

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental Laboratoris (Notoatmodjo, 2002). Desain penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design* dimana subyek dibagi menjadi 6 kelompok secara random (Tjokronegoro, dkk, 1999).

Sampel di pilih dengan *simple random sampling* kemudian ditempatkan pada:

K (Kelompok Kontrol) : adalah kelompok yang tidak diberikan perlakuan berupa pemberian lendir bekicot paca ekstraksi gigi

P (Kelompok Perlakuan) : adalah kelompok yang di beri perlakuan berupa lendir bekicot pada soket gigi pasca ekstraksi gigi.

4.2 Populasi dari Sampel Penelitian

4.2.1 Jenis Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah hewan percobaan berupa tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria inklusi sampel penelitian yang digunakan yaitu:

- a. Jenis kelamin jantan (untuk menghindari efek hormonal yang lebih dominan pada tikus betina)

- b. Berat badan tikus 200-350 gram
- c. Usia 2-3 Bulan
- d. Keadaan umum tikus sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, mata jernih, dan bulu mata tebal yang bewarna putih mengkilap.
- e. Diadaptasikan 7 hari

Kriteria eksklusi sampel penelitian yang digunakan, yaitu:

- a. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
- b. Berat badan kurang dari 200 gram
- c. Tikus yang mengalami diare pada saat penelitian ditandai dengan feses tikus yang tidak berbentuk
- d. Tikus yang mengalami tanda-tanda infeksi pada soket gigi
- e. Tikus mati selama penelitian

4.2.3 Jumlah Sampel Penelitian

Teknik randomisasi untuk pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) mengingat hewan coba, bahan pakan dan bahan penelitian lainnya adalah homogen. Pada rancangan ini dimungkinkan setiap hewan coba mempunyai kesempatan menjadi sampel dalam kelompok perlakuan atau kelompok kontrol.

Besar sampel yang digunakan pada penelitian berdasarkan rumus *Federer* (1963), yaitu:

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

Keterangan:

n = Jumlah Sampel

t = Jumlah Kelompok

Oleh karena itu, perhitungan menjadi:

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

$$(n - 1)(6 - 1) \geq 15$$

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi jumlah sampel minimum yang digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Lalu diputuskan untuk penelitian ini menggunakan 5 ekor tikus pada setiap kelompok dengan 1 tikus sebagai cadangan untuk masing-masing kelompok.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas atau Independen

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lendir bekicot (*Achatina fulica*)

4.3.2 Variabel Terikat atau Dependen

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel fibroblast pada luka soket gigi pasca pencabutan gigi insisivus pertama rahang bawah kanan tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

4.3.3 Variabel Terkendali

- a. Hewan coba (Tikus Wistar)
 - i. Jenis kelamin coba
 - ii. Berat badan hewan coba
 - iii. Usia hewan coba
 - iv. Makan dan minum hewan coba

- b. Teknik pencabutan gigi hewan coba
- c. Pemilihan dan pengambilan lendir bekicot
- d. Jumlah sampel bahan percobaan yang diaplikasikan kedalam soket gigi tikus pasca ekstraksi gigi
- e. Pengambilan preparat jaringan

4.3.4 Variabel Tidak Tekendali

- a. Pengiriman bahan coba
- b. Keterampilan operator

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli sampai bulan November tahun 2016.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Enam buah box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³ yang diisi 5 ekor tikus Wistar.
- b. Dengan kawat kassa sebagai tutup box dan sekam sebagai dasar box.
- c. Tempat minum hewan coba.

4.5.2 Alat Penimbang Berat Badan Tikus

Neraca Ohaus (Sartorius)

4.5.3 Alat dan Bahan untuk Pencabutan Gigi Tikus

- a. Tikus putih jantan
- b. Pinset

- c. Pinset sirugis
- d. Lecron modifikasi
- e. *Needle holder* modifikasi
- f. Ekskavator
- g. Sonde setengah lingkaran
- h. *Blade* dan *blade holder*
- i. Anestesi (ketamin)
- j. *Disposable syringe insulin* (1 ml) (Terumo, Japan)
- k. Kapas
- l. Kassa
- m. Obat antiinflamasi
- n. Obat antibiotik
- o. Cawan

4.5.4 Alat dan Bahan Perlakuan

- a. Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*)
- b. Lendir bekicot (*Achatina fulica*)
- c. Pakan hewan coba
- d. *Cotton buds*
- e. Masker dan sarung tangan

4.5.5 Alat dan Bahan Pengambilan Jaringan dan Pembuatan

Preparat

- a. *Blade no.11*
- b. Pinset
- c. Tabung fiksasi berlabel
- d. Gelas ukur
- e. *Object glass* dan *deck glass*
- f. *Cover glass*

- g. Counter
- h. Mikroskop cahaya
- i. Mikroskop Olympus photo slide BX51 dengan kamera DP71 12 megapixel
- j. Alkohol 70%, 80%, 95%, 96%
- k. Albumin
- l. Zenker
- m. Formalin 10%
- n. *Decalsification agent (EDTA 14%)*
- o. HCL 5%
- p. Amonium oksalat 1%
- q. Xylol
- r. Paraffin
- s. Alat cetak paraffin
- t. Water-bath
- u. Pewarna Hematoksilin dan Eosin
- v. Air
- w. Akuades
- x. Balsam Kanada
- y. Ether chloride
- z. Asam format 50%
- aa. Rotari mikrotom

4.6 Definisi Operasional

1. Lendir Bekicot

Lendir bekicot adalah lendir yang diperoleh dari salah satu peternak bekicot di desa Selopuro Kabupaten Blitar. Lendir diambil secara mandiri dengan memecah ujung cangkang bekicot dan meneteskan lendir yang keluar dari cangkang kedalam wadah yang telah disiapkan.

2. Fibroblas

Jumlah fibroblas didapatkan dengan menghitung jumlah sel yang terbentuk pada preparat yang diambil dari soket tikus pasca ekstraksi dengan pembesaran mikroskop 400x. Preparat diambil pada hari ketiga, kelima dan ketujuh. Fibroblas yang dilihat pada preparat diambil dari soket tikus. Pada pewarnaan Hematoksilin-Eosin, sel fibroblas baru akan tampak sebagai bentukan bintang (*stellat*), dengan tonjolan protoplasma. Intinya memanjang, parallel dengan serabut – serabut kolagen.

3. Luka Ekstraksi Gigi

Ekstraksi gigi dari gigi insisivus satu kanan mandibula tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dilakukan dengan menggunakan lecron dan needle holder modifikasi (Fitriani, 2011)

4. Soket Gigi

Soket gigi yang dimaksud dalam penelitian ini adalah soket gigi mandibular tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Soket gigi adalah lubang dalam tulang alveolar pada rahang yang memberikan tempat untuk melekatnya gigi. Bagian tengah dari soket mandibula dipotong secara melintang untuk pembuatan sediaan histologi.

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 Alur Kerja Penelitian

Tahapan – tahapan yang akan ditempuh dalam penelitian ini tersaji dalam akhir bab IV.

4.7.3 Pengambilan Lendir Bekicot (*Achatina fulica*)

Bekicot (*Achatina fulica*) hidup dibersihkan dengan air mengalir kemudian ditempatkan dalam kotak plastic (75 x 40 x 30 cm) selama 3 hari untuk mencegah kontaminasi material biologis. Lendir bekicot dihasilkan dari glandula yang terletak di otot perut bekicot. Pengambilan lendir dilakukan setiap hari untuk menjaga kesegaran bahan lendir saat aplikasi lendir kedalam soket gigi. Pengumpulan lendir dapat dilakukan dengan cara memecah ujung dari cangkang bekicot dengan menggunakan pisau, lalu meneteskan lendir yang mengalir dari dalam cangkang.

4.7.4 Persiapan Hewan Coba

- a. Tikus diadaptasikan dalam kandang kurang lebih selama 1 minggu pada temperatur konstan (20-25°C) dengan 12 jam siklus terang gelap untuk proses aklimitasi. Tikus dipelihara dalam box plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm³ yang ditutup dengan kawat kassa dengan dasar sekam yang diganti setiap minggu. Selama proses tersebut, dijaga

agar kebutuhan makanan dan air minum tetap terpenuhi dengan diet normal terdiri dari 67% *Comfeed* PAR-S 33% terigu dan air secukupnya (Anwari, 2003).

- b. Tikus dipuaskan selama 12-18 jam sebelum perlakuan ekstraksi gigi, namun air minum tetap diberikan (*ad libitum*) (Parven et al, 2007; Rajavel et al, 2007).
- c. Berat badan tiap tikus ditimbang dan dibagi menjadi 6 kelompok secara acak dengan jumlah masing-masing kelompok adalah 5 ekor kemudian berat tikus ditimbang lagi sebelum dilakukan ekstraksi gigi.

4.7.5 Pencabutan Gigi Tikus

Pencabutan gigi tikus dilakukan pada insisivus kiri mandibula dikarenakan lebih mempermudah operator dalam memberi perlakuan pada tikus. Proses pencabutan gigi tikus yaitu:

- a. Sebelum dilakukan ekstraksi, dilakukan anastesi secara intra-muscular dengan ketamin 40 mg/kgBB dengan cara:
 1. Kaki dan ekor tikus dijepit agar tidak dapat bergerak
 2. Ketamin dimasukkan kedalam *disposable syringe* dengan jarum nomor 24 sesuai dengan dosis (40mg/kgBB)
 3. Kulit dibagian tengkuk tikus diangkat dan ditahan diantara 2 jari
 4. Jarum dimasukkan dibawah kulit tengkuk, kemudian cairan anastesi diinjeksikan pelan – pelan.

5. Kemudian tikus akan menunjukkan gejala tidak sadarkan diri yang ditandai dengan reflek kumis dan bulu mata yang menghilang.

b. Lalu gigi insisivus kiri mandibula dibersihkan dari makanan dengan semprotan air menggunakan *disposable syringe*, lalu dikeringkan.

c. Dilakukan pencabutan gigi tikus dengan pinset dan ekskavator yang telah steril dengan arah sejajar dengan soket giginya secara hati – hati dengan kekuatan yang sama untuk meminimalkan resiko patahnya gigi tikus.

d. Soket diirigasi dengan aquades steril dan dikeringkan dengan kapas secara hati – hati (Fitriani, 2011).

4.7.6 Perawatan Pasca Pencabutan Gigi

Pemberian makan dilakukan dengan mengencerkan makanan dan dilakukan dengan cara sondasi lambung tanpa melewati mulut untuk mencegah gangguan penyembuhan pada soket gigi. Pemberian makan dilakukan 2 kali sehari setiap pagi dan sore hari.

4.7.7 Tahap Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba

Sebanyak 30 ekor tikus dengan berat badan 200 – 350 gram dibagi ke dalam 6 kelompok sebagai berikut :

a. Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol terdiri dari 12 ekor tikus dilakukan pencabutan gigi insisivus kiri bawah pada hari ke nol tetapi tidak diberi perlakuan pada soket giginya, kemudian dibagi dalam 3 sub kelompok, sebagai berikut:

- i. Kelompok K3 : Pada hari ke-3, 4 ekor tikus didekaputasi dan diambil sampel rahangnya.
 - ii. Kelompok K5 : Pada hari ke-5, 4 ekor tikus didekaputasi dan diambil sampel rahangnya.
 - iii. Kelompok K7 : Pada hari ke-7, 4 ekor tikus didekaputasi dan diambil sampel rahangnya.
- b. Kelompok Perlakuan

Kelompok perlakuan terdiri dari 12 ekor tikus dilakukan pencabutan gigi insisivus kiri bawah pada hari ke nol dan diberi perlakuan berupa pemberian lendir bekicot kedalam soket gigi sebanyak 1cc dengan menggunakan spuit yang dimasukkan sampai ke dasar soket untuk mencegah adanya gelembung udara yang terperangkap di dalam soket gigi. Kemudian, hewan coba dibagi dalam 3 sub kelompok, sebagai berikut :

- i. Kelompok P3 : Pada hari ke-3, 4 ekor tikus didekaputasi dan diambil sampel rahangnya.
- ii. Kelompok P5 : Pada hari ke-5, 4 ekor tikus didekaputasi dan diambil sampel rahangnya.
- iii. Kelompok P7 : Pada hari ke-7, 4 ekor tikus didekaputasi dan diambil sampel rahangnya.

4.7.8 Pengambilan Preparat untuk Pengamatan Histologi Luka

Ekstraksi Gigi

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-3, 5, dan 7 untuk melihat jumlah infiltrasi sel fibroblast di jaringan granulasi di soket gigi hewan coba. Dilakukan anestesi pada tikus masing-

masing kelompok perlakuan dengan menggunakan inhalasi eter dosis lethal dengan cara yang sama dengan proses anestesi. Sebelum dekaputasi dan diambil rahang bawahnya, harus dipastikan kematian tikus terlebih dahulu dengan cara melihat aktivitas pernafasannya. Apabila sudah tidak ada aktivitas respirasi, tikus didekaputasi menggunakan *scalpel* dengan *blade* no.11 dan diambil rahang bawahnya dimana terdapat soket bekas pencabutan gigi sebelumnya. Rahang bawah kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan formalin 10% untuk fiksasi jaringan dan diberi label. Jasad tikus kemudian dikuburkan dalam tanah dengan kedalaman 40cm dengan dibantu oleh tenaga ahli dari laboratorium terkait.

4.7.9 Teknik Pemrosesan Jaringan

- a. Dilakukan proses dekalsifikasi dengan cara direndam dalam larutan EDTA 14%. Proses dekalsifikasi ini dilakukan selama 30 hari untuk menunggu jaringan tulang mandibula menjadi lunak dan dapat dipotong kecil. Larutan dekalsifikasi ini harus diganti setiap hari untuk mendapatkan hasil yang baik. Setelah proses dekalsifikasi selesai, maka dilakukan pencucian pada air mengalir selama 3-8 jam untuk menghilangkan sisa dari bahan dekalsifikasi.
- b. Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, clearing, dan impregnasi dengan cara mencelupkan jaringan kedalam larutan seperti tabel dibawah ini sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin	2 jam	Clearing

2	Alkohol 70%	1 jam	Dehidrasi
3	Alkohol 80%	2 jam	Dehidrasi
4	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi
5	Alkohol 96% + Prusi	2 jam	Dehidrasi
6	Alkohol 96% + Prusi	1 jam	Dehidrasi
7	Alkohol 96% + Prusi	2 jam	Dehidrasi
8	Xylol	1 jam	Clearing
9	Xylol	2 jam	Clearing
10	Xylol	2 jam	Clearing
11	Parafin cair (58-60°C)	2 jam	Impregnasi
12	Parafin cair (58-60°C)	2 jam	Impregnasi

Tabel 4.1 Tabel Proses Fiksasi, Dehidrasi, Clearing, dan Impregnasi

Catatan :

- Dehidrasi dengan konsentrasi alkohol yang meningkat sampai kadar alkohol mencapai 96%. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 70% selama 1 jam, 80% selama 2 jam, 95% selama 2 jam, dan 96% selama 5 jam.
- Masukkan jaringan dalam xylol (clearing) sebanyak 3 kali pada 3 tabung yang berbeda dengan ketentuan waktu 1 jam, 2 jam, dan 3 jam.

4.7.10 Penanaman Dalam Paraffin (Embedding) dan Penyayatan

Jaringan

Melakukan *embedding* dan penyayatan jaringan dengan rotary mikrotom dengan cara :

- a. Alat cetak yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca. Alat dan alas diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dan kaca dengan blok paraffin yang sudah beku.
- b. Paraffin cair ditempatkan dalam dua wadah yaitu untuk bahan *embedding* dan paraffin sebagai media penyesuaian temperatur yang akan ditanam.
- c. Paraffin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak hingga penuh permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.
- d. Pembuatan preparat jaringan dengan pemotongan blok paraffin menggunakan rotary mikrotom.
- e. Bila paraffin sudah cukup keras, alat cetak dilepaskan dan blok paraffin diberi label dan siap disayat.
- f. Blok paraffin ditempatkan pada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan sampai suhu kamar agar tidak melekat erat.
- g. Pisau mikrotom dipasang pada pegangannya, membentuk sudut 5° - 10° . Pisau harus tajam dan permukaannya harus benar-benar rata.
- h. *Water-bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air dibawah titik leleh paraffin ($\pm 48^{\circ}\text{C}$).
- i. Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada rotary mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis yaitu 5 mikron.

- j. Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan kedalam *water-bath* agar sayatan jaringan mengembang dengan baik.
- k. Potongan yang sudah diseleksi dipindahkan pada object glass yang telah diolesi dengan egg albumin atau polisin sebagai bahan perekatnya yang sudah diberi label lalu sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu optimum (58 - 60°C) selama 30 menit.

4.7.11 Pengecatan Preparat Jaringan

Menurut Ross (1985) dan Hammersen (1993) pengecatan preparat jaringan dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Deparaffinisasi dengan menggunakan xylol.
- b. Preparat dimasukkan ke dalam xylol selama 2 menit.
- c. Memasukkan kembali ke dalam xylol II dalam wadah yang berbeda selama 2 menit.
- d. Dilakukan dehidrasi dengan larutan alkohol 96%, 95% dan 80% masing-masing selama 1 menit.
- e. Preparat dibilas dengan air mengalir selama 3-5 menit, mula-mula dengan aliran lambat kemudian lebih kuat dengan tujuan menghilangkan semua kelebihan alkohol.
- f. Preparat diwarnai dengan zat warna *Hematoxilin Mayer's* selama 15 menit.
- g. Dibilas kembali di bawah air mengalir selama 5 menit.
- h. Preparat direndam eosin selama 15 detik sampai 2 menit.
- i. Dilakukan dehidrasi kembali dengan larutan alkohol konsentrasi meningkat 95% dan 96% masing-masing 2

menit sebanyak 2 kali dengan wadah yang berbeda (bak I dan II).

- j. Setelah melalui alkohol absolut, preparat dipindahkan ke xylol.
- k. *Mounting*.
- l. Beri setetes medium Entellan yang mempunyai indeks refraksi hampir sama dengan indeks refraksi kaca pada sediaan hapus. Kemudian sediaan itu ditutup dengan kaca penutup dan dibiarkan mengering.

4.7.12 Penghitungan Jumlah Fibroblast

Penghitungan jumlah fibroblast dilakukan menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan perbesaran 400x. Jumlah sel fibroblast dihitung sebanyak 3 lapang pandang lalu dihitung nilai rata-ratanya (Putri, 2012).

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Hasil pengukuran jumlah sel fibroblast pada tikus kontrol dan tikus perlakuan dianalisis secara statistik menggunakan program komputerisasi dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) serta taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut : (Dahlan, 2004)

1. Uji normalitas data bertujuan untuk menginterpretasikan apakah data memiliki sebaran normal atau tidak karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis bergantung pada normal atau tidaknya distribusi data. Penyajian data yang berdistribusi normal digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang

tidak berdistribusi normal digunakan median dan minimum maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis jika persebaran data normal maka dilakukan uji parametrik sedangkan jika persebaran data tidak normal dilakukan uji nonparametrik.

2. Uji homogenitas varian bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Apabila varian homogen maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
3. Uji One-Way ANOVA bertujuan membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
4. Data penelitian yang terdistribusi normal ($p > 0,05$), dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan Oneway Anova dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dan bila ada perbedaan dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significance Difference) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Bila data penelitian tidak terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji nonparametrik dengan Kruskal-Wallis dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dan bila ada perbedaan nyata antara kelompok sampel, dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney dengan derajat kemaknaan 95% dengan nilai $\alpha=0,05$ (Notoatmojo, 2002).
5. Post Hoc Tes (Uji *Least Significant Difference*) bertujuan mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji Post Hoc yang digunakan adalah uji LSD dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0,05$).

6. Uji Korelasi Pearson bertujuan untuk mengukur kekuatan dan arah hubungan dari dua variable dikatakan berkorelasi apabila perubahan salah satu variable disertai dengan perubahan variabel lainnya, baik dalam arah yang sama ataupun arah sebaliknya.



4.7.2 Alur Kerja Penelitian



