

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan penelitian *Double Blind Randomized Control Trial* dengan pendekatan *pre test* dan *post test* pada kelompok perlakuan dan kontrol, yang menggunakan manusia sebagai subjek penelitian, dengan tujuan mencari perbedaan pengaruh pemberian ekstrak ikan gabus dan teripang dibandingkan kontrol terhadap kadar PDGF pada luka pasca operasi

Kelompok penelitian dibagi menjadi dua, yaitu kelompok kontrol (K1), kontrol perlakuan (K2), penjelasannya sebagai berikut :

1. K1 : Kelompok kontrol, pasien pasca operasi diberikan terapi standar.
2. K2 : Kelompok perlakuan, pasien pasca operasi diberikan terapi standar dan penambahan ekstrak ikan gabus dan teripang.

B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan selama bulan April – Juni 2019 hingga jumlah sampel terpenuhi pada pasien pasca operasi yang dilakukan di instalasi bedah sentral (IBS) rumah sakit dr. Moewardi (RSDM) Surakarta dan dirawat di RSDM di Surakarta. Pemeriksaan sampel darah dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik RSDM di Surakarta.

C. SUBJEK PENELITIAN

1. Populasi Penelitian

Populasi target penelitian ini adalah semua pasien pasca operasi yang dilakukan di IBS RSDM Surakarta dan dirawat di RSDM di Surakarta.

2. Besar Sampel Penelitian

Tidak terdapat data dari penelitian sebelumnya mengenai pengaruh pemberian ekstrak ikan gabus dan teripang terhadap kadar PDGF pada pasien pasca operasi, maka besar sampel pada jenis penelitian eksperimental mempunyai sampel minimum 15 sampel (Kasjono dan Yasril, 2013). Koreksi besar sampel untuk antisipasi *drop-out* sebesar :

$$n' = \frac{n}{(1-f)}$$

Keterangan :

n' : Besar sampel koreksi

n : Besar sampel minimal

f : Perkiraan proporsi *dropout* (kira-kira 10%)

$$n' = \frac{15}{(1 - 0.1)} = 16.66 \text{ dibulatkan menjadi } 17$$

Untuk penelitian ini dipakai besar sampel minimal 17 subjek (Kasjono dan Yasril, 2013).

3. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria Inklusi

- Pasien laki-laki dan perempuan pasca operasi (laparatomi, kolesistektomi, kistektomi, miomektomi) dengan usia 18 - 65 tahun.
- Bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani lembar persetujuan.

b. Kriteria Eksklusi

- Pasien yang alergi terhadap ekstrak ikan gabus dan teripang yang didapat dari anamnesis atau rekam medik.
- Pasien dengan gangguan fungsi hati, penyakit keganasan hematologi, luka bakar, diabetes melitus, gagal ginjal kronik, arterosklerosis, neoplasia, desmoplasia, *unstable angina pectoris*, trombositopenia pada demam berdarah dan obat yang mensupresi sumsum tulang didapat dari anamnesis atau rekam medik.

c. Kriteria *dropout*

- Pasien yang mengalami perburukan kondisi atau meninggal sebelum hari keempat.
- Pasien mengeluhkan efek samping/ reaksi alergi terkait pemberian ekstrak ikan gabus dan teripang. Jika terjadi efek samping segera hentikan penggunaannya dan diberikan terapi untuk alerginya. Terapi yang diberikan untuk alergi berdasarkan derajat keparahannya, pada kasus alergi yang ringan dapat diberikan

terapi steroid dan antihistamin, pada kasus yang berat seperti syok anafilaktik terapi yang utama adalah injeksi adrenalin, resusitasi cairan disertai dengan pemberian steroid dan antihistamin

D. IDENTIFIKASI OPERASIONAL VARIABEL

1. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas

- Ekstrak ikan gabus dan teripang.

b. Variabel Tergantung

- PDGF.

2. Definisi operasional variabel

- Ekstrak ikan gabus dan teripang dalam bentuk sediaan bubuk dengan komposisi tiap 10 gram mengandung *Ophiocephalus Striatus Ekstractum* 5.0 gram, *Sea Cucumber Ekstractum* 2.5 gram, *Citrus Senensis Frukthus Ekstractum* 2.0 gram, *Curcuma Domesticae Rhizoma* 0.5 gram, diberikan dengan dosis 1 *sachet* ditambahkan 50 ml air minum dingin, kemudian diaduk hingga homogen dan diberikan setiap 12 jam peroral sesudah makan pada jam 08.00 dan jam 20.00, kepada kelompok perlakuan dengan pengawasan langsung oleh perawat bangsal yang bertugas setiap hari dimulai hari pertama pasca operasi sampai hari keempat.
- Platelet derived growth factor* adalah faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh sel megakariosit, sel endotel, makrofag, fibroblas,

sel otot polos pembuluh darah, osteoblas, glia dan neuron. Berperan dalam tiap fase penyembuhan luka. Diukur dengan sampel serum dengan alat *Rayto RT-2100C (microplate reader)*. Metode pemeriksaan *sandwich* ELISA. Nilai densitas optikal dibaca dengan prinsip spektrofotometri pada panjang gelombang $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, nilai densitas optikal sebanding dengan kadar PDGF. Bahan *reagen kit* yang digunakan adalah *Human PDGF ELISA kit (E-EL-H2211) (96 test) Elabscience*. Nilai rujukan normal adalah $273 \pm 25 \text{ pg/mL}$ (Tahara *et al.*, 1991). Skala data adalah rasio. Sampel diperiksa pada hari pertama pasca operasi (sebelum pemberian EGT pada K2) dan hari keempat pasca operasi (sesudah pemberian EGT pada K2).

E. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan
 - a. Sampel berupa serum
 - b. Kit reagen *Human PDGF ELISA (Elabscience)*
 - c. Label identitas pasien
2. Alat
 - a. Tabung *vacum* tanpa anti koagulan
 - b. *Spuut* (jarum suntik) ukuran 3 cc
 - c. *Tourniquet*
 - d. *Tip disposable*
 - e. Pipet 100 μL , *Aliquot*
 - f. Alat sentrifus

- g. *Sample container*
- h. Kulkas dengan suhu -80°C
- i. Sarung tangan *disposable*, *handsrub*, *alcohol swab*, kassa dan kapas steril serta plester
- j. Rayto RT – 2100C (*microplate reader*)

F. PROSEDUR KERJA LABORATORIUM

1. *Phlebotomy* (Warekois *et al.*, 2016)

a. Persiapan

Yang harus disiapkan adalah tabung *vacum* tanpa antikoagulan untuk pemeriksaan kadar PDGF, *sprit* 3 cc, sarung tangan, *handsrub*, *alcohol swab*, *tourniquet*, kasa/kapas steril dan plester.

b. Langkah-langkah

- Pastikan identitas pasien sesuai dengan minimal dua identitas, yaitu nama, nomor rekam medis atau tanggal lahir.
- Tempelkan label identitas pasien pada tabung. Cuci tangan (sesuai dengan lima langkah cuci tangan) dan gunakan sarung tangan non steril.
- Cari vena superfisial, cukup besar, lurus dan tidak ada tanda peradangan pada lengan pasien.
- Luruskan lengan dan ekstensikan dengan bantuan tangan operator atau diganjal dengan telapak tangan menghadap ke atas.

- Kepalkan tangan pasien, dengan posisi ibu jari digenggam oleh keempat jari.
- Desinfeksi daerah penusukan dengan *alcohol swab* secara melingkar dari arah dalam ke arah luar.
- Keringkan selama 10 – 20 detik.
- Pada tiga jari proksimal daerah penusukan dilakukan pembendungan menggunakan *tourniquet* dengan waktu pembendungan yang kurang dari 1 menit.
- Ambil *sput* steril buka tutupnya, kencangkan bagian jarum dengan *syringe* nya.
- Buka tutup jarum *sput*.
- Lakukan penusukan vena dengan sudut $15^{\circ} - 30^{\circ}$, bila jarum tepat masuk ke dalam vena maka akan terlihat darah masuk ke dalam jarum indikator, kemudian tarik *plunger* agar darah masuk ke dalam *syringe* sambil lepaskan *tourniquet* dan kepalan tangan.
- Setelah *syringe* terisi sebanyak 3 cc, ambil kapas steril kemudian diletakkan ditempat penusukan sambil cabut *sput* dan jarumnya.
- Masukkan perlahan jarum ke dalam tutup jarum. Tekan bekas luka selama 1 – 2 menit dengan kapas steril kemudian tutup menggunakan plester.

- Pisahkan jarum dari *syringe* nya kemudian buka tutup tabung *vacum* masukkan darah kedalam tabung dengan mengalirkan darah pada dinding tabung.
- Homogenisasi sampel darah beberapa menit sesuai dengan ketentuan (5 – 7 kali homogenisasi).

2. Pemeriksaan PDGF

Pemeriksaan PDGF menggunakan 3 cc darah yang diambil saat *phlebotomy* yang ditampung pada tabung *vacum* tanpa antikoagulan melalui prosedur:

- a. Tabung berisi darah tanpa antikoagulan didiamkan 15 – 30 menit.
- b. Setelah itu tabung di sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 *round per minute*. Setelah terpisah sel darah dengan serum.
- c. Dilakukan pemindahan serum kedalam *aliquot* bersih sebanyak 200 – 250 μL dengan menggunakan pipet dan *tip*.
- d. Kemudian *aliquot* diberi label identitas pasien.
- e. Kemudian dimasukkan ke dalam *sample container* dan disusun rapi.
- f. Kemudian disimpan di dalam kulkas dengan suhu -80°C hingga jumlah sampel terpenuhi.
- g. Setelah jumlah sampel terpenuhi, dilakukan proses *thawing* sampel dari kulkas suhu -80°C ke suhu ruangan ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

- h. Saat menunggu proses *thawing* sampel, dilakukan juga proses kalibrasi, presisi dan kontrol kualitas alat *Rayto 2100C (microplate reader)*.
- i. Setelah sampel dan mesin dalam keadaan siap dan layak dilakukan pemeriksaan, maka dilakukan pemeriksaan PDGF.
- j. Tambahkan larutan *standard* atau sampel ke dalam tiap sumuran sebanyak 100 μL , kemudian secara cepat tambahkan larutan *biotinylated detection antibody* (Ab) tiap sumuran sebanyak 100 μL . Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
- k. Aspirasi dan cuci sebanyak 3 kali.
- l. Tambahkan larutan konjugasi HRP (*horseradish peroxide*) tiap sumuran sebanyak 100 μL kemudian diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37 °C.
- m. Aspirasi dan cuci sebanyak 5 kali.
- n. Tambahkan reagen substrat sebanyak 90 μL kemudian diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C.
- o. Tambahkan *stop solution* sebanyak 50 μL kemudian dibaca dengan panjang gelombang 450 nm secara cepat.
- p. Kemudian dikalkulasi alat dan dikeluarkan hasil.
- q. Hasil dikeluarkan dengan satuan pg/mL.

Linearitas reagen pada penelitian ini dilakukan dengan cara memberikan PDGF manusia dengan konsentrasi tinggi pada serum kemudian dilakukan dilusi dengan larutan standar, diperoleh :

Tabel 4. Linearitas reagen (Anonim, 2017)

Dilusi		Serum (n=5)
1 : 2	<i>Range (%)</i>	86 – 97
	<i>Average (%)</i>	92
1 : 4	<i>Range (%)</i>	93 – 106
	<i>Average (%)</i>	98
1 : 8	<i>Range (%)</i>	86 – 99
	<i>Average (%)</i>	93
1 : 16	<i>Range (%)</i>	89 – 99
	<i>Average (%)</i>	94

G. CARA DAN ALUR PENELITIAN

1. Cara Penelitian

Subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi di RSDM tanpa ada riwayat alergi terhadap ekstrak ikan gabus dan teripang dan riwayat penyakit sesuai kriteria eksklusi, dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok K1 dan K2, terhadap kedua kelompok diberikan terapi standar, yaitu terapi yang diberikan sesuai dengan gejala klinis, jenis penyakit dan dosis terapi. Terapi standar pasien pasca operasi adalah farmakologis dan terapi cairan. Terapi standar yang dilakukan adalah:

- a. Antibiotika diberikan sebagai profilaksis terhadap infeksi bakteri.

Antibiotika yang diberikan injeksi *Ampicilin Sulbactam* 1.5 gram/ 8 jam, didahului dengan *skin test*.

- b. Analgetik *nonsteroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) diberikan untuk mengurangi rasa nyeri pasca operasi. Analgetik yang diberikan injeksi *Ketorolac* 30 mg/ 8 jam.
- c. Infus NaCl 0.9 % 20 tetes per menit.
- d. Perawatan luka operasi, ganti perban dan dioleskan salep Gentamisin setiap 3 hari.

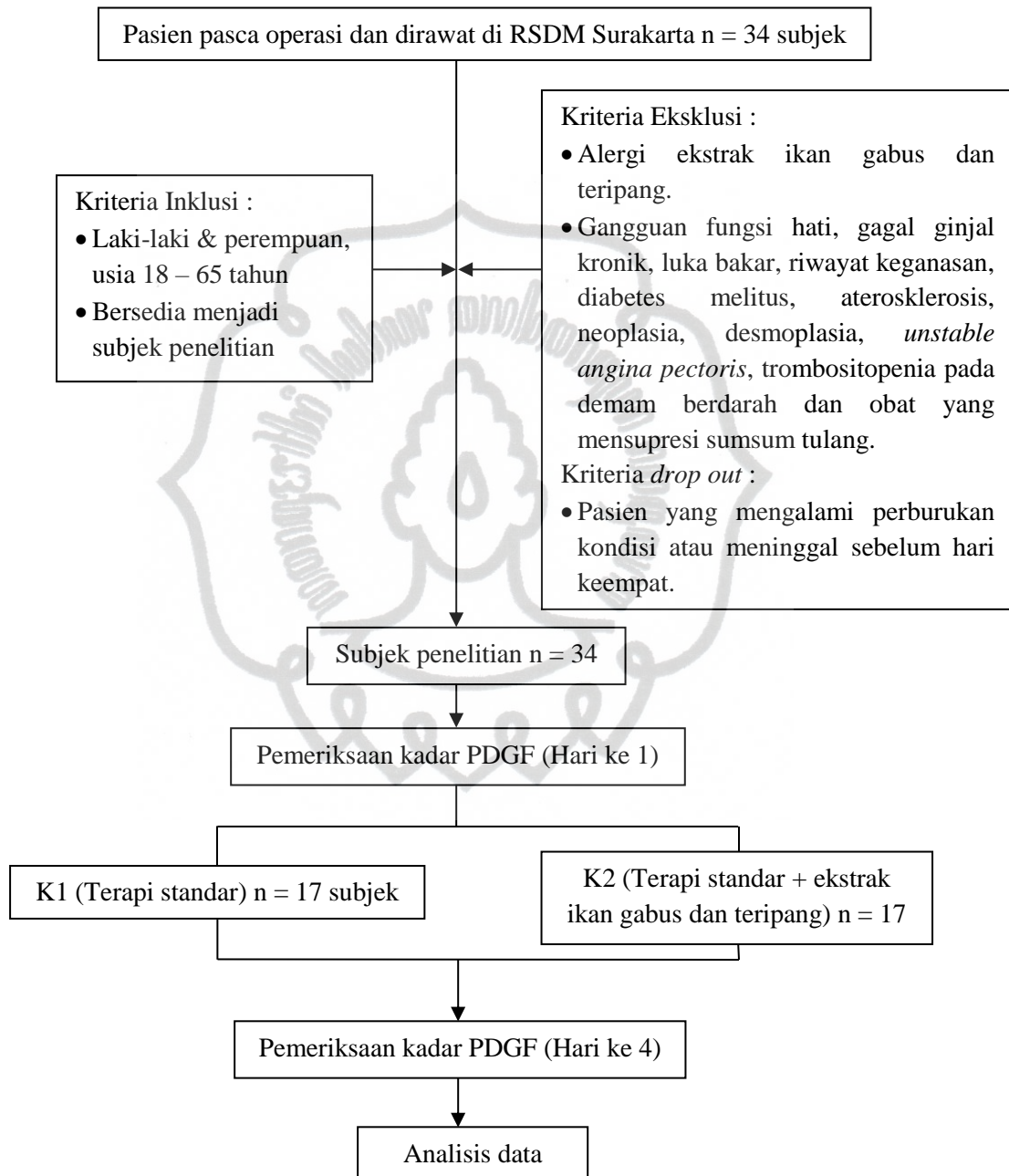
Pemilihan subjek ke dalam 2 kelompok secara acak yaitu memilih subjek penelitian pasca operasi yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dialokasikan ke kelompok K1 dan K2 dengan cara *simple random sampling* pada penelitian sampai jumlah subjek yang diperlukan terpenuhi, kelompok kontrol (K1) tidak diberikan ekstrak ikan gabus dan teripang sedangkan pada kelompok perlakuan (K2) diberikan ekstrak ikan gabus dan teripang dengan dosis 1 *sachet* ditambahkan 50 ml air minum dingin, kemudian diaduk hingga homogen dan diberikan setiap 12 jam peroral sesudah makan pada jam 08.00 dan jam 20.00. Bila terjadi reaksi alergi terhadap ekstrak ikan gabus dan teripang, segera hentikan penggunaannya dan diberikan terapi untuk alerginya. Terapi yang diberikan untuk alergi berdasarkan derajat keparahannya. Kasus alergi yang ringan dapat diberikan terapi steroid dan antihistamin, pada kasus yang berat seperti syok anafilaktik terapi yang utama adalah injeksi adrenalin, resusitasi cairan disertai dengan pemberian steroid dan antihistamin.

Pendataan identitas dilakukan melalui rekam medis, anamnesis dan pemeriksaan fisik berupa nama, umur, jenis kelamin, tinggi badan, berat badan, tindakan operasi, tanggal operasi untuk melengkapi data karakteristik pasien.

Sampel darah vena pada K1 dan K2 diambil pada hari pertama pasca operasi (sebelum pemberian ekstrak ikan gabus dan teripang pada K2) dan hari keempat pasca operasi (sesudah pemberian ekstrak ikan gabus dan teripang pada K2), sebanyak 1 tabung tanpa antikoagulan 3 cc. Tabung tersebut dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm (*revolutions per minutes*) selama 15 menit untuk memisahkan serum dari komponen sel darah kemudian ditampung dalam *aliquot* dengan menggunakan pipet 100 μ L dan *tip disposable* (kuning). *Aliquot* yang sudah diberi label identitas pasien diletakkan ke dalam *sample container* dan disimpan di dalam kulkas dengan suhu -80°C sampai terkumpul seluruh sampel, selanjutnya dilakukan pemeriksaan PDGF.

Identitas dan data subjek penelitian dicatat dalam formulir penelitian, dilakukan pengisian *informed consent* dan dilakukan anamnesis subjek penelitian. Subjek yang memenuhi kriteria inklusi diberi edukasi dan penjelasan tentang tujuan penelitian dan bersedia ikut dalam penelitian serta menandatangani lembar persetujuan. Dilakukan *follow up* (kondisi pasien, kepatuhan pasien minum ekstrak ikan gabus dan teripang, reaksi alergi terhadap ekstrak ikan gabus dan teripang) subjek penelitian selama perawatan.

H. Skema Alur Penelitian



Gambar 5. Skema Alur Penelitian

I. ANALISIS STATISTIK

Analisis data dilakukan dengan memakai program komputer. Definisi pengaruh disini adalah pengaruh nilai kadar PDGF antara sampel yang mendapat ekstrak ikan gabus dan teripang dengan kelompok kontrol. Perbandingan antara variabel bebas dan terikat menggunakan uji beda atau komparatif. Uji beda digunakan untuk mengetahui perbedaan nilai kadar PDGF antara kelompok yang mendapat ekstrak ikan gabus dan teripang dengan kelompok kontrol.

Pasien pasca operasi sebelum dan sesudah pemberian ekstrak ikan gabus dan teripang :

1. Analisis deskriptif dilakukan untuk melihat gambaran menurut variabel subjek. Setelah data terkumpul, data dianalisis dengan uji normalitas data dengan uji *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 dan dinyatakan sebagai rerata \pm simpangan baku (SB) bila data terdistribusi normal dan sebagai median (*min – max*) bila tidak terdistribusi normal.

2. Data tidak berpasangan (kelompok kontrol dan kelompok perlakuan).

Analisis data dengan melakukan transformasi data. Bila data hasil transformasi berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik dengan uji *independent sample T test*. Bila data hasil transformasi tidak berdistribusi normal maka dilakukan uji nonparametrik untuk kelompok tidak berpasangan yaitu dengan uji *Mann Whitney* (Dahlan, 2014).

3. Data berpasangan (pada kelompok *pre* dan *post* terapi). Bila data hasil transformasi berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik dengan uji *paired T test* berpasangan. Bila data hasil transformasi berdistribusi tidak normal dilakukan uji nonparametrik untuk kelompok berpasangan menggunakan uji *Wilcoxon*. Batas kemaknaan: $p < 0.05$, Interval kepercayaan 95% (Dahlan, 2014).
4. Dilakukan perhitungan delta (perbedaan/ selisih hasil) untuk kadar PDGF pada kelompok kontrol dan perlakuan sebelum dan sesudah terapi.

J. Pertimbangan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik RSDM Surakarta nomor 565/IV/HREC/2019 dan mendapatkan persetujuan dari subjek penelitian. Penelitian dilakukan dengan terlebih dahulu menerangkan secara singkat latar belakang, tujuan, manfaat dan teknik pengambilan sampel darah pada subjek penelitian atau pendamping, kemudian subjek penelitian menandatangani *informed consent* yang telah disediakan oleh peneliti.