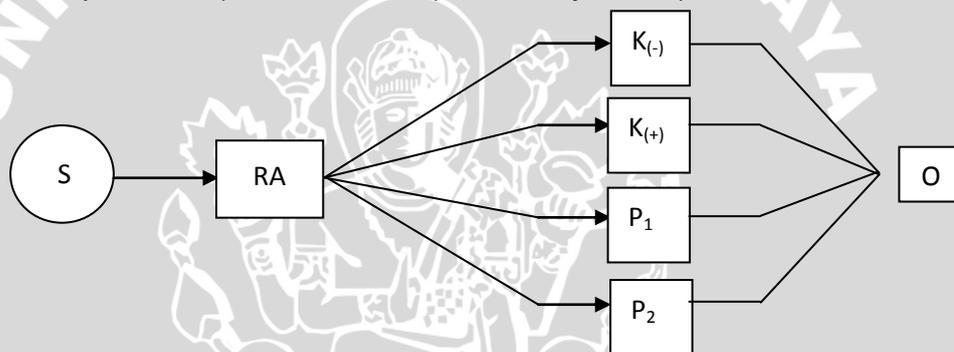


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *randomized posttest only controlled group design*. Jenis penelitian menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) secara *in vivo* (Notoadmojo, 2005).



4.1. Rancangan penelitian

Keterangan :

- S = Sampel Penelitian
- R A = Random Alokasi
- K<sub>(-)</sub> = Kontrol Negatif, tanpa diinduksi LPS Aa dan tanpa pemberian ekstrak teh hijau
- K<sub>(+)</sub> = Kontrol Positif, diinduksi LPS tanpa pemberian ekstrak teh hijau
- P<sub>1</sub> = Perlakuan dengan diinduksi LPS Aa dan pemberian ekstrak teh hijau 150mg/100grBB
- P<sub>2</sub> = Perlakuan dengan induksi LPS Aa dan pemberian ekstrak teh hijau 200mg/100grBB
- O = Observasi tulang alveolar tikus

4.2 Sampel

4.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah hewan model tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan.



Kriteria inklusi:

1. Tikus berbulu putih, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.
2. Berat rata-rata 200-250 gram
3. Umur dua bulan

Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berjalan
3. Tikus yang periodontitis

#### 4.2.2 Besar Sampel Penelitian

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Federer (Nazir, 2005):

$(n-1)(t-1) \geq 15$  ; dengan  $t = \text{jumlah kelompok} = 4$  ;  $n = \text{jumlah sampel}$

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

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

$$n \geq 18/3 = 6$$

Penelitian ini dilakukan pada empat kelompok perlakuan, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor dan ditambah 1 ekor tikus tiap kelompok sebagai cadangan sehingga total sampel penelitian sejumlah 28 ekor.

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak teh hijau dengan dosis 150mg/100gr dan 200mg/100gr.

#### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel osteoklas.

#### 4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. Kriteria hewan coba
- b. Cara menginduksi LPS Aa
- c. Cara pemberian ekstrak teh hijau

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal, Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang bulan Juni – November 2016.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

Tikus wistar jantan, LPS Aa, Larutan *phosphate buffer saline* (PBS), Larutan *buffer formaline* 10%, Larutan *saline*, teh hijau, Ketamin (80 mg/kg BB), Blok parafin lunak dan keras serta besi L untuk mencetak blok parafin, Larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut), Larutan etanol 70% dan *xylol*, Aquades steril, Kertas saring, EDTA 10%, Minuman dan makanan standar tikus wistar

##### 4.5.2 Alat Penelitian

Kandang dan tempat minum, Spuit 1 ml, 3 ml, dan 5 ml untuk anestesi, Jarum 25G, Tabung reaksi (Pyrex), Gelas ukur dan spatula, *Erlenmeyer* (Pyrex), Benang wol, Alat bedah minor, *Sterofoam*, Neraca

analitik, Pipet tetes, Mikropipet 10-100  $\mu$ l dan 200-1.000  $\mu$ l beserta tipnya, Maserator dan oven, Termometer, *Rotary evaporator* dan *rotary microtome*, Mikroskop cahaya, Tabung organ, *Object glass*

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun teh hijau adalah ekstrak dari daun teh hijau yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Ekstrak daun teh hijau dilarutkan ke dalam DMSO (*dimetil sulfoksida*) 2% agar ekstrak dapat diinjeksikan kedalam gingiva. Dosis ekstrak teh hijau yang digunakan adalah 150mg/100grBB dan 200mg/100grBB. Teh hijau diperoleh dari Kebun Teh Wonosari. Identifikasi daun teh dilakukan di Balai Materica Medica Batu (BMM).
2. Penurunan densitas tulang alveolar adalah penurunan densitas tulang alveolar yang diakibatkan oleh injeksi LPS Aa yang merupakan endotoksin dari bakteri gram negatif Aa dengan bentuk sediaan bubuk lalu diencerkan dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) steril dengan dosis 5  $\mu$ g dalam 3  $\mu$ l PBS. LPS Aa diinduksi pada tikus pada bagian sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian mesiolabial. Tanda adanya periodontitis setelah diinduksi LPS Aa dapat dilihat secara makroskopis yaitu adanya inflamasi pada daerah gingiva dan adanya penambahan kedalaman poket yang diukur dengan melakukan *Probing* pada hari ke-20.
3. Jumlah osteoklas adalah jumlah sel osteoklas dari tulang alveolar yang telah diinjeksi LPS Aa dan yang telah diberi perlakuan maupun yang tidak diberi perlakuan ekstrak teh hijau yang dilihat pada hari ke 37. Osteoklas memiliki ciri-ciri yaitu sel berinti banyak (multinukleus) dan pipih yang

berada di daerah cekungan dangkal ( Howship's lacunae ) pada permukaan tulang, berwarna merah dengan inti berwarna hitam apabila dibuat preparat atau sediaan mikroskopis dengan pengecatan HE (*Harrus Hematoxyllin – Eosin*) dan dilihat pada 5 lapang pandang dengan menggunakan mikroskop elektrik Olympus CX35 dengan perbesaran 400x.

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Ethical Clearence**

Penelitian diawali dengan pengurusan *ethical clearence* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

##### **4.7.2 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba**

Tikus putih (*Rattus novergicus*) galur wistar jantan ditimbang menggunakan neraca analitik. Hewan coba kemudian diaklimatisasi selama satu minggu. Tikus dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bak plastik bersih berukuran 40x30x20 cm dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Hewan coba dipelihara dengan suhu ruangan 18°C - 27°C , ventilasi kandang terjaga dengan baik. Satu kandang berisi 1 ekor tikus. Setiap hari dilakukan penggantian sekam, pemberian minum dengan air matang (15-30 ml/hari), dan pemberian makan dengan pellet (10%-15% dari berat badannya/hari).

##### **4.7.3 Persiapan Bahan Perlakuan**

Bahan yang dipakai pada kelompok perlakuan terdiri dari LPS Aa sebagai induksi periodontitis sehingga dan ekstrak teh hijau.

#### 4.7.4 Pengenceran Sediaan LPS Aa

1. Membeli LPS Aa dengan sediaan yang sudah jadi
2. Pembuatan stok LPS Aa didapat dengan cara 1 mg LPS dilarutkan dalam 1 ml aquadest
3. LPS Aa dikemas dalam wadah tertutup dan disimpan dalam suhu ruang
4. Bila LPS Aa akan digunakan maka LPS Aa akan diencerkan dengan PBS dengan dosis 5  $\mu\text{g}$  LPS Aa dalam 3  $\mu\text{l}$  PBS

#### 4.7.5 Pembuatan ekstrak teh hijau

Membeli daun kering teh hijau yang telah jadi. Daun kering teh hijau sebanyak 200 gram direndam dengan pelarut etanol 96% dan didiamkan selama 2-3 hari serta ditutup dengan menggunakan alumunium foil untuk menjaga agar tidak terjadi penguapan dan hasil ekstrak yang diperoleh akan lebih baik. Proses ini disebut sebagai tahap maserasi. Rendaman daun kering teh hijau diperas dengan menggunakan kertas saring. Prosedur selanjutnya, hasil saringan daun teh hijau diekstrak menggunakan rotavapor dengan suhu 50°C selama 4 jam yang berguna untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak teh hijau. Lalu ekstrak teh hijau dilarutkan ke dalam DMSO (*dimetil sulfoksida*) agar ekstrak dapat diinjeksikan kedalam gingiva.

#### 4.7.6 Pembagian Kelompok Hewan Coba

1. Kelompok K- : Kelompok kontrol negatif yaitu hewan coba yang tidak diberi perlakuan apapun

2. Kelompok K+ : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba yang diinduksi LPS Aa sebanyak 50 $\mu$ l dengan dosis 5  $\mu$ g/3  $\mu$ l selama 20 hari dengan interval 2 hari sekali.
3. Kelompok P1 : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba yang diinduksi LPS Aa sebanyak 50 $\mu$ l dengan dosis 5  $\mu$ g/3  $\mu$ l selama 20 hari dengan interval 2 hari sekali dan diberi injeksi ekstrak teh hijau dengan dosis 150 mg / 100 gram BB per hari selama 16 hari
4. Kelompok P2 : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba diinduksi LPS Aa sebanyak 50 $\mu$ l dengan dosis 5  $\mu$ g/3  $\mu$ l selama 20 hari dengan interval 2 hari sekali dan diberi injeksi ekstrak teh hijau dengan dosis 200 mg / 100 gram BB per hari selama 16 hari

#### 4.7.7 Prosedur Perlakuan

##### 4.7.7.1 Pembiusan Hewan Coba

Hewan coba sebelum diberi perlakuan, dilakukan pembiusan dengan menggunakan Ketamin (KTM 100). Dosis yang diberikan adalah 80 mg/kg berat badan yang disuntikkan pada daerah kaki belakang sebelah kanan di muskulus quadriceps atau triceps.

##### 4.7.7.2 Aplikasi Bahan Perlakuan

Kedalaman sulkus gingiva sehat diukur dengan melakukan *Probing* untuk mengetahui gambaran klinis gingiva sehat pada tikus strain putih jantan. *Dental probe* dimasukkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian mesiolabial. Injeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi LPS Aa. LPS disuntikkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian mesiolabial dengan dosis 5  $\mu$ g/3  $\mu$ l PBS menggunakan jarum 25 G

sebanyak 50 µl, diberikan selama 20 hari dengan interval 2 hari sekali. Gigi insisif pertama dipilih karena gigi tersebut berada di bagian depan dan *visible* sehingga secara teknik mudah untuk melakukan perlakuan.

Kedalaman sulkus gingiva setelah diinduksi LPS *A.a* diukur kembali dengan melakukan *Probing* untuk mengetahui gambaran klinis gingiva periodotitis pada tikus strain putih jantan. *Dental probe* dimasukkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian mesiolabial

Pemberian ekstrak teh hijau bertujuan untuk menginduksi mekanisme perbaikan tulang alveolar yang telah mengalami kerusakan terlebih dahulu. Pemberian ekstrak teh hijau dilakukan pada hari ke-21 setelah dilakukan induksi LPS *Aa* selama 20 hari menggunakan jarum 25G. Kelompok perlakuan dibagi dalam tiga kelompok, yaitu: kelompok K+, kelompok P1 dengan dosis 150 mg / 100 gr BB, dan kelompok P2 dengan dosis 200 mg / 100 gr BB. Perlakuan dilakukan setiap hari sampai hari ke-36 dengan teknik injeksi pada daerah yang sama dengan injeksi LPS *Aa* (Shen *et al*, 2009).

Kedalaman sulkus gingiva setelah pemberian ekstrak teh hijau diukur dengan melakukan *Probing* untuk mengetahui gambaran klinis gingiva yang mengalami regenerasi pada tikus strain putih jantan. *Dental Probe* dimasukkan pada sulkus gingiva gigi insisif pertama kanan rahang bawah bagian mesiolabial.

#### 4.7.7.3 Pembedahan Tulang Alveolar Mandibula

Pembedahan dilakukan pada hari ke-37. Hewan coba diberi anastesi total ketamin (80 mg/kg BB) lalu tulang alveolar mandibula

dipotong. Setelah perlakuan, tubuh hewan coba yang tersisa dibersihkan dan dilakukan aseptik dengan alkohol 70% dan dikubur dengan kedalaman 1 meter. Potongan mandibula kemudian diawetkan menggunakan formalin 10% dan EDTA 10% untuk mendekalsifikasi tulang.

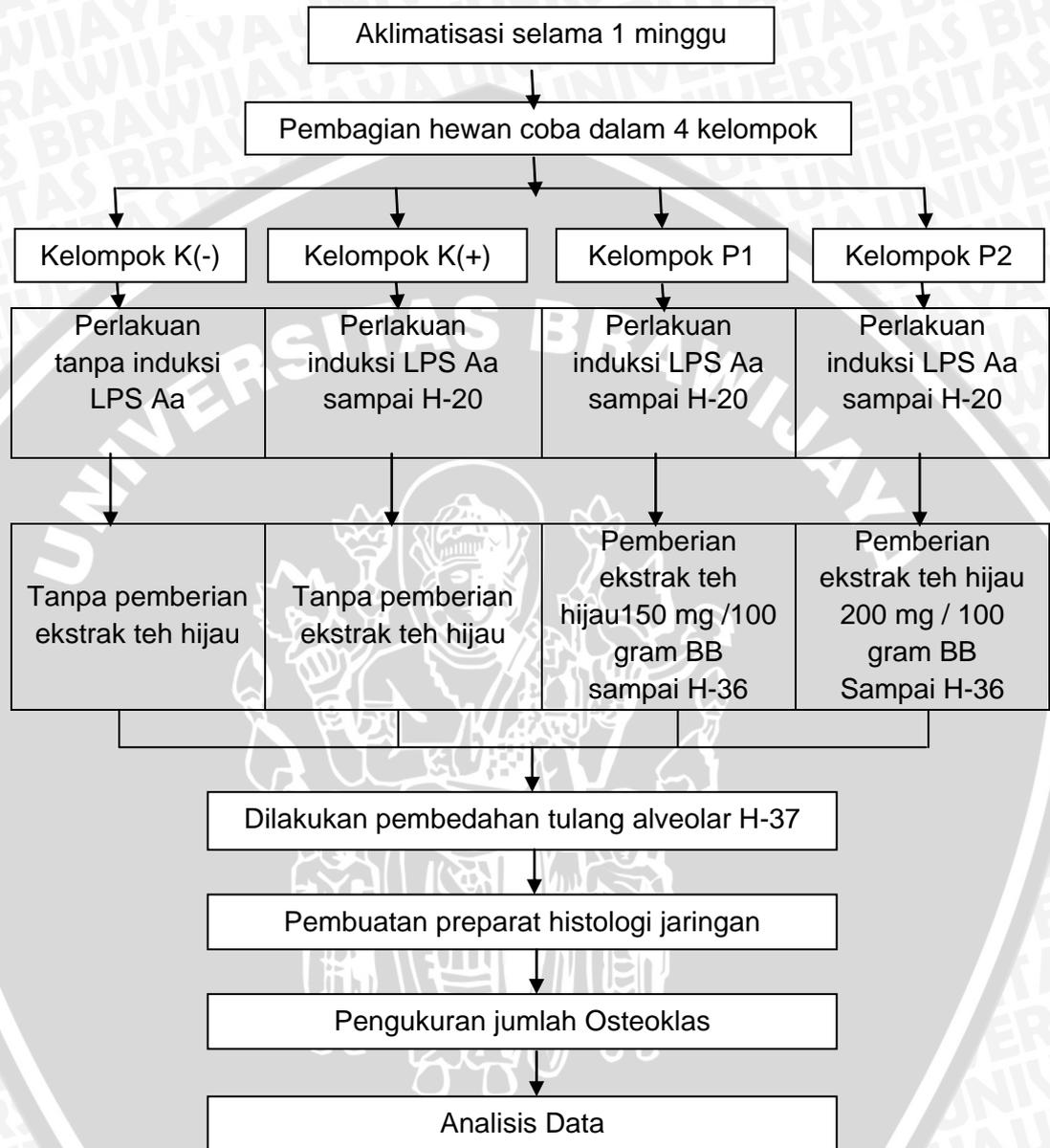
#### 4.7.7.4 Pembuatan Blok Parafin

Jaringan dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut) masing-masing 60 menit. Langkah selanjutnya adalah dilakukan *clearing* dengan xilol dua kali masing-masing 60 menit, kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. *Block* dalam parafin keras dibuat pada cetakan dan didiamkan sehari, lalu blok parafin ditempelkan pada penjepit dan dilakukan pemotongan setebal 4  $\mu\text{m}$  dengan *rotary microtome* dengan pengecatan HE (*Harrus Hematoxyllin – Eosin*) kemudian dilekatkan pada *object glass* ber polylisin (PDL). Pada pemeriksaan histopatologi anatomi, sediaan diperiksa dibawah mikroskop dengan lapangan besar (400x) kemudian menghitung sel osteoklas dari lima *slide* dari masing-masing ulangan.

#### 4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Hasil pengukuran hewan coba kontrol maupun perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 17,0 *for Windows 7* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p=0,05$ ) dan taraf kepercayaan 0,95% ( $\alpha=0,05$ ). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-Way ANOVA*, *Post Hoc Test*, dan uji korelasi *Pearson*.

4.1 Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian