

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* untuk mengetahui efektivitas Nano Chitosan sebagai bahan pulp capping terhadap ketebalan dentin reparatif gigi molar tikus wistar (*Rattus novergicus*).

4.2 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini, adalah :

1. Variabel bebas

- Kelompok kontrol negatif :

Gigi molar tikus wistar yang diperforasi dan preparasi kavitas, lalu diberikan kapas eugenol dan ditumpat GIC.

- Kelompok kontrol positif :

Gigi molar tikus wistar dilakukan perforasi dan preparasi kavitas, lalu diberikan MTA dan ditumpat GIC.

- Kelompok perlakuan 1 :

Gigi molar tikus wistar dilakukan perforasi dan preparasi kavitas, lalu diberikan chitosan dan ditumpat GIC.

- Kelompok perlakuan 2 :

Gigi molar tikus wistar dilakukan perforasi dan preparasi kavitas, lalu diberikan Nano Chitosan dan ditumpat GIC.

2. Variabel tergantung

Ketebalan dari dentin reparatif

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus wistar *Rattus norvegicus* yang didapat dan dibeli di Laboratorium Biosains Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang higienis, bersih, tidak rusak. Sampel penelitian dipilih berdasarkan ketentuan :

Kriteria Inklusi :

1. Jenis kelamin jantan strain wistar.
2. Usia 6-7 minggu
3. Berat badan 150-200 gram
4. Berbulu warna putih, tebal dan mengkilap, kondisi tubuh sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif, mata jernih, tidak ada kecacatan tubuh.

Kriteria Eksklusi :

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan.
2. Tikus yang kondisinya memburuk atau mati selama penelitian berlangsung.
3. Tikus yang pernah dilakukan penelitian sebelumnya.

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

$$(n-1)(p-1) \geq 15 ; p : \text{jumlah perlakuan}, n : \text{jumlah ulangan}$$

Pada penelitian ini $p = 4$ sehingga jumlah pengulangan adalah :

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

$$3(n-1) \geq 15$$

$$n \geq 6$$

Jumlah pengulangan jumlah tikus wistar jantan yang digunakan sebanyak 24 ekor.

4.4 Tempat Penelitian

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

4.5 Definisi Operasional

1. Chitosan merupakan produk alamiah yang merupakan turunan dari polisakarida chitin. Chitosan yang digunakan dalam penelitian yaitu chitosan bubuk yang diperoleh dari chitosan kapsul yang diproduksi oleh Spring Leaf Co, Sydney, Australia. Masing-masing kapsul mengandung 250mg 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. Tikus Wistar (*Rattus novergicus*) merupakan hewan coba yang digunakan dalam penelitian dengan kriteria jantan berusia 6-7 minggu dengan berat badan antara 150-200 gram. Gigi molar tikus wistar (terutama kamar pulpa) dapat dilihat secara anatomis, biologis, histologis, fisiologis sebagai *miniature model* gigi molar manusia.
4. Metode HE (*Haematoxylin Eosin*) adalah metode pewarnaan jaringan histologi yang digunakan untuk mengamati ketebalan dari dentin reparatif gigi molar tikus wistar (*Rattus novergicus*) yang telah diberi perlakuan.

5. *Pulp Capping* merupakan teknik aplikasi bahan langsung ke jaringan pulpa, baik dentin yang tipis atau atap pulpa yang terbuka yang bertujuan untuk merangsang terbentuknya dentin reparatif, dengan menggunakan bahan Nano Chitosan, chitosan, MTA, dan kapas eugenol.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Nano Chitosan

Pembuatan Nano Chitosan menggunakan cara penggilingan (*milling*) sebelum dilakukan proses *milling*, terlebih dahulu partikel diukur menggunakan *particle size* setelah dilakukan pengukuran dimulai proses *milling*. *Milling* dilakukan rentang dalam waktu 20 jam, 24 jam, 30 jam dan 48 jam sampai didapatkan ukuran nanochitosan. Setelah proses *milling* berakhir dilakukan penyinaran menggunakan sinar UV agar partikel stabil (Effendy, 2012)

4.6.2 Perforasi pada Gigi Tikus Wistar

1. Mempersiapkan alat dan bahan. Posisi operator terhadap tikus tepat di kepala tikus dengan membuka akses visual ke faring oral dengan tujuan untuk melaksanakan prosedur *Direct Pulp Capping*. Rongga mulut tikus dibuka menggunakan ring klamer.
2. Seluruh prosedur dilakukan anestesi total dengan menggunakan ketamin.
3. Isolasi daerah kerja agar mempermudah dalam mencapai akses perlakuan serta mencegah terjadinya kontaminasi saliva.
4. Persiapan perforasi dan dilakukan perlakuan pada gigi molar pertama maksilla tikus wistar.
5. Preparasi kelas I oklusal gigi molar pertama maksila kanan tikus wistar menggunakan round bur dan *inverted cone* bur (diameter 0,46 mm)

untuk meratakan kavitas hingga mencapai pulpa kemudian diirigasi dengan aquadest untuk kontrol perdarahan.

4.6.3 Aplikasi Kapas eugenol, Nano Chitosan, Chitosan, dan MTA

Pelapik langsung diatas pulpa untuk kelompok kontrol negatif ditutup dengan kapas eugenol, kelompok kontrol positif dengan MTA, kelompok perlakuan 1 dengan chitosan dan kelompok perlakuan 2 dengan Nano Chitosan. Kemudian, GIC tipe IX digunakan sebagai bahan restorasi tetap untuk menutup kavitas yang diaduk di atas *mixing pad* dengan spatula GIC dan diaplikasikan menggunakan filling instrument plastik. Selanjutnya, pada hari ke 30 dilakukan pembedahan maksila tikus.

4.6.4 Euthanasia Tikus wistar

Sebelum dilakukan pewarnaan menggunakan metode HE, tikus dilakukan tindakan euthanasia yaitu pembunuhan secara alami dan perlahan dengan dimasukkan kedalam toples berisi kapas yang telah diberi obat anastesi umum berupa ketamin. setelah dieuthanasia, dilakukan pembedahan pada rahang maksila tikus. Setelah pembedahan, maksila tikus dimasukkan dalam larutan buffer formalin 10% untuk difiksasi dalam tabung plastik yang diberi tanda sesuai dengan nama kelompok dan tanggal euthanasia.

4.6.5 Pembuatan dan Pengamatan Preparat

I. Proses pemotongan jaringan berupa makross

- a. Jaringan maksilla tikus hasil pembedahan dimasukkan ke dalam larutan formalin 10%
- b. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti.
- c. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter

- d. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode maksilla tikus peneliti.
- e. Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum diproses atau dimasukkan ke alat tissue tex processor.
- f. Di proses menggunakan alat atau mesin Automatic Tissue Tex Processor selama 90 menit.
- g. Alarm bunyi tanda sudah selesai.

II. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan

- a. Jaringan diangkat dengan mesin Tissue Tex Processor.
- b. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan maksilla tikus.
- c. Jaringan di potong dengan alat Microtome ketebalan 3-5 mikron.

III. Proses Deparafinisasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, lalu ditaruh di dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas sekitar 70-80°C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan sylol masing masing 20 menit. Setelah itu dimasukkan kedalam 4 tabung alkohol masing masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukkan ke dalam air mengalir selama 15 menit.

IV. Proses Pewarnaan HE (Auto Staining)

1. Pengecatan utama menggunakan Harris Hematoksilin selama 10-15 menit.
2. Cuci dengan air mengalir selama 15 menit.

3. Dichelupkan pada Alkohol asam 1% 2-5 kali.
4. Dichelupkan pada amonia air 3-5 kali.
5. Pengecatan pembanding menggunakan Eosin 1% selama 10-15 menit.

DEHIDRASI :

Dehidrasi dilakukan menggunakan Alkohol 70% selama 3 menit, lalu alkohol 80% selama 3 menit, lalu alkohol 96% selama 3 menit, dan terakhir alkohol absolut selama 3 menit

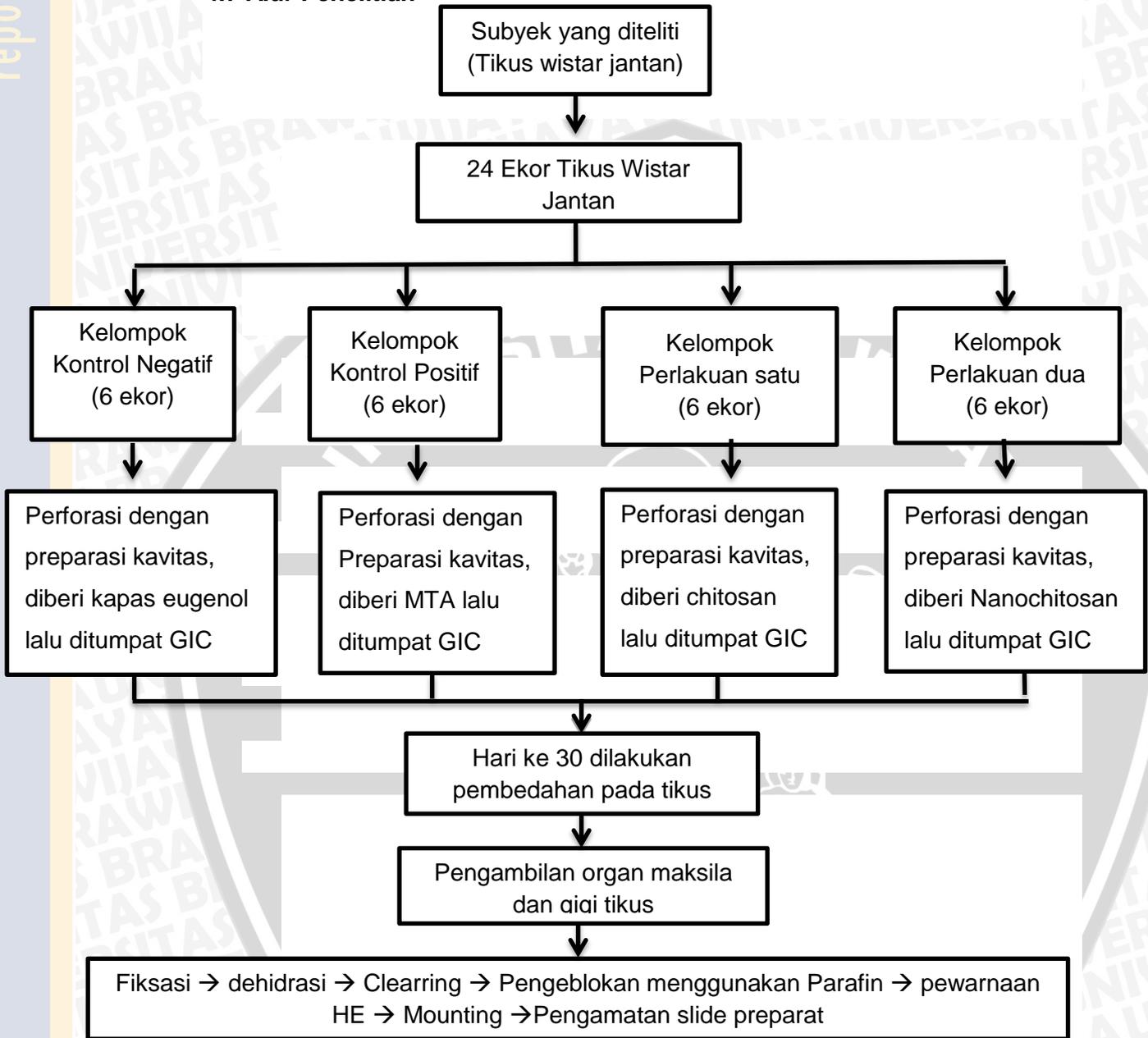
PENJERNIHAN (Clearring) :

Clearring menggunakan Xylol selama 60 menit

MOUNTING :

Mounting menggunakan entelan dan coverglass. Slide dibiarkan kering pada suhu ruangan,. Setelah slide kering, slide siap untuk diamati.

4.7 Alur Penelitian



Gambar 10. Alur Penelitian

4.8 Instrumen Penelitian

Scanning microscope (Olympus), *compact disc program dot slide OlyVIA* (Olympus), mikroskop cahaya (Olympus), mikroskop digital (Olympus), mikrotom digital, *water bath*, mikro pipet (Gilson), *Freezer* (suhu -20°C, merk Sharp),



sterilized chamber, timbangan analitik, *vibrator*, *Graticulae* dan *sterilisator* kamera digital (Sony), komputer (Axioo)

4.9 Alat dan Bahan Penelitian

4.9.1 Alat untuk Pemeliharaan dan Perlakuan Hewan Coba

Kandang plastik ukuran 75 cm x 50 cm x 25 cm yang ditutup dengan kawat kasa dan dialasi sekam, botol minum, timbangan untuk menimbang berat badan tikus.

4.9.2 Alat untuk Pembiusan

Dysposable syringe ukuran 1 ml untuk cairan ketamin tiap tikus wistar.

4.9.3 Alat untuk Perlakuan

Bur intan bulat diameter 0,46 mm, mikromotor, filling instrumen plastic, spuit 5 ml, pinset, cotton pelet, handpiece *low speed contra angel*, sonde lurus, *mixing pad*, sonde *half moon*, glass lab, spatula GIC.

4.9.4 Alat untuk Pembedahan Tikus

Pinset, papan bedah, jarum pentul, kapas, pisau bedah, gunting bedah.

4.9.5 Bahan Penelitian

Chitosan dalam kemasan 10 gr yang telah dijadikan ukuran nanopartikel, ketamin untuk pembiusan pada saat ekstraksi gigi, bahan pulp capping kalsium hidroksida dan MTA, eter buatan Brataco Chemica untuk pembiusan pada saat dekaputasi 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, xyzalin HCl (7 mg/kg/berat badan), phosphat Buffered Saline (PBS) steril, dentin conditioneer, 0,9 natrium klorit, GIC tipe IX.

4.10 Pengumpulan dan Analisis Data

4.10.1 Prosedur Pengumpulan Data

Data ketebalan dentin reparatif masing masing kelompok yang dilihat pada mikroskop dengan ukuran masing masing pembesaran 40x, 100x, dan 200x.

4.10.2 Teknik Analisis Data

Analisis yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Uji normalitas menggunakan *One Sample Kolmogorov Smirnov Test*. Kemudian dilakukan uji homogenitas ragam menggunakan *Levene's Test*. Apabila data yang diperoleh berdistribusi normal (*signifikansi* > 0,05) dan homogenitas ragam terpenuhi ($p > 0,05$), maka selanjutnya bisa dilakukan uji *One Way Anova* sebagai uji hipotesisnya. Uji *One Way Anova* dilakukan untuk menguji secara statistik apakah ada perbedaan bermakna pada pengamatan setiap variabel berdasarkan kelompok perlakuan, kelompok kontrol dan waktu pengamatan. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One Way Anova*. Apabila data tidak berdistribusi normal atau varian data tidak homogen, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilakukan uji *Mann Whitney* sebagai lanjutan uji *Kruskal-Wallis*.