

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan menggunakan jenis penelitian laboratorium yang bersifat *experimental* pada hewan coba, dengan menggunakan desain penelitian *Post Test Design*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Perancah hidrogel CaCO_3 yang dikembangkan oleh tim peneliti Rekayasa jaringan Fakultas kedokteran universitas gajah mada.
2. *Platelet Rich plasma* (PRP) yang diperoleh dari donor (mahasiswa prodi kedokteran gigi UMY) yang telah mengisi informed consent sebelumnya.
3. Subjek penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur wistar. Digunakan sebanyak 28 ekor, berumur 2-3 bulan dengan berat 150-300 gram.

Besar sampel hewan coba dihitung dengan menggunakan rumus sampel Federer sebagai berikut :

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

Keterangan

t : Banyaknya kelompok perlakuan

n : Jumlah pengulangan

Hasil perhitungan :

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

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

$$(n-1) \geq 15/3$$

$$(n-1) \geq 5$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6$$

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok sampel , sehingga didapatkan jumlah sampel adalah 24 sampel dengan sampel cadangan sebesar 10% sehingga berjumlah 28 sampel , yaitu :

a. Diamati dalam 3 hari dengan:

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine + inkorporasi PRP pada Perancah Hidrogel CaCO_3 ,

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine dan Perancah Hidrogel CaCO_3

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine + Spongostan sebagai kelompok

b. Diamati dalam 7 hari dengan:

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine + inkorporasi PRP pada Perancah Hidrogel CaCO_3

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine dan Perancah Hidrogel CaCO_3

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine + Spongostan sebagai kelompok kontrol.

c. Diamati dalam 14 hari dengan :

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine + inkorporasi PRP pada Perancah Hidrogel CaCO_3 ,

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine dan Perancah Hidrogel CaCO_3

2 tikus putih yang diberi Povidone Iodine + Spongostan sebagai kelompok kontrol.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat :

1. Pembuatan PRP dilakukan di Laboratorium Biokimia FKIK UMY.
2. Perlakuan Hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Coba FKIK UMY.
3. Pembuatan Preparat Histologi di Laboratorium Patologi Anatomi AMC untuk dilihat ketebalan epitel dari penyembuhan luka pada ekor tikus.
4. Pengamatan Preparat Histologi di MMT Lab FKIK UMY.

Waktu : November-Desember 2018

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Perawatan luka dengan diberi perlakuan berupa penempelan perancah hidrogel CaCO_3 dengan inkorporasi Platelet Rich Plasma, penempelan perancah hidrogel CaCO_3 saja, Spongostan, dan olesan Povidone Iodine.

2. Variabel Terikat

Penyembuhan Luka dengan tinjauan histologi ketebalan epitel.

3. Variabel tak terkendali

Aktivitas tikus putih : pergerakan setelah dilakukan perlukaan mengigit-gigit bekas luka.

4. Variabel terkendali

- a. Umur, Berat badan tikus putih.
- b. Makanan dikendalikan dengan cara pemberian makan yang sama sesuai dengan kebutuhan tikus putih.
- c. Volume PRP yang digunakan.
- d. Ukuran Perancah yang digunakan.

E. Definisi Operasional

1. Perancah hidrogel CaCO_3 yang berbentuk membran.
2. PRP adalah *platelet* yang didapatkan dari darah manusia kemudian diproses dengan menggunakan 2x sentrifugasi (Matsui dan Tabata, 2012).

3. Pembuatan Luka Potong pada ekor tikus putih, dengan cara memotong menggunakan pisau bedah pada bagian ekor yang panjangnya 2 cm dari ujung ekor.
4. Penyembuhan Luka merupakan pemberian perlakuan pada luka sesuai dengan prinsip steril dan tahapan perawatan luka, dan debridemen bila diperlukan. Kemudian pada penelitian ini diberikan perawatan luka dengan 4 perlakuan dilihat selama 3,7,dan 14 hari yaitu :
 - a. Perawatan luka dengan diberi Povidone Iodine
 - b. Perawatan luka dengan diberi Povidone Iodine + inkorporasi PRP pada Perancah Hidrogel CaCO₃,
 - c. Perawatan luka dengan diberi Povidone Iodine dan CaCO₃
 - d. Perawatan luka dengan diberi Povidone Iodine + Spongostan sebagai kelompok kontrol positif
5. Inkorporasi adalah proses pemuatan PRP pada perancah hidrogel CaCO₃.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Handscoon, Masker, pinset,gunting, bengkok, alat tulis,kamera, timbangan, pisau bedah, kandang tikus, wadah tertutup untuk anestesi, *microtube*, *centrifuge refrigerated Rotina 35R* (Hettich Zentrifuge, Germany), *Vacountainer Acid Citrat Dextrose* (BD, USA), *micropipette* (*BRAND*, USA), *yellow tip* (Biologic, USA), *blue tip* (Biologic, USA), mikroskop cahaya, dan seperangkat alat optilab.

2. Bahan Penelitian

Darah pendonor, Perancah hidrogel CaCO_3 , *CE (Chlor Ethyl) spray*, Providone Iodine, kapas, kassa, tissue, cotton bud, jaringan kulit, formalin 10%, alkohol 70-100% ,dan cat *Hematoksilin Eosin (HE)*, tikus putih (*Rattus Norvegicus*) jantan galur wistar.

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Perancah dengan metode (Mahanani dkk., 2016) :

Perancah hidrogel CaCO_3 dibuat dari gelatin tipe B (Nitta,Osaka, Jepang) dan calcite CaCO_3 dalam bentuk bubuk (Wako, Osaka, Jepang) dengan 10% w/v konsentrasi padat dalam akuades dengan proporsi yang sama. Sodium sitrat (Sigma Aldrich, Jerman) digunakan untuk dispersan. CaCO_3 ditambahkan dan dimasukkan dalam gelatin hingga tercapai suspensi yang homogen. Solusinya kemudian dicetak dalam sebuah penutup dari 24 lempengan piring untuk menyiapkan perancah tebal seperti ketebalan film yaitu 0,3 mm. Perancah seperti film tebal dibekukan pada -20°C selama 24 jam, dilanjutkan dengan pengeringan beku selama 24 jam. Setelah perancah seperti itu diperoleh, kemudian di *cross-linked* dengan metode dehydrothermal dengan menggunakan vaccuum oven (Memmert, USA) selama 72 jam.

2. Pengambilan sampel darah dari donor

Pengambilan sampel darah dilakukan di laboratorium RSGM AMC sebanyak 10 ml dari setiap pendonor.

3. Pembuatan PRP dengan menggunakan 2x sentrifugasi (Matsui & Tabata, 2012):
 - a. Darah dari *vacountainer* diambil sebanyak 50 μ l dengan memakai *micropipet* dan *yellow tip*
 - b. Darah kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* unruk pembuatn PRP. Darah *disentrifugasi* sebanyak 2 kali di *centrifuge*. *Sentrifugasi* pertama dilakukan selama 7 menit dengan kecepatan 450 rcf/g pada suhu 4 °C.
 - c. Setelah disentrifugasi pertama, akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat* , dan eritrosit. Plasma dari bagian atas *microtube* diambil dengan menggunakan *micropipet*, kemudian ambil bagian lapisan putih tipis diatas eritrosit dan dipindahan kedalam *microtube* 1,5 ml yang kering dan steril. Pada pengambilan *buffy coat* akan terambil sedikit eritrosit dan plasma. Sentrifugasi kedua dilakukan dengan kecepatan 1600 rcf/g pada suhu 4 °C selama 5 menit.
 - d. Setelah *sentrifugasi* kedua dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat*, dan eritrosit. Plasma di bagian atas *microtube* diambil terlebih dahulu dengan *micropipet*. *Buffy coat* diambil dengan menggunakan *micropipet* dan kemudan dipindahkan kedalam *microtube* baru yang kering dan juga steril. *Buffy coat* merupakan fase kaya *platelet* (PRP) .

- e. PRP dikumpulkan kemudian, PRP diinkorporasi ke dalam perancah Hidrogel CaCO_3 dengan cara PRP diambil menggunakan micropipete kemudian diinkorporasikan pada perancah.

4. Pemberian perlakuan

a. Pembuatan Luka Potong

Cara Pembuatan Luka Potong adalah :

- 1) Menentukan lokasi pada ekor yang panjangnya 2 cm dari ujung ekor tikus putih diberi tanda dengan spidol.
- 2) Mensterilkan bagian tersebut dengan alkohol 70%.
- 3) Mengoleskan *Povidone Iodine* pada bagian yang akan dipotong.
- 4) Pasang alas di bawah tubuh tikus.
- 5) Cuci tangan WHO, memakai sarung tangan bersih.
- 6) Melakukan *Anestesi* menggunakan *CE (Chlor Ethyl)* pada bagian yang akan dipotong.
- 7) Melakukan Pembedahan dengan pisau bedah steril pada ekor yang panjangnya 2 cm dari ujung ekor tikus putih.

b. Perawatan Luka

Perawatan luka dilakukan pada setiap kelompok sampel setiap sampel terdapat 6 ekor tikus dengan dilihat proses penyembuhan luka pada hari ke 3, hari ke 7, dan hari ke 14. Dengan cara sebagai berikut : sebelumnya diberi povidone iodine dahulu sebagai antiseptik pada semua tikus. Merawat luka dengan inkorporasikan *Platelet Rich Plasma (PRP)* pada Perancah Hidrogel CaCO_3 ke

daerah luka pada 6 ekor tikus, Perancah saja pada 6 ekor tikus ,Spongostan pada 6 ekor tikus, dan 6 ekor tikus pada kelompok tanpa perlakuan dibersihkan saja dan dibiarkan tanpa diberi apa-apa. Luka diberi balutan kassa steril. Kemudian dilihat penyembuhan luka dalam 3 hari, 7 hari, dan 14 hari dan dibuat preparat histologinya.

1) Lepaskan sarung tangan, Cuci tangan WHO dan merapikan alat.

5. Pembuatan preparat Histologi.

Prosedur untuk pembuatan preparat sebagai berikut :

a. Penerimaan Jaringan

Jaringan yang sudah dipotong difiksasi dengan cairan buffer 10% dan ditutup rapat ,diberikan pada bagian patologi anatomi dan diterima untuk pemeriksaan histopatologi. Perbandingan dari jaringan dengan cairan fiksasi adalah 1:9.

b. Makroskopis jaringan

Dokter di bagian patologi anatomi mengambil 1 kope dari satu/beberapa tempat. Pengambilan masing-masing kope adalah dengan ukuran 0,5 cm. Kemudian jaringan yang diambil tersebut akan dilakukan *processing*.

c. *Processing* Jaringan

Untuk memproses jaringan menggunakan alat *tissue processor automatic* yang bekerja \pm 18,5 jam. Proses ini terbagi dalam empat tahap, yaitu :

1) Fiksasi

Berfungsi untuk mempertahankan struktur gel sehingga menjadi stabil secara fisik maupun kimiawi dan mencegah terjadinya dialisis atau pembengkakan pada ruptur. Fiksasi yang paling sering digunakan adalah formalin 10%, tetapi alangkah lebih baiknya menggunakan formalin buffer 10%.

2) Dehidrasi

Berfungsi untuk menghilangkan/menarik kadar air dalam jaringan dengan cara mulai konsentrasi rendah sampai tinggi. Untuk dehidrasi yang baik memakai alkohol 70% sampai 100%.

3) *Clearing*

Berfungsi untuk menarik keluar kadar alkohol yang berada dalam jaringan, membeikan warna yang bening pada jaringan dan juga sebagai zat perantara masuknya kedalam parafin.

4) Infiltrasi parafin

Parafin cair suhu 57-59 °C berfungsi mengisi rongga-rongga atau pori-pori yang ada pada jaringan setelah ditinggalkan oleh cairan sebelumnya (xylo).

d. Pengeblokan/*Embedding*

Jaringan yang sudah selesai di proses kemudian dikeluarkan dan segera dimasukkan ke dalam cetakan blok yang sebelumnya sudah diisi dengan parafin cair. Setelah keras (± 20 menit) cetakan dilepas.

e. Pemotongan dengan mikrotom

Blok dijepitkan pada mikrotom kemudian dipotong dengan pisau mikrotom dengan kemiringan $\pm 30^\circ$ terhadap blok parafin setebal 2-5 mikron, hasil pemotongan yang berupa pita kemudian dimasukkan kedalam waterbath yang mana sebelumnya sudah diisi dengan air yang dihangatkan $\pm 50^\circ$ C. Kemudian diambil dengan object glass dan diberi dengan nomor registrasi blok, kemudian dibiarkan ± 5 menit setelah itu diinkubasi.

f. Inkubasi

Berfungsi untuk menguapkan kadar air yang terbawa oleh hasil potongan/pita sehingga jaringan menempel kuat pada object glass.

g. Pemulasan/*Staining*

Cat yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Hematoxylin-Eosin* (HE) . Proses dari pengecatan adalah sebagai berikut :

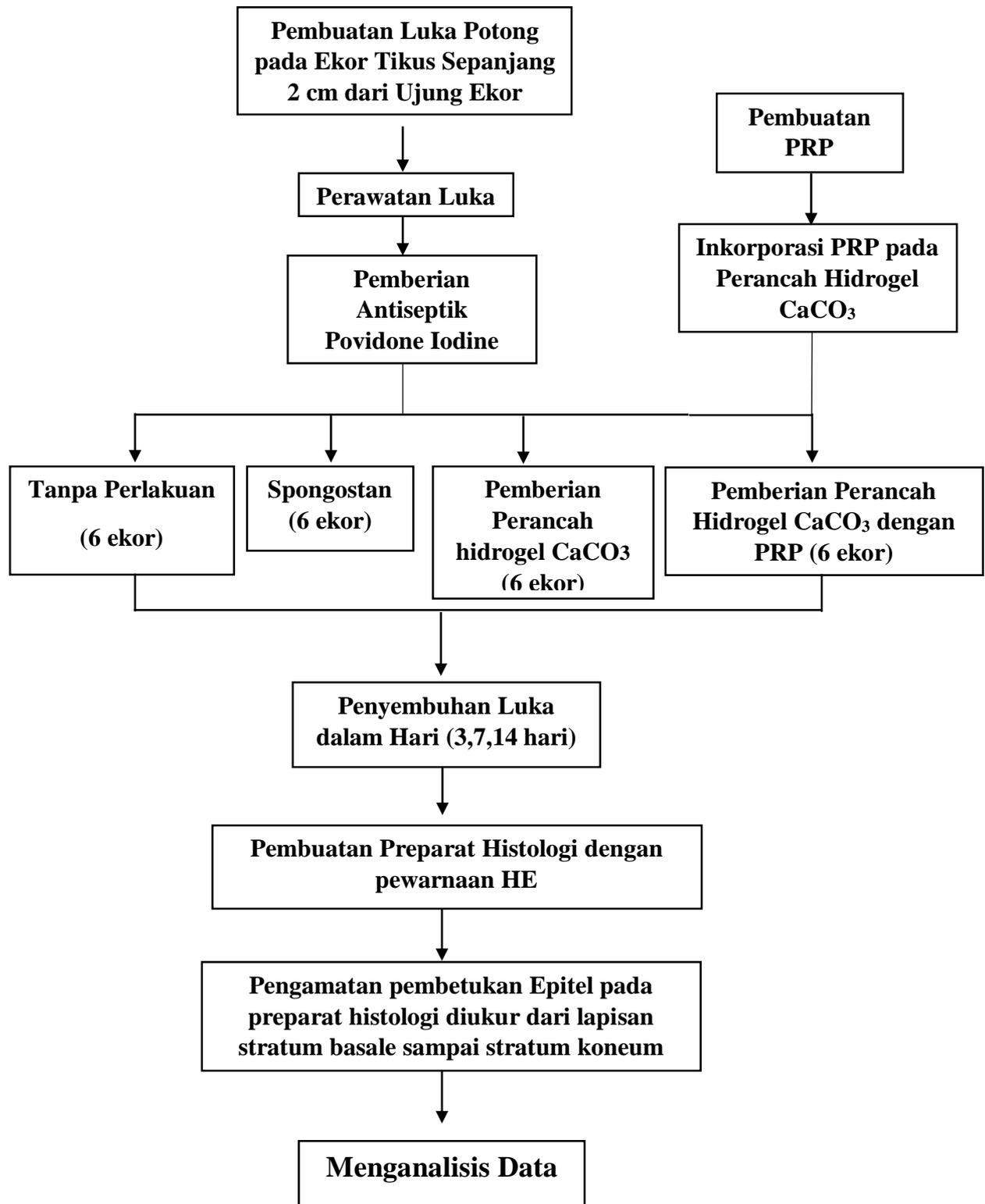
- 1) Deparafinasi : preparat dimasukkan ke dalam xylol I,II,III, masing-masing selama tiga menit.
- 2) Rehidrasi : preparat dimasukkan ke dalam alkohol 100%, 95%, 80%, 70%, masing-masing selama dua menit.
- 3) Preparat dimasukkan ke dalam air mengalir.
- 4) Pengecatan inti : preparat dimasukkan ke larutan Mayer *Hematoksilin* selama tujuh menit.
- 5) Preparat dimasukkan ke dalam air mengalir.
- 6) Counter Stain : Preparat dimasukkan ke larutan eosin ± 30 detik.

- 7) Preparat masuk ke air wadah I,II,III. Masing-masing tiga kali celup.
- 8) Dehidrasi : preparat dimasukkan ke alkohol 70%, 80%, 95%, dan 100%, masing-masing tiga kali celup.
- 9) *Clearing* : preparat dimasukkan ke dalam xylol I dan II.
- 10) Mounting : preparat diberi satu tetes entelan dan *deck glass*.

6. Cara Pengamatan

Penyembuhan luka dilihat dengan preparat histologi yang dibuat dengan pengecatan HE (*Hematoxylin-Eosin*). Tiap 1 hewan coba dibuat menjadi 1 preparat dengan dibuat potongan jaringan 0,5 cm dari daerah penyembuhan luka, kemudian dipotong dengan mikrotom sebanyak 0,05 mm diletakkan di *deck glass* dan diwarnai dengan pewarnaan HE, kemudian dilihat seberapa ketebalan epitel pada permukaan kulit ekor tikus dihitung dengan cara mengukur ketebalan dari lapisan epitel *stratum basale* sampai *stratum korneum* menggunakan mikroskop cahaya (Bel Engineering) ketebalan epitel diukur dengan menggunakan aplikasi *Bel Capturing* yang dipasang pada mikroskop dengan perbesaran 4x melalui media komputer.

H. Alur Penelitian



I. Analisis data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa kesembuhan luka dengan pengamatan ketebalan epitel dalam hitungan hari. Uji normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-Wilk* karena sampel yang digunakan kurang dari 50 sampel dan Uji Statistik hasil penelitian jika distribusi data normal menggunakan *oneways ANOVA*, tapi jika distribusi data tidak normal menggunakan analisa *kruskal-wallis*.