

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*.

4.2 Subjek dan Sampel Penelitian

4.2.1 Subjek Penelitian

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, umur 6-8 minggu, dengan berat rata-rata 200-300 gram, tampak sehat, tingkah laku normal yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Persiapan sebelum penelitian dimulai meliputi persiapan pemeliharaan hewan coba, yaitu kandang, sekam, makan, dan tempat minum. Kemudian seleksi hewan coba dengan kriteria :

Kriteria Inklusi :

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Usia 6-8 minggu
- c. Berat badan 200-300 gram
- d. Sehat yang ditandai dengan gerakannya aktif, mata jernih, dan ketebalan bulu normal.

Kriteria Eksklusi :

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan

- b. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

Tikus galur wistar dipilih sebagai hewan coba karena tikus merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah perawatannya dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah gigi molar hewan coba tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan, umur 6-8 minggu, dengan berat rata-rata 200-300 gram, tampak sehat dan tingkah laku normal, diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah diseleksi kesehatan dan kenormalan tingkah lakunya.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak ikan teri (*Stolephorus sp*) dengan berbagai macam dosis, yaitu 4 mg, 8 mg, dan 12 mg (McLain, 2005).

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah sel odontoblas diamati pada hari ke 30.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral dan Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Material Fakultas Teknik Industri Institut Teknologi Sepuluh November dari bulan Februari 2014 sampai November 2015.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Persiapan Hewan Coba Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

Kandang tikus, tempat minum, timbangan ukur, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, nampan, terigu, air, sekam.

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Pengolahan Ikan Teri (*Stolephorus sp*)

Oven, blender, ikan teri (*Stolephorus sp*), NaOH 1 M.

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Tindakan Perforasi

Sprit 1 ml, pinset dan *cotton pellet*, tip aplikator, mata bur gigi mikrodonsia, *handpiece low speed*, *micromotor*, *mixing pad*, spatula GIC, *plastic filling instrument*, sonde lurus dan sonde *halfmoon*, larutan anestesi ketamin (10 mg/kg BB), *dentin conditioner*, natrium klorit 0,9%, GIC tipe 2.

4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak ikan teri dibuat dari ikan teri dengan kondisi masih segar, tidak berbau tajam, tidak berlendir, masih utuh dan teksturnya tidak lembek atau hancur bila ditekan. Kemudian dicuci dan dikeringkan dengan oven lalu digiling menggunakan blender sampai menjadi bubuk. Selanjutnya dicampur dengan *aquadest*, disaring, ditambahkan NaOH, disentrifugasi, dan endapannya dioven agar kering. Dilakukan pengulangan pembuatan ekstrak sebanyak 5 kali. Kemudian ekstrak diuji kandungan senyawanya di Laboratorium Material ITS.
- b. Hewan coba menggunakan tikus wistar jantan berumur 6-8 minggu. Gigi molar tikus (termasuk jaringan pulpa, kamar pulpa) dapat dilihat anatomis, histologis, biologis, fisiologis sebagai miniatur gigi molar manusia (Dammaschke, 2010). Penggunaan gigi molar tikus adalah metode dan

model yang reliabel dan valid untuk evaluasi histologis hasil *direct pulp capping*.

- c. Perlakuan pada hewan coba adalah memberikan trauma mekanik berupa iatrogenik injuri dengan dilakukannya tindakan perforasi sedalam 1 mm dengan menggunakan mata bur gigi mikrodonsia jenis round bur yang berdiameter tidak lebih dari 1 mm. Dengan demikian dapat diperoleh indikasi *direct pulp capping*.
- d. Tindakan perforasi pada gigi molar mandibular tikus ditujukan untuk mendapatkan keadaan pulpa yang terbuka. Dentin reparatif diamati dari potongan melintang tulang rahang di daerah interdental molar mandibular setelah gigi tikus diekstraksi dan diamati secara histopatologis dengan perwarnaan HE.
- e. Kontrol negatif adalah gigi molar tikus yang tidak diberi bahan *direct pulp capping* apapun, hanya diberi *zinc oxide eugenol* untuk penahan nyeri kemudian ditumpat.

4.7 Estimasi Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini, perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan

Dalam penelitian ini digunakan 4 macam perlakuan, maka :

t = 4 sehingga :

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

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Dari perhitungan didapatkan jumlah ulangan minimal adalah 6 gigi molar tikus wistar. Namun untuk mengurangi terjadinya *lose of sample* di tengah-tengah penelitian karena tikus mati, maka jumlah sampel ditambah 1 gigi molar tikus tiap perlakuan menjadi 7 gigi molar tikus setiap perlakuan, dengan pembagian kelompok :

Kelompok A (7 ekor tikus): setiap molar kanan rahang bawah untuk perlakuan 3 dan molar kiri rahang bawah untuk perlakuan kontrol negatif

Kelompok B (7 ekor tikus): setiap molar kanan rahang bawah untuk perlakuan 1 dan molar kiri rahang bawah untuk perlakuan 2

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Prosedur Persiapan Hewan Coba Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

- a. Tikus wistar jantan datang di laboratorium
- b. Tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu

4.8.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Ikan Teri (*Stolephorus sp*)

- a. Dibuat dari ikan teri yang masih segar, tidak berbau tajam, tidak berlendir, masih utuh dan teksturnya tidak lembek atau hancur bila ditekan.
- b. Dilakukan pencucian menggunakan *aquadest* untuk menghilangkan kotoran.
- c. Ikan teri dikeringkan menggunakan *oven* pada suhu 50 °C sekitar 6 jam.
- d. Ikan teri yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi bubuk.
- e. Bubuk teri ditimbang sebesar 10 mg dengan timbangan analitik.

- f. Kemudian dilarutkan dalam *aquadest* 1 liter dalam tabung erlenmeyer dan ditutup selama 24 jam.
- g. Larutan teri disaring dengan kertas saring lalu direaksikan dengan NaOH sebesar 12,85 gram.
- h. Larutan disentrifugasi 250 rpm selama 15 menit untuk mengambil endapan.
- i. Endapan kemudian dioven agar kering dengan suhu 50 °C selama 5 jam. Dilakukan pengulangan pembuatan sampel sebanyak 5 kali. Kemudian sampel ekstrak diuji kandungan senyawanya di Laboratorium Material ITS.

4.8.3 Persiapan Tindakan Perforasi

- a. Persiapkan alat dan bahan. Posisi operator terhadap tikus tepat di kepala tikus dengan membuka akses visual ke faring oral landasan dalam rangka untuk melaksanakan prosedur *direct pulp capping*.
- b. Seluruh prosedur dilakukan anestesi total.
- c. Isolasi daerah kerja karena posisi anatomi gigi molar 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.



Gambar 4.1 Letak Gigi Molar Tikus Wistar dengan Gigi Tetangga dan Diastema Besar

(Sumber : Headden J., 2011)

- d. Persiapan perforasi dan paparan perlakuan pada gigi molar tikus.
- e. Pembersihan daerah kerja dengan *dentin conditioner* untuk menghilangkan *smear layer* dan meningkatkan retensi.
- f. Preparasi oklusal gigi molar pertama mandibula tikus wistar menggunakan mata bur gigi mikrodonsia untuk perforasi mencapai pulpa.
- g. Kemudian diirigasi dengan *aquadest* dan garam 0,9% natrium klorit untuk mengontrol perdarahan.

4.8.4 Paparan Ekstrak Ikan Teri (*Stolephorus sp*) dan Penutupan Kavitas

4.8.4.1 Paparan Ekstrak Ikan Teri (*Stolephorus sp*)

- a. Berikan *zinc oxide eugenol* pada kontrol negatif untuk penahan nyeri.
- b. Pelapik secara langsung dengan bubuk ekstrak ikan teri 4 mg pada perlakuan 1, 8 mg pada perlakuan 2, 12 mg pada perlakuan 3.

4.8.4.2 Penutupan Kavitas

- a. GIC tipe 2 digunakan sebagai bahan restorasi untuk menutup kavitas yang diaduk di atas *mixing pad* dengan spatula GIC.
- b. Diaplikasikan pada kavitas menggunakan *plastic filling instrument*.

4.8.5 Pengambilan Spesimen

4.8.5.1 Pembedahan Mandibula Tikus

- a. Pembedahan dilakukan pada hari ke-30.
- b. Tikus dianastesi total dengan kloroform.
- c. Lalu tulang mandibula dipotong seluruhnya kemudian dipotong lagi menjadi dua, sehingga gigi molar kanan dan kiri tikus yang diberi perlakuan terdapat pada masing-masing potongan mandibula.
- d. Masing-masing potongan diberi tanda sesuai kelompok perlakuan.

4.8.5.2 Perendaman Jaringan Keras Gigi Dan Tulang Mandibula

Potongan-potongan mandibula direndam pada 10% *neutral buffered formalin* untuk memfiksasi jaringan selama 7 hari dan 10% EDTA untuk mendekalsifikasi jaringan.

4.8.5.3 Pembuatan Preparat Jaringan Keras Gigi dan Tulang Mandibula

- a. Jaringan tulang mandibula dan gigi dimasukkan pada blok parafin hasil *embedding* pada penjepit (*block holder*) mikrotom dengan ukuran tertentu.
- b. Irisan jaringan diambil dengan kuas dan dimasukkan ke dalam air pada suhu 38-40 °C.
- c. Irisan yang terentang sempurna diletakkan pada *object glass*.
- d. Selanjutnya dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C sampai kering.
- e. Preparat yang sudah disiapkan digunakan untuk melihat jaringan tulang dan jaringan gigi.

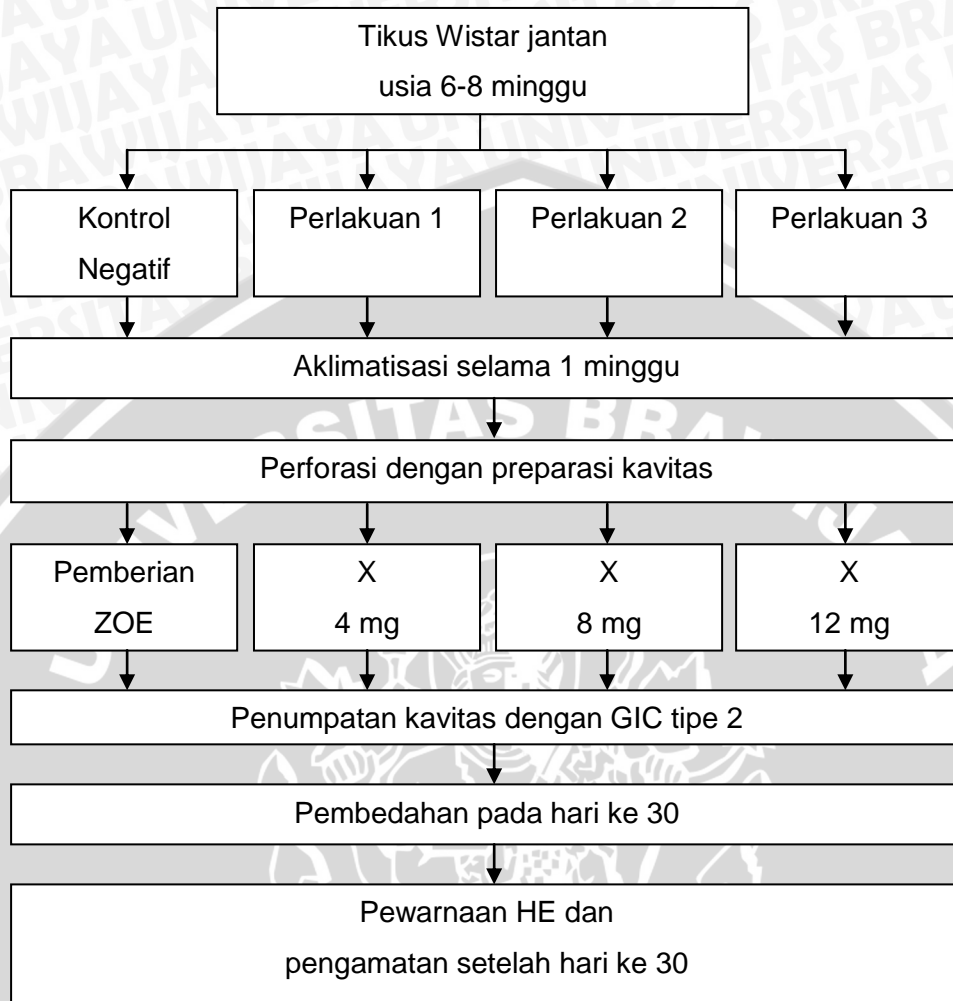
4.8.5.4 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

- a. Pewarnaan HE dilakukan dengan memasukkan spesimen ke dalam hematoksilin.
- b. Lalu dimasukkan ke dalam eosin selama 5 menit dan diakhiri dengan pengeringan.
- c. Setiap langkah diikuti pembilasan dengan air.

4.8.5.5 Pemeriksaan Sediaan Histopatologis

- a. Mengamati jaringan gigi khususnya pada pulpa dengan melihat dan menghitung peningkatan sel odontoblas pada preparat di mikroskop.
- b. Analisis histopatologi subyektif menggunakan mikroskop *Olympus XC10* dengan pembesaran 40x.
- c. Parameter berikut dianalisis: peningkatan jumlah sel odontoblas.

4.9 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.2 Skema Alur Kerangka Kerja Penelitian

Keterangan :

X = Bubuk ekstrak ikan teri (*Stolephorus sp*)

4.10 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan varian data sama ($p > 0,05$) maka digunakan uji hipotesis *Oneway ANOVA* untuk menganalisa jumlah sel odontoblas. Namun, jika tidak sama ($p < 0,05$) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Kemudian dilakukan analisis menggunakan uji *Post Hoc Test Multiple Comparison* sebagai lanjutan uji *Oneway ANOVA* untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai pengaruh

paling signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Uji terakhir yang dilakukan adalah uji korelasi yaitu untuk mengetahui besarnya hubungan dari dosis paparan ekstrak ikan teri terhadap jumlah sel odontoblas.

