

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan bahan kontrol *poolserum* terhadap kadar BUN dan Kreatinin. Dengan rancangan penelitian (Poste Only Control Group Design) sebagai berikut.

	Perlakuan	Postes
	K	O1
R (Kelompok Eksperimen/perlakuan)	P1	O2
	P2	O3
R (Kelompok kontrol)	P3	O4
	P4	O5

**Gambar 3.1 : Rancangan penelitian (Soekidjo Notoatmodjo, 2012)**

Keterangan :

R : Acak (*Random*)

K : Kelompok kontrol perlakuan waktu penyimpanan 0 minggu

O1 : Observasi kadar BUN dan Kreatinin setelah perlakuan penyimpanan  
0 minggu

P1 : Perlakuan waktu penyimpanan 1 minggu

O2 : Observasi kadar BUN dan Kreatinin setelah perlakuan penyimpanan  
1 minggu

P2 : Perlakuan waktu penyimpanan 2 minggu

O3 : Observasi kadar BUN dan Kreatinin setelah perlakuan penyimpanan  
2 minggu

P3 : Perlakuan waktu penyimpanan 3 minggu

O4 : Observasi kadar BUN dan Kreatinin setelah perlakuan penyimpanan  
3 minggu

P4 : Perlakuan waktu penyimpanan 4 minggu

O5 : Observasi kadar BUN dan Kreatinin setelah perlakuan penyimpanan  
4 minggu

### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

#### **3.2.1 Populasi**

Dalam penelitian ini populasi berupa serum yang berasal dari Mahasiswa yang memiliki kadar BUN dan Kreatinin normal, setelah diperiksa (melalui pengujian Laboratorium) terlebih dulu kadarnya (memiliki kadar BUN dan Kreatinin normal). langkah-langkah menentukan responden untuk pengambilan serum.

- 1) Memilih 5 orang mahasiswa.
- 2) Kemudian diperiksa kadar BUN dan Kreatinin. Jika menunjukkan kedua parameter normal maka, diambil darahnya. Jika tidak normal kadar BUN dan Kreatinin, maka diambil mahasiswa lain hingga menemukan sejumlah 5 orang yang memiliki kadar BUN dan Kreatinin normal.
- 3) Selanjutnya diambil darah untuk dijadikan serum.

#### **3.2.2 Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah serum yang berasal dari Mahasiswa D3 Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya, yang memiliki kadar BUN dan Kreatinin normal. Uji sejumlah 5 Mahasiswa. Setiap perlakuan

melakukan masing-masing 5 kali pengulangan. Sedangkan jumlah pengulangan sampel diperoleh berdasarkan rumus sebagai berikut :

$$(r-1) (t-1) \geq 15$$

$$(r-1) (5-1) \geq 15$$

$$(r-1) (4) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$R \geq 19/4 = 4,75 = 5$$

(Kusriningrum, 2008)

Keterangan :

r : jumlah sampel yang dibutuhkan

t : jumlah perlakuan

### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

#### **3.3.1 Lokasi pemeriksaan**

Lokasi pemeriksaan kadar BUN dan Kreatinin dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Universitas Muhammadiyah Surabaya. Jl. Sutorejo No. 59 Surabaya.

#### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2016 – Juni 2017. Sedangkan pemeriksaan uji laboratorium dilakukan pada bulan April 2017.

### **3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel**

#### **3.4.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas : Lama penyimpanan bahan kontrol *pool* serum

Variabel terikat : Kadar BUN dan Kreatinin

Variabel kontrol : Lama pemusingan, suhu *freezer*, dan lama inkubasi, volume serum.

### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Lama penyimpanan bahan kontrol dikategorikan menjadi penyimpanan 0 minggu, 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, 4 minggu.

Lama penyimpanan adalah waktu yang dibutuhkan untuk menyimpan serum sejak akhir pemusingan sampai saat dilakukan pemeriksaan kadar BUN dan kadar Kreatinin.

2. Kadar BUN dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan kandungan kadar BUN dalam darah yang ditentukan dalam satuan mg/dl.
3. Kadar Kreatinin dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan kandungan kadar Kreatinin dalam darah yang ditentukan dalam satuan mg/dl.

### 3.5 Metode Pengumpulan Data

#### 3.5.1 Metode Pengumpulan Data

Data Kadar BUN (Blood Urea Nitrogen) dikumpulkan melalui uji laboratorium menggunakan metode Urease modifikasi reaksi, dan data Kreatinin (Cr) dikumpulkan melalui uji laboratorium menggunakan metode Jaffe.

#### 3.5.2 Prosedur Pemeriksaan Sampel

Langkah-langkah pemeriksaan sebagai berikut :

##### 1. Persiapan pengambilan darah (serum)

Alat : tourniquet, spuit 3ml (cc), tabung reaksi, centrifuge, kapas, plesterin  
(hipafix)

Bahan : alkohol 70 %

Prosedur kerja :

- 1) Mengambil sampel darah dari 5 Mahasiswa Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.
- 2) Selanjutnya teknik pengambilan sampel darah sebagai berikut untuk masing-masing Mahasiswa Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya :
  - i) Posisi lengan pasien harus lurus, tidak boleh membengkokkan siku. Pilih lengan yang banyak melakukan aktifitas.
  - ii) Pasien diminta untuk mengepalkan tangan.
  - iii) Memasang tourniquet  $\pm$  10cm di atas lipatan siku.
  - iv) Memilih bagian vena medianan cubiti atau cepalic.
  - v) Membersihkan kulit pada bagian kulit yang akan diambil darahnya dengan alkohol 70% membiarkan hingga kering untuk mencegah terjadinya hemolisis dan rasa terbakar. Kulit yang sudah dibersihkan jangan dipegang lagi.
  - vi) Menusuk bagian vena tadi dengan lubang jarum menghadap ke atas dengan kemiringan 15°.
  - vii) Setelah volume darah cukup, melepaskan tourniquet dan pasien diminta untuk membuka kepalan tangannya.
  - viii) Tourniquet dilepas dan kemudian melepaskan jarumnya. Kapas alkohol 70% di letakkan pada bekas tusukan untuk menghentikan perdarahan, plesterin bagian yang terkena tusukan. Kemudian darah dimasukkan ke dalam tabung tanpa antikoagulan.

## 2. Pembuatan *pool* serum

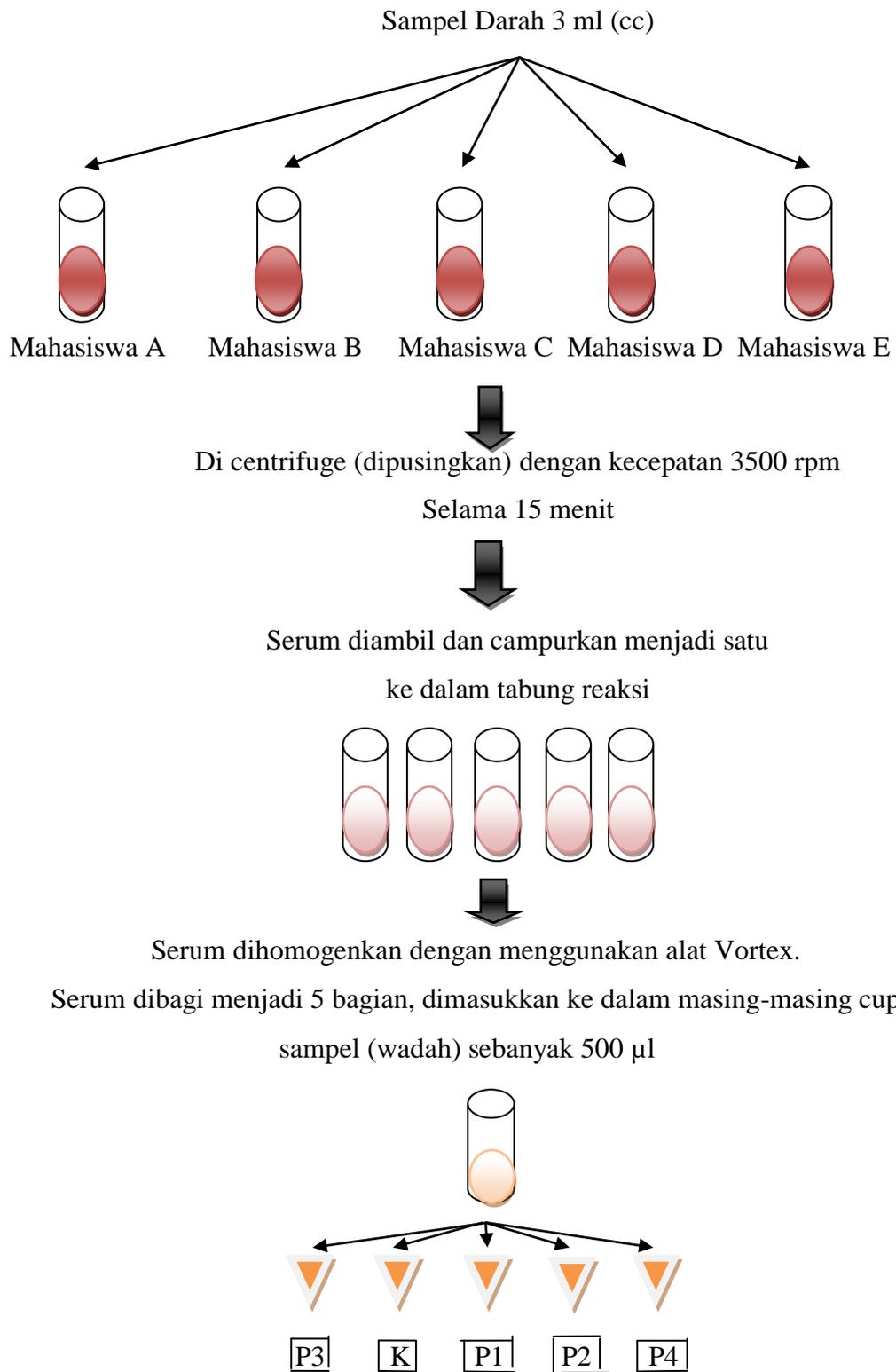
Alat : tourniquet, spuit 3ml (cc), tabung reaksi, centrifuge, kapas alkohol, plesterin, cup sampel, mikro pipet 500 $\mu$ l, blue tip,

Bahan : darah

Prosedur kerja :

- 1) Darah 3 ml dari masing-masing pasien sebanyak 5 pasien di pusingkan (centrifuge) dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit
- 2) Serum diambil sebanyak dan campurkan menjadi satu ke dalam tabung reaksi
- 3) Menghomogenkan campuran serum tersebut menggunakan alat vortex
- 4) Serum dibagi menjadi 5 bagian, dimasukkan ke dalam masing-masing cup sampel (wadah) sebanyak 500  $\mu$ l. 1 wadah sebagai serum kontrol (tidak disimpan) dan 4 wadah yang lain disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -20°C
- 5) Masing-masing serum diperiksa kadar BUN dan Kreatinin dengan pilihan sebagai berikut
  - Lama penyimpanan 0 minggu (kontrol)  
Serum dalam wadah tidak disimpan, segera diperiksa kadar BUN dan Kreatinin.
  - Lama penyimpanan 1 minggu (P1)  
Serum dalam wadah (P1) (setelah disentrifuge/dihomogenkan) lalu disimpan selama 1 minggu dalam freezer. Setelah 1 minggu serum diperiksa kadar BUN dan kreatinin.

- Lama penyimpanan 2 minggu  
Serum dalam wadah (P2) (setelah disentrifuge/dihomogenkan) lalu disimpan selama 2 minggu dalam freezer. Setelah 2 minggu serum diperiksa kadar BUN dan kreatinin.
- Lama penyimpanan 3 minggu  
Serum dalam wadah (P3) (setelah disentrifuge/dihomogenkan) lalu disimpan selama 3 minggu dalam freezer. Setelah 3 minggu serum diperiksa kadar BUN dan kreatinin.
- Lama penyimpanan 4 minggu  
Serum dalam wadah (P4) (setelah disentrifuge/dihomogenkan) lalu disimpan selama 4 minggu dalam freezer. Setelah 4 minggu serum diperiksa kadar BUN dan kreatinin.

SKEMA PEMBUATAN *POOL SERUM*

Sumber: Hani Ayu Annisak (2017)

### 3. Pemeriksaan BUN (Blood Urea Nitrogen)

Prinsip:

Pada analisis, katalisis urease hidrolisis dari urea menjadi  $\text{NH}_3$  dan  $\text{CO}_2$ . Amonia diubah menjadi warna yang muncul indhepenol blue dari sodium nitroferriicianida-fenol dan hypochlorite reagents. Yang kadarnya dapat diukur dengan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 578 nm.

Alat: Mikro pipet (50  $\mu\text{L}$  dan 500  $\mu\text{L}$ ), Spektrofotometer, rak tabung, blue tip, yellow tip, gelas kimia (beaker glass), wadah sampel (cup serum), *freezer*, termometer (pengukur suhu).

Bahan: *Pool* serum

Reagen : reagen RGT 1, reagen RGT 2, reagen Enzim, reagen Standart.

Prosedur kerja (Human) :

- 1) Mempersiapkan semua alat dan bahan.
- 2) Cara mengencerkan reagen BUN (Blood Urea Nitrogen) sebagai berikut :

#### **Working Reagen 1 (tutup putih)**

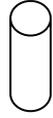
Memipet reagen enzim (1x) sebanyak 100  $\mu\text{l}$  ke dalam botol pengencer, lalu menambahkan (20x) reagen RGT 1 sebanyak 500  $\mu\text{l}$  ke dalam botol pengencer kemudian dihomogenkan (campur) menggunakan mikro pipet dan blue tip. Kemudian botol ditutup rapat.

#### **Working Reagen 2 (tutup merah)**

Reagen RGT 2 tanpa pengenceran.

3) Lalu memberikan label, di setiap tabung reaksi ditulis sebagai berikut :

Tabung reaksi 1    Tabung reaksi 2    Tabung reaksi 3



Blanko



Standart



Test

4) Memipet reagen BUN (Blood Urea Nitrogen) atau working reagen 1 (RGT

1) sebanyak 500  $\mu$ l ke dalam masing-masing tabung reaksi 1 sebagai blanko, tabung reaksi 2 sebagai standart, tabung reaksi 3 sebagai test.

5) Kemudian memipet reagen standart sebanyak 5  $\mu$ l ke dalam tabung reaksi

2 sebagai standart yang sudah berisi working reagen 1 (RGT 1), dihomogenkan (campur) dan memipet sampel serum sebanyak 5 $\mu$ l ke dalam tabung reaksi 3 sebagai test (sampel) yang sudah berisi working reagen 1 (RGT 1), dihomogenkan (campur). Inkubasi selama 3 menit dalam suhu 37°C (suhu ruang).

6) Setelah 3 menit, lalu ditambahkan working reagen 2 (RGT 2) sebanyak

500  $\mu$ l ke dalam tabung reaksi 1 sebagai blanko, ke dalam tabung reaksi 2 sebagai standart, dan ke dalam tabung reaksi 3 sebagai test (sampel), dihomogenkan (campur). Inkubasi selama 5 menit dalam suhu 37°C (suhu ruang).

7) Setelah 5 menit, lalu dibaca pada alat spektrofotometer dengan panjang

gelombang 578 nm.

8) Mencatat hasil yang muncul pada display spektrofotometer

**a. Kalkulasi :**

$$C = \frac{A_{\text{sample}} \times \text{Factor}}{A_{\text{standar}}}$$

Keterangan :

C = Concentration (ppm) adalah part per milion dapat diartikan perbandingan konsentrasi zat terlarut dan pelarutnya.

A = Absorbansi atau serapan

(Human Gesellschaft) terlampir di lampiran.

**b. Conversi BUN**

$$\text{BUN} = 0,466 \times \text{Urea (mg/dl)}$$

$$\text{UREA} = 2,14 \times \text{BUN (mg/dl)}$$

**c. Nilai normal :**

Serum (urea) : 10 – 50 mg/dl

Berthelot M., Report Chem. Applique 1, 284 (1859)

Sumber: Human Gesellschaft

**4. Pemeriksaan Kreatinin (Cr)**

Prinsip:

Reaksi antara kreatinin dengan asam pikrat dalam suasana basa akan membentuk kompleks kreatinin pikrat yang berwarna kuning jingga yang kadarnya dapat diukur dengan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 546 nm.

Alat : Mikro pipet (50  $\mu$ L dan 500  $\mu$ L), Spektrofotometer, rak tabung, blue tip, yellow tip, gelas kimia, wadah sampel (cup serum), freezer, termometer.

Bahan : *Pool* serum

Reagen : reagen Asam Pikrat, reagen NaOH, reagen Standart.

Prosedur kerja (Human) :

- 1) Mempersiapkan semua alat dan bahan
- 2) Cara mengencerkan reagen Kreatinin (Cr) sebagai berikut :

#### **NaOH Diluet**

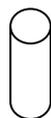
Memipet reagen NaOH (1x) sebanyak 500  $\mu$ l ke dalam botol pengencer, di tambahkan aquabidest (7x) sebanyak 500  $\mu$ l ke dalam botol pengencer, homogenkan (campur) atau hisap tiup menggunakan mikro pipet dan blue tip.

#### **Pikrat**

Menambahkan reagen pikrat (8x) sebanyak 500  $\mu$ l ke dalam botol pengenceran yang sudah berisi NaOH dan aquabidest, homogenkan (campur) atau hisap tiup menggunakan mikro pipet dan blue tip. Kemudian botol ditutup rapat.

- 3) Lalu memberikan label (etiket), di setiap tabung reaksi di tulis sebagai berikut :

Tabung reaksi 1    Tabung reaksi 2



Standart



Test

- 4) Memipet reagen kreatinin sebanyak 500  $\mu$ l ke dalam masing-masing tabung reaksi 1 sebagai standart, tabung reaksi 2 sebagai test.

- 5) Kemudian memipet reagen standart sebanyak 50 µl ke dalam tabung reaksi 1 sebagai standart yang sudah berisi reagen kreatinin, homogenkan (campur) dan memipet sampel serum sebanyak 50 µl ke dalam tabung reaksi 2 sebagai test (sampel) yang sudah berisi reagen kreatinin, dihomogenkan (campur). Inkubasi selama 30 detik dalam suhu 37°C (suhu ruang).
- 6) Setelah 30 detik, lalu dibaca pada alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.
- 7) Mencatat hasil yang muncul pada display spektrofotometer

**a. Kalkulasi :**

**Serum / Plasma**

$$C = 2,0 \times \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standar}}} \quad (\text{mg/dl})$$

Keterangan :

C = Concentration (ppm) adalah part per milion dapat diartikan perbandingan konsentrasi zat terlarut dan pelarutnya.

A = Absorbansi atau serapan

(Human Gesellschaft) terlampir di lampiran.

**b. Nilai normal :**

**Serum**

Laki-laki : 0,6 – 1,1 mg/dl

Perempuan : 0,5 – 0,9 mg/dl

Mod. Method of Bartels H. *et al.*, Clin. Chim. Acta 32, 81 (1971)

Sumber: Human Gesellschaft

### 3.5.3 Tabulasi Data

Data diperoleh dari hasil pemeriksaan laboratorium kadar BUN (Blood Urea Nitrogen) dan Kreatinin (Cr) bahan kontrol *poolserum* kemudian dijadikan dalam bentuk tabel, sebagai berikut :

**Tabel 3.1 Hasil kadar BUN (Blood Urea Nitrogen) pada bahan kontrol *pool serum***

No	Kode Sampel	Kadar BUN (Blood Urea Nitrogen) mg/dl Pada Lama Penyimpanan				
		0 minggu	1 minggu	2 minggu	3 minggu	4 minggu
1	A1					
2	A2					
3	A3					
4	A4					
5	A5					
	Jumlah					
	Rata-rata					
	SD					

**Tabel 3.2 Hasil kadar Kreatinin (Cr) pada bahan kontrol *pool serum***

No	Kode Sampel	Kadar Kreatinin (Cr) mg/dl Pada Lama Penyimpanan				
		0 minggu	1 minggu	2 minggu	3 minggu	4 minggu
1	A1					
2	A2					
3	A3					
4	A4					
5	A5					
	Jumlah					
	Rata-rata					
	SD					

### **3.5.4 Metode Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan ANOVA dengan tingkat kesalahan 5% atau  $\alpha = 0.05$ , dengan program SPSS (*Statistical Program Social Science*) versi 16.