

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratoris murni yang dilakukan pada hewan uji secara *in vivo*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Uji dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2015.

C. Subyek Penelitian

1. Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah gigi tikus jantan *Sprague Dawley* dengan berat badan 250-300 gram dan berumur 3-4 bulan yang diperoleh dari peternakan hewan uji di daerah Condong Catur. Jumlah sampel masing-masing hari adalah 3 gigi ($n=3$) dan total sampel sebanyak 9 gigi. Setiap 1 ekor tikus diambil 1 gigi yaitu gigi molar pertama kanan rahang atas, sehingga penelitian ini menggunakan 3 ekor tikus pada masing-masing hari. Jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 9 ekor.

2. Sel yang diamati

Sel yang diamati adalah sel fibroblas yang terdapat pada gigi tikus *Sprague Dawley* dengan keadaan pulpa terbuka hari 1, 3, dan 7.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Pulpa terbuka akibat jejas mekanis

2. Variabel Terpengaruh

Sel fibroblast

3. Variabel Terkendali

- a. Gigi tikus *Sprague Dawley* dengan berat 250-300 gram, berjenis kelamin jantan, dan berumur 3-4 bulan
- b. Pakan tikus menggunakan BR-2
- c. Round bur no 10 (1 mm)
- d. Sonde
- e. Kedalaman kavitas 1 – 1,2 mm (pulpa terbuka)

E. Definisi Operasional

1. Pulpa terbuka adalah gigi molar *Sprague Dawley* dengan pulpa yang terbuka akibat diberikan jejas mekanis didapatkan dengan preparasi kavitas menggunakan round bur no 10 berdiameter 1 mm sedalam 1 hingga 1,2 mm² dan aplikasi sonde atau hingga pulpa terbuka (Puspita *et al.*, 2011)
2. Sel fibroblas adalah sel yang muncul pada penelitian ini akibat pulpa gigi terbuka karena jejas mekanis yang dibiarkan selama 1, 3, dan 7 hari.

3. Gambaran histologis sel fibroblas diperoleh dari pemeriksaan histologi dengan pewarnaan HE yang diamati dibawah mikroskop cahaya perbesaran 40x dan 400x.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian
 - a. Kandang tikus
 - b. Timbangan
 - c. Sduit injeksi (Terumo, Philippines)
 - d. *Round bur* no 10 diameter 1 mm² (Edenta, Swiss)
 - e. *Handpiece* (W&H, German)
 - f. Bengkok
 - g. Lup
 - h. Sonde (Dentika, Pakistan)
 - i. Pinset anatomis
 - j. Pinset sirugis
 - k. Pisau
 - l. Scapel
 - m. Botol
 - n. Label
 - o. Spidol
 - p. Mikroskop cahaya perbesaran 400x (Olympus, Jepang)

2. Bahan Penelitian

- a. Masker
- b. Handscoen dan *Gloves*
- c. Larutan anestesi *ketamine* (65 mg/kg BB) dan *Xylazine-HCL* (7 mg/kg BB).
- d. *Cotton bud, cotton ball*
- e. Kassa
- f. Tissue
- g. Povidon Iodin
- h. Bahan fiksasi buffer formalin 10%
- i. Larutan desinfektan alkohol 70%
- j. *Alcohol swabs*
- k. Bahan dekalsifikasi asam formic
- l. Hematoxylin eosin

G. Jalannya Penelitian

1. Mempersiapkan *ethical clearance* yang dikeluarkan oleh Komisi etik penelitian FKIK UMY.
2. Disediakan 9 tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* sehat yang berumur 3-4 bulan dengan berat badan 250-300 gram. Sembilan tikus dibagi menjadi 3 kelompok dengan cara randomisasi, masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor subjek. Kelompok dibagi berdasarkan hari dekapitasi, diantaranya kelompok hari ke 1, 3, dan 7. Subjek kelompok hari pertama dinamai A1, B1, dan C1, subjek kelompok hari ketiga dinamai A3, B3,

dan C3, dan subjek kelompok hari ke tujuh dinamai A7, B7, dan C7. Masing-masing subjek dipilih 1 gigi yaitu gigi molar pertama kanan rahang atas sebagai gigi yang diberi perlakuan (pemberian jejas mekanis).

3. Subjek diaklimatisasi selama 3 hari sebelum perlakuan. Selama aklimatisasi subjek hanya diberi air putih dan pakan BR-2.
4. Berat badan pada masing-masing subjek diukur untuk keperluan perhitungan **dosis** anestesi.
5. Sebelum subjek diberikan jejas mekanis, subjek terlebih dahulu dianestesi secara intramuskuler menggunakan larutan anestesi *ketamine* (65 mg/kg BB) dan *Xylazine-HCL* (7 mg/kg BB) (Sabir *et al.*, 2005).
6. Setelah efek anestesi bekerja, gigi molar pertama kanan rahang atas bagian mesial diberikan jejas mekanis dengan cara dibur dari arah oklusal menggunakan *round bur* no 10 dengan diameter 1 mm² dan aplikasi sonde sekali. Pemberian jejas mekanis pertama kali dilakukan pada kelompok hari ke 7, empat hari berikutnya pemberian jejas dilakukan pada kelompok hari ke 3, dua hari berikutnya atau sehari sebelum dekapitasi rahang pemberian jejas dilakukan pada kelompok hari ke 1, sehingga waktu dekapitasi rahang pada seluruh kelompok dilakukan pada hari yang sama.
7. Gigi subjek yang telah diberi jejas dibiarkan selama masing-masing lama perlakuan (1, 3, dan 7 hari).
8. Subjek dikorbankan dengan teknik inhalasi menggunakan kloroform.
9. Rahang subjek didekapitasi dan difiksasi dalam larutan formalin 10% selama 24 jam.

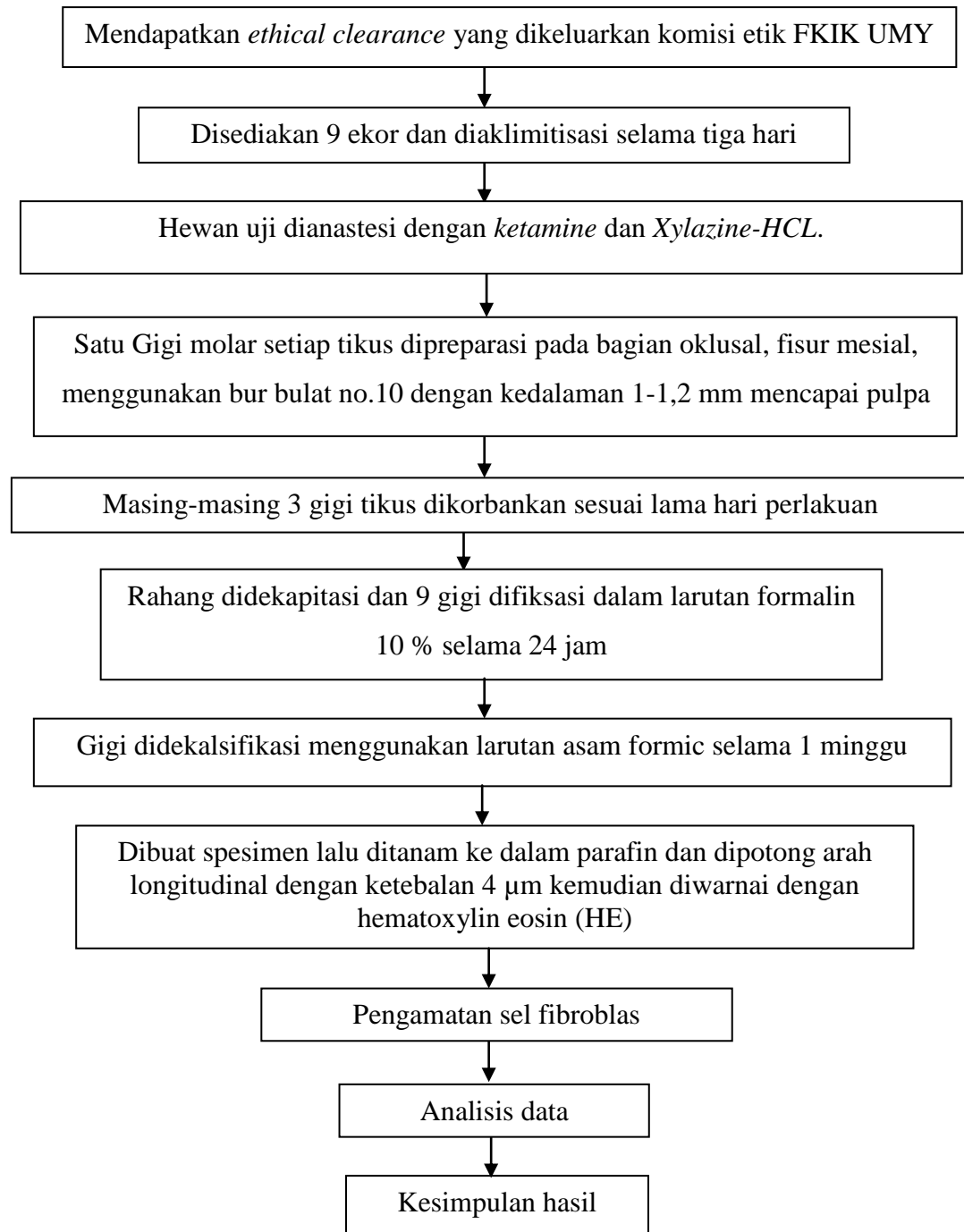
10. Rahang didekalsifikasi menggunakan larutan asam formic selama 1 minggu, disebut spesimen.
11. Spesimen gigi ditanam ke dalam paraffin kemudian dipotong menggunakan mikrotom *rotary* mengarah longitudinal dengan ketebalan 4 μm .
12. Pemulasan menggunakan Hematoksin Eosin (HE)
13. Pengamatan gambaran sel fibroblas menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 40x dan 400x. Data yang diambil merupakan hasil perhitungan jumlah sel fibroblas menggunakan 4 lapang pandang pada area pengamatan yang ditentukan berdasarkan skor pengamatan PMN menurut Giro *et al.*, (2010), diantaranya preparat subjek A1 di dekat jejas saluran pulpa mesial, preparat subjek B1 di dekat jejas saluran pulpa mesial, preparat subjek C1 di 2/3 saluran pulpa mesial, preparat subjek A3 di 1/3 saluran pulpa distal, preparat subjek B3 di 2/3 saluran pulpa mesial, preparat subjek C3 di 2/3 saluran pulpa mesial, preparat subjek A7 di 1/3 saluran pulpa distal, preparat subjek B7 di 1/3 saluran pulpa distal, preparat subjek C7 di 1/3 saluran pulpa mesial.
14. Analisis data.
15. Menarik kesimpulan dari hasil penelitian.

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan jumlah sel fibroblas yang berada pada area yang sama dengan pengamatan sel PMN pada pulpa gigi yang diberi jejas merupakan data numerik dengan skala rasio, selanjutnya

dihitung rerata jumlah sel fibroblas berdasarkan kelompok. Data dilakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji Saphiro-wilk ($N < 50$). Uji homogenitas data menggunakan uji levene. Penelitian ini menggunakan uji ANOVA satu arah (*one way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan respon sel fibroblas pada hari ke 1, 3, dan 7. Selanjutnya untuk melihat signifikansi perbedaan jumlah sel fibroblas masing-masing kelompok digunakan uji Tukey. Apabila diketahui distribusi data tidak normal dan tidak homogen, maka uji statistik yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*.

I. Alur Penelitian



Gambar 3. Skema Alur Penelitian