. Pastikan hanya ada satu produk amplifikasi utama dengan ukuran sesuai target dengan idealnya hanya ada 1 produk pada *template target*.

(h) Jika ada lebih dari satu produk, primer mungkin tidak spesifik dan harus didesain ulang.

(i) Setelah desain primer dikonfirmasi, *primer forward dan reverse* dapat dipesan ke vendor penyedia sintesis oligonukleotida.

b) Pengambilan sampel

(1) Lakukan identifikasi pasien seperti nama, usia, jenis kelamin, berat badan dan tinggi badan.

(2) Hitung IMT pasien, jika masuk ke dalam kategori obesitas maka dilanjutkan dengan proses pengambilan sampel darah.

(3) Siapkan alat bahan seperti jarum vacum, holder, *turniquet*, tabung darah EDTA, *alcohol swab*, kapas kering dan plesterin.

(4) Lakukan palpasi pada vena mediana cubiti dengan memasang *turniquet* pada lengan pasien.

(5) Desinfeksi lokasi pengambilan darah dengan *alcohol swab*.

(6) Masukkan jarum sesuai dengan arah vena dan darah ditampung pada tabung darah EDTA.

(7) Setelah volume darah sudah cukup, lepaskan tabung dari holder.

(8) Beri label identitas pasien pada tabung darah EDTA.

(9) Simpan tabung EDTA dengan suhu dan tempat yang sesuai.

(10) Lepas *turniquet* pada lengan pasien dan keluarkan jarum dengan menutup ujung jarum menggunakan kapas kering.

(11) Lokasi pengambilan darah pasien ditutup dengan plesterin (Mojopanggung, 2017).

c) Persiapan *master mix* PCR

- (1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).
- (2) *Vortex* dan *centrifuge* *Taq 2x Master Mix* setelah dicairkan.
- (3) Pastikan komponen reagen PCR mix mencair semua, kemudian pipet komponen reagen PCR mix ke dalam *microtube* 1,5 mL kecuali *template* DNA.
- (4) Total reaksi yang dibuat adalah 1 reaksi untuk 1 sampel. Jadi volume total reagen yang dibuat yakni 25  $\mu\text{L}$  untuk 1 reaksi, dengan ketentuan untuk menambahkan komponen sebagai berikut :

**Tabel 4**  
**Komponen *Master Mix* PCR**

| <i>Component</i>                          | <b>Volume<br/>(1X Reaksi)</b>      | <i>Final<br/>Concentration</i> |
|-------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Taq 2x Master Mix</i>                  | 12,5 $\mu\text{L}$                 | 0,5 x                          |
| <i>Forward Primer</i> (10 $\mu\text{M}$ ) | 0,5 $\mu\text{L}$                  | 100 nM                         |
| <i>Reverse Primer</i> (10 $\mu\text{M}$ ) | 0,5 $\mu\text{L}$                  | 100 nM                         |
| <i>Template</i> DNA                       | 4 $\mu\text{L}$                    | -                              |
| PCR-grade H <sub>2</sub> O                | 7,5 $\mu\text{L}$                  | -                              |
| <b>Total Volume</b>                       | <b>25 <math>\mu\text{L}</math></b> |                                |

(Sumber:Ampliqon IIII, 2021)

- (5) Beri label kode sampel pada bagian tutup tabung PCR.
- (6) Selanjutnya *spindown* agar reagen atau cairan yang ada di dinding tabung PCR turun ke dasar tabung.
- (7) Masukkan *template* DNA yang sesuai label kode sampel sebanyak 4  $\mu\text{L}$  pada tabung PCR.
- (8) Homogenkan, kemudian ditutup rapat untuk dilakukan *spindown* kembali.
- (9) Reagen mix PCR siap di *running* untuk pada alat *Thermal cycler*.

d) Pengenceran *buffer* TAE (50X) menjadi (1X)

- (1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk membuat *buffer* TAE (1X) sebanyak 1000 ml.
- (2) Tuangkan 20 ml larutan TAE dengan konsentrasi 50X pada gelas ukur 1000 ml.
- (3) Tambahkan 980 ml *aquadest* atau sampai tanda batas 1000 ml.
- (4) Kemudian tuang ke dalam erlenmeyer dan homogenkan dengan manual.
- (5) Tutup Erlenmeyer menggunakan *aluminium foil* dan beri label nama beserta tanggal pembuatannya
- (6) Larutan *buffer* TAE 1000 ml dengan konsentrasi 1X siap digunakan (Dwi Wahyuni, 2017).

e) Pembuatan gel *agarose* 1,5 %

- (1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
- (2) Timbang bubuk *agarose* hingga 2,25 gram, masukkan ke dalam labu erlenmeyer.
- (3) Tambahkan 150 ml larutan *buffer* TAE pada labu erlenmeyer.
- (4) Letakkan labu erlenmeyer di atas *hotplate*, kemudian nyalakan *hotplate* dengan menekan tombol ON.
- (5) Letakkan *magnetic stirrer* ke dalam labu erlenmeyer, lalu atur suhu dan kecepatan sesuai yang diinginkan.
- (6) Tunggu hingga larutan benar-benar bening.
- (7) Setelah larutan bening, matikan *hotplate* dengan menekan tombol OFF dan pindahkan labu erlenmeyer ke atas meja, tunggu hingga larutan tidak terlalu panas.
- (8) Masukkan 4 µl pewarna *gel red*, kemudian homogenkan
- (9) Tuang larutan *agarose* ke dalam cetakan, kemudian letakkan sisir sesuai tempatnya
- (10) Tunggu larutan hingga mengeras.

- (11) Setelah larutan *agarose* mengeras menjadi gel, lepaskan sisir pada gel *agarose*.
- (12) Letakkan gel *agarose* pada *elektroforator*.
- (13) Gel *agarose* 1,5% siap digunakan (Rumbiwati & Trimuratno, 2021).

## **2) Analitik**

### **a) Ekstraksi DNA**

- (1) Proses lisis sel darah merah
  - (a) Tambahkan 900uL *Cell Lysis Solution* ke tabung *mikrocentrifuge* 1.5 mL.
  - (b) Tambahkan 300 uL *whole blood* EDTA.
  - (c) Inkubasi campuran pada suhu ruang selama 10 menit, bolak-balik tabung 2-3x selama inkubasi.
  - (d) Sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 – 16.000 x g selama 20 detik (suhu ruang).
  - (e) Buang supernatan tanpa mengganggu *pellet* putih yang terlihat. Tinggalkan residu cairan sekitar 10 – 20 uL.

### **(2) Proses lisis *nukleic***

- (a) Resuspensi *pellet* putih dengan vortex selama 10-15 detik hingga homogen.
- (b) Tambahkan 300 uL *Nucleic Lysis Solution* dan pipet 5-6x untuk melisiskan *nucleic*.
- (c) Jika larutan sangat kental atau ada gumpalan, inkubasi pada 37°C agar homogen.

### **(3) Penghilangan RNA**

- (a) Tambahkan 1,5 µL *RNase Solution* ke larutan inti, lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.

### **(4) Proses presipitasi protein**

- (a) Tambahkan 100 uL *Protein Precipitation* ke larutan *nucleic*, vortex selama 10-20 detik.

- (b) Sentrifugasi 13.000 – 16.000 x g selama 3 menit (suhu ruang), *pellet* protein berwarna coklat gelap seharusnya terlihat.
- (5) Proses presipitasi DNA
  - (a) Transfer supernatan (tanpa protein pelet) ke tabung mikro baru yang berisi 300 uL isopropanol, bolak-balik tabung secara perlahan hingga DNA membentuk massa putih berbentuk benang.
  - (b) Sentrifugasi 13.000 – 16.000 x g selama 1 menit, DNA akan terlihat seperti pelet putih kecil di dasar tabung.
- (6) Proses pencucian DNA
  - (a) Buang supernatan, tambahkan 300 uL etanol 70% (suhu ruang) untuk mencuci DNA. Bolak-balik mikrotube beberapa kali dengan perlahan.
  - (b) Sentrifus 13.000 – 16.000 x g selama 1 menit.
  - (c) Buang etanol dengan hati-hati menggunakan mikropipet, pastikan pelet DNA tidak terhisap.
- (7) Proses pengeringan DNA
  - (a) Keringkan pelet DNA dengan membalikkan tabung pada kertas serap bersih selama 10 – 15 menit.
- (8) Rehidrasi DNA
  - (a) Tambahkan 100 uL DNA *Rehydration Solution* ke pelet DNA.
  - (b) Inkubasi pada 65°C selama 1 jam atau biarkan semalaman pada suhu ruang atau 4°C.
  - (c) Simpan DNA yang telah direhidrasi pada suhu 2 – 8°C (Corporation, 2023).

b) PCR- RFLP

- (1) Masukkan ke dalam alat *Thermal cycler*, dengan ketentuan suhu sebagai berikut :

**Tabel 5**  
**Ketentuan *Running* PCR**

| <i>Step</i>                  | <i>Time</i> | <i>Temperature</i> | <i>Cycle</i> |
|------------------------------|-------------|--------------------|--------------|
| <i>Polymerase Activation</i> | 5 menit     | 95°C               | 1X           |
| <i>Denaturasi</i>            | 45 detik    | 95°C               |              |
| <i>Anneling</i>              | 45 detik    | 57°C               | 35X          |
| <i>Extension</i>             | 60 detik    | 72°C               |              |
| <i>Final Extention</i>       | 5 menit     | 72°C               | 1X           |

(Sumber :Ampliqon IIII, 2021)

- (2) Tunggu hingga selesai *running*.
- (3) Simpan hasil PCR pada suhu 4°C bila tidak langsung diproses.
- (4) Campurkan hasil amplifikasi PCR sebanyak 9 µL dengan enzim restriksi AluI sebanyak 1 µL dan buffer enzim sebanyak 2 µL.
- (5) Tambahkan 18 µL *Nuclease Free Water* (NFW) dan homogenkan.
- (6) Selanjutnya *spindown* agar reagen atau cairan yang ada di dinding tabung turun ke dasar tabung.
- (7) Inkubasi dengan suhu 37°C selama 1-16 jam (Thermo Fisher Scientific, 2021).
- (8) Analisis hasil dengan elektroforesis.

c) Elektroforesis

- (1) gel agarose pada *elektroforator* lalu tambahkan *buffer* TAE ke dalam alat elektroforesis hingga menutupi gel *agarose*.
- (2) Siapkan shield untuk tempat menghomogenkan sample dengan *loading dye*
- (3) Ambil sampel ekstraksi DNA dengan mikropipet sebanyak 6 µL kemudian letakkan pada *shield*

- (4) Ambil kembali *loading dye* sebanyak 2  $\mu$ L dan campurkan ke dalam sampel ekstraksi DNA
  - (5) Homogenkan sampel dengan *loading dye* beberapa kali dengan menyedot dan mengeluarkan sampel berulang.
  - (6) Sedot sampel yang sudah dihomogenkan dengan mikropipet sebanyak 8  $\mu$ L.
  - (7) Kemudian masukan kedalam sumuran gel *agarose*.
  - (8) Lakukan prosedur tersebut berulang pada sampel lainnya.
  - (9) Programkan alat elektroforesis 200 A, 77 W, dan 60 menit
  - (10) Tunggu selama 60 menit untuk proses elektroforesis
  - (11) Setelah 60 menit dan alat sudah berhenti beroperasi hasil dapat di baca di dalam UV-Doc (Wahyuni, 2019).
- d) Pembacaan hasil di UV *Documentation*
- (1) Sambungkan kabel alat UV *Documentation* pada stop kontak.
  - (2) Nyalakan alat dengan menekan tombol ON.
  - (3) Nyalakan lampu pada alat.
  - (4) Buka pintu alat UV *Documentation*.
  - (5) Letakkan gel *agarose* yang telah ditiriskan pada bagian dalam alat, kemudian tutup kembali.
  - (6) Matikan lampu pada alat dan nyalakan UV.
  - (7) Setelah UV *Transluminator* dinyalakan, pita DNA akan berpendar.
  - (8) Hasil dari proses elektroforesis tersebut dapat dilihat pada layar monitor yang terhubung dengan UV *Transluminator*.
  - (9) Matikan lampu UV, kemudian hidupkan lampu untuk mengidentifikasi gel *agarose*.

- (10) Setelah melakukan proses pengamatan dan dokumentasi, matikan kembali lampu alat.
- (11) Buka pintu alat UV *Documentation*, lalu keluarkan gel *agarose*.
- (12) Lakukan desinfeksi pada bagian dalam alat menggunakan alkohol.
- (13) Tutup kembali pintu alat UV *Documentation*.
- (14) Matikan alat dengan menekan tombol OFF lalu cabut kabel alat UV *Documentation* dari stop kontak (Maharani & Sumsanto, 2024).

### **3) Pasca analitik**

- (1) Amati hasil yang didapat dan dokumentasikan.
- (2) Melakukan pencucian alat yang digunakan.
- (3) Menyimpan alat dan bahan di tempat semula.
- (4) Melakukan analisis potongan pita DNA yang terlihat.
- (5) Melakukan pengolahan limbah medis dan non medis.

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

### **1. Jenis data yang dikumpulkan**

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini yaitu data primer dan data sekunder. Data primer adalah sumber data yang langsung diberikan oleh narasumber kepada peneliti dengan tujuan tertentu (Sugiyono, 2019). Data primer dalam penelitian ini adalah hasil pemeriksaan di laboratorium dan hasil wawancara pasien di UPTD Puskesmas II Denpasar Utara. Sedangkan, data sekunder dalam penelitian ini adalah studi penelitian terdahulu dari jurnal, buku, atau literatur yang sudah dipublikasikan, data rekam medis pasien obesitas, dan studi pendahuluan yang dilakukan di UPTD Puskesmas II Denpasar Utara.

## **2. Teknik pengumpulan data**

Pengumpulan data pada penelitian ini dilakukan dengan cara wawancara terstruktur menggunakan kuisioner dan observasi. Wawancara bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai data responden obesitas. Sedangkan, observasi dilakukan untuk mendapatkan data tentang polimorfisme gen *APOC3* pada sampel penelitian. Peneliti akan melakukan pengambilan darah vena pada responden menggunakan tabung EDTA sebanyak 3 cc yang kemudian dilakukan pemeriksaan di laboratorium.

## **3. Instrumen pengumpulan data**

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini untuk mengumpulkan data meliputi:

- a. Formulir *informed consent*, untuk memperoleh persetujuan tertulis dari peserta penelitian.
- b. Formulir kuesioner, untuk mengumpulkan informasi dari peserta penelitian guna mendukung proses penelitian yang dilakukan.
- c. Alat tulis, untuk mencatat dan menulis saat melakukan pengumpulan data.
- d. *Handphone*, untuk mengambil dokumentasi dari kegiatan penelitian yang dilakukan.

## **F. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Pengolahan data**

Hasil data ada dan tidaknya pita DNA diperoleh melalui eksperimen laboratorium polimorfisme gen *APOC3* pada kasus obesitas menggunakan metode PCR-RFLP dengan enzim restriksi AluI, kemudian diolah menggunakan teknik *tabulating data*.

### **2. Analisis data**

Pada penelitian ini, data dianalisis menggunakan analisis deskriptif untuk menggambarkan karakteristik data yang dikumpulkan dari subjek penelitian dan melihat

polimorfisme yang didapat dari hasil pemotongan pita DNA gen *APOC3* yang dilakukan di laboratorium.

## **G. Etika Penelitian**

Etika penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu (Masturoh & T, 2018) :

### **1. Menghormati atau menghargai subjek (*respect for person*)**

- a. Peneliti mempertimbangkan kemungkinan risiko dan penyalahgunaan penelitian.
- b. Subjek penelitian yang rentan terhadap dampak negatif penelitian harus diberikan perlindungan yang memadai.

### **2. Manfaat (*beneficence*)**

Diharapkan bahwa penelitian akan meminimalkan risiko atau kerugian bagi partisipan penelitian sekaligus menghasilkan manfaat yang dapat dicapai. Oleh karena itu, keselamatan dan kesejahteraan partisipan penelitian harus dipertimbangkan dalam penelitian.

### **3. Tidak membahayakan subjek penelitian (*non-maleficence*)**

Penelitian harus dirancang sedemikian rupa agar dapat mengurangi risiko atau potensi kerugian bagi partisipan, sekaligus memberikan manfaat yang optimal. Oleh karena itu, aspek keamanan dan kesejahteraan partisipan harus menjadi prioritas utama guna mencegah terjadinya dampak negatif yang dapat merugikan subjek penelitian.

### **4. Keadilan (*justice*)**

Keadilan dalam penelitian bukan berarti membedakan subjek, melainkan memastikan keseimbangan antara manfaat dan risiko yang ditimbulkan. Risiko yang ada harus proporsional dengan standar kesehatan, yang mencakup aspek sosial, mental, dan fisik.

## **5. Kerahasiaan (*confideality*)**

Dengan tidak menyertakan identitas responden dalam kuesioner dan menyimpan data agar tidak ada orang lain yang dapat mengaksesnya, peneliti akan memastikan bahwa informasi yang dikumpulkan dari responden tetap terjaga kerahasiaannya. Informasi yang dikumpulkan oleh peneliti digunakan secara eksklusif untuk penelitian dan tidak pernah dibagikan kepada pihak luar.

## **6. Lembar persetujuan (*obtaining informed concent*)**

Persetujuan partisipan untuk mengikuti penelitian diberikan setelah mereka menerima penjelasan dari peneliti. Proses penyampaian informasi ini bertujuan untuk mengkomunikasikan konsep dan tujuan penelitian kepada responden secara jelas.