

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Populasi dan Sampel**4.2.1 Populasi Penelitian**

Populasi penelitian adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

4.2.2 Sampel Penelitian**4.2.2.1 Kriteria Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah hewan model tikus strain wistar jantan yang diberi perlakuan induksi periodontitis menggunakan LPS *P. gingivalis* sesuai kelompoknya selama 28 hari dan 60 hari, selanjutnya dibedah untuk pengambilan sampel darah dari jantung untuk dilakukan pemeriksaan kadar LDL dan HDL.

Kriteria inklusi:

1. Tikus wistar jantan 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.

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

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

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

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

$n \geq 17/2 = 8,5$ dibulatkan menjadi 9

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama paparan LPS *Phorpyromonas gingivalis* sebagai induksi periodontitis.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar LDL dan HDL.

4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah :

- a. Kriteria hewan coba
- b. Makanan dan minuman yang diberikan
- c. 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 Oktober - Desember 2015.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- a. Tikus wistar jantan
- b. LPS *P.gingivalis*
- c. Larutan *phosphate buffer saline* (PBS)
- d. Ketamin (80 mg/kgBB)
- 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 *ependorf*
- j. Neraca analitik
- k. Spektrofotometer

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Induksi Periodontitis

Suatu cara untuk menginduksi hewan coba menjadi periodontitis dengan menginjeksi LPS *Phorpyromonas gingivalis* secara intrasulkular (ke arah sulkus gingiva) pada 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 (Nugraha *dkk.*, 2014).

4.6.2 Kadar LDL

Kadar LDL (*low density lipoprotein*) serum darah hewan coba yang diambil dari jantung dan diukur menggunakan rumus *Friedwald* yaitu kadar LDL = Kolesterol total - (HDL+1/5 Trigliserida).

4.6.3 Kadar HDL

Kadar HDL (*high density lipoprotein*) serum darah hewan coba yang diambil dari jantung dan diukur menggunakan alat spektrofotometer (Megasari, 2009).

4.6.4 Spektrofotometer

Alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet.

4.6.5 Pemeriksaan Periodontitis

Pemeriksaan periodontitis dilakukan dengan menggunakan pemeriksaan klinis dan pemeriksaan poket periodontal dengan menggunakan probe periodontal.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ethical Clearance

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

4.7.2 Persiapan dan Perawatan Hewan Coba

Tikus wistar jantan ditimbang menggunakan neraca analitik. Hewan coba kemudian diaklimatisasi selama satu minggu. Tikus dipelihara dalam kandang yang terbuat dari bak plastik bersih berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 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 2 ekor tikus. Setiap hari dilakukan penggantian sekam, pemberian minum dengan air mineral (15-30 ml/hari), dan pemberian makan dengan pellet (10%-15% dari berat badannya/hari) (Sudrajat, 2008).

4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok 1 : Kelompok kontrol yaitu hewan coba yang tidak diberi perlakuan induksi periodontitis sama sekali selama 28 hari dan akan dilakukan pemeriksaan klinis gingiva dan pengukuran kedalaman poket periodontal.

Kelompok 2 : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba diinduksi LPS *P.gingivalis* sebanyak 0,02 ml dengan dosis 5 μ g/0,05 ml selama 28 hari dengan interval 3 kali seminggu dan akan dilakukan pemeriksaan periodontitis dengan pemeriksaan klinis gingiva dan pengukuran kedalaman poket periodontal.

Kelompok 3 : Kelompok perlakuan yaitu hewan coba diinduksi LPS *P.gingivalis* sebanyak 0,02 ml dengan dosis 5 μ g/0,05 ml selama 60 hari dengan interval 3 kali seminggu dan akan dilakukan pemeriksaan periodontitis dengan pemeriksaan klinis gingiva dan pengukuran kedalaman poket periodontal.

4.7.4 Persiapan Bahan Perlakuan

Bahan yang dipakai pada kelompok perlakuan terdiri dari LPS *P.gingivalis* sebagai induksi periodontitis sehingga menghasilkan kerusakan pada jaringan periodontal.

4.7.4.1 Pembuatan Sediaan LPS

1. Membeli LPS-PG Ultrapure 1mg dengan sediaan yang sudah jadi.
2. Pembuatan stok LPS didapat dengan cara mengencerkan 1 mg LPS dalam 9 ml PBS menghasilkan dosis 5 μ g/0,05 ml PBS.
3. Kemudian LPS dikemas dalam mikrotube, untuk menghindari LPS terkontaminasi maka satu mikrotube untuk satu kali induksi, sehingga dibutuhkan 24 mikrotube. 12 mikrotube berisi LPS sebanyak 0,02 ml x 18 tikus untuk induksi 28 hari, 12 mikrotube lainnya berisi LPS sebanyak

0,02 ml x 9 tikus untuk induksi 60 hari. Setelah itu sediaan disimpan dalam -20°C dan dapat bertahan selama 6 bulan.

4.7.5 Prosedur Perlakuan

4.7.5.1 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* (Faisah, 2012).

4.7.5.2 Injeksi Bahan Perlakuan

Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi LPS *P. gingivalis*. LPS disuntikkan 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 perlakuan dibagi menjadi 2 yaitu kelompok perlakuan yang diinduksi periodontitis selama 28 hari dan kelompok perlakuan yang diinduksi periodontitis selama 60 hari. (Nugraha *dkk.*, 2014)

4.7.5.3 Pengambilan Darah Hewan Coba

Sebelum dilakukan pengambilan darah, hewan coba diukur kedalaman poket periodontalnya menggunakan probe periodontal. Lalu hewan coba dikorbankan terlebih dahulu dengan menggunakan eter 10 % dosis letal dan kemudian akan dilakukan pembedahan (Zulfitri, 2013). Dilakukan pengambilan darah secara *intracardial* dengan menggunakan spuit sebanyak 3-5 ml. Untuk mendapatkan serumnya, sampel darah yang sudah diambil dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa menggunakan antikoagulan. Tabung reaksi dидiamkan

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 (Megasari, 2009), setelah proses pengambilan darah selesai jasad tikus yang sudah dikorbankan dikubur secara bersamaan dalam tanah dengan kedalaman 40 cm dengan dibantu oleh tenaga ahli dari laboratorium terkait.

4.7.5.4 Pemeriksaan kadar LDL dan HDL

Pengukuran kadar HDL menggunakan alat spektrofotometer. Pengukuran kadar LDL dilakukan dengan menggunakan rumus Friedwald yaitu kadar LDL = Kolesterol total - (HDL+1/5 Trigliserida) (Marks *et al.*, 2000).

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Hasil pengukuran hewan coba kontrol maupun perlakuan dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk test* dan uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka analisis data yang digunakan adalah uji One Way Anova digunakan untuk mengetahui pengaruh lama paparan LPS *Phorpyromonas gingivalis* sebagai induksi periodontitis terhadap perbedaan kadar LDL dan HDL antara kontrol negatif dengan perlakuan. 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 LDL dan HDL. Jika data terdistribusi normal dilakukan uji korelasi *Pearson*, dan jika data terdistribusi tidak normal dilakukan uji *Spearman*.



4.9 Alur Penelitian

