

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*.

## 4.2 Populasi dan Sampel

## 4.2.1 Populasi

Sampel penelitian adalah model tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah sebagai berikut (Federer):

$(t-1)(n-1) \geq 15$  dengan  $t$ : jumlah perlakuan,  $n$ : jumlah ulangan. Pada penelitian ini  $t = 5$  sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 3,75$$

Jumlah pengulangan 5 kali setiap kelompok. Pada penelitian ini, terdapat kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang bertujuan untuk membuat homogen sampel penelitian yang akan digunakan. Hal tersebut dikarenakan homogenitas sampel penelitian merupakan syarat yang digunakan pada penelitian eksperimental untuk mencegah terjadinya bias. Berikut ini merupakan kriteria inklusi dan eksklusi sampel penelitian yang digunakan:

Kriteria inklusi:

1. Tikus strain *Rattus norvegicus* jantan
2. Tikus berwarna bulu putih, sehat dan bergerak aktif
3. Umur 6-7 minggu
4. Berat rata-rata 150-250 gram

Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

#### 4.2.2 Besar Sampel

Pada penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan.

**Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan**

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Negatif (K -)	Ekstraksi dan tidak diberi perlakuan
Kontrol Positif (K +)	Ekstraksi dan luka dijahit
Kelompok Perlakuan 1 (P1)	Ekstraksi, dijahit, DELFI 15 hz tiap 20 menit selama 10 hari
Kelompok Perlakuan 2 (P2)	Ekstraksi, dijahit, DELFI 45 hz tiap 20 menit selama 10 hari
Kelompok Perlakuan 3 (P3)	Ekstraksi, dijahit, DELFI 75 hz tiap 20 menit selama 10 hari

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

- Variabel bebas dalam penelitian ini adalah frekuensi DELFI 15 Hz, 45 Hz, dan 75 Hz.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

- Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah pembuluh darah.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Elektronik Fakultas Teknik Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Biomedik Unair. Penelitian ini dilakukan selama 4 bulan.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1. Alat dan bahan untuk adaptasi tikus sebagai hewan coba

###### 4.5.1.1 Alat untuk adaptasi tikus sebagai hewan coba

1. Kandang tikus
2. Tempat minum
3. Timbangan
4. Baskom
5. Pengaduk
6. Gelas ukur
7. Sikat pembersih kandang
8. Tutup kandang terbuat dari anyaman kawat
9. Neraca *sartorius*

###### 4.5.1.2 Bahan untuk adaptasi tikus sebagai hewan coba

1. Terigu
2. Air
3. Sekam

##### 4.5.2. Alat dan Bahan Pembiusan Tikus

###### 4.5.2.1 Alat Pembiusan Tikus

1. Syringe
2. Kapas
3. Pinset

#### 4.5.2.2 Bahan pembiusan tikus

1. Povidon Iodine
2. Ketamin (65 mg/kg berat badan)

#### 4.5.3 Alat dan bahan tindakan ekstraksi gigi insisivus kiri bawah

##### 4.5.3.1 Alat tindakan ekstraksi gigi insisivus kiri bawah

1. Klem yang telah dimodifikasi khusus untuk ekstraksi gigi insisivus tikus,
2. Pinset kecil dengan ujung bengkok
3. Lecron yang dimodifikasi sebagai bein
4. Needle holder untuk penjahitan soket
5. Gunting bedah
6. Sonde
7. Meja operasi kecil
8. *Handscon*
9. Masker
10. Suture

##### 4.5.3.2 Bahan tindakan ekstraksi

1. Kapas
2. Kassa
3. Benang jahit

#### 4.5.4 Alat dan Bahan Terapi DELFI

##### 4.5.5.1 Alat piranti DELFI

1. Kawat 20 meter

2. *Blauk* H 2 spin
3. Gulung kawat lilitan
4. Transistor
5. Monitor
6. *Header*

#### 4.5.5 Alat dan bahan pembedahan rahang tikus

##### 4.5.6.1 Alat pembedahan rahang tikus

1. Gunting bedah
2. Pinset
3. Botol organ
4. Tali kenur
5. Tabel nama

##### 4.5.6.2 Bahan pembedahan rahang tikus

1. *Ether*
2. Alkohol 10%
3. 10% *neutral buffered formalin* untuk memfiksasi jaringan
4. 10% *EDTA* untuk mendekalsifikasi rahang tikus.

#### 4.5.6 Alat dan bahan pembuatan preparat dengan pewarnaan HE

##### 4.5.7.1 Alat pembuatan preparat

1. Mikrotom
2. *Beaker Glass* 250 ml
3. Kuas
4. *Obyek Glass*
5. Inkubator
6. *Hot Plate* 38-40°C

7. Wadah
8. Rak Untuk Pewarnaan
9. Pipet
10. Cover Glass

#### 4.5.6.2 Bahan pembuatan preparat dengan pewarnaan HE

1. Xylo
2. Hematoksilin
3. Eosin
4. Alkohol Absolut
5. Alkohol 90 %
6. Alkohol 80 %
7. HCl 0,6%
8. Lithium Carbonat 0,5%
9. Entellan / Canada Balsem

#### 4.5.6.3 Alat Pemeriksaan sedian histopatologi

1. Mikroskop kamera DP 40
2. Program Scanning Dot OlyVia

### 4.6 Prosedur Penelitian

#### 4.6.1 Perakitan DELFI

Perakitan piranti DELFI bekerjasama dengan mahasiswa elektro.

Persiapan alat dan bahan perakitan. Komponen DELFI terdiri dari *waveform generator*, amplifier, coil A, coil B dan pengukuran gelombang menggunakan oscilloscope.

#### 4.6.2 Perawatan Tikus sebagai Hewan Coba

Tikus *Rattus norvegicus* jantan diadaptasi di laboratorium farmako selama 1 minggu. Tikus *Rattus norvegicus* dipelihara pada kandang yang terbuat dari bak plastik. Tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Tikus diberi makan setiap hari dan penggantian sekam setiap minggunya.

#### 4.6.3 Ekstraksi Gigi Hewan Coba

1. Tikus ditimbang menggunakan timbangan lalu dicatat berat badan tikus. Tikus dianestesi dengan ketamin dengan dosis 60 mg/kgBB dalam syringe 1 ml secara *intrapitoneal*. Setelah teranestesi dengan sempurna, dilakukan aseptis pada daerah ekstraksi.
2. Ekstraksi gigi insisif rahang bawah kiri tikus dilakukan dengan menggunakan klem yang dimodifikasi khusus dengan cara menggoyang gigi tersebut memakai lecron yang dimodifikasi sebagai bein. Setelah digoyang, gigi dijepit dengan klem dan diekstraksi. Gigi yang dikeluarkan harus utuh (Zulkifli *et al*, 2010)
3. Tikus diinjeksi novalgin sebanyak 20 ml untuk mengurangi rasa sakit setelah ekstraksi dan meminimalisir terjadinya stres pada tikus.

#### 4.6.4 Perlakuan Terapi DELFI

1. Hewan coba di tempatkan pada wadah baskom.
2. Setelah itu di radiasi gelombang elektromagnetik dengan frekuensi 15 Hz, 45 Hz, dan 75 Hz. Pemaparan dilakukan selama 20 menit per hari selama seminggu

#### 4.6.5 Pembedahan Rahang Bawah

1. Tiap kelompok tikus dibedah pada hari ke-10 untuk diambil sampel jaringan. Pemilihan interval waktu berdasarkan tahap penyembuhan luka menurut Sjamsuhidajat *et al* (2003).
2. Tikus dianestesi total *ether*. Setelah tikus dalam kondisi tidak sadar lalu dilakukan pembedahan mandibula tikus yang sudah diberi perlakuan. Mandibula diambil menggunakan gunting bedah dan klem.
3. Mandibula direndam dalam larutan formalin 10%. Perendaman jaringan keras gigi berfungsi agar jaringan keras gigi terfiksasi. Rahang yang telah diambil direndam dalam 10% *neutral buffered formalin* pada botol organ minimal selama 18-24 jam.

#### 4.6.6 Pembuatan Preparat

1. Jaringan mandibula dilunakkan dalam cairan EDTA 10% (dekalsifikasi) pada suhu kamar dengan cairan diganti tiap hari. Kelunakan jaringan dites dengan menusuk dengan jarum.
2. Tahap selanjutnya adalah sediaan preparat di blok parafin dengan pengecatan HE (Sudiana, 2004).

#### 4.6.7 Pewarnaan Preparat dengan Pengecatan *Hematoksin-Eosin*

1. Dilakukan *dehidrasi* dengan merendam pada alkohol bertingkat.
2. Dilakukan *clearing* dengan xylol
3. Dilakukan *infiltrasi* dengan *parafin*
4. Dilakukan *blocking* dengan *parafin* cair dingin
5. Dilakukan pemotongan blok *parafin* dengan menggunakan *mikrotom*



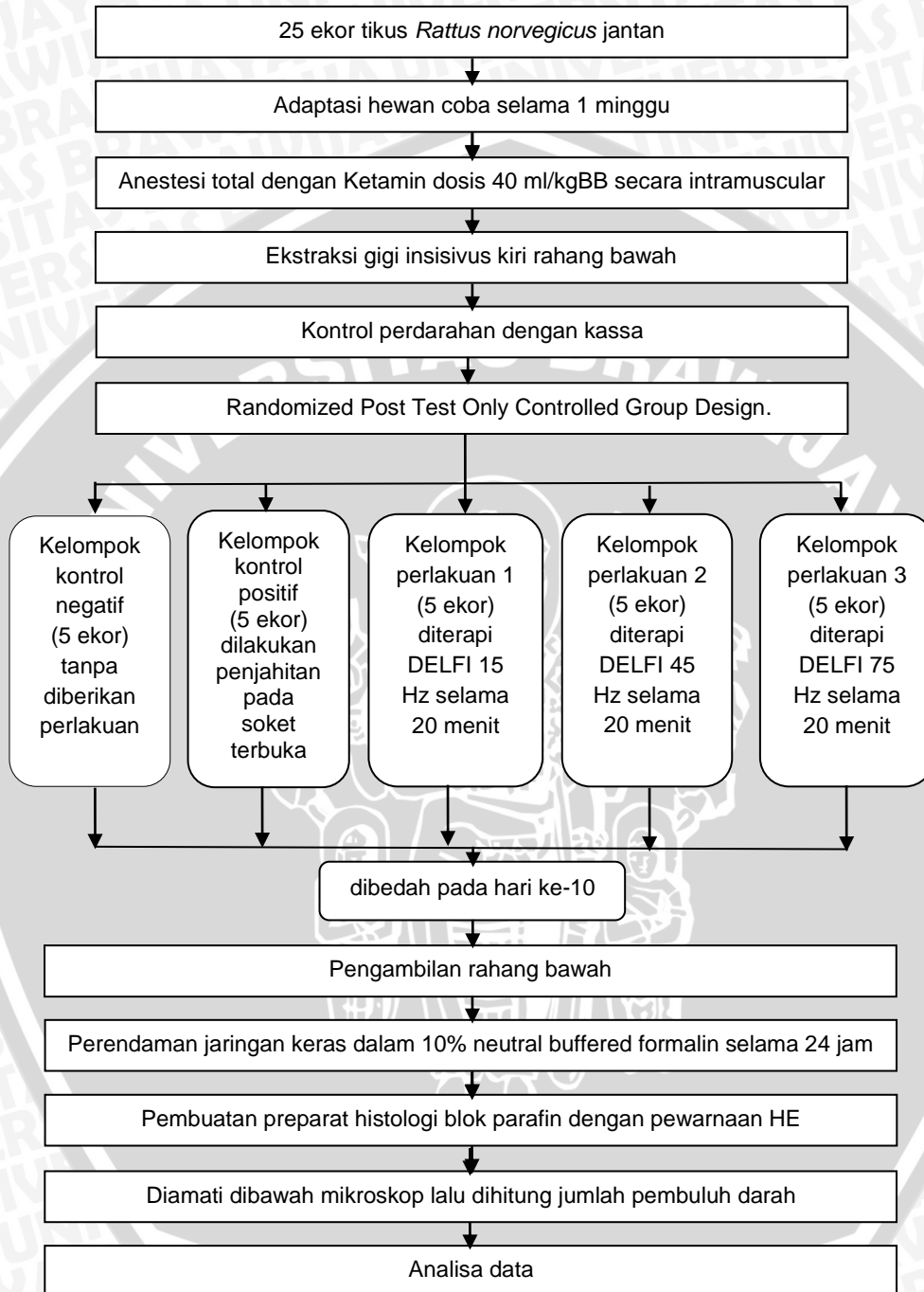
6. Hasil sayatan blok *parafin* dipasang pada gelas obyek, dan kemudian dilakukan *deparafinasi*
7. Jaringan yang telah dipotong diletakkan di atas gelas obyek.
8. Dilakukan *rehidrasi* dengan alkohol bertingkat
9. Tetesi dengan *Harris Hematoksilin*
10. Cuci dengan alkohol bertingkat
11. Tetesi dengan *Eosin*
12. Cuci dengan alkohol bertingkat
13. Bilas dengan *aquades* kemudian keringkan.
14. Bilas dengan air mengalir kemudian keringkan
15. Tetesi dengan *entelan* dan tutup dengan *coverslip* (Arieska, 2010)

Pemeriksaan histologi normal menggunakan jaringan dengan potongan tipis sebesar 6 mikron yang telah diwarnai agar dapat memperlihatkan kontras yang tinggi dan ditempatkan dibawah kaca penutup (Sudiana, 2004).

#### 4.7 Definisi Operasional

1. Ekstraksi gigi merupakan pengambilan gigi insisivus kiri rahang bawah dari soket tikus *Rattus norvegicus* jantan.
2. Jumlah pembuluh darah merupakan perhitungan jumlah pembuluh darah kapiler yang merupakan tanda-tanda angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru).
3. DELFI merupakan terapi medan elektromagnetik yang digunakan untuk penyembuhan luka pada soket terbuka pasca ekstraksi gigi insisivus tikus *Rattus norvegicus* jantan.

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

## 4.8 Pengumpulan Data dan Analisis Data

### 4.8.1 Prosedur Pengumpulan Data

Data jumlah sel angiogenesis pada tahap proliferasi penyembuhan luka dihitung pada pemeriksaan lima lapang pandang dengan menggunakan scanning microscope (program *dot slide OlyVIA Olympus*) menggunakan pembesaran 400 kali.

### 4.8.2 Teknik Analisis Data

Uji *one way Anova* untuk menguji secara statistik apakah ada perbedaan yang bermakna pada pengamatan setiap variable berdasarkan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dan waktu pengamatan maka data yang normal dan varian homogen dianalisis. Jika salah satu data tidak normal atau varian tidak homogen atau keduanya, menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Untuk mengetahui arah dan kekuatan hubungan antar variabel menggunakan uji korelasi-regresi. Uji *korelasi Pearson* digunakan jika data berdistribusi normal dan jika data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji *korelasi Spearman*. Uji *Post Hoc Multiple Comparison* Analisis mengenai perbedaan jumlah dari kelima kelompok. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey*. Pada uji *Post Hoc Tukey*, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi  $p < 0,05$  serta pada interval kepercayaan 95% (IK 95%). Uji *Korelasi Pearson* digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval/parametrik (Dahlan, 2006).