

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini memiliki ruang lingkup pada ilmu biokimia kedokteran dan farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Agustus 2018. Sampel penelitian diperoleh dari beberapa Posyandu Lansia di Semarang yaitu Posyandu Lansia Tegalsari, Genuk, Mahoni, dan Dewi Sartika. Pemeriksaan laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sedangkan Pemeriksaan Vitamin D dilakukan di Laboratorium Central Rumah Sakit Nasional Diponegoro, Semarang.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini berjenis *cross sectional* dimana dilakukan satu kali pengambilan data untuk kadar vitamin D dan kadar MDA plasma.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi

3.4.1.1 Populasi Target

Populasi target dari penelitian ini adalah lansia, yaitu orang yang berumur 60 tahun keatas.

3.4.1.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau dalam penelitian ini adalah lansia, yaitu orang yang berusia ≥ 60 tahun dan berjenis kelamin wanita yang terdapat di beberapa Posyandu Lansia di Semarang yaitu Posyandu Lansia Tegalsari, Genuk, Mahoni, dan Dewi Sartika.

3.4.2 Sampel

3.4.2.1 Kriteria Inklusi

1. Lansia berusia 60 tahun keatas
2. Mampu berkomunikasi
3. Bersedia ikut dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*

3.4.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Pernah atau sedang mendapat terapi kortikosteroid jangka panjang
2. Pengguna tetap suplementasi kalsium
3. Menderita infeksi akut
4. Perokok aktif

3.4.2.3 Cara Sampling

Penelitian ini menggunakan teknik *consecutive sampling*, yaitu salah satu teknik *non probability sampling* dimana semua subjek yang datang dan memenuhi

kriteria pemilihan dimasukkan dalam penelitian sampai jumlah subjek yang diperlukan terpenuhi.

3.4.2.4 Besar Sampel

Besar sampel diukur dengan menggunakan rumus besar sampel untuk penelitian analitis korelatif, yaitu :

$$n = \left(\frac{(Z\alpha + Z\beta)}{0,5 \ln \frac{1+r}{1-r}} \right)^2 + 3$$

$$n = \left(\frac{(1,96 + 1,28)}{0,5 \ln \frac{1+0,5}{1-0,5}} \right)^2 + 3$$

$$n = 34,79 + 3$$

$$n = 37,79$$

$$n = 38$$

Keterangan :

- Kesalahan tipe I ($Z\alpha$) = ditetapkan sebesar 5%, hipotesis dua arah, sehingga ($Z\alpha$) = 1,96.
- Kesalahan tipe II ($Z\beta$) = ditetapkan sebesar 10%, hipotesis dua arah, sehingga ($Z\beta$) = 1,28.
- Koefisien korelasi penelitian ditetapkan oleh peneliti (r) = 0,5.

Sehingga, besar sampel minimal yang digunakan untuk penelitian ini adalah minimal 38 sampel penelitian. Namun, berdasarkan pertimbangan peneliti, ditetapkan bahwa besar sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 40 sampel penelitian.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Kadar vitamin D plasma.

3.5.2 Variabel Terikat

Kadar MDA plasma.

3.6 Tabel Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Skala
Kadar Vitamin D	Kadar 25-(OH) vitamin D pada sampel berupa plasma darah yang diukur menggunakan metode ELISA (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>). Satuan: ng/ml	Numerik
Kadar MDA	Merupakan hasil sekunder radikal bebas yang diukur pada plasma darah lansia menggunakan metode TBARS. Satuan : nmol/L	Numerik

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Instrumen Penelitian

3.7.1.1 Alat

1. Spuit
2. tabung EDTA
3. Spektrofotometer
4. Cuvet
5. Mikropipet
6. Tabung Reaksi
7. Sentrifuge
8. Vortex
9. *waterbath*

3.7.1.2 Bahan

1. reagen ELISA
2. Larutan TCA 15 %
3. Larutan TBA 0,37% dalam HCL 0,25 N
4. larutan 1,1,3,3, Tetraetoxipropane (TEP) sebagai larutan standar
5. Aquades

3.7.2 Jenis Data

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini merupakan data primer. Data diperoleh langsung dari penelitian yang dilakukan oleh peneliti.

3.7.3 Cara Kerja

3.7.3.1 Prosedur Pemeriksaan Kadar Vitamin D Plasma

Status vitamin D ditentukan dengan cara mengukur konsentrasi 25(OH) Vitamin D plasma darah dengan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent assay*) sesuai dengan prosedur standar yang direkomendasikan (Abcam ab213966).³¹

Pemeriksaan Vitamin D dilakukan melalui tahapan sebagai berikut :

- a. siapkan komponen KIT, larutan konjugat, dan larutan buffer pencuci.
- b. Siapkan micropalte yang diperlukan dan susun ke dalam plate frame.
Kembalikan sisa microplate yang tidak digunakan kedalam kulkas.
- c. Siapkan pipet 25 μ L untuk masing-masing kalibrator, control dan serum/plasma sampel.kemudian masukkan kedalamsumur yang telah dilabeli sebnayak 2 kali. (1 sampel ada 2 sumur)
- d. Siapkan pipet 50 μ L untuk memasukkan incubation buffer kesetiap sumur.

Ketuk microplate gengan tangan secara gantle selama 10 detik untuk mencampurkan content dalam sumur

- e. Inkubasi microplate selama 60 menit pada suhu ruang di ruangan gelap (Tidak boleh dikocok)
- f. Cuci sumur sebanyak 3 kali, setiap kali pencucuan dengan 300 μ L wash buffer yang sudah diencerkan (step 1). Setelah dicuci, tap palte kembali dengan menggunakan kertas penyerap untuk menghilangkan

sisir cairan (Penggunaan mesin cuci otomatis direkomendasikan).

Kinerja pengujian ini sangat dipengaruhi oleh pelaksanaan prosedur pencucian dengan tepat

- g. Siapkan pipet 150 μ L untuk memasukkan larutan konjugat (Step 1) kesetiap sumur. Ketuk microplate dengan tangan secara gantle selama 10 detik untuk mencampurkan content dalam sumur.
- h. Inkubasi microplate selama 30 menit pada suhu ruang di ruangan gelap (Tidak boleh dikocok)
- i. Cuci sumur sebanyak 3 kali dengan menggunakan prosedur yang sama pada step 6.
- j. Siapkan pipet 150 μ L untuk memasukkan substrat TMB kesetiap sumur. (Penggunaan multichannel pipet sangat direkomendasikan).
- k. Ketuk microplate dengan tangan secara gantle selama 10 detik untuk mencampurkan content dalam sumur.
- l. Inkubasi microplate selama 10-15 menit pada suhu ruang di ruangan gelap (Tidak boleh dikocok)
- m. Siapkan pipet 50 μ L untuk memasukkan "*Stopping solution*" kesetiap sumur.
- n. Ketuk microplate dengan tangan secara gantle selama 10 detik untuk mencampurkan content dalam sumur.
- o. Ukur absorbansi semua sumur dengan micropalte reader pada panjang gelombang 450 nm selama 0-20 menit setelah penambahan *Stopping solution*.

- p. Intensitas warna yang telah terbentuk dari interaksi Antigen-Antibodi diukur dengan microplate reader hingga mendapatkan hasil berupa densitas optis (OD). Dengan menghitung rata-rata control negative yang digunakan, didapatkan nilai *cut-off* untuk menentukan hasil positif-negatif suatu sampel. Hasil OD yang berada dibawah nilai *cut-off* merupakan hasil negative, dan demikian sebaliknya.

3.7.3.2 Prosedur Pemeriksaan Kadar MDA Plasma

Metode yang dipakai untuk melakukan pemeriksaan kadar MDA pada penelitian ini adalah *thiobarbituric acid-reactive substances* (TBARS), dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Darah Vena sebanyak 3 cc dimasukkan ke dalam tabung sentrifus
- b. Sampel darah (3 cc) disentrifus pada kecepatan 3.500 rpm selama 10 menit, supernatant sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang kosong.
- c. Tambahkan dengan larutan TCA 15% sebanyak 2 ml.
- d. Tambahkan dengan larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N sebanyak 2 ml.
- e. Panaskan dalam *waterbath* pada suhu maksimal 95°C selama 15 menit
- f. Sentrifus selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm
- g. Ambil supernatant dan masukkan dalam cuvet
- h. Baca absorbansi supernatant dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm dengan blanko berupa TCA dan TBA.

- i. Lakukan juga pembacaan pada 2 panjang gelombang dibawah 545 nm dan diatas 545 nm
- j. Kemudian kadar MDA didapatkan kurva baku yang telah dibuat menggunakan larutan standar TEP.

3.7.3.3 Prosedur Pembuatan Larutan Standar MDA

- a. Buat larutan *stock solution* dengan konsentrasi 2 mM
- b. Selanjutnya larutan *stock solution* 2 mM diencerkan kembali menjadi konsentrasi 0,04 mM ,0,03 mM, 0,02 mM , 0,01 mM, 0,005 mM menggunakan rumus $M1.V1 = M2.V2$
- c. Ambil larutan standar TEP dalam berbagai konsentrasi tersebut ke dalam tabung reaksi sebangun 200 μ L
- d. Tambahkan dengan larutan TCA 15% sebanyak 2 ml.
- e. Tambahkan dengan larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N sebanyak 2 ml
- f. Panaskan dalam *waterbath* pada suhu maksimal 95°C selama 15 menit
- g. Sentrifus selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm
- h. Ambil supernatant dan masukkan dalam cuvet
- i. Baca absorbansi supernatant dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 545 nm dengan blanko berupa aquadest.

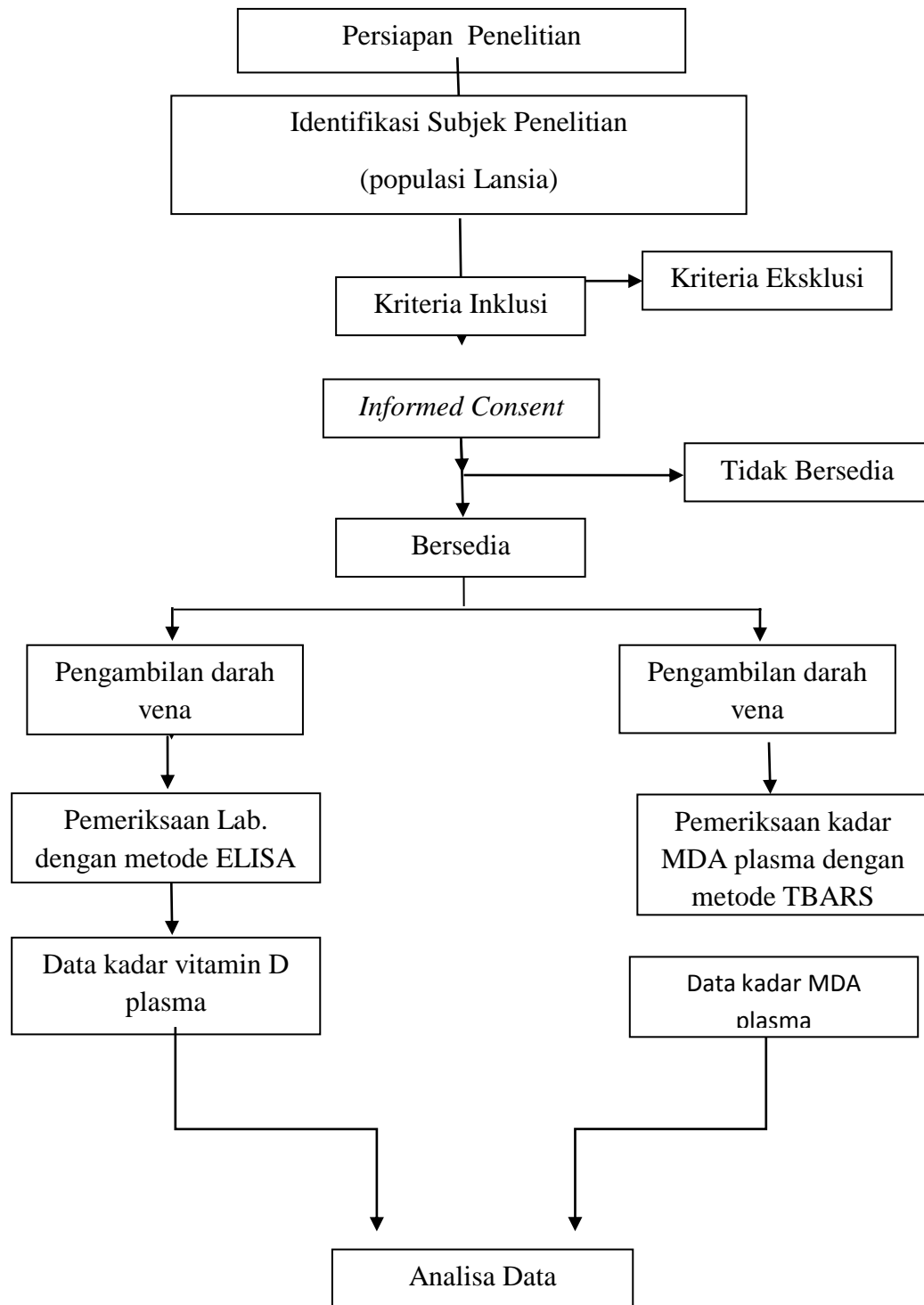
3.8 Analisis data

Data yang sudah terkumpul dicek kelengkapannya, selanjutnya data

tersebut diberi kode, ditabulasi, dan dimasukkan ke dalam program komputer SPSS 20.01. Data kemudian dianalisis secara statistik meliputi :

- 1) Analisis deskriptif untuk menampilkan nilai rerata dan simpang baku faktor demografis IMT, kadar vitamin D dan kadar MDA plasma dari semua sampel. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel..
- 2) Analisis bivariat untuk melihat hubungan antara 2 variabel berskala rasio. Data akan diuji normalitas distribusinya dengan uji statistik *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan < 50 sampel. Apabila data terdistribusi normal, maka digunakan uji statistik *Pearson*. Sedangkan apabila data tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji statistik *Spearman*. Kedua variabel dikatakan memiliki hubungan yang signifikan apabila diperoleh $p\text{-value} < 0,05$.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

3.10 Etika Penelitian

Ethical Clearance diperoleh atas persetujuan dan pertimbangan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan RSUP Dr. Kariadi Semarang. Calon subjek penelitian akan dimintakan persetujuan untuk mengikuti penelitian melalui penandatanganan *informed consent*. Seluruh data yang diperoleh peneliti akan dijaga kerahasiannya dan digunakan untuk kepentingan penelitian. Subjek penelitian yang memilih untuk tidak melanjutkan penelitian tidak menerima konsekuensi apapun.

3.11 Tabel Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5				Bulan 6			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Studi literature	■																			
2	Penyusunan proposal				■	■	■	■	■												
3	Seminar proposal					■	■	■	■												
4	Ethical clearance							■	■												
5	Perizinan instansi terkait									■	■	■	■								
6	Persiapan dan									■	■	■	■								

