

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) in vivo dengan metode *Randomized Posttest Only Controlled Group Design*. (Notoadmodjo, 2005), dimana setiap hewan coba memiliki probabilitas yang sama untuk mendapatkan perlakuan, sehingga dapat menjaga validitas generalisasi ke populasi.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*), berbadan sehat, jenis kelamin jantan, berat badan 200-250 gram, dan usia 3-4 bulan (dewasa).

Pemilihan ini didasarkan pada alasan bahwa:

1. *Rattus norvegicus* strain wistar ini secara anatomis dan fisiologis mirip dengan manusia
2. Tikus berumur dewasa karena aterosklerosis sering terjadi pada pasien yang berumur dewasa (Nissen, 2005)
3. Tikus putih jantan galur wistar dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil
4. Berat badan tikus yang biasa digunakan sebagai hewan coba rata-rata pada usia tersebut adalah 200 - 250 gram.

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 karena berdasarkan penelitian Nugraha dkk, lamanya paparan LPS 28 hari tidak menunjukkan perubahan HDL yang signifikan (Nugraha, *et al.*, 2014). Menurut Paquette dkk, perubahan HDL secara signifikan dalam 60 hari (Paquette, *et al.*, 2007). Setelah induksi periodontitis maka dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel darah dari jantung untuk dilakukan pemeriksaan kadar Trigliserida.

Kriteria Inklusi :

- Jenis kelamin jantan.
- Usia 3-4 bulan.
- Berat badan 200 - 250 gram.
- Sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, dan bulu yang tebal dan berwarna putih mengkilap.

Kriteria Eksklusi :

- Tikus yang mengalami infeksi selama penelitian berlangsung.
- Tikus yang selama penelitian mengalami penurunan berat badan secara drastis.
- Tikus yang mati selama penelitian berlangsung.

4.2.2.2 Besar Sampel Penelitian

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan pada tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Federer (Nazir, 2005).

$$(n-1)(t-1) \geq 15 : \text{dengan } t = \text{jumlah kelompok} = 3 : n = \text{jumlah sampel}$$

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

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

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

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

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 Triglicerida darah.

4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah :

- Kriteria hewan coba
- Makanan dan minuman yang diberikan

- c. Cara menginduksi LPS *P.gingivalis*
- d. Dosis 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 sampai Desember 2015.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- a. Tikus wistar jantan
- b. LPS *P.gingivalis* Ultrapure (Catalog # tlr1-ppglps 1 mg)
- c. Larutan phosphate buffer saline (PBS)
- d. Larutan standar
- e. Reagen
- f. Air
- g. Minuman dan makanan standar tikus

4.5.2 Alat Penelitian

- a. Kandang dan tempat minum tikus wistar
- b. Spuit 1ml, 3 ml, dan 5 ml untuk anestesi dan pengambilan sampel darah
- c. Jarum insulin 30 G
- d. Alat bedah minor
- e. Mikro pipet

- f. Tabung reaksi
- g. Rak tabung reaksi
- h. Alat Sentrifuge
- i. Tabung ependrof
- j. Neraca Analitik
- k. Spektrofotometer
- l. Probe Periodontal

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Induksi Periodontitis

Suatu cara untuk menginduksi hewan coba menjadi periodontitis dengan meletakkan LPS *Phorpyromonas gingivalis* pada sekitar sulkus gingiva hewan coba.

4.6.2 Kadar Trigliserida

Kadar Trigliserida serum darah diukur secara enzimatik dengan spektrofotometer, skala rasio, dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Trigliserida} = \frac{As}{As_t} \times \text{Kadar Standard (200 mg/dL)}$$

Keterangan: As = Absorbansi sampel rata-rata $\{(As_t + As)/2\}$

As_t = Absorbansi standart

Ambang batas kadar Trigliserida dalam darah sebagai berikut (Budi, 2011):

- Kadar normal : maksimal 150mg/dl
- Kadar ambang batas tinggi : antara 151-250 mg/dl
- Kadar Trigliserida tinggi : 251-400 mg/dl
- Kadar Trigliserida amat tinggi : 401mg/dl atau lebih

4.6.3 Spektrofotometer

Alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet (Caprette, 2005).

4.6.4 Pemeriksaan Periodontitis

Pemeriksaan periodontitis dilakukan pada hari ke 29 dan 61 dengan cara pemeriksaan klinis berupa kemerahan, pembengkakan, dan perdarahan saat probing dan pemeriksaan kedalaman poket periodontal menggunakan alat probe periodontal.

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 ditimbang menggunakan neraca analitik. Hewan coba kemudian diadaptasi selama satu minggu lalu dimasukkan dalam kandang berukuran 30x20 cm, setiap kandang berisi satu tikus.

4.7.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Kelompok 1 : Kelompok kontrol yaitu hewan coba yang tidak diberi perlakuan

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.

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.

4.7.4 Persiapan Bahan Perlakuan

Bahan yang dipakai pada kelompok perlakuan terdiri dari LPS *P.gingivalis* Ultrapure (Catalog # tlr1-ppglps) produksi InvivoGen sebagai induktor periodontitis sehingga menghasilkan kerusakan pada jaringan periodontal.

4.7.5 Pembuatan Sediaan LPS

1. Membeli LPS-PG Ultrapure dengan sediaan yang sudah jadi di laboratorium fisiologi sebanyak 1 mg.
2. Pembuatan stok LPS didapat dengan cara mencampurkan 10 μ g LPS dalam 2 ml PBS pada tabung reaksi.
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.

4.7.6 Prosedur Perlakuan

4.7.6.1 Injeksi Bahan Perlakuan

Infeksi pada jaringan periodontal dilakukan dengan induksi LPS *P. gingivalis*. Induksi LPS *P. gingivalis* tanpa pembiusan terlebih dahulu karena reaksi hewan coba selama induksi tidak berlebihan dan terlihat nyaman. LPS ditempatkan pada sekitar sulkus gingiva gigi insisivus pertama kanan RB bagian labial dengan dosis 5µg/0,05 ml PBS seperti penelitian yang dilakukan oleh Nugraha dkk. Induksi menggunakan jarum insulin 30G sebanyak 0,02 ml, diberikan 3 kali seminggu (Nugraha, *et al.*, 2014). Kelompok perlakuan dibagi menjadi 2 yaitu kelompok perlakuan yang diinduksi periodontitis selama 28 hari dan kelompok perlakuan yang diinduksi periodontitis selama 60 hari (Stashenko *et al.*, 2007).

4.7.6.2 Pengambilan Darah Hewan Coba

Sebelum hewan coba dikorbankan, dilakukan pemeriksaan periodontitis terlebih dahulu kemudian hewan coba dikorbankan menggunakan eter dosis lethal. Setelah hewan coba dinyatakan mati, maka dilanjutkan pada proses pembedahan. Pengambilan darah dilakukan melalui jantung (*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 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 Trigliserida (Megasari, 2009).

4.7.6.3 Pemeriksaan kadar Trigliserida

Pemeriksaan kadar trigliserida dimulai dengan membuat 3 jenis campuran yaitu larutan pereaksi, sampel dengan larutan pereaksi, dan larutan standar dengan larutan pereaksi. Setelah homogen dan didiamkan selama 20 menit dapat langsung dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Setiap akan mengukur sampel atau standart, spektrofotometer harus di nol dahulu dengan blangko (Martoharsono, 2000). Hasil dari spektrofotometer dimasukkan kedalam rumus:

$$\text{Kadar Trigliserida} = \frac{A_s}{A_t} \times \text{Kadar Standard (200 mg/dL)}$$

Keterangan: A_s = Absorbansi sampel rata-rata $\{(A_{s1} + A_s)/2\}$

A_t = Absorbansi standart

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisa Data

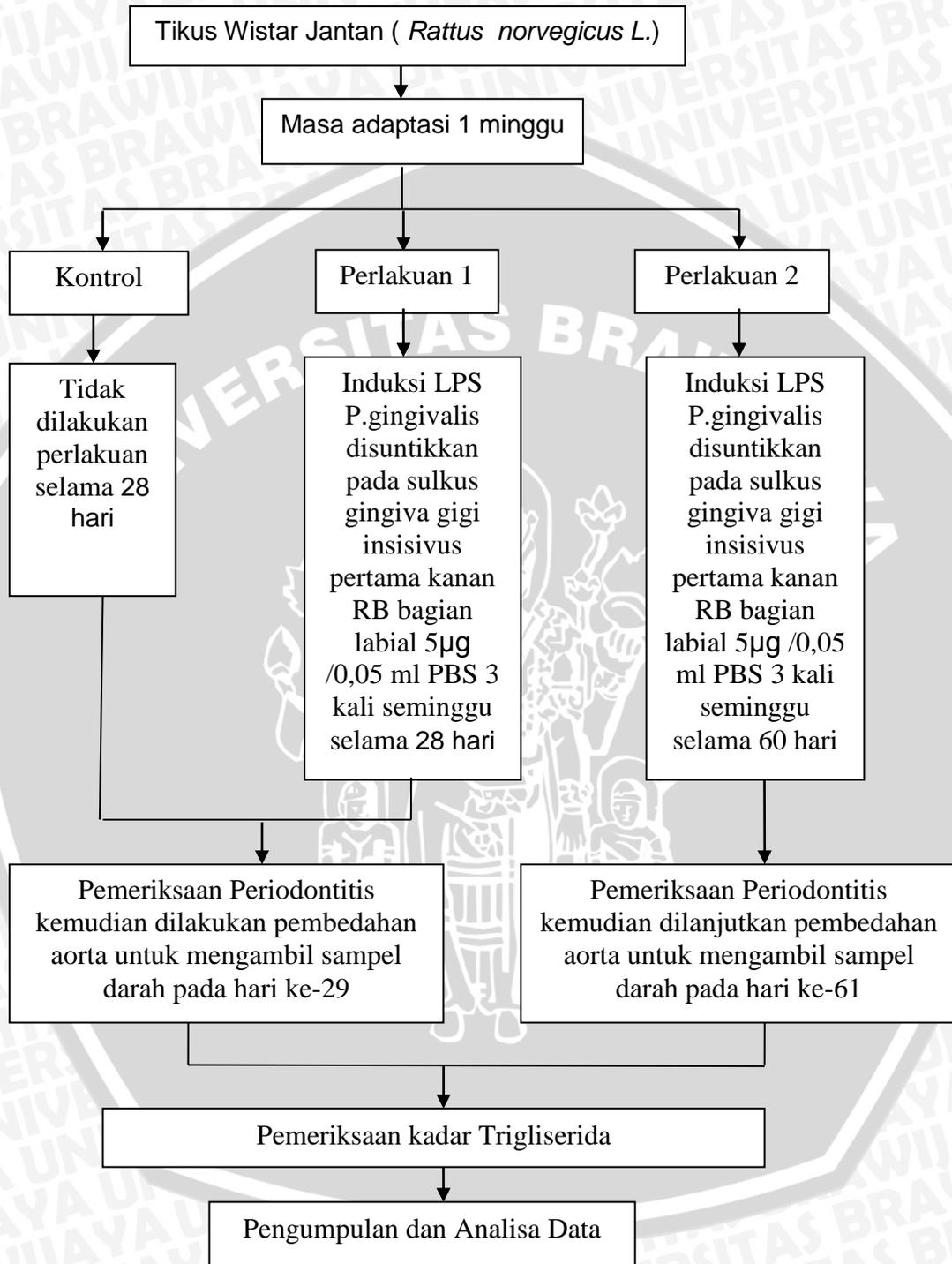
Hasil pengukuran hewan coba kontrol maupun perlakuan dilakukan uji normalitas dengan *kolmogorov smirnov test* dan uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen maka analisis data yang digunakan adalah uji One Way digunakan untuk mengetahui pengaruh lama paparan LPS *P.gingivalis* sebagai induksi periodontitis terhadap kadar TG 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 *P.gingivalis* sebagai induksi periodontitis

terhadap kadar Trigliserida. Jika data terdistribusi normal dilakukan uji korelasi *Pearson*, dan jika data terdistribusi tidak normal dilakukan uji *Spearman*.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian