

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang telah dilakukan adalah penelitian klinis laboratoris dengan *pre test post test design*.

B. Populasi dan Sampel

1. Perancah yang digunakan merupakan perancah yang dikembangkan oleh Tim Riset Rekayasa Jaringan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Perancah yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak Sembilan perancah.
2. *Platelet rich plasma* (PRP) dan *platelet rich fibrin* (PRF) sebanyak 1 ml (dari setiap pendonor) yang diperoleh dari empat pendonor yang merupakan mahasiswa Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang telah mengisi *informed consent* dan memenuhi kriteria sebagai berikut :
 - a. Keadaan sehat
 - b. Tidak sedang hamil dan menstruasi
 - c. Tidak memiliki penyakit sistemik
 - d. Tidak memiliki penyakit menular

C. Tempat dan Waktu

1. Penelitian ini dilakukan :
 - a. Pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Diagnostik Asri Medical Center.

- b. Perhitungan jumlah platelet di Laboratorium Diagnostik Asri Medical Center.
- c. Pembuatan PRP dan PRF dan perhitungan profil degradasi perancah dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober - Desember 2017

D. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel

- a. Variabel pengaruh
 - 1) *Platelet rich plasma*
 - 2) *Platelet rich fibrin*
- b. Variabel terpengaruh
Profil degradasi perancah
- c. Variabel terkendali
 - 1) Berat perancah
 - 2) Metode pembuatan PRP dan PRF
 - 3) Metode pemuatan PRP dan PRF
 - 4) Waktu perendaman
 - 5) Suhu penyimpanan

2. Definisi Operasional

- a. Perancah merupakan tempat sekaligus lingkungan bagi sel untuk tumbuh, berkembang dan berdeferensiasi sesuai dengan target jaringan yang akan direkonstruksi.

- b. Profil degradasi merupakan gambaran kemampuan suatu material dapat terurai sampai habis pada lingkungan sekitarnya. Proses degradasi berkaitan dengan proses terlepasnya molekul signal. Kecepatan proses degradasi harus sesuai dengan kecepatan pembentukan jaringan.
- c. *Platelet rich plasma* (PRP) merupakan trombosit yang mengandung 7 faktor pertumbuhan. Faktor pertumbuhan yang terkandung dalam PRP adalah PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$, TGF- β , TGF- β_2 , VEGF, dan EGF. Pembuatan PRP dengan metode Matsui dan Tabata (2012) melalui 2 tahap sentrifugasi dengan penambahan antikoagulan ACD yang akan memisahkan antara PRP, PPP, dan eritrosit.
- d. *Platelet rich fibrin* (PRF) merupakan signal dalam perkembangan sel yang mengandung banyak sel darah putih sehingga mampu memfasilitasi sel dalam melakukan regenerasi jaringan, penyembuhan luka serta pencegahan infeksi. PRF mampu memperlambat pelepasan faktor pertumbuhan. Pembuatan PRF dengan metode Choukroun dkk (2001) melalui tahap sentrifugasi dan tanpa penambahan antikogulan.

E. Instrument Penelitian

- 1. Bahan penelitian
 - a. Perancah koral buatan
 - b. *Whole blood sample*
 - c. *Phosphate Buffered Saline* (PBS)
 - d. HCL 1N
- 2. Alat penelitian

- a. *Uv-vis Spectrophotometers UVmini-1240 SHIMADZU*
- b. *Microtube* volume 1,5 ml
- c. Mikro pipet
- d. *Centrifuge Hettich*
- e. *Incubator Memmert*
- f. *Vortex Mixer*
- g. *Vacountainer* EDTA 3ml
- h. Jarum *Vacountainer* 22 x 1 ml
- i. *Vacountainer plain*
- j. *Vacountainer holder*
- k. Cup serum
- l. *Torniquete*
- m. Neraca
- n. *Yellow tip*
- o. *Blue tip*
- p. Hemositometer Mindray
- q. Alat tulis
- r. Pinset
- s. Alat perlindungan diri

F. Jalannya Penelitian

1. Menyiapkan sampel darah dari pendonor
 - a. Memberikan informasi kepada pendonor tentang apa penelitian yang dilakukan dan digunakan untuk apa sampel darah yang di ambil.

- b. Memberikan *informed consent* kepada keempat pendonor.
 - c. Pengambilan darah dilakukan di Laboratorium Diagnostik Asri Medical Center.
 - d. Pendonor diambil darahnya sebanyak masing-masing 10ml kemudian langsung diletakkan ke dalam *vacountainer*.
2. Pembuatan *platelet rich plasma* dengan metode Matsui-Tabata

Metode pembuatan PRP yang dilakukan oleh Yasuhiko Tabata dan Makoto Matsui (2012) merupakan metode dengan prinsip sentrifugasi atau pemutaran berdasarkan gaya sentrifugal. Berikut merupakan cara pembuatan PRP:

1. Darah yang berasal dari pendonor diambil sebanyak 10 ml dengan menggunakan jarum *vacuntainer* dan *vacuntainer* holder yang kemudian dimasukkan ke dalam *vacuntainer* EDTA 3 ml.
2. Darah kemudian dihitung jumlah trombosit dengan menggunakan *Hemositometer Mindray* dari sampel darah sebanyak 3 ml.
3. Lakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1200 rpm.
4. Dari hasil sentrifugasi akan terbentuk 3 lapisan, yaitu plasma, *buffy coat* dan sel darah merah.
5. Ambil lapisan plasma dan *buffy coat* dengan menggunakan *micropipette* dan *blue tip*, kemudian pindahkan ke dalam tabung *vacuntainer plain* bersih.
6. Lakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 3500 rpm.

7. Sentrifugasi kedua akan menghasilkan 3 lapisan, yaitu PPP, PRP dan endapan *platelet* (fibrin dan leukosit).
8. Pisahkan lapisan PPP dari PRP dan endapan *platelet*, sehingga akan menyisakan 2 lapisan yaitu PRP dan endapan *platelet*.
9. Campurkan antara lapisan PRP dan endapan *platelet* hingga homogen dengan menggunakan *vortex mixer* sehingga terbentuk PRP.
10. Hitung kembali jumlah trombosit yang terdapat pada PRP dengan menggunakan *Hemositometer Mindray*.

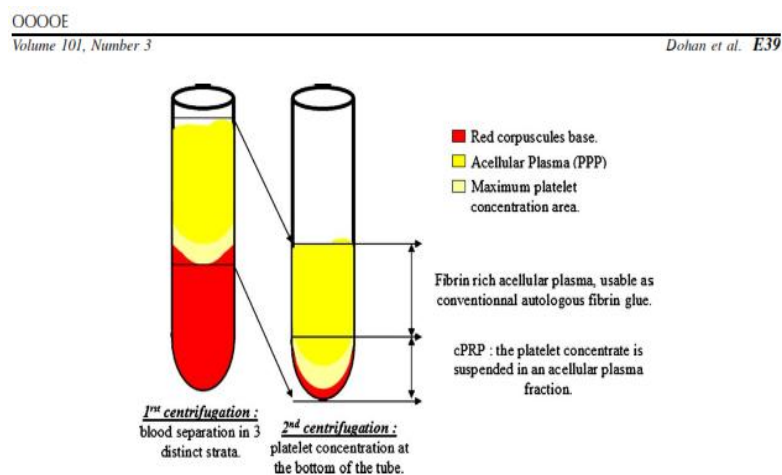


Fig. 1. Technologic concept of cPRP processing.

Gambar 2. Pembuatan PRP (Dohan dkk., 2006)

3. Pembuatan *platelet rich fibrin* dengan metode Choukroun dkk

Darah di dapatkan dari setiap pendonor yang diambil sebanyak 10 ml dengan menggunakan jarum *vacuntainer* dan *vacuntainer holder*, kemudian masukkan ke dalam *vacuntainer plain*. Segera lakukan sentrifugasi untuk menghindari terjadinya pembekuan darah. Sentrifugasi dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Sentrifugasi akan menghasilkan 3 lapisan yaitu PPP, fibrin dan sel darah merah. Pisahkan

PPP dan fibrin dari sel darah merah dengan menggunakan *micropipette* dan *blue tip* kemudian masukkan ke dalam tabung *vacuntainer* bersih. Diamkan di dalam lemari es selama 24 jam. Setelah 24 jam, pindahkan ke dalam cup serum dan di simpan di dalam freezer.

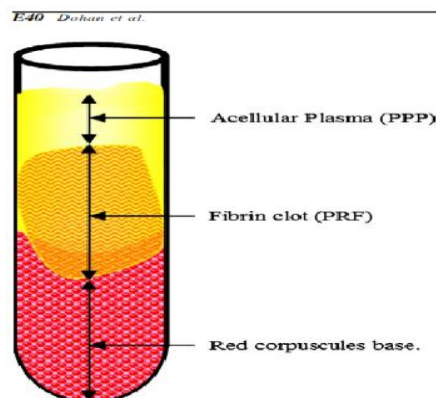


Fig. 2. Blood centrifugation immediately after collection allows the composition of a structured and resistant fibrin clot in the middle of the tube, just between the red corpuscles at the bottom and acellular plasma at the top.

Gambar 3. Pembuatan PRF (Dohan dkk., 2006)

4. Inkorporasi *platelet rich plasma* (PRP) dan *platelet rich fibrin* (PRF) pada perancah
 - 1) Menyiapkan perancah sebanyak sembilan perancah yang dikembangkan oleh Tim Riset Rekayasa Jaringan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.
 - 2) Menyiapkan PRP dan PRF yang telah dibuat.
 - 3) Menyiapkan *microtube* sebagai wadah perendaman perancah.
 - 4) Membuat tiga kelompok A (A₁, A₂, A₃) untuk perancah yang diinkorporasi dengan PRP, B (B₁, B₂, B₃) untuk kelompok perancah yang diinkorporasi dengan PRF dan C (C₁, C₂, C₃) untuk perancah yang tidak diinkorporasi.

- 5) Pada kelompok A dilakukan inkorporasi pada perancah seberat 10 mg dengan PRP sebanyak 40 μ l.
- 6) Pada kelompok B dilakukan inkorporasi pada perancah seberat 10 mg dengan PRF sebanyak 40 μ l..
- 7) Pada kelompok C tidak dilakukan inkorporasi pada perancah seberat 10 mg.
- 8) Masukkan perancah yang telah diinkorporasi dan perancah yang tidak diinkorporasi kedalam *microtube* yang telah diberi PBS sebanyak 1,3 ml.
- 9) Memasukkan *microtube* yang berisi rendaman perancah tersebut kedalam *incubator* dengan suhu 37°C selama 1 jam.
- 10) Keluarkan *microtube* yang telah diinkubasi selama 1 jam.
- 11) Memisahkan larutan supernatant (hasil perendaman) dengan perancah pada masing-masing *microtube* dengan menggunakan teknik sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 2 menit. Sentrifugasi akan menghasilkan endapan perancah di bagian bawah dan cairan supernatant di bagian atas.
- 12) Ambil larutan supernatant dengan menggunakan pipet sebanyak 1 ml. Kemudian cairan supernatant di masukkan kedalam kuvet *spectrophotometers* dengan panjang gelombang 280 nm. Kemudian mengganti larutan supernatant dengan larutan PBS yang baru sebanyak 1,2 ml kemudian memasukkan kembali ke dalam *incubator*.

- 13) Mengamati dan mencatat nilai absorbansi pada setiap larutan supernatant menggunakan alat *Uv-vis Spectrophotometers UVmini-1240 SHIMADZU*. Pembacaan data dilakukan sebanyak tiga kali dan diambil rerata dari tiga pembacaan data tersebut.
- 14) Mengulangi langkah 9-13 pada setiap periode waktu 3, 6, 24, 48, 72 dan 96 jam.
- 15) Setelah melakukan pengamatan pada periode 96 jam, kemudian pisahkan larutan supernatant dengan menggunakan teknik sentrifugasi, kemudian larutan supernatant diganti dengan larutan HCL 1N. Larutan HCL 1N berfungsi sebagai larutan akselerasi. Masukkan *microtube* ke dalam *incubator* kembali.
- 16) Mengamati proses degradasi perancah dalam larutan perendam HCL yang telah diinkubasi selama 1 jam.
- 17) Memisahkan larutan supernatant dengan perancah pada setiap *microtube* menggunakan teknik sentrifugasi kemudian mengganti larutan supernatant tersebut dengan larutan HCL yang baru kemudian masukkan kembali ke dalam *incubator*.
- 18) Mengamati dan mencatat nilai absorbansi pada setiap larutan supernatant menggunakan alat *Uv-vis Spectrophotometers UVmini-1240 SHIMADZU*. Pembacaan data dilakukan sebanyak tiga kali dan diambil rerata dari tiga pembacaan data tersebut.

19) Mengulang langkah nomor 17-18 pada setiap periode waktu 3, 6 dan 24 jam sampai didapatkan nilai absorbansi 100% saat perancah habis seluruhnya.

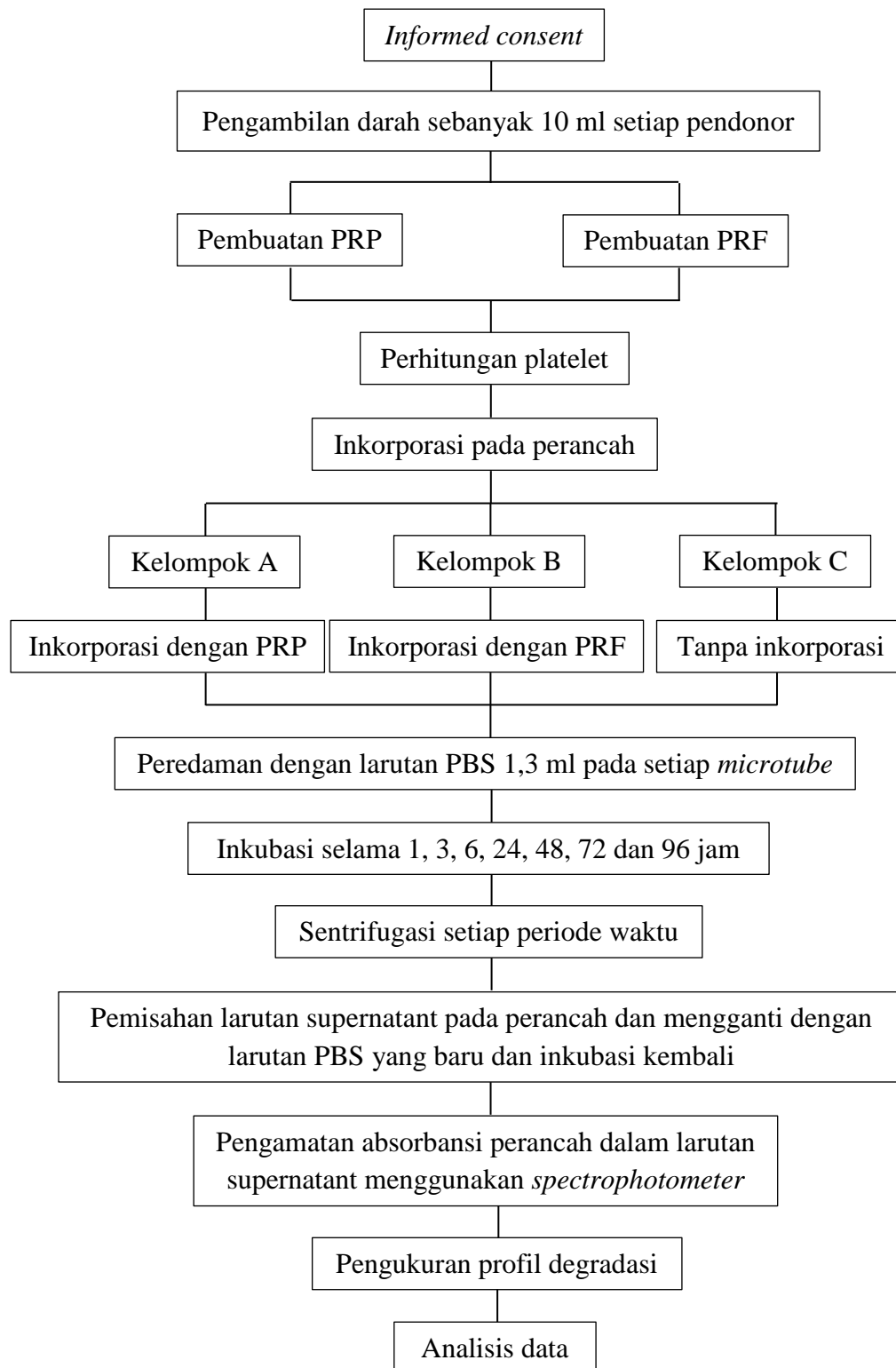
5. Menghitung profil degradasi perancah

Setelah didapatkan nilai absorbansi setiap interval waktu, kemudian menghitung persentase degradasi perancah dengan persamaan perhitungan berikut : (Saito dan Tabata, 2012)

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

X = waktu perendaman

G. Alur Penelitian



Gambar 4. alur penelitian

H. Analisis Data

Data yang di peroleh merupakan data numerik dengan jenis data t tidak berpasangan. Data dari hasil penelitian akan di analisis dengan ONE WAY ANOVA untuk data terdistribusi normal dan menggunakan *Kruskal Wallis* untuk data terdistribusi tidak normal.

I. Etika Penelitian

Penelitian ini telah lolos uji etik dengan Nomor: 552/EP-FKIK-UMY/X/2017. Pada penelitian ini membutuhkan sampel darah manusia sehingga dilakukan pengambilan darah pada manusia, oleh sebab itu dilampirkan *informed consent* sebagai bukti bahwa pendonor menyetujui untuk diambil darahnya untuk penelitian ini. Pemberian *informed consent* pada pendonor sebelumnya di dahului dengan pemberian penjelasan bahwa pendonor hanya akan dilakukan pengambilan darah saja tanpa dilakukan perlakuan terhadap pendonor, sehingga tidak akan terjadi resiko penelitian terhadap pendonor.