

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Ruang Lingkup Penelitian

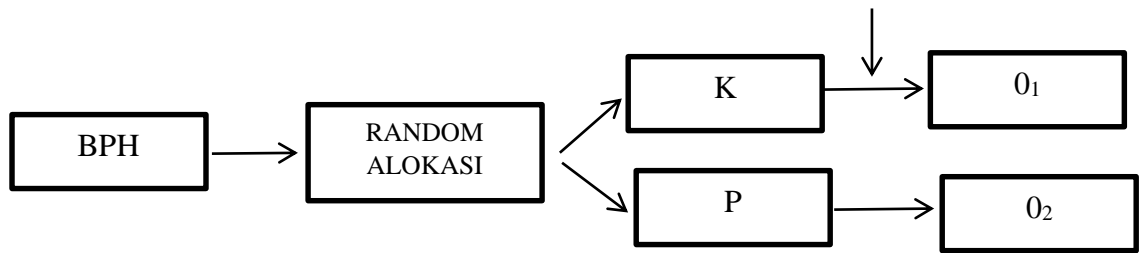
Ruang lingkup penelitian ini adalah ilmu bedah khususnya ilmu bedah urologi RSUP Dr. Kariadi Semarang pada November 2017 sampai Maret 2018.

4.2. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan rancangan “*Double Blind Randomized Controlled Trial Post Test Only Design*”. Dilakukan dengan cara membandingkan perubahan angiogenesis antara kelompok penderita BPH yang menjalani operasi TURP dengan menilai ekspresi HIF 1 α (Hypoxia Induced Factor 1 alpha) dan kadar Δ Ht (*Hematocrite*) setelah pemberian dutasteride 0,5 mg tunggal pada kelompok kontrol dan kombinasi dutasteride 0,5 mg + *lycopene* 30 mg pada kelompok perlakuan minimal selama 30 hari sampai dengan di laksanakan operasi TURP.

Subyek penelitian adalah pasien BPH yang akan dilakukan operasi TURP. Pada subyek penelitian dilakukan pemeriksaan Ht sebelum prosedur operasi yang dilakukan bersamaan dengan pemeriksaan laboratorium darah lain yang menjadi prosedur dan syarat dilaksanakan operasi. Kemudian dihitung selisih penurunan Ht akibat prosedur operasi TURP, dimana kadar Ht post TURP dihitung maksimal 2 jam pasca TURP. Pengamatan ekspresi HIF 1 α dilakukan melalui pengamatan secara imunohistokimia terhadap kerokan prostat subyek.

TURP



Gambar 12. Bagan Skema Desain penelitian

K = dutasteride 0,5 mg + plasebo

P = dutasteride 0,5 mg + 1 *lycopene* (30mg)

01 = HIF – 1 α ; Hematokrit (Ht)

02 sama dengan 01

4.3. Populasi dan Sampel

4.3.1. Populasi

Populasi target adalah penderita BPH yang akan menjalani operasi TURP. Populasi terjangkau adalah penderita yang secara klinis dan sonografi telah didiagnosis sebagai BPH yang datang ke poliklinik urologi, UGD bedah, dan ruang rawat inap urologi RSUP Dr. Kariadi Semarang.

4.3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah penderita BPH datang ke poliklinik urologi, UGD 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.

Besar sampel menurut WHO menggunakan besar sampel untuk proporsi dua kelompok (*two sample situation*).⁽⁹⁶⁾ Adapun besar sampel tiap kelompok minimal adalah :

$$n^1 = n^2 = \frac{Z_{1-\alpha}^2 [P1(1-P1)+P2(1-P2)]}{d^2}$$

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

d = Tingkat ketepatan absolut = 0,25

$[P1(1-P1)+P2(1-P2)] = V = 0,304$

Sehingga pada tabel *sample size for confidence level 95 %* didapatkan jumlah n masing – masing kelompok perlakuan adalah 20 sampel, hal ini berarti untuk 2 kelompok perlakuan, dibutuhkan $2 \times 20 = 40$ sampel.

Sampel dalam penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok secara random alokasi:

Kelompok 1 (K) Pemberian terapi dutasteride 0,5 mg (sekali per hari) minimal selama 30 hari sebelum menjalani operasi TURP (kelompok kontrol).

Kelompok 2 (P) Pemberian terapi kombinasi dutasteride 0,5 mg dan *lycopene* 1 kapsul 30 mg (sekali per hari) minimal selama 30 hari sebelum menjalani operasi TURP (kelompok perlakuan).

4.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Pasien pria dengan retensi urine dan sudah di diagnosis BPH secara klinis maupun sonografi dan direncanakan untuk menjalani operasi TURP.
2. Bersedia mengisi dan menandatangani formulir pernyataan persetujuan penelitian.

3. Bersedia mengisi *log book* mengenai konsumsi produk tomat lain (jus, saos) yang dikonsumsi selama periode penelitian.
4. Sebelumnya pasien tidak pernah mengonsumsi obat prostat

4.3.2.2. Kriteria Eksklusi

1. Pasien secara klinis, laboratoris dan sonografi cenderung mengarah ke arah kanker prostat atau gangguan keganasan lainnya.
2. Pernah menjalani operasi BPH sebelumnya seperti tamsulosin, finasterid dan lainnya.
3. Pasien dengan BPH residif
4. Pasien BPH dengan komplikasi meliputi batu saluran kemih (batu buli-buli), urosepsis (febris, leukositosis, dan kultur urine ada pertumbuhan kuman), gagal ginjal, gangguan jantung, gangguan koagulasi dan penyakit lain (seperti hipertensi dan diabetes mellitus yang tidak terkontrol) yang menyebabkan resiko operasi berat
5. Pasien dengan retensi urin kronis dimana pemakaian kateter lebih dari 2 kali
6. Pasien sedang mengonsumsi obat-obatan anti koagulan atau menggunakan koagulan dalam 10 hari sebelum penelitian
7. Pasien dengan gangguan pembekuan darah (koagulasi)
8. Pada pemeriksaan patologi anatomi (PA) didapatkan adenokarsinoma prostat
9. Pasien mengonsumsi bahan minuman lain yang memiliki efek terhadap angiogenesis seperti meniran, daun mahkota dewa dan lainnya selama proses perlakuan

10. Pasien mengkonsumsi obat-obat prostat golongan lain seperti tamsulosin, finasterid dan lainnya.

4.3.2.3. Kriteria *drop out*

1. Pasien yang tidak minum obat secara teratur selama 4 minggu atau menghentikan minum obat selama 30 hari
2. Pasien berubah pikiran tidak mau operasi
3. Pada pemeriksaan patologi anatomi (PA) sampel rusak sehingga tidak layak dibaca
4. Terdapat risiko tinggi menjelang operasi yang menjadikan operasi menjadi batal dilaksanakan. Contoh : anestesi menemukan adanya gagal jantung kongestif (CHF) NYHA (*New York Heart Assosiation*) III saat dilakukan pre-medikasi, dll

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel bebas

Sebagai variabel bebas adalah pemberian dutasteride 0,5 mg, kombinasi dutasteride 0,5 mg + *lycopene* 30mg 1 kapsul.

4.4.2. Variabel tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

- a. Kadar HIF 1 α
- b. Kadar Ht

4.4.3. Variabel perancu

- a. Usia

- b. Besar prostat
- c. Lama pemberian obat
- d. Lama pemasangan kateter
- e. Lama tindakan TURP
- f. Jumlah cairan irigan
- g. Waktu pengambilan darah untuk ukur Ht post TURP
- h. Balance cairan
- i. Operator

4.5. Definisi Operasional

4.5.1. Variabel Bebas

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

Lycopene yang dipakai adalah berupa kapsul produk dari GNC NB *Lycopene*. Isi tiap kapsul *lycopene* 30 mg, bahan tambahan : soybean oil, gelatin, glycerin, beta-carotene. Diberikan minimal selama 30 hari dikombinasi dengan dutasteride 0,5 mg sampai dengan dilakukan tindakan TURP.

4.5.2. Variabel Tergantung

- a. Ekspresi HIF 1 - alpha

Pengukuran dilakukan dengan pemeriksaan Histopatologi. Jaringan prostat yang diambil dengan teknik blok parafin. Pemeriksaannya dengan menggunakan teknik imunohistokimia (IHC). Skala : Rasio

b. Kadar Hematokrit (Ht)

Pengukuran kadar hematokrit dilakukan *pre* dan *pasca* operasi TURP. Dilakukan pengambilan sampel darah dari vena mediana cubiti. Sebanyak 3 cc darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA dengan menggunakan Hb analyzer sebelum maupun sesudah dilakukan operasi TURP. Skala : Rasio

4.5.3. Variabel Perancu

- a. Usia : adalah usia pasien saat dilakukan penelitian, di ukur dengan keterangan di kartu identitas diri (KTP) atau keterangan kelahiran. Satuan : tahun, skala variabel : rasio.
- b. Besar prostat : setiap subyek penelitian di ukur besar prostat sebelum dilakukan prosedur TURP, besar di ukur dengan USG transrektal (TRUS : Trans Rectal Ultra Sound). Besar prostat diukur dengan rumus ellipsoid yaitu : 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 TURP. Satuan : hari, skala : rasio
- d. Lama penggunaan kateter : lama penggunaan kateter urin diukur melalui anamnesis langsung ke pasien sejak kapan menggunakan kateter, dihitung sejak pertama dipasang kateter hingga dilakukan 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
- g. Waktu pengambilan darah untuk ukur Ht Post TURP : adalah jarak antara waktu pengambilan darah pasca operasi guna pengukuran data Ht Post Operasi TURP, yaitu maksimal 2 jam setelah dinyatakan selesai prosedur operasi. Satuan : menit, skala : rasio.
- h. Balance cairan : balance cairan yang positif membuat tubuh akan mengalami kondisi hemodilusi, oleh karena itu pada saat TURP akan mempengaruhi kadar hematokrit.
- i. Operator : keterampilan operator secara tidak langsung berpengaruh terhadap jumlah perdarahan yang terjadi pada durante operasi

4.6. Cara Pengambilan Sampel

4.6.1. Teknik Random Alokasi Subyek

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

- a. 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 jus tomat atau produk olahan tomat yang lainnya.
- b. Pemeriksaan Fisik : Pemeriksaan tensi dan tanda vital, suhu tubuh, status lokalis, status generalisata, colok dubur untuk menegakkan diagnosis BPH.

- c. Pemeriksaan lab: Hb, Ht, eritrosit, studi koagulasi, hasil pemeriksaan darah rutin, urin rutin, kimia darah (faal hati, faal ginjal), kutur urine, PSA, besar prostat dengan trans rektal dengan USG / TRUS (*Trans Rectal Ultra Sound*).

Apabila pasien tersebut masuk dalam kriteria eksklusi maka subyek tersebut di eksklusi dan tidak di ikut sertakan dalam penelitian. Pasien yang masuk kriteria inklusi diberikan penjelasan akan maksud dilakukan penelitian dan diberikan surat pernyataan persetujuan ikut dalam penelitian. Pasien yang masuk kriteria inklusi kemudian diberi nomer kode dan di random alokasikan ke dalam 2 kelompok perlakuan. Perlakuan dilaksanakan selama minimal 30 hari sampai dengan di laksanakan 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 7 hari.

4.6.2 Teknik Pemberian Perlakuan

1. Disiapkan kapsul merah ukuran 00 untuk mengemas ulang sediaan *lycopene*, dutasteride dan plasebo. Setelah dikemas ulang kapsul ditempatkan di satu plastik klip kecil dengan isi tiap plastik terdiri atas 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 disetiap plastiknya. Kode dibuat oleh peneliti utama.

2. Kemudian klip-klip kecil dimasukkan dalam amplop yang berisi 20 plastik klip kecil (sesuai kelompok) berikut lembar check list kepatuhan minum obat didalamnya. Amplop diberikan kode yang dibuat oleh peneliti utama.
3. Pemberian amplop kapsul ke pasien dilakukan oleh residen bedah 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 Ht post TURP di ruangan, maksimal 2 jam setelah selesai operasi.

Jaringan kerokan prostat diambil sebanyak 5-10 kerokan prostat periurethra, ditempatkan didalam wadah spesimen plastik berisi formalin, kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi FK Universitas Diponegoro Semarang. Dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dari spesimen kerokan prostat untuk menilai ekspresi dari HIF 1 α pasca perlakuan. Pembacaan HIF 1 α dilakukan dengan light microscope Olympus BX-41 oleh ahli patologi anatomi.

4.6.3 Teknik Pengumpulan Data HIF 1 α

Spesimen TURP diambil sebanyak 5-10 kerokan prostat periurethra dan dikirim ke laboratorium PA kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi HIF – 1 α (*Hypoxia induced factor* – 1 alpha) dengan teknik blok parafin. Pemeriksaannya dengan menggunakan teknik 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
2. LSAB + 2 system
3. PBS PH 7,4
4. Hematoxylline
5. Antigen retrieval

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 pemeriksaan ekspresi HIF 1- α dinilai imunoreaktif dengan melakukan evaluasi pada pewarnaan nukleus, bagian nukleus yang terwarnai dapat dijumlahkan dan dihitung persentasenya .

4.6.4 Teknik Pengumpulan Data Ht

Untuk pemeriksaan hematokrit (Ht) dan pemeriksaan penunjang untuk persiapan operasi, dilakukan pengambilan sampel darah dari vena mediana cubiti. Sebanyak 3 cc darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA dengan menggunakan Hb analyzer sebelum maupun sesudah dilakukan operasi TURP. Pemeriksaan kadar Ht dilakukan dengan metode SLS (*Sodium Lauryl Sulfate*) bebas sianida.

1. Alat dan bahan :

- disposal spuit 3 atau 5cc
- tabung reaksi
- Sysmex KX-21 / semua tipe
- whole blood

2. Reagensia :

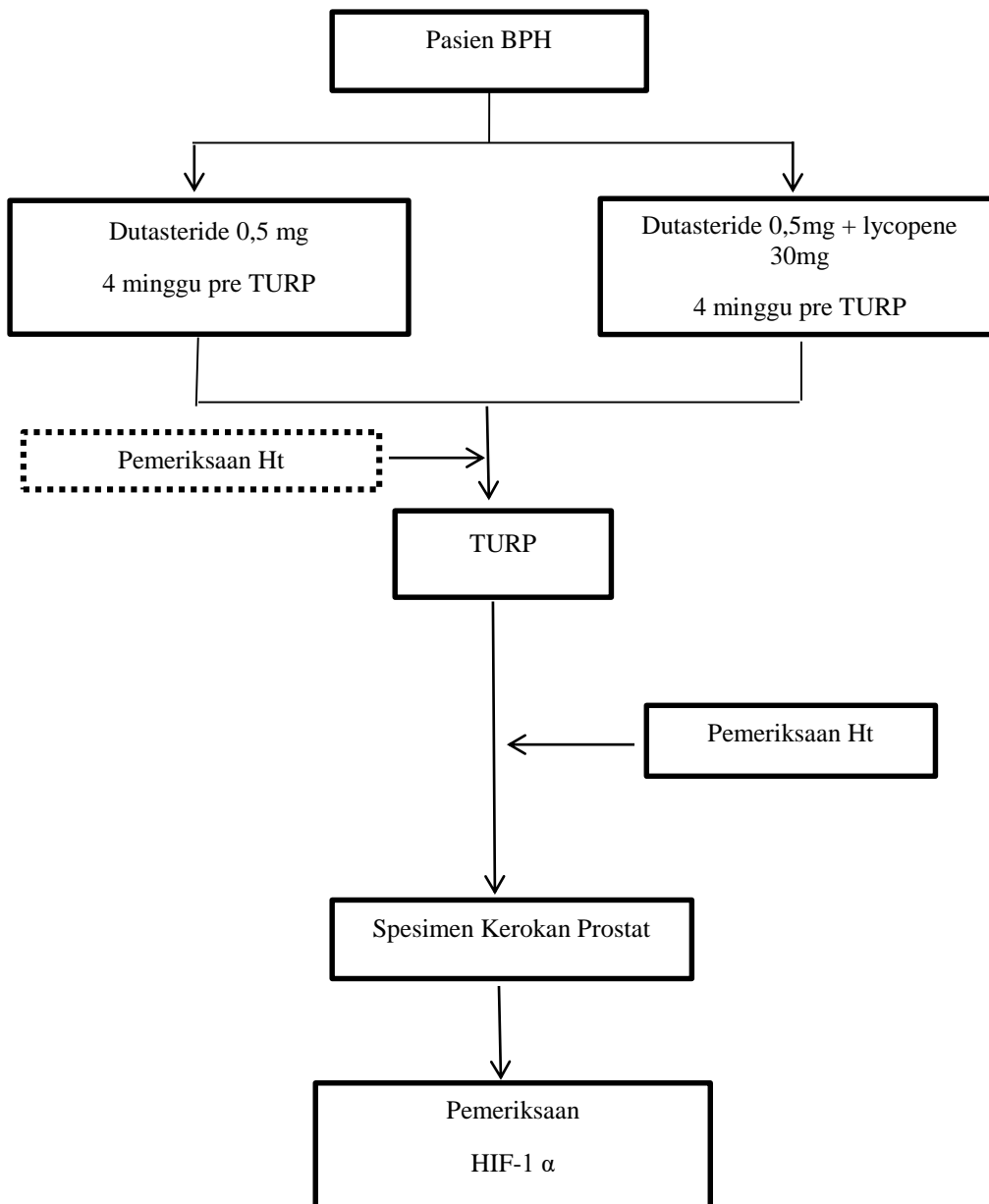
- EDTA
- Reagen Sysmex, semua tipe

3. Cara kerja :

- Menyiapkan darah EDTA 3 cc yang didapat dari sampling. Sampling mengambil darah di vena mediana cubiti sebanyak 3cc karena dimaksudkan untuk sekaligus pemeriksaan darah pre operasi. Sampling dilakukan dalam masa 1 x 24 jam, sebelum prosedur operasi dan 2 jam setelah prosedur operasi
- Mengkalibrasi alat SYSMEX KY21 atau tipe lainnya

- Reagen diletakkan pada tempatnya, kemudian alat di program untuk memeriksa kadar Ht
- Subyek di kocok sampai homogen. Pemeriksaan dilakukan maksimal 4 jam setelah pengabilan darah.
- Subyek dihisap satu per satu oleh probe (alat penghisap) dan dibaca pada gelombang 555 nm
- Hasil akan terlihat pada kertas print out

Skema Alur Penelitian :



Gambar 13. Bagan Skema Alur Penelitian

4.7 Uji Statistik

Data dari hasil penelitian yang telah dicatat, dikumpulkan dan diolah dengan program SPSS v.15. Data disajikan dalam bentuk table dan grafik. Sebelum dilakukan analisis dilakukan uji normalitas dengan Uji Shapiro-Wilk. Analisis uji beda antar kelompok perlakuan dianalisis dengan uji Independent T Test, pada kelompok yang berdistribusi normal. Sedangkan pada data yang tidak normal dilakukan dengan uji Mann-Whitney. Perbedaan dinyatakan bermakna bila didapatkan nilai $p < 0,05$. Uji parametrik maupun non parametrik tergantung pada normalitas distribusi data dan homogenitas data.

4.8 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dan pengumpulan data dilakukan selama 5 bulan (November 2017 sampai Maret 2018). Perlakuan pada sampel dilakukan di Instalasi Bedah Sentral RSUP Dr. Kariadi. Proses pemeriksaan kadar HIF $1 - \alpha$ dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Waspada dan pemeriksaan hematokrit dilakukan di RSUP Dr. Kariadi.

4.9 Aspek Etik Penelitian

1. Ethical Clearance

Penelitian ini 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 meminimalkan kerugian yang timbul akibat penelitian ini

5. Justice

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