

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *Cross Sectional* yang membedakan hasil pemeriksaan kadar kolesterol dan trigliserida menggunakan sampel serum (dengan *clot activator*) dan plasma (dengan antikoagulan EDTA) dengan menggunakan eksperimen.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan April 2019

2. Tempat Penelitian

Tempat penelitian adalah di Laboratorium Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi Penelitian

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dibagi menjadi dua yaitu populasi target yang ditentukan oleh karakteristik klinis dan demografis, dan populasi terjangkau yang merupakan bagian populasi target yang dibatasi tempat dan waktu.

Populasi target dalam penelitian ini adalah pasien rawat inap yang baru masuk di Rumah Sakit Jiwa Daerah Surakarta, sedangkan populasi terjangkau adalah pasien rawat inap yang masuk pada bulan April 2019.

2. Sampel Penelitian

Sampel adalah sebagian dari populasi yang ciri-cirinya diteliti atau diukur, dipilih dengan menggunakan prosedur tertentu dan keberadaannya diharapkan mampu mewakili populasi yang sebenarnya (Sabri, 2014).

Sampel dalam penelitian ini adalah pasien yang baru masuk rawat inap di Rumah Sakit Jiwa Daerah Surkarta pada bulan april 2019 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Pengambilan sampel dengan teknik *Purposive sampling* yaitu teknik pengambilan sampel yang dilakukan dengan cara mengambil subyek bukan didasarkan atas strata, random, atau daerah tetapi berdasarkan atas adanya tujuan tertentu dan dengan pertimbangan tertentu misalnya keterbatasan waktu, tenaga, dan dana.

Perhitungan jumlah sampel ditetapkan dengan rumus:

$$S = \frac{\epsilon^2 \cdot N \cdot P \cdot Q}{d^2 \cdot (N-1) + \epsilon^2 \cdot P \cdot Q}$$

Keterangan

S= Ukuran sampel

N= Ukuran populasi

ϵ^2 = Nilai table *chi kuadrat* dengan dK=1, taraf kesalahan 5% =3,481

P= Proporsi dalam populasi

$$Q=0,5$$

$$d^2 = \text{Ketelitian (error)} 0,05$$

Berdasarkan rumus di atas, maka besarnya sampel minimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$S = \frac{3,481 \times 45 \times 0,5 \times 0,5}{0,05^2 \times (45-1) + 3,481 \times 0,5 \times 0,5}$$

$$S = \frac{3,481 \times 45 \times 0,5 \times 0,5}{0,05^2 \times (45-1) + 3,481 \times 0,5 \times 0,5}$$

$$S = \frac{39,16125}{0,98025}$$

$$S = 39,95 \rightarrow \text{Sampel batas minimal} = 40 \text{ sampel}$$

Sampel yang diambil pada penelitian ini adalah 40 sampel. Sehingga sudah memenuhi kriteria sampel minimal yang diperlukan.

a. Kriteria Inklusi

Sampel pasien usia > 40 tahun yang melakukan pemeriksaan laboratorium kolesterol dan trigliserida

b. Kriteria Eksklusi

- Sampel serum/plasma ikterik
- Sampel serum/plasma hemolis
- Sampel serum/plasma lipemik

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (Independent)

Variabel bebas adalah variable yang bila berubah akan mengakibatkan perubahan variabel lain (Prasetyo, 2013)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah serum dan plasma EDTA

2. Variabel Terikat (Dependent)

Variabel terikat adalah variable yang diakibatkan atau dipengaruhi oleh variabel bebas (Prasetyo, 2013)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol dan trigliserida.

3. Definisi Operasional

a. Kolesterol

- Pengertian

Kolesterol adalah lemak berwarna kekuningan dan berbentuk seperti lilin yang diproduksi oleh tubuh manusia terutama di dalam hati. Bahan makanan yang mengandung kolesterol berasal dari organ binatang, terutama pada bagian otak, kuning telur dan jeroan, tetapi bahan makanan yang bersumber dari tumbuhan tidak mengandung kolesterol (Nilawati, 2008).

- Pemeriksaan dengan metode *Enzymatic photometric* test “CHOD-PAP” dengan Alat Biolis 24i Premium
- Nilai Rujukan

Normal : ≤ 200 mg/dL

Batas Resiko Tinggi : 200 – 240 mg/dL

Resiko Tinggi : ≥ 240 mg/dl

- Skala Pengukuran : Rasio

b. Trigliserida

- Pengertian

Trigliserida merupakan salah satu jenis lemak di dalam tubuh yang di dalam cairan darah dikemas dalam bentuk partikel lipoprotein. Lipoprotein yang mengandung trigliserida adalah kilomikron. Trigliserida adalah ester gliserol, atau suatu alkohol trihidrat dan asam lemak yang tepatnya disebut triasilgliserol. Bila ketiga asam lemak di dalam trigliserida adalah asam lemak yang sama dinamakan asam lemak trigliserida campuran (Rorod, 2011)

- Pemeriksaan dengan metode *Enzymatic photometric* test “GPO-PAP” dengan Alat Biolis 24i Premium
- Nilai Rujukan

Normal : < 200 mg/dL

Batas Resiko Tinggi : 200 – 400 mg/dL

Tinggi : > 400 mg/dl

- Skala Pengukuran : Rasio

c. Serum

- Pengertian

Serum adalah bagian dari sel darah yang dibiarkan menggumpal dan disentrifugasi. Serum adalah plasma yang tidak memiliki faktor pembekuan di dalamnya, karena faktor pembekuan ini telah digunakan pada gumpalan darah yang terbentuk di dalam tabung. Tabung tanpa antikoagulan dapat digunakan untuk penampung sampel uji menggunakan serum. Tabung ini meliputi tabung dengan tutup merah yang mengandung gel triksotropik dan aktivator pembekuan (Lieske & Ziebig. 2014).

d. Plasma EDTA

- Pengertian

Plasma merupakan bagian yang cair dari darah yang ditambahkan antikoagulan (anti pembekuan darah), antikoagulan dapat menjaga darah tetap cair di luar sistem vaskuler. Antikoagulan juga dapat mencegah sebagian besar koagulasi dengan membuang ion-ion kalsium atau mengkelasinya. Golongan dari antikoagulan kelasi yaitu sitrat, oksalat, dan EDTA. Sedangkan heparin berfungsi mencegah koagulasi dengan menghambat thrombin. Akan tetapi antikoagulan heparin tidak berpengaruh terhadap konsentrasi kalsium (Sacher, 2012).

E. Bahan dan Alat

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan adalah:

- a. Serum
- b. Plasma darah
- c. Reagen kolesterol
- d. Reagen trigliserida

2. Alat Penelitian

- a. Jarum *vacutainer*
- b. *Tube Holder*
- c. *Alcohol swab*
- d. Plester
- e. *Torniquet*
- f. Tabung Serum (tutup merah)
- g. Tabung EDTA (tutup ungu)
- h. *Cup sample*
- i. *Blue tip*
- j. Biolis 24i premium

F. Cara Kerja

1. Prosedur pengambilan darah vena

Langkah-langkah pengambilan darah vena:

- a. Menyiapkan tabung dan peralatan yang sesuai untuk prosedur plebotomi
- b. Mencuci tangan dan memakai sarung tangan
- c. Memasang *tourniquet* pada lengan atas, dan pasien diminta mengepal agar vena jelas terlihat
- d. Membersihkan tempat tusukan dengan *alcohol swab* dan biarkan sampai kering
- e. Meregangkan kulit di atas vena dengan jari-jari tangan kiri supaya posisi vena stabil
- f. Menusuk kulit dengan jarum *vacutainer* dengan tangan kanan sampai ujung jarum masuk ke dalam lumen vena. Jika sudah tepat maka akan terlihat darah yang mengalir masuk pada area indikator jarum
- g. Masukkan tabung merah ke jarum *vacutainer* melewati *tube holder*, biarkan darah mengalir ke tabung vacuum sampai volume maksimal
- h. Menarik ke luar tabung merah, selanjutnya masukkan tabung ungu, biarkan sampai darah berhenti mengalir
- i. Melepas *tourniquet*, selanjutnya letakkan *alcohol swab* di atas ujung karum, dan secara perlahan jarum ditarik keluar
- j. Tabung ungu dibolak balik 5-6 kali secara perlahan untuk menghomogenkan antikoagulan

- k. Bekas tusukan kemudian diplester.

2. Prosedur pembuatan serum dan plasma

- a. Tabung *vacutainer* yang sudah terisi darah diletakkan di rak dengan posisi vertikal, kemudian dibiarkan kurang lebih 10 menit, atau sampel darah tanpa antikoagulan membeku
- b. Masukkan dalam sentrifus kemudian diputar dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit
- c. Cairan bagian atas yang bening berwarna kekuningan adalah sampel plasma dan serum

3. Prosedur Pemeriksaan Kolesterol

- a. Metode

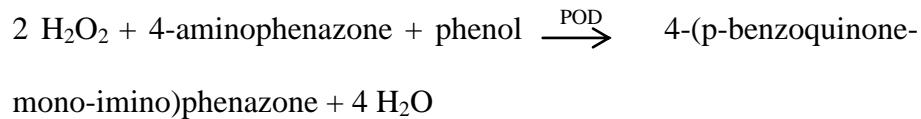
Enzymatic photometric test “CHOD-PAP”

- b. Prinsip:

Kolesterol ester diura menjadi kolesterol dan asam lemak menggunakan enzim kolesterol esterase. Kolesterol yang terbentuk kemudian diubah menjadi *Cholesterol-3-one* dan hydrogen peroksida oleh enzim kolesterol oksidase. Hidrogen peroksida yang terbentuk beserta fenol dan 4-aminoantipirin oleh peroksidase diubah menjadi zat yang berwarna merah. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi kolesterol total dan dibaca pada panjang gelombang 520 nm.

- c. Reaksi





d. Reagen Kolesterol

Reagen Kolesterol yang diapakai adalah reagen kit DiaLINE dengan komposisi:

Good's buffer, pH 6,7, Phenol, 4-aminophenazon, Cholesterol esterase (CHE), Cholesterol Oxidase (CHO), Peroxidase (POD),

e. Prosedur Pemeriksaan

Panjang gelombang : 500nm, Hg 546 nm

Kuvet : 1 cm *light path*

Temperatur : 20-25°C/37°C

f. Prosedur pengoperasian alat Biolis 24i Premium

- 1) Alat dihidupkan sampai muncul menu utama
- 2) Klik order pada menu utama
- 3) Pilih tray dengan klik tanda panah yang ada ditengah-tengah gambar tray sampel.
- 4) Isi kolom ***TRAY – S.No**** ** sesuai nomor sampel pada sampel tray lalu tekan ***enter***.
- 5) * menunjukkan nomor tray sampel dan ** menunjukkan nomor sampel
- 6) Masukkan data pasien (nama pasien, ID dst)

- 7) Pilih nama tes lalu klik **order**
- 8) Lanjutkan order sampel berikutnya
- 9) Setelah selesai, klik **exit** untuk kembali ke menu utama
- 10) Susun sampel pada tray lalu klik start untuk memulai running pasien
- 11) Setelah sampling untuk semua test selesai akan terdengar pesan suara “**sampling has been completed**”
- 12) Klik ok untuk menghilangkan pesan
- 13) Sampling stop artinya proses pengambilan sampel sudah selesai dan dapat dilakukan penggantian rak sampel.
- 14) Setelah semua test selesai terdengar pesan suara “**analysis has been completed**”
- 15) Klik ok untuk menghilangkan pesan
- 16) Pada Biolis 24i premium untuk sampel tray di setting dengan menggunakan software.

4. Prosedur Pemeriksaan Trigliserida

a. Metode:

Enzymatic colorimetric test “GPO-PAP”

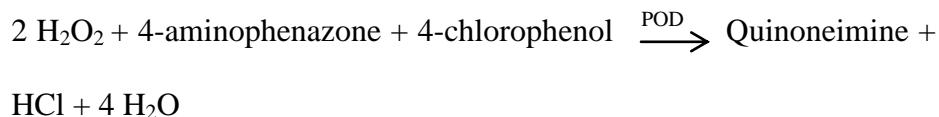
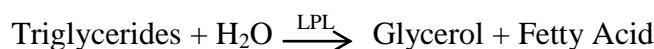
b. Prinsip

Trigliserida dihidrolisis oleh enzim lipase menjadi gliserol dan asam lemak, gliserol yang terbentuk dikonversi menjadi gliserol-3-fosfat oleh enzim gliserol kinase. Gliserol-3-fosfat ini kemudian diubah menjadi dihidroksiaseton dan hydrogen peroksida yang terbentuk

bersama dengan 4-klorofenol oleh enzim peroksidase diubah menjadi 4-(p-benzoquinon-monoimino)-fenazone yang berwarna merah.

Kelemahan metode ini, proses hidrolisis trigliserida tidak selalu optimal terutama jika menghidrolisis trigliserida dengan asam lemak yang lebih dari 16 rantai karbon, tidak semua reagen komersil yang tersedia menghidrolisis secara sempurna. Karena enzim ini juga menghidrolisis mono dan digliserida, maka dapat meningkatkan jumlah trigliserida. Walaupun jumlahnya hanya sekitar 3%.

c. Reaksi



d. Reagen Trigliserida

Reagen Trigliserida yang diapakai adalah reagen kit DiaLINE dengan komposisi:

Good's buffer, pH 7,2, 4-chlorophenol, ATP, Mg^{2+} , Glycerokinase (GK), Peroxidase (POD), Lipoprotein Lipase (LPL), 4-aminophenazone, Glycerol-3-phosphate-oxidase (GPO)

e. Prosedur Pemeriksaan

Panjang gelombang : 500nm, Hg 546 nm

Kuvet : 1 cm *light path*

Temperatur : 20-25°C/37°C

- k. Prosedur Pengoperasian AlatBolis 24i premium
 - 1) Alat dihidupkan sampai muncul menu utama
 - 2) Klik order pada menu utama
 - 3) Pilih tray dengan klik tanda panah yang ada ditengah-tengah gambar tray sampel.
 - 4) Isi kolom **TRAY – S.No*** ** sesuai nomor sampel pada sampel tray lalu tekan **enter**.
 - 5) * menunjukkan nomor tray sampel dan ** menunjukkan nomor sampel
 - 6) Masukkan data pasien (nama pasien, ID dst)
 - 7) Pilih nama tes lalu klik **order**
 - 8) Lanjutkan order sampel berikutnya
 - 9) Setelah selesai, klik **exit** untuk kembali ke menu utama
 - 10) Susun sampel pada tray lalu klik start untuk memulai running pasien
 - 11) Setelah sampling untuk semua test selesai akan terdengar pesan suara “**sampling has been completed**”
 - 12) Klik ok untuk menghilangkan pesan
 - 13) Sampling stop artinya proses pengambilan sampel sudah selesai dan dapat dilakukan penggantian rak sampel.
 - 14) Setelah semua test selesai terdengar pesan suara “**analysis has been completed**”

- 15) Klik ok untuk menghilangkan pesan
- 16) Pada Biolis 24i premium untuk sampel tray di setting dengan menggunakan software.

G. Analisis Data

Data yang telah terkumpul dianalisis secara statistik menggunakan *Statistical package for the social science* (SPSS). Sebelum dilakukan analisis data, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas untuk mengetahui apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas menggunakan *Sapiro Wilk* dikarenakan jumlah sampel yang dilakukan uji kurang dari 50. Data tergolong terdistribusi normal apabila nilai $p > 0,05$. Selanjutnya jika data terdistribusi normal, maka dilanjutkan uji *Paired sample t Test*. Uji *Paired sample t test* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan sampel berpasangan yang berasal dari subjek yang sama. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara hasil pemeriksaan Kolesterol dan Trigliserida antara sampel dengan antikoagulan dan tanpa antikoagulan EDTA. Tetapi apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal maka dilakukan analisa dengan menggunakan uji *Wilcoxon*.

H. Kerangka Alur Penelitian

