

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian ini 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 Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemeliharaan dilakukan dalam kandang yang bersih. Sampel penelitian dipilih berdasarkan kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Jantan
- b. Usia 3–5 bulan
- c. Berat badan 200-500 gram
- d. Sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan mengkilap.

Kriteria eksklusi sebagai berikut :

- a. Tikus yang sudah pernah digunakan sebagai sampel penelitian.
- b. Tikus yang kondisi fisiknya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Menurut Supranto (2000) perhitungan besarnya pengulangan pada penelitian eksperimental untuk rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial secara sederhana dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

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

t = jumlah perlakuan, n = jumlah ulangan

Pada penelitian ini t = 5 sehingga jumlah pengulangan adalah:

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Jadi didapatkan jumlah pengulangan ini adalah sebanyak 5 kali atau lebih. Sehingga dibutuhkan sampel penelitian sebanyak 25 ekor tikus *Rattus norvegicus*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

1. Kelompok Kontrol Negatif

Setelah dilakukan ekstraksi, soket terbuka dibiarkan tanpa dilakukan perawatan.

2. Kelompok Kontrol Positif

Setelah dilakukan ekstraksi, dilakukan penjahitan pada soket.

3. Kelompok Perlakuan 1

Setelah dilakukan ekstraksi dilakukan pemaparan PEMF dengan frekuensi 15 hz selama 20 menit perhari selama 10 hari.

4. Kelompok Perlakuan 2

Setelah dilakukan ekstraksi dilakukan pemaparan PEMF dengan frekuensi 45 hz selama 20 menit perhari selama 10 hari.

5. Kelompok Perlakuan 3

Setelah dilakukan ekstraksi dilakukan pemaparan PEMF dengan frekuensi 75 hz selama 20 menit perhari selama 10 hari.

4.3.2 Variabel Terikat

Jumlah pertumbuhan sel fibroblas pada soket.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Elektronika Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Adaptasi Tikus

4.5.1.1 Alat untuk Adaptasi Tikus

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

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 Tikus

4.5.3.1 Alat Tindakan Ekstraksi

1. Klem yang telah dimodifikasi khusus untuk ekstraksi gigi insisif 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. Jarum jahit bedah

4.5.3.2 Bahan Tindakan Ekstraksi

1. Kapas

2. Kassa
3. Benang jahit

4.5.4 Alat dan Bahan Terapi PEMF

1. Mikrokontroler ATMEGA AVR 16
2. *Amplifer*
3. *Power supply*
4. *Transistor*
5. Koil tembaga
6. Monitor

4.5.5 Alat dan Bahan Pembedahan Rahang Tikus

4.5.5.1 Alat Pembedahan Rahang Tikus

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

4.5.5.2 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

4.5.6.1 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

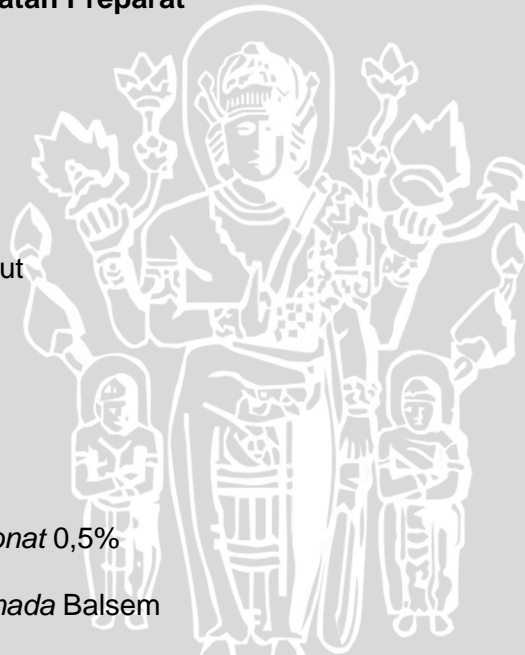
1. *Xylol*
2. *Hematoksilin*
3. *Eosin*
4. Alkohol Absolut
5. Alkohol 90 %
6. Alkohol 80 %
7. HCl 0,6%
8. *Lithium Carbonat 0,5%*
9. *Entellan / Canada Balsem*

4.5.6.3 Alat Pemeriksaan Sediaan Histologi

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

4.6 Definisi Operasional

- a. PEMF



PEMF adalah terapi menggunakan medan elektromagnetik terpulsa dengan frekuensi yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan, yaitu sebesar 15 Hz; 45 Hz; dan 75Hz.

b. Jumlah sel fibroblas

Jumlah sel fibroblas merupakan penghitungan jumlah sel fibroblas yang tampak pada daerah soket paska pencabutan yang merupakan tanda-tanda penyembuhan luka.

c. Ekstraksi gigi

merupakan pengambilan gigi insisivus kiri rahang bawah dari soket tikus *Rattus norvegicus*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba akan diseleksi berdasarkan kriteria inklusi maupun eksklusi. Setelah itu hewan coba akan dibagi secara random ke dalam 5 kelompok, dimana masing masing kelompok berisi 7 hewan coba.

4.7.2 Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba akan diadaptasikan dalam laboratorium selama 1 minggu pada kondisi suhu 22-24 °C di dalam kandang pemeliharaan yang terbuat dari bak plastik, kandang ditutup dengan kawat kasa dan diberikan sekam yang diganti tiap minggu selama adaptasi dan 3 hari sekali setelah pencabutan. Pemberian minum dan makan setiap hari.

4.7.3 Pencabutan Gigi Hewan Coba

Tikus ditimbang. Tikus dianestesi dengan ketamin dengan dosis 60 mg/kgBB dalam *syringe* 1 ml secara intraperitoneal. Setelah teranestesi dengan sempurna, dilakukan aseptis pada daerah pencabutan.

Pencabutan gigi insisif rahang bawah kiri tikus dilakukan dengan menggunakan klem yang dimodifikasi khusus setelah sebelumnya dilakukan pemotongan jaringan ligamen periodontal untuk memudahkan pencabutan. Setelah itu gigi dijepit dengan klem dan diekstraksi. Gigi yang dikeluarkan harus utuh. Setelah itu pada kelompok kontrol positif dilakukan penjahitan.

4.7.4 Perlakuan Terapi PEMF

Setelah pencabutan, hewan coba di tempatkan pada wadah. Kumputan dari alat PEMF akan diletakkan di tengah wadah agar radiasi dari gelombang elektromagnetik tersebar merata pada tikus. Setelah itu di radiasi gelombang elektromagnetik dengan frekuensi sebesar 15 Hz; 45 Hz; dan 75 Hz. Pemaparan dilakukan selama 20 menit per hari selama 10 hari.

4.7.5 Pembedahan Rahang

Tiap kelompok tikus dibedah pada hari ke-10 untuk diambil sampel jaringan. Pemilihan interval waktu berdasarkan tahap penyembuhan luka. Tikus diletakkan dalam tabung kaca dan diberi eter. Kemudian mandibula diambil dan direndam dalam larutan formalin 10%.

4.7.6 Pembuatan Preparat

Jaringan mandibular dilunakkan dalam cairan EDTA 10% (dekalsifikasi) selama 30 hari pada suhu kamar dengan cairan diganti tiap hari. Kelunakan jaringan dites dengan menusuk dengan jarum. Tahap selanjutnya adalah pembuatan blok paraffin, pemotongan dengan *microtome* dan pembuatan slide preparat (Sudiana, 2004).

4.7.7 Pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE)

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). Slide preparat yang sudah jadi diwarnai dengan menggunakan metode pewarnaan HE.

4.8 Pengumpulan Data dan Analisis Data

4.8.1 Prosedur Pengumpulan Data

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

4.8.2 Teknik Analisis Data

Untuk menguji secara statistik apakah ada perbedaan yang bermakna pada pengamatan setiap variabel berdasarkan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dan waktu pengamatan maka data yang normal dan varian homogen dianalisis dengan menggunakan uji *one way Anova*. 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.

4.9 Alur Penelitian

