

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik dengan desain *cross sectional* (studi potong lintang) yang bertujuan mengetahui kadar kolesterol HDL dan Trigliserida pada individu obese dengan IgG *T. gondii* yang positif.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Penduduk Kelurahan Kotalama Kecamatan Kedungkandang Kota Malang.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah individu obese dengan ataupun tanpa sindroma metabolik. Estimasi besar sampel diperoleh berdasarkan Laporan Riskesdas tahun 2007 yang menyebutkan bahwa prevalensi obese pada penduduk usia dewasa di Malang sebesar 17,8% (Depkes, 2007).

Rumus yang digunakan untuk menghitung besar sampel minimal adalah sebagai berikut:

$$N = \frac{Z\alpha^2 \times P \times Q}{d^2}$$

Keterangan:

- $Z\alpha$ = derivat baku alfa (1,96)
 P = proporsi variabel yg diteliti (0,17)
 Q = 1-P (0,83)
 d = presisi (0,1)

Berdasarkan rumus tersebut diperoleh besar sampel minimal adalah 54 orang, sehingga pada penelitian ini digunakan sampel individu obese sebesar 56 orang. Teknik sampling yang digunakan adalah *Cluster Random Sampling* dengan populasi penduduk di Kelurahan Kotalama Kecamatan Kedungkandang Kota Malang.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di dua tempat yaitu Laboratorium Sentral RS Saiful Anwar Malang dan Laboratorium Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan April sampai dengan September 2012.

4.4 Definisi Operasional

1. Individu Obese

Untuk pemilihan sampel obese menggunakan *Body Mass Index* (BMI) dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Berat Badan (kg)}}{\text{Tinggi Badan}^2 \text{ (m)}}$$

Penderita disebut obese berdasarkan kriteria WPRO (2000). Kriteria ini merupakan kriteria WHO yang telah disesuaikan untuk pengukuran BMI orang Asia termasuk Indonesia. Penderita disebut obese bila BMI lebih dari 29.

2. Individu dengan Sindroma Metabolik

Kriteria Sindroma Metabolik diambil dari *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP ATP III)* tahun 2001, terdapat tiga ciri utama kriteria sindroma metabolik, yaitu :

- Lingkar perut pada laki-laki lebih dari 102 cm dan lebih dari 88 cm pada perempuan.
- Kadar Trigliserida darah lebih dari 150 mg/dl.
- HDL kolesterol lebih rendah dari 40 mg/dl pada laki laki dan 50 mg/dl pada perempuan.
- Tekanan darah diatas 130/85 mmHg.
- Gula darah puasa lebih dari 110 mg/dl.

3. Kolesterol HDL adalah lipoprotein yang lebih besar disebut lipoprotein dengan daya larut tinggi. Kadar HDL normal adalah lebih tinggi dari 40 mg/dl pada perempuan dan lebih dari 50 mg/dl pada laki-laki.

4. Trigliserida adalah salah satu jenis lemak yang dibawa dalam aliran darah dan juga merupakan zat yang disimpan di dalam jaringan sebagai hasil dari konversi sebagian besar jenis lemak di dalam tubuh. Kadar Trigliserida normal adalah dibawah 150 mg/dl.

4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.5.1 Kriteria Inklusi

1. Jenis kelamin: laki-laki dan perempuan
2. Usia > 21 tahun
3. BMI > 25 kg/m²
4. Ukuran lingkar pinggang, laki-laki > 90 cm, perempuan > 80 cm

5. Bersedia menjadi peserta penelitian dengan menandatangani surat persetujuan penderita atas kesadaran sendiri (*informed consent*)

4.5.2. Kriteria eksklusi

1. Wanita hamil atau menyusui
2. Wanita yang menggunakan kontrasepsi hormonal

4.6 Prosedur Penelitian

1. Penentuan Sampel Obese

Individu obese ditentukan berdasarkan BMI, dimana bila BMI lebih dari 29 dikatakan sebagai obese. Penderita yang sudah memenuhi kriteria inklusi untuk obese dilakukan wawancara lebih dulu mengingat tujuan penelitian ini adalah mengetahui kadar kolesterol HDL, Trigliserida, dan IgG *Toxoplasma gondii* pada individu obese, sehingga perlu dilakukan pemilihan ulang mengingat banyaknya penyebab obesitas.

Individu obese yang digunakan sebagai sampel harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

- Berasal dari tingkat sosio-ekonomi yang rendah (mengingat infeksi *Toxoplasma* banyak terjangkit pada masyarakat dengan sosio-ekonomi yang rendah)
- Tidak sedang menggunakan KB hormonal (suntik/ pil/ susuk) dalam waktu 3 tahun terakhir
- Tidak berasal dari keluarga dengan riwayat genetik obese (yakni dengan menanyakan BB anggota keluarga lain, terutama ayah dan ibunya).

- Konsumsi makanan rata-rata per hari tidak berlebihan (dengan asumsi makan tidak lebih dari 3 kali per hari dengan porsi standard orang Indonesia).

2. Pengambilan darah penderita obese

- Pasang tourniquet pada lengan 7.5-10 cm di atas lipat siku atau bagian yang akan dilakukan tusukan vena (venipuncture), palpasi vena atau pilih vena yang besar dan tidak mudah bergerak (utamakan bagian tengah) dan tidak boleh pada proksimal tempat infus, jaringan parut, hematoma, atau limfostasis)
- Lepaskan tourniquet untuk sementara dan bersihkan area vena yang akan ditusuk dengan kapas alkohol 70% dengan gerakan memutar dari tengah ke tepi, biarkan selama 30 detik untuk pengeringan alkohol.
- Pasang kembali tourniquet.
- Tusukkan jarum ke vena yang telah didesinfeksi dengan posisi lubang jarum menghadap ke atas dengan sudut 12-30 °.
- Segera lepaskan tourniquet setelah darah mengalir, biarkan pasien membuka genggamannya.
- Isi tabung hingga batas yang ditetapkan (5 ml)
- Lepaskan tabung dari jarum.
- Lepaskan jarum dari tempat tusukan vena, segera tekan dengan kapas selama 3-5 menit.
- Plester bagian venipuncture dan lepas setelah 15 menit.
- Lepaskan jarum dari *holder* dan buang ke dalam wadah limbah jarum.

- Setelah itu darah dimasukkan dalam *vacutainer*, dan disentrifugasi untuk mendapatkan plasmanya.
3. Cara pemeriksaan kadar IgG *T.gondii* (*The NovaTec Toxoplasma gondii IgG-ELISA RE57101*)
- Sumuran yang telah di *coated* sebelumnya dengan antigen *T. gondii* yang telah dilemahkan kemudian ditambahkan serum subyek supaya terjadi ikatan dengan antibodi pada serum.
 - Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
 - Setelah dilakukan pencucian 3 kali, lalu ditambahkan *horseradish peroxidase* (HRP) yang sudah dilabel dengan anti human IgG *conjugate*, kemudian diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 30 menit. Konjugat ini akan mengikat antibodi spesifik *T. gondii* yang telah tertangkap.
 - Tambahkan *Tetramethylbenzidine* (TMB) yang memberikan warna biru, kemudian diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 15 menit.
 - Intensitas warna biru produk ini sebanding dengan jumlah antibodi IgG spesifik *T. gondii* dalam spesimen.
 - Asam sulfur ditambahkan sebagai *stop solution* untuk menghentikan reaksi. Hal ini menghasilkan warna akhir kuning.
 - Pengukuran absorbansi dapat dibaca 30 menit setelah pemberian *stop solution* pada 450/620 nm menggunakan ELISA *microwell plate reader*. Hasil yang didapat kemudian diplotkan pada kurva standar untuk mendapatkan kadar antibodi IgG *T. gondii*
 - Hasil dalam satuan IU/ml

4. Pemeriksaan kolesterol HDL menggunakan metode *homogeneous enzymatic colorimetric test*:

- Eritrosit dari kapiler atau sampel darah vena dipisahkan dari plasma dengan sentrifugasi.
- Sampel plasma diencerkan dengan *buffer* fosfat.
- Tes HDL menggunakan metode presipitasi dengan Mg^{2+} dan asam fosfotungstat sebagai pereaksi pengendap.
- Semua komponen kecuali kolesterol HDL diendapkan.
- Sistem menentukan kolesterol total dan kolesterol HDL dengan metode enzimatik.
- Ester kolesterol dalam sampel dihidrolisis menjadi kolesterol dan lemak asam. Kolesterol dan kolestenone menghasilkan NAD^+ dan $NADH$ yang diubah oleh dehidrogenase kolesterol.
- WST8 dikurangi menjadi pewarna formazan oleh diaphorase dan $NADH$ melalui reaksi reduksi oksidasi.
- Warna intensitas formazan diukur pada panjang gelombang tertentu dari 460 nm dan berbanding lurus dengan konsentrasi kolesterol HDL dan jumlah kolesterol dalam sampel.

5. Pemeriksaan Trigliserida menggunakan metode *enzymatic colorimetric test* dengan langkah sebagai berikut:

- Trigliserida dalam sampel yang dihidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak oleh lipoprotein lipase.
- Gliserol dan NAD^+ menghasilkan dihidroksiaseton dan $NADH$ yang diubah oleh gliserol dehidrogenase.

- WST8 dikurangi menjadi pewarna formazan oleh diaphorase dan NADH melalui reaksi reduksi-oksidasi.
- Intensitas warna formazan adalah sebanding dengan konsentrasi Trigliserida dan dihitung dengan mengukur di panjang gelombang 460 nm.

4.7 Analisis Data

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan program *SPSS for Windows version 23*. Sebelum dilakukan pengujian statistik, terlebih dahulu dilakukan uji asumsi pada data, yaitu uji normalitas menggunakan Uji Kolmogorov Smirnov. Jika data sudah berdistribusi normal (memiliki nilai signifikansi $> 0,05$), data tersebut selanjutnya dilakukan pengujian parametrik menggunakan Uji t tidak berpasangan. Jika data dinyatakan tidak berdistribusi normal (memiliki nilai signifikansi $< 0,05$), pengujian selanjutnya menggunakan pengujian nonparametrik menggunakan Uji Mann Whitney. Variabel bebasnya adalah kadar kolesterol HDL dan Trigliserida, kemudian dicari median dan standard deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 0,05$ dimana apabila diperoleh $P > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan yang bermakna (signifikan). Sebaliknya bila $P < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.