

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional* untuk mengetahui gambaran jumlah sel limfosit T CD8⁺ pada pasien TB paru di Puskesmas Bakunase, Oesapa dan Sikumana Kota Kupang.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel pada penelitian ini di Puskesmas Bakunase, Oesapa dan Sikumana selanjutnya dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Prodia Kupang.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini direncanakan akan dilaksanakan pada bulan April - Mei tahun 2025.

C. Variabel Penelitian

Variabel tunggal yaitu gambaran jumlah sel limfosit T CD8⁺ pada pasien tuberkulosis paru.

D. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh pasien TB kasus baru yang mendapatkan pengobatan fase awal (< 1 bulan pengobatan).

E. Sampel

1. Sampel

Pemilihan sampel ditentukan berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi.

adapun kriteria inklusi antara lain :

- a. Sampel yang digunakan adalah semua pasien TB paru kasus baru yang mendapatkan pengobatan fase awal (<1 bulan pengobatan) di Puskesmas Bakunase, Oesapa dan Sikumana
- b. Pasien yang menyetujui menjadi responden penelitian.

Kriteria eksklusi antara lain :

- a. Pasien TB paru yang telah melewati masa pengobatan tahap awal dan telah mendapatkan pengobatan pada fase lanjutan.
- b. Pasien tidak menyetujui menjadi responden penelitian.
- c. Pasien TB paru dengan riwayat penyakit autoimun, *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) dan penyakit sistemik.
- d. Pasien TB paru dengan riwayat terapi imunosupresan.

2. Teknik sampling

Teknik sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah metode *purposive sampling*. Pasien sedang dalam masa pengobatan TB paru (fase awal) dan memenuhi kriteria penelitian diminta untuk menjadi responden penelitian, diperkirakan sekitar 15 pasien dengan mempertimbangkan waktu dan biaya penelitian.

F. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil	Skala
Jumlah sel limfosit T CD8 ⁺	Sel limfosit T CD8 ⁺ yang diperiksa dengan metode flowcytometry pada alat FACS <i>calibur</i> dengan menggunakan sampel <i>whole blood</i>	FACS <i>Calibur</i>	- Sel/uL	- Rasio
Jenis kelamin	Identitas pasien digunakan untuk membedakan jenis kelamin laki-laki dan perempuan	Lembar Kuisisioner	- Laki-laki - Perempuan	- Nominal
Umur	Lama masa hidup pasien terhitung dari waktu kelahirannya	Lembar Kuisisioner	- Remaja (10-18) - Dewasa (19-59) - Lansia (>60)	- Nominal
Status pengobatan pasien (kasus baru)	Pasien yang baru pertama kali terdiagnosis TB dan belum menerima pengobatan atau telah menerima pengobatan <1 bulan	Lembar Kuisisioner	- Belum menerima - pengobatan minggu ke 1-2 - pengobatan minggu ke 3-4	- Nominal

G. Prosedur Penelitian

Prosedur tahapan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tahapan perencanaan
 - a. Melakukan observasi Lokasi
 - b. Penyusunan, revisi dan seminar proposal
 - c. Mengurus kode etik penelitian
 - d. Mengurus surat ijin penelitian
2. Tahap pelaksanaan
 - a. Pencatatan data pasien dari rekam medis
 - b. Perkenalan diri serta maksud dan tujuan penelitian
 - c. Tanda tangan formulir persetujuan (*informed consent*)
 - d. Prosedur pengambilan darah
 - 1) Alat dan bahan :
 - a) Jarum 3cc
 - b) Tabung vacumtainer EDTA
 - c) Tourniquet
 - d) Kipas kering
 - e) Kipas alkohol 70%
 - f) Plester luka
 - g) Safety box.
 - 2) Cara kerja
Pengambilan darah di lakukan dengan prosedur :
 - a. Alat dan bahan di siapkan seperti jarum, tabung vacumtainer

EDTA tourniquet, kapas sering kapas alkohol 70%, plester luka dan safety box.

- b. Sduit disiapkan, dipastikan jarum sudah terpasang erat dan diberi sedikit rongga udara dalam sduit.
- c. Pasien diminta untuk menggenggam lalu dipilih bagian vena dengan jari telunjuk untuk menentukan lokasi vena besar dan untuk menentukan kedalaman, arah, dan ukuran.
- d. Vena yang dipilih adalah vena mediana cubital dan vena sepalika, jika memungkinkan hindari vena cepalika.
- e. Daerah tempat suntik didesinfeksi dengan kapas alkohol 70% secara memutar ke arah keluar dan biarkan kering sambil menunggu kapas alkohol kering setelah kering dipasang kembali tourniquet kemudian dilepaskan penutup jarum. Ditusukkan jarum secara perlahan ke dalam vena dengan sudut kemiringan 15-30 derajat.
- f. Dilakukan penusukan di bagian vena cubiti dengan sduit dan posisi jarum menghadap ke atas setelah darah terlihat pada jarum, dan darah terhisap hingga memenuhi sduit tourniquet dilepaskan.
- g. Saat volume darah mencapai 3ml, pasien diminta untuk membuka kepala tangannya.
- h. Lalu dibolak-balik spesimen perlahan sebanyak tiga sampai delapan kali.

- i. Setelah pengambilan darah, Kertas kering diletakkan pada tempat penusukan lalu jarum ditarik keluar.
 - j. Lalu lengan pasien diberi plester di area penusukan, limbah jarum di buang ke safety box.
3. Pemeriksaan jumlah sel limfosit T CD8⁺

Pemeriksaan jumlah sel limfosit T CD8⁺ dilakukan dengan prosedur.

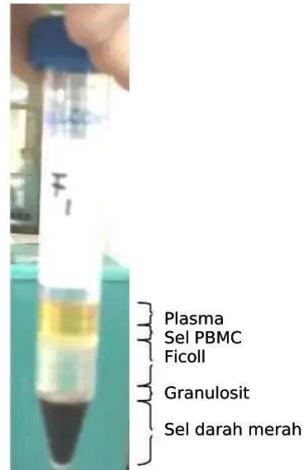
a. Alat dan Bahan

Tabung sentrifuge 1,5 ml, Sentrifuge dingin, Micropipet, Kuvet fcm, vacutainer EDTA, Swing centrifugated, Ficoll Hipaque, Phospat Buffer Salin, sample darah, Antibodi sel sueface marker, larutan sel staining buffer.

b. Prosedur Kerja

Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan sampai suhu ruang, Kemudian disiapkan tabung sentrifuse 15 ml dan diisi dengan Ficoll Hipafique d = 1,077 g/mL sebanyak 2,5 mL Sampel darah dalam vacutainer EDTA yang akan diuji diambil dengan micropippete dan disalurkan secara perlahan pada dinding tabung sentrifus sehingga terbentuk 2 lapisan lalu di sentrifuge dengan kecepatan 1600 rpm selama 30 menit dalam suhu ruang. Setelah di sentrifuge akan terpisah menjadi 5 lapisan yaitu plasma, sel PMBC, ficoll, granulosit dan sel darah merah.

-



Cincin Peripheral Blood Monoclear Cell (PBMC) yang terbentuk diambil secara perlahan diambil secara perlahan menggunakan micropipet dan diletakan dalam botol sentrifuge 15 mL yang baru. Kemudian Larutan PBMC dicuci dengan PBS hingga 10 mL dan disentrifuge suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Pencucian ini dilakukan sebanyak 2 kali. Pelet yang terbentuk dicuci dengan sel staining buffer (2% Fetal Bovine Serum (FBS) dalam PBS) 1 kali. Kemudian Divortex, dan disentrifuse pada suhu 4°C 2500 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel yang terbentuk siap untuk distaining dengan antibodi surface marker (2,5 μ L FITC CD4 ditambah 2,5 μ L PE CD8⁺ diencerkan dengan 45 μ L sel staining buffer). Pelet sel dicampurkan dengan antibodi surface marker yang telah diencerkan. Dinkubasi 20 menit dalam gelap di suhu ruang, setelah inkubasi ditambahkan sel staining buffer kurang lebih 300 μ l dan dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *flowcytometry*.

H. Analisis Hasil

Hasil pemeriksaan yang diperoleh dan dianalisis dapat disajikan dalam bentuk tabel berdasarkan berapa jumlah sel limfosit T CD8⁺, umur, jenis kelamin, status pengobatan pasien kasus baru.