

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Sampel penelitian adalah model tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan yang dibeli dari Laboratorium Biosains Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan :

Kriteria Inklusi :

- Jenis kelamin jantan *strain* wistar.
- Usia 6-7 minggu.
- Berat badan 150-200 gram.
- Berbulu warna putih, sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan mengkilap.

Kriteria Eksklusi :

- Tikus yang pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya.
- Tikus yang selama penelitian tidak mau makan.
- Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Supranto, 2000) :

$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

p : jumlah perlakuan, n : jumlah ulangan

Pada penelitian ini p = 4 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 15:3$$

$$n \geq 6$$

Jadi pengulangan jumlah tikus wistar jantan yang digunakan sebanyak 24.

4.2.2 Besar Sampel

Pada penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif (K -)	Perforasi, diberi eugenol, ditumpat dengan GIC
Kontrol Positif (K +)	Perforasi, diberi MTA, ditumpat dengan GIC
Kelompok Perlakuan 1 (P1)	Perforasi, diberi chitosan, ditumpat dengan GIC
Kelompok Perlakuan 2 (P2)	Perforasi, diberi nano chitosan, ditumpat dengan GIC

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

- Kelompok 1 : Kelompok kontrol negatif yaitu pada gigi molar dilakukan perforasi dan diberikan kapas eugenol
- Kelompok 2 : Kelompok kontrol positif yaitu pada gigi molar dilakukan perforasi dan diberikan MTA
- Kelompok 3 : Kelompok perlakuan yaitu pada gigi molar dilakukan perforasi dan diberikan chitosan

- Kelompok 4 : Kelompok perlakuan yaitu pada gigi molar dilakukan perforasi dan diberikan nano chitosan

4.3.2 Variabel Terikat

- Jumlah sel odontoblas yang terlihat pada preparat histologi pasca aplikasi bahan *pulp capping*

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

1. Genetik
2. Jenis kelamin
3. Umur
4. Berat badan
5. Makanan dan minuman yang dikonsumsi obyek penelitian
6. Aplikasi bahan *pulp capping*

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Scanning microscope (Olympus), *compact disc program dot slide OlyVIA* (Olympus), mikroskop cahaya (Olympus), mikroskop digital (Olympus), kamera digital (Kodak), komputer (Asus), mikrotom digital, *water bath*, mikro pipet (Gilson),

Freezer (suhu -20°C , merk Sharp), *sterilized chamber*, timbangan analitik, *vibrator*, *Graticulae* dan *sterilisator*.

4.5.2 Alat untuk Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba

1. Kandang plastik ukuran 75 cm x 50 cm x 25 cm yang ditutup dengan kawat kasa dan dialasi sekam.
2. Botol minum.
3. Timbangan untuk menimbang berat badan tikus.

4.5.3 Alat untuk Pembiusan

Dysposable syringe ukuran 1 ml sebanyak 1 buah untuk cairan ketamin tiap tikus.

4.5.4 Alat untuk Perlakuan

Spuit 5 ml, pinset, cotton pelet, tip aplikator, bur intan bulat diameter 0,46 mm, bur intan *inverted cone* diameter 0,46 mm, handpiece *low speed contra angel*, mikromotor, kaca pembesar, kaca mulut, *paper point* steril, sonde lurus, sonde *half moon*, glass lab, chip blower, spatula GIC, filling instrumen plastik, *celluloid strip*, *mixing pad*.

4.5.5 Alat untuk Pembedahan Tikus

Papan bedah, pisau bedah, gunting bedah, pinset, jarum pentul, stereofom, kapas.

4.5.6 Bahan Penelitian

Chitosan dalam kemasan 10 gr yang telah dijadikan ukuran nanopartikel, ketamin untuk pembiusan pada saat ekstraksi gigi, eter buatan Brataco Chemica untuk pembiusan pada saat dekapitas tikus, larutan buffer formalin 10% (pH 7,4) untuk fiksasi sediaan, pellet untuk makanan tikus, alkohol 70% untuk dehidrasi, EDTA 10% tanpa sodium untuk dekalsifikasi, aquadestilata, etanol, xylol, parafin,

anestesi ketamin (65mg/kg/berat badan), xyzalin HCl (7 mg/kg/berat badan), Phosphat Buffered Saline (PBS) steril, dentin conditioner, 0,9 natrium klorit, GIC tipe IX.

4.6 Definisi Operasional

1. Chitosan yang digunakan dalam eksperimen ini adalah chitosan bubuk yang diperoleh dari chitosan kapsul yang diproduksi oleh Spring Leaf Co, Sydney, Australia. Masing-masing kapsul mengandung 250 mg bubuk chitosan. Dihaluskan dan disterilisasi dengan radiasi sinar gamma sebesar 13-15 Kilo gray (KGy).
2. Nano chitosan merupakan chitosan yang dinanokan dengan proses *milling* dan diuji ukuran nanopartikelnya dengan menggunakan Particle Size Analyzer (PSA), Scanning Electron Microscopy (SEM), EDAX, FTIR, dan XRD.
3. Hewan coba menggunakan tikus wistar jantan berumur 6-7 minggu. Gigi molar tikus (termasuk jaringan pulpa, kamar pulpa) dapat dilihat anatomis, histologis, biologis, fisiologis disebagai *miniature* gigi molar manusia (Dammaschke, 2010). Penggunaan gigi molar tikus adalah metode dan model yang reliabel dan valid untuk mengevaluasi histologis hasil *direct pulp capping* (Stanley, 1998).
4. Tindakan perforasi pada gigi molar pertama mandibular tikus ditujukan untuk mendapatkan keadaan pulpa yang terbuka. Dentin reparatif diamati dari potongan melintang tulang rahang di daerah interdental molar pertama mandibular sebelah kanan setelah tikus didekapitasi dan diamati secara mikroskopis.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Nano Chitosan

Pembuatan nano chitosan menggunakan cara *milling* (penggerusan). Sebelum dilakukan proses *milling*, terlebih dahulu partikel diukur menggunakan *particle size*. Setelah dilakukan pengukuran di mulai proses *milling*. *Milling* dilakukan dengan rentang waktu 20 jam, 24 jam, 30 jam dan 48 jam sampai didapatkan ukuran nanachitosan. Setelah proses *milling* berakhir, dilakukan penyinaran menggunakan sinar UV agar partikel stabil (Effendi, 2012)

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus novergicus*) jenis *strain wistar* jantan sebagai binatang percobaan. Hal ini dikarenakan tikus putih jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil karena tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi dan kehamilan seperti pada tikus betina. Tikus putih jantan juga memiliki kecepatan metabolisme obat yang lebih cepat dan kondisi biologis tubuh yang lebih stabil dibanding tikus putih betina (Sugiyanto 1995, at Setiawan 2010)

Hewan coba diseleksi berdasarkan kriteria sampel, kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus yang dipelihara dalam tempat pemeliharaan hewan coba.

4.7.3 Pemeliharaan Hewan Coba

Sebelum dilakukan semua prosedur penelitian, kesehatan tikus diperiksa terlebih dahulu. Hal ini diketahui dari surat keterangan sehat yang diperoleh dari dokter hewan pada saat tikus dikirim ke laboratorium. Tikus yang digunakan dalam penelitian harus benar-benar dalam keadaan sehat, kemudian tikus ditimbang berat badannya (University of Melbourne Animal Welfare Committee, 2005).

Setelah dilakukan penimbangan berat badan, tikus diadaptasikan dalam laboratorium. Adaptasi tikus di laboratorium memungkinkan mereka untuk menyesuaikan fisiologis dan psikologis dengan lingkungan baru dan memberikan kesempatan untuk memantau setiap kelainan (University of South Florida, 2009). Tikus diadaptasikan selama minimal 7 hari pada temperatur ruangan konstan (22-24^o C) (Tandon *et al.*, 2000). Tempat pemeliharaan tikus digunakan *box* plastik berukuran 1.080 cm², masing-masing untuk 4 sampai 6 ekor tikus, ditutup dengan kawat kasa, dan diberi alas sekam yang diganti 2 sampai 3 kali seminggu (Smith *et al.*, 1987). Kebutuhan makanan tikus dewasa adalah 10-20 gr/hari/ekor, sedangkan kebutuhan minuman tikus yaitu 20-45 ml/hari/ekor (Tandon *et al.*, 2000).

4.7.4 Perforasi pada Gigi Hewan Coba

- a. Persiapan alat dan bahan.

Posisi operator terhadap tikus tepat di kepala tikus dengan membuka akses visual ke faring oral landasan dalam rangka untuk melaksanakan prosedur *pulp capping*.

- b. Seluruh prosedur dilakukan anastesi lokal.
- c. Isolasi daerah kerja karena posisi anatomi gigi molar posterior ke diastema besar memisahkan gigi seri tikus membuatnya akses daerah perlakuan menjadi sulit maka diperlukan isolasi daerah kerja agar mempermudah dalam mencapai akses perlakuan serta mencegah kontaminasi saliva.
- d. Persiapan perforasi dan paparan perlakuan pada gigi molar tikus.

Pembersihan daerah kerja dengan dentin conditioner untuk menghilangkan *smear layer* dan meningkatkan retensi. Preparasi kelas I oklusal gigi molar pertama mandibula kanan tikus wistar menggunakan

round bur dan *inverted cone* bur (diameter 0,46 mm) untuk meratakan kavitas hingga mencapai pulpa kemudian diirigasi dengan 0,9% natrium klorida untuk mengontrol perdarahan.

4.7.5 Pemantauan Anestesi

- a. Setelah tikus dianestesi, mereka harus dipantau secara ketat untuk memastikan bahwa anestesi tidak menjadi terlalu dalam dan mati serta untuk memastikan bahwa anestesi tidak menjadi terlalu ringan dan mengalami rasa sakit dari prosedur pembedahan. Fungsi fisiologis normal seperti suhu tubuh, respirasi dan fungsi kardiovaskular juga harus dipantau dan didukung selama hewan tersebut dibius.
- b. Anestesi dipantau dengan cermat untuk memastikan kedalaman anestesi yang memadai, homeostasis, dan dukungan selama pemulihan anestesi. Pemantauan meliputi pemeriksaan kedalaman anestesi dan parameter fisiologis (minimal : denyut jantung dan laju pernapasan) secara teratur minimal setiap 10 menit.
- c. Tikus harus dimonitor selama induksi sampai pemulihan anestesi. Kardiovaskular, pernapasan, dan kedalaman anestesi harus sering diamati. Hal ini meliputi pengamatan dari kedua tanda-tanda vital (misalnya detak jantung, laju dan kedalaman pernapasan, warna membran mukosa, suhu tubuh) dan refleks (misalnya mencubit kaki, mencubit ekor, memperhatikan kelopak mata / bulu mata). Tanda-tanda vital merupakan indikator fungsi dasar homeostatik, sedangkan refleks untuk membantu menilai kedalaman anestesi. Semua ini harus dipertimbangkan dalam rangka untuk menentukan respon tikus terhadap anestesi. Apabila pupil melebar secara luas, dengan iris terlihat sedikit atau tidak ada, harus ada kekhawatiran karena mungkin

terdapat reaksi yang berlebihan dalam anestesi atau mungkin terjadi hipoksia

- d. Untuk tanda-tanda pernapasan, harus selalu memantau tingkat, irama, dan kedalaman pernapasan serta warna membran mukosa
- e. Untuk tanda-tanda jantung, apabila terjadi kenaikan denyut jantung (takikardia) selama prosedur sering menunjukkan bahwa kedalaman anestesi tidak memadai. Apabila terjadi penurunan denyut jantung (bradikardia) selama prosedur dapat menandakan dosis berlebihan. Jika terjadi overdosis, berikan cairan isotonik hangat secara intravena atau intraperitoneal. Hangatkan tikus untuk meningkatkan suhu tubuh
- f. Anestesi biasanya menyebabkan depresi suhu tubuh. Suhu tubuh dapat diukur di rektal. Mempertahankan suhu tubuh pada tingkat normal, memungkinkan metabolisme lebih cepat dari agen anestesi. Suhu tubuh harus dipantau dan dijaga selama proses anestesi dan pasca operasi untuk menghindari hipotermia. Suhu tubuh normal 37-38^o C.
- g. Pemantauan terhadap tikus yang dianestesi juga meliputi :
 - Sirkulasi : untuk memastikan bahwa aliran darah ke jaringan memadai
Metode : denyut jantung, palpasi nadi, melihat gerakan dada
 - Oksigenasi : untuk memastikan konsentrasi oksigen cukup dalam pembuluh darah tikus
Metode : pengamatan warna membran mukosa (gusi, konjungtiva).
Sebuah warna kebiruan berarti hewan tersebut tidak mendapatkan cukup oksigen

- Ventilasi : untuk memastikan bahwa ventilasi tersedia secara layak
- Metode : tingkat pernapasan, pengamatan gerakan dinding toraks atau gerakan pernapasan jika hewan secara spontan bernapas, pemeriksaan pernapasan (University of Minnesota Board of Regents, 2009)

4.7.6 Aplikasi Nano Chitosan, Chitosan, MTA dan Eugenol

- a. Pelapik secara langsung dengan kapas eugenol untuk kelompok kontrol negative, pemberian MTA untuk kelompok kontrol positif, pemberian chitosan untuk kelompok perlakuan 1 dan pemberian nano chitosan untuk kelompok perlakuan 2, lalu dikeringkan dengan chip blower.
- b. Menutup kavitas
GIC tipe IX digunakan sebagai bahan restorasi untuk menutup kavitas yang diaduk di atas *mixing pad* dengan spatula GIC dan diaplikasikan menggunakan filling instrument plastik serta diadaptasi di permukaan gigi dengan *celluloid strip*.

4.7.7 Pemulihan Anastesi

- a. Pemulihan tahap 4 : hewan tidak sadar atau setengah sadar. Beberapa refleks masih berkurang atau tidak ada. Hewan tersebut dipantau secara ketat sampai telah melewati tahap-tahap pemulihan. Tahap 4 adalah prosedur standar untuk menilai suhu tubuh, denyut jantung, denyut nadi, frekuensi pernapasan setidaknya setiap satu jam. Kondisi beda dimonitor
- b. Pemulihan tahap 3 : hewan sadar dan semua refleks hadir, tetapi tidak mungkin dapat mengontrol posisi tubuhnya. Refleks menelan ada, selanjutnya hewan harus dimonitor. Parameter yang tercantum di atas dinilai tetapi kurang sering, kira-kira setiap 8-12 jam

- c. Pemulihan tahap 2 : hewan dapat mempertahankan dirinya dalam posisi sternalis atau dapat berdiri dan bergerak, namun masih dapat menampilkan beberapa sedasi, hipotermia atau dehidrasi. Di *post operative*, parameter yang tercantum di atas, serta sikap, aktivitas, makanan dan air dinilai setidaknya setiap 12 jam
- d. Pemulihan tahap 1 : semua fungsi normal, kecuali diubah langsung oleh prosedur eksperimental. Di *post operative*, hewan dipantau setiap 12 jam untuk parameter yang tercantum di atas (University of Minnesota Board of Regents, 2009)

4.7.8 Perawatan Hewan Coba Pasca Aplikasi Bahan *Pulp Capping*

Pemberian makanan pasca aplikasi bahan *pulp capping* adalah dengan mengencerkan makanan tikus. Hal tersebut dilakukan secara rutin setiap jam makan tikus. Hal ini bertujuan untuk menghindari rasa sakit tikus pasca aplikasi bahan *pulp capping* sehingga kebutuhan nutrisi hewan coba dapat terpenuhi.

4.7.9 Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan sampel jaringan dilakukan pada hari ke-30 dengan cara melakukan *euthanasia* pada tikus menggunakan eter. Setelah dilakukan anestesi inhalasi, tikus ditempatkan dalam wadah tertutup yang terdapat kapas atau kasa yang sudah direndam dengan eter. Sebelum diambil mandibulanya, tikus harus benar-benar dipastikan sudah mati. Tikus tidak mati apabila : (University of Minnesota Board of Regents, 2009)

- a. Jantungnya berdetak. Periksa ini dengan merasakan dada antara ibu jari dan telunjuk
- b. Berkedip ketika disentuh bola mata

Jika tikus ini tidak mati, ditempatkan kembali di wadah tersebut, mengis ulang dan menunggu 5 menit. Pastikan sampai tikus benar-benar tidak ada tanda-tanda kehidupan. Apabila tikus sudah mati, lalu diambil mandibula di mana terdapat gigi molar yang telah diaplikasikan bahan *pulp capping*. Jasad tikus *strain wistar* kemudian dikuburkan dengan layak.

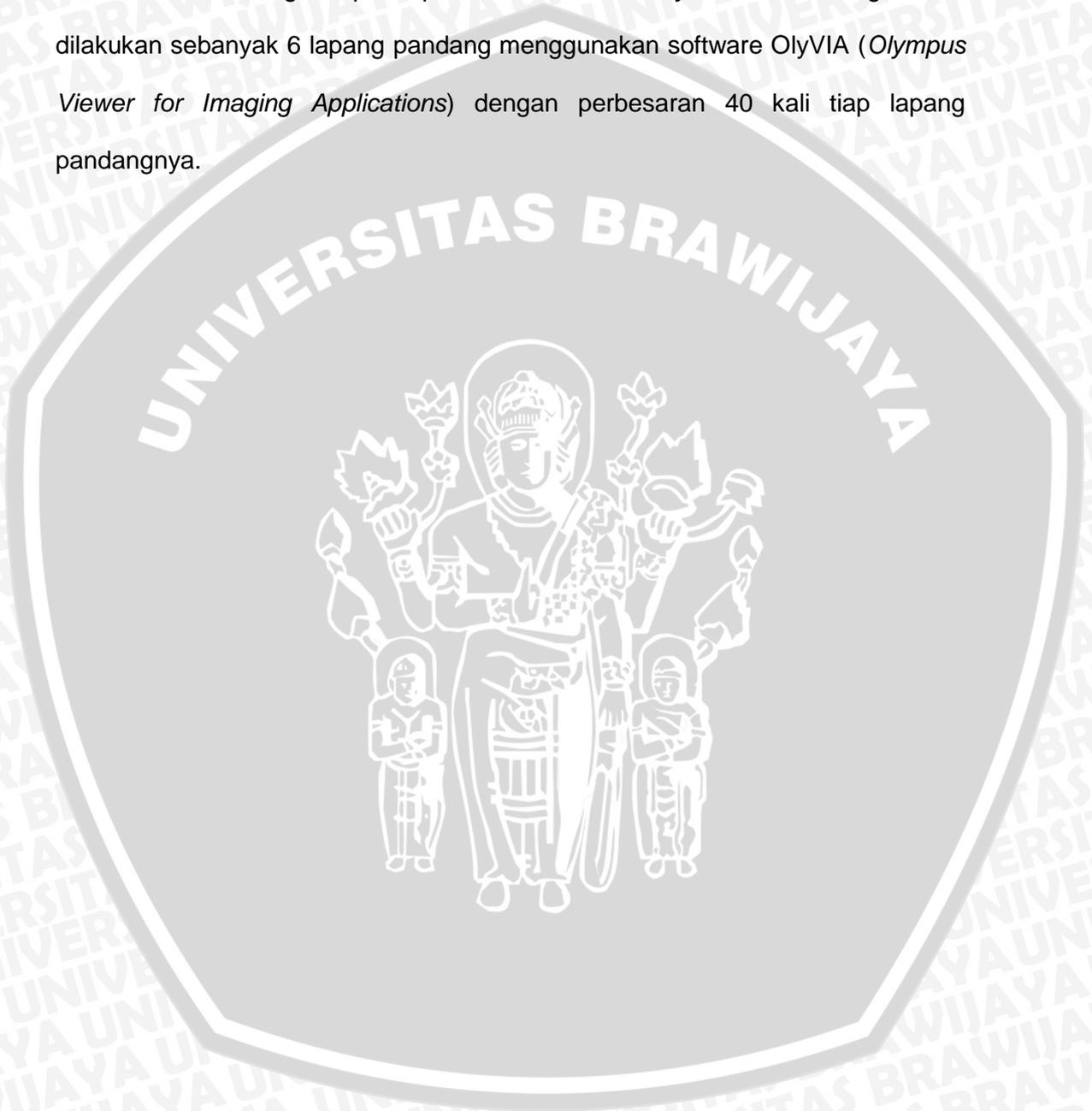
4.7.10 Pembuatan Sediaan

- a. Sampel jaringan yang telah diambil dari hewan coba difiksasi dalam larutan formalin 10% selama 18-24 jam
- b. Lalu dicuci dengan air mengalir selama 15-30 menit
- c. Dilakukan dekalsifikasi dengan menggunakan EDTA 14%
- d. Lalu dicuci dengan air selama 15 menit
- e. Dehidrasi dengan menggunakan aseton sebanyak 1 jam x 4
- f. *Clearing* dengan menggunakan xylol sebanyak ½ jam x 4
- g. *Impregnasi* dengan menggunakan parafin cair dengan suhu 55^o – 80^o C
- h. Dilakukan penanaman jaringan ke dalam parafin blok (*embedding*)
- i. Dilakukan pendinginan selama 24 jam
- j. Sediaan disayat dengan menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan berkisar 3-6 μ
- k. Peletakan sayatan pada *water baht* dengan suhu 50^o C
- l. Setelah menempel, didiamkan selama 24 jam
- m. Dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *Hematoksilin Eosin*

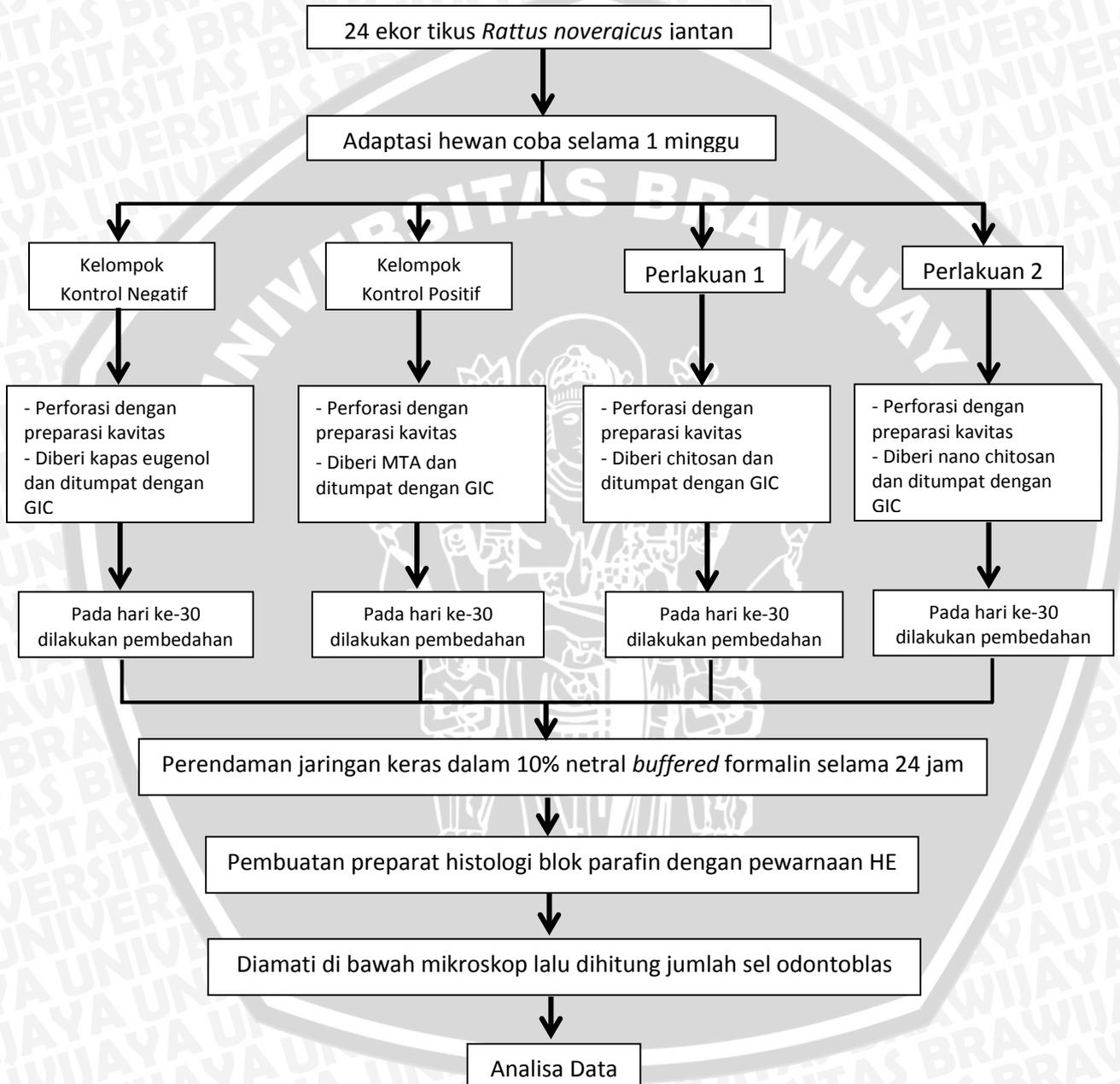
4.7.11 Pemeriksaan Sediaan Histopatologis

Mengamati jaringan gigi khususnya pada pulpa melihat proliferasi sel odontoblas dalam membentuk dentin reparatif pada preparat di mikroskop. Analisis histopatologi subyektif menggunakan mikroskop kamera dp 40x. Sel

odontoblas merupakan sel yang membentuk lapisan tunggal di periferinya dan mensintesis matriks yang kemudian termineralisasi dan menjadi dentin serta berwarna biru keunguan pada pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Pengamatan dilakukan sebanyak 6 lapang pandang menggunakan software OlyVIA (*Olympus Viewer for Imaging Applications*) dengan perbesaran 40 kali tiap lapang pandangnya.



4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian



4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

4.9.1 Prosedur Pengumpulan Data

Data yang diambil berupa data-data hasil pengamatan proliferasi sel odontoblas pada jaringan melintang histoPA gigi molar tikus menggunakan *scanning microscope* (program *dot slide OlyVIA Olympus*) dengan perbesaran 400 kali. Data-data tersebut diambil setelah dilakukan pembedahan pada minggu ke-30.

4.9.2 Teknik Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah odontoblas pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) 19.0 for Windows dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah yang dilakukan sebagai berikut : (Dahlan, 2004)

a. Uji Normalitas Data

Bertujuan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh dari kegiatan penelitian mempunyai distribusi yang normal atau tidak. Jika distribusi normal, maka rumus uji hipotesis yang digunakan adalah statistik parametrik dan jika distribusi tidak normal, maka menggunakan statistik non parametrik

b. Uji Homogenitas Varian

Bertujuan untuk mengetahui apakah kelompok sampel mempunyai varian yang sama atau tidak. Apabila berasal dari populasi dengan varian yang sama dinamakan populasi homogen

c. Uji One Way Anova

Bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing kelompok

d. Uji Post-Hoc Test

Bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang terdapat perbedaan yang signifikan dari hasil uji ANOVA. Jika asumsi homogenitas varians terpenuhi, maka teknik yang digunakan uji Tukey (*Honestly Significant Difference*)

