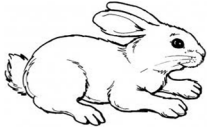

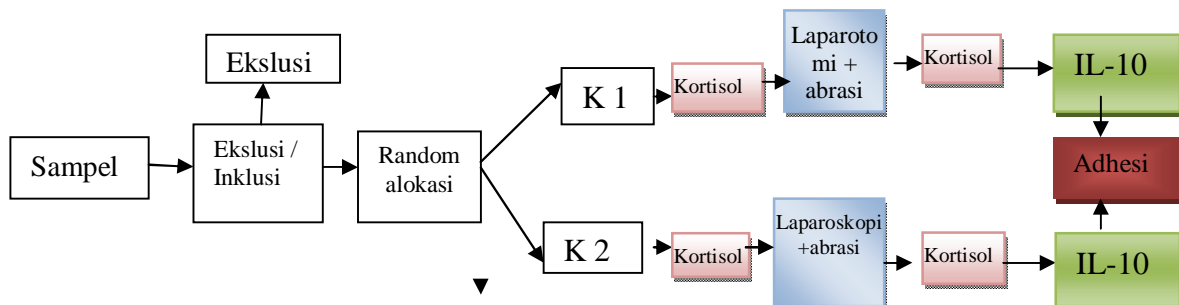


BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *post test design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Dipilih kelinci New Zealand dengan pertimbangan ukuran tubuh yang relatif besar agar mudah saat dilakukan laparotomi. Percobaan dilakukan dengan *simple randomized sampling*. Setelah diaklimatisasikan selama 1 minggu, 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:

K1		Kelompok 1 (K1), kelinci yang dibuat adhesi peritoneal dengan laparotomi
K2		Kelompok2 (K2), kelinci yang dibuat adhesi peritoneal dengan laparotomi



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Binatang percobaan berupa kelinci jantan jenis New Zealand (1 galur) yang secara fisik sehat, umur 8-12 minggu dengan berat badan antara 2500 – 3000 gram. Pemilihan kelinci atas pertimbangan ukuran tubuh yang cukup besar sehingga tindakan laparoscopi 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.

4.2.2. Sampel

Kriteria Inklusi:

- a. Kelinci New Zealand jantan
- 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 dan perlakuan kelinci tampak sakit (tidak aktif)

4.2. 3 Besar Sampel

Menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor, dengan cadangan 10% (1 ekor).⁴⁰ Sehingga jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 6 ekor kelinci.

4.2.4 Pemilihan Sampel

Sebelum digunakan dalam penelitian, 12 ekor kelinci diaklimatisasikan 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 K1 : 6 ekor kelinci

Kelompok K2 : 6 ekor kelinci

4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 2 bulan. Penelitian dilakukan di Laboratorium LPPT 1 UGM dan Laboratorium Ilmu Biologi UNNES.

4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas

Tindakan operasi

Variabel antara

Kadar kortisol dan kadar IL-10

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 secara laparotomi, abrasi ileum dengan menggunakan forsep laparotomi dan kelompok II secara laparotomi, abrasi ileum dengan forsep laparotomi.
2. Kadar kortisol adalah hasil pengukuran kadar kortisol yang diambil dari sampel darah. Pengukuran dilakukan dengan pemeriksaan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), skala variabel rasio.

3. Kadar IL-10 adalah hasil pengukuran kadar IL-10 yang diambil dari sampel cairan peritoneum dengan menggunakan pemeriksaan ELISA, skala variabel rasio.
4. Derajat adhesi peritoneal adalah penilaian adhesi yang dinilai berdasarkan gambaran makroskopis menggunakan scoring menurut *Nair et al*, skala variabel ordinal.

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

1. Hewan yang di pakai dalam penelitian adalah kelinci jantan jenis New Zealand yang berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan 2500 – 3000 gram. Jumlah sampel adalah 12 ekor.
2. Diazepam injeksi dan ketamin injeksi, merupakan bahan untuk sedasi dan anestesi intravenous.
3. Alat bedah minor.
4. Alat bedah laparoscopi merk Olympus
5. Kit pemeriksaan Kadar Kortisol dan IL-10.

4.7. Pelaksanaan Penelitian

1. 12 ekor kelinci jantan diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standard selama 1 minggu secara *ad libitum*.
2. Sebelum pembiusan semua kelinci diambil sample darahnya untuk pemeriksaan kadar kortisol sebelum operasi. 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. Perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing, yaitu:
 - a. Kelompok perlakuan 1, dilakukan laparotomi dan abrasi ileum terminal sepanjang 1 cm kearah proksimal dari ileocaecal junction, pada sisi anti-mesenterial dengan forsep laparoscopi, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Kadar kortisol darah diperiksa 6 jam post operasi.
 - b. Kelompok perlakuan 2, dilakukan laparoscopi dengan port berukuran 1 cm, 0,5 cm dan 0,5 cm, dan abrasi ileum terminal sepanjang 1 cm kearah proksimal dari ileocaecal junction, pada sisi anti-mesenterial dengan forsep laparoscopi, luka operasi ditutup dengan jahitan satu lapis memakai silk 3/0 tanpa menjahit peritoneum. Kadar kortisol darah diperiksa 6 jam post operasi.

4. Pasca operasi kelinci dirawat dikandang semula dan mendapatkan Ceftriaxone 3 mg/100gr berat badan secara intramuskuler tiap 24 jam selama 3 hari. Setiap kelinci yang mati setelah hari keempat pasca operasi laparotomi I/ laparoskopi dilakukan laparotomi otopsi. Sedangkan kelinci yang mati sebelum hari keempat pasca laparotomi/laparoskopi I dikeluarkan dari penelitian dan diganti oleh kelinci baru yang memenuhi kriteria. Setiap kelinci yang mati dicatat secara terpisah.
5. Laparotomi II dilakukan pada hari ke-7 untuk menilai derajat adhesi intraperitoneum. Setelah diterminasi, kelinci diposisikan tergantung 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, kemudian diambil cairan peritoneum untuk pemeriksaan kadar IL-10, dan dilanjutkan penilaian derajat adhesi di sisi kanan (*ileum terminal*).
6. Prosedur pemeriksaan derajat adhesi intraperitoneum dinilai sesuai dengan kriteria *Nair et al.*

Alat dan bahan untuk pemeriksaan Cortisol:³³

1. Rabbit UFC (Urinary Free Cortisol) ELISA Kit
 - a. Mikro ELISA plate, 8 wheel x 12 strips
 - 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 HRP Conjugate, 1 vial 120 μ l
 - g. HRP Conjugate Diluent, 1 vial 10 ml
 - h. Concentrated Wash Buffer (25x), 1 vial 30 ml
 - i. Substrate Reagent, 1 vial 10 ml
 - j. Stop Solution , 1 vial 10 ml
 - k. Plate Sealer, 5 pieces
 - l. Manual, 1 copy
 - m. Certificate of Analysis, 1 copy

2. Alat :

- a. Microplate reader dengan panjang gelombang filter 450 nm
- b. High-precision transferpettor, selang EP, dan ujung pipet disposibel
- c. Inkubator 37 ° C
- d. Air destilasi atau deionisasi
- e. Kertas serap
- f. Microcentrifuge
- g. Standart curve software (Expert curve 1.4)

Prosedur pemeriksaan Crtisol;

1. Persiapkan sampel, reagen, larutan utama dan peralatan

a. Sampel

Biarkan sample darah membeku selama 2 jam pada suhu 4 °C .Lakukan sentrifugasi selama 15 menit, , kemudian segera dilakukan pemeriksaan assay atau dapat dibagi dan disimpan pada suhu $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (≤ 1 bulan), atau -80°C (≤ 6 bulan) ..Tabung darah harus disposibel, steril.

b. Reagen

Reagen disiapkan pada suhu ruangan

c. Larutan Wash Buffer

Encerkan 30 ml WBC menjadi 750 ml 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 harus didinginkan dalam suhu ruangan sebelum digunakan

d. Larutan Standar

Siapkan larutan standar 15 menit sebelum digunakan. Campur larutan Standar dengan 1 ml Sample Diluent, biarkan 10 menit sampai terlarut. Rekonstruksi ini menghasilkan 40 ng/ml larutan stok. Kemudian buat pengenceran serial (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, , 0 ng/mL).

2. Prosedur :

- a. Tambahkan 50 μ l standar atau sampel pada masing- masing lubang microplate.
- b. Tambahkan 50 μ l Biotinylated Detection AB. Inkubasi 45 menit dalam suhu 37 $^{\circ}$ C
- c. Aspirasi dan cuci 3 kali
- d. Tambahkan 100 μ l HRP Conjugate. Inkubasi 30 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C
- e. Aspirasi dan cuci 5 kali
- f. Tambahkan 90 μ l Substrate Reagent. Inkubasi 15 menit dalam suhu 37 $^{\circ}$ C
- g. Tambahkan 50 μ l Stop Solution . Baca pada 450 nm segera
- h. Kalkulasi hasil dalam bentuk nilai OD. Nilai atau konsentrasi real dihasilkan dengan memasukkan nilai OD dalam standar curve sesuai software seperti curve expert 1.4.

Alat dan bahan untuk pemeriksaan IL-10:³⁴

3. Rabbit IL-1 α (Interleukin 1 Alpha) ELISA Kit
 - a. Mikro ELISA plate, 8 wheel x 12 strips
 - 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 HRP Conjugate, 1 vial 120 μ l
 - g. HRP Conjugate Diluent, 1 vial 10 ml
 - h. Concentrated Wash Buffer (25x), 1 vial 30 ml
 - i. Substrate Reagent, 1 vial 10 ml
 - j. Stop Solution , 1 vial 10 ml
 - k. Plate Sealer, 5 pieces
 - l. Manual, 1 copy
 - m. Certificate of Analysis, 1 copy
4. Alat :
 - a. Microplate reader dengan panjang gelombang filter 450 nm
 - b. High-precision transferpettor, selang EP, dan ujung pipet disposibel
 - c. Inkubator 37 ° C
 - d. Air destilasi atau deionisasi
 - e. Kertas serap
 - f. Microcentrifuge
 - g. Standart curve software (Expert curve 1.4)

Prosedur pemeriksaan IL-10 :³⁴

3. 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 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (≤ 1 bulan), atau -80°C (≤ 6 bulan) .

b. Reagen

Reagen disiapkan pada suhu ruangan

c. Larutan Wash Buffer

Encerkan 30 ml WBC menjadi 750 ml 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 harus didinginkan dalam suhu ruangan sebelum digunakan

d. Larutan Standar

Siapkan larutan standar 15 menit sebelum digunakan. Campu larutan Standar dengan 1 ml Sample Diluent, biarkan 10 menit sampai terlarut. Rekonstruksi ini menghasilkan 1000 pg/ml larutan stok. Kemudian buat pengenceran serial (1000, 500, 250, 62.5, 31.25, 15.63, 0 pg/mL).

4. Prosedur :

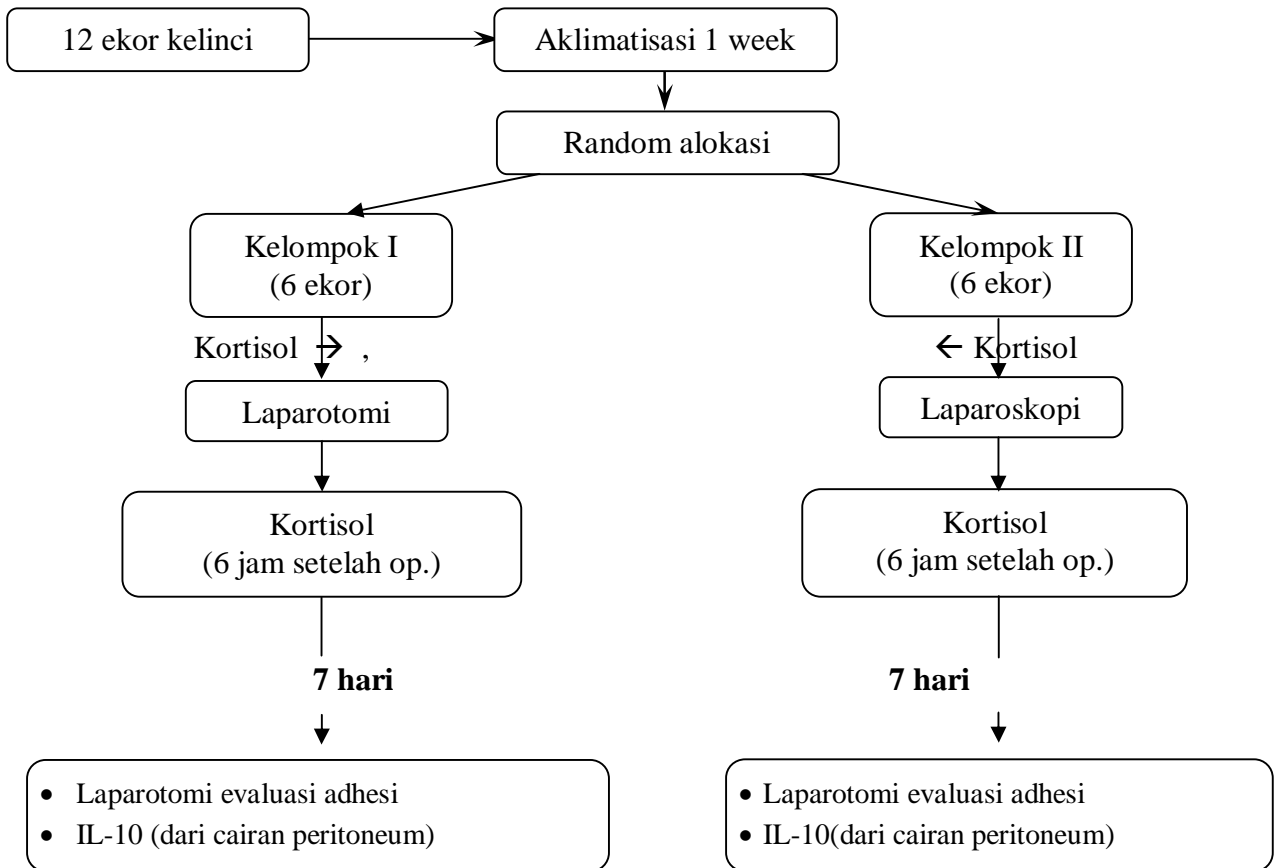
a. Tambahkan 100 μl standar atau sampel pada masing- masing lubang microplate. Inkubasi 90 menit dalam suhu 37°C

b. Tambahkan 100 μl Biotinylated Detection AB. Inkubasi 1 jam dalam suhu 37°C

- c. Aspirasi dan cuci 3 kali
- d. Tambahkan 100 μ l HRP Conjugate. Inkubasi 30 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C
- e. Aspirasi dan cuci 5 kali
- f. Tambahkan 90 μ l Substrate Reagent. Inkubasi 15 menit dalam suhu 37 $^{\circ}$ C
- g. Tambahkan 50 μ l Stop Solution . Baca pada 450 nm segera
- h. Kalkulasi hasil dalam bentuk nilai OD. Nilai atau konsentrasi real dihasilkan dengan memasukkan nilai OD dalam standar curve sesuai software seperti curve expert 1.4.

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 sebelum dan 6 jam pasca operasi, setelah 7 hari pasca operasi dilakukan pengambilan sampel dari cairan peritoneum kelinci, untuk diukur kadar IL-10-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 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 ke Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) sebelum melakukan percobaan.