

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *Experimental* di laboratorium dengan *post test design*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dan sampel dalam penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) bergalur Wistar, dengan beberapa kriteria inklusi seperti harus dalam keadaan sehat, tanpa kelainan genetik, tidak cacat, jantan, umur 2-3 bulan ,dan berat 150 – 300 g. Sementara kriteria eksklusinya adalah tikus sakit atau mati pada waktu penelitian.

Tikus putih dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan perlakuannya. Semua sampel tikus dimasukkan ke dalam kandang selama sekitar 5 hari, untuk proses adaptasi dengan memberikan pakan dan lingkungan kandang yang sama setiap harinya. Tikus putih dikandang sendiri-sendiri untuk menghindari kontak fisik yang dapat menimbulkan perkelahian antar tikus. Jumlah minimal sampel tikus yang digunakan perkelompok perlakuan dihitung dengan rumus Frederer :

t = jumlah kelompok perlakuan
r = besar sampel perkelompok

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$t = 4$ kelompok perlakuan

$r = ?$

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$3(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15 / 3$$

$$r-1 \geq 5$$

$$r \geq 5 + 1$$

$$r \geq 6$$

Maka tiap kelompok perlakuan memiliki minimal besar sampel sejumlah 6 ekor tikus, sehingga total minimal sampel ketiga kelompok adalah 24 ekor tikus dan sebagai cadangan maka ditambah 1 ekor untuk setiap kelompok perlakuan maka didapat total seluruh sampel penelitian adalah 28 ekor tikus, dengan pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut :

- a) 6 ekor tikus diberi perlakuan dengan Perancah Hidrogel CaCO_3 dengan inkorporasi PRP.
- b) 6 ekor tikus diberi perlakuan dengan Perancah Hidrogel CaCO_3 .
- c) 6 ekor tikus diberi perlakuan dengan pemberian Spongostan.
- d) 6 ekor tikus sebagai kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi

1. Laboratorium Diagnostik di RSGM AMC untuk pengambilan darah dari donor untuk pembuatan *Platelet Rich Plasma*.
2. Laboratorium Biokimia FKIK UMY untuk inkorporasi *Platelet Rich Plasma* pada perancah hidrogel CaCO_3
3. Laboratorium Hewan Coba FKIK UMY untuk pemberian perlakuan pada hewan coba.

Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Desember tahun 2018.

D. Variabel Penelitian

Variabel bebas : perancah hidrogel CaCO_3 dengan inkorporasi *Platelet Rich Plasma*

Variabel terikat : waktu berhentinya perdarahan pada luka ekor tikus.

Variabel tak terkendali :

1. Oksigenasi
2. Aktivitas tikus putih

Variabel terkendali :

1. Jumlah Povidone Iodine
2. Metode pembuatan *Platelet Rich Plasma*
3. Jumlah *Platelet Rich Plasma*
4. Inkorporasi PRP pada Perancah Hidrogel CaCO_3

5. Lingkungan kandang tikus
6. Makanan tikus
7. Ukuran luka yang dibuat

E. Definisi Operasional

1. Perancah Hidrogel CaCO_3

Perancah berbahan dasar dari penggabungan kedua material antara gelatin berbentuk hidrogel dan kalsium karbonat sehingga dapat menciptakan suatu perancah yang memiliki sifat biodegradabilitas dan biokompatibilitas yang optimal.

2. *Platelet Rich Plasma* (PRP)

Plasma kaya platelet atau trombosit yang diperoleh dari autologus (darah dari diri individu itu sendiri) dengan kandungan berbagai macam *growth factors*, dibuat dengan Metode Matsui & Tabata (2012).

3. Inkorporasi

Pemuatan PRP ke dalam pori-pori dari perancah membran hidrogel CaCO_3 .

4. Waktu Berhentinya Perdarahan

Waktu tepat di mana jaringan yang dilukai tidak lagi mengeluarkan darah dari mulai dibuat perlukaan di area tersebut. Pengamatan berhentinya perdarahan dilakukan dengan menggunakan kertas saring yang ditempelkan pada luka tiap 15 detik. Waktu berhentinya perdarahan diukur dengan bantuan *stopwatch*.

F. Alat Dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain : *Handscoon*, pisau bedah / scalpel dan blade, kasa steril, kertas saring, kamera, kandang, *sliding caliper*, pinset, gunting, bengkok, timbangan, *stopwatch*, alat tulis, wadah tertutup untuk anestesi, *microtube*, *centrifuge refrigerated Rotina 35R* (Hettich Zentrifuge, Germany), *Vacountainer Acid Citrat Dextrose* (BD, USA), *micropipette* (Brand, USA).

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain : Perancah Hidrogel CaCO₃ dengan inkorporasi PRP, Povidone Iodine, alkohol 70%-100%, cotton bud, dan *spray* Ethyl Chloride.

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Instrumen Penelitian

a. Pengambilan Darah dari Donor

Pengambilan darah dari donor untuk pembuatan *Platelet Rich Plasma* dilakukan di Laboratorium RSGM AMC sebanyak 10 ml dari setiap donor.

b. Persiapan PRP

Platelet Rich Plasma dibuat dengan tahapan sebagai berikut (Matsui & Tabata, 2012) :

1. Darah dimasukkan ke dalam *microtube* , kemudian dilakukan sentrifugasi sebanyak dua kali pada mesin *centrifuge*. Sentrifugasi yang pertama dilakukan dengan kecepatan 450 rcf/g selama 7 menit pada suhu 4°C.
2. Setelah sentrifugasi pertama selesai, akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, eritrosit, dan *buffy coat*. Plasma di bagian atas *microtube* diambil dengan *micropipette*. Bagian atas eritrosit akan terlihat lapisan tipis berwarna putih yang harus diambil dan dipindahkan ke dalam *microtube* 1,5 ml yang kering dan steril. Pengambilan *buffy coat* juga dilakukan, walaupun akan terambil juga sedikit bagian dari plasma dan eritrosit. Sentrifugasi kedua kemudian dilakukan dengan kecepatan 1600 rcf/g selama 5 menit pada suhu 4°C.
3. Setelah sentrifugasi kedua selesai, akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, eritrosit, dan *buffy coat*. Plasma di bagian atas *microtube* diambil dengan *micropipette*. Pengambilan *buffy coat* juga dilakukan dengan menggunakan *micropipette* kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru. *Buffy coat* tersebut merupakan bagian dari hasil sentrifugasi darah

yang mengandung banyak platelet atau disebut juga *Platelet Rich Plasma*.

c. Persiapan Perancah Hidrogel CaCO₃

Pembuatan perancah hidrogel CaCO₃ diperoleh dengan mempersiapkan kalsit CaCO₃ berbentuk bubuk dengan kandungan 10 % w/v atau berat per volume akuades dengan proporsi yang sama, serta gelatin tipe B. Proses pembuatan perancah membutuhkan pendispersi yaitu menggunakan sodium sitrat. Kalsium karbonat atau CaCO₃ kemudian diaduk bersama gelatin hingga terbentuk suspensi yang homogen. Proses selanjutnya adalah mencetak larutan suspensi tersebut dalam suatu wadah yang tertutup. Pencetakan dilakukan dalam 24 wadah yang berbeda dengan bentuk lembaran agar nantinya dihasilkan lapisan serupa perancah dengan ketebalan 0,3 mm. Lapisan serupa perancah kemudian dibekukan dalam suhu -20°C selama 24 jam. Setelah dibekukan, dilanjutkan dengan pengeringan dingin selama 24 jam. Setelah lapisan serupa perancah telah diperoleh, lalu dilakukan *cross-linking* dengan metode dehidrotermal yaitu menggunakan *oven vacuum* selama 72 jam (Mahanani, *et al.*, 2016).

d. Pemilihan Hewan Coba

Tikus putih diperoleh dari unit pemeliharaan hewan coba Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, dalam percobaan ini digunakan tikus

putih jantan bergalur Wistar dengan kriteria sehat, tidak cacat, umur 2-3 bulan, dan berat 150 – 300 g.

2. Pemberian Perlakuan

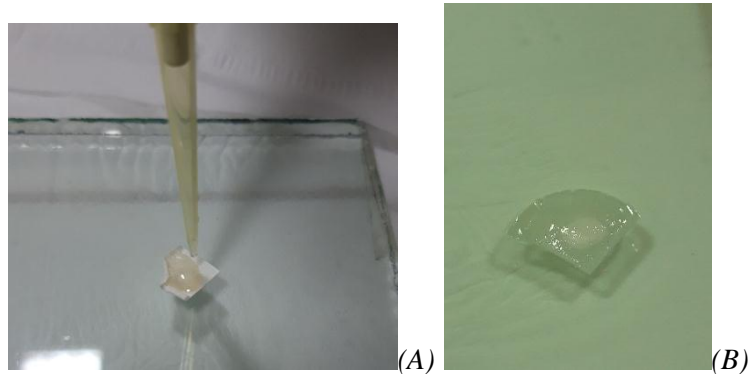
a. Pembuatan Luka Potong

Titik perlukaan ekor tikus diukur terlebih dahulu menggunakan *sliding caliper* yaitu tepat 2 cm dari ujung ekornya. Kemudian sebelum dibuat luka potong, dioleskan Povidone Iodine dengan *cotton bud* untuk mencegah infeksi. Setelah itu dianestesi topikal pada ekornya dengan *spray* Ethyl Chloride dan ditunggu hingga muncul zat yang menyerupai kristal es pada ekor yang telah dianestesi tadi. Selanjutnya dibuat luka potong ekor di titik yang telah ditandai dengan menggunakan *scalpel* dan *blade*.

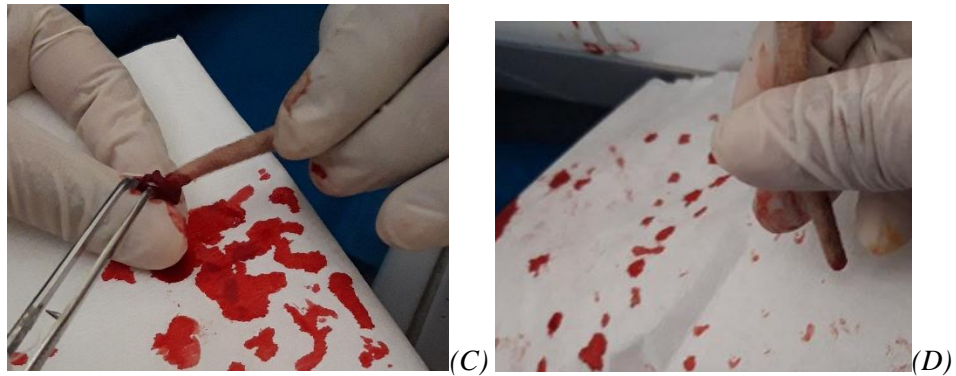
b. Perawatan Luka

Perawatan luka dilakukan sesaat setelah memotong ekor tikus. Perawatan luka atau perlakuan dilakukan dengan melakukan penempelan perancah hidrogel CaCO_3 dengan inkorporasi PRP pada luka sebagai perlakuan terhadap kelompok pertama, lalu dengan penempelan perancah hidrogel CaCO_3 saja tanpa PRP pada luka sebagai perlakuan kelompok kedua, dan kelompok ketiga diberi perlakuan dengan pemberian agen hemostatik lokal Spongostan, dan kelompok keempat yaitu kelompok kontrol atau tanpa diberi perlakuan pada luka ekor tikus tersebut. PRP yang diinkorporasikan pada masing-masing perancah hidrogel CaCO_3

untuk tiap sampel adalah sejumlah 40 μl yang kemudian ditunggu selama 10 menit agar PRP dapat terinkorporasi sempurna, kemudian perancah CaCO_3 dengan inkorporasi PRP ditempelkan pada ujung ekor yang luka.



(A) Inkorporasi PRP pada perancah hidrogel CaCO_3 , (B) Perancah hidrogel CaCO_3 dengan inkorporasi PRP.



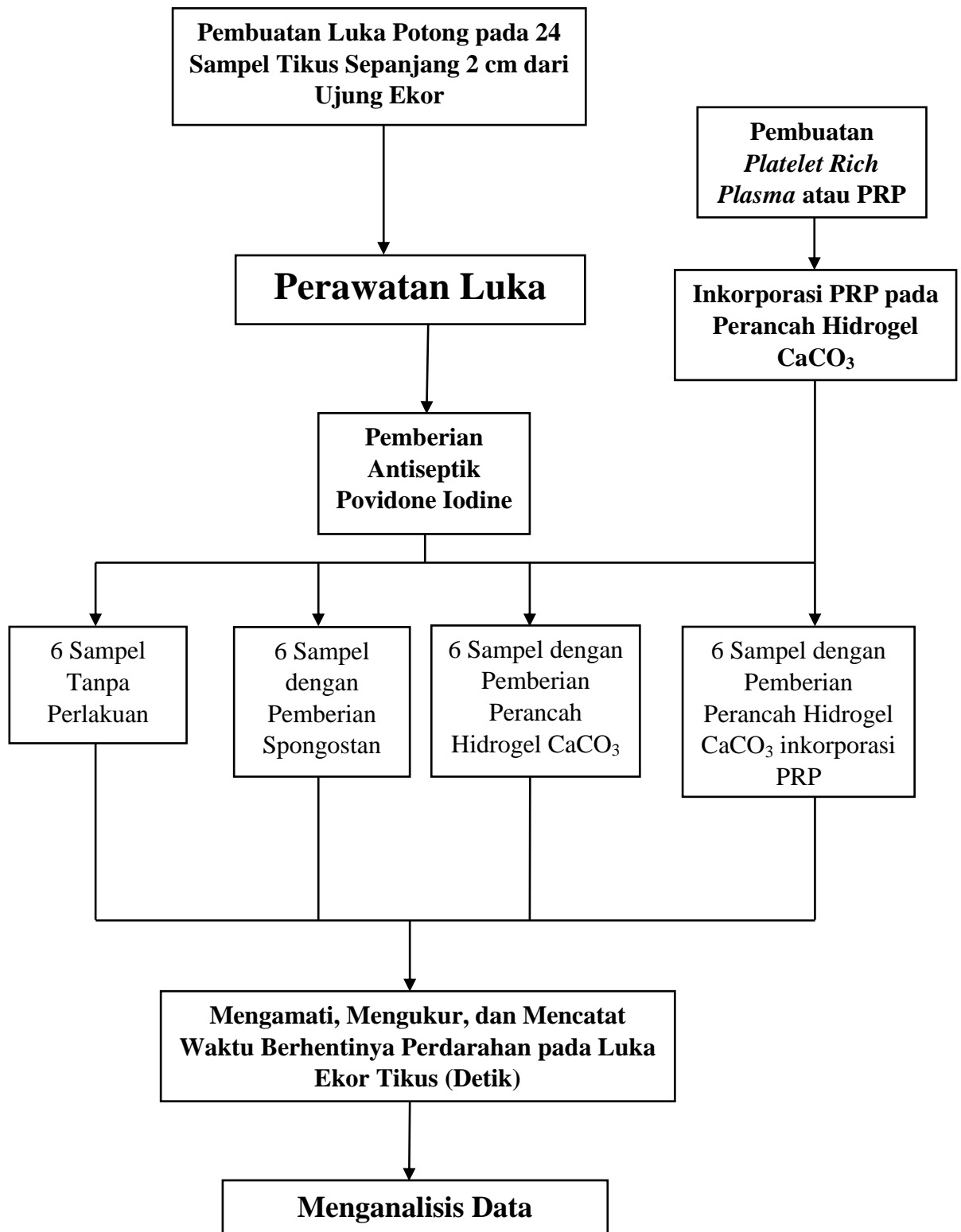
(C) Pemberian perlakuan luka ekor tikus, (D) Pengamatan berhentinya perdarahan luka.

3. Pengamatan, Pengukuran, dan Pencatatan

Pengamatan dilakukan pada keempat kelompok tikus sesaat setelah dilakukan masing-masing perlakuan. Pengamatan luka potong dilakukan dengan cara melihat secara langsung atau inspeksi terhadap luka yang telah diberi perlakuan untuk mengetahui pada menit

keberapa luka tersebut berhenti mengalami perdarahan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan kertas saring yang ditempelkan pada luka setiap 15 detik hingga tidak ada lagi bekas darah yang menempel pada kertas saring. Waktu berhentinya perdarahan diukur dengan menggunakan *stopwatch* dan dicatat sebagai data yang akan digunakan pada analisis data.

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Pengelolaan data dilakukan dengan menggunakan bantuan komputersasi program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Hasil penilaian tanda-tanda berhentinya perdarahan pada luka didapatkan dari penelitian data rata-rata waktu berhentinya perdarahan pada masing-masing kelompok perlakuan. Analisis data yang digunakan memiliki variabel data *numeric* dan skala data rasio dengan normalitas data diuji terlebih dahulu. Karena jumlah sampel dalam penelitian yang digunakan ≤ 50 , maka pengujian normalitas data dilakukan dengan metode analitik *Shapiro-wilk Test*. Uji normalitas data menunjukkan data berdistribusi normal, maka analisis data dilakukan dengan menggunakan metode *One Way ANOVA*. Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas *Levene* dan diperoleh data bersifat homogen. Kemudian, untuk mencari antar kelompok mana yang memiliki perbedaan hasil bermakna dilakukan Uji Post Hoc *Tukey*.