

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif yaitu penelitian yang dilakukan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan suatu fenomena yang terjadi dalam masyarakat (Notoatmodjo, 2012).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel dilakukan pada darah dengan HBsAg positif dan HBsAg negatif di Rumah Sakit Umum Daerah Wangaya, Kecamatan Denpasar Utara, Kota Denpasar. Pemeriksaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Biomol, Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Februari sampai April 2019.

C. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel penelitian dan unit analisis pada penelitian ini adalah sampel darah HBsAg negatif yang digunakan sebagai kontrol serta sampel darah pasien HBsAg positif sebesar 10 sampel dari pasien di Rumah Sakit Umum Daerah Wangaya, Kecamatan Denpasar Utara, Kota Denpasar. Sampel plasma yang didapat kemudian dilakukan isolasi DNA untuk mendapatkan DNA template yang akan digunakan pada proses PCR.

D. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer meliputi data mengenai hasil pemeriksaan laboratorium sampel darah yang diuji dengan menggunakan metode PCR dengan melihat hasil positif dan negatif melalui pita DNA yang dihasilkan dengan menggunakan primer yang telah ditentukan.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara pemeriksaan laboratorium melalui teknik PCR serta melihat pita DNA yang terbentuk pada hasil pemeriksaan sampel darah dengan primer yang telah ditentukan.

3. Instrumen pengumpulan data

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data diantaranya :

- a. Kamera handphone untuk dokumentasi.
- b. Alat untuk pemeriksaan laboratorium
- c. Alat tulis seperti buku, pulpen, pensil.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya tabung merah (clot-activator) (30 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), gelas kimia (Duran) 500 mL (3 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 500 mL (1 buah), Erlenmeyer (Iwaki-Pyrex®) 250 mL (5 buah), *hotplate stirrer* (Jisico) (1 buah), pipet ukur steril (Iwaki-Pyrex®) 10 mL (1 buah), oven (Wegnac) (1 buah), kompor (Maspion S300), *Biosafety Cabinet* (Biobase), mikropipet (Socorex) 2-20 µl dan 100-1000 µl (1

buah), pinset (1 buah), inkubator (Esco) (1 buah), *ball pipet* (d & n ball pipet) (1 buah), mikro tube (Axygen) (10 buah), PCR (Biometra) (1 buah), alat elektroforesis (Biometra) (1 buah), alat UV Solo (Sientra) (1 buah).

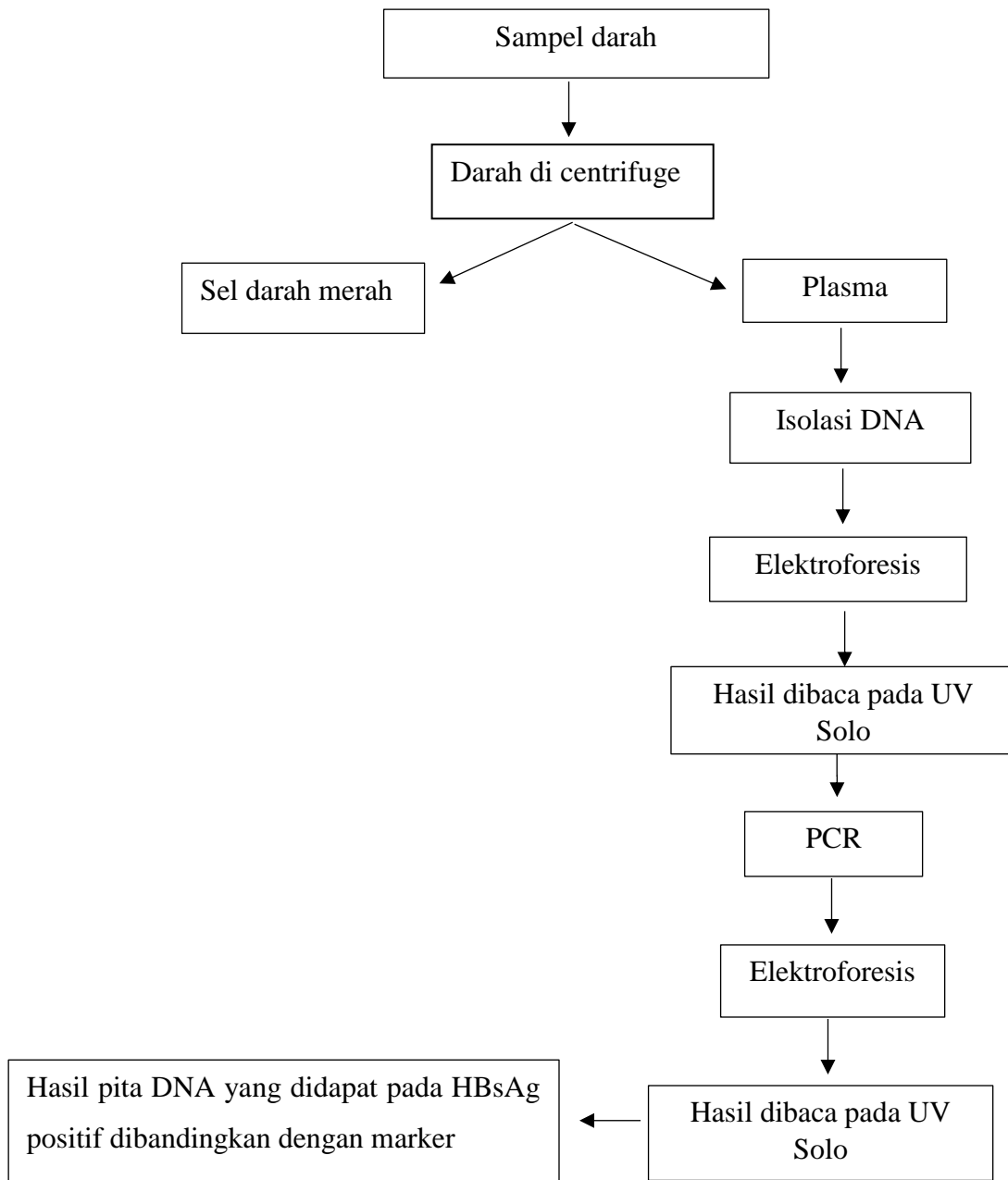
2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah sampel serum darah HBsAg positif (10 sampel), media agarose (Affymetrix) (2 gram), blue tip dan yellow tip (10 buah), buffer TAE (Ambient), *Dneasy Blood & Tissue Kit* (50) (Qiagen), PBS (Gibco), primer *foward* (primer 251f) dan primer *reverse* (primer 1190r), marker (Biometra), proteinase K (Biometra), *loading dye* (Biometra), *Staining gel* (Biometra), ddH₂O (1000 mL).

F. Skema Kerja dan Prosedur Kerja

Berdasarkan panduan penuntun praktikum virologi yang disusun oleh tim dosen praktikum virologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Denpasar yang telah disesuaikan oleh peneliti :

1. Skema kerja



Gambar 4. Skema Kerja Penelitian

2. Prosedur kerja

a. Tahap persiapan sampel

- 1) Dipersiapkan alat dan bahan yang akan digunakan dalam pengambilan sampel
- 2) Diambil sampel darah dan ditampung dalam tabung berwarna merah

- 3) Setelah darah ditampung, darah dicentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit
- 4) Kemudian dipisahkan antara plasma dan sel darah yang terdapat pada tabung
- 5) Kemudian sampel plasma darah ditampung dalam mikro tube dan diberi label

b. Tahap isolasi DNA

- 1) Disiapkan mikrotube 1,5 mL
- 2) Ditambahkan 20 μ l proteinase K
- 3) Ditambahkan 100 μ l sampel
- 4) Ditambahkan 100 μ l PBS
- 5) Ditambahkan 200 μ l buffer AL
- 6) Diinkubasi pada suhu 57⁰C selama 15 menit
- 7) Ditambahkan etanol 100% dan divortex selama 15-30 detik
- 8) Dimasukkan kedalam *mini coloum spin* dan dicentrifuge selama 1 menit dalam 8000 rpm
- 9) Filter pada mini coloum spin dipindahkan kedalam tabung baru
- 10) Ditambahkan 500 μ l buffer AW1
- 11) Dicentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit
- 12) Ditambahkan 500 μ l buffer AW2 dan dicentrifuge dengan kecepatan 800 rpm selama 1 menit
- 13) Hasil centrifuge diambil filternya dan diletakkan pada mikrotube dengan ukuran 1,5 mL
- 14) Ditambahkan 200 μ l buffer AE, kemudian diinkubasi selama 1 menit dan dicentrifuge dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit

15) Kemudian cairan dapat disimpan dalam suhu -20°C , sebelum dilakukan proses PCR hasil isolasi DNA dielektroforesis terlebih dahulu

c. Proses pemasukan sampel pada alat elektroforesis

1) Dipipet $5\mu\text{l}$ marker (100bp) dan $2\mu\text{l}$ gel stain dihomogenkan dan dimasukkan kedalam sumuran gel agarosa 1%

2) Dipipet $3\mu\text{l}$ loading dye, $2\mu\text{l}$ gel stain dan dipipet $5\mu\text{l}$ DNA sampel lalu keduanya dicampur dan dihomogenkan

3) Dimasukkan sampel ke dalam sumuran

4) Sampel siap di running pada alat elektroforesis

5) Proses running pada alat elektroforesis

6) Ditekan tombol ON pada alat elektroforesis

7) Ditekan tombol mode lalu di setting : MA: 250, voltage: 100, waktu: 45 menit

8) Ditekan tombol start

9) Proses pembacaan hasil elektroforesis

10) Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan tahap pembacaan pada *gel doc*

11) Ditekan tombol on pada *gel doc*, lalu masukkan hasil elektroforesis dan tekan tombol UV dan diambil gambar fragmen DNA yang sudah di elektroforesis

12) Lalu setelah itu dibaca hasilnya

d. Tahap pemeriksaan sampel dengan PCR

1) Prosedur reaksi mix PCR

a) Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan

b) Ditambahkan $40\mu\text{l}$ mix PCR ke dalam tabung eppendorf

c) Ditambahkan primer 251F sebanyak $10\mu\text{l}$ ke dalam tabung eppendorf

d) Ditambahkan primer 1190R sebanyak $10\mu\text{l}$ ke dalam tabung eppendorf

- e) Ditambahkan ddH₂O sebanyak 90µl ke dalam tabung eppendorf
- f) Di *thawing* beberapa detik dengan menggunakan *spin down*
- g) Disiapkan 10 tabung eppendorf yang baru dan dipindahkan masing-masing 15 µl hasil reagen yang telah di spin tadi
- h) Dimasukkan DNA template sebanyak 5µl pada masing masing eppendorf tadi
- i) Dihomogenkan lalu dispin lagi beberapa detik
- j) Sampel siap di running pada alat PCR
- k) Disiapkan sampel yang akan di running
- l) Nyalakan mesin PCR dengan menghubungkan ke stop kontak lalu tekan tombol ON
- m)Dimasukkan sampel ke dalam alat PCR
- n) Disetting program PCR pastikan program yang ada sesuai dengan user. Setelah memastikan usernya sesuai lalu tekan program PCR 1
- o) Lalu, setelah muncul tampilan dari program PCR 1 klik menu edit
- p) Di dalam menu edit ini ada 6 step tahapan proses PCR, masing masing step di edit suhu maupun waktunya. Berikut ini tahapan editannya :
- q) Pre denaturasi : suhu 95⁰C waktu 15 menit
- r) Denaturasi : suhu 95⁰C waktu 1 menit
- s) Annealing : suhu 54⁰C waktu 1 menit
- t) Elongasi : suhu 72⁰C waktu 2 menit
- u) Post elongasi : suhu 72⁰C waktu 7 menit
- v) Cycle : 30 siklus
- w)Setelah proses setting selesai, ditekan tombol done lalu tekan menu save.
Setelah itu akan muncul tampilan dari program PCR yang sudah disetting tadi,

pastikan ulang bahwa hasil settingan sudah sesuai dengan petunjuk, setelah semua sesuai lalu tekan tombol start

- x) Proses selesainya hasil PCR akan terlihat pada tampilan waktu END.
 - y) Setelah proses PCR selesai, dilanjutkan dengan proses elektroforesis dan proses pembacaan pada *gel doc*.
- e. Pembuatan gel agarosa 1%
- 1) Ditimbang gel agarosa sebanyak 1,5 gram
 - 2) Larutkan gel dalam 150 ml TAE dan panaskan sampai mendidih
 - 3) Dihomogenkan dan masukkan gel pada sumuran yang sudah berisi sisiran khusus pada alat elektroforesis
 - 4) Didiamkan sampai dingin dan memadat
 - 5) Setelah memadat, diangkat sisirannya, lalu pindahkan ke alat elektroforesis
 - 6) Ditambahkan TAE sampai menutupi gel
 - 7) Proses pemasukan sampel pada alat elektroforesis
 - 8) Dipipet 5 μ l marker (100bp) dan 2 μ l gel stain dihomogenkan dan dimasukkan kedalam sumuran gel agarosa 1%
 - 9) Dipipet 3 μ l loading dye, 2 μ l gel stain dan dipipet 5 μ l DNA sampel lalu dicampur dan dihomogenkan
 - 10) Dimasukkan sampel ke dalam sumuran
 - 11) Sampel siap di running pada alat elektroforesis
 - 12) Proses running pada alat elektroforesis
 - 13) Ditekan tombol ON pada alat elektroforesis
 - 14) Ditekan tombol mode lalu di setting : MA : 250, voltage : 100, waktu : 45 menit
 - 15) Tekan tombol start

- 16) Proses pembacaan hasil elektroforesis
- 17) Setelah proses elektroforesis selesai, dilakukan tahap pembacaan pada *gel doc*
- 18) Ditekan tombol on pada *gel doc*, lalu masukkan hasil elektroforesis dan tekan tombol UV dan diambil gambar fragmen DNA yang sudah di elektroforesis
- 19) Lalu setelah itu dibaca hasilnya

G. Teknik Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data/

Data berupa gambaran hasil pita DNA dengan metode PCR, diolah serta disajikan dalam bentuk gambar dan diberi narasi.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif yaitu hasil pemeriksaan virus hepatitis B pada sampel darah dengan metode PCR yang dibandingkan dengan teori dan jurnal hasil penelitian.