

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

4.2.2 Sampel Penelitian

4.2.2.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah tikus strain wistar jantan yang diberi perlakuan induksi periodontitis menggunakan LPS *P. gingivalis* sesuai kelompoknya selama 28 hari dan 60 hari, kemudian dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel darah dari jantung dan dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total.

Kriteria inklusi:

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

Kriteria eksklusi:

1. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan.
2. Tikus yang kondisinya sakit atau mati selama penelitian berjalan (Nugraha et al, 2014)

4.2.2.2 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 = jumlah kelompok = 3 ; n = jumlah sampel

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

$$(n-1)(2) \geq 15 =$$

$$(n-1) \geq 15/2 =$$

$$n \geq 17/2 = 8,5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 3 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 9 (pembulatan 8,5) kali dalam setiap kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 27 ekor hewan coba.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Lama paparan lipopolisakarida (LPS) *Phorpyromonas gingivalis* sebagai induksi periodontitis.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar kolesterol total

4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah :

- Kriteria hewan coba
- Makanan dan minuman yang diberikan
- Cara menginduksi LPS *P.gingivalis*

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada bulan September–desember 2015.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- Tikus wistar jantan
- LPS *P.gingivalis*

- c. Larutan *phosphate buffer saline* (PBS)
- d. Ketamin
- e. Larutan standar
- f. Reagen
- g. Air
- h. Minuman dan makanan standar tikus wistar

4.5.2 Alat Penelitian

- a. Kandang dan tempat minum tikus wistar
- b. Spuit 1 ml, 3 ml, dan 5 ml untuk anestesi dan pengambilan sampel darah
- c. Jarum insulin 30G
- d. Alat bedah minor
- e. Mikro pipet
- f. Tabung reaksi
- g. Alat sentrifuge
- h. Rak tabung reaksi
- i. Tabung endorf
- j. Neraca analitik
- k. Spektrofotometer

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Induksi Periodontitis

Suatu cara untuk meginduksi hewan coba menjadi periodontitis dengan menginjeksi LPS *Phorpyromonas gingivalis* secara intrasulkular.

4.6.2 Spektrofotometer

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dari serum darah dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet (Penuntun Pratikum Biokimia,2014)

4.6.3 Kadar Kolesterol Total

Serum darah hewan coba yang diambil dari jantung. Setelah didapatkan nilai absorbansi serum darah dari alat spektrfotometer maka nilai absorbansi tersebut dimasukan dalam rumus :

$$\text{Kadar kolesterol total} = \frac{As}{Ast} \times \text{kadar standart (200mg/dL)}$$

Keterangan : As = absorbansi sampel rata – rata $\{(As_1 + As_2)/2\}$

Ast = absorbansi standart

(Penuntun Pratikum Biokimia,2014)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ethical Clearence

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

4.7.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus wistar jantan diukur berat badannya menggunakan neraca analitik. Hewan coba kemudian diadaptasi selama satu minggu kemudian dimasukkan dalam kandang berukuran 30x20 cm, setiap kandang berisi satu tikus dan diberikan makanan serta minuman setiap harinya (Nugraha et al ,2014).

4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok 1 : Kelompok kontrol yaitu hewan coba yang tidak diberi perlakuan induksi periodontitis sama sekali selama 28 hari.

Kelompok 2 : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba diinduksi LPS *P.gingivalis* sebanyak 0,02 ml dengan dosis 5µg/0,05 ml selama 28 hari dengan interval 3 kali seminggu.

Kelompok 3 : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba diinduksi LPS *P.gingivalis* sebanyak 0,02 ml dengan dosis 5µg/0,05 ml selama 60 hari dengan interval 3 kali seminggu.

4.7.4 Persiapan Bahan Perlakuan

Bahan yang dipakai pada kelompok perlakuan terdiri dari LPS *P. gingivalis* sebagai induksi periodontitis yang akan menghasilkan kerusakan pada jaringan periodontal (Nugraha et al,2014)

4.7.4.1 Pembuatan Sediaan LPS

1. Membeli LPS dengan sediaan yang sudah jadi.
2. Pembuatan stok LPS didapat dengan cara 10 µg LPS dalam 2 ml PBS dengan perbandingan LPS dan PBS 1:9
3. LPS dikemas dalam wadah tertutup dan dibagi kedalam mikrotube sebanyak 0,054 ml sehingga memudahkan peneliti untuk memberikan dosis LPS saat dilakukan injeksi pada hewan coba

4.7.5 Prosedur Perlakuan

4.7.5.1 Pembiusan Hewan Coba

Hewan coba sebelum diberi perlakuan, dilakukan pembiusan dengan menggunakan ketamine (KTM 100) dengan dosis yang diberikan adalah 80mg/kg berat badan yang disuntikkan pada daerah kaki belakang sebelah kanan di muskulus quadriceps atau tricep (Faisah, 2012).

4.7.5.2 Injeksi Bahan Perlakuan

Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi LPS *P. gingivalis*. LPS diinjeksikan secara intrasulkuler pada sulkus gingiva gigi insisivus pertama kanan RB bagian labial dengan dosis 5µg/0,05 ml PBS menggunakan jarum insulin 30G

sebanyak 0,02 ml, diberikan 3 kali seminggu. Kelompok sampel dibagi menjadi 3 yaitu kelompok negatif dan kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 yang diinduksi periodontitis selama 28 dan 60 hari (Nugraha et al ,2014)

4.7.5.3 Pengambilan Darah Hewan Coba

Sebelum dilakukan pengambilan darah, hewan coba didislokasi leher terlebih dahulu serta dilakukan pembedahan. Pengambilan darah dilakukan melalui jantung dengan menggunakan spuit sebanyak 3-5 ml. Untuk mendapatkan serumnya, sampel darah yang sudah diambil akan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa menggunakan antikoagulan. Tabung reaksi didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 15 menit. Serum didapat diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung ependorf untuk pengukuran kadar LDL dan HDL serta kolesterol total (Megasari, 2009).

4.7.5.4 Pemeriksaan kadar kolesterol total

Pengukuran kadar kolesterol total menggunakan alat spektrofotometer , nilai absorbansi akan dikonversikan untuk mendapatkan kadar kolesterol total dalam darah (Penuntun Pratikum Biokimia,2014).

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Hasil pengukuran hewan coba kontrol maupun perlakuan dilakukan uji normalitas dengan *kolmogorov smirnov test* dan uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka analisis data yang digunakan adalah uji One Way digunakan untuk mengetahui perbedaan kadar HDL

dan LDL antara kontrol negatif dengan perlakuan saat diinjeksi LPS *Phorpyromonas gingivalis* sebagai induksi periodontitis. Apabila data terdistribusi tidak normal atau tidak homogen maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan One Way Anova atau uji *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*.

Selanjutnya dilakukan uji korelasi-regresi untuk mengetahui kekuatan hubungan antara lama paparan LPS *Phorpyromonas gingivalis* sebagai induksi periodontitis terhadap kadar HDL dan LDL. Jika data terdistribusi normal dilakukan uji korelasi *Pearson*, dan jika data terdistribusi tidak normal dilakukan uji *Spearman*.



4.9 Alur Penelitian

