BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Pada penelitian ini ruang lingkup keilmuan yang digunakan adalah Ilmu Anatomi, Histologi, Bedah, Farmakologi, dan Patologi Klinik.

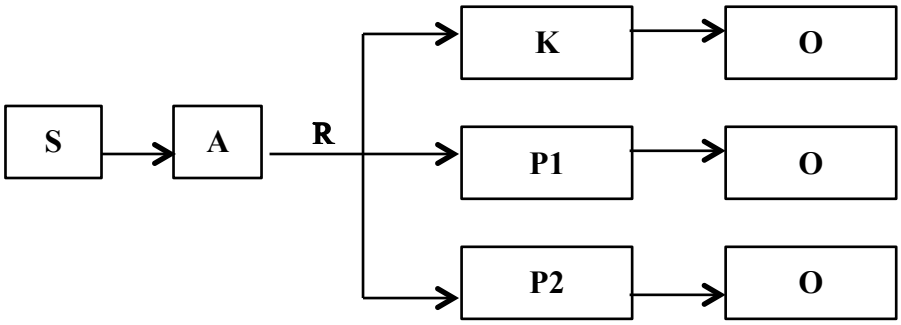
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
b. Pengambilan serum dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
c. Pemeriksaan kadar bilirubin dilakukan di laboratorium swasta di Yogyakarta.
d. Penelitian dan pengumpulan data berlangsung pada bulan Maret – Mei 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan *Post-Test Only Control Group Design* menggunakan hewan coba tikus Wistar sebagai obyek penelitian. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok yang dirandomisasi sederhana, yaitu kelompok kontrol (dilakukan ligasi duktus

koledokus), kelompok perlakuan 1 (dilakukan ligasi duktus koledokus diikuti administrasi UDCA tunggal), dan kelompok perlakuan 2 (dilakukan ligasi duktus koledokus diikuti administrasi kombinasi UDCA-Glutathione). Penilaian dilakukan dengan membandingkan kadar bilirubin total dan bilirubin direk pada serum kelompok perlakuan dan kontrol. Penelitian tidak diawali dengan pra tes karena dibuat asumsi seluruh tikus Wistar normal pada kondisi pra ligasi dan memiliki kadar bilirubin total dan direk di serum yang serupa.



Gambar 1. Rancangan Penelitian

S : Sampel

A : Aklimatisasi

R : Randomisasi sederhana

K : Kontrol. Tikus Wistar jantan yang dilakukan ligasi duktus koledokus dan diberi pakan standar secara ad libitum selama 21 hari. Pada hari ke-22 seluruh tikus dilakukan pengambilan sampel serum.

P1 : Perlakuan 1. Tikus Wistar jantan yang dilakukan ligasi duktus koledokus, diberi pakan standar secara ad libitum, dan diberi UDCA per oral dengan dosis 20 mg dengan bantuan sonde. Pemberian UDCA dilakukan selama 21 hari berturut-turut. Pada hari ke-22 seluruh tikus dilakukan pengambilan sampel serum.

P2 : Perlakuan 2. Tikus Wistar jantan yang dilakukan ligasi duktus koledokus, diberi pakan standar secara ad libitum, dan diberi kombinasi UDCA-Glutathione. UDCA diberikan per oral dengan dosis 20 mg dengan bantuan sonde. Glutathione diberikan melalui injeksi intramuskular dengan dosis 15 mg. Glutathione diberikan bersamaan dengan pemberian UDCA. Pemberian kombinasi UDCA-Glutathione dilakukan selama 21 hari berturut-turut. Pada hari ke-22 seluruh tikus dilakukan pengambilan sampel serum.

O : *Post-Test.* Serum tikus diambil untuk dilakukan pengukuran kadar bilirubin direk dan kadar bilirubin total pada hari ke-22.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus Wistar jantan.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah tikus Wistar yang dipelihara di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

3.4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil dari populasi terjangkau secara acak dan memenuhi kriteria inklusi, eksklusi dan dropout.

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

1) Tikus Wistar jantan
2) Usia 2-3 bulan
3) Berat Badan 200-250 g
4) Sehat dan aktif

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

1) Terdapat kecacatan anatomis

3.4.3.3 Kriteria Dropout

1) Mati selama adaptasi dan perlakuan
2) Selama perlakuan mengalami infeksi luka operasi

3.4.4 Cara Sampling

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara randomisasi atau acak.

3.4.5 Besar Sampel

Penelitian besar sampel minimal yang digunakan menurut *Institutional Animal Care and Use Comitee Guidebook* dan *World Health Organization* (WHO) adalah 5 ekor tiap kelompok dengan menganut prinsip 3R (*Replacement, Reduction and Refinement)*.[51] Berdasarkan hal tersebut, jumlah sampel yang digunakan adalah 15 ekor tikus Wistar jantan, dengan 5 ekor tikus tiap kelompok perlakuan. Sedangkan untuk mengantisipasi tikus yang dropout, tiap kelompok perlakuan ditambah satu ekor tikus hingga jumlah sampel 18 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah UDCA per oral dosis 20 mg dan glutathione intramuskular dosis 15 mg selama 21 hari.

3.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar bilirubin direk dan kadar bilirubin total serum tikus Wistar.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Jenis Variabel	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala
Bebas	UDCA dosis tunggal	Asam empedu hidrofilik yang pada dosis 15 mg/kgBB digunakan untuk terapi kolestasis pada manusia (per oral). Bila dilakukan konversi dosis manusia ke dosis tikus dengan tabel konversi dosis *Pages and Barnes*, didapat dosis 20 mg untuk tikus. UDCA diberikan per oral dengan bantuan sonde 1x/hari selama 21 hari.	Nominal
	Glutathione dosis tunggal (Tationil Milan®)	Suplementasi antioksidan yang digunakan untuk mengatasi stress oksidatif pada hepatosit. Sediaan pada manusia adalah 600 mg dalam 4 ml. Bila dilakukan konversi dosis manusia ke dosis tikus dengan tabel konversi dosis *Pages and Barnes*, didapat dosis 15 mg (0,1 ml) untuk tikus.	Nominal

		Glutathione diberikan secara intramusukular bersamaan dengan pemberian UDCA. Glutathione diberikan 1x/hari selama 21 hari.	
Tergantung	Kadar bilirubin direk dan bilirubin total serum	Kadar bilirubin direk dan bilirubin total didapat dari pengukuran *AutoAnalyzer* serum tikus dengan reagen Diazo. Kadar normal bilirubin total serum tikus Wistar jantan usia 8-16 minggu adalah 0,05-0,15 mg/dl. Kadar normal bilirubin direk serum tikus Wistar jantan usia 8-16 minggu adalah 0,03-0,05 mg/dl.[52]	Rasio

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

1. Makanan dan minuman standar hewan percobaan
2. Tikus strain Wistar jantan
3. Bahan pengukuran kadar bilirubin total dan bilirubin direk serum tikus Wistar dengan spektrofotometer
4. UDCA

5. Glutathione
6. Ketamin hidroklorida
7. Silk 4,0
8. Ibuprofen
9. Sefotaksim

3.7.2 Alat

1. Kandang hewan coba
2. Timbangan duduk dan timbangan neraca
3. Sonde lambung
4. Alat bedah hewan percobaan: scalpel, pinset, gunting, jarum, meja lilin
5. Alat untuk mengambil serum darah tikus
6. Alat untuk mengukur kadar bilirubin direk dan bilirubin total serum darah tikus
7. Alat tulis

3.7.3 Jenis Data

Data yang diambil adalah data primer yaitu dari pembacaan kadar bilirubin total dan bilirubin direk berdasarkan hasil pengukuran *AutoAnalyzer* dengan reagen Diazo serum kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

Cara kerja dalam penelitian meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

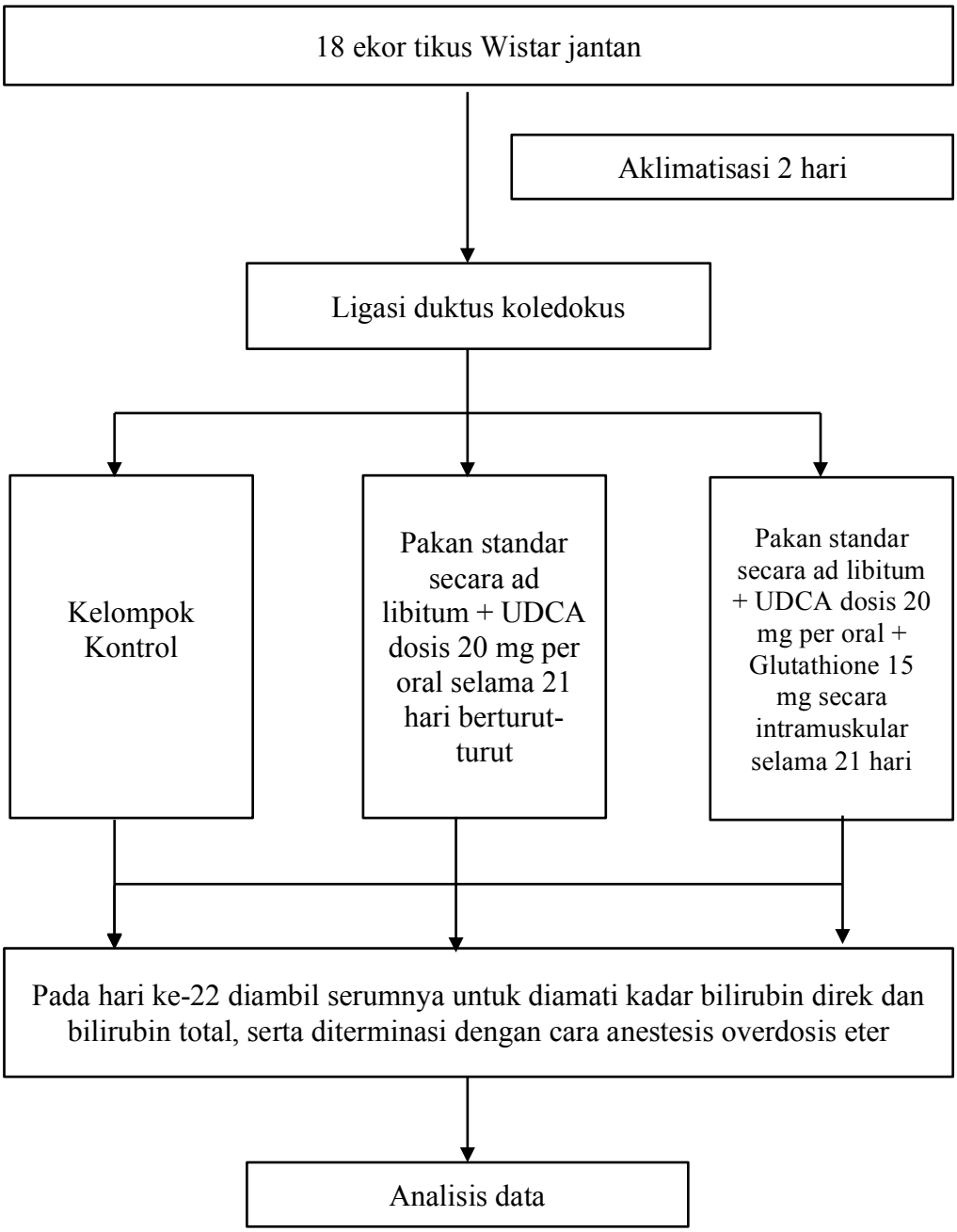
1) Sampel (18 ekor tikus Wistar jantan) diadaptasi dan diberi pakan dan minum standar secara ad libitum selama 2 hari di laboratorium.
2) Sampel (18 ekor tikus Wistar jantan) dikelompokkan dengan teknik randomisasi acak sederhana menjadi 3 kelompok (masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor tikus), yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, dan kelompok perlakuan 2.
3) Seluruh tikus pada tiap kelompok dilakukan operasi pengikatan atau ligasi pada duktus koledokus. Sebelum dilakukan operasi tikus diberi antibiotik sefotaksim dengan dosis 18 mg intravena kemudian tikus diberi anestesi ketamin hidroklorida dengan dosis 0,5 ml (25 mg) intramuskular. Selanjutnya dilakukan laparotomi, dalam kondisi aseptik dilakukan pengikatan pada duktus koledokus tikus. Ikatan dilakukan dengan benang silk 4,0. Setelah itu diberi analgesia pasca operasi Ibuprofen 7 mg per oral selama 3 hari berturut-turut untuk meringankan nyeri.
4) Pemberian UDCA dengan dosis 20 mg per oral satu hari setelah operasi. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya (dosis manusia 15 mg/ kgBB) dan dosis konversi menurut tabel

konversi *Pages* dan *Barnes* (dosis manusia 70 kg dikonversi ke dosis tikus). UDCA diberikan 1x/hari selama 21 hari.

5) Pemberian glutathione dengan dosis 15 mg (0,1 ml) diberikan secara intramuskular satu hari setelah operasi. Dosis ditentukan berdasarkan penelitian sebelumnya (dosis manusia 600 mg dalam 4 ml) dan dosis konversi menurut tabel konversi *Pages* dan *Barnes* (dosis manusia 70 kg dikonversi ke dosis tikus). Glutathione diberikan 1x/hari selama 21 hari.
6) Kelompok kontrol, tikus Wistar jantan yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus diberi pakan dan minum standar ad libitum selama 21 hari.
7) Kelompok perlakuan 1, tikus Wistar jantan yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus diberi UDCA per oral dengan dosis 20 mg dengan bantuan sonde. Pemberian UDCA dilakukan 1x/hari selama 21 hari berturut-turut.
8) Kelompok perlakuan 2, tikus Wistar jantan yang telah dilakukan ligasi duktus koledokus diberi UDCA dengan dosis 20 mg diberikan secara per oral dengan bantuan sonde serta diberi glutathione dengan dosis 15 mg diberikan secara intramuskular 1x/hari selama 21 hari berturut-turut. Glutathione diberikan bersamaan dengan pemberian UDCA.

Pada hari ke 22 setelah selesai pemberian perlakuan, semua hewan percobaan diambil darahnya dari vena retroorbital (mata). Spesimen darah kemudian dilakukan sentrifugasi untuk mendapat serum darah. Seluruh tikus diterminasi dengan anestesi overdosis ether. Serum dimasukkan ke dalam tabung sampel tanpa antikoagulan (1 cc) dan dibekukan sempurna untuk ditransportasi ke laboratorium swasta di Yogyakarta. Serum darah dijaga supaya tidak terkena paparan cahaya matahari. Serum darah tikus kemudian dilakukan pemeriksaan kadar bilirubin direk dan bilirubin total dengan metode *AutoAnalyzer* reagen Diazo.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Data yang terkumpul diolah melalui proses *editing*, *coding, entrying* dan *cleaning* data, lalu data dianalisis secara statistik dengan program SPSS (Statistical Product and Service Solution). Penentuan uji hipotesis yang digunakan melalui langkah-langkah berikut:

- Menentukan variabel yang dihubungkan: variabel yang dihubungkan pada penelitian adalah nominal (pemberian UDCA 20 mg dan Glutathione 15 mg) dengan numerik (kadar bilirubin direk dan bilirubin total serum tikus)
- Menentukan jenis hipotesis: hipotesis komparatif
- Menentukan skala variabel masalah: numerik
- Menentukan jumlah kelompok: 3 kelompok (>2 kelompok)

Dari langkah-langkah tersebut didapat uji hipotesis yang tepat adalah uji one way ANOVA untuk data yang memenuhi syarat (distribusi dan varians data harus normal) dan uji Kruskal Wallis untuk data yang tidak memenuhi syarat. Sebelum dilakukan uji hipotesis, dilakukan uji normalitas dan uji varians. Nilai $p>0,05$ pada uji normalitas menandakan distribusi ketiga kelompok data normal. Nilai $p>0,05$ pada uji varians menandakan varians data sama.

Data hasil pemeriksaan kadar bilirubin total dan bilirubin direk memiliki distribusi yang tidak normal sehingga dilakukan transformasi data. Setelah

dilakukan transformasi data, didapatkan distribusi tetap tidak normal. Varians data hasil pemeriksaan kadar bilirubin total dan bilirubin direk sama. Kesimpulan yang diambil adalah data tidak memenuhi syarat (distribusi tidak normal) sehingga dilakukan uji Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk analisis Post-Hocnya.[53]

Hasil dari uji Kruskal Wallis disajikan dalam bentuk tabel yang terdiri atas jumlah subjek, nilai median, nilai minimum, nilai maksmimum, rerata, simpang baku, dan nilai *p* tiap kelompok. Hasil dari uji Post-Hoc Mann-Whitney disajikan dalam bentuk tabel komparasi antar kelompok.

3.10 Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3				Bulan 4				Bulan 5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Studi Literatur																				
Survei Laboratorium																				
Penulisan Proposal																				
Seminar Proposal																				
Revisi Proposal																				
Penelitian																				
Analisis data dan Evaluasi																				
Penulisan Laporan																				
Seminar Laporan																				

3.11 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan *Ethical Clearance* dengan nomor 572/EC/FK-RSDK/2016 dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penelitian ini telah mendapatkan izin dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpatu Universitas Gadjah Mada (LPPT-UGM) Bidang Layanan Penelitian Pra-Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan.