

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian deskriptif (Nasir, Muhith, dan Ideputri, 2011) yaitu penelitian yang dilakukan untuk mendeskripsikan atau menggambarkan kadar serum interleukin-6 pada perokok aktif.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat dilakukannya penelitian ini yaitu di Kepolisian Daerah Bali dan pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Imunologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Adapun waktu penelitian dilakukan antara bulan Januari sampai dengan bulan Mei 2020.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh polisi perokok aktif di Kepolisian Daerah Bali dengan jenis kelamin laki – laki usia 15 – 64 tahun, dimana jumlah populasi perokok aktif tidak dapat ditentukan.

2. Sampel penelitian

a. Unit analisa dan responden

Unit analisa dalam penelitian ini adalah kadar serum interleukin-6. Responden dalam penelitian ini adalah para polisi perokok aktif di Kepolisian Daerah Bali. Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Laki – laki yang merokok rutin setiap hari berjenis rokok putih dan/atau kretek yang menggunakan filter dan/atau non filter atau campuran minimal satu batang per hari.
- 2) Laki – laki perokok usia 15 – 64 tahun.
- 3) Tidak menggunakan rokok elektrik.
- 4) Merokok lebih dari lima tahun
- 5) Tidak sedang sakit dan mengonsumsi obat – obatan.
- 6) Bersedia menjadi responden

b. Besar sampel

Terkait surat edaran Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis No. PP.02.02/034/262/2020 tentang Pelaksanaan Pembelajaran Semester Genap Selama Tanggap Darurat Covid-19/*Learning From Home* Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar, khususnya mengenai jadwal KTI dilakukan sesuai kalender akademik, himbauan dari Ketua Jurusan Teknologi Laboratorium Medis untuk mengurangi kontak dengan orang lain, keterbatasan waktu, dan biaya pemeriksaan maka sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu sebesar 11 sampel dari keseluruhan populasi polisi perokok aktif di Kepolisian Daerah Bali yang sesuai dengan kriteria dalam penelitian.

c. Teknik sampling

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan teknik *non probability sampling* dengan metode *purposive sampling*. Menurut Notoatmojo (2012), *non probability sampling* atau teknik pengambilan sampel bukan acak adalah pengambilan sampel yang tidak didasarkan atas kemungkinan yang dapat diperhitungkan, tetapi semata – mata hanya berdasarkan kepada segi kepraktisan belaka. Pengambilan sampel secara *purposive sampling* didasarkan pada suatu pertimbangan tertentu yang dibuat oleh peneliti sendiri, berdasarkan ciri – ciri atau sifat populasi yang sudah diketahui sebelumnya dan sesuai dengan kriteria yang telah ditentukan dalam penelitian.

D. Jenis, Teknik, dan Instrumen Pengumpulan Data

1. Jenis data yang dikumpulkan

a. Data primer

Data primer adalah data hasil pemeriksaan laboratorium yaitu kadar serum interleukin-6 dan karakteristik perokok aktif di Kepolisian Daerah Bali.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui wawancara dan pemeriksaan laboratorium. Peneliti datang ke Kepolisian Daerah Bali untuk bertemu dengan responden polisi perokok aktif. Peneliti akan memperkenalkan diri, memberitahukan tujuan penelitian, dan memberikan lembar permohonan responden serta *informed consent*. Jika responden bersedia menjadi sampel, peneliti akan memberikan lembar wawancara untuk diisi dengan jujur. Wawancara dilakukan untuk mengetahui nama, umur, tinggi badan, berat badan, tempat tinggal, kondisi kesehatan, konsumsi obat, jenis rokok, intensitas merokok,

dan lamanya merokok. Responden yang sesuai dengan kriteria penelitian akan dijadikan sampel. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah vena metode *close system* dengan tabung merah tanpa zat aditif langsung dilokasi tersebut jika dianggap aman bagi peneliti, responden, dan lingkungan sekitar. Jika tidak memungkinkan, maka peneliti akan mengajak responden ketempat terdekat yang lebih aman. Proses pengambilan sampel dibantu oleh seorang peneliti lain yang melakukan penelitian sejenis. Sampel yang sudah diperoleh kemudian disimpan di dalam *coolbox* dengan posisi tegak dan rapi. Peneliti akan melanjutkan proses pengambilan sampel dengan teknik yang sama. Proses kontak dengan responden dilakukan sesingkat mungkin untuk menghindari hal – hal yang tidak diinginkan akibat pandemi Covid-19. Sampel dikumpulkan kemudian di bawa ke Laboratorium Imunologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar. Pemeriksaan kadar serum interleukin-6 dilakukan dengan menggunakan ELISA.

3. Instrumen penelitian, alat, bahan, dan prosedur pemeriksaan

Instrumen yang digunakan dalam pengumpulan data, yaitu :

- a. Lembar persetujuan responden, digunakan untuk menyatakan kesediaan pasien menjadi responden.
- b. Lembar wawancara responden, digunakan untuk mengumpulkan data sesuai dengan kriteria yang diinginkan dan dicatat.
- c. Alat tulis dan alat dokumentasi.

Alat, bahan, dan prosedur kerja untuk pemeriksaan laboratorium yang terdiri dari :

- 1) Alat dan bahan yang digunakan

Alat yang digunakan untuk analisa yaitu ELISA (menggunakan *Human Interleukin 6 ELISA kit Cat.No E0090Hu* dan *Elisa reader PHO MO Autobio*). Selain itu digunakan juga alat – alat lainnya dalam penelitian ini yaitu: holder BD, jarum *Vacutainer BD Vacutainer Flasback Blood Collection*, tabung vakum dengan tutup merah kapasitas 3 ml, *tourniquet*, *cool box*, *centrifuge*, inkubator, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, dan micro plate ELISA. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : sampel serum, kapas alkohol 70%, *hipafix*, dan reagen ELISA (*Human Interleukin 6 ELISA kit Cat.No E0090*).

2) Prosedur pengambilan sampel darah

Prosedur pengambilan sampel darah dan pemeriksaan kadar serum interleukin-6 pada perokok aktif dilakukan oleh peneliti sendiri berdasarkan ijin yang telah diberikan oleh responden penelitian, ketua jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar, dan penanggungjawab laboratorium imunologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar. Dalam pemeriksaan sampel di laboratorium, peneliti didampingi oleh dosen yang berkompetensi di bidang imunologi.

Menurut Usman (2014), prosedur pengambilan darah vena dengan sistem *vacutainer* atau *syringe* pada pasien rawat jalan, sebagai berikut :

- a) Kelengkapan APD dipasang (Alat Pelindung Diri seperti jas, sarung tangan, masker, dan lainnya).
- b) Peralatan disiapkan : jarum, holder, *syringe* 3 cc dan 5 cc, kapas alkohol 70%, tali pembendung (*tourniquet*), plester, dan tabung vakum.
- c) Pasien diidentifikasi dengan benar sesuai dengan data di lembar permintaan.

- d) Jika menggunakan sistem *vacutainer*, disiapkan untuk memasang jarum pada holder, dipastikan terpasang erat.
- e) Jika menggunakan *syringe*, dipilih ukuran/volume sesuai dengan jumlah sampel yang akan diambil, dipilih ukuran jarum yang sesuai, dan dipastikan jarum terpasang dengan erat.
- f) Ditanyakan tentang keadaan pasien, misalnya puasa atau konsumsi obat. Dicatat bila pasien minum obat tertentu.
- g) Pasien diminta meluruskan lengannya, dipilih lengan yang banyak melakukan aktifitas jika tidak memungkinkan dipilih vena yang jelas terlihat.
- h) Diminta pasien mengepalkan tangan dan diberi penjelasan saat darah mulai masuk ke tabung genggamannya mulai di lepas pelan – pelan.
- i) Dipasang *tourniquet*/karet pembendungan pada lengan atas $\pm 7 - 10$ cm (4 jari) di atas vena *fossa cubiti* (pemasangan tidak boleh lebih dari 1 menit).
- j) Dilakukan disinfeksi daerah tusukan dengan alkohol swab 70% selama 30 detik dengan melingkar dimulai dari tengah ke arah luar lebih kurang 2 cm atau lebih sampai mengering sempurna, jangan menyentuh daerah yang sudah di disinfeksi terutama daerah yang akan dilakukan penusukan, bila tersentuh lakukan kembali disinfeksi.
- k) Jarum diarahkan dengan menyentuh ke vena yang sudah disinfeksi dengan sudut kurang dari 30 derajat dengan lubang jarum menghadap ke atas.
- l) Tusukan dilakukan ke sepanjang vena dengan posisi lubang jarum menghadap ke atas.
- m) Jika menggunakan sistem *vacutainer*, tabung dimasukkan ke dalam holder dan dorong sehingga jarum bagian posterior tertancap pada tabung, maka darah

akan mengalir masuk ke dalam tabung. Tunggu sampai darah berhenti mengalir. Jika memerlukan beberapa tabung, setelah tabung pertama terisi, dicabut dan diganti dengan tabung kedua, begitu seterusnya.

- n) Jika menggunakan *syringe* pembagian darah untuk dimasukkan ke dalam tabung vakum dengan cara menusuk ke karet penutup tabung biarkan sampai darah berhenti baru cabut jarum *syringe* dari tabung vakum dan dilakukan homogenisasi, untuk tabung yang tidak vakum dimasukkan dengan cara melepaskan jarum kemudian dialirkan darah lewat dinding tabung perlahan – lahan agar tidak terjadi hemolisis.
- o) Tourniquet dilepaskan.
- p) Kapas diletakkan di tempat tusukan lalu segera lepaskan/tarik jarum. Kapas ditekan beberapa saat lalu plester, jangan menarik jarum sebelum tourniquet dibuka.
- q) Dilakukan homogenisasi pada tabung dengan membolak – balikkan ke kanan dan ke kiri atau membentuk angka delapan dengan pelan 5 – 10 kali dan dilakukan pelabelan tabung sesuai identitas pasien dan tabung diletakkan dengan benar.
- r) Jangan lupa mengucapkan terima kasih atas kerjasamanya.
- s) Tempat kerja dirapikan, buang sampah sesuai kriteria sampah media untuk sisa bahan yang sudah kontak dengan pasien, sampah non medis untuk kertas, dan bahan yang tidak kontak dengan pasien dan jarum bekas dibuang ke *sharp box*.

3) Transport sampel

Spesimen ditempatkan pada kantong atau wadah *biohazard* ke laboratorium dalam waktu sesingkat mungkin. Transportasi semua spesimen dilakukan pada suhu kamar. Tabung – tabung darah ditempatkan dengan posisi vertikal. Menjaga tabung agar selalu dalam keadaan tertutup untuk mencegah kontaminasi eksogen yang mungkin terjadi dari spesimen, mencegah penguapan, dan kemungkinan tumpahan serta aerosol. Dalam melakukan penanganan spesimen harus dilakukan dengan hati – hati untuk meminimalkan kerusakan eritrosit yang mengarah ke hemolisis sampel (Bt-Laboratory, 2020).

4) Pemisahan sampel

Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar serum interleukin-6, serum dibiarkan menggumpal selama 10 – 20 menit pada suhu kamar, kemudian di centrifuge dengan kecepatan 2000 – 3000 rpm selama 20 menit. Serum dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung plastik (*aliquot*) 1 ml. Dalam penelitian ini proses pemisahan sampel dilakukan di Laboratorium Imunologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis yang memiliki jarak tidak jauh dari tempat pengambilan sampel. Pemisahan sampel dilakukan untuk menjaga agar sampel tetap stabil sampai proses pemeriksaan kadar serum interleukin-6 dilakukan. Sampel yang dapat digunakan untuk pemeriksaan kadar serum interleukin-6 harus memenuhi persyaratan seperti tidak mengalami lipemik, hemolisis, dan ikterik. Sebelum pengukuran kadar IL-6, serum disimpan dalam *freezer* -20⁰C sampai waktu pemeriksaan yang telah ditentukan (maksimum 2 bulan). Pengukuran kadar IL-6 dilakukan serentak setelah seluruh sampel serum terkumpul. Metode pemeriksaan dilakukan dengan proses satu langkah *double-antibody sandwich*

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk mengukur kadar IL-6 dalam sampel (Bt-Laboratory, 2020).

5) Pemeriksaan kadar serum interleukin-6

Pemeriksaan kadar serum interleukin-6 dilakukan dengan menggunakan alat ELISA (*Human Interleukin 6 ELISA kit Cat.No E0090Hu* dan *Elisa reader PHO MO Autobio*) yang merupakan alat pemeriksaan imunoserologi di Laboratorium Imunologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar. Prosedur pemeriksaan interleukin-6 dilakukan dengan menggunakan SOP *Bioassay Technology Laboratory – Human Interleukin 6 ELISA kit Cat.No E0090Hu*, sensitivitas 1,03 ng/L, dengan ukuran 96 well. Prinsip pemeriksaan adalah plat mikro dilapisi dengan antibodi IL-6. Interleukin-6 yang terdapat dalam sampel akan mengikat antibodi yang dilapisi pada plat mikro. Antibodi IL-6 yang terbiotinilasi (mengikat biotin secara kovalen ke protein, asam nukleat, atau molekul lainnya) ditambahkan dan berikatan dengan IL-6 dalam sampel. Kemudian Streptavidin-HRP ditambahkan dan mengikat antibodi IL-6 yang terbiotinilasi. Setelah inkubasi, Streptavidin-HRP yang tidak terikat dihilangkan selama langkah pencucian. Substrat kemudian ditambahkan dan terjadi perubahan warna secara proporsional dengan kadar IL-6. Reaksi akan diakhiri dengan penambahan *stop solution* dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut :

a) Persiapan reagen

(1) Semua reagen harus diletakkan di suhu kamar sebelum digunakan.

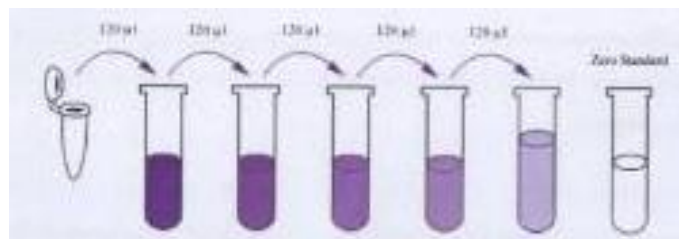
(2) Standar

Mencampurkan 120 μl larutan standar (640 ng/L) dengan 120 μl larutan pengencer standar (*diluent*) untuk menghasilkan 320 ng/L stok larutan standar. Diamkan larutan standar tersebut selama 15 menit. Siapkan duplikat standar lainnya dengan mengencerkan larutan stok standar (320 ng/L) 1:2 dengan menggunakan larutan standar untuk menghasilkan larutan 160 ng/L, 80 ng/L, 40 ng/L, dan 20 ng/L. Standar *diluent* berfungsi sebagai standar nol (0 ng/L). Larutan yang diperoleh dibekukan pada suhu -20°C dan dapat digunakan dalam waktu satu bulan. Larutan standar yang disarankan adalah sebagai berikut.

Tabel 2
Volume Larutan Standar

320 ng/L	Standar No. 5	120 μl larutan standar + 120 μl larutan pengencer standar (<i>diluent</i>)
160 ng/L	Standar No. 4	120 μl standar No.5 + 120 μl larutan pengencer standar (<i>diluent</i>)
80 ng/L	Standar No. 3	120 μl standar No.4 + 120 μl larutan pengencer standar (<i>diluent</i>)
40 ng/L	Standar No. 2	120 μl standar No.3 + 120 μl larutan pengencer standar (<i>diluent</i>)
20 ng/L	Standar No. 1	120 μl standar No.2 + 120 μl larutan pengencer standar (<i>diluent</i>)

Sumber : (Bt-Laboratory, 2020)



Gambar 2. Teknik pengenceran standar

Sumber : (Bt-Laboratory, 2020)

Tabel 3
Konsentrasi Masing – Masing Larutan Standar

Konsentrasi standar	Standar No.5	Standar No.4	Standar No.3	Standar No.2	Standar No.1
640 ng/L	320 ng/L	160 ng/L	80 ng/L	40 ng/L	20 ng/L

Sumber : (Bt-Laboratory, 2020)

(3) *Wash Buffer*

Mengencerkan 20 ml *wash buffer concentrate 25x* dengan air deionisasi atau air suling untuk menghasilkan 500 ml *wash buffer 1x*. Jika kristal atau gumpalan telah terbentuk dalam konsentrat, homogenkan dengan hati – hati sampai kritical atau gumpalan tersebut larut.

b) Prosedur pengujian

(1) Semua reagen disiapkan, larutan standar, dan sampel yang akan diperiksa.

Semua reagen diletakkan di suhu kamar sebelum digunakan. Pemeriksaan dilakukan pada suhu kamar.

(2) Ditentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pemeriksaan. Strip dimasukkan ke *frame* untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada suhu 2 – 8⁰C.

(3) Ditambahkan 50 µl larutan standar ke sumuran/well standar.

(4) Ditambahkan 40 µl sampel ke sumuran sampel dan ditambahkan 10 µl antibodi anti-IL-6 ke sumuran sampel tersebut, kemudian ditambahkan 50 µl Streptavidin-HRD pada sumuran sampel dan sumuran standar (tidak pada sumuran kontrol). Homogenisasi dilakukan dengan baik dan tutup seluruh

bagian sumuran dengan menggunakan sealer. Inkubasi 60 menit pada suhu 37⁰C.

(5) Sealer dilepaskan dan sumuran dicuci sebanyak 5 kali dengan *wash buffer*.

Proses pencucian dilakukan sesuai kebutuhan pemeriksaan. Dalam penelitian ini proses pencucian dilakukan sebanyak 8 kali. Sumuran direndam kurang lebih 0,35 ml dengan *wash buffer* selama 30 detik hingga 1 menit setiap mencuci. Untuk pencucian otomatis juga dilakukan pencucian sebanyak 5 kali dengan menggunakan *wash buffer*. Sumuran dikeringkan dengan menggunakan kertas *tissue* atau bahan penyerap lainnya.

(6) Ditambahkan 50 µl larutan substrat A ke setiap sumuran kemudian ditambahkan 50 µl larutan substrat B pula ke masing – masing sumuran. Diinkubasi kembali dengan menggunakan sealer yang baru selama 10 menit pada suhu 37⁰C dalam suasana gelap.

(7) Ditambahkan 50 µl *stop solution* ke masing – masing sumuran, akan segera terjadi perubahan warna yaitu dari biru berubah menjadi kuning.

(8) Kerapatan optik ditentukan (*Optical Density/OD value*) dari setiap sumuran dengan menggunakan *microplate reader* panjang gelombang 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan *stop solution*.

c) Perhitungan hasil

Menghitung kurva standar dengan memplot

OD rata-rata untuk setiap standar pada sumbu vertikal (Y) terhadap konsentrasi pada sumbu horizontal (X) dan menggambar kurva yang paling cocok melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan ini dapat dilakukan paling baik dengan

menggunakan perangkat lunak berbasis komputer dan dapat ditentukan dengan analisis regresi. Kurva standar harus dihasilkan dalam setiap pengujian.

E. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dicatat, dikumpulkan, dan diolah dengan bantuan komputer dan disajikan dalam bentuk tabel dan dinarasikan.

2. Analisa data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan membandingkan hasil penelitian yang diperoleh dengan standar dan teori – teori yang dikaitkan dengan penelitian.