

BAB IV

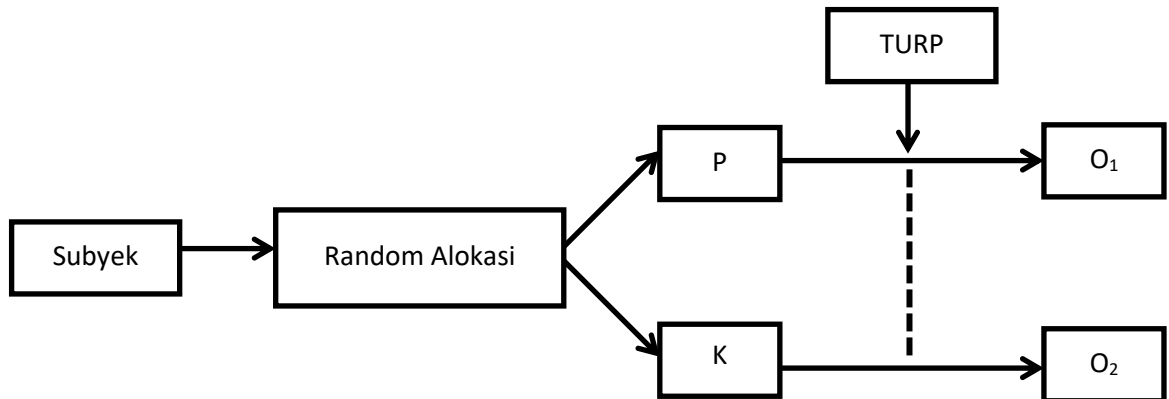
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan “*Double Blind Randomized Controlled Trial Post Test Only Design*”. Dilakukan dengan cara membandingkan perubahan angiogenesis antara kelompok subyek BPH yang menjalani operasi TURP dengan menilai jumlah *microvessel density* (MVD) dan selisih jumlah eritrosit pre dan post TURP setelah pemberian dutasteride secara tunggal dan kombinasi dutasteride dan lycopene selama minimal 30 hari pre operasi.

Subyek penelitian adalah pasien BPH yang akan dilakukan operasi TURP. Perlakuan Kelompok K adalah sebagai kontrol berupa pemberian kapsul dutasteride 0,5 mg. Perlakuan Kelompok P berupa pemberian kombinasi kapsul dutasteride 0,5 mg dan lycopene 30 mg.

Pemeriksaan jumlah eritrosit dilakukan sebelum prosedur operasi yang dilakukan bersamaan dengan pemeriksaan laboratorium darah lain yang menjadi prosedur dan syarat dilaksanakan operasi. Kemudian dihitung selisih penurunan jumlah eritrosit akibat prosedur operasi TURP. Sedangkan pengamatan jumlah MVD dilakukan melalui pengamatan secara mikroskopik dengan teknik pewarnaan imunohistokimia (IHC) terhadap kerokan prostat subyek.



Gambar 5. Bagan Skema Rancangan Penelitian

P = Perlakuan pemberian kapsul dutasteride 0,5 mg + kapsul lycopene 30 mg

K = Perlakuan pemberian dutasteride 0,5 mg + kapsul plasebo

O₁ = Pengamatan jumlah MVD dan selisih jumlah eritrosit pre dan post TURP

O₂ = sama dengan O₁

4.2 Populasi dan Subyek

4.2.1 Populasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada subyek BPH yang datang ke Poliklinik Urologi, IGD Bedah, dan Ruang Rawat Inap Urologi RSUP Dr. Kariadi Semarang yang secara klinis dan sonografi telah di diagnosis sebagai BPH dan direncanakan untuk menjalani operasi TURP. Penelitian dilakukan di Bagian Bedah Urologi RSUP Dr. Kariadi Semarang, Jawa Tengah selama periode penelitian dari bulan November 2017 sampai dengan bulan Maret 2018.

4.2.2 Subyek Penelitian

Besar subyek menurut Lameshow menggunakan besar subyek untuk proporsi dua kelompok (*Two Sample Situation*) . Adapun besar subyek tiap kelompok minimal adalah :

$$n_1 = n_2 = n_3 = \frac{Z_{1-\alpha}^2 [P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)]}{d^2}$$

$Z_{1-\alpha}$ dengan *confident interval* 95 % = 1,96

d = tingkat ketepatan absolut = 0,35

$[P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)] = V = 0,304$

Jadi hasil yang didapatkan adalah sebagai berikut :

$$N = \frac{(1,96)^2 \times 0,3}{(0,35)^2} = 10$$

Sehingga pada tabel *sample size for confidence level* 95 % didapatkan jumlah n masing-masing kelompok perlakuan adalah 10 subyek, hal ini berarti untuk 2 kelompok perlakuan, dibutuhkan $2 \times 10 = 20$ subyek. Dengan memperhitungkan kemungkinan *drop out* 10% maka total subyek yang diperlukan menjadi 22 subyek.

Subyek dalam penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok secara random alokasi, yaitu :

Kelompok Kontrol (K) diberikan terapi sehari 1 kapsul dutasteride 0,5 mg dan 1 kapsul plasebo.

Kelompok Perlakuan (P) diberikan terapi sehari 1 kapsul dutasteride 0,5 mg dan 1 kapsul lycopene 30 mg.

Kedua kelompok masing-masing meminum obat selama 30 hari, dan apabila pada hari ke 30 belum bisa dilakukan operasi, maka obat diteruskan sampai dengan dilakukan operasi, dan lama pemberian obat akan dijadikan sebagai variabel pengganggu.

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Pasien pria dengan retensi urin dan sudah di diagnosis BPH secara klinis maupun radiologis dan direncanakan untuk menjalani operasi TURP.
2. Volume prostat 30-80 gram.
3. Bersedia mengisi dan menandatangani formulir pernyataan persetujuan penelitian.
4. Bersedia mengisi *log book* mengenai asupan olahan berbahan dasar tomat lain yang dikonsumsi selama periode penelitian.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

1. Penderita secara klinis, laboratoris, dan sonografi cenderung mengarah ke arah kanker prostat atau gangguan keganasan lainnya.
2. Pernah menjalani operasi BPH sebelumnya.
3. Pasien dengan gangguan koagulasi.

4. Pasien dengan retensi urin kronis dimana pemakaian kateter lebih dari 2 kali.
5. Pasien BPH dengan komplikasi meliputi batu saluran kemih (batu buli-buli), urosepsis (febris, leukositosis, dan kultur urine ada pertumbuhan kuman), dan penyakit lain yang menyebabkan resiko operasi berat seperti hipertensi maligna, gagal ginjal, gangguan jantung, stroke dan gangguan koagulasi.
6. Pasien sedang mengkonsumsi obat-obatan anti koagulan atau menggunakan koagulan dalam 10 hari sebelum penelitian dimulai.
7. Pasien memiliki kebiasaan mengkonsumsi produk tomat lain sebelumnya.
8. Sedang mengkonsumsi obat-obatan golongan *5 α reductase inhibitor* lain.

4.2.2.3 Kriteria Drop Out

1. Pasien tidak minum obat secara teratur selama 30 hari atau menghentikan minum obat sebelum 30 hari.
2. Pasien berubah pikiran tidak mau operasi
3. Terdapat resiko tinggi menjelang operasi yang menjadikan operasi batal dilaksanakan. Contoh : anestesi menemukan adanya gagal jantung kongestif (CHF) NYHA (*New York Heart Association*) 3 saat dilakukan pre-medikasi, dll
4. Spesimen penelitian saat dilakukan pemeriksaan patologi anatomi (PA) didapatkan adenokarsinoma prostat atau spesimen rusak.

5. Pasien mengkonsumsi produk olahan tomat atau produk lain yang memiliki efek terhadap angiogenesis selama proses perlakuan.

4.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah kelompok perlakuan yang dibagi 2 kelompok yaitu pemberian dutasteride 0,5 mg + plasebo dan kombinasi dutasteride 0,5 mg + lycopene 30 mg.

2. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

- a. Jumlah *Microvessel Density* (MVD)
- b. Selisih jumlah eritrosit

3. Variabel Perancu

Ada beberapa *confounding variabel* yang mungkin akan mempengaruhi hasil penelitian, antara lain :

- a. Usia
- b. Besar prostat
- c. Lama pemberian obat
- d. Lama pemasangan kateter
- e. Lama tindakan TURP
- f. Jumlah cairan irigan

4.4 Definisi operasional

1. Variabel Bebas

Dutasteride yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan dosis yang didasarkan atas penelitian-penelitian sebelumnya yaitu 0,5 mg/hari, diberikan selama 30 hari secara tunggal maupun dikombinasi dengan lycopene selama paling sampai dengan dilakukan tindakan TURP.

Ekstrak tomat (*Solanum Lycopersium*) yang dipakai adalah Lycopene GNC, diproduksi oleh PT. Guna Nutrindo Sehat dengan izin BPOM/FDAPOM SI. 074 325 881. Isi tiap kapsul lycopene 30 mg, *soybean oil, corn oil, gelatin, glycerin, beta-Carotene*. Diberikan sehari 1 kapsul secara kombinasi dengan dutasteride, selama paling sedikit 30 hari sampai dengan dilakukan tindakan TURP.

2. Variabel Tergantung

a. Jumlah MVD

Pada penelitian ini jumlah MVD diukur dengan penanda permukaan CD34. Jumlah MVD dihitung melalui pemeriksaan mikroskopik terhadap slide dari spesimen kerokan prostat yang dilakukan pengecatan imunohistokimia (IHC) menggunakan Kit CD34 DAKO Code No.7165. Pemeriksaan dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi di Laboratorium PA FK UNDIP. Penghitungan densitas pembuluh darah mikro dilakukan dengan pembesaran 40x untuk mengidentifikasi area dengan densitas pembuluh darah paling tinggi disebut dengan area *hot spot*. Kemudian dilakukan penghitungan kelompok sel endotel

pembuluh darah dengan atau tanpa lumen pada pembesaran 100x. Hasil ukur dinyatakan dalam jumlah pembuluh darah mikro (*Microvessel/MV*) per lapangan pandang (LP).

Satuan : MV/LP. Skala : rasio

b. Jumlah eritrosit

Jumlah eritrosit yang dihitung adalah eritrosit sebelum dilakukan operasi TURP sekaligus sebagai syarat prosedur dijalankan operasi, dan eritrosit post TURP diambil maksimal 2 jam setelah selesai prosedur operasi. Dalam penelitian ini sampel darah untuk hitung eritrosit diambil dari darah v. mediana cubiti dan diukur menggunakan menggunakan alat *Auto Hematology Analyzer Sysmex* di Laboratorium Patologi Klinik FK Universitas Diponegoro Semarang.

Satuan : 10^6 / uL

Skala : rasio

3. Variabel Perancu

a. Usia

Adalah usia pasien saat dilakukan penelitian, diukur dengan keterangan di Kartu Identitas Diri (KTP) atau keterangan kelahiran. Satuan : tahun.

Skala variabel : rasio

b. Besar prostat

Setiap subyek penelitian diukur besar prostat sebelum dilakukan prosedur TURP, besar diukur dengan USG transrektal (TRUS : *Trans Rectal Ultra Sound*). Besar prostat diukur dengan rumus ellipsoid :

Besar prostat = panjang A-P x panjang cranio-caudal x panjang transversal x 0,52 ($\pi/6$) dalam mL.

Satuan : gram

Skala variabel : rasio

c. Lama pemberian obat

Lama pemberian obat (lama perlakuan) ke pasien dilakukan sekurang-kurangnya 30 hari hingga dilakukan tindakan TURP. Satuan : hari.

Skala : rasio

d. Lama penggunaan kateter urin

Lama penggunaan kateter urin diukur melalui anamnesis langsung ke pasien sejak kapan menggunakan kateter, dihitung sejak pertama dipasang kateter hingga dilakukn operasi TURP. Satuan : hari.

Skala : rasio.

e. Lama tindakan TURP

Lama tindakan TURP dihitung sejak mulai pengerokan prostat pertama kali sampai dengan selesai koagulasi. Satuan : menit.

Skala : rasio

f. Jumlah cairan irigan

Jumlah cairan irigan adalah banyaknya cairan aquadest yang digunakan untuk irigasi durante tindakan TURP. Satuan : Liter

Skala : rasio

4.5 Teknik Pengambilan Subyek

4.5.1 Teknik Random Alokasi Subyek

Pasien BPH dengan retensi urin yang datang ke Poliklinik Bedah Urologi dilakukan pemeriksaan berupa :

- Anamnesis : Identitas, umur, riwayat gangguan kencing, riwayat operasi sebelumnya, riwayat pengobatan dan konsumsi obat-obatan anti koagulan, riwayat penyakit sistemik (jantung, stroke, ginjal), riwayat pemasangan kateter dan lama pemasangan kateter, riwayat rutinitas konsumsi produk berbahan dasar tomat lainnya.
- Pemeriksaan fisik : Pemeriksaan tekanan darah dan tanda vital lainnya, suhu tubuh, status lokalis, status lokalisata, colok dubur untuk menegakkan diagnosis BPH.
- Pemeriksaan laboratorium : Hb, Ht, jumlah eritrosit, studi koagulasi, hasil pemeriksaan darah rutin, urin rutin, kimia darah (faal hati, faal ginjal), kultur urin, PSA, besar prostat dengan USG trans rektal / TRUS (*Transrectal Ultrasonography*).

Apabila pasien tersebut masuk dalam kriteria eksklusi maka subyek tersebut di eksklusi dan tidak di ikut sertakan dalam penelitian. Pasien yang masuk kriteria insklusi diberikan penjelasan mengenai maskud dilakukan penelitian dan diberikan surat pernyataan persetujuan ikut dalam penelitian. Pasien yang masuk kriteria inklusi kemudian diberi nomor kode dan di random alokasikan ke dalam 2 kelompok perlakuan. Perlakuan dilaksanakan minimal 30 hari sampai dengan dilakukan operasi TURP,

dengan kontrol evaluasi kepatuhan melalui lembar check list minum obat harian yang diberikan kepada pasien bersamaan dengan pemberian obat. *Check list* harus di isi oleh pasien dan keluarga yang menyaksikan pasien minum obat. Evaluasi melalui telepon atau kunjungan dilakukan setiap 14 hari.

4.5.2 Teknik Pemberian Perlakuan

- a. Disiapkan kapsul merah ukuran 00 untuk mengemas ulang sediaan dutasteride, lycopene, dan plasebo. Setelah dikemas ulang kapsul ditempatkan di satu plastik klip kecil dengan isi tiap plastik terdiri dari 2 kapsul dengan isi sesuai kebutuhan tiap kelompok perlakuan. Diberikan plastik klip karena dalam 1 hari setiap pasien meminum 2 buah kapsul dengan warna yang sama. Tujuan pengemasan dengan plastik kecil adalah memudahkan pasien untuk meminum obat 1 plastik klip kecil setiap hari. Diberikan kode di setiap plastiknya. Kode dibuat oleh peneliti utama.
- b. Kemudian klip-klip kecil dimasukkan dalam amplop yang berisi 20 plastik klip kecil (sesuai kelompok) berikut lembar *check list* kepatuhan minum obat di dalamnya. Amplop diberikan kode yang dibuat oleh peneliti utama.
- c. Pemberian amplop kapsul ke pasien dilakukan oleh perawat poliklinik dan dicatat sesuai kode amplop. Baik pasien maupun peneliti tidak

mengetahui jenis kapsul yang diberikan, apakah kapsul dutasteride, lycopene, atau plasebo.

Selesai perlakuan, dalam masa persiapan operasi TURP dilakukan pengambilan darah dan pemeriksaan laboratorium darah dalam masa tidak lebih dari 24 jam sebelum operasi TURP. Kemudian dilakukan operasi TURP, dicatat tanggal operasi dan lama tindakan operasi. Selesai tindakan TURP dilakukan pemeriksaan jumlah eritrosit post TURP di ruangan, maksimal 2 jam setelah selesai operasi.

Pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan jumlah eritrosit diambil dari vena mediana cubiti sebanyak 3 cc, lalu darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA, kemudian dilakukan hitung jumlah eritrosit menggunakan alat analisis sel darah automatic yaitu *Auto Hematology Analyzer Sysmex*. Hitung jumlah eritrosit dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FK UNDIP Semarang.

Jaringan kerokan prostat diambil sebanyak 5-10 kerokan prostat periurethra, ditempatkan di dalam wadah spesimen plastik berisi formalin, kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP Semarang. Dilakukan pemeriksaan jumlah MVD dari spesimen kerokan prostat dengan teknik imunohistokimia (IHC) dan dilakukan pembacaan dengan *light microscope* Olympus BX-41 oleh ahli patologi anatomi.

4.5.3 Teknik Pengumpulan Data MVD dan Eritrosit

Pemeriksaan jumlah eritrosit dilakukan menggunakan alat *Auto Hematology Analyzer Sysmex*.

Alat dan bahan :

- *Disposable spuit* 3 atau 5 cc
- Tabung reaksi
- Sysmex KX-21/semua tipe
- *Whole blood*

Reagentia :

- EDTA
- Reagen Sysmex, semua tipe

Cara kerja :

- Menyiapkan darah EDTA 3 cc yang didapat dari sampling. Sampling didapat dari mengambil darah di v. mediana cubiti sebanyak 3 cc yang dimaksudkan untuk pemeriksaan darah pre operasi sekaligus. Sampling dilakukan dalam masa 1x24 jam sebelum prosedur operasi dan 2 jam setelah prosedur operasi.
- Mengkalibrasi alat Sysmex KX-21 atau tipe lainnya
- Reagen diletakkan pada tempatnya, kemudian alat di program untuk menghitung jumlah eritrosit
- Subyek dikocok sampai homogen. Pemeriksaan dilakukan maksimal 4 jam setelah pengambilan darah

- Subyek dihisap satu per satu oleh *probe* (alat penghisap) dan dibaca pada gelombang 555 nm
- Hasil akan terlihat pada kertas *print out*

Pemeriksaan jumlah MVD menggunakan teknik pengecatan imunohistokimia (IHC). Bahan dan teknik pemeriksaannya adalah sebagai berikut :

Bahan : Jaringan yang telah diblok parafine

Alat :

1. Almari pendingin
2. Microwave
3. Mous Chamber
4. Staining jaringan
5. Mikro pipet 100 ul
6. Bekerglass volume 1000 ml
7. Vortex
8. Yellow tipe
9. Timer

Reagentia :

1. Antibodi Prymer CD34. Merk DAKO Code No M.7165
2. LSAB 2 system
3. PBS PH 7,2

4. Hematoxylline
5. Antigen retrieval (Buffer Citrat pH 6,0)
6. Lithium Carbonat 5%
7. Xylol
8. Alkohol
9. Aquadest
10. Canada Balsam
11. Normal Serum

Persiapan:

- Setelah blok parafine dipotong dengan mikrotome, hasil potongan ditempelkan pada kaca obyektif
- Nomor sesuai dengan nomor blok parafine

Selanjutnya dikerjakan sebagai berikut :

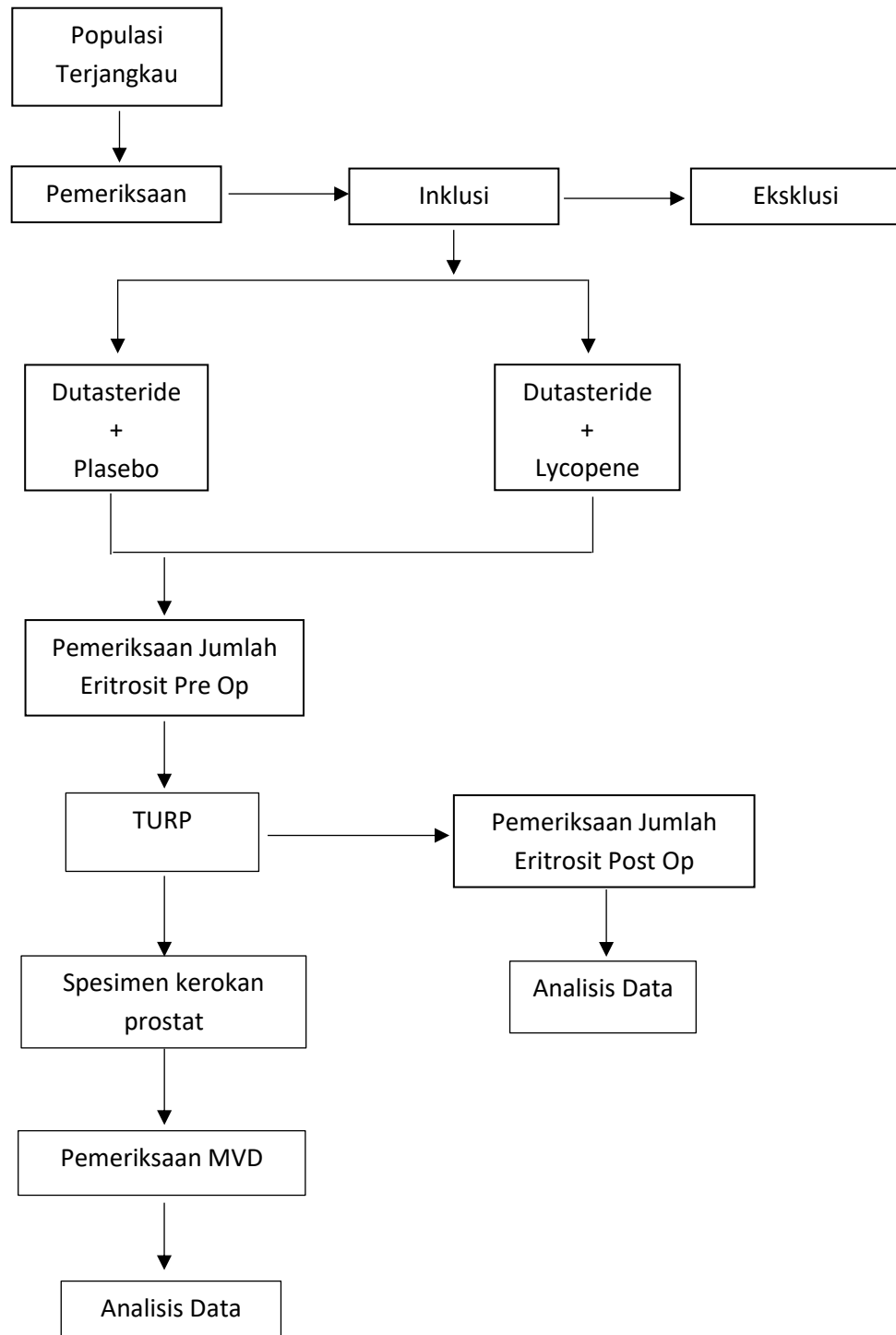
1. Deparafinase sampai dengan aquadest
2. Rendam dalam antigen retrieval (dalam *microwave*) selama 6 menit
3. Dinginkan
4. Bilas dengan aquadest
5. Tetesi H₂O₂
6. Bilas dengan aquadest
7. Bilas PBS
8. Tetesi normal serum selama 5 menit

9. Buang sisa – sisa normal serum
10. tetesi antibodi prymar, inkubasi selama 60 menit / overnight
11. Bilas dengan PBS
12. Tetesi antibodi sekunder pertama selama 20 menit
13. Bilas dengan PBS
14. Tetesi dengan antibodi sekunder kedua selama 20 menit
15. Bilas dengan PBS
16. Tetesi DAB selama 20 menit
17. Bilas dengan air keran
18. Rendam dengan hematoxyline selama 2 menit
19. bilas dengan air keran
20. Masukkan dengan alkohol 70 % sebanyak 2 celup
21. Masukkan dengan alkohol 80 % sebanyak 2 celup
22. Masukkan dengan alkohol 96 % sebanyak 2 celup
23. Masukkan dengan alkohol Absolut sebanyak 2 celup
24. Masukkan dengan alkohol xylol I sebanyak 2 celup
25. Masukkan dengan alkohol xylol II sebanyak 2 celup
26. Masukkan dengan alkohol xylol III sebanyak 15 menit, Keringkan, tetesi
canada balsam, tutup dengan glass
27. Diholudri, siap dibaca

Metode penghitungan *microvessel density* adalah sebagai berikut :

Pertama-tama dengan pembesaran 40x untuk mencari area dengan densitas terbesar sel-sel endotelial dilingkari pada tiap-tiap *slide*. Area yang sama pada tiap-tiap *slide* lainnya juga dilingkari untuk memastikan bahwa pembuluh darah pada area yang sama telah dihitung. Kemudian penghitungan dilakukan sebanyak 10 kali lapangan pandang yang berbeda pada kekuatan *high power fields* menggunakan mikroskop *Olympus BX41* pada pembesaran 100x. Jumlah MVD merupakan penjumlahan dari 10 lapangan pandang. Pemeriksaan ini dilakukan oleh dua orang ahli Patologi Anatomi independen yang kemudian hasilnya dilakukan uji Kappa untuk menentukan tingkat akurasi pembacaan kedua pemeriksa.

4.6 Skema Alur Penelitian



Gambar 6. Bagan Skema Alur Penelitian

4.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data dari hasil penelitian yang telah dicatat, dikumpulkan, dan diolah dengan program SPSS. Data disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Sebelum dilakukan analisis dilakukan uji normalitas dengan uji *Saphiro Wilk*. Uji normalitas dan uji homogenitas dilakukan untuk kelompok umur, besar prostat, lama pemberian obat, lama pemasangan kateter, lama tindakan TURP, jumlah cairan irigan. Jumlah MVD dan selisih eritrosit juga dilakukan uji normalitas dan homogenitas.

Analisis uji beda antar kelompok dianalisis dengan uji *T-test*. Perbedaan dinyatakan bermakna bila didapatkan nilai $p < 0,05$. Uji parametrik maupun non parametrik tergantung pada normalitas distribusi data dan homogenitas data. Kemudian dilakukan uji Korelasi *Spearman* untuk mengetahui pengaruh antar variabel dalam penelitian ini.

4.8 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 5 bulan dari bulan November 2017 sampai dengan bulan Maret 2018. Perlakuan pada subyek dilakukan di Instalasi Bedah Sentral RSUP Dr. Kariadi Semarang. Proses pembuatan blok parafin dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Kariadi Semarang, kemudian blok parafin dibawa ke Laboratorium Waspada untuk dilakukan pewarnaan imunohistokimia dan dilakukan penghitungan jumlah MVD. Sedangkan proses pemeriksaan jumlah erosit dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Kariadi Semarang.

4.9 Aspek Etik Penelitian

1. Ethical Clearance

Penelitian ini akan dilaksanakan setelah mendapat surat kelayakan etik penelitian dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FK UNDIP / RSUP Dr. Kariadi Semarang

2. Informed Consent

Setiap responden yang ikut dalam penelitian ini diberi penjelasan secara terperinci dan lembar persetujuan agar responden dapat mengetahui maksud dan tujuan peneliti serta dampak yang diteliti selama proses penelitian ini berlangsung. Apabila responden bersedia untuk menjadi responden peneliti harus mendapatkan tanda tangan dari responden pada lembar persetujuan sebagai bukti persetujuan. Jika responden menolak untuk menjadi responden maka peneliti tidak memaksa dan tetap menghormati haknya.

3. *Confidentiality*

Kerahasiaan informasi yang diberikan oleh responden dijamin oleh peneliti.

4. *Benefit*

Dalam penelitian ini, peneliti berusaha memaksimalkan manfaat penelitian dan meminimalkan kerugian yang timbul akibat penelitian ini.

5. *Justice*

Semua responden yang ikut dalam penelitian ini diperlakukan secara adil dan diberikan haknya yang sama.