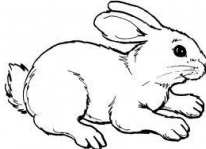
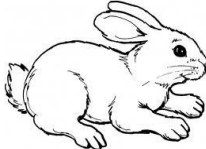


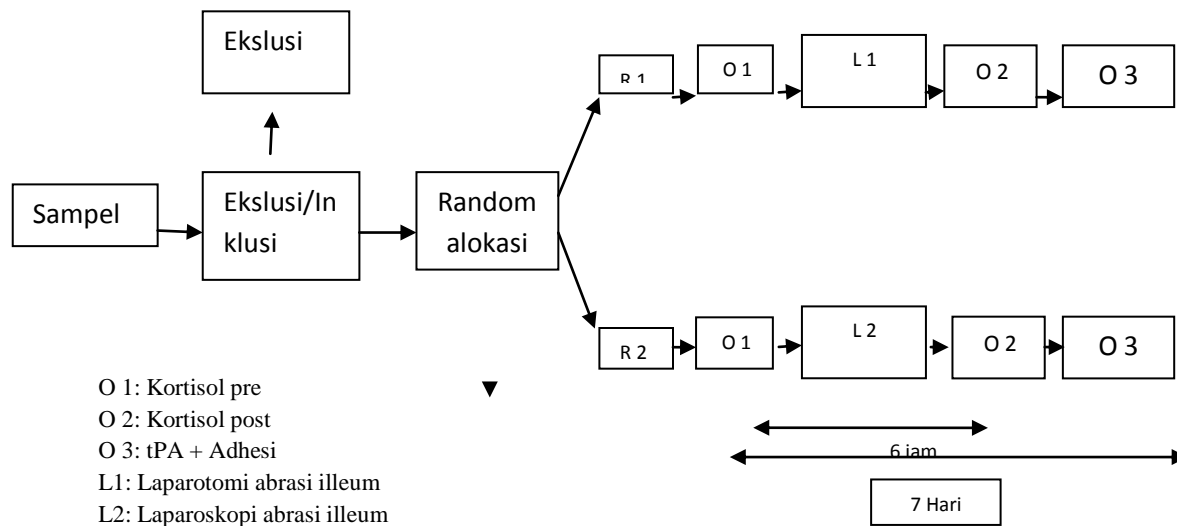
BAB IV

METODELOGI 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 laparoscopi. Percobaan dilakukan dengan *simple randomized sampling*. Kelompok penelitian dibagi menjadi 2, yaitu kelompok R1 sebagai kelompok perlakuan yaitu kelompok kelinci yang dilakukan laparotomi dan kelompok R2 sebagai kelompok perlakuan yaitu kelompok kelinci yang dilakukan laparoscopi. Pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

R1		Kelompok 1 (R1), kelinci yang di laparotomi dan abrasi illeum
R2		Kelompok 2 (R2), kelinci yang di laparoscopi dan abrasi illeum



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Binatang percobaan berupa kelinci putih jantan (new zealand) sebanyak 12 ekor yang secara fisik sehat, umur 8-12 minggu dengan berat badan antara 2500 – 3000 gram, tidak terdapat infeksi pada kulit daerah abdomen sebelum perlakuan, tidak terdapat infeksi ataupun adhesi intraperitoneum sebelum perlakuan. Dipilih kelinci jantan supaya tidak terpengaruh hormonal dan kehamilan. Penelitian usia dewasa muda karena kelinci masih dalam usia dewasa muda dan respon imunologis akan cepat terlihat. Beberapa peneliti sebelumnya juga menggunakan kriteria yang sama.

4.2.2. Sampel

Kriteria Inklusi:

- a. Kelinci putih jantan (new zealand)
- 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

Kriteria Eksklusi:

Selama perawatan dan perlakuan 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 R1 : 6 kelinci

Kelompok R2 : 6 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 tPA cairan peritoneum dengan metode ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) dilakukan di LPPT 1 Fakultas Kedokteran UGM

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas

Tindakan operasi

Variabel perantara

Kadar kortisol dan kadar tPA cairan peritoneum

Variabel tergantung

Derajat adhesi intraperitoneum

4.5. Definisi Operasional

1. Tindakan operasi adalah tindakan operasi abdomen dan abrasi ileum terminal yang dilakukan secara steril baik alat dan doek, dilakukan dengan 2 cara, kelompok I dengan cara laparotomi sepanjang 5cm dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoskopik sepanjang 2cm 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 laparoskopik 3 port (satu

buah insisi 11mm dan dua buah insisi masing-masing 6mm) dan abrasi ileum terminal dengan forsep laparoscopi sepanjang 2cm 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 diambil sebelum perlakuan dan 6 jam sesudah perlakuan. Pengukuran dilakukan dengan pemeriksaan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, skala variabel rasio.
3. Kadar *tPA* cairan peritoneum adalah hasil pengukuran kadar *tPA* cairan peritoneum yang diambil dari sampel cairan peritoneum yang diambil hari ke-7 dengan menggunakan pemeriksaan secara *ELISA*, cairan diambil pada cavum pelvis kelinci 60-800 dengan kepala diatas selama 15 menit dan melalui laparatomi, 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.

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan yang di pakai dalam penelitian adalah kelinci jantan yang berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 200 – 300 gram. Jumlah total 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 laparoscopi steril.
7. Kit pemeriksaan tPA.

4.7. Pelaksanaan Penelitian

1. Dua belas ekor kelinci jantan diadaptasi di laboratorium 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.⁴²
Tindakan dilakukan secara aseptik dengan menggunakan instrument steril.
3. Ambil sampel darah untuk kadar kortisol darah sebelum perlakuan.
4. Pelakuan 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 5cm, identifikasi caecum dan illeum terminal, abrasi ileum terminal dengan forsep laparoscopi sepanjang 2cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Periksa kadar kortisol darah 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 11mm dan

dua buah insisi masing-masing 6mm), isi cavum peritoneal dengan CO₂ dengan tekanan 6-8 mmHg dan untuk memepertahkannya flow rate diatur 2,4 L/min. Abrasi ileum terminal dengan forsep laparoskopi sepanjang 2cm ke arah oral di sisi antimesenterial, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum.

Kadar kortisol darah 6 jam post operasi laparoskopi abrasi ileum

5. Paska operasi kelinci dirawat dikandang semula dan mendapatkan antibiotika profilaksis Ceftriaxone 3 mg/100gr berat badan secara intramuskuler. Setiap kelinci yang mati setelah hari keempat paska operasi laparotomi I dilakukan laparotomi otopsi. Sedangkan kelinci yang mati sebelum hari keempat paska laparotomi I dikeluarkan dari penelitian dan diganti oleh kelinci baru yang memenuhi kriteria. Setiap kelinci yang mati dicatat secara terpisah.
6. Laparotomi II dilakukan pada hari ke-7 untuk menilai derajat adhesi intraperitoneum. Setelah dilakukan terminasi dengan mematahkan leher, kelinci diposisikan tegak (erect) kemudian dimiringkan dengan posisi 45⁰ selama 15 menit supaya cairan peritoneum tekumpul di *cavum pelvis*. Kemudian dilakukan insisi laparotomi dengan cara insisi vertikal ± 5 cm sisi kiri dari linea mediana, hal ini untuk memudahkan dalam penilaian adhesi di sisi kanan (ileum terminal). Cairan peritoneum diambil sebanyak ± 1cc untuk penelitian kadar tPA cairan peritoneum.
7. Pemeriksaan derajat adhesi intraperitoneum dinilai sesuai dengan kriteria *Nair et al*³⁸.

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 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 40°C 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 μ l 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 μ l 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 μ l larutan *HRP konjugated* 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 μ l 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 μ L *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 tPA :

1. Elabscience[®] RAP (Rabit tPA Kit, Catalog Number E-EL-RB0523)
 - 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. Microcentrifuge eppendorf.

- i. *Polypropylene test tubes.*

Prosedur pemeriksaan tPA:

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 20 ml *Wash Buffer Concentrate* dengan *distilled* atau *deionized water* sampai menjadi 500 ml larutan *Wash Buffer*.

- 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 500 ng/ml.

Kemudian encerkan sesuai dengan yang dibutuhkan. Konsentrasi yang di rekomendasikan adalah 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 0 ng/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.

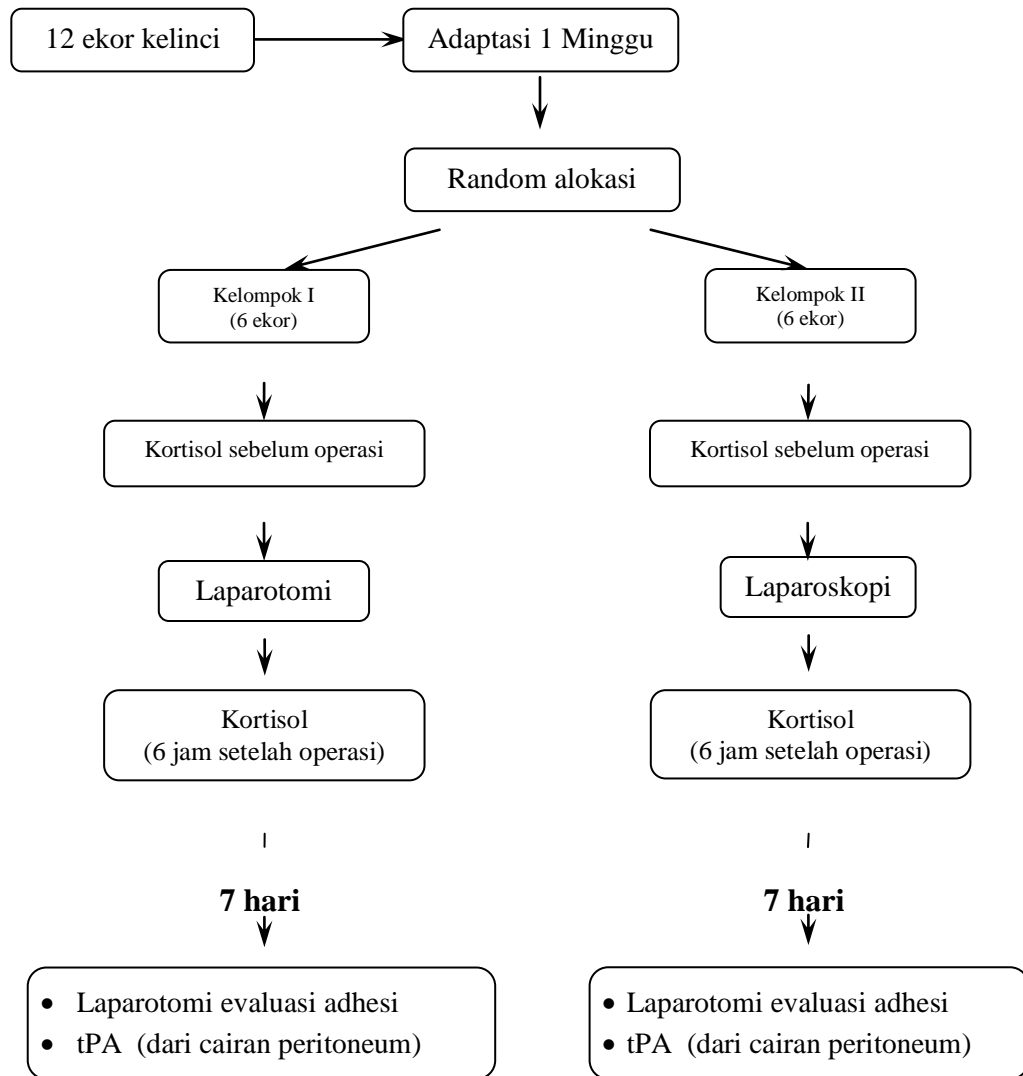
- Larutan *substrate reagent*

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 lubang, tutupi plate dengan *plate sealer*, inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C

3. Buang cairan pada tiap lubang sebersih mungkin, kemudian diisi dengan 100 μ l larutan *biotinylated detection Ab* pada setiap plate, tutup dengan *plate sealer*, goyang secara gentle untuk memastikan pencampuran, lalu inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰ C.
4. Aspirasi tiap lubang 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 μ l larutan *HRP konjugated* pada tiap lubang, tutup dengan *foil plate sealer*. Kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C.
6. Lakukan pencucian seperti pada langkah 5, sebanyak 3 kali.
7. *Substrate*: Tambahkan 90 μ l 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.
8. Tambahkan 50 μ L *stop solution* tiap lubang, lalu warna nya segera berubah menjadi kuning.
9. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan Bio-Rad Analyzer. Dengan setingan panjang gelombang pada 450nm.

4.8. Alur rancangan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 4.2. Alur Penelitian

4.9. Cara Pengumpulan Data

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

4.10. 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 analisis.

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, pengambilan unit analisis penelitian,

dan pemusnahannya. *Ethical clearance* diajukan ke Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) sebelum melakukan percobaan.