

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Desain penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan pendekatan belah lintang (*cross sectional*)

##### **1.1. Ruang lingkup penelitian**

###### **1.1.1. Ruang lingkup ilmu**

Bidang yang diteliti adalah Ilmu Patologi Klinik sub bagian Hematologi dan Endokrinologi

###### **1.1.2. Ruang lingkup waktu**

Waktu penelitian dikerjakan pada bulan Juni- Juli 2016

###### **1.1.3. Ruang lingkup wilayah**

Pemeriksaan fisik, anamnesis, persetujuan *informed consent* untuk skrining sampel penelitian dilaksanakan di Posyandu Lansia Kecamatan Sokaraja kabupaten Banyumas.

#### **3.3. Populasi dan sampel**

##### **3.3.1. Populasi target**

Populasi target adalah usia lanjut

##### **3.3.2. Populasi terjangkau**

Usia lanjut di wilayah kecamatan Sokaraja kabupaten Banyumas yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

### **3.3.3. Sampel penelitian**

Sampel penelitian adalah usia lanjut di wilayah kecamatan Sokaraja kabupaten Banyumas yang datang ke posyandu lansia Desa Sokaraja Wetan dan bersedia ikut dalam penelitian ini, serta menandatangani *informed consent* serta memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang dilaksanakan pada bulan Juni 2016. Sampel penelitian dibagi menjadi dua kelompok yaitu usia lanjut dengan anemia dan non anemia

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

1. Pria
2. Umur  $\geq 60$  tahun
3. Tekanan darah normal (sistole  $<130$  dan diastole  $<100$ )

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

1. Riwayat hipertensi
2. Penyakit ginjal kronik
3. Diabetes Mellitus
4. *Congestive heart failure*
5. Penyakit hepar
6. Suplemen vitamin D
7. Sampel hemolisis
8. Sampel lipemik
9. Terdapat bekuan dalam sampel darah

### 3.4. Cara pengambilan subjek penelitian

Pengambilan subjek penelitian dilakukan secara *consecutive sampling*, dimana setiap sampel yang ada pada saat pengambilan data bila memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dimasukan sebagai sampel. Sampel diambil sampai memenuhi jumlah sampel minimal

#### 2.3.1 Besar sampel

Rumus besar sampel uji beda rerata dua kelompok digunakan untuk membuktikan perbedaan kadar 25-hydroxyvitamin D, jumlah leukosit, NLR dan CRP pada usia lanjut dengan anemia dan non anemia. Rumus besar sampel adalah sebagai berikut:<sup>74</sup>

$$n_1 = n_2 = 2 \left[ \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)s}{(x_1 - x_2)} \right]^2$$

Apabila kesalahan tipe I ( $\alpha$ ) ditetapkan sebesar 0,05 dan kesalahan tipe II ( $\beta$ ) ditetapkan sebesar 0,2, power penelitian 95%, maka nilai  $Z_\alpha = 1,96$  dan  $Z_\beta = 1,645$ . S merupakan simpang baku kedua kelompok dan  $x_1 - x_2$  merupakan perbedaan klinis yang diinginkan diambil berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Todd S (2011).<sup>3</sup> Besarnya simpang baku sebesar 14,8 dan perbedaan klinis yang diinginkan sebesar 20.

Perhitungan besar sampel adalah:

$$n_1 = n_2 = 2 \left[ \frac{(1,96 + 1,645) 14,8}{20} \right]^2$$
$$= 14,19 \approx 15$$

Berdasarkan perhitungan di atas dibutuhkan besar sampel untuk masing-masing kelompok minimal 15 orang.

### **3.5. Variabel penelitian dan definisi operasional variabel**

#### **3.5.1. Variabel bebas**

anemia dan non anemia

#### **3.5.2. Variabel tergantung**

*25-hydroxyvitamin D*

Jumlah leukosit

NLR

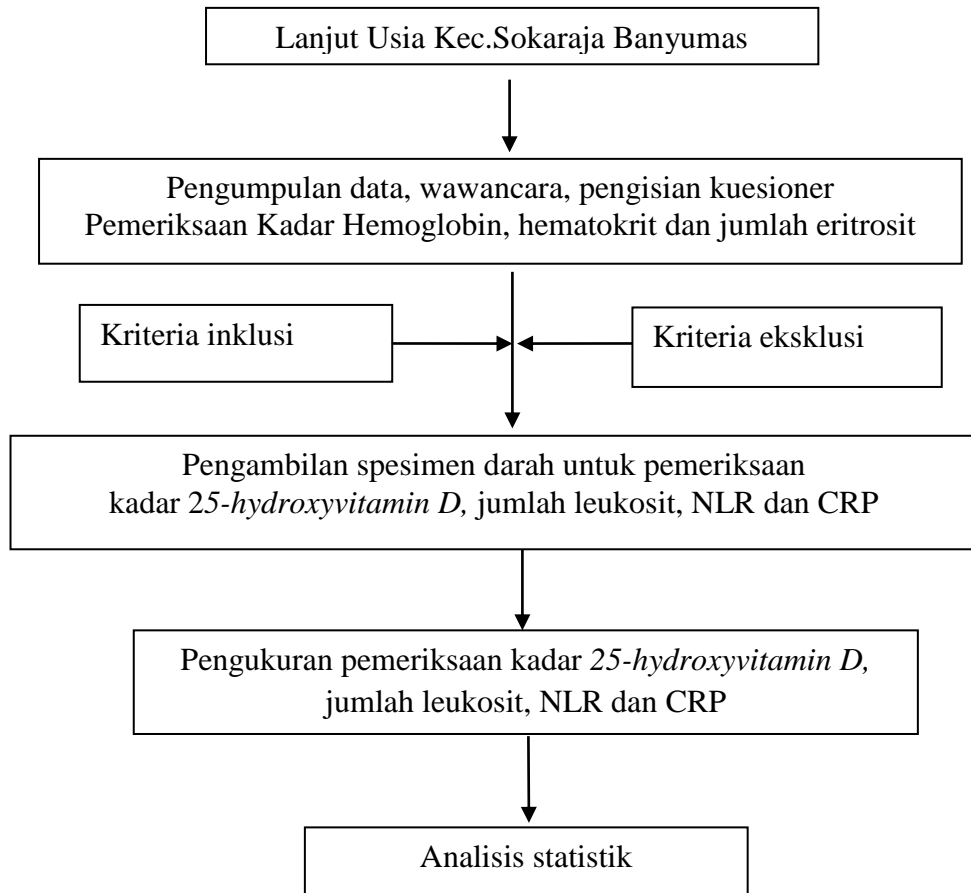
CRP

### 3.5.3. Definisi operasional

Tabel 5. Definisi operasional variabel dan pengukuran

No	Definisi operasional variable	Skala
1.	Anemia adalah kadar hemoglobin < 13,5 gr/dl (pria), hematokrit < 36%, jumlah eritrosit < 4 x 10 <sup>6</sup> /uL	nominal
2.	Non anemia adalah kadar hemoglobin >13,5 gr/dl (pria), hematokrit > 36%, jumlah eritrosit > 4 x 10 <sup>6</sup> /uL	nominal
3.	Kadar <i>25-hydroxyvitamin D</i> adalah kadar <i>25-hydroxyvitamin D</i> dalam serum yang diperiksa dengan metode ELISA dinyatakan dalam satuan ng/ml Nilai rujukan kadar 25-hydroxyvitamin D: 1. Defisiensi : <20ng/ml 2. Insufisiensi : 20-30ng/ml 3. Normal : >30ng/ml	rasio
4.	Jumlah leukosit adalah jumlah leukosit dalam plasma EDTA yang diperiksa dengan menggunakan metoda <i>flowcytometer</i> dinyatakan dalam satuan uL	rasio
5.	NLR adalah hasil persentase neutrofil dan persentase limfosit yang dihitung dengan hematologi analiser. Metode yang digunakan flowsitometri. Hasil NLR didapatkan dari pembagian ANC dibagi dengan ALC	rasio
6.	Kadar CRP adalah kadar CRP dalam serum yang dideteksi dengan metode <i>high sensitive-CRP</i> ELISA dinyatakan dalam satuan mg/L	rasio

### 3.6. Alur penelitian



### 3.7. Cara pengumpulan data

1. Data penelitian dikumpulkan dari anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium dan wawancara menggunakan kuisisioner yang telah disiapkan sebelumnya. Informasi tentang usia, jenis kelamin, sakit ginjal, suplementasi vitamin D, diabetes melitus, sakit jantung didapatkan dari hasil wawancara dan rekam medis di puskesmas. Informasi tentang kadar *25-hydroxyvitamin D*, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP didapatkan dari hasil pemeriksaan laboratorium.

## 2. Pemeriksaan laboratorium

Pengambilan spesimen dilakukan pada pagi hari, sampel diambil dari *vena mediana cubiti* sebanyak 10 cc, dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* dengan antikoagulan EDTA 3 cc untuk pemeriksaan jumlah leukosit dan NLR, tabung *vacutainer* tanpa koagulan sebanyak 7 cc untuk pemeriksaan *25-hydroxyvitamin D* dan CRP di laboratorium GAKI. Proses transport spesimen serum yang akan diperiksa ke laboratorium GAKI dilakukan dengan kontainer pada suhu 4-8<sup>0</sup>C (menggunakan *coolpacks*).

3. Dilakukan analisis statistik menggunakan SPSS pada kedua kelompok tersebut untuk menilai perbedaan kadar *25-hydroxyvitamin D*, jumlah leukosit, NLR dan CRP antara anemia dan non anemia pada usia lanjut.

## **3.8. Prosedur pemeriksaan darah**

### **3.8.1. Prosedur pemeriksaan jumlah leukosit dan NLR**

1. Persiapan pasien : tidak perlu persiapan khusus
2. Spesimen darah dalam antikogulan EDTA
3. Metode pemeriksaan : Flowsitometri

Alat :

- Mindray BC5200
- Tabung EDTA

Bahan:

- Spesimen darah

Cara pemeriksaan:

1. Siapkan semua alat hematologi analiser, standar kerja, dan sampel sesuai petunjuk dalam bagian sebelumnya
2. Homogenkan plasma EDTA
3. Masukkan dalam hematologi analiser
4. Proses dengan mesin analiser
5. Baca hasil

### **3.8.2. Prosedur pemeriksaan kadar 25-hydroxyvitamin D<sup>75,76</sup>**

1. Waktu sampling : pagi hari
2. Spesimen darah beku
3. Metode pemeriksaan : quantitative sandwich enzyme immunoassay

Bahan:

- Reagen 25-hydroxyvitamin D

Alat :

- *Microplate reader* yang mampu mengukur pada absorbansi 450 nm, dengan koreksi pada panjang gelombang 540 nm atau 570 nm
- *Micropipette* and tips.
- Air suling
- *Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.*
- Gelas silinder ukuran 50 mL and 500 mL
- *Shaker* dengan kecepatan tetap  $500 \pm 50$  rpm.
- Tabung uji dilusi standard dan sampel



Cara pemeriksaan :

1. Siapkan semua reagen, standar kerja, dan spesimen sesuai petunjuk dalam bagian sebelumnya.
2. Menambahkan 10 uL *25-hydroxyvitamin D* standar, kontrol dan spesimen ke masing-masing sumur.
3. Menambahkan 200 uL substrat solusi reagen *25-hydroxyvitamin D* ke masing-masing sumur.
4. Mencampur isi sumur selama 20 detik menggunakan shaker piring di 200-400RPM tutup dengan strip perekat yang tersedia, inkubasi pada suhu ruang selama 90 menit.
5. Membuka strip perekat dan membuang isi sumur pada tempat limbah.
6. Menambahkan *Wash Buffer* (300 uL) ke masing-masing sumur dan cuci, ulangi proses tiga kali. Setelah mencuci terakhir, hilangkan sisa *Wash Buffer* dengan aspirasi atau dekantasi. *well* di balik dan hapus sisa air dengan kertas tisu yang bersih.
7. Menambahkan 200 uL *enzyme conjugate (Streptavidin-HRP)* ke dalam masing-masing sumur. Tutup dengan strip perekat baru. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.
8. Membuka strip perekat dan membuang isi sumur pada tempat limbah
9. Mengulangi proses pencucian seperti pada langkah 6.
10. Tambahkan 200 uL substrat TMB untuk masing-masing dengan sumur. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar . Lindungi dari cahaya.

11. Menambahkan 50 uL *Stop Solution* untuk menghentikan reaksi enzimatis. Mencampur dalam plate selama 20-30 detik.
12. Mengukur absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450nm

### **3.8.3. Prosedur pemeriksaan CRP**

Pemeriksaan CRP menggunakan pemeriksaan kuantitatif CRP secara sandwich *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Keterbatasan tes ini apabila didapatkan sampel serum yang gross lipemik atau gross hemolisis. Antibodi monoklonal spesifik untuk CRP sebelumnya dilapisi ke microplate. Standar dan sampel dipipet ke dalam well jika terdapat CRP maka akan diikat antibodi. Setelah pencucian substansi yang tidak berikatan, sebuah anti monoklonal spesifik berlabel enzim/ *enzyme-linked monoclonal antibody specific* untuk CRP ditambahkan ke dalam well dan warna yang terbentuk secara proporsional menunjukkan jumlah CRP yang berikatan pada tahap awal. Pembentukan warna dihentikan dengan stopping reagent dan intensitas warna dibaca dengan microplate reader dengan panjang gelombang 450 nm.

### **3.9. Analisis data**

Data dikumpulkan meliputi hasil wawancara, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium. Data yang terkumpul dilakukan *coding, entry, cleaning, editing*. Uji normalitas data dengan *Saphiro Wilk* dan dilanjutkan uji beda dengan uji *Mann Whitney* karena data tidak terdistribusi normal,

untuk menilai perbedaan kadar *25-hydroxyvitamin D*, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP. Signifikansi dinyatakan pada  $p < 0,05$ .

### **3.10. Etika penelitian**

Penelitian dilakukan setelah mendapat *ethical clearance* no 725/EC/FK-RSDK/2016 dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP dr Kariadi Semarang. Seluruh subyek penelitian diminta persetujuannya dengan menandatangani *informed consent* secara tertulis. *Informed consent* diperoleh dari subyek penelitian. Identitas subyek penelitian dirahasiakan dan seluruh biaya yang berhubungan dengan penelitian menjadi tanggung jawab peneliti. Seluruh calon subyek penelitian diberikan penjelasan lengkap tentang tujuan, manfaat dan prosedur penelitian. Subyek penelitian berhak menolak untuk diikutsertakan dalam penelitian