

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian laboratorium yang bersifat eksperimental, *post test design*.

B. Sample penelitian

1. PRP yang diperoleh dari donor (mahasiswa Prodi Kedokteran Gigi FKIK UMY) sebanyak 3 orang yang sebelumnya telah mengisi *informed consent* dan harus memiliki kriteria:

- a. Pasien dalam keadaan sehat
- b. Tidak sedang menstruasi (jika pendonor adalah wanita)
- c. Tidak dalam keadaan hamil
- d. Tidak memiliki penyakit sistemik

2. Perancah hidrogel

Perancah yang digunakan adalah perancah hidrogel CaCO₃. Perancah yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah sejumlah 3 perancah dengan perbandingan gelatin dan CaCO₃ sebagai berikut : 6:4, 3:7, dan 10:0.

C. Lokasi dan waktu penelitian

1. Penelitian dilakukan di:

- a. Proses pembuatan PRP dilakukan di laboratorium biokomia FKIK UMY.

- b. Uji pemuatan inkorporasi PRP dilakukan di Laboratorium Biokimia FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
 - c. Proses pembuatan perancah dilakukan di Laboratorium Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada
 - d. Pemuatan PRP dan prwarnaan menggunakan giemsa dilakukan di lab Patologi Anatomi AMC
 - e. Pengamatan jumlah PRP dilakukan di MMT laboratorium RSGM AMC
2. Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 29 januari 2019 -26 februari 2019

D. Variable penelitian

- 1. Variabel bebas
Perancah hidrogel dengan konsentrasi gelatin dan CaCO_3 : 6:4, 3:7 dan 10:0.
- 2. Variabel terikat
Jumlah platelet yang terinkorporasi kedalam perancah.
- 3. Variabel terkontrol
 - a. Metode pembuatan PRP
 - b. Metode pembuatan perancah
 - c. Antikoagulan yang digunakan
 - d. Ukuran perancah hidrogel yang digunakan

- e. volume PRP yang di inkoorporasikan
- f. Jarak waktu perhitungan jumlah platelet pada perancah setelah dilakukan penetesan (metode yang digunakan untuk mengaplikasikan PRP pada perancah)

E. Definisi operasional

1. *Platelet rich plasma* adalah platelet yang dihasilkan dari pengambilan darah pada manusia yang disentrifugasi untuk memisahkan antara platelet rich plasma dan platelet poor plasmanya dengan metode Matsui dan Tabata
2. Perancah hidrogel adalah salah satu wadah bertumbuhnya PRP yang komposisinya terdiri dari CaCO₃ dan gelatin.
3. Inkorporasi PRP pada perancah adalah pemuatan/penyerapan PRP yang diteteskan kedalam suatu perancah.

F. Alat dan bahan penelitian

1. Alat yang digunakan:

Handsoon, micropipette, microtube, centrifuge, centrifuge refriferated, blue tip, yellow tip, deck glass, vocuntainer ACD, masker, spuit injeksi dan jarum.
2. Bahan yang digunakan :

CaCO₃, gelatin, Perancah hidrogel, darah yang akan dijadikan PRP, antikoagulan, pewarna giemsa

G. Jalannya penelitian

1. Persiapan sebelum melakukan penelitian

Peneliti menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan untuk penelitian termasuk alat pelindung diri (APD).

2. Pengambilan sample darah

Pengambilan sample darah didapatkan dari 3 pendonor yang dilakukan di Laboratorium diagnostik RSGM AMC sebanyak 10 ml untuk setiap pendonor. Disarankan saat pengambilan darah pada pasien menggunakan jarum 18G agar tidak merusak trombosit. Setelah itu *sample* darah yang telah diambil dari 3 pendonor tersebut dicampurkan dan langsung dimasukkan kedalam *vacountainer* yang telah berisi antikoagulan.

3. Membuat perancah

Pembuatan perancah hydrogel dilakukan dengan menyiapkan gelatin dan CaCO_3 dalam bentuk bubuk, lalu setelah itu ditambahkan aquades 10% dengan jumlah proporsi yang sama. Gelatin yang digunakan adalah gelatin tipe B

CaCO_3 dicampurkan dengan gelatin sampai didapatkan suspensi yang homogen. Hasil dari pencampuran tersebut kemudian dicetak dalam sebuah cover dengan ukuran diameter masing masing perancah 5 mm (Mahanani dkk., 2016)

4. Membuat PRP

Sample darah yang telah diambil dari 3 pendonor dicampur didalam Ivocuntainer yang telah di isi dengan anti koagulan agar darah tidak menjendal sebelum disentrifugasi setelah itu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit atau dengan gaya sebesar 100g selama 15 menit. Sentrifugasi ini akan menghasilkan *whole blood* yang terbagi menjadi 3 bagian , yaitu lapisan yang pertama adalah lapisan pada dasar (eritrosit), lapisan pada bagian tengah (*buffy coat*), dan lapisan paling atas (plasma). Pada saat darah dilakukan sentrifugasi tidak boleh dilakukan terlalu cepat karena dapat meningtkkan suhu yang diakibatkan dari bertambahnya gaya mekanis. Peningkatan suhu ini dapat mengakibatkan perubahan pada ultrastruktur trombosit sehingga terjadi aktivasi parsial dan menghilangkan sebagian kandungan aktif dari trombosit tersebut.

Antikoagulan yang digunakan pada penelitian ini adalah *acid citrate dextrose* (ACD). Setelah itu darah disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit atau dengan gaya sebesar 100g selama 15 menit. Plasma yang diperoleh dari sentrifugasi tersebut adalah PRP. Plasma yang dihsilkan dari sentrifugasi ini bersifat stabil dan dapat digunakan hingga 8 jam setelah pembuatan (Satriyo dkk., 2011).

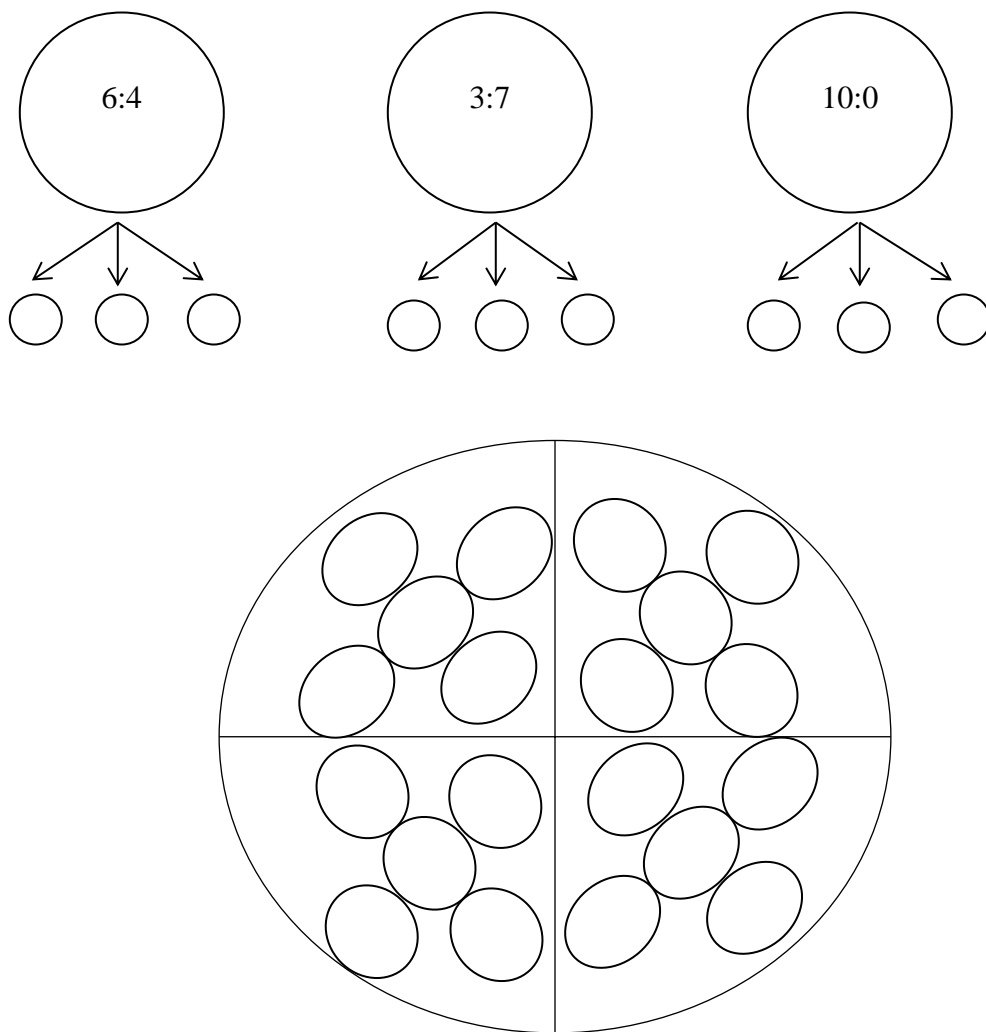
5. Metode pemuatan PRP

PRP dimuat kedalam 3 perancah hidrogel CaCO_3 dengan perbandingan 3:7, 6:4 dan 10:0 menggunakan metode tetes. PRP lalu diambil menggunakan *micropipette* dan diteteskan sebanyak 30 μl pada setiap perancah lalu ditunggu selama 10 menit kemudian ditiriskan dan setelah itu difiksasi menggunakan formalin 10% agar PRP tidak rusak. Setelah difiksasi perancah tidak boleh digerak-gerakan agar PRP yang sudah masuk kedalam perancah tidak terlepas kembali, lalu dilakukan pengamatan mikrostruktur perancah dan inkoorporasi PRP menggunakan mikroskop cahaya tanpa ditetesi PRP. Perancah yang telah ditetesi PRP selanjutnya dilakukan penghitungan menggunakan mikroskop cahaya secara manual.

6. Cara pengamatan dan penghitungan PRP

- a. Perancah yang telah ditetesi PRP akan di beri pewarnaan menggunakan zat warna giemsa.
- b. Perancah yang telah dilakukan pewarnaan dikeringkan dan diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x lalu diganti dengan perbesaran 40x dan 100x sampai PRP terlihat jelas dan dapat mudah dihitung. setiap konsentrasi perancah dibuat sebanyak 3 sampel lalu diamati sebanyak 5 lapang pandang yaitu pada bagian atas, bawah, kanan, kiri, dan tengah. pengamatan jumlah PRP

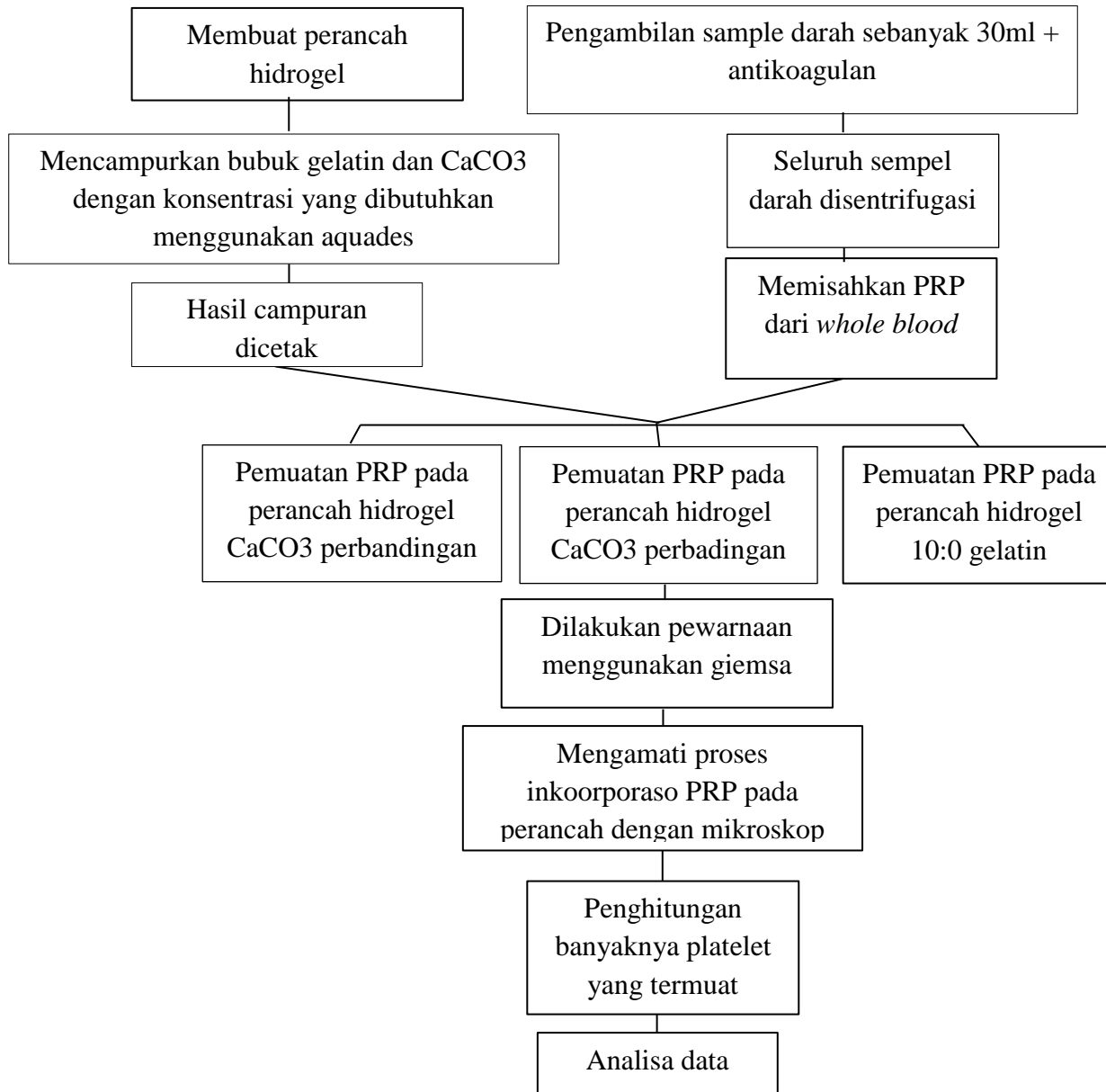
dihitung disetiap 1 lapang pandang, dalam satu lapang pandang tersebut dihitung lagi sebanyak 3 kali dan dihitung rata-rata lalu dijumlahkan, yang berarti banyaknya PRP yang terserap tiap 1 perancah adalah jumlah dari tiap rata-rata 5 lapang pandang di masing masing perancah tersebut.



Gambar 1. Desain Perancah

- c. Setelah itu lalu dilakukan pengamatan mikrostruktur perancah menggunakan mikroskop cahaya. Hal ini bertujuan untuk melihat porositas perancah.

H. Alur penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

I. Analisa data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dianalisa menggunakan one way Anova.

J. Etika penelitian

Sebelum penelitian ini dilakukan, subjek penelitian diberitahu dan diberi penjelasan tentang tujuan, maksud, dan manfaat dilakukannya penelitian ini. Subjek penelitian ini adalah pendonor darah yang akan dilakukan sebagai bahan untuk penelitian. Sebelum dilakukan pengambilan darah, pendonor terlebih dahulu diminta untuk mengisi *informed consent* yang telah disediakan sebagai bentuk ketersediaan pendonor untuk mendonorkan darahnya dan ikut terlibat dalam penelitian yang dilaksanakan dan tanpa ada unsur paksaan dari pihak manapun.