

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk penelitian eksperimental laboratoris, dengan *post test desain*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Perancah koral buatan yang dikembangkan oleh tim peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
2. *Platelet-rich plasma* yang diperoleh dari darah tikus yang diambil melalui ekor.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi :
 - a. Pengambilan darah tikus dilakukan di Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
 - b. Pembuatan PRP dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
 - c. Pemeriksaan PRP dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada
 - d. Inkorporasi dan pengamatan profil *swelling* dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu :

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober – Desember 2016

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

- a. *Platelet-rich plasma*
- b. Perancah koral buatan

2. Variabel terikat

Profil *swelling* perancah koral buatan

3. Variabel terkontrol

- a. Ukuran perancah koral buatan (gelatin: CaCO_3 = 5:5)
- b. Metode pemuatan PRP pada perancah koral buatan
- c. Volume larutan PBS
- d. Waktu perendaman perancah

E. Definisi Operasional

1. Perancah koral buatan, merupakan perancah koral yang dibuat dengan bahan dasar gelatin dan kalsium karbonat (CaCO_3) yang diformulasikan dalam bentuk membran hidrogel.
2. *Platelet-rich plasma*, merupakan *platelet* dari darah tikus yang dibuat dengan metode Matsui dan Tabata (2012).
3. Inkorporasi, merupakan proses pemuatan PRP pada perancah koral buatan dengan metode celup.

4. Profil *swelling*, merupakan kemampuan perancah koral buatan dalam menyerap cairan yang dapat ditandai dengan terjadinya pembengkakan pada perancah.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *handscoon*, masker, alat tulis, timbangan (Mettler Toledo, Switzerland), vacountainer Acid Citrate Dextrose (BD, USA), *Centrifuge* (Hettich Zentrifugen, Germany), *blue tip* (Biologic, USA) , *yellow tip* (Biologic, USA), *microtube* (eppendorf, Germany), micropipette (brand, USA), inkubator dan oven (Memmert, Germany).

2. Bahan :

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : perancah koral buatan (gelatin : $\text{CaCO}_3 = 5:5$), darah dari tikus, dan larutan PBS.

G. Prosedur penelitian

1. Menstabilkan berat perancah koral buatan (gelatin : $\text{CaCO}_3 = 5: 5$) yang telah dibuat oleh tim peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan cara memasukkan ke dalam oven selama 24 jam dengan suhu 50°C .
2. Pengambilan sampel darah tikus melalui vena ekor.
 - a. Tikus dimasukkan ke dalam slongsong yang sesuai dengan ukuran tubuh tikus.

- b. Ekor tikus dijulurkan keluar dan vena lateralis pada ekor diincis (dipotong) 0,2-2 cm dari pangkal ekor dengan silet atau gunting yang steril.
 - c. Darah ditampung pada tabung tabung vacountainer ACD kemudian diletakkan miring 45°C dan dibiarkan mengendap.
3. Darah dari tabung vacountainer diambil sebanyak 50µl untuk pemeriksaan *whole blood* menggunakan hemositometer di Laboratorium Diagnostic Asri Medical Center.
4. Pembuatan PRP dengan metode Matsui dan Tabata (2012)
 - a. Darah dimasukkan ke dalam *microtube* untuk pembuatan PRP. Darah disentrifugasi sebanyak dua kali di *centrifuge*. Sentrifugasi pertama dilakukan dengan kecepatan 450 rcf/g selama 7 menit pada suhu 4°C.
 - b. Setelah sentrifugasi pertama dilakukan, akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat* dan eritrosit. Plasma dari bagian atas *microtube* diambil dengan *micropipette*, kemudian ambil bagian lapisan putih tipis diatas eritrosit dan pindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang kering dan steril. Pada pengambilan *buffy coat* akan terambil sedikit eritrosit dan plasma. Sentrifugasi kedua dilakukan dengan kecepatan 1600 rcf/g selama 5 menit pada suhu 4°C.
 - c. Setelah sentrifugasi kedua dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat*, dan eritrosit. Plasma di bagian atas

microtube diambil terlebih dahulu dengan *micropipette*. *Buffy coat* diambil dengan menggunakan *micropipette* dan dipindahkan kedalam *microtube* baru yang kering dan steril. *Buffy coat* merupakan fase kaya platelet (PRP).

5. Mengambil 50 μ l PRP untuk dilakukan pemeriksaan PRP dengan teknik giemsa di Lboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada.
6. Menyiapkan perancah koral buatan (gelatin : CaCO₃ = 5:5) yang telah distabilkan beratnya untuk dua kelompok, yaitu kelompok A dan kelompok B dengan ukuran yang sama. Kelompok A adalah perancah dengan inkorporasi PRP, sedangkan kelompok B adalah perancah tanpa inkorporasi PRP. Masing-masing kelompok dilakukan pengulangan perlakuan sebanyak tiga kali, yang diberi kode angka 1,2, dan 3. Sehingga didapatkan kelompok baru yaitu A1, A2, A3 dan B1, B2, B3.
7. Pemuatan PRP pada perancah koral buatan dilakukan dengan cara mencelupkan perancah dalam PRP yang telah disiapkan dalam *microtube* dengan volume yang sama untuk tiga kelompok A.
8. Memasukkan perancah yang telah diinkorporasikan PRP pada botol yang telah diberi kode A1, A2, dan A3.
9. Memasukkan perancah tanpa inkorporasi PRP ke dalam botol yang telah diberi kode B1, B2, dan B3.
10. Menambahkan larutan PBS sebanyak 1,5 ml pada semua botol A dan B.
11. Memasukkan semua botol ke dalam inkubator denga suhu 37°C.

12. Setelah dimasukkan dalam inkubator selama 30 menit, semua botol dikeluarkan dari inkubator.
13. Memisahkan antara perancah dengan cairan PBS yang tidak terserap oleh perancah dan memastikan tidak ada cairan yang tersisa, kecuali cairan yang telah terserap oleh perancah
14. Mengukur berat perancah basah setelah perendaman dalam larutan PBS dengan cara ditimbang.
15. Menghitung berat cairan yang mampu diserap oleh perancah selama waktu yang telah ditentukan. Berdasarkan Sarvazyan dkk., (2012) berat cairan yang mampu diserap oleh perancah dapat dihitung menggunakan rumus :

Keterangan :

Ww : berat cairan yang terserap oleh perancah

WHw : berat perancah saat basah atau setelah kontak dengan cairan.

DHw : berat perancah saat kering atau sebelum kontak dengan cairan.

16. Mencatat hasil pengukuran berat perancah setelah perendaman selama 30 menit.
17. Mengulangi kembali tahap 12 sampai dengan 16 dengan cara menambahkan larutan PBS sebanyak 1,5 ml pada perancah basah yang telah ditimbang, kemudian dimasukkan lagi ke dalam inkubator dengan suhu 37° dan dilakukan pengukuran kembali berat perancah basah pada menit ke- 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, dan 1440.

18. Apabila setelah perendaman selama 24 jam perancah belum mengalami pemecahan, maka perendaman dilanjutkan sampai mencapai pembengkakan maksimal dan terjadi pemecahan perancah.
19. Perancah yang tidak larut dalam PBS, kemudian dikeringkan dengan oven.
20. Menimbang berat kering dari perancah.
21. Menghitung fraksi gel, berdasarkan Nagasawa, dkk. (2004) dapat

digunakan rumus :

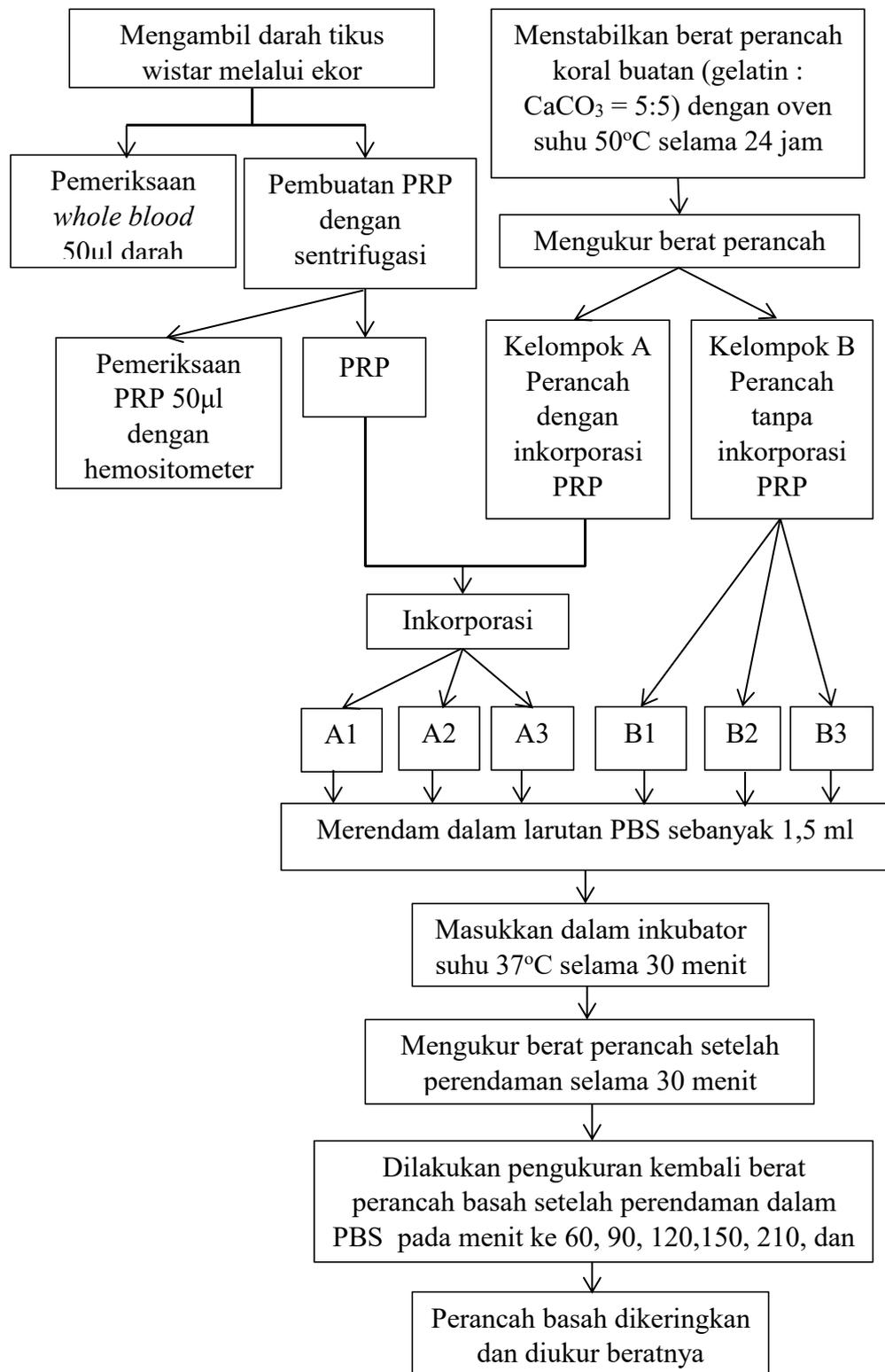
$$\text{Gel fraction (hydrogel\%)} \times 100$$

Keterangan :

Wi : berat awal perancah kering sebelum perendaman

Wd : berat perancah kering yang tidak larut setelah perendaman.

H. Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

I. Analisis Data

Hasil penelitian akan dianalisis dengan membandingkan data profil *swelling* antara perancah koral buatan yang diinkorporasikan PRP dengan perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP. Analisis uji normalitas yang digunakan adalah Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50. Apabila uji normalitas dinyatakan normal, maka uji statistik yang digunakan adalah *Independent Sample t Test*. Apabila uji normalitas dinyatakan tidak normal, maka uji statistik yang digunakan adalah Mann Whitney.