

BAB III

METODE DAN CARA PENELITIAN

A. Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional* untuk mengetahui hubungan antara sdLDL dan rasio ApoB/ApoA-I untuk menilai kejadian PAP pada pasien hipertensi

B. Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan pada pasien hipertensi yang datang ke Poliklinik Jantung RSDM dan melakukan pemeriksaan laboratorium di Instalasi Patologi Klinik RSDM Surakarta antara bulan Mei 2018 – Juni 2018.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi penelitian

Populasi target penelitian ini adalah semua pasien hipertensi yang datang ke Poliklinik Jantung RSDM. Populasi terjangkau penelitian ini adalah semua pasien hipertensi yang datang ke Poliklinik Jantung RSDM diperiksa ABI dan melakukan pemeriksaan rutin di laboratorium Patologi Klinik RSDM Surakarta pada bulan Mei – Juni 2018.

2. Besar sampel penelitian

Perkiraan besar sampel berdasarkan rumus besar sampel untuk rancangan penelitian analisis multivariat menurut Harris (1985) adalah jumlah sampel minimal dianjurkan menggunakan angka absolut 10 subjek per variabel. Pada

penelitian ini terdapat 5 variabel bebas, maka besar sampel minimal adalah $5 \times 10 = 50$ sampel.

3. Kriteria inklusi dan eksklusi

a. Kriteria inklusi

- Pasien dengan diagnosis hipertensi, diperiksa ABI dan melakukan pemeriksaan di laboratorium Patologi Klinik RSDM di Surakarta.
- Pasien dewasa usia >18 tahun
- Pasien pria dan wanita
- Bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani lembar persetujuan.

b. Kriteria eksklusi

- Pasien riwayat DM yang didapat dari anamnesis dan rekam medis
- Pasien dengan gangguan fungsi hati yang didapat dari anamnesis dan rekam medis.
- Pasien riwayat trauma, operasi atau amputasi melibatkan tungkai bawah, ulkus pada kaki yang didapat dari anamnesis dan rekam medis
- Data rekam medik pasien tidak lengkap

D. Bahan dan Alat

1. Bahan

- a. Sampel berupa serum
- b. *Kit* reagen kalibrator, reagen kontrol *high* dan *low*, dan reagen ApoB dan ApoA-I Auto N “Daiichi”

- c. *Kit* reagen kalibrator, reagen kontrol *high* dan *low*, dan reagen TC quant ILAB
- d. *Kit* reagen kalibrator, reagen kontrol *high* dan *low*, dan reagen HDL quant ILAB
- e. *Kit* reagen kalibrator, reagen kontrol *high* dan *low*, dan reagen LDL quant ILAB
- f. *Kit* reagen kalibrator, reagen kontrol *high* dan *low*, dan reagen TG quant ILAB

2. Alat

- a. TMS 24i Platinum *chemistry analyzer*
- b. IL Taurus *chemistry analyzer*
- c. Tabung *vacutainer* tanpa antikoagulan
- d. Tips *disposable*.
- e. Jarum
- f. *Needle holder*
- g. *Aliquot*
- h. *Centrifuge*
- i. *Cup sample* dan *sample container*
- j. Tensimeter
- k. *Freezer* -80°C.
- l. *Tourniquet*

- m. Sarung tangan *disposable*, *handsrub*, *alcohol swab*, kasa/kapas steril dan plester.

E. Cara, Prosedur dan Alur Penelitian

1. Cara Penelitian

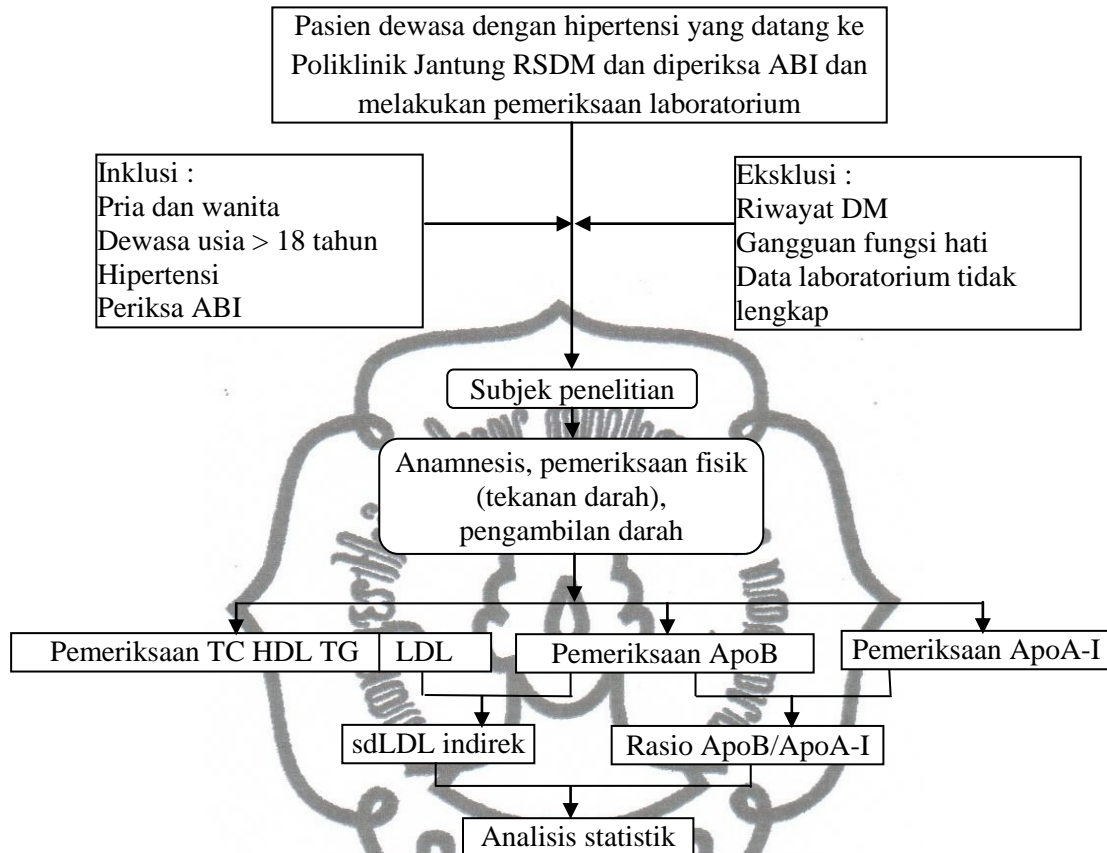
Subjek penelitian yang memenuhi kriteri inklusi dan eksklusi dengan diagnosis hipertensi di Poliklinik Jantung RSDM dipilih secara konsekutif. Penegakan diagnosis berdasarkan pemeriksaan fisik oleh klinisi dan riwayat dari rekam medis.

Sampel darah vena diambil sebanyak 2 tabung tanpa antikoagulan @ 3 cc. Kedua tabung disentrifugasi dengan kecepatan 4000 *revolutions per minutes* (rpm) selama 10 menit untuk memisahkan serum dari komponen darah kemudian ditampung ditampung dalam *aliquot* dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu -80°C sampai terkumpul seluruh sampel hingga pemeriksaan dilakukan. Semua sampel digunakan untuk pemeriksaan profil lipid (TC, HDL, LDL, TG), ApoB, ApoA-I, dan sdLDL.

2. Prosedur Penelitian

Identitas dan data subjek penelitian dicatat dalam formulir penelitian, dilakukan pengisian *informed consent*, dan subjek dianamnesis. Subjek diambil sampel darah vena diambil sebanyak 2 tabung tanpa antikoagulan @ 3 cc. Semua sampel digunakan untuk pemeriksaan profil lipid (TC, HDL, LDL, TG), ApoB, ApoA-I, dan sdLDL. Pemeriksaan sdLDL dilakukann dengan cara merasiokan parameter LDL dan ApoB (indirek).

3. Skema alur penelitian



Gambar 20. Skema Alur Penelitian.

E. Identifikasi Variabel Penelitian

Penelitian ini memiliki variabel bebas dan terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah sdLDL, rasio ApoB/ApoA-I, umur, tekanan darah, dan dislipidemia, sedangkan variabel terikat adalah PAP. Variabel lain yang mungkin mempengaruhi antara lain : ras, *overweight*/obesitas.

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Penyakit arteri perifer

Penyakit arteri perifer adalah penyempitan atau penyumbatan arteri yang memasok darah ke anggota tubuh bagian bawah terutama disebabkan oleh aterosklerosis.

Alat ukur : Pemeriksaan ABI

Satuan : Tidak ada

Skala pengukuran : Menggunakan skala kategorikal

Nilai rujukan : $ABI \geq 1$ menunjukkan keadaan normal

Skala nilai $ABI < 1$ menunjukkan PAP dan ≥ 1 menunjukkan keadaan normal (Xu *et al.*, 2013).

2. *Small dense low lipoprotein density*

Small dense low density lipoprotein merupakan salah satu fraksi dari partikel LDL berdasarkan ukuran dengan diameter $< 25,5$ nm.

Alat ukur : Merasiokan LDL/ApoB

Satuan : Tidak ada

Skala pengukuran : Menggunakan skala nominal

Nilai rujukan : $< 1,2$ menunjukkan adanya sdLDL

Rasio LDL/ApoB $< 1,2$ menunjukkan adanya sdLDL dan $\geq 1,2$ menunjukkan bukan sdLDL (Srisawasdi *et al.*, 2011)

a. Apolipoprotein B

Apolipoprotein B adalah fraksi protein dari partikel VLDL, LDL, dan IDL. Terdapat satu molekul ApoB pada masing-masing partikel lipoprotein ini dan oleh karena itu nilai ApoB total menunjukkan jumlah total lipoprotein aterogenik (Walldius *and* Jungner, 2014).

Alat ukur : TMS 24i Platinum *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : Pria : 63 – 160 mg/dl
Wanita : 70 - 168 mg/dl (Burtiz *et al.*, 2012)

b. Low-density lipoprotein cholesterol

Lipoprotein plasma yang terdiri dari 22% protein dan 48% lemak dan berperan sebagai transport lemak melalui jalan endogen yang diperiksa menggunakan sampel serum.

Alat ukur : IL Taurus *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : ≤ 150 mg/dl (Teramoto *et al.*, 2012).

3. Rasio ApoB/ApoA-I

Rasio ApoB/ApoA-I mencerminkan keseimbangan lipoprotein aterogenik dan anti aterogenik dalam plasma.

a. Apolipoprotein B

Apolipoprotein B adalah fraksi protein dari partikel VLDL, LDL, dan IDL. Terdapat satu molekul ApoB pada masing-masing partikel lipoprotein ini dan oleh karena itu nilai ApoB total menunjukkan jumlah total lipoprotein aterogenik (Walldius *and* Jungner, 2014).

Alat ukur : TMS 24i Platinum *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : Pria : 63 – 160 mg/dl
Wanita : 70 - 168 mg/dl (Burtiz *et al.*, 2012)

b. Apolipoprotein A-I

Apolipoprotein A-I adalah fraksi protein utama dari HDL yang berimplikasi pada banyak fungsi ateroprotektif (Vuilleumier *et al.*, 2013).

Alat ukur : TMS 24i Platinum *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : Pria : 103 – 173 mg/dl
Wanita : 115 – 211 mg/dl (Burtiz *et al.*, 2012).

c. Rasio ApoB/ApoA-I

Alat ukur : Merasiokan ApoB/Apo-I

Satuan : Tidak ada

Skala pengukuran : Menggunakan skala nominal

Nilai rujukan : $\leq 0,9$ tidak berisiko

Nilai *cut-off* rasio ApoB/ApoA-I untuk menentukan risiko kardiovaskular yang tinggi adalah $>0,9$. Nilai rasio ApoB/ApoA-I $>0,9$ menunjukkan risiko PAP dan $\leq 0,9$ tidak berisiko PAP (Kaneva *et al.*, 2015).

4. Usia

Usia adalah umur pasien yang dihitung mulai dari saat lahir hingga dilakukan pemeriksaan untuk penelitian.

Alat ukur : Catatan rekam medik

Satuan : Tahun

Skala pengukuran : Menggunakan skala nominal

Nilai rujukan : Tidak ada

Penelitian ini akan membagi usia subjek penelitian menjadi 2 kelompok, yaitu : usia < 55 tahun, dan usia ≥ 55 tahun. Prevalensi PAP pada pasien berusia di atas 40 tahun adalah sekitar 4,3%. Pada pasien berusia di atas 70 tahun atau 50 - 69 tahun dengan faktor risiko prevalensi PAP sebesar 29% (Blech *et al.*, 2003).

5. Merokok

Merokok yang dimaksud adalah perokok aktif. Perokok aktif adalah dengan sengaja menghisap lintingan atau gulungan tembakau.

Alat ukur : Catatan rekam medik

Satuan : Tidak ada

Skala pengukuran : Menggunakan skala nominal

Nilai rujukan : Tidak ada

Penelitian ini akan membagi subjek penelitian menjadi 2 kelompok, yaitu merokok dan tidak merokok.

6. Dislipidemia

Dislipidemia adalah kelainan metabolisme lipoprotein. Parameter laboratorium yang digunakan untuk menentukan dislipidemia adalah :

- a. *High-density lipoprotein*, yaitu lipoprotein plasma yang terdiri dari 52% protein dan 4% lemak dan berperan sebagai transport kolesterol dari jaringan perifer ke hepar yang diperiksa dengan menggunakan sampel serum.

Alat ukur : IL Taurus *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : > 40 mg/dl (Teramoto *et al.*, 2012).

- b. *Low-density lipoprotein cholesterol*, yaitu lipoprotein plasma yang terdiri dari 22% protein dan 48% lemak dan berperan sebagai transport lemak melalui jalan endogen yang diperiksa menggunakan sampel serum.

Alat ukur : IL Taurus *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : ≤ 150 mg/dl (Teramoto *et al.*, 2012).

- c. Trigliserida adalah hasil esterifikasi dari gliserol dan *fatty acid* dan merupakan komponen utama cadangan lemak pada tubuh yang dapat digunakan untuk proses glukoneogenesis.

Alat ukur : IL Taurus *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : ≤ 150 mg/dl (Teramoto *et al.*, 2012).

- d. *Total cholesterol*, kolesterol adalah komponen penting dari membran sel. Kolesterol juga merupakan molekul prekursor untuk sintesis hormon steroid, vitamin D dan garam empedu. Kolesterol berasal dari makanan atau disintesis di dalam tubuh (Menys and Durrington, 2007).

Alat ukur : IL Taurus *chemical analyzer*

Satuan : Diukur dalam satuan miligram per desiliter (mg/dl)

Skala pengukuran : Menggunakan skala numerik

Nilai rujukan : ≤ 200 mg/dl (Teramoto *et al.*, 2012).

- e. Dislipidemia

Disebutkan dislipidemia apabila didapatkan salah satu hasil dari empat parameter pemeriksaan di atas tidak sesuai dengan nilai normal masing-masing pemeriksaan (Teramoto *et al.*, 2012).

Skala pengukuran nominal, yaitu normal dan dislipidemia

Satuan : tidak ada

H. Prosedur Kerja Laboratorium

1. *Phlebotomy* (Kern, 2010)

a. Persiapan

Yang harus disiapkan adalah tabung *vacutainer* tanpa koagulan, jarum, *needle holder*, sarung tangan, *handsrub*, *alcohol swab*, *tourniquet*, kasa/kapas steril dan plester.

b. Langkah-langkah

- Pastikan identitas pasien benar dengan minimal 2 identitas : nama, nomor rekam medis atau tanggal lahir.
- Tempelkan label pada tabung.
- Cuci tangan dan gunakan sarung tangan
- Cari vena superfisial, cukup besar, lurus dan tidak ada tanda peradangan pada lengan pasien. Luruskan lengan dan ekstensikan dengan bantuan tangan operator atau diganjal dengan telapak tangan menghadap ke atas. Kepalkan tangan pasien.
- Desinfeksi daerah penusukan dengan *alcohol swab* secara melingkar dari arah dalam ke arah luar. Keringkan selama 30 detik.
- Pada 3 jari proksimal daerah penusukan dilakukan pembendungan menggunakan *tourniquet* dengan waktu pembendungan yang tidak lebih lama dari 1 menit.

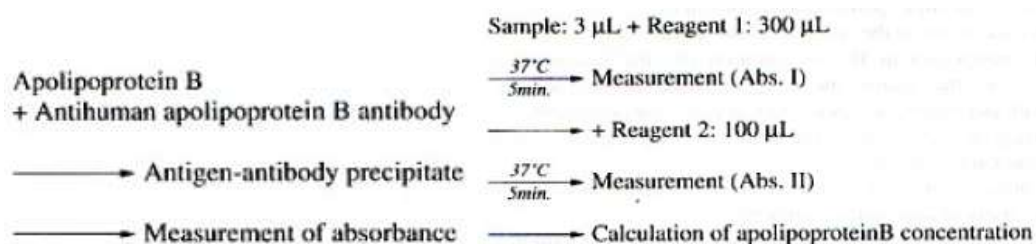
- Tutup jarum dibuka dengan cara memegang bagian tutup yang berwarna dengan 1 tangan, putar dan lepaskan bagian yang berwarna putih dengan tangan lainnya, pasang dengan cara memutar jarum pada *holder* dan putar jarum sampai rapat ke dalam *holder*.
- Lakukan penusukan vena dengan sudut 15° - 30° , bila jarum tepat masuk ke dalam vena maka akan terlihat darah masuk ke dalam jarum indikator, kemudian fiksasi jarum tersebut.
- Masukkan tabung *vacutainer* ke dalam *holder*, dorong tabung ke jarum sampai ke ujung *holder*. Darah secara otomatis akan mengalir masuk ke dalam tabung.
- Lepaskan *tourniquet* dan kepalan tangan. Tabung akan terisi darah sesuai dengan kapasitas vakum tabung. Bila masih diperlukan sampel darah, ganti tabung baru sesuai dengan *order of draw*.
- Tekan secara perlahan tepi *holder* untuk melepas tabung dari *holder*.
- Tempelkan kasa steril di atas jarum. Tarik jarum secara perlahan dari tempat penusukan dengan menekan kasa. Dengan menggunakan ibu jari atau telunjuk pasien, tekan kasa selama 15 menit.
- Homogenisasi sampel darah beberapa menit.
- Tutup luka tusukan dengan plester.

2. Pemeriksaan ApoB (Anonim, 2007a)

Penelitian ini menggunakan reagen ApoB *Auto N* “Daiichi” *kit* yang menggunakan metode *turbidimetric immunoassay* (TIA), dapat dengan cepat dan akurat memeriksa konsentrasi ApoB serum atau plasma dengan *automated analyzer*. Reaksi antigen-antibodi yang terjadi antara ApoB serum (plasma) dan anti ApoB antibodi akan menghasilkan kekeruhan. Konsentrasi ApoB dapat diperoleh dari pengukuran kekeruhan tersebut. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pada panjang gelombang 700 nm dan 340 nm. Spesimen pemeriksaan ApoB dapat berasal dari serum maupun plasma. Apolipoprotein B *Auto N* “Daiichi” *kit* mempunyai rentang deteksi 0 – 200 mg/dl. Interferens pada sampel tidak berdampak pada hasil pemeriksaan pada bilirubin sampai 40 mg/dl, hemoglobin (Hb) sampai 500 mg/dl, dan intralipos sampai 20%.

Komposisi *kit* :

- a. Tris *buffer*
- b. *Macrogol* 4000
- c. Anti ApoB poliklonal antibodi



Gambar 21. Prosedur analitik pemeriksaan ApoB (Anonim, 2007a)

Prosedur pemeriksaan konsentrasi ApoB adalah sebagai berikut :

- Keluarkan semua reagen dari tempat penyimpanan ke suhu ruang ($18-25^{\circ}\text{C}$) sebelum digunakan.
- Masukkan sampel kedalam *cap* sampel, lalu masukkan ke *tray*, masukkan identitas, dan klik pemeriksaan ApoB.
- Setelah semua sampel dimasukkan ke dalam alat lalu klik *run*. Dan tunggu hasil pemeriksaan dari alat.

Persiapan sampel sebagai berikut :

- Sampel serum dapat disimpan pada suhu $2-10^{\circ}\text{C}$ dan dapat bertahan selama 2 minggu. Pada suhu -80°C sampel dapat bertahan selama 3 tahun.
- Hindari *freeze-thaw* berulang. Siapkan sampel pada suhu ruang ($18-25^{\circ}\text{C}$) sebelum dilakukan pemeriksaan.

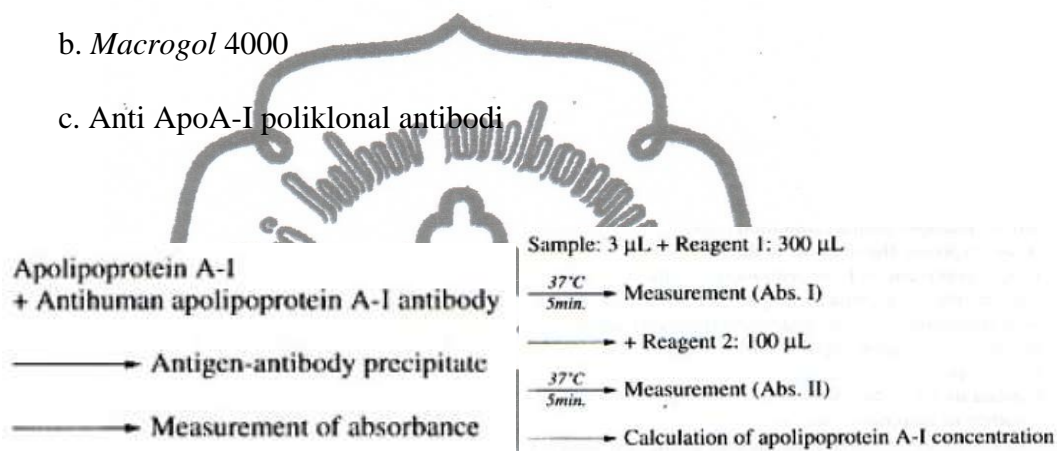
3. Pemeriksaan ApoA-I (Anonim, 2007b)

Penelitian ini menggunakan reagen ApoA-I *Auto N* “Daiichi” *kit* yang menggunakan metode TIA, dapat dengan cepat dan akurat memeriksa konsentrasi ApoA-I serum atau plasma dengan *automated analyzer*. Reaksi antigen-antibodi yang terjadi antara ApoA-I serum (plasma) dan anti ApoA-I antibodi akan menghasilkan kekeruhan. Konsentrasi ApoA-I dapat diperoleh dari pengukuran kekeruhan tersebut. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pada panjang gelombang 800 nm dan 600 nm. Spesimen pemeriksaan ApoA-I dapat berasal dari serum maupun plasma. Apolipoprotein A-I *Auto N*

“Daiichi” *kit* mempunyai rentang deteksi 0 – 200 mg/dl. Interferens pada sampel tidak berdampak pada hasil pemeriksaan pada bilirubin sampai 40 mg/dl, Hb sampai 500 mg/dl, dan intralipos sampai 20%.

Komposisi *kit* :

- a. Tris *buffer*
- b. *Macrogl* 4000
- c. Anti ApoA-I poliklonal antibodi



Gambar 22. Prosedur analitik pemeriksaan ApoA-I (Anonim, 2007b)

Prosedur pemeriksaan konsentrasi ApoA-I adalah sebagai berikut :

- Keluarkan semua reagen dari tempat penyimpanan ke suhu ruang (18-25⁰C) sebelum digunakan.
- Masukkan sampel ke dalam *cap* sampel, lalu masukkan ke *tray*, masukkan identitas, dan klik pemeriksaan ApoA-I.
- Setelah semua sampel dimasukkan ke dalam alat lalu klik *run*. Dan tunggu hasil pemeriksaan dari alat.

Persiapan sampel sebagai berikut :

- Sampel serum dapat disimpan pada suhu $2 - 10^{\circ}\text{C}$ dan dapat bertahan selama 2 minggu. Pada suhu -80°C sampel dapat bertahan selama 3 tahun.
- Hindari *freeze-thaw* berulang. Siapkan sampel pada suhu ruang ($18-25^{\circ}\text{C}$) sebelum dilakukan pemeriksaan.

I. Kontrol Kualitas Internal.

Agar hasil pemeriksaan yang dilakukan valid dan dapat dipertanggungjawabkan, maka terlebih dahulu perlu dilakukan uji presisi (ketelitian) dan akurasi (ketepatan).

1. Uji Presisi/Ketelitian

Uji presisi dilakukan untuk melihat konsistensi hasil pengukuran yaitu kedekatan hasil beberapa kali pengukuran dengan bahan yang sama. Pemilihan contoh bahan serum dilakukan secara acak sesuai volume yang tersedia. Ketelitian terutama dipengaruhi oleh kesalahan acak yang tidak dapat dihindari. Presisi dinyatakan dalam nilai koefisien variasi (KV) yang dihitung menggunakan rumus $KV (\%) = (SB/\bar{x}) \times 100$. Simpangan baku (SB) dan \bar{x} adalah rerata hasil pemeriksaan berulang. Semakin kecil nilai KV semakin teliti suatu metode pemeriksaan (Depkes, 2008)

Uji presisi meliputi uji presisi sehari (*within day*) dan uji presisi hari ke hari (*day to day*). Uji presisi sehari dilakukan dengan melakukan

pemeriksaan 1 bahan sebanyak 10 kali secara berurutan pada hari yang sama. Variabel yang akan dilakukan uji presisi *within day* adalah kadar ApoB dan ApoA-I serum. Variabel yang akan dilakukan uji presisi *day to day* adalah parameter kadar TC, LDL, HDL, dan TG.

2. Uji Akurasi/Ketepatan

Akurasi analitik adalah kedekatan hasil pemeriksaan dengan nilai sebenarnya yang telah ditentukan oleh metode standar. Penilaian akurasi didapatkan dari hasil pengukuran bahan kontrol dan dihitung sebagai nilai bias (d%). Nilai d% dapat positif atau negatif. Nilai d% positif menunjukkan nilai yang lebih tinggi dari nilai yang seharusnya dan nilai negatif menunjukkan nilai yang lebih rendah dari seharusnya. Rumus $d\% = [(\bar{x} - NA)/NA]$, NA= nilai aktual atau sebenarnya dari bahan kontrol (Depkes, 2008).

J. Analisis Statistik

Analisis data terdiri dari :

1. Analisis deskriptif dilakukan untuk melihat gambaran menurut variabel subjek. Variabel dengan skala nominal seperti jenis kelamin, dislipidemia, merokok dideskripsikan sebagai frekuensi dan persentase, sedangkan data kontinyu seperti umur, SBP, DBP, konsentrasi profil lipid (TC, HDL, LDL, TG), sdLDL, dan rasio ApoB/ApoA, diuji dengan *Kolmogorov-Smirnov* dan dinyatakan sebagai rerata \pm SB bila data terdistribusi normal dan sebagai

median (persentil 25 – persentil 75) bila data tidak terdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji beda pada tiap variabel tersebut antara kelompok hipertensi tanpa PAP dan kelompok hipertensi dengan PAP menggunakan *Independent t-test* untuk data yang terdistribusi normal, dan *Mann whitney u-test* untuk data yang tidak terdistribusi normal. Data diolah menggunakan program komputer dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$ dengan 95% CI.

2. Analisis bivariat dilakukan untuk melihat hubungan antara variabel bebas dan variabel lain yang mungkin mempengaruhi PAP dengan menggunakan tabel uji 2x2 untuk mencari *prevalence ratio* (PR) dan 95% CI.
3. Analisis multivariat

Analisis multivariat dilakukan untuk mencari PR dan 95% CI dengan menganalisis beberapa model penelitian untuk melihat pengaruh variabel-variabel lain terhadap kejadian PAP. Analisis multivariat dilakukan pada semua variabel penelitian.

Batas kemaknaan: Nilai $p \geq 0,05$: tidak bermakna.

 Nilai $p < 0,05$: bermakna.

CI : 95%.

K. Pertimbangan Etik.

Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etika penelitian biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret/RSDM dan persetujuan pasien. Pernyataan bersedia sebagai subjek penelitian diperoleh setelah

sebelumnya mendapat penjelasan singkat mengenai tujuan dan manfaat penelitian, serta teknik pengambilan sampel darah kepada pasien. Pasien menandatangani surat pernyataan bersedia menjadi subjek penelitian yang telah disediakan.

