

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian yang akan dilakukan menggunakan jenis penelitian laboratorium yang bersifat experimental, dengan desain penelitian menggunakan *Post Test Design*.

#### **B. Populasi dan Sample 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 strain wistar (*Rattus norvegicus*) melalui vena lateralis ekor dengan berat standar 150 gram.
3. Perhitungan sample menggunakan triplicate (n=3) untuk setiap kelompok sampel sehingga didapatkan jumlah sampel adalah 24 sampel.

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Tempat :

1. Pengambilan darah tikus dilakukan di Laboratorium Biomedis FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Pembuatan PRP dilakukan di Laboratorium Biokimia FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
3. Penimbangan perancah dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

4. Pemeriksaan PRP dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Waktu : Oktober- Desember 2016

#### **D. Variable Penelitian**

1. Variabel pengaruh  
PRP
2. Variabel terpengaruh  
Waktu profil *weight loss*
3. Variabel terkendali
  - a. Waktu perendaman
  - b. Ukuran perancah
  - c. Metode pemuatan PRP
  - d. Volume *aquadest*

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

1. Perancah koral buatan dalam penelitian ini adalah perancah dengan berbentuk membran dan dibuat dengan teknik hidrogel dengan berbahan kolagen, gelatin, dan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ).
2. *Platelet-rich plasma* merupakan jumlah platelet dalam volume plasma minimal yang diambil dari darah tikus melalui vena lateralis ekor dengan menggunakan metode Matsui dan Tabata (2012).
3. Profil *weight loss* merupakan gambaran pada saat perancah mengalami proses degradasi dimana terdapat penurunan berat dan penurunan dimensi dari perancah.

4. Inkorporasi merupakan proses pemuatan PRP pada perancah koral buatan dengan metode celup.

## **F. Alat dan Bahan Penelitian**

### **1. Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya *handscoon*, masker, alat tulis, timbangan (Mettler Toledo, *Switzerland*), *centrifuge refrigerated* Rotina 35R (Hettich Zentrifuge, *Germany*), *blue tip* (Biologic, USA), *yellow tip* (Biologic, USA), *micropipette* (BRAND, USA), *microtube* (Eppendorf, *Germany*), *Vacountainer Acid Citrate Dextrose* (BD, USA), Hemositometer (Mindray, *China*), *Oven* dan Inkubator (Mettler, *Germany*).

### **2. Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah perancah koral buatan dengan gelatin/CaCO<sub>3</sub> konsentrasi 5:5, *aquadest*, darah tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*).

## **G. Prosedur Penelitian**

1. Menstabilkan berat perancah koral buatan gelatin CaCO<sub>3</sub> 5:5 dengan mengeringkan semua perancah dalam oven pada suhu 50°C hingga beratnya stabil sebelum diberi perlakuan.
2. Mengambil 10 ml sample darah dari tikus melalui vena ekor (V. Lateralis ekor)
  - a. Tikus dimasukkan dalam selongsong yang sesuai ukurannya tubuh tikus.

- b. Ekor tikus dijulurkan keluar dan vena lateralis pada ekor di Incis (dipotong) 0,2 – 2 cm dari pangkal ekor dengan silet atau gunting yang steril.
  - c. Darah ditampung pada *vacountainer* ACD , kemudian diletakkan miring 45° dan dibiarkan mengendap pada suhu kamar.
3. Mengambil sebanyak 50  $\mu$ l darah untuk dilakukan perhitungan jumlah platelet menggunakan pewarnaan Giemsa di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
4. Pembuatan *platelet-rich plasma* (PRP) dengan metode Matsui dan Tabata.
  - a. Darah dari *vacountainer* ACD diambil sebanyak 1ml dengan menggunakan micropipet dan *yellow tip* kemudian dimasukkan kedalam setiap *microtube eppendorf* untuk pembuatan PRP.
  - b. Darah dalam *microtube eppendorf* disentrifugasi sebanyak 2 kali di *centrifuge refrigerated*. Sentrifugasi pertama dilakukan dengan kecepatan 450 rcf/g selama 7 menit pada suhu 4 derajat.
  - c. Setelah sentrifugasi pertama dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat* dan eritrosit. Plasma dari bagian atas *microtube eppendorf* diambil dengan *micropipette*, kemudian ambil bagian lapisan putih tipis diatas eritrosit dan pindahkan kedalam *microtube eppendorf* 1,5 ml yang kering dan steril. Pada pengambilan *buffy coat* akan terambil sedikit eritrosit dan plasma. Sentrifugasi ke dua dilakukan dengan kecepatan 1600 rcf/g selama 5 menit pada suhu 4 derajat.

- d. Setelah sentrifugasi kedua dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat*, dan eritrosit. Plasma dibagian atas *microtube eppendorf* diambil terlebih dahulu dengan *micropet*. *Buffy coat* diambil dengan menggunakan *micropipet* sebanyak 1 ml dan dipindahkan kedalam *microtube* baru yang kering dan steril. *Buffy coat* tersebut merupakan fase kaya platelet (PRP).
5. Mengambil 50µl PRP untuk dilakukan perhitungan jumlah platelet menggunakan pewarnaan Giemsa di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada..
  6. Mempersiapkan perancah yang sebelumnya sudah dikeringkan dengan oven kemudian ditimbang berat keringnya.
  7. Membagi perancah menjadi 2 kelompok besar masing-masing dengan berat yang sama yaitu kelompok A inkorporasi PRP dan kelompok B tanpa inkorporasi PRP.
  8. Kelompok A inkorporasi PRP dibagi menjadi 4 kelompok yaitu A1, A2, A3, A4 yang masing-masing kelompok tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
  9. Kelompok B tanpa inkorporasi PRP dibagi menjadi 4 kelompok yaitu B1, B2, B3, B4 yang masing-masing kelompok tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
  10. Memberikan tanda A1, A2, A3, A4 dan B1, B2, B3, B4, pada masing-masing botol sesuai kelompoknya, kemudian menimbang berat masing-masing botol.

11. Pemuatan PRP pada perancah koral buatan dengan teknik tetes perancah koral buatan pada 75  $\mu$ l PRP yang telah disiapkan dalam pot obat selama 15 menit. Perlakuan hanya diperuntukan pada perancah koral buatan kelompok A1, A2, A3, A4.
12. Menyiapkan bahan perendam yaitu *aquadest*.
13. Memasukan perancah kedalam botol yang sudah diberi tanda,
14. Memasukan *aquadest* pada perancah kelompok A inkorporasi PRP A1, A2, A3, A4 sebanyak 5ml menggunakan mikropipet.
15. Memasukan *aquadest* pada perancah kelompok B tanpa inkorporasi PRP 1, B2, B3, B4 sebanyak 5ml menggunakan mikropipet.
16. Memasukkan botol-botol berisi rendaman perancah tersebut kedalam inkubator pada suhu 37°C.
17. Menginkubasi A1 selama 2 minggu, A2 selama 4 minggu, A3 selama 6 minggu dan A4 selama 8 minggu.
18. Menginkubasi B1 selama 2 minggu, B2 selama 4 minggu, B3 selama 6 minggu dan B4 selama 8 minggu.
19. Memisahkan perancah yang telah diinkubasi dari larutan *aquadest* kemudian ditiriskan menggunakan kertas tissue.
20. Perancah- perancah tersebut kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga beratnya stabil.
21. Mengukur berat masing perancah kemudian dicatat.
22. Menghitung proses *weight loss* dengan menggunakan rumus.

$$\%W = 100 \times \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \dots\dots\dots (1)$$

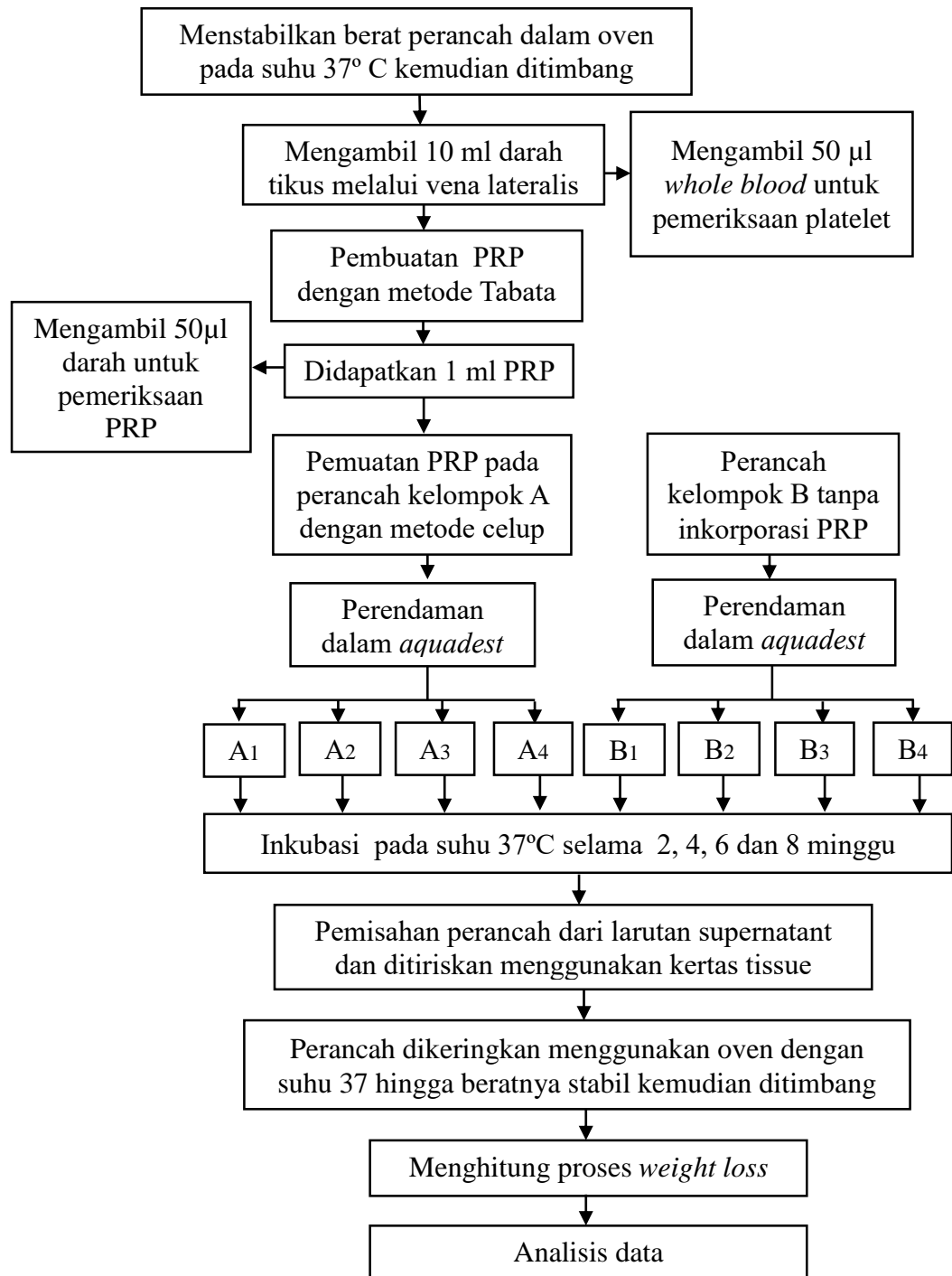
Keterangan:

1.  $W_0$  : Berat awal perancah yang dikeringkan
2.  $W_t$  : Berat perancah yang dikeringkan setelah waktu degradasi

Nilai-nilai tersebut dinyatakan sebagai rata-rata dari 3 kali pengulangan.

(Modifikasi metode Sera, 2014).

## H. Alur Penelitian



**Gambar 1.** Alur Penelitian



## **I. Analisis data**

Data dari hasil penelitian tersebut dianalisis dan dibahas dengan membandingkan profil *weight loss* antara perancah koral buatan yang berbahan dasar gelatin dan  $\text{CaCO}_3$  konsentrasi 5:5 dengan inkorporasi PRP dan tanpa inkorporasi PRP. Analisa uji normalitas data menggunakan shapiro-Wilk dan uji statistik hasil penelitian menggunakan *Independent T test* dengan nilai kemaknaan  $P < 0,05$  dan *one ways ANOVA* jika distribusi data normal, jika distribusi data tidak normal maka menggunakan analisa kruskal-wallis.