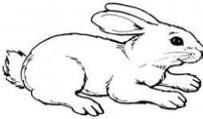
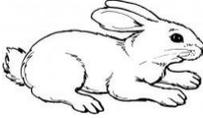


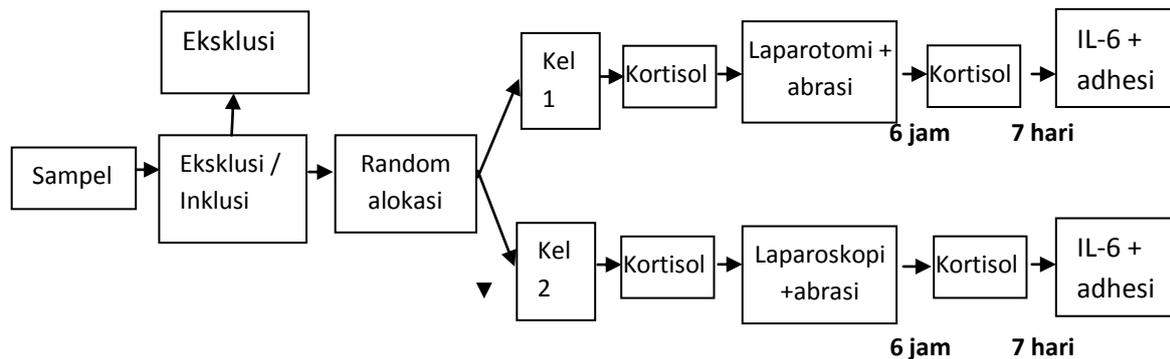
BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *post test design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Dipilih kelinci jenis New Zealand dengan pertimbangan ukuran tubuh yang cukup sehingga mudah saat dilakukan laparotomi. Percobaan dilakukan dengan *simple randomized sampling*. Kelompok penelitian dibagi menjadi 2, yaitu kelompok K1 sebagai kelompok perlakuan yaitu kelompok kelinci yang dilakukan laparotomi dan kelompok K2 sebagai kelompok perlakuan yaitu kelompok kelinci yang dilakukan laparotomi. Pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

	Kelompok 1 (X1), kelinci yang dilakukan operasi dengan laparotomi
	Kelompok2 (X2), kelinci yang dilakukan operasi dengan laparotomi



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

4.2. Sampel Penelitian

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 laparotomi 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 akan cepat terlihat. Beberapa peneliti sebelumnya juga menggunakan kriteria yang sama.

4.3. Kriteria Inklusi:

- a. Kelinci New Zealand jantan 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.

4.4. Besar Sampel

Menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 10% (1 ekor).³⁸ Jadi jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok yaitu 6 ekor kelinci.

4.5. Pemilihan Sampel

Sebelum digunakan dalam penelitian, 12 ekor kelinci diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. 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

4.6. 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 IL-6 cairan peritoneum dengan metode ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) dilakukan di LPPT 1 Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

4.7. Variabel Penelitian

Variabel bebas

Tindakan operasi laparotomi dan laparoscopi

Variabel antara

Kadar kortisol darah dan kadar IL-6 cairan peritoneum

Variabel tergantung

Derajat adhesi peritoneal

4.8. Definisi Operasional

1. Tindakan operasi adalah tindakan operasi abdomen dan abrasi ileum terminal, dilakukan dengan 2 cara, kelompok I dengan cara laparotomi 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 dan kelompok II dengan cara laparoskopi 3 port (satu buah insisi 11 mm dan dua buah insisi masing-masing 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, skala variabel ordinal.
2. Kadar kortisol darah adalah hasil pengukuran kadar kortisol yang diambil dari sampel darah vena di telinga, diambil sebelum perlakuan dan 6 jam sesudah perlakuan. Pengukuran dilakukan dengan pemeriksaan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, skala variabel rasio.
3. Kadar *IL-6* cairan peritoneum adalah hasil pengukuran kadar *IL-6* cairan peritoneum yang diambil dari sampel cairan peritoneum yang diambil hari ke-7 dengan menggunakan pemeriksaan secara *ELISA*, cairan diambil pada cavum pelvis kelinci yang diposisikan tegak dengan kepala diatas selama 15 menit dan melalui laparotomi, skala variabel rasio.

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

4.9. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan yang di pakai 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. Ketamin injeksi, merupakan bahan untuk anestesi intravenous.
3. Diazepam injeksi, merupakan bahan untuk sedasi.
4. Alat bedah minor.
5. Alat bedah laparoscopi merk Olympus tipe HD
6. Kit pemeriksaan IL-6.

4.10. Pelaksanaan Penelitian

1. 12 ekor kelinci jantan diadaptasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara *ad libitum*.
2. Pembiusan memakai ketamin 20 mg/kgBB dan diazepam 1,5 mg/kgBB. Tindakan dilakukan secara aseptik dengan menggunakan instrumen steril. Antibiotik profilaksis tidak diberikan karena dapat mempengaruhi reaksi inflamasi.
3. Ambil sampel darah dari vena di telinga untuk pemeriksaan kadar kortisol darah sebelum perlakuan.
4. Perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing, yaitu:

- a. Kelompok perlakuan 1, cukur bulu pada perut dan desinfeksi dengan larutan povidon iodine. Cuci sarung tangan dengan NaCl 0.9%, hingga bebas dari talk. dilakukan laparotomi sepanjang 5 cm, identifikasi caecum dan ileum terminal, abrasi ileum terminal dengan forsep laparoscopi sepanjang 2 cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Periksa kadar kortisol darah dari vena di telinga 6 jam post operasi laparotomi abrasi ileum
 - b. Kelompok perlakuan 2, cukur bulu pada perut dan desinfeksi dengan larutan povidon iodine. Cuci sarung tangan dengan NaCl 0.9%, hingga bebas dari talk, dilakukan laparoscopi 3 port (satu buah insisi 11 mm dan dua buah insisi 6 mm) dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoscopi sepanjang 2 cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Periksa kadar kortisol darah dari vena di telinga 6 jam post operasi laparoscopi abrasi ileum
5. Pasca operasi kelinci dirawat dikandang semula dan mendapatkan Ceftriaxone 3 mg/100 gr berat badan secara intramuskuler tiap 24 jam selama 3 hari. Setiap kelinci yang mati sebelum hari keempat pasca laparotomi I dikeluarkan dari penelitian dan diganti oleh kelinci baru yang memenuhi kriteria. Sedangkan kelinci yang mati setelah hari keempat pasca operasi laparotomi I dilakukan laparotomi otopsi, diambil cairan peritoneum untuk dilakukan pemeriksaan ELISA atau sedimentasi cairan peritoneum disimpan

dalam kulkas dengan suhu -30°C . Setiap kelinci yang mati dicatat secara terpisah.

6. Laparotomi II dilakukan pada hari ke-7 untuk menilai derajat adhesi intraperitoneum. Kelinci diposisikan tegak (*erect*) selama 15 menit supaya cairan peritoneum terkumpul di *cavum pelvis*, kemudian dilakukan insisi laparotomi dengan cara insisi vertikal sepanjang 5 cm pada sisi kiri dari linea mediana, kemudian diambil cairan peritoneum untuk pemeriksaan kadar IL-6, dan dilakukan penilaian derajat adhesi di sisi kanan (ileum terminal). Cairan peritoneum diambil sebanyak ± 1 cc untuk penelitian kadar IL-6 cairan peritoneum.
7. Prosedur pemeriksaan derajat adhesi intraperitoneum dinilai sesuai dengan kriteria *Nair et al.*

Alat dan bahan untuk pemeriksaan Kortisol :

1. Elabscience[®] RAP (*Rabbit Cortisol 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 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. 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, 0ng/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 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 50 µl larutan standar, *reference standard* dan *sample diluent* atau sample pada tiap lubang, tutupi plate dengan *plate sealer*, inkubasi selama 45 menit pada suhu 37⁰C
3. Buang cairan pada tiap lubang 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 lubang, tutup dengan *foil plate sealer*. Kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C.
5. Lakukan pencucian seperti pada langkah 5, sebanyak 5 kali.
6. *Substrate*: Tambahkan 90 µl larutan *substrate* pada tiap lubang, tutup dengan *foil plate sealer*. Kemudian inkubasi selama 15 menit pada suhu 37⁰. Lindungi plate dari cahaya langsung, ketika perubahan warna terjadi pada plate reaksi segera dihentikan.
7. Tambahkan 50 µL *stop solution* tiap lubang, lalu warna nya segera berubah menjadi kuning.

8. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan Bio-Rad Analyzer. Dengan setingan panjang gelombang pada 450nm.

Alat dan bahan untuk pemeriksaan IL-6 :

1. Elabscience[®] RAP (Rabbit IL-6 ELISA Kit, Catalog Number E-EL-RB0014)

- a. *Micro ELISA Plate* 1 buah
- b. *Reference standard* 2 vial
- c. *Reference standard & 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 Horseradish peroxidase (HRP) conjugate* 1 vial 120 µl
- g. *Horseradish 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 IL-6 :

Pengumpulan dan Preparasi Sampel

Sampel cairan peritoneum dilakukan sentrifugasi, kemudian dilakukan pengumpulan supernatan dan dilakukan pemeriksaan assay atau dapat dibagi dan disimpan pada suhu $< -60^{\circ}\text{C}$.

Preparasi Reagen

Semua reagen disiapkan pada suhu ruangan sebelum digunakan.

- *Larutan Wash Buffer*

Dilusikan 30 mL *Concentrated Wash Buffer* dalam 750 mL *Wash Buffer* dengan air deionisasi atau distilata. Bila kristal telah terbentuk di dalam konsentrat, maka dapat dihangatkan dengan air bersuhu 40°C dan diaduk perlahan hingga kristal larut sepenuhnya. Larutan didinginkan dalam suhu ruangan sebelum digunakan.

- *Larutan Standar*

Persiapkan larutan standar 15 menit sebelum digunakan, buat larutan standar dengan 1,0 mL *sample diluent*, biarkan selama 10 menit

sampai tercampur semua, ini akan menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi 1000 pg/mL. Kemudian buat serial dilusi sesuai dengan yang dibutuhkan, konsentrasi yang di rekomendasikan adalah 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 0 pg/mL. Larutan standar yang tidak di-dilusi menjadi standar yang tertinggi (1000 pg/mL), sementara larutan sample diluent menjadi standar nol (0 pg/mL).

- Larutan *Concentrated Biotinylated Detection Ab*

Hitung jumlah yang dibutuhkan sebelum digunakan (100 μ L / tabung). Sentrifugasi tabung stok sebelum digunakan, kemudian larutkan *Concentrated Biotinylated Detection Ab* menggunakan *Biotinylated Detection Ab diluent* dengan konsentrasi 1:100.

- Larutan *Concentrated HRP Conjugate*

Hitung jumlah yang dibutuhkan sebelum digunakan (100 μ L / tabung). Larutkan *Concentrated HRP Conjugate* menggunakan *Concentrated HRP Conjugate Diluent* dengan konsentrasi 1:100.

- Larutan *Substrate Reagent*

Larutan ini sensitif terhadap cahaya dan kontaminan, sehingga jangan dibuka sebelum dibutuhkan. Dosis yang dibutuhkan untuk reagen dapat diaspirasi dengan tip steril dan residu reagen yang tidak terpakai tidak dimasukkan kedalam vial kembali.

Prosedur Pencucian

Tambahkan 350 μL *Wash Buffer* kedalam masing – masing tabung, rendam selama 1 – 2 menit. Setelah pencucian, tuang *wash buffer* yang tersisa dengan membalik plate dan dikeringkan.

Prosedur Assay

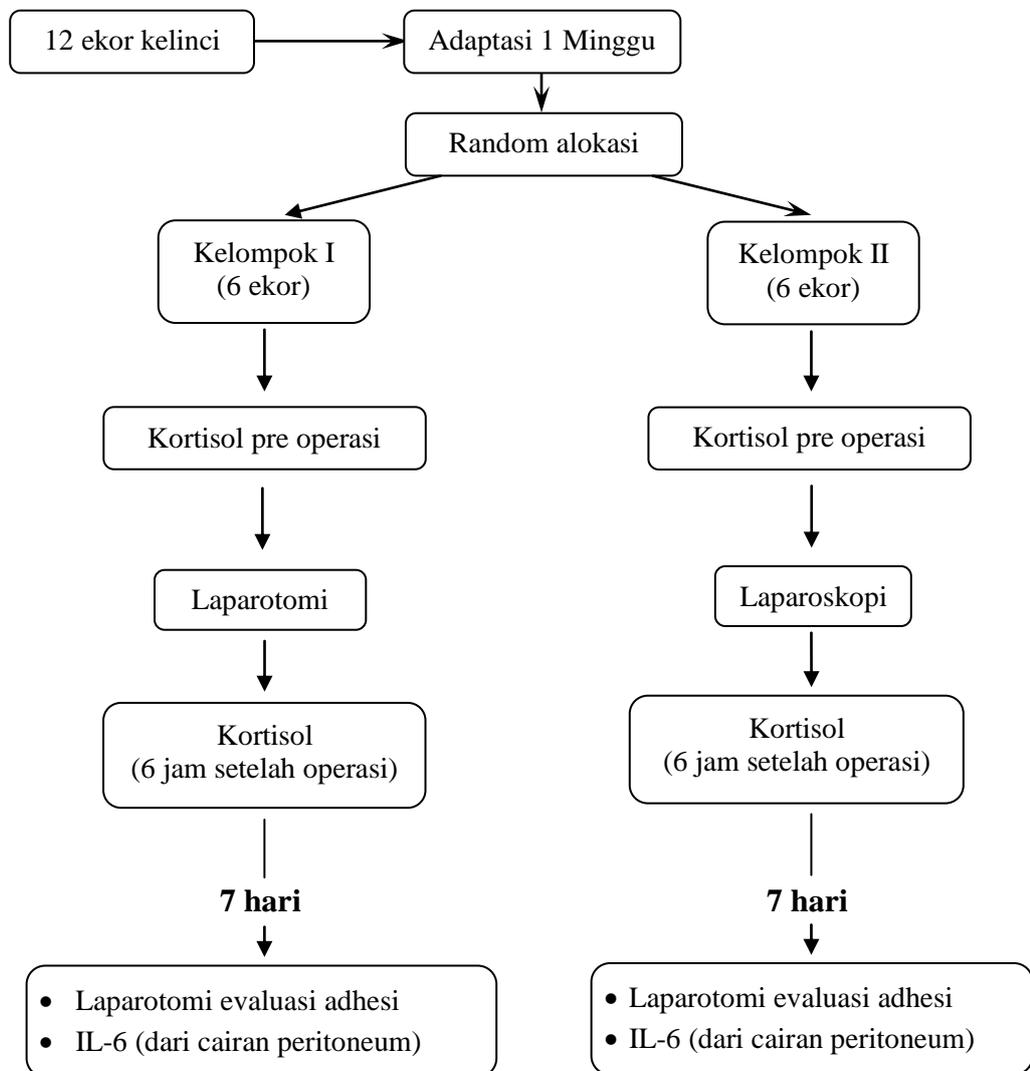
Semua reagen dan sampel dibawa ke dalam suhu ruang sebelum digunakan. Semua reagen dicampur secara merata dengan diputar secara lembut.

1. Tambahkan 100 μL larutan *Standar*, *Blank* atau *Sampel* pada tiap *well*. *Well* yang *blank* ditambahkan dengan *Reference Standard & Sample diluent*. Larutan ditambahkan ke dasar plate mikro ELISA, dengan menghindari tersentuh dinding, lalu dicampur merata. Tutup plate dengan *sealer*, lalu diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37 °C.
2. *Biotylinated Detection Ab* : pisahkan cairan dari tiap *well*, dan tidak dicuci. Lalu tambahkan 100 μL larutan *Biotylinated Detection Ab* pada tiap *well*, dan tutup plate dengan *plate sealer*. Pastikan tercampur secara merata, lalu inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
3. Pencucian : aspirasi cairan pada tiap *well* dan dicuci, proses ini diulang tiga kali. Cuci dengan mengisi tiap *well* dengan *Wash Buffer* (kurang lebih 350 μL). Setelah pencucian terakhir, bersihkan *Wash Buffer* yang tersisa dengan aspirasi, lalu plate dibalik dan dikeringkan diatas kertas absorbent.
4. *HRP conjugate*: Tambahkan 100 μL larutan *HRP conjugate* pada tiap *well*, tutup dengan *plate sealer*, kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.

5. Pencucian : ulangi proses pencucian seperti pada langkah 3, sebanyak 5 kali
6. *Substrate* : Tambahkan 90 μL larutan *Substrate* pada tiap *well*, tutup dengan *plate sealer*. Kemudian inkubasi selama 15 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$. Lindungi plate dari cahaya langsung. Waktu reaksi dapat berubah tergantung pada perubahan warna, namun tidak lebih dari 30 menit. Ketika perubahan warna terjadi pada *well* standard, reaksi segera dihentikan.
7. Penghentian : Tambahkan 50 μL *Stop Solution* tiap *well*, dan warnanya segera berubah menjadi kuning.
8. *OD Measurement* : tentukan *optical density (OD value)* pada masing – masing *well*, menggunakan *micro-plate reader set* pada 450 nm. Sebelum digunakan, *micro-plate reader set* dibuka, dihangatkan dan ditentukan parameter testingnya.

4.11. Alur Penelitian

Alur rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.12. Cara Pengumpulan Data

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

4.13. Analisis Data

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan boxplot. Untuk mengetahui normalitas data dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test*. 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 syarat-syarat analisis parametrik tidak terpenuhi maka dilakukan analisis non parametrik. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $P \leq 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program SPSS.

4.14. 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 clearence diajukan sebelum melakukan percobaan.