

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Binatang percobaan berupa kelinci putih jantan jenis New Zealand yang secara fisik sehat, umur 8-12 minggu dengan berat badan antara 2500 – 3000 gram. Pemilihan kelinci atas pertimbangan ukurannya yang cukup besar sehingga tindakan laparoskopi diharapkan dapat dilakukan dengan baik. Tidak terdapat infeksi pada kulit daerah abdomen sebelum perlakuan, tidak terdapat infeksi ataupun adhesi peritoneal sebelum perlakuan. Dipilih kelinci jantan supaya tidak terpengaruh hormonal dan kehamilan. Umur kelinci 8-12 minggu karena kelinci masih dalam usia dewasa muda, memiliki respon imunologis yang akan cepat terlihat. Beberapa peneliti sebelumnya juga menggunakan kriteria yang sama.

4.2.2. Sampel

Kriteria Inklusi:

- a. Kelinci jantan New Zealand berwarna putih
- b. Usia 8-12 minggu
- c. Berat badan 2500-3000 gram
- d. Tidak ada abnormalitas anatomis yang tampak
- e. Tidak ada tanda – tanda infeksi sebelumnya
- f. Tidak ada adhesi peritoneal saat dilakukan tindakan operasi pertama.

Kriteria Eksklusi:

Selama perawatan kelinci tampak sakit (gerakan tidak aktif)

4.2.3. Besar Sampel

Menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 10% (1 ekor).³⁵ Jadi jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 6 ekor kelinci.

4.2.4. Pemilihan Sampel

Sebelum digunakan dalam penelitian, 12 ekor kelinci diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari. Selama dalam pemeliharaan kelinci diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Untuk menghindari bias terhadap berat badan maka dilakukan penimbangan kelinci sebelum mendapat perlakuan. Selanjutnya kelinci dibagi menjadi 2 kelompok secara acak, masing-masing terdiri dari 6 ekor yaitu:

Kelompok X1 : 6 ekor kelinci

Kelompok X2 : 6 ekor kelinci

4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 1 bulan. Perlakuan pada kelinci dilakukan di Laboratorium Minimal Invasive RSUP dr. Kariadi Semarang dan penilaian kadar kortisol darah dan *TGF- β* cairan peritoneum dengan metode ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) dilakukan di LPPT 1 Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas

Tindakan operasi

Variabel antara

Kadar kortisol plasma dan kadar *TGF-β* cairan peritoneum

Variabel tergantung

Derajat adhesi peritoneal

4.5. Definisi Operasional

1. Tindakan operasi adalah tindakan operasi abdomen dan abrasi ileum terminal, dilakukan dengan 2 cara, kelompok I dengan cara laparoskopi 3 port (satu insisi 11 mm dan dua insisi 6 mm) dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoskopi sepanjang 2 cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum dan kelompok II dengan cara laparotomi dibuat irisan pada dinding abdomen sepanjang 5 cm dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoskopi sepanjang 2 cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum, skala variabel nominal.
2. Kadar kortisol adalah hasil pengukuran kadar kortisol yang diambil dari vena di telinga sesaat sebelum dan 6 jam sesudah perlakuan, diukur dengan metode pemeriksaan *Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*, skala variabel rasio.
3. Kadar *TGF-β* adalah hasil pengukuran kadar *TGF-β* yang diambil dari sampel cairan peritoneum yang diambil hari ke-7 melalui laparotomi, dengan metode pemeriksaan *Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*, skala variabel rasio.

4. Derajat adhesi peritoneal adalah pembagian adhesi dinilai berdasarkan gambaran makroskopis menggunakan scoring menurut *Nair et al* pada hari ke-7, skala variabel ordinal.

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan yang dipakai dalam penelitian adalah kelinci putih jantan jenis New Zealand yang berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 2500 – 3000 gram. Jumlah sampel adalah 12 ekor.
2. Timbangan bayi.
3. Ketamin injeksi, merupakan bahan untuk anestesi intravenous.
4. Diazepam injeksi, merupakan bahan untuk sedasi.
5. Alat bedah minor steril.
6. Alat bedah laparoskopisteril.
7. Kit pemeriksaan kortisol dan *TGF- β* .

4.7. Pelaksanaan Penelitian

1. 12 ekor kelinci jantan diadaptasi dengan dikandangkan secara individual setelah sebelumnya ditimbang dan diberi ransum pakan standard selama 7 hari secara *ad libitum*.
2. Pembiusan memakai ketamin 20 mg/kgBB dan diazepam 1,5 mg/kgBB. Tindakan dilakukan secara aseptik dengan menggunakan instrumen steril.
3. Ambil sampel darah dari vena di telinga untuk pemeriksaan kadar kortisol sebelum perlakuan.

4. Perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing, yaitu:
 - a. Kelompok X1, cukur bulu pada dinding perut dan desinfeksi dengan larutan povidon iodine. Cuci sarung tangan dengan NaCl 0,9%, hingga bebas dari talk. Dilakukan laparoskopi 3 port (satu insisi 11 mm dan dua insisi 6 mm) dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoskopi sepanjang 2 cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Kadar kortisol darah diperiksa 6 jam post operasi.
 - b. Kelompok X2, cukur bulu pada dinding perut dan desinfeksi dengan larutan povidon iodine. Cuci sarung tangan dengan NaCl 0,9%, hingga bebas dari talk. Dilakukan laparotomi sepanjang 5 cm (2,5 cm ke proximal serta 2,5 cm ke distal umbilicus) dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoskopi sepanjang 2 cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Kadar kortisol darah diperiksa 6 jam post operasi.
5. Pasca operasi kelinci dirawat dikandang semula, setiap kelinci yang mati setelah hari keempat pasca operasi I dilakukan laparotomi otopsi. Sedangkan kelinci yang mati sebelum hari keempat pasca operasi I dikeluarkan dari penelitian dan diganti oleh kelinci baru yang memenuhi kriteria. Setiap kelinci yang mati dicatat secara terpisah.
6. Dilakukan terminasi dan laparotomi pada hari ke-7. Kelinci dimatikan dengan dibuat dislokasi servikal, selanjutnya diposisikan *erect* selama 15 menit supaya

cairan peritoneum terkumpul di rongga pelvis, kemudian dilakukan insisi laparotomi dengan cara insisi vertikal \pm 5 cm sisi kiri dari linea mediana, dengan menggunakan spuit diambil cairan peritoneum \pm 1 cc untuk pemeriksaan kadar *TGF- β* , dan dinilai derajat adhesi intraperitoneum yang terjadi di sisi kanan (ileum terminal) sesuai dengan kriteria *Nair et al.*

Alat dan bahan untuk pemeriksaan Kortisol :

1. Elabscience[®] RAP (*Rabit Cortisol ELISA Kit, Catalog Number E-EL-RB0046*)
 - a. *Micro ELISA Plate* 1 buah
 - b. *Reference standard* 2 vial
 - c. *Reference standard dan sample diluent* 1 vial 20 ml
 - d. *Concentrated Biotinylated Detection Ab* 1 vial 120 μ l
 - e. *Biotinylated detection Ab diluent* 1 vial 10 ml
 - f. *Concentrated Horseadish peroxidase (HRP) conjugated* 1 vial 120 μ l
 - g. *Horseadish peroxidase (HRP) conjugated diluent* 1 vial 10 ml
 - h. *Concentrated wash buffer (25x)* 1 vial 30ml
 - i. *Substrate reagent* 1 vial 10ml
 - j. *Stop solution* 1 vial 10 ml
 - k. *Plate sealer*
2. Alat
 - a. Bio-Rad model 680XR Analyzer dengan X-Y platform.

- b. *Standard Value Card* : 1 kartu daftar volume dan konsentrasi rekonstitusi campuran standar.
- c. Botol Pencampur : 2 buah botol (8ml) untuk mencampur mikropartikel dengan diluen mikropartikel.
- d. Pipet dan pipet tip.
- e. Deionized atau distilled water.
- f. Multi-channel pipette, manifold dispenser, atau automated dispensing unit.
- g. 50 ml dan 500 ml graduated cylinders.
- h. Horizontal orbital microplate shaker (0.12" orbit).
- i. Microcentrifuge eppendorf.
- j. *Polypropylene test tubes*.

Prosedur pemeriksaan kortisol:

1. Persiapkan sampel, reagen, larutan utama dan peralatan

a. Sampel

Partikel pada darah dipisahkan dengan cara sentrifugasi, ambil serumnya, kemudian segera dilakukan pemeriksaan assay atau dapat dibagi dan disimpan pada suhu $< -60^{\circ}\text{C}$.

b. Reagen

Reagen disiapkan pada suhu ruangan.

- Larutan *Wash Buffer*

Encerkan 30 ml larutan *consentraded wash buffer* ke dalam 750ml *wash buffer* dengan air distilasi. Jika ditemukan endapan kristal pada *Wash*

Buffer Concentrate, hangatkan pada suhu 40⁰C dan kocok secara perlahan hingga kristal larut.

- Larutan Standar

Persiapkan 15 menit sebelum digunakan, buat larutan standar dengan 1 ml *larutan sample diluent*, biarkan selama 10 menit sampai tercampur semua, hasilnya adalah larutan standart dengan konsentrasi 40 ng/ml. Kemudian encerkan sesuai dengan yang dibutuhkan. Konsentrasi yang di rekomendasikan adalah 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0 ng/ml.

c. Larutan utama

- Larutan *Concentrated Biotinylated Detection Ab*

Sentrifugasi *Concentrated Biotinylated Detection Ab* dengan 1000xG selama 30 detik, buka tutup vial secara perlahan untuk mencegah tercampurnya kembali endapan mikropartikel. Larutkan *Concentrated Biotinylated Detection Ab* dengan *Biotinylated detection Ab diluent* pada botol pencampur dengan perbandingan 1:100.

- Larutan *Concentrated HRP conjugated*

Concentrated HRP conjugated, buka tutup vial secara perlahan untuk mencegah tercampurnya kembali endapan. Larutkan dengan *HRP conjugated diluent* dengan perbandingan 1: 100.

- Larutan *substrate reagent*

Larutan ini merupakan cairan yang sensitif terhadap cahaya dan kontaminan, sehingga dibuka hanya jika dibutuhkan. Gunakan

polypropylene tube yang ditutupi dengan aluminium foil untuk mencegah larutan *substrate reagent* terkena cahaya pada saat pengerjaan maupun penyimpanan.

2. Tambahkan 50 μl larutan standar, reference standard dan sample diluent atau sampel pada tiap sumuran, tutupi plate dengan plate sealer, inkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C
3. Buang cairan pada tiap sumuran sebersih mungkin, kemudian diisi dengan 350 μl larutan wash buffer menggunakan *squirt bottle*, lakukan ini sebanyak 3 kali. Buang semua cairan pada setiap pencucian, pada pencucian terakhir buang cairan dan balikkan plate di atas kertas absorbent.
4. HRP conjugated: Tambahkan 100 μl larutan HRP conjugated pada tiap sumuran, tutup dengan foil plate sealer. Kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
5. Lakukan pencucian seperti pada langkah 3, sebanyak 5 kali.
6. Substrate: Tambahkan 90 μl larutan substrate pada tiap sumuran, tutup dengan foil plate sealer. Kemudian inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Lindungi plate dari cahaya langsung, ketika perubahan warna terjadi pada plate reaksi segera dihentikan.
7. Tambahkan 50 μL stop solution tiap sumuran, lalu warnanya segera berubah menjadi kuning.
8. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan Bio-Rad Analyzer. Dengan setingan panjang gelombang pada 450 nm.

Alat dan bahan untuk pemeriksaan *TGF-β*:

1. Elabscience® RAP (Rabbit TGF-β Elisa Kit, Catalog Number E-EL-RB0385)
 - a. *Micro ELISA Plate 1 buah*
 - b. Reference standard 2 vial
 - c. Reference standard dan sample diluent 1 vial 20 ml
 - d. Concentrated Biotinylated Detection Ab 1 vial 120 µl
 - e. Biotinylated detection Ab diluent 1 vial 10 ml
 - f. Concentrated Horseadish peroxidase (HRP) conjugated 1 vial 120 µl
 - g. Horseadish peroxidase (HRP) conjugated diluent 1 vial 10 ml
 - h. Concentrated wash buffer (25x) 1 vial 30ml
 - i. Substrate reagent 1 vial 10ml
 - j. Stop solution 1 vial 10 ml
 - k. *Plate sealer*

2. Alat
 - a. Bio-Rad model 680XR Analyzer dengan X-Y platform.
 - b. Standard Value Card : 1 kartu daftar volume dan konsentrasi rekonstitusi campuran standar.
 - c. Botol Pencampur : 2 buah botol (8ml) untuk mencampur mikropartikel dengan diluen mikropartikel.
 - d. Pipet dan pipet tip.
 - e. Deionized atau distilled water.
 - f. Multi-channel pipette, manifold dispenser, atau automated dispensing unit.
 - g. 50 ml dan 500 ml graduated cylinders.

- h. Microcentrifuge eppendorf.
- i. Polypropylene *test tubes*.

Prosedur pemeriksaan *TGF-β*:

1. Persiapkan sampel, reagen, larutan utama dan peralatan

a. Sampel

Partikel pada cairan peritoneum dipisahkan dengan cara sentrifugasi, kemudian segera dilakukan pemeriksaan assay atau dapat dibagi dan disimpan pada suhu $< -60^{\circ}\text{C}$.

b. Reagen

Reagen disiapkan pada suhu ruangan.

- Larutan *Wash Buffer*

Jika ditemukan endapan kristal pada *Wash Buffer Concentrate*, hangatkan pada suhu ruangan dan kocok secara perlahan hingga kristal larut. Larutkan 30 ml *Wash Buffer Concentrate* dengan 750 ml *distilled atau deionized water*.

- Larutan *Reference standard* dan *sample diluent*

Larutkan 20 ml *reference standard* dan *sample diluent* dengan *distilled atau deionized water* sampai menjadi 40 ml

- Larutan Standar

Persiapkan 15 menit sebelum digunakan, buat larutan standard dengan 1 ml larutan *sample diluent*, biarkan selama 10 menit sampai tercampur semua, hasilnya adalah larutan standart dengan konsentrasi 2000 pg/ml.

Kemudian encerkan serial sesuai dengan yang dibutuhkan. Konsentrasi yang di rekomendasikan adalah 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/ml.

Larutan utama

- Larutan *Concentrated Biotinylated Detection Ab*

Sentrifugasi *Concentrated Biotinylated Detection Ab* dengan 1000xG selama 30 detik, buka tutup vial secara perlahan untuk mencegah tercampurnya kembali endapan mikropartikel. Larutkan *Concentrated Biotinylated Detection Ab* dengan *Biotinylated detection Ab diluent* pada botol pencampur dengan perbandingan 1:100.

- Larutan *Concentrated HRP conjugated*

Concentrated HRP conjugated, buka tutup vial secara perlahan untuk mencegah tercampurnya kembali endapan. Larutkan dengan *HRP conjugated diluent* dengan perbandingan 1: 100.

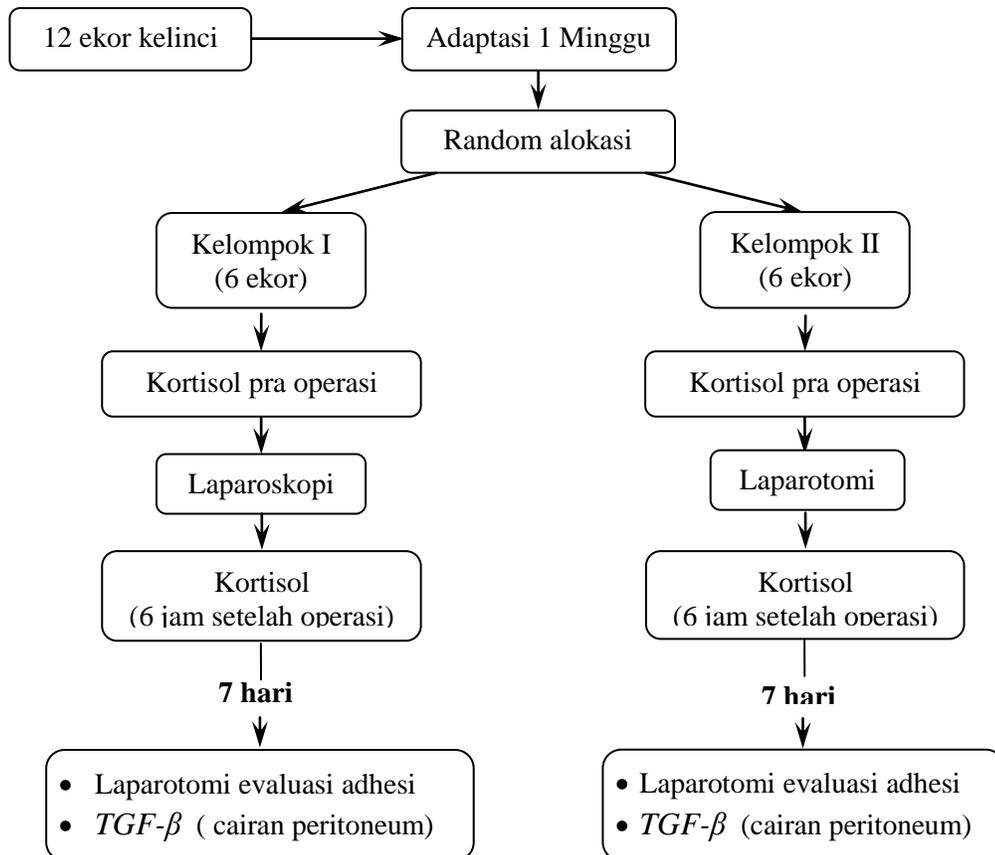
- Larutan *substrate reagent*

Larutan ini merupakan cairan yang sensitive terhadap cahaya dan kontaminan, sehingga dibuka hanya jika dibutuhkan. Gunakan *polypropylene tube* yang ditutupi dengan aluminium foil untuk mencegah larutan *substrate reagent* terkena cahaya pada saat pengerjaan maupun penyimpanan.

2. Tambahkan 100 μl larutan standar, reference standard dan sample diluent atau sample pada tiap sumuran, tutupi plate dengan plate sealer, inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C
3. Buang cairan pada tiap sumuran sebersih mungkin, kemudian diisi dengan 100 μl larutan biotinylated detection Ab pada setiap plate, tutup dengan plate sealer, goyang secara gentle untuk memastikan pencampuran, lalu inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C .
4. Aspirasi tiap sumuran dan cuci, ulangi proses ini sebanyak 3 kali, cuci dengan menggunakan wash buffer. Buang semua cairan pada setiap pencucian, pada pencucian terakhir buang cairan dan balikkan plate di atas kertas absorbent.
5. HRP conjugated: Tambahkan 100 μl larutan *HRP conjugated* pada tiap sumuran, tutup dengan *foil plate sealer*. Kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C .
6. Lakukan pencucian seperti pada langkah 3, sebanyak 5 kali.
7. Substrate: Tambahkan 90 μl larutan substrate pada tiap sumuran, tutup dengan foil plate sealer. Kemudian inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C . Lindungi plate dari cahaya langsung, ketika perubahan warna terjadi pada plate reaksi segera dihentikan.
8. Tambahkan 50 μL stop solution tiap sumuran, lalu warna nya segera berubah menjadi kuning.
9. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan Bio-Rad Analyzer. Dengan setingan panjang gelombang pada 450 nm.

4.8. Alur Penelitian

Alur rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.9. Cara Pengumpulan Data

Dari masing-masing kelompok diukur kadar kortisol 6 jam pasca operasi dari pembuluh dan setelah 7 hari pasca operasi dilakukan pengambilan sampel dari cairan peritoneum kelinci, untuk diukur kadar $TGF-\beta$ -nya, serta dinilai derajat adhesi peritoneum secara makroskopis.

Analisis Data

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas. Bila distribusi data normal dan homogen, untuk uji beda 2 sampel yang berpasangan dilakukan analisis secara parametrik *Paired t-test* dan untuk uji korelasi dilakukan analisis parametrik *Pearson*. Bila distribusi data tidak normal dan tidak homogen maka dilakukan analisis non parametrik. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $P \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program SPSS.

4.10. 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 yang baik dalam ruang kandang, perlakuan saat penelitian, menghilangkan rasa sakit, pengambilan unit analisis penelitian, dan pemusnahannya. Ethical clearance diajukan ke Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) sebelum melakukan percobaan.