

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hasil kalsinasi cangkang telur ayam ras petelur (*Gallus sp.*) terhadap waktu hemostasis pasca ekstraksi gigi tikus wistar. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) in vivo di laboratorium dengan rancangan *randomized post test only controlled group design*, dimana setiap hewan coba memiliki probabilitas yang sama untuk mendapatkan perlakuan, sehingga dapat menjaga validitas generalisasi ke populasi. Penelitian ini menggunakan tikus putih Jenis *Rattus norvegicus* (Notoatmojo, 2010)

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah tikus (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) jantan yang diperoleh dari Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel yang diambil adalah tikus putih jenis *Rattus Novergicus Strain Wistar* yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2.1 Kriteria Inklusi

- a. Usia 2 – 3 bulan
- b. Berat badan 200 – 250 gram
- c. Dalam kondisi sehat dan tidak cacat

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit selama masa penelitian
- b. Tikus mati selama masa penelitian
- c. Pada saat ekstraksi gigi, mengalami fraktur baik mahkota maupun akar gigi

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan teknik *Simple Random Sampling*. Dalam penelitian ini terdapat 4 perlakuan termasuk kontrol yang diberikan kepada objek penelitian, yaitu:

1. Kontrol : ekstraksi gigi insisivus atas tikus tanpa pemberian larutan cangkang telur
2. Perlakuan 1 (P1) : ekstraksi gigi insisivus atas tikus + larutan cangkang telur 10 mg/ml
3. Perlakuan 2 (P2) : ekstraksi gigi insisivus atas tikus + larutan cangkang telur 20 mg/ml
4. Perlakuan 3 (P3) : ekstraksi gigi insisivus atas tikus + larutan cangkang telur 40 mg/ml

4.2.4 Estimasi Jumlah Sampel

Jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Federer (Solimun, 2001): $(n-1)(t-1) \geq 15$; dengan t merupakan jumlah kelompok ($t=6$) dan n merupakan jumlah pengulangan/ sampel, sehingga jumlah pengulangan (jumlah sampel) yang dibutuhkan adalah:

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

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

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

$$(n-1) \geq 5$$

$$n \geq 6$$

Penelitian ini menggunakan 6 ekor tikus untuk tiap kelompok perlakuan sehingga jumlah tikus yang dibutuhkan untuk 4 kelompok adalah 24 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah larutan hasil kalsinasi cangkang telur ayam ras petelur (*Gallus sp.*) dengan berbagai konsentrasi (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml).

4.3.2 Variabel Terikat

Variable terikat dalam penelitian ini adalah waktu hemostasis pasca ekstraksi gigi tikus putih (*Rattus norvegicus*).

4.3.3 Variabel Kendali

- a. Usia tikus
- b. Berat badan tikus
- c. Gigi insisivus atas kanan tikus yang diekstraksi

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada tempat sebagai berikut:

1. Laboratorium Hasil Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya sebagai pengolahan kalsinasi cangkang telur.

2. Laboratorium Sentral Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang sebagai uji XRD dan XRF hasil kaslinasi cangkang telur.
3. Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, sebagai pembuatan larutan hasil kalsinasi cangkang telur.
4. Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan tikus dan pemberian perlakuan serta sebagai tempat pengukuran waktu hemostasis pasca ekstraksi gigi tikus.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 8 bulan yaitu pada bulan April 2015 sampai Bulan Desember 2015

4.5 Definisi Operasional

- a. Ekstraksi gigi tikus adalah prosedur bedah untuk melepaskan gigi dari soketnya. Ekstraksi gigi ini dilakukan pada gigi insisivus kanan atas tikus *Rattus norvegicus*.
- b. Cangkang telur ayam ras petelur (*Gallus sp.*) adalah lapisan terluar telur yang berwarna coklat tanpa melibatkan membran putih.
- c. Kalsinasi cangkang telur adalah pemanasan yang solid di bawah titik leleh untuk menciptakan keadaan dekomposisi termal atau transisi fasa lain dari mencair. Reaksi yang mungkin terjadi saat pemanasan yang solid dibawah titik leleh termasuk disosiasi termal dan rekristalisasi termal, Cangkang sendiri mengalami fase dari padat ke keadaan amorf sebelum didinginkan, dikeringkan, dan ditumbuk menjadi bubuk (Fredet *al.*,2014).
- d. Waktu hemostasis pasca ekstraksi gigi adalah waktu berhentinya perdarahan pada soket gigi pasca ekstraksi gigi terhitung mulai dari darah

yang pertama kali keluar selesai mengalir, sampai darah berhenti keluar, dihitung manual menggunakan *stopwatch* kemudian dicatat.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

- a. Pemeliharaan tikus: Bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air, neraca analitik, penggiling pakan, timbangan.
- b. Kalsinasi cangkang telur: Oven atmosferis, blender, ayakan 200 mesh, seperangkat wadah untuk bubuk, pendingin balik dan termometer, corong pemisah dan kertas saring.
- c. Ekstraksi gigi tikus: lecron modifikasi, *needle holder* modifikasi, kaca mulut.
- d. Pemberian hasil kalsinasi cangkang telur pada soket gigi tikus: pipet,
- e. Pengukuran waktu hemostasis: *stopwatch*, bulpen, dan buku catatan.

4.6.2 Bahan Penelitian

- a. Pemeliharaan tikus: pakan tepung PAR-S, terigu, air, dan sekam
- b. Kalsinasi cangkang telur: cangkang telur ayam ras petelur, air
- c. Ekstraksi gigi tikus: ketamin i.m dengan dosis 40mg/kgBB, Novalgine 500 mg/ml dengan dosis 0,3 ml IM selama 1 hari, dan Gentamicin 40mg/ml dosis 0,2 ml IM per hari selama 3 hari
- d. Pemberian hasil kalsinasi cangkang telur pada soket gigi tikus: bubuk cangkang telur yang dilarutkan dalam aquades yang direaksikan dengan CO₂ sebanyak 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Perawatan Hewan Coba

Tikus Wistar jantan dibeli dari Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dirawat di Laboratorium Faal. Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu. Selama penelitian, hewan coba diberi diet normal. Komposisi diet normal adalah 90,9% PAR-S dan 9,1% tepung terigu. dengan komposisi dalam PAR-S adalah karbohidrat 77,97%; protein 15,68%, lemak 6,63% dan kalsium 0,62%. Jumlah energi diet normal sebesar 104,7 kal (30g pakan/ tikus)

4.7.2 Kalsinasi Cangkang Telur

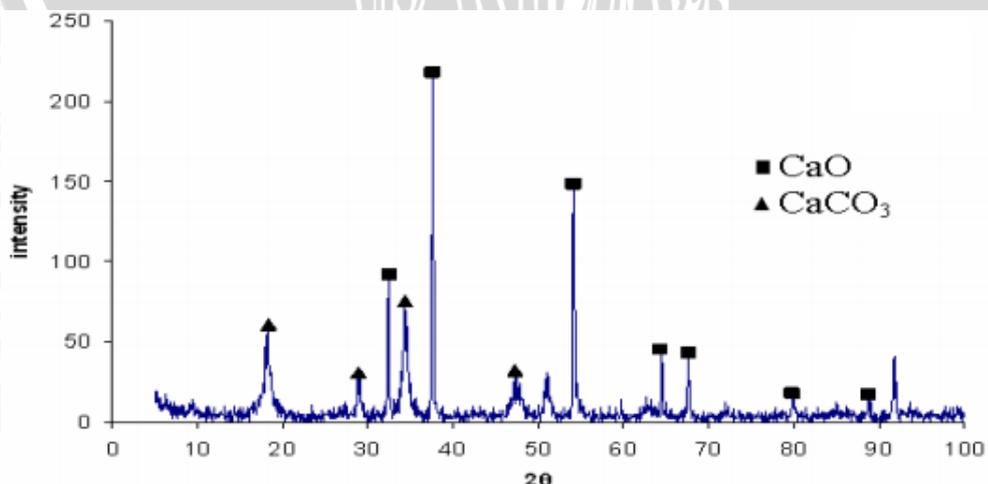
Menurut Fred *et al.*, (2014), metode kalsinasi pada cangkang telur adalah sebagai berikut:

- a. Kulit telur dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dipisahkan dari bagian membran
- b. Cangkang telur lalu dihancurkan menjadi ukuran yang lebih kecil. Ukuran yang biasa digunakan adalah diameter $\frac{1}{4}$ inci.
- c. Setelah *sizing*, cangkang telur kemudian di sentrifugasi . Tujuannya adalah untuk menghilangkan sisa-sisa cairan telur dan kelembaban sebab cangkang telur memiliki tingkat kelembaban 11,5%.
- d. Cangkang telur kemudian ditempatkan dalam alat pemanas untuk kalsinasi.
- e. Pemanasan cangkang telur dimulai. Suhu pemanasan tergantung pada komponen cangkang yang diinginkan untuk dikalsinasi.
- f. Suhu kalsinasi konvensional untuk Kalsium adalah 900°C. Aktivitas antimikroba terlihat pada cangkang telur yang dikalsinasi pada suhu

berkisar antara 1000°C sampai 1200°C. pemanasan pada suhu sekitar 1200°C ini menyebabkan hilangnya oksigen sehingga meningkatkan porositas dan luas permukaan senyawa untuk membuat lebih bioavailable.

- g. Pemanasan di zona kalsium dilakukan selama 5 jam
- h. Setelah itu masuk tahap pendinginan, pada tahap ini suhu yang digunakan dikurangi menjadi 50°C.
- i. Produk yang dihasilkan oleh cangkang telur nanti adalah berwarna putih.
- j. Produk yang telah didinginkan kemudian digiling dengan ukuran 1-50 mikron.

Proses kalsinasi mengakibatkan massa cangkang telur berkurang. Dari cangkang telur ayam diperoleh 65,67% (b/b) serbuk hasil kalsinasi. Gambar 4.3 memperlihatkan pola XRD serbuk cangkang telur ayam. Analisis XRD pada cangkang telur ayam kalsinasi ini untuk melihat dan memastikan bahwa CaCO_3 pada cangkang telur sudah berubah menjadi CaO . Pada cangkang telur ayam terdapat puncak-puncak difraksi CaCO_3 dan CaO , hal ini mengindikasikan bahwa masih ada CaCO_3 yang tidak berubah menjadi CaO (Nurlaela *et al.*, 2014).



Gambar 4.1 Pola XRD pada cangkang telur ayam (Nurlaela *et al.*, 2014)

Selanjutnya, dilakukan uji XRF (*X-Ray Fluorescence*) yaitu untuk mengetahui besar kandungan unsur dalam serbuk CaO. Hasil penelitian Enggawati dan Ediati (2013) menyebutkan hasil analisa XRF menunjukkan bahwa senyawa yang didapatkan dari hasil kalsinasi kulit telur ayam pada suhu 1000 °C tersebut mengandung 99,48% unsur Ca.

4.7.3 Pembuatan Larutan Hasil Kalsinasi

Basis larutan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades yang direaksikan dengan CO₂. Pembuatan larutan dilakukan menurut pembuatan sediaan farmasi yang sudah baku. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan berdasarkan penelitian pendahuluan, adalah sebagai berikut:

- a. 10 mg/ml yaitu sebanyak 10 mg dilarutkan dalam aquades hingga 1 ml
- b. 20 mg/ml yaitu sebanyak 20 mg dilarutkan dalam aquades hingga 1 ml
- c. 40 mg/ml yaitu sebanyak 40 mg dilarutkan dalam aquades hingga 1 ml

4.7.4 Ekstraksi Gigi Tikus

Ekstraksi gigi tikus dilakukan oleh satu orang operator. Dilakukan anestesi inhalasi menggunakan ketamin i.m (*intra muscular*) dengan dosis 40mg/kgBB. Pencabutan gigi dilakukan dengan menggunakan *lecron* dan *needleholder* modifikasi, *lecron* modifikasi dimasukkan ke soket dan digunakan untuk merusak stabilitas jaringan periodontal gigi tikus, kemudian menggunakan *needle holder* modifikasi untuk mengambil gigi dari dalam soket, dilakukan dengan gerakan searah dengan soket gigi dan dilakukan secara hati-hati dengan kekuatan yang sama untuk meminimalisir patahnya gigi (Fitriani, 2010).

4.7.5 Pemberian Larutan Cangkang Telur pada Soket Gigi Tikus

Endapan hasil kalsinasi cangkang telur yang telah diuji kandungannya dengan XRD/XRF dalam bentuk bubuk yang kemudian dilarutkan diberikan secara lokal dengan cara memberikan larutan sebanyak dosis. Pemberian dilakukan pada 3 kelompok perlakuan berbeda, dengan rincian:

- a. Ekstraksi gigi insisivus kanan atas tikus + Pemberian cangkang telur 10 mg/ml
- b. Ekstraksi gigi insisivus kanan atas tikus + Pemberian cangkang telur 20 mg/ml
- c. Ekstraksi gigi insisivus kanan atas tikus + Pemberian cangkang telur 40 mg/ml

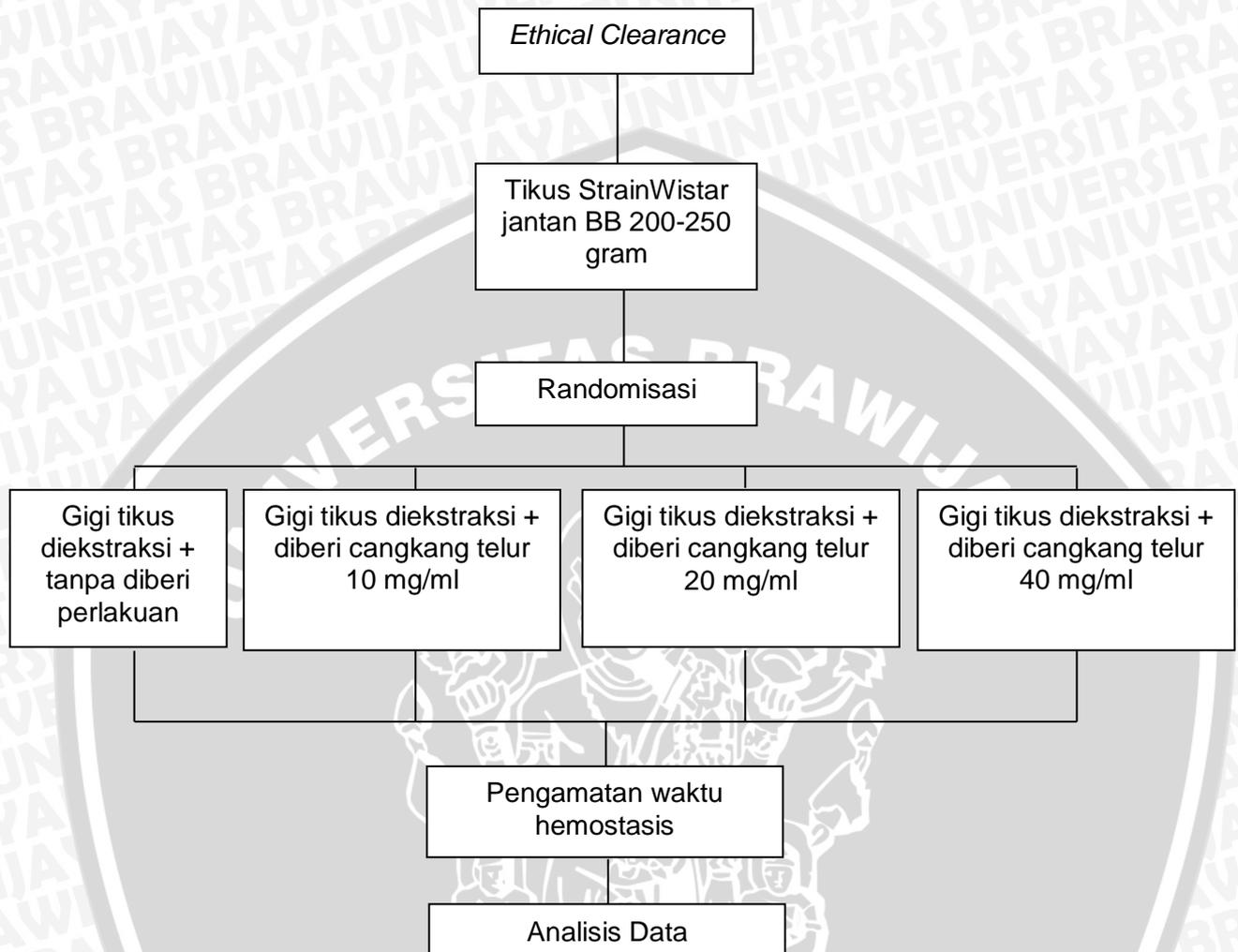
4.7.6 Pengukuran Waktu Hemostasis

Pasca pencabutan gigi tikus, dan perlakuan diberikan, penghitungan dimulai menggunakan *stopwatch*, dan dicatat waktu hemostasis pasca ekstraksi. Pengamatan dilakukan setelah aliran darah yang pertama kali keluar, lalu diamati darah berhenti mengalir dari soket gigi tikus.

4.7.7 Perawatan Hewan Coba Pasca Ekstraksi Gigi

Untuk mencegah infeksi yang terjadi pada soket mandibula *Rattus norvegicus*, maka selama 3 hari pasca pencabutan, tikus diberi anti inflamasi dan antibiotik. Obat yang digunakan adalah Novalgin 500 mg/ml untuk anti inflamasi dengan dosis 0,3 ml IM selama 1 hari dan Gentamicin 40mg/ml untuk antibiotik dengan dosis 0,2 ml IM per hari selama 3 hari (Fitriani, 2010). Perawatan berupa pemberian makan dilakukan setelah pencabutan gigi agar tikus tetap sehat setelah pemberian perlakuan. Selain itu pemberian minum secukupnya dengan air putih juga perlu dilakukan.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis awal yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji homogenitas dengan program statistik komputer dengan signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Jika sebaran data normal dan homogen ($p>0,05$) maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika sebaran data tidak normal dan tidak homogen ($p<0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya, dilakukan uji Uji Post hoc Multiple Comparison Equal Variance by Tukey sebagai lanjutan *one way anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*

untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Uji berikutnya adalah uji korelasi Pearson apabila didapatkan data normal dan homogen, apabila didapatkan data tidak normal dan tidak homogen menggunakan uji korelasi Spearman.

