

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian observasional dengan pengambilan data *cross sectional*, yang bertujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan kadar imunoglobulin G pada kelompok orang yang beresiko rendah kontak dengan unggas berdasarkan uji serologis metode ELISA.

B. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 45 sampel serum dari kelompok orang yang beresiko rendah kontak dengan unggas yaitu dokter hewan, tetangga dari peternak unggas dan konsumen yang memakan produk (daging dan telur) unggas di wilayah kabupaten Kulonprogo, Sleman, Bantul, Gunung Kidul, dan Kodya DIY.

C. Variabel Penelitian

Variabel-variabel yang termasuk ke dalam penelitian ini mencakup tiga jenis variable, antara lain :

1. Variable terikat : kadar imunoglobulin G pada serum darah kelompok orang yang beresiko rendah kontak dengan unggas.
2. Variable bebas : kelompok orang yang beresiko rendah kontak dengan unggas.

3. Perancu : kelompok orang yang beresiko kontak dengan unggas yang memperhatikan higienitas diri.

D. Definisi Operasional

1. Kadar Ig G adalah nilai kadar imunoglobulin terhadap antigen AI yang terdeteksi pada serum subyek penelitian yang diperoleh dengan pemeriksaan metode ELISA.
2. Kelompok orang yang beresiko rendah kontak dengan unggas adalah orang-orang yang mempunyai intensitas rendah terpapar unggas atau hewan sebagai *host* AI, dengan kriteria paparan kurang dari 50 % waktu kerja dalam seminggu dan kontak dengan unggas atau sekret unggas dengan memperhatikan higienitas.
3. Mencuci tangan setelah kontak dengan unggas, serta mengkonsumsi produk (daging dan telur) unggas, dengan memperhatikan cara memasak unggas yang benar, dikendalikan dengan melakukan pendataan melalui kuesioner.

E. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan dengan periode waktu Juni 2007 hingga Desember 2007, dengan tempat pelaksanaan sebagai berikut :

1. Pengambilan sampel dilakukan di kabupaten Daerah Istimewa Yogyakarta dan sekitarnya. Tempat pengambilan sample dilakukan pada 5 kabupaten, yaitu Kulonprogo sebanyak 7 sampel, Sleman sebanyak 10

sampel, Bantul sebanyak 10 sampel, Gunung Kidul sebanyak 8 sampel, dan Kodya DIY sebanyak 10 sampel.

2. Pemeriksaan kadar Ig G serum subyek penelitian dengan uji serologis ELISA dilakukan di laboratorium penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

F. Instrumen Penelitian

1. Bahan Kimia.

Bahan Kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

1. Negatif kontrol.
2. Positif kontrol,
3. HRP-konjugat.
4. Reagen antigen.
5. *Wash buffer*.
6. Kromogen A.
7. Kromogen B.
8. *Stop solution*.

Bahan diatas tersedia didalam paket kit ELISA merek Akurat Intan Madya (AIM).

9. Air suling.

2. Alat.

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini antara lain :

1. *Microwell plate* terdiri dari 96 sumuran.
2. Pipet single / *multichannel*.
3. Tempat sampah.
4. Tisu serap atau handuk bersih.
5. Inkubator basah atau kering (suhu $37 \pm 0,5$ °C).
6. *Disposable v-shaped*.
7. *Microshaker*.
8. *Microwell plate reader single* panjang gelombang 450nm.
9. *Microwell* aspirasi.
10. Spuit 2,5 ml untuk menganbil darah dari vena.
11. *Venoject* untuk menampung darah dan menyimpan serum.
12. Alat pemusing (sentrifus).
13. Sarung tangan.
14. Kulkas dan *Freezer*.

G. Cara Kerja

1. Penentuan Subyek.

Subyek ditentukan berdasar tingkat resiko seseorang kontak dengan unggas. Dalam penelitian ini dilakukan penelitian terhadap subyek penelitian yang mempunyai resiko rendah kontak dengan unggas.

2. Pengambilan Sampel Penelitian.

Pengambilan sampel penelitian dilakukan untuk koleksi serum :

- a. Setelah semua data untuk keperluan penentuan subyek dicatat, darah diambil dari vena dengan spuit 2,5 ml, kemudian darah diamsukkan ke dalam *venoject* steril.
- b. *Venoject* yang berisi darah segera ditutup rapat dan diberi kertas label untuk mencatat tanggal pengambilan serum, identitas subyek, dan nomor urut.
- c. Darah dibiarkan menjendal, setelah menjendal, darah segera disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit.
- d. Setelah serum nampak terpisah, *venoject* yang berisi serum tersebut segera disimpan di dalam *freezer* hingga pengujian serologis dengan ELISA siap dikerjakan.

3. Penentuan Kadar Ig G Subyek Terhadap AI dengan Metode ELISA.

1. Persiapan Reagen.

- Taruh reagen dalam ruangan bersuhu 18-30 °C.
- Cek konsentrasi *wash buffer* untuk yang masih berbentuk kristal garam (jika masih dalam bentuk kristal dapat dipanaskan pada 37 °C sampai kristal larut).
- Cairkan *stock wash buffer* 1-20 kali dengan air suling.

2. Penomoran Sumuran.

- Atur piringan yang dibutuhkan dengan *strip holder*.
- Tandai sumuran dengan 3 negatif kontrol, 2 positif kontrol dan

1 blanko.

Baik sampel maupun reagen antigen dan HRP-konjugat dimasukkan ke dalam blanko.

3. Penambahan Sampel.

- Tambahkan 50 µl positif kontrol dan negatif kontrol ke dalam masing-masing sumuran.

Catatan: gunakan pipet sekali pakai untuk masing-masing spesimen negatif kontrol dan positif kontrol agar terhindar dari kontaminasi.

4. Penambahan Reagen Antigen.

- Tambahkan 50 µl reagen antigen ke masing-masing sumuran kecuali untuk blanko dan campur dengan mengetuk piring dengan pelan.

5. Inkubasi

- Tutup piringan dengan penutup piringan.
- Inkubasi selama 60 menit pada 37°C.

Dianjurkan untuk menggunakan wadah penampung air untuk menjamin stabilitas temperatur dan kelembapan selama inkubasi.

Jika menggunakan inkubasi kering, penutup jangan dibuka selama proses inkubasi.

6. Pencucian.

- Pada akhir inkubasi lepaskan dan buang penutup piringan.
- Cuci masing-masing sumuran 5 kali dengan *wash buffer cair*.

- Tiap kali waktu pencucian, *microwell* direndam 30-60 detik.
 - Setelah semua pencucian selesai, turunkan *strip* piringan ke bawah, gunakan kertas isap atau handuk bersih, ketuk piring untuk melapas sisa pencucian.
7. Penambahan HRP-Konjugat.
- Tambahkan 100 μ l HRP-konjugat untuk masing-masing sumuran kecuali blanko dan aduk dengan mengetuk piring dengan pelan.
8. Inkubasi.
- Tutup piringan dengan penutup piringan.
 - Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C.
- Disarankan untuk menggunakan wadah penampung air untuk menjamin stabilitas temperatur dan kelembapan selama inkubasi. Jika menggunakan inkubasikering, penutup jangan dibuka selama proses inkubasi.
9. Pencucian.
- Pada akhir inkubasi, lepaskan dan buang penutup piringan.
 - Cuci masing-masing sumuran 5 kali dengan *wash buffer* cair seperti pada langkah 6.
10. Pewarnaan.
- Beri 50 μ l kromogen A dan 50 μ l kromogen B *solution* ke dalam masing-masing sumuran termasuk blanko dan aduk dengan mengetuk piringan dengan pelan.

- Inkubasi piringan pada suhu 37 °C selama 30 menit dan hindarkan dari cahaya.

Reaksi enzimatik antara kromogen *solution* dan HRP-konjugat menghasilkan warna biru di dalam negatif kontrol dan sumuran sampel negatif.

11. Penghentian Reaksi.

- Gunakan pipet *multichannel* atau pipet manual, tambahkan 50 μ l *stop solution* kedalam masing-masing piringan dan aduk perlahan.

Warna kuning akan muncul pada kontrol negatif dan sumuran sampel negatif.

12. Pengukuran Absorbansi.

- Kalibrasi piringan *reader* dengan piringan blanko dan baca dengan absorbansi pada 450 nm.
- Kalkulasi nilai *cut-off* dan evaluasi hasilnya.

Baca absorbansi dalam 10 menit setelah diberikan stop reaksi.

4. Data yang telah terkumpul, dilakukan analisis statistik untuk mengetahui perbedaan antar tiap variabelnya.

H. Validitas dan Reliabilitas

Menentukan validitas data dari uji serologis ditetapkan dengan *cut of point* pengujian. Sedangkan reabilitas data ditetapkan dengan pengujian 1 kali untuk setiap sampel dengan metode ELISA yang dikendalikan dengan kuesioner.

I. Analisis Data

Berdasarkan data yang diperoleh dari studi observasi perbedaan tingkat Immunoglobulin G pada kelompok resiko rendah kontak dengan unggas dengan uji serologis metode ELISA pada 5 kabupaten DIY dilakukan secara deskriptif analisis.