

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium yang bersifat eksperimental dengan *post test design*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Perancah hidrogel kalsium karbonat

Perancah hidrogel kalsium karbonat yang digunakan adalah perancah yang telah di kembangkan oleh tim riset rekayasa jaringan FKG-UGM (Mahanani, *et al.*, 2016). Perancah yang dibutuhkan adalah 9 buah.

2. *Platelet Rich Plasma*

Platelet Rich Plasma ini di peroleh dari 3 pendonor oleh mahasiswa Prodi Kedokteran Gigi FKIK UMY yang telah mengisi *informed consent* sebelumnya dan mempunyai kriteria sebagai berikut :

- a. Pendonor harus dalam keadaan sehat dan tidak memiliki penyakit sistemik
- b. Tidak sedang mengalami menstruasi serta tidak sedang hamil.
- c. Pendonor tidak sedang terinfeksi virus maupun bakteri.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

- a. Penelitian pada proses pembuatan *Platelet Rich Plasma* dan uji dari inkorporasi *Platelet Rich Plasma* dilakukan di Laboratorium Biokimia FKIK UMY.
- b. Pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium RSGM AMC.
- c. Pewarnaan menggunakan giemsa dan uji dari inkorporasi *Platelet Rich Plasma* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi AMC.
- d. Perhitungan jumlah *Platelet Rich Plasma* dilakukan di Laboratorium *Molecular Medicine and Therapy Research* (MMT) RSGM AMC.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan 29 Januari – 26 Februari 2019.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel

a. Variabel bebas

Variasi konsentrasi antara perancah hidrogel gelatin dan CaCO_3

b. Variabel terikat

Platelet Rich Plasma yang di muat dalam perancah hidrogel gelatin- CaCO_3

c. Variabel terkontrol

- Metode dalam pembuatan *Platelet Rich Plasma*.

- Antikoagulan yang di gunakan.
 - Ukuran dari perancah hidrogel gelatin.
 - Volume *Platelet Rich Plasma* yang di inkorporasikan.
 - Perancah hidrogel CaCO_3 yang digunakan.
 - pH pada perancah.
- d. Variabel tak terkendali
- Jumlah trombosit yang rusak

E. Definisi Operasional

1. Perancah hidrogel gelatin adalah perancah yang berbentuk membran yang di desain menyerupai tulang yang berpori dengan bahan dasar berupa gelatin dan CaCO_3 dengan konsentrasi gelatin- CaCO_3 perbandingan 5:5, 4:6 dan 10:0.
2. *Platelet Rich Plasma* (PRP) merupakan platelet yang di dapatkan dari manusia melalui hasil sentrifugasi darah pasien untuk memisahkan plasma dari sel darah merah, selanjutnya PRP di pisahkan dari *Platelet Poor Plasma* sehingga menghasilkan konsentrasi platelet yang tinggi.
3. Inkorporasi adalah proses dari pemuatan PRP pada perancah hidrogel dengan menggunakan metode tetes.
4. Metode tetes merupakan metode dalam pemuatan PRP pada perancah hidrogel gelatin- CaCO_3 dengan cara meneteskan PRP sebanyak 30 μl pada perancah selama 15 menit.

F. Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan sebagai berikut :

- Masker, *microtube*, *handscoon*, *micropipette*, *vancountainer ACD*, *centrifuge refrigerated*, *centrifuge*, *deck glass*, *yellow tip*, *blue tip*.

Bahan yang digunakan sebagai berikut :

- Perancah hirogel gelatin-CaCO₃ dengan konsentrasi gelatin gelatin-CaCO₃ 5:5, 4:6 serta 10:0, pewarna giemsa, darah dari pendonor, antikoagulan sitrat, akuades, formalin.

G. Cara Pengumpulan Data

1. Pengambilan sampel darah dari 3 pendonor yang di lakukan di Laboratorium Diagnostik Rumah Sakit Gigi dan Mulut AMC. Darah yang diambil melalui vena di bagian cubiti sebanyak 10 ml dan kemudian dimasukkan ke dalam *vacountainer* yang sudah diisi antikoagulan sitrat.
2. Menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
3. Perancah hidrogel CaCO₃ (Mahanani, *et al.*, 2016)
 - CaCO₃ yang digunakan awal mulanya berasal dari *calcite* CaCO₃ berupa bubuk dengan 10% w/v, 1.5 gram, dari konsentrasi padat yang dicampurkan dengan air suling deionisasi. Pengadukan dilakukan pada suhu kamar selama 30 menit sampai bubuk kalsium karbonat larut dalam air. Setelah

pengadukan selesai, campuran dipindahkan ke *water bath* pada suhu 40°C dan ditambahkan gelatin. Gelatin yang digunakan berasal dari gelatin tipe B.

- Pendispersan yang digunakan adalah sodium sitrat. Selanjutnya, kalsium karbonat digabungkan dengan gelatin yang telah di siapkan hingga suspensi tersebut menjadi homogen.
- Larutan tersebut kemudian dicetak dalam sebuah cover dari 24 lempengan dan membentuk ketebalan hingga 0,3 mm yang nantinya digunakan sebagai perancah menyerupai piringan yang cukup tebal. Perancah tersebut dibekukan pada -20°C selama 24 jam dan dilanjutkan dengan *freeze-drying* selama 24 jam. Setelah perancah yang dikeringkan terbentuk selanjutnya dilakukan *cross-linked* dengan metode *dehydrothermal* menggunakan *vacuum oven* selama 72 jam.

4. Pembuatan *Platelet Rich Plasma* (Matsui dan Tabata, 2012)

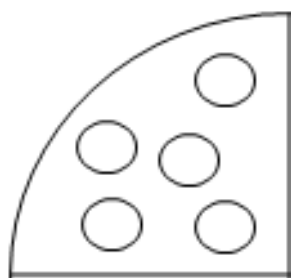
- tahap pertama dalam persiapan PRP yaitu darah dari probandus di masukkan kedalam tabung yang mengandung asam-sitrat-dekstrosa. Selanjutnya di beri antikoagulan dan di sentrifugasi selama tujuh menit pada 450 g pada suhu 4 °C.
- selanjutnya plasma kuning bersamaan dengan *buffy coat* dengan hati-hati di pindahkan ke tabung *BD Vacutainer* setelah itu disentrifugasi kembali selama 5 menit sebanyak

1600 gram pada suhu 4 °C untuk memisahkan *Platelet Poor Plasma* dari platelet yang kaya akan plasma.

- Setelah disentrifugasi akan terlihat tiga lapisan dimana PRP terletak di lapisan bagian tengah dan selanjutnya di pisahkan ke dalam *microtube* yang steril dan kering.
5. Selanjutnya lebih dahulu menghitung jumlah platelet pada *whole blood* dengan cara mengambil 30 μ l *whole blood* dengan *micropipette* dan meletakkannya pada ujung kanan *deck glass* lalu buat apusan dengan *deck glass* lainnya dan membentuk sudut 45 derajat dorong hingga membentuk bagian tipis, tunggu hingga kering lalu difiksasi menggunakan formalin dan diberi pewarnaan giemsa selama 5 menit selanjutnya dicuci menggunakan akuades dan di keringkan.
 6. Perhitungan platelet dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dalam 5 lapang pandang dengan perbesaran objektif 100 kali. jumlah platelet yang dihitung adalah jumlah platelet yang terlihat pada mikroskop cahaya di kali $1000/\text{mm}^3$
 7. Menyiapkan perancah hidrogel CaCO_3 dengan variasi konsentrasi gelatin- CaCO_3 5:5, 4:6 dan 10:0 yang telah distabilkan beratnya untuk ketiga kelompok yaitu kelompok A untuk gelatin- CaCO_3 5:5, kelompok B untuk 4:6 dan kelompok C untuk 10:0. Setiap kelompok dengan jumlah 3 sampel yang sama. Sampel tersebut

digunakan untuk perhitungan jumlah PRP menggunakan mikroskop cahaya. Perancah diletakkan di atas *deck glass*.

8. Sampel tersebut diinkorporasi PRP terlebih dahulu dengan metode tetes yaitu meneteskan 30 μ l PRP ke atas perancah menggunakan *micropipette* selama 15 menit, selanjutnya dilakukan fiksasi dengan formalin.
9. Fiksasi menggunakan formalin yang diteteskan pada masing-masing perancah kemudian ditunggu selama 3 menit dan dikeringkan, setelah fiksasi dilakukan pewarnaan pada preparat dengan pewarnaan giemsa 3% dan di cuci menggunakan akuades serta dikeringkan kembali.
10. menghitung platelet dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 4x, 10x, 40x, dan 100x.
11. Setiap perancah akan dihitung jumlah PRP dengan pengamatan 5 lapang pandang seperti gambar berikut :

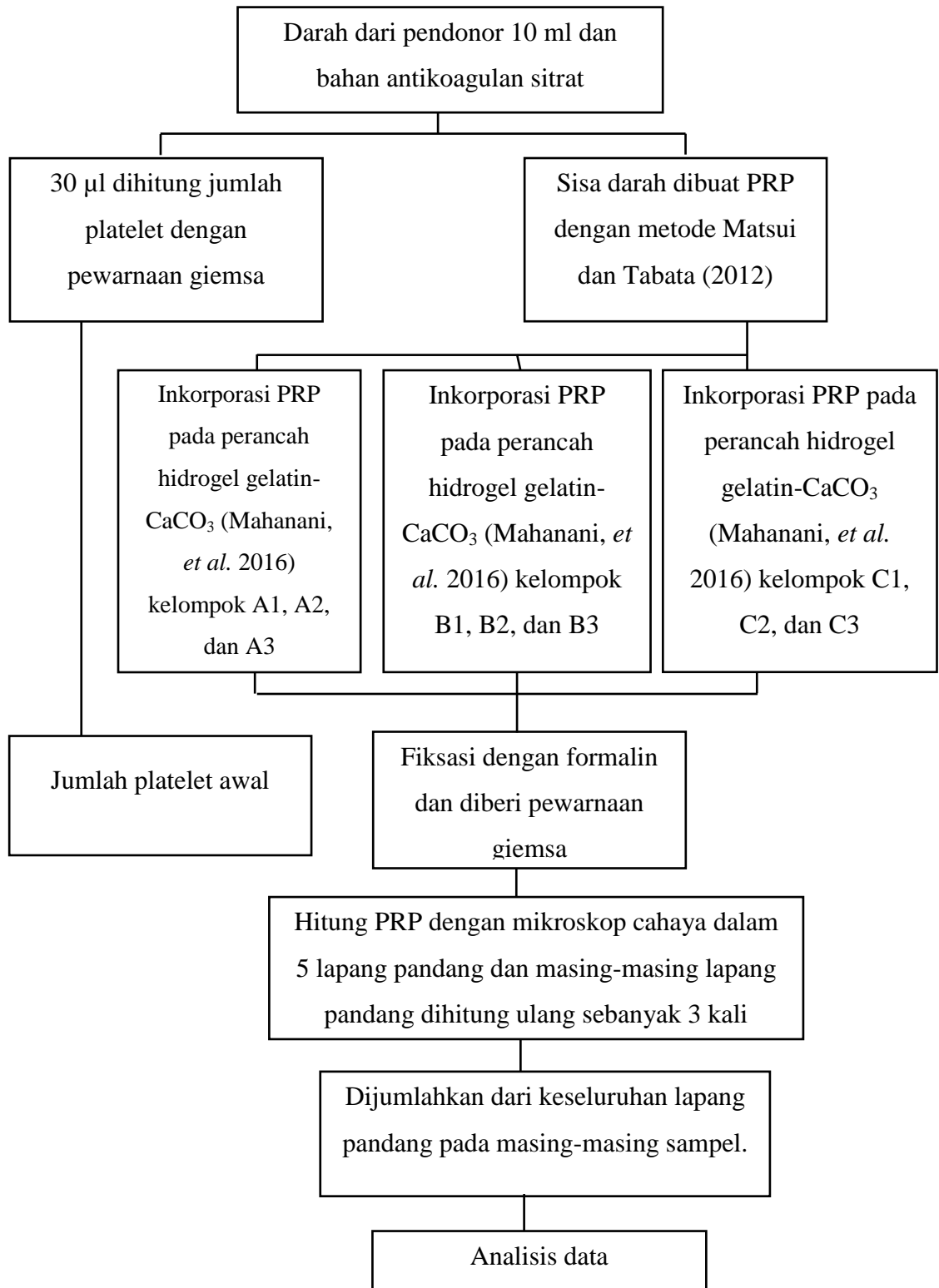


Gambar 1.

Pembagian lapang pandang pada setiap perancah.

12. Pada setiap lapang pandang akan dihitung jumlah PRP dengan 3 kali perhitungan pada masing-masing lapang pandang dan dirata-rata secara keseluruhan di setiap lapang pandang tersebut. Setelah itu dilakukan penjumlahan pada 5 lapang pandang tersebut di masing-masing perancah.

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah dengan *One Way ANOVA* terhadap perbedaan rata-rata jumlah dari pemuatan platelet yang diinkorporasikan pada perancah hidrogel dengan konsentrasi gelatin- CaCO_3 5:5, 4:6 dan 10:0. Perbedaan akan dikatakan bermakna jika memenuhi ($p < 0,05$) dan jika bermakna maka akan dilanjutkan dengan uji *post-hoc Least Significant Difference (LSD)* dimana akan di ketahuai kemaknaan dari perbedaan antar variasi konsentrasi masing-masing perancah.