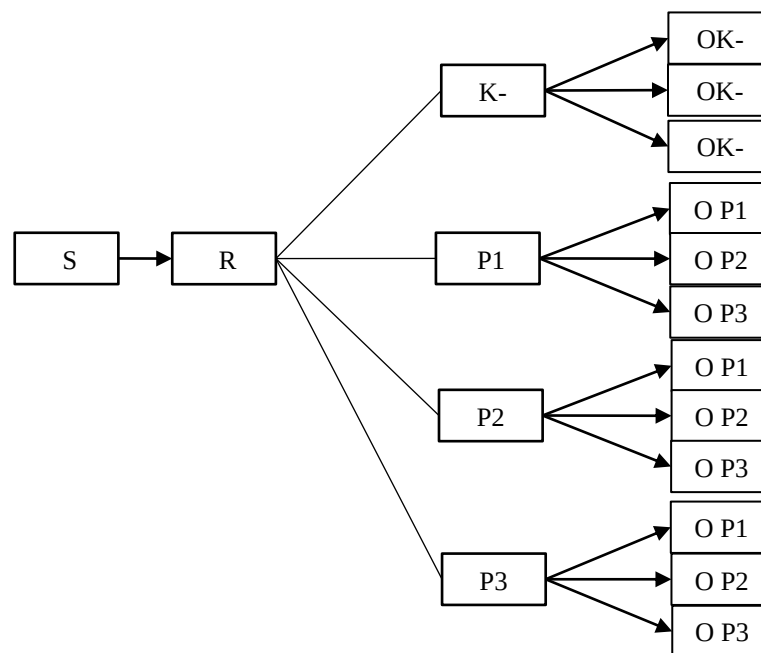


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental laboratories* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* (Khairunnisa dkk, 2018).



Keterangan:

S : Sampel

R : Random

K- : Kelompok kontrol negatif yang dilakukan ekstraksi gigi tanpa pemberian ekstrak ceker ayam

P1 : Kelompok perlakuan yang dilakukan ekstraksi gigi dan diberikan ekstrak ceker ayam konsentrasi 5%

P2 : Kelompok perlakuan yang dilakukan ekstraksi gigi dan diberikan ekstrak ceker ayam konsentrasi 10%

P3 : Kelompok perlakuan yang dilakukan ekstraksi gigi dan diberikan ekstrak ceker ayam konsentrasi 15%

OK- : Observasi luka soket pasca ekstraksi gigi tikus kontrol negatif pada hari ke 3,7, dan 14

OP1 : Observasi luka soket pasca ekstraksi gigi tikus perlakuan pada hari 3,7, dan 14

OP2 : Observasi luka soket pasca ekstraksi gigi tikus perlakuan pada hari 3,7, dan 14

OP3 : Observasi luka soket pasca ekstraksi gigi tikus perlakuan pada hari 3,7, dan 14

Gambar 3.1 *Post Test Only Control Group Design*

3.2 Populasi

Populasi penelitian ini menggunakan hewan percobaan berupa tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*).

3.3 Sampel

3.3.1 Kriteria Sampel

1. Kriteria Inklusi

- Tikus putih wistar jenis kelamin jantan
- Berat badan tikus 200-300 gram
- Usia tikus lebih kurang 4-9 minggu
- Keadaan umum tikus sehat ditandai dengan gerakannya yang aktif
- Bulu mengkilap

2. Kriteria Ekslusi

- Tikus yang mengalami infeksi pada soket gigi
- Tikus yang selama perlakuan tidak mau makan
- Tikus yang mengalami penurunan kondisi fisik atau mati selama perlakuan
- Ekstraksi gigi yang dilakukan tidak sempurna pada tikus.

3.3.2 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Federer, seperti berikut:

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

Keterangan:

- t = Banyaknya kelompok perlakuan
r = Jumlah yang dibutuhkan disetiap perlakuan

Maka,

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

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$4r-4-r+1 \geq 15$$

$$3r-3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq \frac{18}{3}$$

$$r \geq 6$$

Sehingga, jumlah sampel yang digunakan adalah 6 sampel untuk setiap kelompok perlakuan. Total semua tikus yang akan dijadikan sampel untuk penelitian ini sebanyak 18 ekor tikus pada kelompok K-, KP (5%, 10%, 15%) dan sebagai cadangan 8 ekor tikus. Masing-masing kelompok 2 ekor tikus sebagai cadangan

3.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik randomisasi sampling untuk pengelompokkan perlakuan setiap hewan coba, bahan pakan sama. Pada rancangan ini setiap hewan coba mempunyai peluang yang sama untuk menjadi sampel dalam kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol (Kalton, 2022).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Independen

Variabel independen (bebas) pada penelitian ini adalah ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)

3.4.2 Variable Dependen

Variabel dependen pada penelitian ini adalah jumlah osteoblas dan osteoklas pada proses penyembuhan luka pasca ekstraksi gigi pada tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*)

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak ceker ayam kampung (Gallus domesticus)	Ekstrak berasal dari tulang ceker ayam kampung yang didapatkan dengan cara dilakukan proses maserasi menggunakan pelarut ethanol 96% selama 24 jam sehingga menghasilkan ekstrak ceker ayam kampung murni, kemudian dijadikan bentuk sediaan hydrogel dengan Na CMC dengan konsentrasi ekstrak 5%, 10%, dan 15%	Persentase (%)	Rasio
2.	Jumlah sel Osteoklas dan Osteoblas	Sel Osteoklas dan Osteoblas yang akan bertambah pada proses penyembuhan luka dalam fase proliferasi pasca ekstraksi gigi	Parameter skoring histopatologi osteoklas dan osteoblas (berdasarkan perhitungan jumlah rata-rata dari 3 lapang pandang, pada objek pembesaran 400x) 0 = tidak ditemukan sel Osteoklas dan Osteoblas 1 = jumlah sel Osteoklas dan Osteoblas pada daerah luka (<10% per lapangan pandang) 2 = jumlah sel Osteoklas dan Osteoblas pada daerah luka rendah (>10% s/d <50% per lapangan pandang) 3 = jumlah sel Osteoklas dan Osteoblas pada daerah luka sedang (>50% s/d <90% per lapangan pandang) 4 = jumlah sel Osteoklas dan Osteoblas pada	Ordinal

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Skala Ukur
			daerah luka sangat rapat (>90% per lapangan pandang)	

3.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.6.1 Tempat Penelitian

Identifikasi fitokimia dan pembuatan ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)

1. Laboratorium CV. Mustikarya Gemilang Padang
2. Ekstraksi gigi hewan coba dan pemberian ekstrak ceker ayam kampung ke soket pada luka pasca ekstraksi gigi: Ellio Sains Laboratorium Medan
3. Pembuatan blok paraffin: Laboratorium Patologi Prospecta Medan, Sumatra Utara
4. Pengamatan osteoklas dan osteoblas: Laboratorium Patologi Prospecta Medan, Sumatra Utara

3.6.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober –Desember 2024

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat:

- a. Kandang tikus
- b. Timbangan hewan
- c. Masker
- d. *Handscoon*
- e. Pinset

- f. Lecron
- g. *Needle holder*
- h. Sonde *halfmoon*
- i. Satu set alat ekstraksi gigi (elevator yang dimodifikasi, tang instrumen)
- j. *Blade holder*
- k. Spuit 1 cc
- l. Kapas
- m. Kassa
- n. Scalpel
- o. Blade no.11
- p. Tabung fiksasi berlabel
- q. Kaca preparat/ *object glass*
- r. Mikroskop Olympus photo slide bx51 dengan kamera dp71 12 megapixel
- s. Kamera
- t. Spidol

3.7.2 Bahan

- a. Ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)
- b. Makanan dan minuman tikus standar laboratorium
- c. Ketamin *injection*
- d. Xylazine
- e. Alkohol 70 %, 80%, 95%, 96%
- f. Formalin 10 %

- g. Bahan pembuatan preparat: *Decalsification agent* (EDTA 14 %), HCL 5%, ammonium oksalat 1%, Xylol, paraffin, alat cetak paraffin, *water-bath*, pewarna hematoksilin dan eosin (HE), air, aquades, balsam kanada, asam format 50%

3.8 Cara Kerja

1. Pembuatan *Ethical Clearance*
2. Persiapan hewan coba tikus putih wistar jantan (*Rattus norvegicus*)
3. Pengelompokan hewan coba masing-masing 4 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus dan 2 ekor tikus sebagai cadangan
4. Aklimatisasi selama 7 hari dan diberikan makan yang sama dan cukup
5. Anestesi dan ekstraksi gigi insisivus kiri rahang bawah
6. Penelitian dibagi dalam 4 kelompok
 - K- (tanpa pemberian apa-apa)
 - KP pemberian ekstrak ceker ayam kampung dengan 3 variasi konsentrasi
 - A. Kelompok 5%
 - B. Kelompok 10%
 - C. Kelompok 15%
7. Diamati selama 3, 7, dan 14 hari
8. Anestesi dan dekapitasi pada hari ke 3, 7, dan 14
9. Pemotongan jaringan
10. Pembuatan preparat histologi jaringan
11. Perhitungan jumlah Osteoklas dan Osteoblas

3.8.1 Pembuatan Ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)

Tahapan pertama dalam pembuatan ekstraksi ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*) ialah melakukan preparasi sampel dengan cara ceker ayam kampung dicuci sampai bersih, kuku jari dipotong, kemudian ceker ayam tersebut direbus hingga mendidih. Setelah mendidih, ceker ayam kampung didinginkan dan dipisahkan dari daging yang menempel. Tulang ceker ayam yang sudah bersih selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40°C selama 24 jam. Selanjutnya tulang ceker ayam kampung di timbang dan dihaluskan dengan menggunakan blender (Masruro, 2020)

Proses pembuatan ekstrak gelatin secara asam yang bertujuan untuk mendapatkan kolagen adalah sebagai berikut: tulang ceker ayam kampung didemineralisasi, kemudian direndam dengan menggunakan larutan asam asetat 1,5 N selama 24 jam dengan perbandingan W/V 1:3 menjadi ossein. Ossein ditambahkan larutan aquades untuk menjaga pH 6-7 dan ditiriskan. Hasil demineralisasiasam asetat dihidrolisa dan dibuat menjadi tepung gelatin. Tulang ceker ayam kampung yang telah didemineralisasi pada konsentrasi asam asetat 1,5 N dihidrolisa menggunakan waterbath dengan suhu 60°C dan waktu hidrolisa 4 jam, perbandingan mol kolagen dan air yaitu 1:2. Filtrat gelatin yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring, dipekatkan di dalam waterbath pada suhu 70°C selama 12 jam kemudian didinginkan dalam refrigerator 5-10°C selama 30 menit. Gelatin dituang ke dalam wadah dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 48 jam atau sampai kering (Santoso dkk., 2018)

3.8.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)

Larutan yang digunakan pada penelitian ini adalah larutan Na-CMC. Untuk mencari konsentrasi yang diinginkan, digunakan rumus:

$$\text{Persentase} = \frac{\text{Zat terlarut yang digunakan}}{\text{Volume larutan}} \times 100\%$$

Tabel 3.2 Persentase Konsentrasi Ekstrak Ceker Ayam Kampung

Ekstrak ceker ayam kampung (gr)	Volume Akhir (ml)	Konsentrasi
5	10	5%
10	10	10%
15	10	15%

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Eva, 2021), teknik pengolahan dan pemanfaatan ceker ayam dengan menggunakan konsentrasi 5%, 10% dan 15% dalam memanfaatkan ceker ayam sebagai penyembuhan luka. Maka pada penelitian ini peneliti tertarik menggunakan konsentrasi ekstrak 5%, 10% dan 15%.

3.8.3 Pesiapan Hewan Coba

- Tikus yang dibutuhkan sebanyak 26 ekor tikus, 18 ekor tikus yang akan diteliti. Dan 8 ekor tikus sebagai cadangan
- Adaptasi tikus dalam kondisi laboratorium selama 1 minggu dengan diberi makan yang sama dan minum yang cukup
- Tikus dipuasakan selama 12-18 jam sebelum perlakuan, tetapi tetap diberikan air putih untuk minum
- Berat badan tiap tikus ditimbang dan dikelompokkan menjadi 4 kelompok secara random dengan jumlah masing-masing kelompok 3 ekor tikus,

kemudian berat tikus ditimbang lagi sebelum dilakukan ekstraksi, dimana berat badan yang dibutuhkan 200-300 gram.

3.8.4 Pengelompokan Hewan Coba

Sebanyak 3 ekor tikus dan 2 tikus sebagai cadangan dengan berat badan 200-300 gram dibagi ke dalam 4 kelompok sebagai berikut:

a. Kelompok kontrol negatif

Kelompok kontrol negatif terdiri dari 5 ekor tikus yang tidak diberi perlakuan berupa ekstrak ceker ayam kampung secara oral, dilakukan ekstraksi gigi dan pengambilan sampel rahang pada hari yang berbeda sebagai berikut:

- Kelompok K- 1 : pada hari ke- 3 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi dan diambil sampel rahangnya
- Kelompok K- 2 : pada hari ke- 7 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi dan diambil sampel rahangnya
- Kelompok K- 3 : pada hari ke- 14 setelah ekstraksi, 1 ekor didekapitasi dan diambil sampel rahangnya

b. Kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan terdiri dari 9 ekor tikus yang diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak ceker ayam kampung secara per oral, dilakukan ekstraksi gigi dan pengambilan sampel pada hari yang berbeda, sebagai berikut:

- Kelompok P1 5% : pada hari ke- 3 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 3 dan diambil sampel rahangnya.

- Kelompok P1 5% : pada hari ke- 7 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 3 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P1 5% : pada hari ke- 14 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 3 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P2 10% : pada hari ke- 3 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 3 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P2 10% : pada hari ke- 7 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 7 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P2 10% : pada hari ke- 14 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 14 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P3 15% : pada hari ke- 3 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 3 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P3 15% : pada hari ke- 7 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 7 dan diambil sampel rahangnya.
- Kelompok P3 15% : pada hari ke- 14 setelah ekstraksi, 1 ekor tikus didekapitasi pada hari ke- 14 dan diambil sampel rahangnya.

3.8.5 Ekstraksi Gigi Tikus

Ekstraksi gigi tikus dilakukan pada gigi insisivus satu kiri mandibula dikarenakan gigi insisivus rahang bawah tikus memiliki ukuran yang lebih besar dan panjang, sehingga mudah untuk dilakukan pencabutan gigi. Sebelum dilakukan ekstraksi, aseptis daerah tempat injeksi dengan mengaplikasikan alkohol 70% pada area yang dianestesi dan melakukan anastesi injeksi dengan ketamin 0,1 ml dan xylazin 0,1 ml. Setelah tikus tertidur dilakukan ekstraksi gigi,

dengan dilakukan elevasi dengan elevator yang modifikasi dari instrumen plastis kemudian ekstraksi gigi tikus dengan *needle holder*.

3.8.6 Pemberian Ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)

Terdapat 3 kelompok perlakuan dengan konsentrasi (5%, 10%, 15%) yang akan diberikan ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*) pada soket gigi Tikus dengan pemberian ekstrak ceker ayam kampung satu kali sehari yaitu,

1. P1 5%, 10%, 15%: dengan jumlah 1 ekor tikus pada kelompok hari ke 3 yang diberikan ekstrak ceker ayam kampung
2. P2 5%, 10%, 15%: dengan jumlah 1 ekor tikus pada kelompok hari ke-7 yang diberikan ekstrak ceker ayam kampung
3. P3 5%, 10%, 15%: dengan jumlah 1 ekor tikus pada kelompok hari ke-14 yang diberikan ekstrak ceker ayam kampung

3.8.7 Perawatan Tikus Pasca Pemberian Ekstrak ceker ayam kampung (*Gallus domesticus*)

Pemberian makan dan minum tikus selama masa penelitian sesuai dengan standar laboratorium dengan pemberian yang sama pada semua hewan percobaan. Pemberian makan dilakukan dengan cara *ad libitum*.

3.8.8 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke- 3, 7, dan 14 untuk melihat jumlah sel osteoklas dan osteoblas. Dilakukan anestesi pada tikus masing-masing kelompok perlakuan dengan menggunakan injeksi ketamine dosis lethal yaitu 3x anestesi sebanyak 0,9 ml. Sebelum dekapitasi dan diambil rahang bawahnya, cek kematian tikus dilakukan dengan cara melihat respirasinya, apabila sudah tidak

ada aktivitas respirasi, tikus didekapitasi menggunakan *scapel* dan *blade* no. 11 dan diambil rahang bawahnya terdapat soket bekas pencabutan gigi sebelumnya. Rahang bawah tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan formalin 10% untuk fiksasi jaringan dan diberi label.

3.8.9 Pembuatan Sediaan Histologi/Preparat

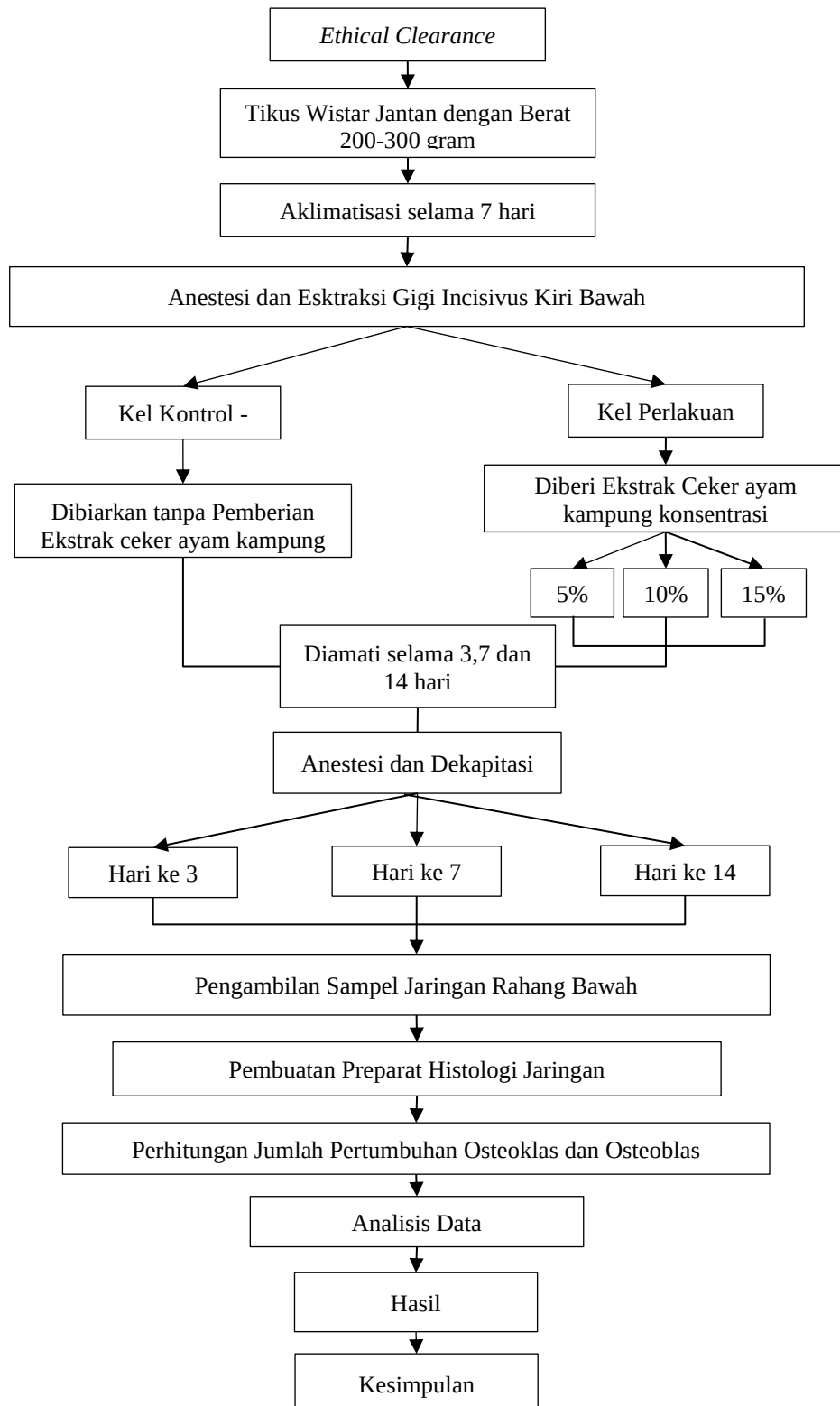
- a. Melakukan fiksasi dengan larutan formalin 10% selama 18-24 jam
- b. Jaringan dicuci dengan larutan aquades selama 15 menit
- c. Dekalsifikasi menggunakan EDTA 14%. Penggantian larutan ini dilakukan setiap hari sampai specimen melunak, setelah melunak perendaman dihentikan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan EDTA
- d. Dehidrasi dengan menggunakan aseton sebanyak 1 jam x 4
- e. *Clearing* dengan menggunakan *xylol* sebanyak 30 menit x 4, *paraffin* cair dengan suhu 55 – 80°C selama 1 jam x 3
- f. Penanaman jaringan pada *paraffin* blok
- g. Jaringan yang sudah ditanam dilakukan pendinginan selama 24 jam
- h. Sediaan disayat jaringan soket dipotong arah sagital (labial-palatal) dengan menggunakan mikrotom rotary dengan ketebalan berkisaran 3-6 μ lalu dilakukan perlekatan sayatan pada *water bath* dengan suhu 50°C
- i. Sayatan yang sudah menempel dapat diambil dengan *object glass* dan didiamkan selama 24 jam
- j. *Object glass* dimasukkan pada pewarna hematoxylin selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit

- k. *Object glass* dimasukkan pada *Litium carbonat* selama 20 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
- l. *Object glass* dimasukkan pada pewarna *Eosin* selama 15 menit, alcohol 96% selama 15 menit x 3 dan *Xylol* selama 15 menit x 3
- m. Preparat ditutup dengan *deck glass entellan*

3.8.10 Perhitungan Jumlah Osteoklas dan Osteoblas

Osteoklas dan Osteoblas pada permukaan jaringan soket dari masing-masing preparat diperiksa di bawah mikroskop, menggunakan Mikroskop Olympus dengan pembesaran 400x pada satu lapangan pandang untuk setiap preparat jaringan, kemudian dibuat foto preparat. Osteoklas dan Osteoblas dari per lapangan pandang dijumlahkan lalu hasilnya dibagi untuk mencari rerata jumlah Osteoklas dan Osteoblas.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.10 Analisis Data

Hasil perhitungan jumlah sel osteoklas dan osteoblas pada tikus kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan *software* komputer dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut:

- a. Uji normalitas: bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data sebaran atau distribusi normal atau tidak
- b. Uji homogenitas varian: bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Uji menggunakan *leavene test*, jika didapatkan varian homogen, maka analisis selanjutnya dapat menggunakan uji ANOVA.
- c. Uji *One-way* ANOVA berlaku untuk membandingkan nilai dari rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal terdapat dua kelompok yang berbeda secara signifikan.
- d. Regresi Linier: Untuk mengetahui besarnya pengaruh satu variabel bebas atau variabel independen terhadap variabel terikat atau variabel dependen.
- e. Uji *kruskall-Wallis* : apabila data tidak berdistribusi normal