

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *post test design*.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

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

#### **C. Tempat dan Waktu Penelitian**

Tempat penelitian akan dilakukan di:

1. Laboratorium Biokimia FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Laboratorium Biomedis FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
3. Laboratorium Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
4. Laboratorium Patologi FK Universitas Gadjah Mada.

Waktu penelitian akan dilakukan pada: Oktober – Desember.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas

*Platelet-rich plasma*

2. Variabel terikat

Profil degradasi perancah koral buatan

3. Variabel terkontrol

- a. Berat perancah koral buatan (gelatin :  $\text{CaCO}_3$ )
- b. Metode pembuatan PRP pada perancah koral buatan
- c. Volume PBS
- d. Waktu perendaman perancah

#### **E. Definisi Operasional**

1. Perancah koral buatan merupakan perancah koral buatan dengan bahan dasar gelatin dan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) diformulasikan dengan teknik hidrogel yang berbentuk membran tipis dikembangkan oleh peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
2. *Platelet-rich plasma* merupakan platelet yang dihasilkan dari darah tikus yang diproses dengan menggunakan metode dari Matsui dan Tabata (2012).
3. Inkorporasi merupakan proses pemuatan PRP pada perancah koral buatan dengan metode celup.

4. Degradasi adalah gambaran terurainya suatu material hingga habis baik secara kimia maupun biologis yang diukur berdasarkan nilai absorbansi menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 280nm.

## **F. Instrumen Penelitian**

### **1. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian adalah *handscoon*, masker, *microtube* (Eppendorf, Germany), *vacuntainer ACD (acid-citrate-dextrose)* (BD, USA), *centrifuge refrigerated* (Hettich Zentrifuge, Germany), *incubator* (Memmert, Germany), *micropipette* (Brand, USA), *yellow tip* (Biologic, USA), *blue tip* (Biologic, USA), timbangan (Mettler Toledo, Switzerland) dan alat tulis.

### **2. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah perancah koral buatan (gelatin :  $\text{CaCO}_3$  = 5:5) yang dikembangkan oleh tim peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, darah dari tikus , larutan PBS, dan HCl 1N.

## **G. Prosedur Penelitian**

1. Persiapan segala macam alat serta menggunakan masker dan *handscoon*.
2. Menstabilkan semua berat perancah dengan cara di oven pada suhu  $50^\circ\text{C}$  sampai dengan berat semua perancah stabil.
3. Pengambilan sampel darah tikus melalui vena ekor.

- a. Tikus dimasukkan kedalam selongsong yang sesuai ukuran tubuh tikus.
  - b. Ekor tikus dijulurkan keluar dan vena lateralis pada ekor di incis (dipotong) 0,2-2cm dari pangkal ekor dengan silet atau gunting yang steril
  - c. Darah ditampung pada tabung *vacuntainer* ACD kemudian diletakkan miring 45°C.
4. Darah dari tabung *vacuntainer* ACD diambil sebanyak 50µl untuk pemeriksaan *whole blood* di laboratorium Patologi Universitas Gadjah Mada.
5. Sisa darah dari tabung *vacuntainer* ACD akan diolah menjadi PRP secara metode Matsui dan Tabata (2012)
- a. Darah dari tabung *vacountainer* ACD diambil dengan menggunakan *micropipette* dan *yellow tip* kemudian di masukan kedalam *microtube* untuk pembuatan PRP.
  - b. Darah dalam *microtube* disentrifugasi sebanyak dua kali di *centrifuge refrigated*. Sentrifugasi pertama dilakukan dengan kecepatan 450 rcf/g selama tujuh menit paa suhu 4°C.
  - c. 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 kedalam *microtube* 1,5 ml yang kering dan steril.

- d. Sentrifugasi kedua dilakukan dengan kecepatan 1600 rcf/g selama lima menit pada suhu 4°C.
  - e. Setelah sentrifugasi kedua dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat*, dan eritrosit. Plasma dibagian atas *microtube* diambil terlebih dahulu dengan *micropipette*. *Buffy coat* diambil dengan menggunakan *micropippet* dan dipindahkan kedalam *microtube* baru yang kering dan steril. *Buffy coat* itu merupakan fase kaya platelet (PRP).
6. *Platelet-rich plasma* yang telah selesai diolah kemudian diambil sebanyak 50µl untuk diperiksa jumlah plateletnya di laboratorium diagnostik Asri Medical Center.
  7. Mempersiapkan perancah koral buatan (gelatin : CaCO<sub>3</sub> = 5 : 5) yang telah distabilkan beratnya di oven, kemudian perancah ditimbang untuk disamakan beratnya untuk dua variabel perlakuan, yaitu 10mg.
  8. Mempersiapkan *microtube* untuk dua kelompok, yaitu kelompok perancah yang diinkorporasikan dengan PRP diberi kode A dan kelompok yang tanpa diinkorporasikan dengan PRP diberi kode B, masing-masing kelompok terdiri dari tiga pengulangan.
  9. Pemuatan PRP pada perancah koral buatan dengan cara mencelupkan perancah koral buatan pada PRP yang telah disiapkan dalam *microtube* masing-masing *microtube* berisi 40µl PRP.
  10. Perancah koral buatan yang telah diinkorporasikan dengan PRP di masukan kedalam tiga *microtube* yang diberi tanda A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>

kemudian masukan PBS menggunakan *micropipette* sebanyak 1,5 ml kedalam masing-masing *microtube* yang dimaksudkan sebagai pengganti cairan tubuh.

11. Memasukkan perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP kedalam tiga *microtube* yang diberi tanda B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> kemudian masukan PBS kedalam masing-masing *microtube* dengan menggunakan *micropipette* sebanyak 1,5 ml.
12. Semua *microtube* kode A dan kode B kemudian dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C.
13. Mengamati proses degradasi perancah dalam larutan perendam PBS setelah tiga jam diinkubator.
14. Memisahkan perancah dengan larutan supernatant (hasil perendaman) menggunakan teknik sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama dua menit, lalu larutan supernatant dipindahkan ke kuvet spektrofotometer. Menambahkan larutan PBS yang baru kedalam perancah dan dimasukkan kembali kedalam inkubator.
15. Mengamati nilai absorbansi masing-masing larutan supernatant dengan menggunakan spektrofotometer *UVmini-1240 SHIMADZU* dengan panjang gelombang 280nm kemudian dicatat nilainya
16. Mengulangi langkah nomor 13–16 pada setiap periode waktu 3, 6, 24, 48, 72, dan 96jam
17. Setelah melakukan pengamatan pada periode 96 jam dan memisahkan larutan supernatant dengan teknik disentrifugasi, kemudian mengganti

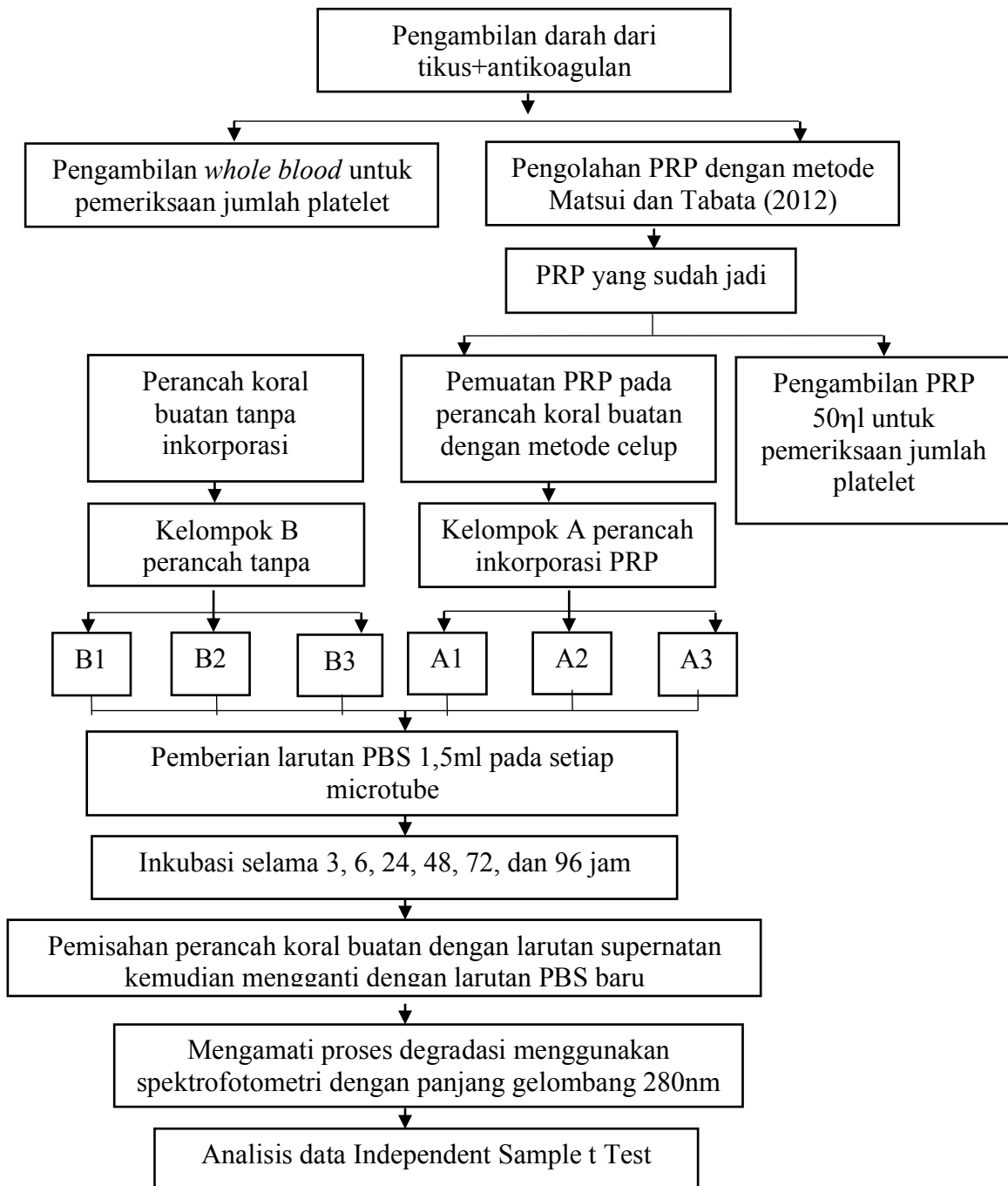
larutan supernatan dengan HCl 1N sebagai larutan aselerasi dan memasukkan kembali ke inkubator.

18. Mengamati proses degradasi perancah dalam larutan perendaman HCl setelah tiga jam diinkubator.
19. Memisahkan larutan supernatan dengan perancah pada masing-masing *microtube* menggunakan teknik sentrifugasi kemudian mengganti dengan larutan HCl baru dan memasukan kembali kedalam inkubator
20. Mengamati dan mencatat nilai absorbansi masing-masing larutan supernatan dengan menggunakan alat *UVmini-1240 (SHIMADZU, Japan)*.
21. Mengulangi langkah nomor 17-19 pada setiap periode waktu 3, 6, dan 24 jam hingga didapatkan nilai absorbansi 100% ketika perancah telah habis seluruhnya.
22. Setelah didapatkan nilai absorbansi 100% dan nilai absorbansi tiap interval waktu, kemudian menghitung persentase degradasi perancah koral buatan tiap interval waktu dengan persamaan perhitungan sebagai berikut: (Saito dan Tabata, 2012)

$$\% \text{ degradasi membran per jam } X = \frac{\text{nilai absorbansi ke } X}{\text{nilai absorbansi } 100\%} \times 100\%$$

X= waktu perendaman

## H. Alur Penelitian



**Gambar 2.**Alur Penelitian



## **I. Analisis Data**

Data dari hasil penelitian ini akan diuji normalitasnya dengan uji Shapiro Wilk. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Independent Sample t Test* untuk data yang terdistribusi normal sedangkan untuk data yang terdistribusi tidak normal uji yang digunakan adalah *Mann Whitney Test*.