

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *post test only design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Percobaan dilakukan dengan *randomized control trial*. Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) dan Perlakuan 3 (P3). Pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

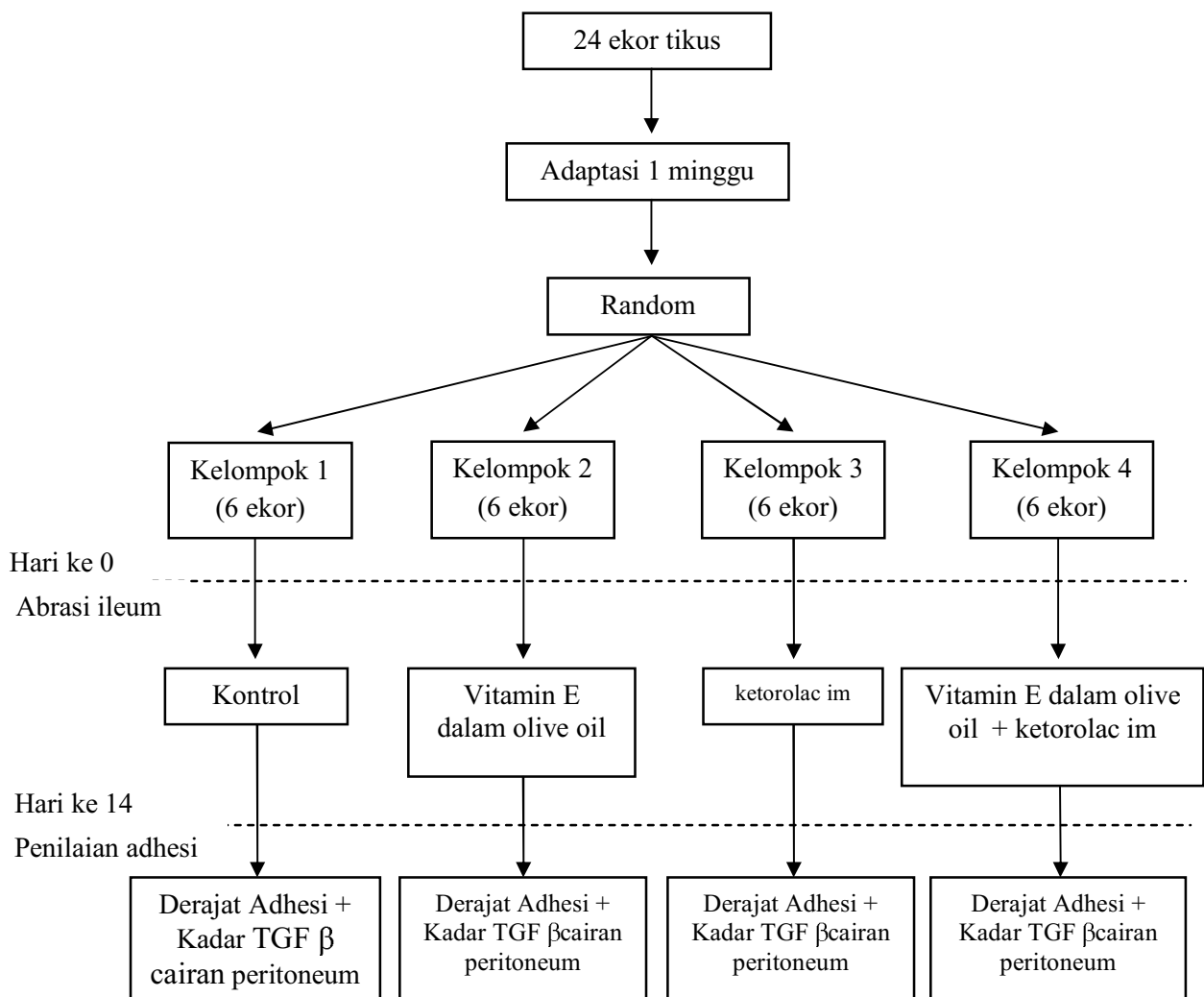
Tabel 4. Pembagian kelompok penelitian

Kelompok	Keterangan
K	Kelompok kontrol, tikus wistar yang dibuat adhesi intraperitoneum dengan cara abrasi ileum
P1	Kelompok perlakuan 1, tikus wistar yang dibuat adhesi intraperitoneum dengan cara abrasi ileum dan diberi vitamin E dalam olive oil topikal intraperitoneum.
P2	Kelompok perlakuan 2, tikus wistar yang dibuat adhesi intraperitoneum dengan cara abrasi ileum dan diberi ketorolac tromethamine intramuskular (tiap 6 jam selama 72 jam pasca operasi)
P3	Kelompok perlakuan 3, tikus wistar yang dibuat adhesi intraperitoneum dengan cara abrasi ileum dan diberi kombinasi

antara vitamin E topikal intraperitoneum dengan ketorolac tromethamine intramuskular (tiap 6 jam selama 72 jam pasca operasi)

4.2. ALUR PENELITIAN

Alur rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Bagan 3. Alur rancangan penelitian

4.3. POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN

4.3.1. POPULASI

Binatang percobaan berupa tikus jantan galur wistar sebanyak 24 ekor yang secara fisik sehat, umur 8-12 minggu dengan berat badan antara 200 – 300 gram, tidak terdapat infeksi pada kulit daerah abdomen sebelum perlakuan, tidak terdapat infeksi ataupun adhesi intra-peritoneum sebelum perlakuan. Di pilih tikus jantan supaya tidak terpengaruh hormonal dan kehamilan. Penelitian usia 8 – 12 minggu karena tikus masih dalam usia dewasa muda dan respon imunologis akan cepat terlihat. Beberapa peneliti juga sebelumnya menggunakan kriteria yang sama.

4.3.2. SAMPEL

Hewan coba adalah tikus wistar yang diperoleh dari laboratorium hewan coba Universitas Negeri Semarang.

Kriteria Inklusi:

- a. Tikus jantan
- b. Tikus wistar usia 8-12 minggu
- c. Berat badan 200-300 gram
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak.
- e. Tidak ada tanda – tanda infeksi sebelumnya

Kriteria Eksklusi:

- a. Selama inokulasi dan perlakuan tikus tampak sakit (gerakan tidak aktif).

b. Tikus wistar telah terdapat adhesi intraperitoneum saat laparotomi I

4.3.3. BESAR SAMPEL

Besar sampel ditentukan dengan rumus Federer,³⁰ yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

dimana t = jumlah perlakuan (4 perlakuan)

n = besar sampel

Besar sampel minimal untuk tiap perlakuan minimal 6 tikus wistar. Setiap tikus yang mati pasca operasi sebelum dilakukan laparotomi ulang akan digantikan oleh tikus yang baru yang sesuai kriteria.

4.3.4. PEMILIHAN SAMPEL

Sebelum digunakan dalam penelitian, 24 ekor tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama dalam pemeliharaan, tikus diberi makan dan minum secara ad libitum. Penimbangan tikus sebelum mendapat perlakuan dilakukan untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan. Selanjutnya tikus dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, masing-masing terdiri dari 6 ekor yaitu:

Kelompok K : 6 tikus

Kelompok P1 : 6 tikus

Kelompok P2 : 6 tikus

Kelompok P3 : 6 tikus

Cadangan tikus untuk mengantisipasi jika ada yang mati pada masing-masing kelompok sebanyak 2 buah tikus.

4.4. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 2 bulan. Perlakuan pada tikus wistar dilakukan di laboratorium biologi hewan Universitas Negeri Semarang. Pemeriksaan kadar TGF β dilakukan di laboratorium GAKI FK UNDIP.

4.5. VARIABEL PENELITIAN

Variabel bebas

Kelompok intervensi :

1. Pemberian vitamin E topikal intraperitoneum
2. Pemberian ketorolac tromethamine intramuskular
3. Pemberian kombinasi antara vitamin E intraperitoneum dan ketorolac tromethamine intramuskular
4. Kelompok kontrol, tidak diberi perlakuan

Variabel tergantung

1. Kadar TGF β intraperitoneum
2. Derajat adhesi intraperitoneum

4.6. DEFINISI OPERASIONAL

1. Pemberian Vitamin E topikal intraperitoneum adalah pemberian vitamin E 10 mg yang dilarutkan dalam 5 ml olive oil (*diluent vehicle*) secara topikal di dalam rongga peritoneum, di atas tempat yang dilakukan abrasi, skala variabel nominal.
2. Injeksi Ketorolac tromethamine adalah injeksi Ketorolac tromethamine yang diberikan secara intra muskular (IM) dengan dosis awal 1mg/kgBB segera setelah operasi, dilanjutkan dengan dosis 0,5 mg/kgBB dalam 0,5cc Nacl 0,9% setiap 6 jam selama 72 jam pasca operasi, skala variabel nominal.
3. Kadar TGF β adalah hasil pengukuran kadar *Transforming Growth Factor β* yang diambil dari sampel cairan peritoneum dengan menggunakan pemeriksaan ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), cairan diambil pada cavum pelvis tikus wistar setelah diberi *Phospate Buffer Saline (PBS)* 10x dan diposisikan 45° dengan kepala diatas selama 5 menit dan melalui laparotomi, satuan pg/ml, skala variabel rasio.
4. Derajat adhesi intraperitoneum adalah, pembagian adhesi dinilai berdasarkan gambaran makroskopis menggunakan scoring menurut Nair dkk (di sitasi dari portilla²⁹ dkk), skala variabel ordinal.

4.7. ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

1. Hewan yang di pakai dalam penelitian adalah tikus wistar jantan yang berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 200 – 300 gram. Jumlah total sampel adalah 24 ekor.
2. Vitamin E, tersedia dalam bentuk sediaan 10 mg yang dilarutkan dalam 5 ml olive oil.
3. Ketorolac tromethamine injeksi tersedia dalam bentuk ampul 30 mg per ml.
4. Ketamin (KTM-100) injeksi 1 gr/vial, merupakan bahan untuk anestesi intravena.
5. Diazepam (Stesolid) 10 mg/2cc, merupakan bahan untuk sedasi.
6. Alat bedah minor.
7. Kit pemeriksaan TGF β

4.8. PELAKSANAAN PENELITIAN

1. Dua puluh empat ekor tikus wistar jantan diadaptasi di laboratorium dengan dikandangan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara ad libitum.
2. Semua tikus menerima antibiotika profilaksis ceftriaxone 3 mg/100 gr berat badan secara intramuskuler 30 menit sebelum laparotomi I untuk mencegah terjadinya infeksi.²¹
3. Pembiusan memakai ketamin 50mg/kgBB, dan diazepam 2,5 mg/kgBB.³¹ Tindakan dilakukan secara aseptik dengan menggunakan instrument steril.

4. Lakukan laparotomi I dengan insisi di linea mediana sepanjang 5 cm, kemudian buka peritoneum.
5. Identifikasi kolon dan ileum terminal, dan lakukan abrasi sepanjang 4 cm pada ileum terminal sampai tampak bintik-bintik perdarahan.³¹
6. Kelompok kontrol, tikus yang dibuat adhesi intraperitoneum dengan cara abrasi ileum.
7. Kelompok perlakuan 1, tikus yang dibuat adhesi intraperitoneum + pemberian vitamin E 10 mg yang dilarutkan dalam 5 ml olive oil secara topikal di dalam rongga peritoneum, di atas tempat yang dilakukan abrasi.
5. Kelompok perlakuan 2, tikus yang dibuat adhesi intraperitoneum + injeksi Ketorolac tromethamine yang diberikan secara intra muskular (IM) dengan dosis awal 1mg/kgBB segera setelah operasi, dilanjutkan dengan dosis 0,5 mg/kgBB dalam 0,5cc Nacl 0,9% setiap 6 jam selama 72 jam pasca operasi.
6. Kelompok perlakuan 3, tikus yang dibuat adhesi intraperitoneum + pemberian vitamin E 10 mg yang dilarutkan dalam 5 ml olive oil secara topikal di dalam rongga peritoneum di atas tempat yang dilakukan abrasi + injeksi Ketorolac tromethamine yang diberikan secara intra muskular (IM) dengan dosis awal 1mg/kgBB segera setelah operasi, dilanjutkan dengan dosis 0,5 mg/kgBB dalam 0,5cc Nacl 0,9% setiap 6 jam selama 72 jam pasca operasi.
8. Luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0, tanpa menjahit peritoneum.

9. Pasca operasi, tikus dirawat dikandang terpisah untuk mengurangi risiko tikus terluka karena agresifitas tikus. Setiap tikus yang mati setelah operasi sebelum dilakukan relaparotomi dikeluarkan dari penelitian dan diganti oleh tikus baru yang memenuhi kriteria. Setiap tikus yang mati dicatat secara terpisah.
10. Laparotomi II dilakukan pada hari ke-14 untuk menilai derajat adhesi intraperitoneum. Kadar TGF β dinilai menggunakan sampel dari cairan peritoneum. Insisi laparotomi II adalah dengan insisi vertikal \pm 3 cm sisi kanan dari linea mediana, hal ini untuk memudahkan dalam penilaian adhesi di sisi kiri (ileum terminal). Sebelumnya tikus wistar dilakukan pembiusan dan diberi PBS 10x sebanyak 3 cc melalui insisi \pm 0.5 cm sisi kanan dari linea mediana, dan lakukan pemijatan pada abdomen selama 90 detik, kemudian tikus wistar diposisikan miring 45° dengan kepala diatas selama 5 menit supaya cairan peritoneum terkumpul di kavum pelvis. Insisi laparotomi II dilakukan dalam posisi miring 45° dengan kepala diatas, hal ini untuk memudahkan dalam pengambilan cairan peritoneum dan penilaian adhesi di sisi kiri (ileum terminal). Cairan peritoneum diambil sebanyak \pm 1 cc untuk penilaian TGF β .
11. Adhesi dinilai berdasarkan kriteria Nair dkk, dilakukan oleh 2 orang pengamat independen.
12. Terminasi tikus dilakukan setelah semua langkah di atas selesai dilakukan.

Prosedur pemeriksaan derajat adhesi intraperitoneum :

Adhesi intraperitoneum dinilai sesuai dengan kriteria Nair dkk²⁹

Alat dan bahan untuk pemeriksaan TGF β ³² :

1. Luminex 100/200 atau Biorad Analyzer
2. Microplate vaccum manifold
3. Pippet atau multi channel pippet
4. Distilled water
5. Horizontal orbital microplate shaker
6. Microcentrifuge
7. TGF β standard cocktail
8. TGF β microparticle concentrate
9. TGF β Biotin Antibody Concentrate
10. Microparticle Diluent
11. Calibrator Diluent
12. Wash Buffer Concentrate
13. Microplate
14. Streptavidine PE
15. Plate sealers
16. Mixing Bottle

Prosedur pemeriksaan TGF β^{32} :

1. Persiapkan reagen, sampel dan peralatan.
2. Cairan peritoneum dimasukkan di dalam tabung dan dimasukkan di dalam kotak yang berisi es (supaya sampel tidak rusak selama periode transportasi ke laboratorium)
3. Basahi sebelumnya microplate dengan mengisinya menggunakan 100 μ L cairan wash buffer, kemudian buang cairan melalui filter pada dasar plate menggunakan vaccum.
4. Tambahkan 50 μ L sampel standar atau sampel teraktivasi
5. Tambahkan 50 μ L campuran dilusi mikropartikel, kemudian inkubasi selama 2 jam secara horizontal pada microplate shaker
6. Cuci dengan membuang cairan, kemudian diisi dengan 100 μ L wash buffer dan buang cairannya lagi. Lakukan pencucian 3 kali
7. Tambahkan 50 μ L diluted Biotin Antibody Cocktail, inkubasi 1 jam di atas shaker
8. Lakukan pencucian ulang seperti langkah 5.
9. Tambahkan 50 μ L diluted streptavidin PE, inkubasi selama 30 menit di atas shaker
10. Lakukan pencucian ulang seperti langkah 5
11. Tambahkan 100 μ L wash buffer, inkubasi 1 menit di atas shaker
12. Pembacaan dilakukan setelah 90 menit menggunakan Luminex atau Biorad analyzer

4.9. CARA PENGUMPULAN DATA

Masing-masing kelompok dinilai derajat adhesi intraperitoneum secara makroskopis dan dilakukan pengambilan sampel dari cairan peritoneum tikus wistar, untuk selanjutnya dinilai kadar TGF β nya.

4.10. ANALISIS DATA

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Normalitas data diketahui dengan dilakukan uji *Shapiro-Wilk test*. Analisis statistik untuk mengetahui beda kadar TGF β cairan peritoneum antar kelompok kontrol, perlakuan tunggal dengan perlakuan kombinasi, dilakukan analisis secara parametrik dengan uji *one-way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc*. Analisis statistik untuk mengetahui beda derajat adhesi antar kelompok kontrol, perlakuan tunggal dengan perlakuan kombinasi, dilakukan analisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc*-nya, *Mann-Whitney*. Uji korelasi dilakukan dengan menggunakan *Spearman test*. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisis data dilakukan dengan program SPSS.

4.11. PERSYARATAN ETIK

Implikasi etik pada hewan, pengelolaan binatang coba pada penelitian ini mengikuti animal ethics. Hal yang perlu dilaksanakan sesuai dengan etik antara lain perawatan dalam kandang, pemberian makan minum (*ad libitum*), aliran udara dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan

unit analisis penelitian, dan pemusnahannya. *Ethical clearance* diajukan sebelum melakukan percobaan.