

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk penelitian laboratorium yang bersifat eksperimental dengan *Post Test Design*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Penelitian ini dilakukan :
 - a. Pengambilan darah dan pembuatan *platelet-rich plasma* dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
 - b. Perhitungan jumlah platelet dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
2. Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei - Agustus 2014 di Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

C. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel darah yang diperoleh dari donor (mahasiswa Prodi Kedokteran Gigi FKIK UMY) yang telah mengisi *informed consent* dan mempunyai kriteria :

- a. Dalam kondisi sehat
- b. Tidak sedang menstruasi (jika pendonor wanita)
- c. Tidak sedang hamil
- d. Tidak mempunyai penyakit sistemik seperti diabetes melitus, hepatitis, dan HIV/AIDS

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas :
Metode preparasi PRP
2. Variabel Terikat :
Jumlah Platelet
3. Variabel Terkendali :
 - a. Volume darah yang disentrifugasi
 - b. Volume antikoagulan ACD dan CPD
 - c. Kecepatan sentrifugasi
 - d. Waktu sentrifugasi
 - e. Suhu
 - f. Jenis antikoagulan ACD dan CPD
 - g. Donor PRP probandus standar
 - h. Metode pembuatan PRP

E. Definisi Operasional

1. Darah adalah sampel yang akan digunakan dalam pembuatan PRP yang diproses dengan cara sentrifugasi ganda untuk memisahkan komponen-komponen yang ada di dalamnya.
2. Platelet adalah bagian dari darah yang berada di dalam plasma darah dan terdapat protein yang mengandung tujuh faktor pertumbuhan.
3. *Whole Blood* (WB) adalah jumlah darah murni tanpa perlakuan apapun
4. *Platelet-Rich Plasma* (PRP) merupakan platelet yang dihasilkan setelah proses sentrifugasi dengan Metode Matsui-Tabata (2011) dan Metode Nugraha *et.al.*, (2012). Platelet di dalam PRP ini berbeda jumlahnya saat berada di dalam *whole*

blood . Platelet yang sudah melalui proses sentrifugasi bisa berjumlah 4 kali lipat dari jumlah platelet saat di dalam *whole blood*.

5. Metode Matsui-Tabata (2011) dan Metode Nugraha *et.al.*, (2012) adalah metode yang digunakan dalam preparasi pembuatan PRP dalam penelitian ini.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

- a. Mikropipet digunakan untuk mengambil *buffy coat* setelah sentrifugasi
- b. Mikrotube digunakan sebagai tempat PRP
- c. Centrifuge adalah alat untuk sentrifugasi
- d. Vacutainer ACD dan CPD adalah tempat yang berisi antikoagulan ACD dan CPD untuk sampel darah yang di ambil
- e. Kapas
- f. Povidone Iodine
- g. Handscoon
- h. Masker
- i. Kaca preparat
- j. Pewarnaan giemsa untuk menghitung jumlah platelet

2. Bahan Penelitian

- a. Darah
- b. Antikoagulan *Acid-citrate-dextrose* (ACD)
- c. Antikoagulan *Citrate-Phosphate-dextrose* (CPD)

G. Jalannya Penelitian

1. Menyiapkan sampel darah dari pendonor
 - a. Memberikan *informed consent* kepada ketiga pasien pendonor.
 - b. Memberikan pengarahan kepada pasien terhadap apa yang akan dilakukan dan digunakan untuk apa sampel darah yang di ambil.
 - c. Menyiapkan kapas, povidone iodine, dan vacutainer ACD dan CPD yang akan digunakan untuk mengambil sampel darah dari pasien pendonor.
 - d. Pendonor A, B, dan C masing-masing akan diambil darahnya sebanyak 18 ml.
 - e. Sampel darah sebanyak 18 ml dari tiap pendonor akan dibagi dua kedalam vacutainer yang berisi ACD 1 ml dan CPD 1 ml, sehingga akan didapatkan perbandingan 9:1
 - f. Sampel darah yang diambil akan langsung digunakan sehingga tidak melalui tahap penyimpanan
2. Isolasi PRP
 - a. Metode Matsui-Tabata :
 1. Sampel darah dari pendonor A yang telah bercampur dengan antikoagulan ACD di dalam tabung vacutainer dipindahkan ke dalam mikrotube lalu masukkan ke dalam mesin centrifuge dan atur dengan kecepatan 450 rcf/g dengan suhu 4 derajat celcius dalam waktu 7 menit, lalu lakukan sentrifugasi.
 2. Setelah 7 menit matikan mesin centrifuge dan kita ambil mikrotube yang berisi sampel darah, dalam mikrotube akan terlihat *buffy coat* diantara eritrosit dan cairan plasma. Ambil *buffy coat* tersebut lalu kita masukkan ke dalam mikrotube kosong.

3. *Buffy coat* yang sudah siap akan kita sentrifugasi kedua dengan kecepatan 1600 rcf/g dengan suhu 4 derajat celcius dalam waktu 5 menit.
4. Setelah 5 menit maka akan terlihat lagi cairan ditengah, itulah platelet yang akan kita hitung yang disebut PRP.
5. Diulangi dengan cara yang sama pada sampel darah dari donor B dan C

b. Metode Nugraha *et.al.*

1. Sampel darah yang telah bercampur dengan antikoagulan CPD di dalam tabung vacutainer dipindahkan ke dalam mikrotube lalu masukkan ke dalam mesin centrifuge dengan kecepatan 1300 rcf/g dalam waktu 5 menit dan suhu 4 derajat celcius, lalu lakukan sentrifugasi.
2. Setelah 5 menit matikan mesin centrifuge dan kita ambil mikrotube yang berisi sampel darah dan akan terlihat *buffy coat* diantara eritrosit dan cairan plasma. Kita ambil *buffy coat* tersebut lalu kita masukkan ke dalam mikrotube kosong.
3. *Buffy coat* yang sudah siap akan kita sentrifugasi kedua dengan kecepatan 2300 rcf/g dalam waktu 7 menit dan suhu 4 derajat celcius.
4. Setelah 7 menit maka akan terlihat lagi cairan ditengah, itulah platelet yang akan di hitung yang bernama PRP.
5. Diulangi dengan cara yang sama pada sampel darah dari donor B dan C

3. Perhitungan Platelet

Setiap sampel yang sudah menghasilkan Platelet akan dihitung dengan pewarnaan giemsa di Laboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada

H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah data berskala numerik, sehingga analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan Uji Independent t-Test dengan tingkat kepercayaan 95%.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini membutuhkan sampel darah manusia sehingga akan dilakukan pengambilan darah pada manusia, oleh sebab itu akan dilampirkan *informed consent* sebagai bukti persetujuan bahwa pendonor bersedia diambil darahnya untuk jalannya penelitian ini.

J. Alur Penelitian

