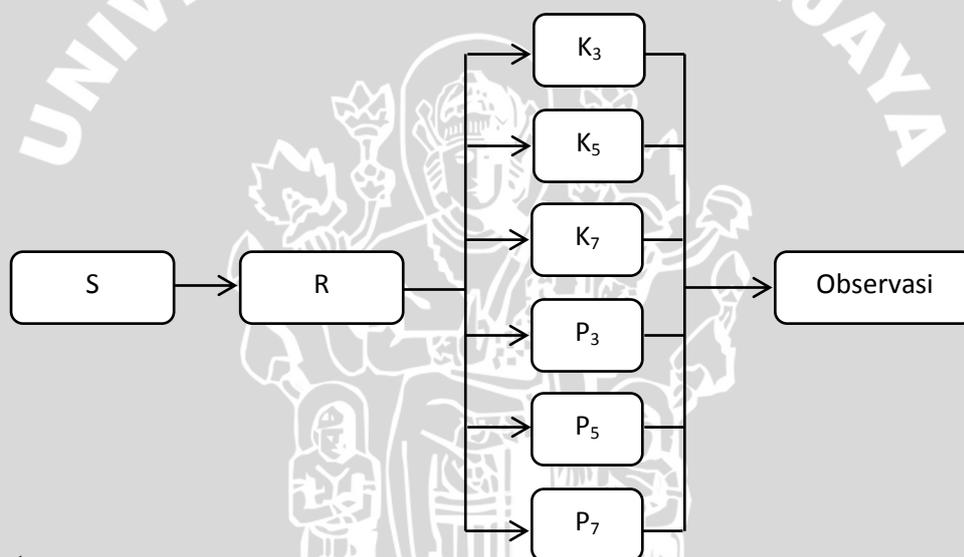


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (Notoatmodjo, 2002). Desain penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana subyek dibagi menjadi 6 kelompok secara random (Tjokronegoro dkk, 2004)



Keterangan:

- S : Sampel penelitian yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- R : Sampel dipilih secara random pada pembagian 6 kelompok
- K3: Kelompok kontrol 3 adalah kelompok tanpa pemberian lendir bekicot pasca ekstraksi gigi pada hari ketiga
- K5: Kelompok kontrol 5 adalah kelompok tanpa pemberian lendir bekicot pasca ekstraksi gigi pada hari kelima
- K7: Kelompok kontrol 7 adalah kelompok tanpa pemberian lendir bekicot pasca ekstraksi gigi pada hari ketujuh
- P3: Kelompok perlakuan 3 adalah kelompok yang akan diberikan lendir bekicot pasca ekstraksi gigi pada pagi dan sore setiap hari pada hari ketiga
- P5: Kelompok perlakuan 5 adalah kelompok yang akan diberikan lendir bekicot pasca ekstraksi gigi pada pagi dan sore setiap hari pada hari kelima
- P7: Kelompok perlakuan 7 adalah kelompok yang akan diberikan lendir

bekicot pasca ekstraksi gigi pada pagi dan sore setiap hari pada hari ketujuh

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Jenis sampel penelitian

Sampel penelitian ini adalah hewan percobaan berupa tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur wistar jantan yang dipelihara di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Tikus putih (*Rattus Norvegicus*) dipilih sebagai populasi karena merupakan hewan coba yang tergolong jinak, mudah perawatannya, dan fungsi metabolismenya mirip dengan manusia.

4.2.2 Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria inklusi sampel penelitian yang digunakan yaitu:

1. Jenis kelamin jantan
2. Berat badan tikus putih 200-350 gram
3. Usia 2-3 Bulan
4. Keadaan umum tikus putih sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih dan bewarna putih mengkilap
5. Diadaptasikan 7 hari

Kriteria eksklusi sampel penelitian yang digunakan, yaitu:

1. Tikus putih yang selama penelitian tidak mau makan
2. Berat badan kurang dari 200 gram
3. Tikus putih tidak sehat
4. Tikus putih mati selama penelitian

4.2.3 Jumlah Sampel Penelitian

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap 6 kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Federer (Notoadmodjo, 2005), yaitu :

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

Keterangan :

n = jumlah pengulangan penelitian

t = jumlah kelompok

Oleh karena itu, perhitungan menjadi :

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

$$(n - 1) (6 - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi, jumlah sampel minimum yang digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Penelitian ini menggunakan 4 ekor tikus putih dengan 1 ekor tikus putih cadangan pada setiap kelompok yang akan didekaputasi dan diambil sampel rahang setelah hari ke tiga, ke lima dan ke ketujuh.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas atau Independen

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lendir bekicot (*Achatina fulica*)

4.3.2 Variabel Terikat atau Dependen

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah pembuluh darah pada luka soket gigi pasca ekstraksi gigi

4.3.3 Variabel Terkendali

- a. Kriteria Hewan Coba
- b. Teknik ekstraksi gigi hewan coba
- c. Pemilihan dan pengambilan lendir bekicot
- d. Jumlah sampel bahan percobaan yang dimasukkan kedalam soket gigi tikus putih pasca ekstraksi gigi
- e. Pengambilan preparat jaringan

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan ke-1 sampai bulan ke-3 penelitian pada tahun 2016

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Enam buah box plastik berukuran 15x30x42 cm³ yang diisi 5 ekor tikus putih. Dengan kawat kassa sebagai tutup box, sekam sebagai dasar boks dan tempat minum hewan coba

4.5.2 Alat Penimbang Berat Badan Tikus Putih

Neraca Chaus (Sartorius)

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi

Pinset, pinset sirugis, lecron modifikasi, *needle holder* modifikasi, ekskavator, sonde setengah lingkaran, *blade* dan *blade holder*, anastesi (ketamin 40mg/kgBB), *disposable syringe* insulin 1ml, kapas dan kassa

4.5.4 Alat dan Bahan Perlakuan

Tikus putih (*Rattus Novegicus*) jantan, lendir bekicot (*Achantina fulica*), pakan hewan coba, cotton buds, masker dan sarung tangan

4.5.5 Alat dan Bahan Pengambilan Jaringan dan Pembuatan Preparat

Blade no. 11, pinset, tabung fiksasi berlabel, gelas ukur, object glass dan deck glass, cover glass, counter, mikroskop cahaya, mikroskop Olympus photo slide BX51 dengan kamera DP71 12 Megapixel, alkohol 70%, 80%, 95% dan 96%, albumin, zenker, formalin 10%, decalcification agent (EDTA 14%), HCL 5%, amonium oksalat 1%, xylol, parafin, alat cek parafin, water-bath, pewarna Hematoksilin dan Eosin, air, aquades, balsam Kanada, Ether chloride, asam format 50%, rotari mikrotom

4.6 Definisi Operasional

1. Lendir Bekicot

Lendir bekicot yang diambil dari cangkang dengan cara memecah ujung cangkang menggunakan pisau dan bekicot dibalik agar lendir bekicot menetes kemudian ditampung pada tabung plastik steril. Bekicot diperoleh dari salah satu peternak di kecamatan selopuro, kabupaten blitar dan diidentifikasi di jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Tidak ada kriteria khusus tentang umur dan berat bekicot yang digunakan (Cooling, 2005).

2. Jumlah Pembuluh Darah

Jumlah pembuluh darah didapatkan dengan menghitung jumlah pembuluh darah kapiler pada preparat yang diambil dari soket gigi insisivus kiri bawah tikus putih pasca ekstraksi dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin menggunakan mikroskop elektrik Olympus CX10 dengan perbesaran 400x. Pada pewarnaan Hematoksin-Eosin, pembuluh darah akan tampak sebagai bulatan berbatas jelas terlihat inti sel endotel di tepi berwarna ungu, lumen berwarna putih, dan bagian tengahnya tampak butiran berwarna merah yaitu eritrosit (Olsen *et al.*, 1997).

3. Luka Ekstraksi Gigi

Luka yang didapatkan pasca ekstraksi gigi insisivus satu kiri bawah dengan menggunakan lecron dan needle holder modifikasi maka seluruh jaringan gigi harus terambil, bila terdapat sisa jaringan gigi akan menimbulkan infeksi (Fitriani, 2011).

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 Pengambilan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Lendir bekicot didapatkan langsung dari peternak bekicot, bekicot dibersihkan dengan air mengalir kemudian ditempatkan dalam kotak plastic (75 x 40 x 30 cm) selama 3 hari untuk mencegah kontaminasi material biologikal. Lendir bekicot dihasilkan dari glandula podal yang terletak pada otot perut

bekicot. Pengambilan lendir dilakukan setiap hari untuk menjaga kesegaran bahan lendir saat aplikasi lendir ke dalam soket gigi.

Lendir dapat dikumpulkan dengan stimulasi manual glandula podal bekicot kemudian memecahkan ujung cangkang lendir bekicot menggunakan pisau kemudian bekicot dibalik agar lendirnya menetes dan ditampung dalam tabung plastik steril (Purnasari dkk, 2012).

4.7.3 Persiapan Hewan Coba

- a. Tikus putih diadaptasikan dalam kandang kurang lebih selama 1 minggu pada temperatur konstan (20-25°C) dengan 12 jam siklus terang gelap untuk proses aklimitasi. Tikus putih dipelihara dalam box plastik berukuran 15x30x42 cm³ yang ditutup dengan kawat kassa dengan dasar sekam yang diganti setiap minggu. Selama proses tersebut, dijaga agar kebutuhan makanan dan air minum tetap terpenuhi dengan diet normal terdiri dari 67% *Comfeed* PAR-S 33% terigu dan air secukupnya (Anwari, 2003)
- b. Tikus putih dipuasakan selama 12-18 sebelum perlakuan ekstraksi gigi, namun air minum tetap diberikan (Parveen *et al.*, 2007)
- c. Berat badan tiap tikus putih ditimbang dan dibagi menjadi 6 kelompok secara acak dengan jumlah masing-masing kelompok adalah 4 ekor kemudian berat tikus putih ditimbang lagi sebelum dilakukan ekstraksi gigi, dimana berat badan yang dibutuhkan adalah 200-350 gram

4.7.4 Perlakuan Tindakan Ekstraksi Gigi pada Hewan Coba

Ekstraksi gigi tikus putih dilakukan pada insisivus satu kiri mandibula dikarenakan lebih mempermudah operator dalam memberi perlakuan pada tikus putih. Sebelum dilakukan ekstraksi, dilakukan anastesi secara anastesi intramuscular dengan ketamin 40mg/kgBB, lalu dilakukan ekstraksi gigi dengan arah

sejajar dengan soket giginya secara hati-hati untuk meminimalkan resiko patahnya gigi tikus putih. Ekstraksi gigi dilakukan dengan lecron dan needle holder modifikasi. (Fitriani, 2011)

4.7.5 Perawatan Pasca Ekstraksi Gigi

Pemberian makan dilakukan dengan mengencerkan makanan dan dilakukan dengan cara sondasi lambung tanpa melewati mulut untuk mencegah gangguan penyembuhan pada soket gigi. Pemberian makan dilakukan 2 kali sehari setiap pagi dan sore hari.

4.7.6 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok 1: Kelompok Kontrol (K3) yaitu kelompok hewan coba dilakukan ekstraksi gigi tanpa pemberian lendir bekicot pasca ekstraksi gigi selama tiga hari.

Kelompok 2: Kelompok Kontrol (K5) yaitu kelompok hewan coba dilakukan ekstraksi gigi tanpa pemberian lendir bekicot pasca ekstraksi gigi selama lima hari.

Kelompok 3: Kelompok Kontrol (K7) yaitu kelompok hewan coba dilakukan ekstraksi gigi tanpa pemberian lendir bekicot pasca ekstraksi gigi selama tujuh hari.

Kelompok 4: Kelompok Perlakuan (P3) yaitu kelompok hewan coba dilakukan ekstraksi gigi dengan pemberian lendir bekicot pada pagi hari dan sore hari setiap hari pasca ekstraksi gigi selama tiga hari.

Kelompok 5: Kelompok Perlakuan (P5) yaitu kelompok hewan coba dilakukan ekstraksi gigi dengan pemberian lendir bekicot pada pagi hari dan sore hari setiap hari pasca ekstraksi gigi selama lima hari.

Kelompok 6: Kelompok Perlakuan (P7) yaitu kelompok hewan coba dilakukan ekstraksi gigi dengan pemberian lendir bekicot pada pagi hari dan sore hari setiap hari pasca ekstraksi gigi selama tujuh hari.

4.7.7 Pembuatan Preparat untuk Pengamatan Histologi

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-4, 6, dan 8 untuk melihat jumlah pembuluh darah di jaringan granulasi soket gigi hewan coba, dilakukan anestesi pada tikus putih masing-masing kelompok perlakuan dengan menggunakan inhalasi eter dosis lethal dengan cara yang sama dengan proses anestesi. Sebelum diambil rahang bawahnya, dilakukan pengecekan pada kematian tikus putih dengan cara melihat aspirasinya. Apabila sudah tidak ada aktivitas respirasi, maka dilakukan pengambilan rahang bawah menggunakan *scalpel* dengan *blade* no.11 dimana terdapat soket bekas ekstraksi gigi sebelumnya. Rahang bawah kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan formalin 10% untuk fiksasi jaringan dan diberi label. Jasad tikus putih kemudian dikuburkan dalam tanah dengan kedalaman 40 cm dibawah tanah dengan bantuan tenaga ahli dari laboratorium terkait.

4.7.8 Teknik Pemrosesan Jaringan

- a. Dilakukan proses dekalsifikasi dengan cara direndam dalam larutan EDTA 14%. Proses dekalsifikasi ini dilakukan selama 30 hari untuk menunggu jaringan tulang mandibula menjadi lunak dan dapat dipotong kecil. Larutan dekalsifikasi ini harus diganti setiap hari untuk mendapatkan hasil yang baik. Setelah proses dekalsifikasi selesai, maka dilakukan pencucian pada air mengalir selama 3-8 jam untuk menghilangkan sisa dari bahan dekalsifikasi.

- b. Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, clearing, dan impregnasi dengan cara mencelupkan jaringan kedalam larutan seperti tabel dibawah ini sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin	2 jam	Clearing
2	Alkohol 70%	1 jam	Dehidrasi
3	Alkohol 80%	2 jam	Dehidrasi
4	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi
5	Alkohol 96% + Prusi	2 jam	Dehidrasi
6	Alkohol 96% + Prusi	1 jam	Dehidrasi
7	Alkohol 96% + Prusi	2 jam	Dehidrasi
8	Xylol	1 jam	Clearing
9	Xylol	2 jam	Clearing
10	Xylol	2 jam	Clearing
11	Parafin cair (58-60°C)	2 jam	Impregnasi
12	Parafin cair (58-60°C)	2 jam	Impregnasi

Tabel 4.1 Tabel Proses Fiksasi, Dehidrasi, Clearing, dan Impregnasi

Catatan :

- o Dehidrasi dengan konsentrasi alkohol yang meningkat sampai kadar alkohol mencapai 96%. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 70% selama 1 jam, 80% selama 2 jam, 95% selama 2 jam, dan 96% selama 5 jam.
- o Masukkan jaringan dalam xylol (clearing) sebanyak 3 kali pada 3 tabung yang berbeda dengan ketentuan waktu 1 jam, 2 jam, dan 3 jam.

4.7.9 Penanaman Dalam Paraffin (Embedding) dan Penyayatan Jaringan

Melakukan *embedding* dan penyayatan jaringan dengan mikrotom dengan cara :

- a. Alat cetak yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca. Alat dan alas diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dan kaca dengan blok paraffin yang sudah beku.

- b. Paraffin cair ditempatkan dalam dua wadah yaitu untuk bahan *embedding* dan paraffin sebagai media penyesuaian temperatur yang akan ditanam.
- c. Paraffin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak hingga penuh permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.
- d. Pembuatan preparat jaringan dengan pemotongan blok paraffin menggunakan rotary mikrotom.
- e. Bila paraffin sudah cukup keras, alat cetak dilepaskan dan blok paraffin diberi label dan siap disayat.
- f. Blok paraffin ditempatkan pada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan sampai suhu kamar agar tidak melekat erat.
- g. Pisau mikrotom dipasang pada pegangannya, membentuk sudut 5° - 10° . Pisau harus tajam dan permukaannya harus benar-benar rata.
- h. *Water-bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air dibawah titik leleh paraffin ($\pm 48^{\circ}\text{C}$).
- i. Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis yaitu 5 mikron.
- j. Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan kedalam *water-bath* agar sayatan jaringan mengembang dengan baik.
- k. Potongan yang sudah diseleksi dipindahkan pada object glass yang telah diolesi dengan egg albumin atau polisin sebagai bahan perekatnya yang sudah diberi label lalu sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu optimum ($58 - 60^{\circ}\text{C}$) selama 30 menit.

4.7.10 Pengecatan Preparat Jaringan

Menurut Ross (1985) dan Hammersen (1993) pengecatan preparat jaringan dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Deparaffinisasi dengan menggunakan xylol.
- b. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 2 menit.
- c. Memasukkan kembali ke dalam xylol II dalam wadah yang berbeda selama 2 menit.
- d. Dilakukan dehidrasi dengan larutan alkohol 96%, 95% dan 80% masing-masing selama 1 menit.
- e. Preparat dibilas dengan air mengalir selama 3-5 menit, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat dengan tujuan menghilangkan semua kelebihan alkohol.
- f. Preparat diwarnai dengan zat warna *Hematoxilin Mayer's* selama 15 menit.
- g. Dibilas kembali di bawah air mengalir selama 5 menit.
- h. Preparat direndam eosin selama 15 detik sampai 2 menit.
- i. Dilakukan dehidrasi kembali dengan larutan alkohol konsentrasi meningkat 95% dan 96% masing-masing 2 menit sebanyak 2 kali dengan wadah yang berbeda (bak I dan II).
- j. Setelah melalui alkohol absolut, preparat dipindahkan ke xylol.
- k. *Mounting*.
- l. Beri setetes medium Entellan yang mempunyai indeks refraksi hampir sama dengan indeks refraksi kaca pada sediaan hapus. Kemudian sediaan itu ditutup dengan kaca penutup dan dibiarkan mengering.

4.7.11 Penghitungan Jumlah Pembuluh Darah pada Luka Ekstraksi Gigi

Penghitungan jumlah pembuluh darah dilakukan dalam 10 lapangan pandang dengan perbesaran mikroskop binokuler sebesar 400x. Persentase percepatan penyembuhan luka dilihat melalui peningkatan jumlah pembuluh darah kapiler yang didapatkan dari perbandingan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang dilihat pada hari ketiga, kelima dan ketujuh.

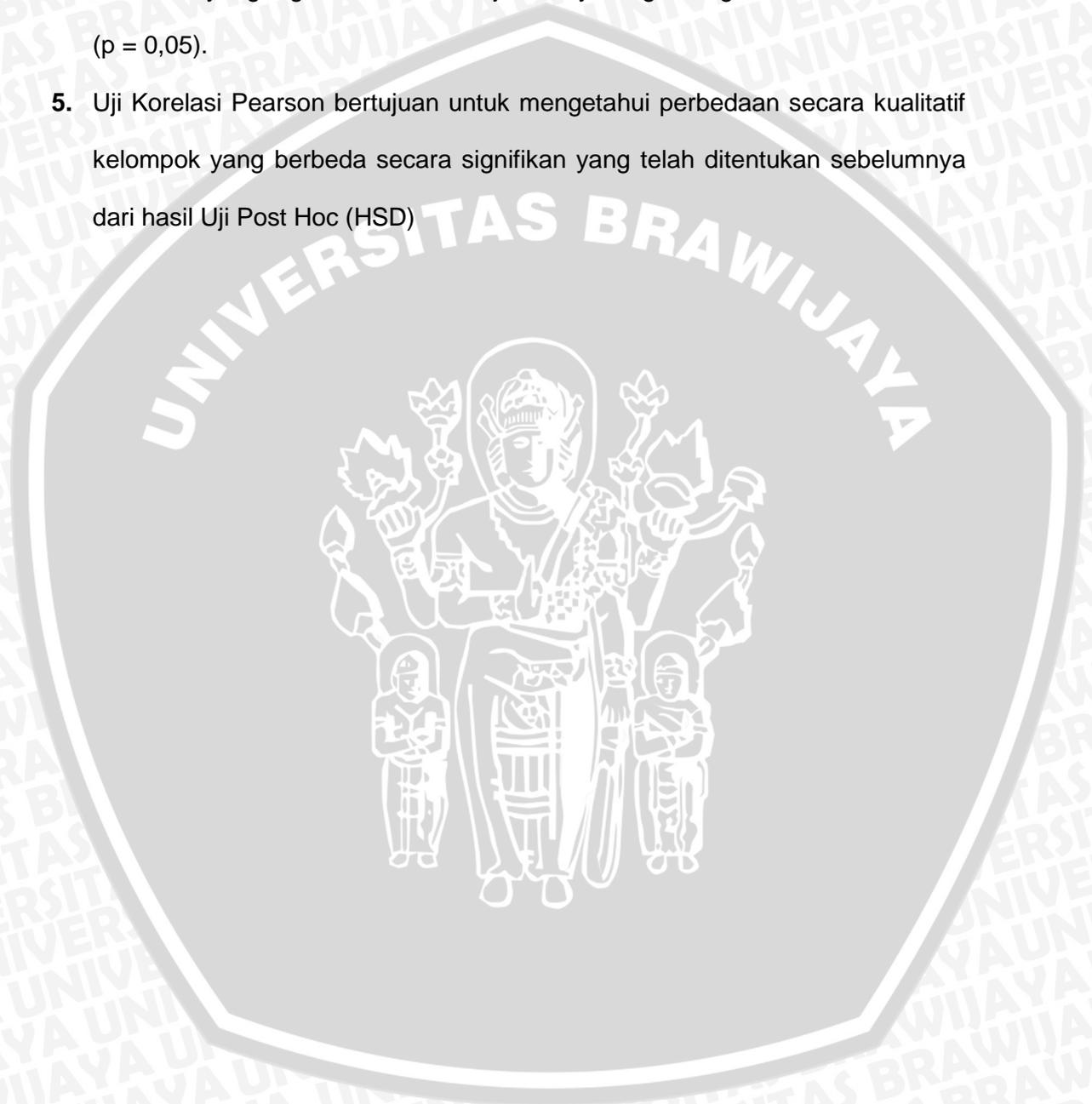
4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah neokapiler pada tikus putih kontrol dan tikus putih perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan program komputerisasi dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) serta taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). (Notoatmodjo, 2002)

Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut :

1. Uji normalitas data bertujuan untuk menginterpretasikan apakah data memiliki sebaran normal atau tidak karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis bergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Untuk uji hipotesis jika persebaran data normal maka dilakukan uji parametrik sedangkan jika persebaran data tidak normal dilakukan uji nonparametrik.
2. Uji homogenitas varian bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Apabila varian homogen maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji One-Way ANOVA bertujuan membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.

4. Post Hoc Tes (Uji *Least Significant Difference*) bertujuan mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji Turkey dengan tingkat kemaknaan 95% ($p = 0,05$).
5. Uji Korelasi Pearson bertujuan untuk mengetahui perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil Uji Post Hoc (HSD)



4.9 Alur Penelitian

