

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Ruang Lingkup Penelitian**

##### **3.1.1 Lingkup Tempat**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro untuk pemeriksaan mikroskopis, ekstraksi, dan kuantifikasi DNA inti dari sampel akar rambut.

##### **3.1.2 Lingkup Waktu**

Dibutuhkan waktu dua bulan untuk menyelesaikan seluruh prosedur penelitian.

##### **3.1.3 Lingkup Ilmu**

Penelitian ini mencakup bidang Ilmu Kedokteran Forensik dan Ilmu Kedokteran Biomolekuler.

#### **3.2 Jenis dan rancangan penelitian**

Penelitian berjenis observasional dengan rancangan penelitian *cross sectional*.

### **3.3 Populasi dan sampel**

#### **3.3.1 Populasi target**

Populasi target dalam penelitian ini adalah rambut manusia yang masih memiliki akar rambut.

#### **3.3.2 Populasi terjangkau**

Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah rambut manusia yang memiliki akar rambut, didapatkan jangka waktu penelitian.

#### **3.3.3 Sampel**

##### **3.3.3.1 Kriteria inklusi**

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah sampel rambut yang memiliki akar, diambil dari seorang individu secara langsung dengan syarat:

1. berasal dari individu yang tidak sedang mengalami penyakit rambut dan kulit kepala
2. merupakan jenis rambut terminal yang diambil dari daerah kepala
3. memiliki warna rambut dengan spektrum coklat sampai hitam, tidak pirang
4. tidak pernah mengalami perawatan rambut artifisial seperti pengecatan, *bonding*, dan *smoothing*

##### **3.3.3.2 Kriteria eksklusi**

Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah sampel rambut yang dalam pemeriksaan mikroskopis ditemukan akar yang rusak dan tidak utuh.

### 3.3.4 Cara sampling

Metode pengambilan sampel berupa *purposive sampling* berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sampai tercapai jumlah sampel yang dibutuhkan.

### 3.4 Besar sampel

Besar sampel yang digunakan untuk penelitian analitik tidak berpasangan dengan skala pengukuran variabel numerik adalah sebagai berikut:

$$\text{Besar sampel} = 2 \left( \frac{(Z\alpha + Z\beta)S}{x_1 - x_2} \right)^2$$

Keterangan :

$\alpha$  = kesalahan tipe 1, ditetapkan peneliti sebesar 10% = 1.645

$\beta$  = kesalahan tipe 2, ditetapkan peneliti sebesar 10% = 1.282

$s$  = variasi data variabel yang diteliti, didapatkan dari penelitian sebelumnya, yaitu 0.28

$x_1 - x_2$  = perbedaan rerata yang dianggap bermakna = 0.5

Nilai  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $x_1 - x_2$  ditetapkan oleh peneliti sesuai dengan kebutuhan penelitian, sedangkan nilai  $s$  didapatkan dari kepustakaan.

Nilai tersebut dimasukkan ke dalam rumus besaran sampel sehingga diperoleh besar sampel untuk penelitian adalah 5,37 dan dibulatkan menjadi 5 sampel untuk tiap fase pertumbuhan akar rambut.

### 3.5 Variabel penelitian

#### 3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah akar rambut dalam berbagai fase pertumbuhan.

#### 3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kuantitas DNA yang dapat diekstrak.

### 3.6 Definisi operasional

**Tabel 5.** Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional dan Cara Pengukuran	Skala	Nilai
1.	Fase pertumbuhan akar rambut	Merupakan gambaran morfologi akar rambut pada fase pertumbuhan katagen, anagen dan telogen yang dinilai dari pemeriksaan mikroskopis. Pada gambaran akar rambut anagen, terlihat akar rambut diselubungi oleh semacam kantung transparan yaitu folikel rambut. Akar memiliki gambaran pelebaran khas pada bagian proksimalnya. Fase katagen merupakan fase transisi antara fase anagen dan telogen, terlihat ujung proksimal akar mengecil dan berbentuk <i>presumptive club hair</i> . Pada gambaran telogen, terlihat akar rambut kecil dan tidak terdapat folikel rambut.	Kategorial	Anagen, katagen, dan telogen
2.	Kuantitas DNA	Jumlah DNA yang diukur dari hasil ekstraksi menggunakan metode nanodrop spektrofotometri	Numerik	Nanogram (ng/μl)

### **3.7 Cara pengumpulan data**

#### **3.7.1 Alat dan bahan untuk pengumpulan sampel rambut**

- Forceps epilasi (pinset) steril
- *Plastic bag*
- Masker
- Sarung tangan
- Sisir steril

#### **3.7.2 Alat dan bahan pemeriksaan mikroskopis akar rambut**

- Sampel rambut
- Mikroskop cahaya
- Lensa mikroskop dengan perbesaran 4x
- Slide mikroskop/*object glass*

#### **3.7.3 Alat dan bahan ekstraksi dengan metode Chelex**

- Chelex 10%
- Saponin
- ddH<sub>2</sub>O
- *Sentrifuge*
- *Micropipet* dan *microtips*
- Vortex
- *Microtube*
- Pemanas air

#### **3.7.4 Alat dan bahan untuk kuantifikasi**

- Spektrofotometer Nanodrop ND-2000
- *Micropipet* dan *microtips*
- Tissue
- ddH<sub>2</sub>O

### **3.8 Cara kerja**

#### **3.8.1 Pemilihan sampel**

Sampel akan diambil berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang ditentukan sebanyak kebutuhan dalam penelitian, yaitu 15 total sampel akar rambut.

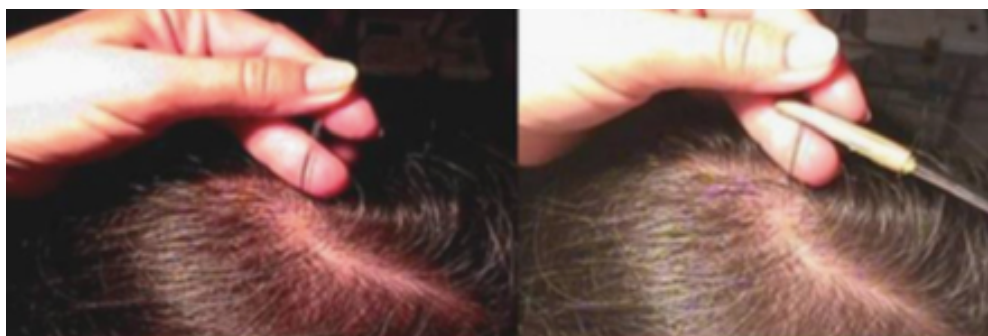
#### **3.8.2 Pengumpulan sampel**

Setiap individu akan diambil kurang lebih 70 sampel akar rambut untuk kemudian melalui pemeriksaan mikroskopis akan didapatkan sehelai sampel akar rambut dalam fase anagen, sehelai akar rambut dalam fase katagen, dan sehelai sampel akar rambut dalam fase telogen dari masing-masing individu.

Sampel rambut diambil dengan menggunakan teknik sebagai berikut:

1. Sampel diambil dengan menggunakan prinsip keamanan biologis untuk mencegah kontaminasi, yaitu menggunakan sarung tangan, masker wajah, dan sisir steril.
2. Metode pengambilan rambut yang digunakan adalah penyisiran dan pencabutan menggunakan pinset steril. Pencabutan dilakukan dengan hati-hati agar tidak meregangkan atau merusak helaian rambut.

3. Sampel diambil secukupnya dan dimasukkan ke dalam amplop kertas untuk diperiksa secara mikroskopis. Rambut yang didapatkan dengan metode yang berbeda, yaitu penyisiran dan pencabutan dimasukkan ke dalam dua amplop yang berbeda.



**Gambar 13.** Cara pengambilan sampel rambut<sup>28</sup>

### **3.8.3 Pemeriksaan Mikroskopis Akar Rambut**

Pemeriksaan mikroskopik rambut paling baik diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 4x. Pemeriksaan mikroskopis digunakan untuk mengonfirmasi fase pertumbuhan akar rambut. Dari pemeriksaan mikroskopis juga akan dilakukan dokumentasi untuk penelitian.

### **3.8.4 Ekstraksi DNA**

Metode ekstraksi DNA yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi Chelex. Metode ini merupakan metode yang lebih baru dibandingkan metode klasik ekstraksi fenol-kloroform. Metode Chelex memerlukan waktu ekstraksi yang lebih singkat dan menghasilkan DNA dalam bentuk rantai tunggal sehingga akan lebih efisien jika pemeriksaan akan dilanjutkan dengan PCR. Proses

ekstraksi Chelex yang memerlukan lebih sedikit langkah juga membuat kemungkinan terjadinya kontaminasi pada sampel saat pengerjaan lebih sedikit.

Berikut adalah langkah-langkah dalam mengekstrak DNA dengan metode ekstraksi Chelex:

1. Sampel satu helai rambut dipotong sepanjang 4 mm dari ujung proksimal akar rambut menggunakan *cutter* steril untuk mendapatkan akarnya saja
2. Masukkan sampel akar rambut ke dalam microtube steril
3. Masukkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 100 µl dan saponin sebanyak 1000 µl
4. Diamkan selama satu hari dalam freezer
5. Keluarkan, cairkan, dan sentrifuge sampel yang sudah biarkan overnight pada 12.000 rpm selama 10 menit
6. Buang supernatan
7. Masukkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1000 µl
8. Sentrifuge pada 12.000 rpm selama 5 menit
9. Buang kembali supernatan
10. Masukkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 100 µl dan Chelex 10% sebanyak 50 µl
11. Panaskan selama 10 menit dan divortex setiap 5 menit
12. Sentrifuge pada 12.000 rpm selama 10 menit
13. Supernatan yang mengandung genom DNA diambil dan dipindahkan ke *microtube* yang baru, sampel siap dianalisa.

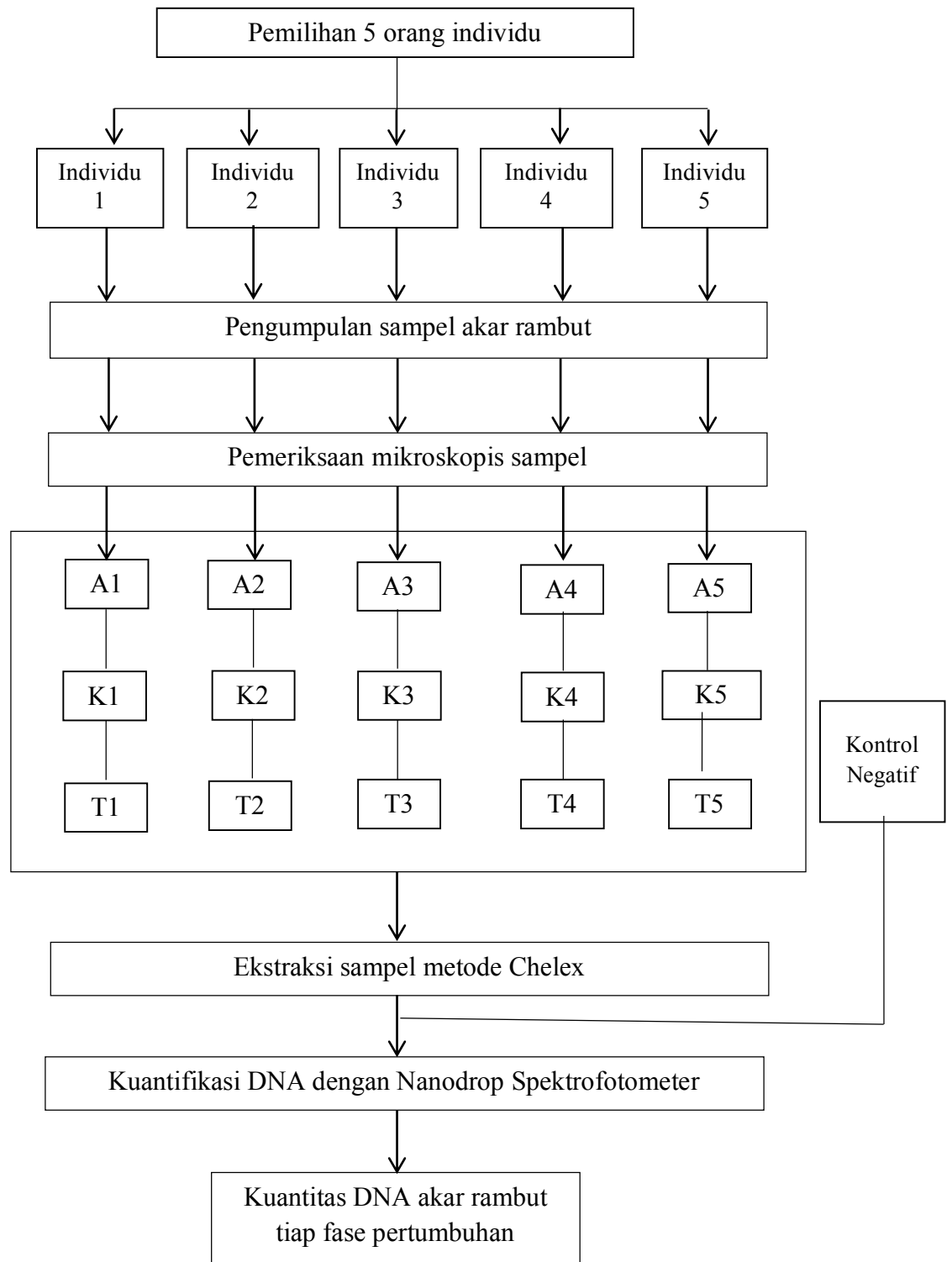


### 3.8.5 Kuantifikasi DNA

Setelah didapatkan hasil ekstraksi, dilakukan kuantifikasi dengan Nanodrop spektrofotometer dengan langkah-langkah:

1. Permukaan nanodrop dibersihkan dengan meneteskan 1-2  $\mu\text{l}$  *deionized water* pada permukaan optik bawah lalu ditutup kemudian di keringkan menggunakan kain steril.
2. Program nanodrop dibuka dan dipilih model asam nukleat.
3. Spektrofotometer dimulai dengan diteteskan 1 $\mu\text{l}$  air bersih ke permukaan optik bawah lalu ditutup dan dipilih “*initialize*” pada program nanodrop setelah 10 detik permukaan optik dibersihkan kembali menggunakan kain steril.
4. Pengukuran blanko menggunakan *deionized water* sebanyak 1 $\mu\text{l}$  dan memilih “*blank*” pada program nanodrop lalu dibersihkan kembali menggunakan kain steril.
5. Sampel hasil ekstraksi diteteskan ke permukaan optik sebanyak 1 $\mu\text{l}$  lalu dipilih “*measure*” pada program nanodrop dan dibersihkan kembali menggunakan kain steril.

### 3.9 Alur Penelitian



**Gambar 14.** Alur Penelitian

### **3.10 Analisis data**

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 23.00 dan diuji normalitas dengan *Saphiro Wilk* karena besar sampel kurang dari 50. Distribusi data didapatkan normal sehingga dilakukan uji hipotesis, yaitu uji parametrik *One Way Anova*, dilanjutkan dengan Post Hoc.

### **3.11 Etika penelitian**

Etika penelitian diajukan ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran UNDIP/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor *Ethical Clearance* No. 549/EC/RSDK/2016.

