

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilakukan dengan menggunakan desain penelitian klinis laboratoris dengan *pre test post test design*.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

1. Tempat penelitian
  - a. Pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Diagnostik Asri Medical Center.
  - b. Perhitungan jumlah *platelet* dilakukan di Laboratorium Diagnostik Asri Medical Center.
  - c. Pembuatan PRP dan PRF dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2017 sampai Februari 2018.

#### **C. Populasi dan Sampel Penelitian**

1. Perancah yang digunakan dalam penelitian ini merupakan perancah koral buatan yang telah dikembangkan oleh tim riset rekayasa jaringan dari FKG – UGM. Jumlah perancah yang dibutuhkan adalah 9 buah.
2. *Platelet Rich Plasma* dan *Platelet Rich Fibrin* sebanyak 1 ml (tiap donor) yang diperoleh dari donor (mahasiswa FKIK UMY) sebanyak 4 orang yang telah mengisi *inform consent* dan telah memenuhi beberapa kriteria berikut :
  - a. Status kesehatan donor dalam keadaan sehat.
  - b. Tidak sedang menstruasi ataupun hamil (bagi donor perempuan).

- c. Tidak memiliki penyakit sistemik (Diabetes militus, Hipertensi, Penyakit jantung, hemophilia, dll).
- d. Tidak memiliki penyakit menular (HIV, Hepatitis, dll).

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

1. Identifikasi variabel
  - a. Variabel pengaruh
    - 1) *Platelet Rich Plasma*
    - 2) *Platelet Rich Fibrin*
  - b. Variable terpengaruh
    - 1) Profil *swelling* perancah
  - c. Variable terkendali
    - 1) Ukuran perancah
    - 2) Metode pembuatan PRP dan PRF
    - 3) Metode pemuatan PRP dan PRF
    - 4) Waktu perendaman
    - 5) Suhu penyimpanan

### **E. Definisi Operasional**

1. Perancah koral buatan merupakan perancah dengan komposisi kalsium karbonat dan gelatin dengan perbandingan 5 : 5 yang di desain menyerupai struktur dari tulang.
2. *Platelet rich plasma* merupakan *platelet* konsentrasi tinggi yang merupakan agen *autologous* dengan penambahan bahan antikoagulan. Terbuat dari darah manusia yang diproses dengan menggunakan metode Matsui dan Tabata (2012). Metode ini dilakukan dalam 2 tahap sentrifugasi untuk memisahkan antara PRP dengan PPP dan eritrosit serta adanya penambahan *thrombin* dan antikoagulan EDTA.
3. *Platelet rich fibrin* merupakan *platelet* yang juga berfungsi sebagai agen *autologous* tanpa penambahan bahan antikoagulan. Berasal dari darah manusia yang diproses dengan metode Choukroun dkk (2001). Metode ini menggunakan 1 kali proses sentrifugasi dan tanpa dilakukan penambahan antikoagulan.
4. Profil *swelling* merupakan salah satu karakteristik dari perancah yang mempengaruhi proses regenerasi jaringan. Profil *swelling* merupakan proses pembengkakan dari perancah yang kemudian akan terjadi pemecahan setelah perancah mengalami pembengkakan maksimal.

### **F. Instrument Penelitian**

#### 1. Alat

- |                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| a) <i>Micropipet</i> | d) <i>Oven Memmert</i>      |
| b) Pinset            | e) <i>Incubator Memmert</i> |
| c) Neraca            | f) <i>Cup Serum</i>         |

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| g) Sentrifuge ( <i>Hettich EBA 200</i> ) | o) Alat saring                 |
| h) <i>Vortex mixer</i>                   | p) Kertas saring               |
| i) Hemositometer ( <i>Mindray</i> )      | q) Jarum Vacuntainer 22 x 1 ml |
| j) Vacuntainer EDTA 3 ml                 | r) <i>Vacumm holder</i>        |
| k) Vacuntainer Plain 10 ml               | s) <i>Torniquete</i>           |
| l) <i>Yellow tip</i>                     | t) Pot kecil                   |
| m) <i>Blue tip</i>                       | u) <i>Ice box</i>              |
| n) <i>Microtube</i>                      |                                |

## 2. Bahan

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| a) Perancah koral buatan  | f) Alkohol 70 %                         |
| b) Sampel darah           | g) PBS ( <i>Phospat Buffer Saline</i> ) |
| c) Kapas                  | h) Masker                               |
| d) Plaster <i>hypafix</i> | i) Kertas label                         |
| e) <i>Handscoon</i>       |   |

## G. Prosedur Penelitian

### 1. Persiapan sampel darah

- a) Memberikan informasi kepada pendonor mengenai penggunaan darah yang akan diambil.
- b) Memberikan *inform consent* kepada pendonor.
- c) Pengambilan darah dilakukan oleh tenaga ahli di Laboratorium Diagnostik Asri Medical Center.

d) Kemudian darah dari donor (10 ml tiap donor) langsung dimasukkan dalam tabung *vacuntainer*.

2. Pembuatan PRP dengan metode Matsui dan Tabata (2012)

a) Darah yang diambil dari donor sebanyak 12 ml (tiap donor) langsung dimasukkan dalam *vacuntainer* EDTA 3 ml sebanyak 4 tabung.

b) Sampel darah sebanyak 3 ml dilakukan penghitungan jumlah *platelet* dengan menggunakan *Hemositometer Mindray*.

c) Sisa sampel darah dalam *vacuntainer* EDTA dilakukan pembuatan PRP dengan 2 tahap sentrifugasi. Sentrifugasi pertama dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 1200 rpm. Terbentuk 3 lapisan yang terdiri dari lapisan kekuningan / plasma (PPP), *buffy coat* (PRP) dan sel darah merah.

d) Lapisan atas plasma (PPP) dan *buffy coat* (PRP) dipisahkan dari lapisan sel darah merah dan dipindahkan ke dalam tabung *vacuntainer plain* bersih dengan menggunakan *micropipete* dan *blue tip*.

e) Sentrifugasi tahap kedua dilakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Terbentuk 3 lapisan berupa plasma (PPP), *buffy coat* (PRP) dan endapan *platelet* (fibrin dan leukosit).

f) Lapisan plasma (PPP) di pisahkan dari lapisan *buffy coat* (PRP) dan endapan *platelet* dengan menggunakan *micropipette* dan dipindahkan kedalam *microtube*, sehingga tersisa 2 lapisan yaitu *buffy coat* (PRP) dan endapan *platelet*.

- g) Campurkan antara lapisan *buffy coat* (PRP) dan endapan *platelet* dengan menggunakan *vortex mixer* hingga homogen dan pada fase ini disebut dengan PRP.
- h) Hitung kembali jumlah *platelet* pada PRP yang telah terbentuk dengan alat *Hemositometer Mindray*.
- i) Kemudian pindahkan PRP yang sudah terbentuk dengan menggunakan *micropipette* dan *blue tip* ke dalam *microtube* yang kering dan steril.
- j) Simpan PRP di dalam freezer.

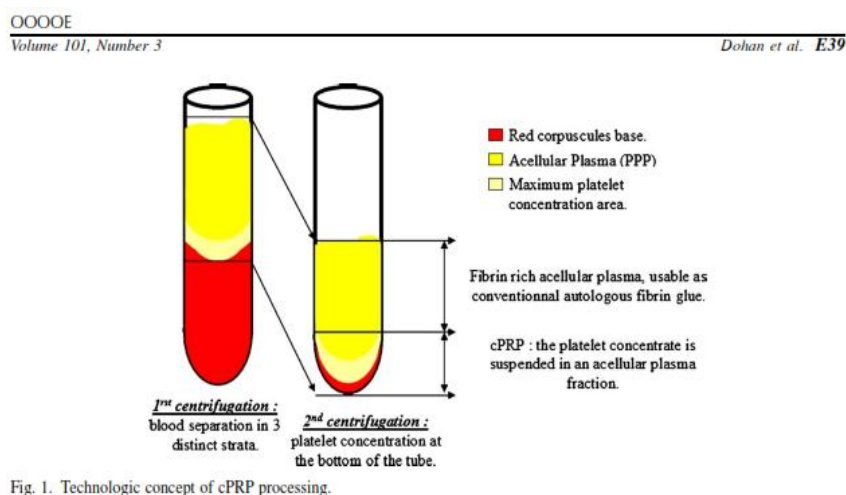


Fig. 1. Technologic concept of cPRP processing.

#### Gambar 4. Pembuatan PRP

3. Pembuatan PRF dengan metode Choukroun dkk (2001)
  - a) Sampel darah yang telah diambil dari pasien sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam *vacuntainer plain* (tanpa antikoagulan) dan segera dilakukan sentrifugasi untuk menghindari pembekuan darah.
  - b) Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Terbentuk 3 lapisan yaitu PPP, *fibrin clot* (PRF) dan sel darah merah. Lapisan *fibrin clot* atau PRF berada di bagian tengah tabung.

- c) Pisahkan lapisan PPP dan PRF dari lapisan sel darah merah dengan menggunakan *micropipete* dan *blue tip* ke dalam tabung *vacuntainer plain* bersih. Kemudian diamkan dalam lemari es selama 24 jam.
- d) Setelah 24 jam, pindahan dalam *cup serum* dan simpan di dalam *freezer*.

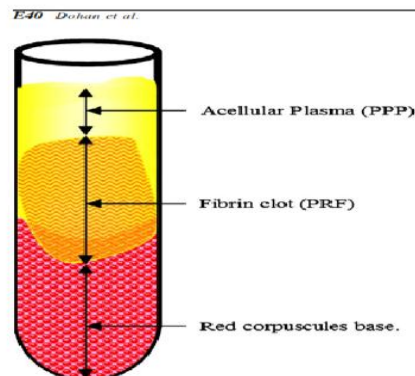


Fig. 2. Blood centrifugation immediately after collection allows the composition of a structured and resistant fibrin clot in the middle of the tube, just between the red corpuscles at the bottom and acellular plasma at the top.

### Gambar 5. Pembuatan PRF

#### 4. Inkorporasi PRP dan PRF pada perancah

Inkorporasi PRP dan PRF dilakukan dengan menggunakan metode celup, berdasarkan penelitian Matsui dan Tabata (2012) dengan menggunakan metode ini dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah baru. Prosedur dilakukan dengan cara :

- a) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan seperti perancah, PRP, PRF, *microtube*, *micropipete* dan piset.
- b) Membuat pengelompokan, A untuk kelompok inkorporasi dengan PRP, B untuk kelompok inkorporasi dengan PRF dan C untuk kelompok tanpa penambahan PRP dan PRF . Kelompok A (A1, A2, A3) dilakukan inkorporasi PRP pada perancah sebanyak 0,6 ml pada setiap perancah.

Kelompok B (B1, B2, B3) dilakukan inkorporasi PRF pada perancah sebanyak 0,6 ml pada setiap perancah.

- c) Sebelum diinkorporasi PRP dan PRF perancah utuh dalam bentuk lembaran / membran ditimbang terlebih dahulu untuk setiap sampel sebagai nilai  $W_0$  kering.
- d) *Incorporasi* dilakukan dengan metode celup. Tahap pertama dengan mengambil PRP dan PRF yang masing-masing sebanyak 100  $\mu$ l ke dalam *microtube* dengan menggunakan *micropipete* dan *blue tip* dan kemudian masukkan perancah utuh ke dalam *microtube* dan kemudian biarkan selama 10 menit hingga seluruh PRP dan PRF terserap sempurna ke dalam perancah. Pindahkan perancah yang telah terinkorporasi ke dalam pot.
- e) Kemudian lakukan penimbangan ulang sebagai nilai  $W_0$  basah (berat setelah *incorporasi*).
- f) Kemudian masing-masing perancah dimasukkan ke dalam pot dan diisi dengan larutan PBS ( $\frac{1}{3}$  pot) hingga perancah terendam seluruhnya.
- g) Masukkan pot-pot tersebut kedalam *incubator* dengan suhu 37<sup>0</sup>C. Masing-masing perancah direndam dan diinkubasi dengan periode waktu 30 menit, 1, 2, 4, 6 dan 24 jam (Li dkk., 2004).
- h) Periode waktu pertama (30 menit), masing-masing sampel diangkat dan ditiriskan dengan alat saring dan kemudian lakukan penimbangan perancah basah ( $W_1$ ) dengan neraca dan dilakukan pencatatan berat perancah. Kemudian masukkan kembali perancah tersebut ke dalam pot setelah dilakukan penimbangan dan ulangi langkah ini pada periode waktu



selanjutnya. Langkah ini dilakukan karena prosentase *swelling* dilihat dari prosentase penyerapan cairan setelah dilakukan proses perendaman.

5. Melihat profil *swelling*

Prosentase *swelling* dapat diukur dengan menggunakan rumus :

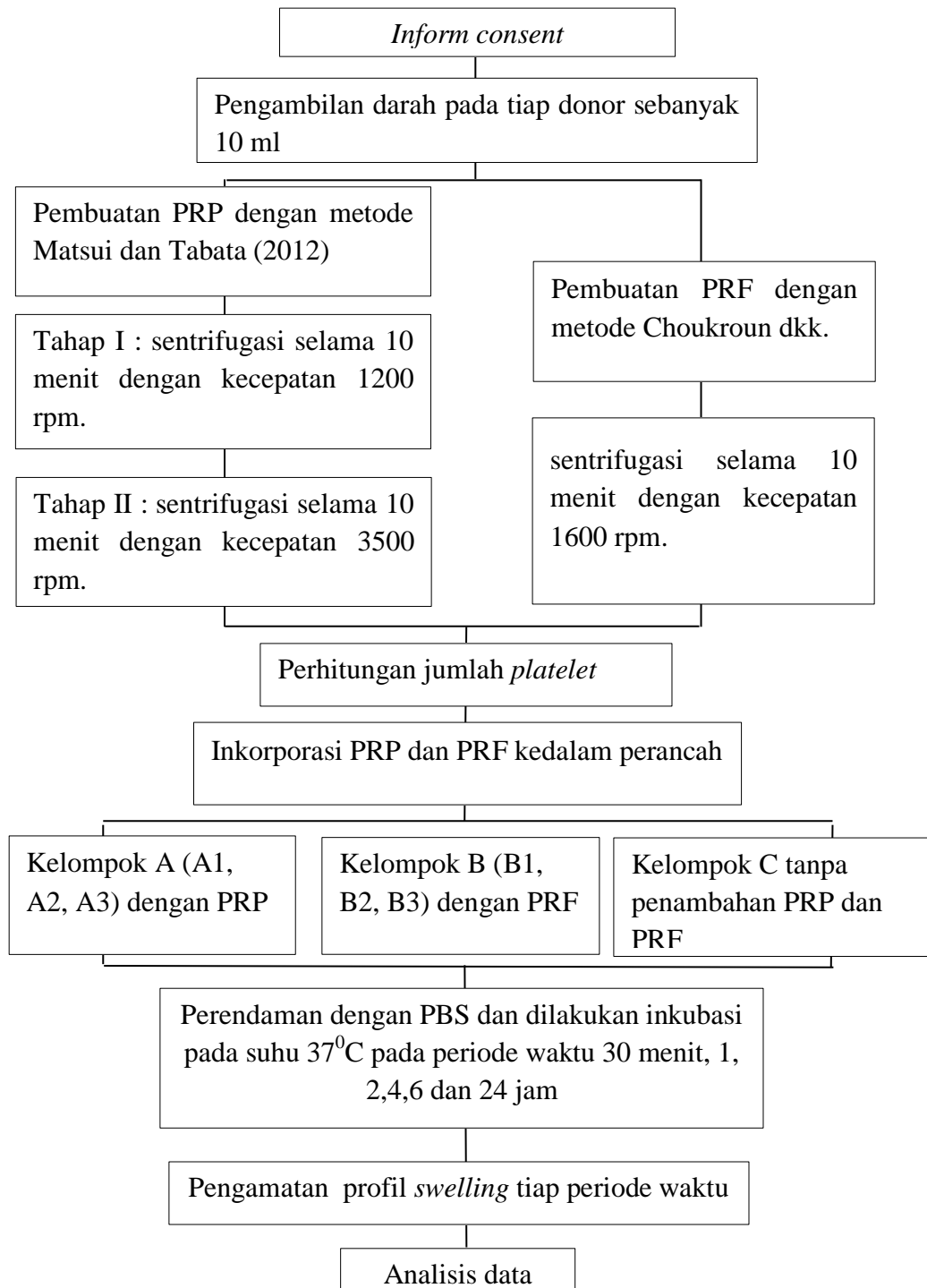
$$\text{Swelling (\%)} = \frac{W_w - W_0}{W_0} \times 100$$

Keterangan :

$W_0$  = merupakan berat awal perancah sebelum dilakukan perendaman.

$W_w$  = merupakan berat basah dari perancah setelah dilakukan perendaman.

## H. Alur Penelitian



**Gambar 6.** Alur penelitian

## **I. Analisis Data**

Data yang diperoleh pada penelitian ini dilakukan analisis menggunakan *One way ANOVA* dengan data yang terdistribusi normal.

## **J. Etika Penelitian**

Penelitian ini menggunakan sampel dari darah manusia, sehingga sebelum pengambilan sampel darah dilakukan, masing-masing pendonor telah mengisi *informed consent*. *Informed consent* telah dilampirkan sebagai bukti persetujuan dari pendonor bahwa bersedia darahnya diambil sebagai bahan penelitian. Pemberian *informed consent* pada pendonor di dahului dengan pemberian penjelasan mengenai prosedur penelitian dan menjelaskan bahwa pendonor hanya dilakukan pengambilan darah saja tanpa dilakukan perlakuan terhadap pendonor, sehingga dalam penelitian ini tidak akan terjadi resiko penelitian terhadap pendonor. Pengambilan sampel darah dilakukan oleh tenaga ahli di laboratorium Diagnosti AMC dengan menggunakan jarum *vacuntainer* steril sehingga aman bagi pendonor. Selain itu, penelitian ini telah disetujui oleh bagian Komisi Etik FKIK UMY yang dibuktikan dengan dikeluarkannya surat *Ethical Clearance* dengan nomor *Ethical Clearance* penelitian 552/EP.FKIK.UMY/X/2017.