

KARYA AKHIR

ANALISIS KADAR *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR* PADA *PLATELET RICH PLASMA* DENGAN PENAMBAHAN AKTIVATOR KALSIUM KLORIDA (CaCl₂) + TROMBIN PADA SUHU DAN WAKTU PENYIMPANAN YANG BERBEDA

ANALYSIS OF ENDOTHELIAL VASCULAR GROWTH FACTORS IN PLATELET RICH PLASMA WITH ADDITION OF CALCIUM CHLORIDE (CaCl₂) + THROMBINE ACTIVATORS AT DIFFERENT TEMPERATURES AND TIME OF STORAGE

**FAIGAH APRILIA SY FARAI
C108216211**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS
HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**ANALISIS KADAR *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH*
FACTOR PADA *PLATELET RICH PLASMA* DENGAN
PENAMBAHAN AKTIVATOR KALSIMUM KLORIDA (CaCl₂) +
TROMBIN PADA SUHU DAN WAKTU PENYIMPANAN YANG
BERBEDA**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Mencapai Gelar Spesialis

Program Studi
Ilmu Patologi Klinik

Disusun dan Diajukan oleh

**FAIGAH APRILIA SY FARAIID
C108216211**

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

KARYA AKHIR

ANALISIS KADAR VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PADA PLATELET RICH PLASMA DENGAN PENAMBAHAN AKTIVATOR KALSIMUM KLORIDA (CaCl₂) + TROMBIN PADA SUHU DAN WAKTU PENYIMPANAN YANG BERBEDA


Disusun dan diajukan oleh :

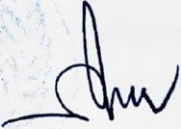
FAIGAH APRILIA SY FARAIID

Nomor Pokok : C108216211

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 16 Februari 2021
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat


dr. Uleng Bahrun, Sp.PK(K), Ph.D
Pembimbing Utama


Dr. dr.Tenri Esa, M.Si, Sp.PK
Pembimbing Anggota

Manajer Program Pendidikan Dokter Spesialis
Fakultas Kedokteran Unhas


dr. Uleng Bahrun, Sp.PK(K), Ph.D
NIP. 19680518 199802 2 001



Wakil Dekan,
Wakil Dekan Bid. Akademik,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes

NIP. 19671103 199802 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : FAIGAH APRILIA SY FARAID

Nomor Pokok : C108216211

Program Studi : Ilmu Patologi Klinik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya akhir yang saya tulis ini, benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2021



Yang menyatakan,

Faigah Aprilia Sy Faraid

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada ALLAH SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang atas limpahan rahmat, kasih dan berkah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya akhir yang berjudul **“ANALISIS KADAR VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PADA PLATELET RICH PLASMA DENGAN PENAMBAHAN AKTIVATOR KALSIMUM KLOORIDA + TROMBIN PADA SUHU DAN WAKTU PENYIMPANAN YANG BERBEDA”** sebagai salah satu persyaratan dalam rangka penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis di Program Studi Ilmu Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin (FKUH) Makassar.

Penulis menyadari bahwa karya akhir ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan koreksi dari semua pihak. Penulis juga menyadari bahwa karya akhir ini dapat diselesaikan berkat bantuan dan partisipasi berbagai pihak.

Pada kesempatan ini pula penulis ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. dr. Budu, Sp.M (K), M.M.Ed, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Guru Besar Departemen Ilmu Patologi Klinik dan Guru Besar Emeritus FKUH, Alm. Prof. dr. H. Hardjoeno, Sp.PK(K), yang telah merintis pendidikan dokter spesialis Patologi Klinik di FKUH.

3. Guru sekaligus orang tua kami, dr. H. Ibrahim Abdul Samad, Sp.PK(K) dan dr. Hj. Adriani Badji, Sp.PK yang senantiasa mendukung pendidikan sejak awal penulis mulai mendaftar di PPDS kemudian mendidik, mengayomi, memberi nasehat dan membimbing dengan penuh ketulusan hati hingga penyempurnaan karya akhir ini.
4. Guru besar di Departemen Ilmu Patologi Klinik, Prof. dr. Mansyur Arif, Ph.D, Sp.PK(K), M.Kes, guru kami dan selaku Dosen Penguji yang telah membimbing, mengajar dan memberikan ilmu yang tidak ternilai dengan penuh ketulusan hati memberi masukan selama selama penulis menjalani pendidikan dan telah meluangkan waktu untuk memberikan penulis ilmu serta saran-sarannya dalam penyempurnaan karya akhir ini.
5. Manajer PPDS FKUH, guru, Dosen Pembimbing Akademik dan selaku Ketua Komisi Penasihat/Pembimbing Utama juga sekaligus orang tua kami yang bijaksana, dr. Uleg Bahrun, Sp.PK(K), Ph.D, senantiasa membimbing dan memberikan arahan kepada penulis dalam berbagai kegiatan, mengajar, memberi nasehat dan semangat serta memotivasi penulis. Jazakillah khairan katsiran Dokter atas semua ajaran, ilmu, bimbingan, nasehat, bantuan moral dan kasih sayang selama penulis memulai pendidikan, penelitian hingga tahap penyusunan karya akhir ini.
6. Ketua Departemen Ilmu Patologi Klinik FKUH, Dr. dr. Yuyun Widaningsih, M.Kes, Sp.PK guru kami yang bijaksana, senantiasa

membimbing dan memberikan arahan kepada penulis dalam berbagai kegiatan, mengajar, memberi nasehat dan semangat serta mendorong penulis supaya lebih maju.

7. Ketua Program Studi Ilmu Patologi Klinik FKUH, Dr. dr. Tenri Esa, M.Si, Sp.PK, guru dan juga selaku Anggota Penasihat/Sekretaris Pembimbing yang penuh pengertian dan senantiasa membimbing dan memberikan arahan kepada penulis dalam berbagai kegiatan, mengajar, memberi nasehat, semangat dan mendorong penulis supaya lebih maju serta memberikan bimbingan sejak masa penelitian hingga penyusunan karya akhir ini.
8. Sekretaris Program Studi Ilmu Patologi Klinik FKUH, Dr. dr. Rachmawati A Muhiddin, Sp.PK(K), guru dan selaku Dosen Penguji yang begitu lembut, senantiasa memberi bimbingan, nasehat dan telah meluangkan waktu untuk memberikan ilmu serta saran dalam penyempurnaan karya akhir ini.
9. Semua guru, Supervisor Program Studi Ilmu Patologi Klinik FKUH yang senantiasa memberikan bimbingan dan saran selama penulis menjalani pendidikan sampai pada penyusunan karya akhir ini.
10. Pembimbing metodologi Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS yang telah membimbing penulis dalam bidang Metode Penelitian dan Statistik selama penyusunan karya akhir ini.

11. Direktur RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menimba ilmu dan menjalani pendidikan di rumah sakit ini.
12. Kepala Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, Kepala Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RS Universitas Hasanuddin, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Ibnu Sina, Kepala Instalasi Laboratorium RSUD Labuang Baji, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Stella Maris, Direktur RSUD Dayaku Raja Kota Bangun Kalimantan Timur, Kepala PMI, Ketua Departemen Ilmu Penyakit Dalam beserta staf yang telah menerima dan membantu penulis dalam menjalani masa pendidikan.
13. Kepala Unit Penelitian FKUH beserta staf yang telah memberi izin dan membantu dalam proses pemeriksaan sampel untuk penelitian ini.
14. Seluruh *volunteer* para residen junior yang telah bersedia menjadi subyek dalam penelitian ini, penulis mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya.
15. Teman-teman sejawat seperjuangan penulis selama pendidikan PPDS Program Studi Ilmu Patologi Klinik, khususnya kepada teman-teman angkatanku tersayang "**Troponin**": dr. Akik Anton, dr. Putri, dr. Rira, dr. Ivon, dr. Oche, dr. Geby, dr. Marini, dr. Anwar dan dr. Tarau yang telah berbagi suka dan duka selama masa pendidikan penulis. Kebersamaan dan persaudaraan kita selama 4 tahun ini merupakan hal yang tak terlupakan. Terima kasih banyak Tropz sudah banyak bantu

menguatkan penulis melewati masa-masa sulit terutama ketika penulis semester 1, benar-benar masya ALLAH pengorbanan yang luar biasa. Insya ALLAH semoga persaudaraan ini tetap terjaga dan tetap saling berkabar walau ditempat tugas masing-masing. Aamiin allahumma aamiin.

16. Senior-senior terbaikku dr. Dewi Kartini, Sp.PK, dr. Chelvy Wijaya, Sp.PK, dr. Fatmawati Achmad, Sp.PK, dr. Riska Anton, Sp.PK, dr. Febrina Rovani, Sp.PK, dr. Hermawan, angkatan *Greyzone* terutama dr. Evi Andriani, Sp.PK, atas ilmu bimbingan dan dukungan serta *support* selama penulis menjalani pendidikan.
17. Teman-teman sejawat PPDS junior tersayang, dr. Putri Hidayasyah Purnama, dr. Andi Handayani, dr. Yunita Rapa, dr. Uswatun Hasanah, dr. Ullifannuri Rachmi, dr. Yunianingsih Selanno, dr. Y. Kusumo Adi Arji Atmanto, dr. Nurjannah, dr. Siti Rahmah, dr. Adeline Nurul Hasanah, dr. Ellen Kurniawati Tungka, dr. Budi Parabang, dr. Sri Mahtufa Riski, dr. Fierna Darmawanti Hanafi, dr. Fadhlan dan junior lainnya yang telah membantu selama masa PPDS, terima kasih semoga ALLAH SWT memudahkan masa pendidikan kalian semua. Aamiinn allahumma aamiin.
18. Teman-teman analis RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, RS Universitas Hasanuddin, RS Ibnu Sina, RS Stella Maris, RSUD Labuang Badji, RSUD Dayaku Raja Kota Bangun Kalimantan Timur, terima kasih

telah membantu dan berbagi pengalaman selama penulis menjalani masa PPDS.

19. Syadida, Amd.AK yang selalu ada dan selalu dapat diandalkan kapanpun, dimanapun dalam berbagai hal baik itu dukungan moril, support pribadi, menjaga, merawat, menyayangi penulis seperti saudara kandung juga menemani, membantu penulis selama menjalani masa PPDS hingga saat proses pengumpulan sampel dalam penelitian karya akhir ini. Terima kasih banyak Kak, semua kebaikan kakak hanya ALLAH SWT yang dapat membalasnya. Insya ALLAH kebersamaan dan komunikasi ini tetap terjalin walau ditempat tugas yang berbeda.
20. Sari, terima kasih Kak atas semua bantuan dan kebaikan selama penulis menjalani masa pendidikan hingga penyelesaian karya akhir ini.
21. Nurilawati, SKM terima kasih atas semua bantuan, menemani dan memberikan support disaat masa sulit semester 1 serta dukungan bagi penulis selama masa pendidikan hingga penyelesaian karya akhir ini.
22. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis tulis satu persatu yang telah memberikan dukungan yang sangat berarti kepada penulis.

Akhirnya ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada kedua orang tua saya tercinta, Abiku Faraid Sabban, Mamah tersayang Fareha Banamah, atas doa tulus, kasih sayang, kesabaran, dan dukungan semangat maupun material selama ini. Terima kasih kepada Ami Chalid Banamah, Ami Zikra Banamah, yang telah memberikan dukungan doa dan semangat, serta seluruh keluarga besar

atas kasih sayang dan dukungan serta doa tulus sehingga penulis dapat menyelesaikan setiap tahap proses pendidikan ini dengan baik.

Terima kasih penulis sampaikan pula kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberi bantuan baik moril maupun materil secara langsung maupun tidak langsung. Melalui kesempatan ini pula, perkenankan penulis menghaturkan permohonan maaf yang setulus-tulusnya atas segala kekhilafan dan kesalahan yang telah dilakukan diluar niat kami maupun tidak sengaja selama masa pendidikan sampai selesainya karya akhir ini. Penulis berharap karya akhir ini dapat memberi sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan terutama di bidang Ilmu Patologi Klinik di masa yang akan datang. Semoga ALLAH SWT senantiasa menyertai setiap langkah pengabdian kita, Aamiin allahumma aamiinnn.

Makassar, Februari 2021

Faigah Aprilia Sy Faraid

ABSTRAK

Faigah Aprilia. Analisis Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* pada *Platelet Rich Plasma* dengan Penambahan Aktivator Kalsium Klorida (CaCl_2) + Trombin pada Suhu dan Waktu Penyimpanan yang Berbeda (dibimbing oleh Uleng Bahrun dan Tenri Esa)

Latar belakang: *Platelet rich plasma* (PRP) secara potensial dapat meningkatkan proses penyembuhan melalui *growth factor* (GF) dan sitokin granula- α yang terdapat dalam trombosit. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) merupakan salah satu GF terbanyak dalam PRP dengan kemampuan kuat menginduksi permeabilitas sel endotel, proliferasi, angiogenesis mempunyai peranan penting dan aplikatif dalam berbagai bidang kedokteran. Tujuan penelitian membandingkan jumlah trombosit dan kadar VEGF PRP dengan penambahan aktivator kalsium klorida (CaCl_2) + trombin pada suhu dan waktu penyimpanan berbeda.

Metode: Penelitian menggunakan desain *experimental laboratory* pada 16 sampel. Pemeriksaan kadar VEGF PRP dengan metode ELISA sebelum aktivasi (VEGF PRP) sebagai pemeriksaan awal. Aktivasi trombosit menggunakan aktivator CaCl_2 + Trombin dan diinkubasi 4°C selama 30 menit. Pemeriksaan kadar VEGF PRP setelah aktivasi 1 jam suhu ruang (t-PRP1), 24 jam suhu 4°C (t-PRP2) dan 7 hari suhu -20°C (t-PRP3). Data dianalisis menggunakan uji *Wilcoxon*, *Friedman* dan *post hoc wilcoxon*, bermakna jika $p < 0,05$.

Hasil: Terdapat kenaikan median VEGF sebesar 1,07 kali setelah aktivasi 1 jam suhu ruang ($p=0,049$), penurunan 0,88 kali setelah aktivasi 24 jam suhu 4°C ($p=0,642$), kenaikan 1,83 kali setelah aktivasi 7 hari suhu -20°C ($p < 0,001$). Disimpulkan bahwa aktivasi PRP dengan CaCl_2 + trombin selama 7 hari pada suhu -20°C menghasilkan VEGF yang paling tinggi dibandingkan pada suhu ruang dan suhu 4°C . Disarankan menghindari penggunaan PRP yang disimpan pada 24 jam suhu 4°C .

Kata kunci: *Platelet rich plasma*, *Vascular endothelial growth factor*, Trombosit, *Growth factor*, CaCl_2 , Trombin

ABSTRACT

Faigah Aprilia. Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor in Platelet Rich Plasma with Addition of Activator Calcium Chloride and Thrombine in Different Temperature and Time of Storage (supervised by Uleng Bahrun, Tenri Esa).

Background: Platelet rich plasma (PRP) can potentially increase the healing process through growth factor (GF) and α -granular cytokines contained in platelets. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the largest GFs in PRP with a strong ability to induce endothelial cell permeability, proliferation, angiogenesis which has an important and applicable role in various fields of medicine. The aim of this study was to compare the platelet count and VEGF PRP levels with the addition of calcium chloride (CaCl_2) and thrombine as activators at different temperature and time of storage.

Methods: An experimental laboratory design using 16 samples was performed by measuring VEGF PRP levels by ELISA method before activation (VEGF PRP) as the initial examination. Platelets then activated using CaCl_2 +thrombine activator at 4°C for 30 minutes, and VEGF PRP levels measured after activation for 1 hour at room temperature (t-PRP1), 24 hours at 4°C (t-PRP2) and 7 days at -20°C (t-PRP3). Data were analyzed using the Wilcoxon, Friedman and post hoc Wilcoxon tests, significant if $p < 0.05$.

Results: There was a median VEGF increase of 1.07 times after 1 hour of activation at room temperature ($p=0.049$), a decrease of 0.88 times after 24 hours of activation at 4°C ($p=0.642$), an increase of 1.83 times after 7 days of temperature activation -20°C ($p < 0.001$). It was concluded that PRP activation with CaCl_2 +thrombin for 7 days at -20°C produced the highest VEGF compared to room temperature and 4°C . It is recommended to avoid using PRP stored at 24 hours at 4°C .

Keywords: Platelet rich plasma, Vascular endothelial growth factor, Growth factor, Platelets, CaCl_2 , Thrombine

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
BAB I 1	
PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
1. Tujuan Umum.....	4
2. Tujuan Khusus.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II 6	
TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Trombosit	6
1. Definisi.....	6
2. Produksi Trombosit	6
3. Struktur Trombosit.....	8
4. Antigen Trombosit	10
5. Fungsi Trombosit.....	11
6. Aktivasi Trombosit.....	18
B. <i>Platelet Rich Plasma</i>	21
1. Sejarah <i>Platelet Rich Plasma</i>	21
2. Definisi <i>Platelet Rich Plasma</i>	22
3. Manfaat <i>Platelet Rich Plasma</i>	23
4. <i>Growth factor</i> dalam <i>Platelet Rich Plasma</i>	27
5. Metode Perolehan <i>Platelet Rich Plasma</i>	30
6. Inkubasi dan Aktivasi Trombosit pada <i>Platelet Rich Plasma</i>	37
7. Penyimpanan Produk PRP pada Suhu dan Waktu yang bervariasi	45
C. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	46
1. Definisi VEGF.....	46

2. Reseptor VEGF	47
3. Fungsi VEGF.....	50
4. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> dalam <i>Platelet Rich Plasma</i> ...	53
BAB III.....	56
KERANGKA PENELITIAN	56
A. Kerangka Teori.....	56
B. Kerangka Konsep.....	57
BAB IV	58
METODE PENELITIAN	58
A. Desain Penelitian	58
B. Tempat dan Waktu Penelitian.....	58
1. Tempat Penelitian	58
2. Waktu Penelitian.....	58
C. Populasi Penelitian dan Sampel Penelitian.....	58
D. Perkiraan Besar Sampel.....	58
E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	59
1. Kriteria Inklusi.....	59
2. Kriteria Eksklusi	60
F. Izin Subyek Penelitian	60
G. Cara Kerja.....	60
H. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif	71
I. Metode Analisis	72
J. Skema Alur Penelitian	75
BAB V	76
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	76
A. HASIL.....	76
1. Karakteristik Subyek Penelitian.....	76
2. Perbedaan Jumlah Trombosit-Pra PRP dan Trombosit-PRP	77
3. Perbedaan Kadar VEGF PRP sebelum aktivasi dan setelah aktivasi 1 jam pada RT, 24 jam pada suhu 4 ⁰ C, dan 7 hari pada suhu - 20 ⁰ C.....	77
4. Perbedaan Kadar VEGF PRP setelah aktivasi selama 1 jam pada RT, 24 jam pada suhu 4 ⁰ C dan 7 hari pada suhu -20 ⁰ C	79

B. PEMBAHASAN	81
C. RINGKASAN HASIL PENELITIAN	92
BAB VI	94
SIMPULAN DAN SARAN	94
A. SIMPULAN.....	94
B. SARAN.....	94
DAFTAR PUSTAKA	96
LAMPIRAN.....	107

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komponen granula- α pada trombosit	10
Tabel 2. <i>Normal wound-healing process</i>	15
Tabel 3. <i>Growth factors and cellular effects</i>	28
Tabel 4. Pengenceran larutan standar VEGF	68
Tabel 5. Konsentrasi larutan standar VEGF	68
Tabel 6. Karakteristik subyek penelitian	76
Tabel 7. Perbandingan Jumlah Trombosit-Pra PRP dan Trombosit-PRP	77
Tabel 8. Perbedaan Kadar VEGF PRP sebelum aktivasi dan setelah aktivasi 1 jam pada RT, 24 jam pada suhu 4 ⁰ C, dan 7 hari pada suhu-20 ⁰ C	78
Tabel 9. Perbedaan Kadar VEGF PRP setelah aktivasi selama 1 jam pada RT, 24 jam pada suhu 4 ⁰ C dan 7 hari pada suhu -20 ⁰ C	79

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Megakariosit	7
Gambar 2. Ultrastruktur trombosit	8
Gambar 3. Fungsi trombosit	11
Gambar 4. Perlekatan trombosit	14
Gambar 5. Mekanisme proses penyembuhan luka	17
Gambar 6. Struktur trombosit sebelum teraktivasi dan yang telah teraktivasi menggunakan mikrograd elektron	20
Gambar 7. Aktivasi trombosit	21
Gambar 8. Aplikasi klinis PRP berbagai bidang kedokteran	25
Gambar 9. Pemisahan plasma berdasarkan gradien kepadatannya	31
Gambar 10. Perubahan morfologi setelah penambahan CaCl_2	43
Gambar 11. Mekanisme pembentukan fibrin yang diinduksi Ca^{2+}	44
Gambar 12. Molekul protein dimerik VEGF	47
Gambar 13. Isoform VEGF	50
Gambar 14. Pengenceran reagen VEGF	68
Gambar 15. Perbedaan Kadar VEGF PRP setelah aktivasi selama 1 jam pada RT, 24 jam pada suhu 4°C dan 7 hari pada suhu -20°C	

DAFTAR SINGKATAN

ACD	: <i>Acid Citrate Dextrose</i>
ADP	: <i>Adenosine diphosphate</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
CTGF	: <i>Connective tissue growth factor</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
gp	: <i>Glycoprotein</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HMEC-1	: <i>Human Microvascular Endothelial Cell Line-1</i>
HPA	: <i>Human Platelet Antigen</i>
IGF-1	: <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
M-CSF	: <i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MSCs	: <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>

NSAID	: <i>Non Steroid Anti Inflammatory Drug</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGF	: <i>Platelet Growth Factor</i>
PPP	: <i>Platelet poor plasma</i>
PRF	: <i>Platelet rich fibrin</i>
PRP	: <i>Platelet Rich Plasma</i>
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
RCF	: <i>Relative Sentrifugal Force</i>
RT	: <i>Room temperature</i>
SCF	: <i>Stem Cell Factor</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TRPV-1	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid-1</i>
TRPA-1	: <i>Transient Receptor Potential Ankyrin-1</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VGP	: <i>Vascular growth promoters</i>
VPF	: <i>Vascular permeability factor</i>
vWF	: <i>Von whilebrand factor</i>
WB	: <i>Whole Blood</i>
WBC	: <i>White Blood Cell</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Trombosit merupakan fragmen sel granular, berbentuk cakram, tidak berinti, unsur seluler dari sumsum tulang terkecil dan penting untuk hemostasis dan koagulasi. Trombosit mengandung tiga jenis granula yaitu granula- α , granula padat dan lisosom, serta mengandung lebih dari 1.100 protein termasuk *growth factor* (GF), enzim, penghambat enzim dan senyawa bioaktif lainnya. Granula- α spesifik yang lebih banyak mengandung faktor pembekuan, *von whilebrand factor* (vWF), GF, dan protein lain (Isabel Andia & Abate, 2013; Dhurat & Sukesh, 2014; Fisk, Pisciotto, Snyder, & Perrota, 2006; Hoffbrand & PAH, 2013; Holinstat, 2017; Huber et al., 2016). Trombosit merupakan sumber potensial protein aktif terapeutik seperti mitogenik, kemotaktik, adhesi, angiogenik dan protein antiangiogenik, dan faktor neurotropik (Hoffbrand & PAH, 2013; Linden, 2013)

Platelet rich plasma (PRP) yang dikenal dengan *autolog platelet gel* didapatkan melalui proses sentrifus plasma darah (*autologous blood*) sehingga menghasilkan konsentrasi trombosit yang tinggi dalam volume plasma yang rendah dan kaya akan GF (Dhurat & Sukesh, 2014; Kushida et al., 2014). *Platelet rich plasma* secara potensial dapat meningkatkan proses penyembuhan dengan berbagai jenis GF dan sitokin granula- α yang terdapat dalam trombosit. Banyaknya GF yang terkandung di dalam PRP

berfungsi mempercepat regenerasi endotel, epitel dan epidermal, menstimuli angiogenesis, merangsang sintesis kolagen, mempercepat penyembuhan jaringan lunak, menurunkan jaringan parut pada kulit, mempercepat respon homeostasis pada cedera, sehingga merangsang proses penyembuhan luka (Dhurat & Sukesh, 2014; Kushida et al., 2014; Wang & Avila, 2013; Widyadharma, 2013).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan salah satu GF terbanyak yang terdapat dalam kandungan PRP dengan mempunyai peranan kemampuan kuat menginduksi permeabilitas sel endotel, proliferasi dan angiogenesis, juga terlibat dalam pengaturan homeostasis organ, seperti otak, jantung, ginjal, atau hati serta perannya penting dalam regenerasi jaringan (Anitua, Prado, Sánchez, & Orive, 2012; González et al., 2013; Maharaj & D'Amore, 2007). *Vascular endothelial growth factor* juga merupakan anti-angiogenik pengobatan melalui penghambatan aktivasi VEGFR mempunyai peranan penting dalam aplikasi terapeutik seperti retinopati diabetik, kanker dan berfungsi dalam sel papila dermal fase anagen, mengatur *perifollicularangiogenesis* serta meningkatkan ukuran pembuluh *perifollicular* selama fase pertumbuhan anagen (Alsohaimi, 2019; Paus, 2008; Zhao & Singh, 2018).

Studi oleh Cavallo *et al.*, (2016) menemukan kadar VEGF selama 1 jam dengan menggunakan kombinasi CaCl₂ + trombin menghasilkan kadar VEGF yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hanya menggunakan satu aktivator trombin hingga 24 jam ($p < 0,05$) (Cavallo *et al.*, 2016). Studi

oleh Etulain *et al.*, (2018) menemukan kadar VEGF, EGF, bFGF, IL-17, dan IL-8 sekresi total molekul ini tercapai ketika PRP diinkubasi selama 30 menit sebelum diaktivasi pada suhu 4°C (Etulain *et al.*, 2018).

Studi lain dilakukan oleh Lisdiana (2020) didapatkan hasil peningkatan kadar TGF- β tertinggi pada produk PRP yang diaktivasi dengan CaCl₂ yang disimpan selama 1 jam pada suhu ruang (meningkat 212%), dan menurun 28% pada penyimpanan selama 7 hari pada suhu -80°C. Akan tetapi, tidak semua rumah sakit atau laboratorium klinik memiliki fasilitas penyimpanan -80°C (Amin Asri Lisdiana, 2020).

Saat ini belum ada konsensus pembuatan proses PRP, inkubasi PRP, penggunaan aktivator trombosit, suhu, waktu penyimpanan PRP yang ideal untuk menghasilkan dan mempertahankan kadar GF secara optimal (Dhurat & Sukesh, 2014). Araki *et al.*, (2012) juga menyebutkan bahwa tidak terstandarisasinya protokol pembuatan PRP untuk uji klinis membuat efikasi PRP masih diperdebatkan. Oleh karena itu, diperlukan standarisasi proses pembuatan PRP untuk memperoleh jumlah trombosit dan kadar GF yang optimal (Araki *et al.*, 2012; Bausset *et al.*, 2012; Chahla *et al.*, 2017). Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk membandingkan jumlah trombosit dan kadar VEGF pada PRP dengan penambahan aktivator CaCl₂ + trombin pada suhu dan waktu penyimpanan yang berbeda.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian adalah bagaimana perbedaan kadar VEGF pada

PRP sebelum aktivasi dan PRP setelah aktivasi dengan menggunakan aktivator CaCl_2 + trombin pada suhu dan waktu penyimpanan yang berbeda?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Mengetahui perbedaan kadar VEGF pada PRP sebelum aktivasi dan PRP setelah aktivasi dengan menggunakan aktivator CaCl_2 + trombin pada perlakuan yang berbeda (suhu dan waktu penyimpanan)

2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui kadar VEGF PRP sebelum aktivasi
- b. Mengetahui kadar VEGF pada PRP setelah aktivasi menggunakan CaCl_2 + trombin yang disimpan pada suhu ruangan selama 1 jam
- c. Mengetahui kadar VEGF pada PRP setelah aktivasi menggunakan CaCl_2 + trombin yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam
- d. Mengetahui kadar VEGF pada PRP setelah aktivasi menggunakan CaCl_2 + trombin yang disimpan pada suhu -20°C selama 7 hari

D. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai waktu penyimpanan dan suhu optimal terhadap kadar VEGF pada PRP
2. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efektifitas aktivator CaCl_2 + trombin terhadap peningkatan kadar VEGF pada PRP

3. Hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan sebagai acuan dalam melakukan persiapan, pengelolaan dan pembuatan PRP.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Trombosit

1. Definisi

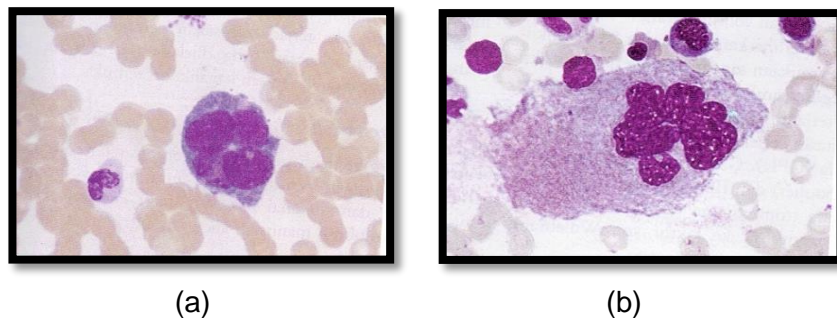
Trombosit disebut juga *platelet* atau keping darah. Trombosit adalah sel kecil berinti yang berasal dari hematopoietik megakariosit. Trombosit dihasilkan di sumsum tulang melalui fragmentasi sitoplasma pada megakariosit. Trombosit merupakan fragmen-fragmen sel granular, berbentuk cakram, tidak berinti. Trombosit merupakan unsur seluler dari sumsum tulang terkecil dan penting untuk hemostasis dan koagulasi (Hoffbrand & PAH, 2013; Holinstat, 2017).

Trombosit adalah fragmen sitoplasmik tanpa inti berdiameter 2 – 4 mm yang berasal dari megakariosit. Hitung trombosit normal di dalam darah tepi adalah 150.000 – 400.000/ μ L dengan proses pematangan selama 7 – 10 hari di dalam sumsum tulang (Hoffbrand & PAH, 2013; Holinstat, 2017).

2. Produksi Trombosit

Proses pembentukan dan perkembangan semua sel darah dari prekursor induknya disebut hemopoiesis. Pembentukan trombosit disebut megakariopoiesis karena dihasilkan di sumsum tulang dengan fragmentasi sitoplasma megakariosit. Prekursor megakariosit, yaitu megakarioblas berasal dari proses diferensiasi dari sel punca hematopoietik. Megakariosit mengalami pematangan melalui replikasi

sinkron endomitotik (yaitu replikasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) tanpa pembelahan nukleus atau sitoplasma) yang menyebabkan volume sitoplasma setiap kali jumlah lobus nukleus bertambah menjadi dua kali lipat. Megakariosit matang berukuran sangat besar, dengan satu nukleus berlobus yang terletak di tepi dan rasio nukleus: sitoplasma rendah (Gambar 1). Proses replikasi yang ke-8 kali pertumbuhan sel tersebut akan berhenti. Kemudian sitoplasma menjadi granular dan trombosit dilepaskan dalam bentuk platelet/keping-keping (Hoffbrand & PAH, 2013; Linden, 2013).



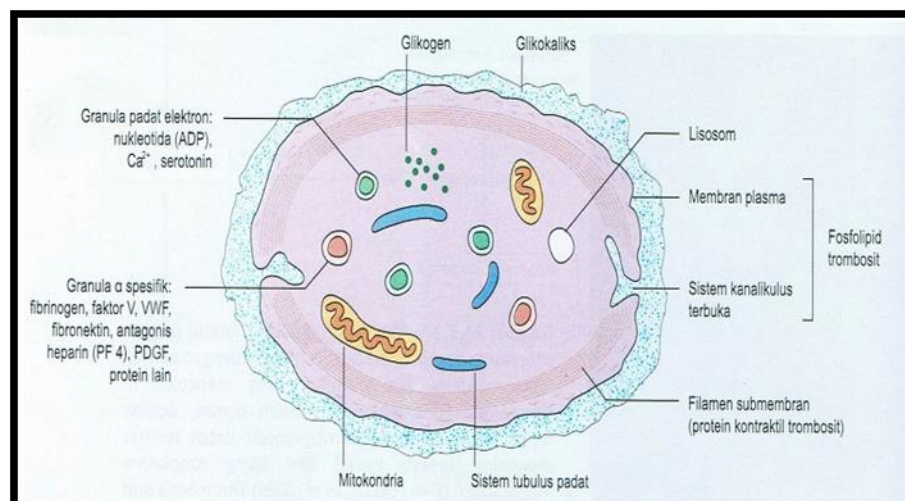
Gambar 1. Megakariosit : (a). bentuk imatur dengan sitoplasma basofilik (b). bentuk matang dengan banyak lobus nukleus dan granulasi yang mencolok di sitoplasma (Hoffbrand & PAH, 2013)

Trombosit terbentuk dari fragmentasi ujung-ujung perluasan sitoplasma megakariosit. Trombosit memasuki sirkulasi darah saat trombosit dilepaskan ke sinusoid sumsum tulang. Setiap megakariosit menghasilkan sekitar 4.000 trombosit. Interval waktu dari diferensiasi sel punca manusia menjadi produksi trombosit adalah sekitar 10 hari. Trombopoietin adalah regulator utama pembentukan trombosit dan secara konstitutif dihasilkan oleh hati dan ginjal, dengan reseptor C-MPL

serta suatu reseptor lain, yaitu *interleukin* (IL)-11 (Hoffbrand & PAH, 2013; Jane-Bain, 2014).

3. Struktur Trombosit

Trombosit berukuran sangat kecil dan diskoid, berdiameter 3,0 x 0,1 μm , dengan volume rerata 7 –11 fL. Ultrastruktur trombosit diperlihatkan pada Gambar 2. Glikoprotein selubung permukaan sangat penting dalam reaksi perlekatan dan agregasi trombosit yang merupakan proses-proses awal untuk terjadinya pembentukan sumbat trombosit selama hemostasis. Perlekatan ke kolagen dipermudah oleh glikoprotein Ia (GPIa) (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014; Hoffbrand & PAH, 2013).



Gambar 2. Ultrastruktur trombosit (Hoffbrand & PAH, 2013)

Trombosit mengandung tiga jenis granula simpanan: padat, α , dan lisosom. Granula- α berdiameter 200 – 500 nm dengan jumlah lebih banyak yaitu sekitar 50 – 80 granula per trombosit, mengandung diantaranya faktor pembekuan, GF seperti *Platelet-Derived Growth*

Factor (PDGF), *transforming growth factor-beta* (TGF- β), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *epidermal growth factor* (EGF), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), dan protein lain dan lebih terinci dapat dilihat pada Tabel 1 (Dhurat & Sukesh, 2014; Hoffbrand & PAH, 2013; Middleton, Barro, Muller, Terada, & Fu, 2012). Setiap trombosit mengandung sekitar 80 granula- α , selain GF juga mengandung protein adhesif, kemokin, fibrinolitik protein dan molekul pro-koagulan (Hamilton, Tol, Knez, & Chalabi, 2015).

Granula padat lebih jarang dan mengandung *adenosine triphosphate* (ATP), serotonin, dan kalsium. Granula- α spesifik yang lebih banyak mengandung faktor pembekuan, vWF, GF, dan protein lain. Lisosom mengandung enzim-enzim hidrolitik. Trombosit juga kaya akan protein penyalur sinyal dan protein membran sel yang menunjang perpindahan cepat dari keadaan reaktif menjadi aktif jika terjadi kerusakan pembuluh darah. Selama reaksi pelepasan yang dijelaskan di bawah granula dibebaskan ke sistem kanalikulum terbuka (Hoffbrand & PAH, 2013; Linden, 2013).

Tabel 1. Komponen granula- α pada trombosit (Linden, 2013)

Molekul adhesi	Fibronektin, fibrinogen, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, integrin $\alpha_v\beta_3$ p-selektin, <i>von Wille brand Factor</i> (vWF).
Kemokin	B-Tromboglobulin, <i>growth-regulated oncogen α</i> , interleukin 8, <i>macrophage inflammatory protein 1α</i> , <i>monocyte chemotactic protein 3</i> , <i>neutrophil-activating protein</i> , platelet factor 4, RANTES.
Protein koagulasi	Faktor V, faktor VIII, kininogen, multimerin.
Protein fibrinolisis	A ₂ -Macroglobulin, plasminogen, plasminogen activator inhibitor 1.
<i>Growth Factors</i>	<i>Platelet-Derived Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor 1, transforming growth factor β, Vascular endothelial growth factor.</i>
Molekul imunologik	B1H globulin , c1 inhibitor, factor D, IgG.
Protein lainnya	A ₁ antitrypsin, albumin, osteonectin.

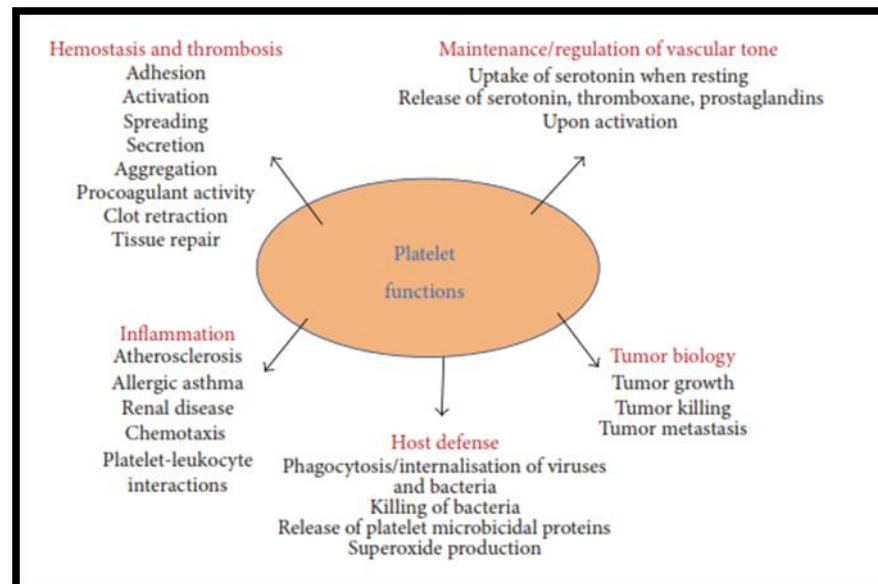
4. Antigen Trombosit

Beberapa protein di permukaan trombosit terbukti merupakan antigen penting dalam autoimunitas spesifik-trombosit dan dinamai *human platelet antigens* (HPA). Pada umumnya terdapat dua alel yang berbeda, yang dinamai alel a atau b (mis. HPA-1a). Trombosit juga mengekspresikan antigen ABO dan *human leucocyte antigen* (HLA) kelas I (Hoffbrand & PAH, 2013).

5. Fungsi Trombosit

a. Fungsi hemostasis

Trombosit memiliki peran dalam sistem hemostasis, suatu mekanisme faali tubuh untuk melindungi diri terhadap kemungkinan perdarahan atau kehilangan darah. Fungsi utama trombosit adalah membentuk sumbat mekanis yang merupakan respons hemostatik normal terhadap cedera vaskular, melindungi pembuluh darah terhadap kerusakan endotel akibat trauma-trauma kecil yang terjadi sehari-hari dan mengawali penyembuhan luka pada dinding pembuluh darah, membentuk sumbatan dengan jalan adhesi (perlekatan trombosit pada jaringan sub-endotel pada pembuluh darah yang luka) dan agregasi (Gambar 3) (Hoffbrand & PAH, 2013; Jane-Bain, 2014).



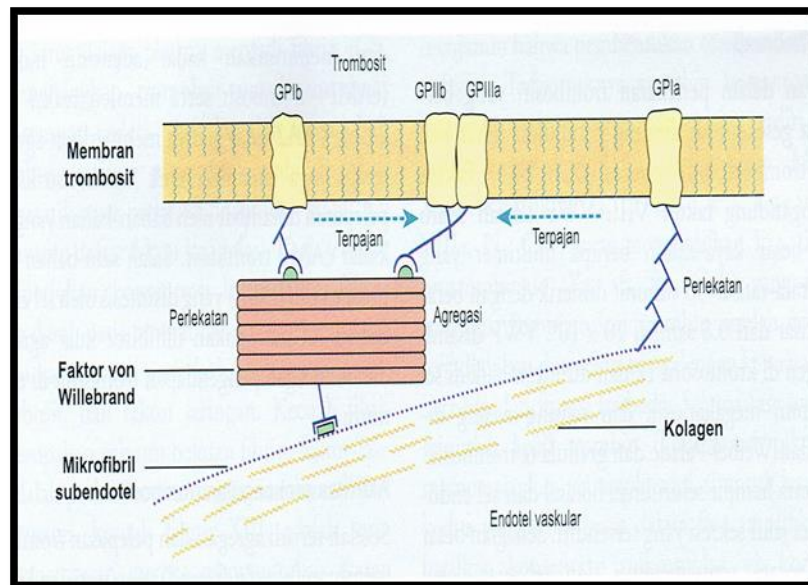
Gambar 3. Fungsi trombosit (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014)

Trombosit memiliki zona luar yang jernih dan zona dalam yang berisi organel-organel sitoplasmik. Permukaan diselubungi reseptor glikoprotein yang digunakan untuk reaksi adhesi & agregasi yang mengawali pembentukan sumbat hemostasis. Fungsi trombosit yaitu perlekatan (*adhesi*), penggumpalan (agregasi) dan reaksi pelepasan, juga terdapat amplifikasi (penguatan). Adhesi trombosit adalah perlekatan antar trombosit dengan jaringan endotel serta jaringan yang cedera, sehingga tertutupnya luka pada pembuluh darah. Proses perlekatan ini akan membuat terjadinya interaksi antara permukaan trombosit dengan jaringan cedera sehingga meningkatkan daya lekat trombosit dan mengaktifkan faktor koagulasi lainnya. Agregasi trombosit adalah kemampuan trombosit melekat satu sama lain untuk membentuk sumbatan (Hoffbrand & PAH, 2013; Jane-Bain, 2014).

Trombosit juga kaya akan protein penyalur sinyal dan protein rangka sel yang menunjang perpindahan cepat dari keadaan tenang menjadi aktif jika terjadi kerusakan pembuluh darah. Membran plasma mengalami invaginasi ke dalam interior trombosit untuk membentuk suatu sistem membran terbuka (kanalikulus) yang menghasilkan permukaan reaktif yang luas menyebabkan protein-protein koagulasi plasma dapat diserap secara selektif. Fosfolipid membran sangat penting dalam perubahan faktor koagulasi X menjadi Xa dan protrombin (faktor II) menjadi trombin (faktor IIa)

(Everts et al., 2006; Hoffbrand & PAH, 2013; Holinstat, 2017; Lichtman et al., 2017). Trombin adalah enzim yang ditemukan dalam penggumpalan darah diproduksi dari protrombin dan merupakan faktor penting dalam konversi fibrinogen menjadi fibrin yang membentuk unit dasar dari bekuan darah. Trombin berfungsi dalam proteolisis fibrinogen menjadi fibrin serta mengaktifkan FXIII yang berperan dalam *cross-link* monomer fibrin terpolimerisasi menjadi gumpalan fibrin kedap-air (*clot*) yang menutup luka (Schmaier, 2019).

Glycoprotein (GP) Ib dan IIb/IIIa penting dalam perlekatan trombosit ke faktor vWF dan karenanya ke subendotel vaskuler. Perlekatan trombosit. Pengikatan GP Ib (yang terdiri dari empat protein: GPIb α , GPIb β , GPIX, dan GPV) ke vWF menyebabkan perlekatan ke subendotel dan juga mejankan tempat pengikatan GPIIb/IIIa (integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$) ke fibronegen dan vWF yang menyebabkan agregasi trombosit. GPIa memungkinkan perlekatan langsung trombosit ke kolagen dan juga mengeksplorasi tempat pengikatan GPIIb/IIIa (sesuai Gambar 4) tempat terjadinya sinyal. Tempat pengikatan untuk IIb/IIIa juga merupakan reseptor untuk fibrinogen yang penting dalam agregasi antar-trombosit (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014; Hoffbrand & PAH, 2013).



Gambar 4. Perlekatan trombosit (Hoffbrand & PAH, 2013)

b. Fungsi Non Hemostasis

Fungsi Non Hemostasis trombosit adalah membantu proses penyembuhan luka. Trombosit dalam membantu proses penyembuhan luka tidak terlepas dari GF pada trombosit yang mempengaruhi kemotaksis, diferensiasi, proliferasi, dan aktivitas sintesis sel sehingga mengatur *remodelling* fisiologis dan penyembuhan. Semakin banyak GF yang dapat sampai ke lokasi luka, semakin besar potensi untuk meningkatkan proses penyembuhan. Trombosit yang teraktivasi oleh trombin mengalami perubahan bentuk dan mengembangkan pseudopodia-pseudopodia panjang. Secara alami setelah terjadi trauma yang menyebabkan perdarahan, sebagai respons terhadap kerusakan jaringan untuk membentuk sumbat trombosit melalui proses agregasi dan mengeluarkan isi granula melalui *open canalicular system* yang

berperan penting pada berbagai fase penyembuhan luka (fase inflamasi hingga *fase remodelling*) (Everts *et al.*, 2006).

Dalam keadaan fisiologis, saat istirahat, trombosit bersifat non-trombogenik dan membutuhkan perangsangan sebelum menjadi poten dan memainkan peranan aktif dalam hemostasis dan proses penyembuhan luka. Setelah cedera, integritas kulit harus segera dipulihkan untuk mempertahankan fungsinya. Mekanisme penyembuhan luka telah diatur dalam tiga fase yaitu fase proliferasi, fase inflamasi dan fase *remodeling* (Guo & DiPietro, 2010).

Tabel 2. *Normal wound-healing process* (Guo & DiPietro, 2010)

Phase	Cellular and Bio-physiologic Events
Hemostasis	1. Vascular constriction 2. Platelet aggregation, degranulation, and fibrin formation (thrombus)
Inflammation	1. Neutrophil infiltration 2. Monocyte infiltration and differentiation to macrophage 3. Lymphocyte infiltration
Proliferation	1. Re-epithelialization 2. Angiogenesis 3. Collagen synthesis 4. Extracellular matrix formation
Remodeling	1. Collagen remodeling 2. Vascular maturation and regression

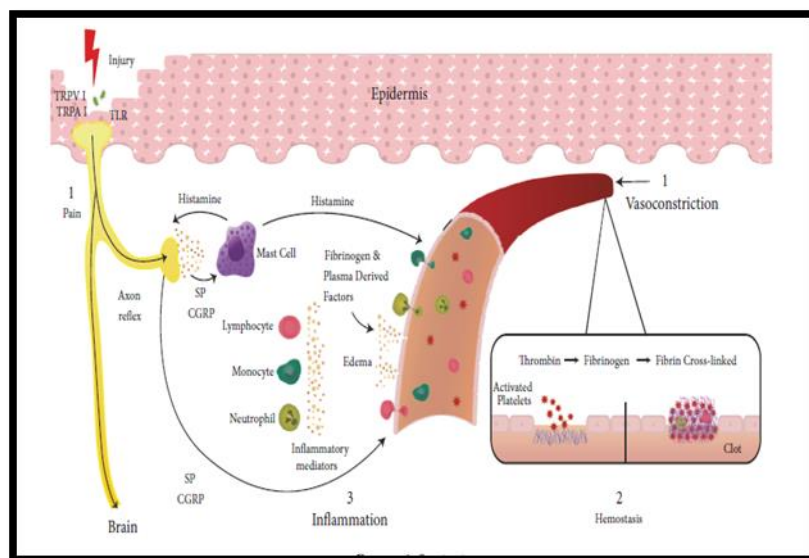
Dalam proses ini, sel mononuklear (MN) pada darah tepi, sel kulit dendritik, matriks ekstraseluler, sitokin, kemokin, GF, dan molekul yang berperan dalam proses penyembuhan luka. Kerusakan sel kulit mengaktifkan saluran potensial reseptor *Transient Receptor Potential Vanilloid-1* (TRPV-1) and *Transient Receptor Potential Ankyrin-1* (TRPA-1) yang berada di ujung neuron sensorik primer

dan di sel lain seperti keratinosit, sel mast, sel dendritik, dan sel endotel yang bertindak sebagai reseptor nosiseptif (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

Mekanisme penyembuhan luka telah diatur dalam tiga fase yaitu fase proliferasi, fase inflamasi dan fase *remodelling*. Fase inflamasi terjadi inflamasi neurogenik kulit dan hemostasis, proses awal dimulai pada detik pertama setelah cedera dan bertahan sekitar 1 jam. Diikuti oleh neutrofil ke jaringan yang terluka selama 24 jam pertama, kemudian bertahan dan mulai menurun hingga 1 minggu. Infiltrasi inflamasi progresif kemudian oleh monosit-makrofag ke luka dimulai hari kedua setelah cedera dan terus meningkat, mencapai maksimum selama fase proliferasi, mulai menurun selama setelah dua minggu, menjadi sel morfonuklear (MN) yang dominan dalam proses perbaikan jaringan. Limfosit yang bersirkulasi bermigrasi ke kulit lebih awal setelah cedera hari 4 dan bertahan selama dua minggu. Fase terakhir dimulai pada minggu kedua setelah cedera dalam *remodeling* jaringan yang sebelumnya terbentuk di fase proliferasi untuk mengembalikan integritas kulit. Tahap terakhir ini bisa bertahan lama (sesuai Gambar 5) (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

Cedera vaskular mengakibatkan terekspose membran basement protein dan makromolekul ekstraseluler matriks. Reseptor permukaan membran trombosit berikatan dengan kolagen,

mengaktifkan trombosit dan memproduksi trombin yang mengkatalisasi inisiasi kaskade koagulasi. Integrin trombosit yang berikatan dengan fibrinogen yang berasal dari fibrin yang terakumulasi dengan kolagen interstitial, membuat neutrofil, eritrosit, dan komponen darah lainnya yang membentuk fibrin. Matriks ekstraseluler sementara dibentuk oleh monomer fibrin yang membentuk protofibril fibrin itu distabilkan melalui Faktor XIIIa (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).



Gambar 5. Mekanisme proses penyembuhan luka (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019)

Selain hemostasis, degranulasi granula- α melepaskan TGF- β yang bertindak sebagai kemotaktan penting termasuk neutrofil dan makrofag. Reseptor permukaan sel pada trombosit berpartisipasi dalam interaksi sel-sel dan pengenalan mikroba dan pelepasan GF seperti PDGF, TGF- β 1, FGF, dan VEGF yang berinteraksi dengan sel endotel, monosit neutrofil, sel dendritik, sel B dan T, dan sel

natural killer (NK), mengaktivasi neutrofil, deteksi patogen, membentuk sumbatan dan modulasi dari respon imun bawaan dan adaptif (Cañedo-Dorantes & Cañedo-Ayala, 2019).

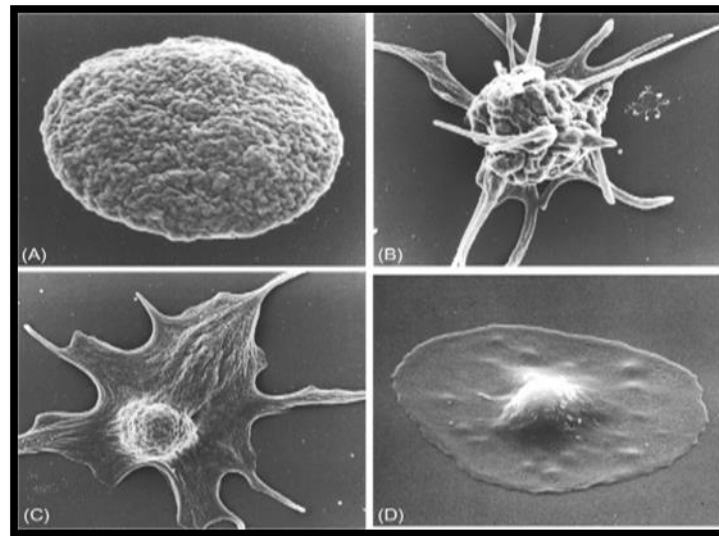
6. Aktivasi Trombosit

Telah diketahui bahwa trombosit diaktivasi oleh ADP, trombin, epinefrin, tromboksan A₂, kolagen, dan banyak senyawa lainnya dan dengan demikian agregat melalui pengikatan reseptor fibrinogen dan glikoprotein IIb / IIIa dan meningkatkan antigen permukaan yang dikenal sebagai “aktivasi trombosit marker”. Aktivasi trombosit diinduksi oleh agonis meningkatkan respon trombosit menunjukkan trombosit yang berbeda dengan setiap respons trombosit. Selama aktivasi, morfologi trombosit umumnya berubah dari bentuk cakram (istirahat) ke bentuk bola bergulir, bentuk belahan, dan akhirnya menyebar bentuk adhesi. Setelah trombosit diaktifkan akan mengalami perubahan morfologis yang signifikan, menghasilkan pseudopoda memanjang (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014; Jane-Bain, 2014; Toyoda et al., 2018).

Aktivasi juga menyebabkan perubahan membran fosfolipid sehingga permukaan fosfatidil serin yang bermuatan negatif menjadi terpajan dan memfasilitasi pembekuan darah. Trombosit menjadi bentuk sferis dan melekat satu sama lain, membentuk sumbat trombosit yang longgar, juga melekat pada tempat terjadinya kerusakan jaringan (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014; Jane-Bain, 2014; Toyoda et al., 2018). Pembentukan kompleks enzim–kofaktor–substrat dengan berikatan

pada permukaan fosfolipid bermuatan negatif yang terjadi karena trombosit teraktivasi, berperan penting dalam jalur koagulasi. Aktivasi trombosit juga dilengkapi oleh kerja trombin dan juga mekanisme koagulasi primer serta sekunder yang berfungsi bersama dan saling bergantung (Hoffbrand & PAH, 2013; Jane-Bain, 2014).

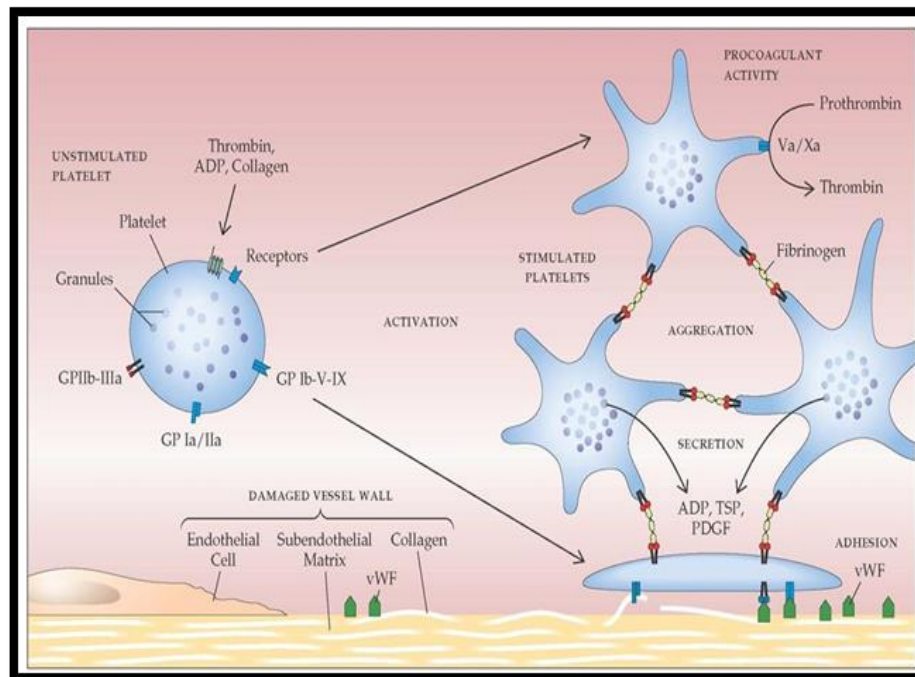
Gambar 6 menunjukkan mikrograf elektron dari trombosit yang beristirahat dan perubahan cepat yang terjadi pada strukturnya setelah aktivasi. Gambar 6 (A) Trombosit diskoid istirahat yang menunjukkan lipatan halus pada membran plasma yang mungkin berkontribusi untuk peningkatan membran plasma yang diperlukan saat penyebaran (perbesaran 30.000), (B) Trombosit yang diaktifkan menunjukkan ekstensi filopodia yang terjadi selama awal penyebaran dan aktivasi (perbesaran 13.000), (C) Trombosit penyebar aktif yang menunjukkan formasi, (D) Trombosit yang sepenuhnya tersebar dicitrakan oleh SEM konvensional (perbesaran 9000) (Thomas, 2019; van der Meijden & Heemskerk, 2019).



Gambar 6. Struktur trombosit sebelum teraktivasi dan yang telah teraktivasi menggunakan mikrograd elektron (Thomas, 2019)

Respons fungsional trombosit teraktivasi melibatkan empat proses berbeda: adhesi (pengendapan trombosit pada matriks subendotelial); agregasi (kohesi trombosit); sekresi (pelepasan protein granula trombosit); dan aktivitas prokoagulan (peningkatan generasi trombin). Trombosit diaktivasi oleh ADP dan trombin melalui perlekatan dengan unsur matriks ekstraseluler yang semuanya terikat dengan reseptor permukaan spesifik. Trombosit yang teraktivasi menjadi lebih melekat, lalu mengalami reaksi pelepasan dan membentuk agregat dengan sesama trombosit. *von willebrand factor* sangat esensial untuk terjadinya adhesi trombosit yang normal. Trombosit yang teraktivasi akan melepaskan isi granul yang meliputi prokoagulan dan agregan seperti ADP, vWF, faktor V, GF dan fibrinogen. Trombosit juga melepaskan serotonin (sebelumnya diambil dari plasma) yang menyebabkan kontraksi otot dan menyebabkan kontriksi arteriolar

(Gambar 7) (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014; Hoffbrand & PAH, 2013; Jane-Bain, 2014).



Gambar 7. Aktivasi trombosit (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014)

B. Platelet Rich Plasma

1. Sejarah Platelet Rich Plasma

Istilah "*platelet rich plasma* (PRP)" pada awalnya dikembangkan pada tahun 1954 oleh Kingsley untuk konsentrat trombosit, yang digunakan untuk perawatan pasien yang menderita trombopenia berat (Ehrenfest *et al.*, 2013). *Platelet rich plasma* atau plasma yang kaya trombosit juga dikenal sebagai *Platelet rich growth factors* (GFs), *Platelet rich fibrin* (PRF). Konsep awal dan deskripsi PRP dimulai di bidang hematologi. Ahli hematologi menciptakan istilah PRP pada 1970-an untuk menggambarkan plasma dengan jumlah trombosit di darah

perifer, pada awalnya digunakan sebagai produk transfusi untuk mengobati pasien dengan trombositopenia (R., 2017).

Bermula dari berbagai penelitian yang dilaksanakan, pemahaman akan trombosit semakin meningkat. Sekitar tahun 1980 didapatkan bahwa secara klinis trombosit memiliki fungsi dalam bidang kuratif. Dalam proses fisiologis penyembuhan luka, trombosit berfungsi sebagai sumber utama faktor biologis aktif (Widyadharna, 2013). Sepuluh tahun kemudian, PRP mulai digunakan dalam operasi maksilofasial sebagai PRF. Fibrin memiliki potensi sebagai perlekatan, berperan dalam homeostatis, dan PRP dengan karakteristik anti-inflamasi merangsang proliferasi sel (Montero, Santos, & Fernández, 2015). Selanjutnya, PRP telah digunakan terutama di bidang muskuloskeletal pada cedera olahraga. Dengan penggunaannya pada olahragawan profesional, ini telah menarik perhatian luas di media dan telah banyak digunakan dalam bidang ini (Lynch & Bashir, 2016). Bidang medis lain yang juga menggunakan PRP adalah bedah jantung, bedah anak, ginekologi, urologi, bedah plastik, dan oftalmologi (I Andia, Rubio-Azpeitia, Martin, & Abate, 2015).

2. Definisi *Platelet Rich Plasma*

Platelet rich plasma yang dikenal dengan autolog *platelet gel* melalui proses sentrifugasi sehingga menghasilkan konsentrasi trombosit yang tinggi dalam volume plasma yang rendah dan kaya akan GF, yang didapatkan setelah melalui proses sentrifus dari plasma darah

(*autologous blood*) (Dhurat & Sukesh, 2014; Kushida et al., 2014). Beberapa kepustakaan menyebutkan PRP dengan istilah *platelet-enriched plasma*, *platelet-rich concentrate*, *Autologous platelet gel*, *platelet concentrate*, *platelet gel*, *platelet rich in growth factor*, dan *platelet releasates* (Lacci & Dardik, 2010; Pietrzak & Eppley, 2005).

Platelet rich plasma adalah produk yang dihasilkan dari darah utuh segar yang mengandung trombosit dalam konsentrasi yang tinggi di atas normal, dengan sifat anti peradangan yang menyembuhkan dan pro-regeneratif sehingga tubuh mampu memperbaiki luka pada jaringan dengan lebih efisien (Eppley, Pietrzak, & Blanton, 2006; Martínez-Zapata et al., 2009). *Platelet rich plasma* merupakan agonis GF yang memiliki sifat mitogenik dan kemotaktik, mengandung komponen pembekuan darah dan GF yang lengkap (Lacci & Dardik, 2010). Trombosit dalam PRP mengandung molekul-molekul adhesi seperti fibronektin, fibrin dan vitronektin. Molekul-molekul adhesi sel ini memainkan peran dalam proses migrasi sel dan dengan demikian menambah aktifitas biologis potensial dari PRP (Widyadharma, 2013).

3. Manfaat *Platelet Rich Plasma*

Platelet rich plasma merupakan preparat konsentrat yang meningkat antara 4 hingga 9 kali lipat jumlah basal trombosit, dalam volume plasma (Marx, 2004). Trombosit mengandung lebih dari 1.100 protein termasuk GF, pembawa pesan sistem kekebalan tubuh, enzim, penghambat enzim dan senyawa bioaktif lainnya. Faktor-faktor ini dapat

meningkatkan perbaikan jaringan dengan beragam mekanisme termasuk regulasi peradangan, angiogenesis, sintesis dan remodeling jaringan baru (Isabel Andia & Abate, 2013). Untuk alasan ini, PRP telah digunakan di berbagai bidang: odontologi, bedah plastik, ortopedi, penyembuhan luka dan estetika dengan hasil yang menjanjikan (Gambar 8). Namun, biomolekul diketahui cepat dilepaskan dari PRP, kehilangan aktivitasnya dalam waktu singkat yang dapat mewakili tantangan dalam praktik klinis (Huber *et al.*, 2016).

Platelet rich plasma merupakan modalitas terapi mutakhir dan mendapatkan atensi yang cukup besar dalam dekade ini. Secara biologis, PRP memiliki efek penyembuhan luka dengan dimensi yang luas. *Platelet rich plasma* sebagai suatu bioteknologi terkini dalam terapi seluler dan perbaikan jaringan diketahui memiliki efek positif pada tulang, otot, tendon maupun jaringan lunak. Mekanisme ini terjadi akibat GF dan sitokin yang dimiliki oleh PRP yang mampu mengakselerasi proses penyembuhan (Boyan, Ranly, & Schwartz, 2006; Matava, 2012; Mazzucco, Balbo, Cattana, & Borzini, 2008). Penelitian terkini banyak mengungkapkan potensi PRP sebagai modalitas terapi. Sifat autolog serta non-toksin yang dimiliki PRP merupakan salah satu poin positif pemanfaatan PRP dalam tatalaksana penyembuhan luka. Secara klinis PRP banyak dimanfaatkan untuk menangani jejas ataupun trauma yang bersifat akut maupun kronik (Widyadharma, 2013).



Gambar 8. Aplikasi klinis PRP berbagai bidang kedokteran (Etulain, 2018)

Platelet rich plasma secara potensial dapat meningkatkan proses penyembuhan dengan penghantaran berbagai jenis GF dan sitokin dari granula- α yang terdapat dalam platelet. Banyaknya GF yang terkandung di dalam PRP, menyebabkan PRP berfungsi mempercepat regenerasi endotel, epitel dan epidermal, menstimuli angiogenesis, merangsang sintesis kolagen, mempercepat penyembuhan jaringan lunak, menurunkan jaringan parut pada kulit, mempercepat respon homeostasis pada cedera, sehingga merangsang proses penyembuhan luka (Dhurat & Sukesh, 2014; Kushida et al., 2014; Wang & Avila, 2013; Widyadharma, 2013).

Penggunaan klinis PRP dalam berbagai bidang telah digunakan dalam dunia kedokteran dengan hasil yang beragam. Penggunaan PRP

ini diantaranya dalam bidang reumatologi, ortopedi (Lana *et al.*, 2014; McClure *et al.*, 2016), kedokteran olahraga (Kramer & Keaney, 2018), kedokteran gigi (Gawai & Sobhana, 2015) (Mohan *et al.*, 2019) dan estetika dan bedah plastik (Baussel *et al.*, 2012). Sejumlah studi telah menunjukkan peranan yang berbeda dari setiap substansi dalam PRP dan dalam rantai penyembuhan cedera, namun informasi yang terpublikasi kebanyakan berdasarkan studi kasus atau data yang berasal dari studi *in vitro* (Lana *et al.*, 2014).

Terdapat berbagai publikasi mengenai indikasi penggunaan PRP dalam dermatologi, misalnya dalam prosedur bedah estetika yaitu *face-lift*, *cosmetic dermal fat graft*, augmentasi payudara, transplantasi rambut, terapi ulkus kronis pada kulit dan ulkus diabetikum, sebagai agen hemostatik topikal, serta perbaikan skar (Eppley *et al.*, 2006; Lacci & Dardik, 2010; Reese, 2010; Villela & Santos, 2010).

Platelet rich plasma umumnya digunakan dalam praktek ortopedi untuk cedera yang berhubungan dengan olahraga dari otot rangka, tendon, dan ligamen. Diperkirakan efek sekunder dalam melepaskan GF dan faktor bioaktif lainnya dari granula- α . Efek ini dapat bervariasi tergantung pada lokasi cedera dan konsentrasi faktor pertumbuhan penting yang terlibat dalam berbagai respons penyembuhan jaringan lunak (Middleton *et al.*, 2012).

Kadar terapeutik dari jumlah aktual trombosit dalam PRP menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Marx.,*et al* (1998),

mengaplikasikan PRP yang dikombinasi dengan cangkok tulang pada pasien defek mandibula menunjukkan perbaikan yang signifikan, meskipun PRP yang digunakan hanya mengandung jumlah trombosit di bawah 800.000 sel/ μ L atau 3 – 4 kali dari jumlah trombosit awal. Studi Weibrich dkk menunjukkan bahwa manfaat PRP dapat dilihat bila kadar trombosit sekitar 1.000.000 sel/ μ L. Studi Haynesworth., *et al* menunjukkan adanya respon selular *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) yang signifikan pada pertumbuhan tulang dengan jumlah trombosit dalam PRP 4 – 5 kali dari jumlah trombosit awal. Peningkatan jumlah trombosit yang sama yakni 4 – 5 kali juga menunjukkan respon yang baik pada produksi kolagen dan proliferasi fibroblast (Haynesworth, 2002; Marx *et al.*, 1998).

Berdasarkan berbagai studi tersebut dapat disimpulkan jumlah trombosit pada PRP memberikan manfaat terapeutik bila jumlah trombosit sekitar 1.000.000 sel/ μ L, sesuai dengan peningkatan 5 – 6 kali dari jumlah trombosit awal pasien pada umumnya sekitar 150.000 – 300.000 sel/ μ L (Haynesworth, 2002; Liu, Kalén, Risto, & Wahlström, 2002; Marx *et al.*, 1998; Weibrich, Hansen, Kleis, Buch, & Hitzler, 2004)

4. *Growth factor* dalam *Platelet Rich Plasma*

Platelet rich plasma tidak hanya mengandung plasma yang kaya trombosit tetapi juga pelengkap faktor pembekuan, mengandung berbagai GF, kemokin, sitokin, serta protein plasma sebagai molekul adhesi sel: Fibrin, fibronectin, dan vitronectin (Cole, Seroyer, Filardo,

Bajaj, & Fortier, 2010; Dhurat & Sukesh, 2014). Terdapat tujuh GF, protein mendasar aktif yang disekresikan oleh trombosit memulai semua proses penyembuhan luka (sesuai Tabel 2) (Middleton et al., 2012; Raja & Naidu, 2008). *Growth factor* yang terdapat dalam PRP adalah PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, TGF- β , IGF-1, VEGF, HGF, FGF, CTGF, dll. *Growth factor* ini menghasilkan efek terapeutik pada proses penyembuhan di jaringan lunak dan keras serta *applicable* dalam memberikan stimulus biologis ke beberapa jaringan yang rusak (Dhurat & Sukesh, 2014; Hosny, Goubran, BadrEldin Hasan, & Kamel, 2015; Kushida et al., 2014; Wroblewski, Mejia, & Wright, 2010).

Telah diketahui bahwa GF dilepaskan setelah mendapat stimulasi sitokin granula- α dalam trombosit yang dapat menginduksi mitogenesis (meningkatkan jumlah sel yang terlibat dalam perbaikan jaringan) mengendalikan pelepasan sel-sel faktor pertumbuhan lain yang mempromosikan sintesis fibroblas dan osteoblas, mempercepat efek faktor pertumbuhan dari sel-sel lain, dengan masa hidup trombosit 10 hari dan akan dilanjutkan oleh sel-sel lain seperti makrofag, yang mampu melepaskan GF. Diantara mediator yang paling banyak dilepaskan dari PRP, adalah EGF, PDGF-AB, VEGF, IL-4, IL-6 (González et al., 2013; Okuda et al., 2003).

Tabel 3. *Growth factors and cellular effects* (Middleton et al., 2012)

Platelet growth factor type	Growth factors source	Biological actions
PDGF	<ul style="list-style-type: none"> – Platelet – Osteoblasts – Endothelial cells 	<ul style="list-style-type: none"> – Macrophage and neutrophil stimulate activation and angiogenesis

Platelet derived growth factor (a – b)	<ul style="list-style-type: none"> – Macrophages – Monocytes – Smooth muscle cells 	<ul style="list-style-type: none"> – Fibroblast chemotaxis and proliferative activity – Enhances collagen synthesis – Enhances the proliferation of bone cells – Mitogenic for mesenchymal cells and osteoblasts,
TGF (alpha-beta) Transforming growth factor	<ul style="list-style-type: none"> – Platelets – Extracellular matrix of bone – Cartilage matrix, – Activated TH1 cells and natural killer cells, – Macrophages/monocytes and neutrophils 	<ul style="list-style-type: none"> – Stimulates undifferentiated mesenchymal cell proliferation – Regulates endothelial Fibroblastic and osteoblastic mitogenesis – Regulates collagen synthesis and collagenase secretion – Regulates mitogenic effects of growth factors – Stimulate endothelial chemotaxis and angiogenesis – Inhibits macrophage and lymphocyte proliferation
VEGF Vascular endothelial growth factor	<ul style="list-style-type: none"> – Platelets – Endothelial cells 	<ul style="list-style-type: none"> – Increases angiogenesis and vessel permeability, stimulates – Mitogenesis for endothelial cells – Creation of blood vessel lumen – Creation of fenestrations – Chemotactic for macrophages and granulocytes – Vasodilation (indirectly by release of nitrous oxide)
EGF Epidermal growth factor	<ul style="list-style-type: none"> – Platelets – Macrophages – Monocytes 	<ul style="list-style-type: none"> – Stimulates endothelial chemotaxis / angiogenesis, regulates – Collagenase secretion – Stimulates epithelial /mesenchymal mitogenesis – Cellular proliferation – Differentiation of epithelial cells
FGF Fibroblast growth factor,	<ul style="list-style-type: none"> – Platelets – Macrophage – Mesenchymal cells 	<ul style="list-style-type: none"> – Promotes growth and differentiation of chondrocytes and osteoblasts

	<ul style="list-style-type: none"> - Chondrocytes - Osteoblasts 	<ul style="list-style-type: none"> - Mitogenic for mesenchymal cells, chondrocytes and osteoblasts
HGF Hepatocyte growth factor	<ul style="list-style-type: none"> - Platelets - Various tissue 	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulates of hepatocyte proliferation and liver tissue regeneration - Angiogenesis - Mitogen for endothelial cells - Antifibrotic
IGF-1 Insulin like growth factor	<ul style="list-style-type: none"> - Plasma, epithelial cells - Endothelial cells - Fibroblasts - Smooth muscle cells - Osteoblasts - Bone matrix 	<ul style="list-style-type: none"> - Chemotaxis for fibroblasts and stimulates protein synthesis - Enhances bone formation by proliferation and differentiation of osteoblasts
CTGF Connective tissue growth factor	<ul style="list-style-type: none"> - Platelets through endocytosis from extracellular environment in bone marrow 	<ul style="list-style-type: none"> - Promotes angiogenesis - Cartilage regeneration - Fibrosis and platelet adhesion

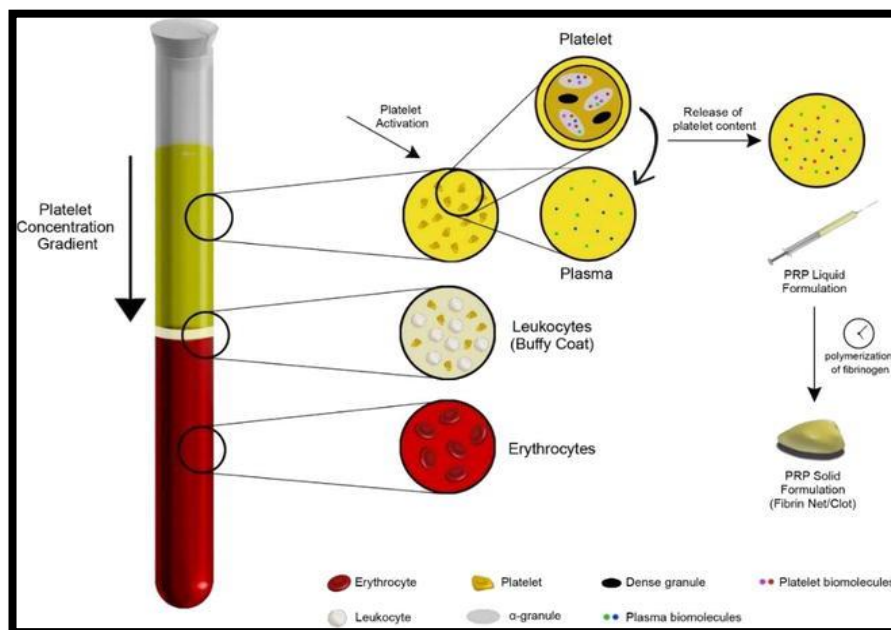
5. Metode Perolehan *Platelet Rich Plasma*

Metode persiapan PRP telah banyak dilaporkan, namun beberapa perbandingan PRP yang diproduksi oleh berbagai model pemisahan trombosit yang berbeda. Perbedaan dalam metode pembuatan yang digunakan untuk menghasilkan PRP dapat menimbulkan perbedaan dalam jumlah seluruh darah yang dibutuhkan, hasil akhir, komponen cair, dan konsentrasi GF dan pengetahuan terkait perbedaan ini memungkinkan PRP untuk digunakan dalam aplikasi klinis (Kushida *et al.*,2014).

Metode dasar pembuatan PRP dimulai dengan pengambilan plasma adalah pengambilan atau ekstraksi darah *whole blood* (WB) ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan. Darah lalu disentrifugasi dengan kecepatan tertentu untuk memisahkan plasma dari sel-sel darah merah berdasarkan gradien kepadatannya (Gambar 9). Setelah sentrifugasi, tabung menunjukkan 3 lapisan dasar: di bagian bawah tabung, erosit dengan leukosit disimpan tepat di atas; lapisan tengah sesuai dengan PRP, dan di atas, ada *Platelet poor plasma* (PPP). *Platelet poor plasma* dibuang dan PRP diperoleh (R., 2017; Sánchez et al., 2019).

Gambar 9. Pemisahan plasma berdasarkan gradien kepadatannya (Sánchez et al., 2019)

Pembuatan PRP dapat menggunakan dua metode yaitu metode PRP dan metode *buffy-coat*. Pada metode PRP, sentrifugasi pertama



untuk memisahkan *red blood cell* (RBC) yang diikuti dengan sentrifugasi

kedua untuk memadatkan trombosit yang disimpan dalam volume plasma akhir yang kecil. Metode *buffy-coat*, darah disentrugasi dengan kecepatan tinggi untuk menghasilkan *buffy-coat*, yang mengandung banyak leukosit dan kemudian disentifugasi kembali untuk memisahkan sel darah putih dengan sel darah merah sebagai produk akhir. Dari volume WB, satu lapisan tipis dari *buffy coat* (yang berisi leukosit dan trombosit) dapat dihasilkan, dan terdapat kesulitan untuk memisahkan lapisan tipis ini dari lapisan dibawahnya yang berisi eritrosit (Dhurat & Sukesh, 2014).

a. Prosedur pada metode *Platelet Rich Plasma* (Dhurat & Sukesh, 2014)

Ambil darah vena dan simpan dalam tabung *acid citrate dextrose* (ACD):

- 1) Jangan dinginkan darah tersebut sebelum atau selama pemisahan trombosit;
- 2) Lakukan sentrifugasi menggunakan kecepatan rendah
- 3) Pindahkan plasma *supernatant* yang mengandung platelet ke dalam tabung steril tanpa antikoagulan.
- 4) Lakukan sentrifugasi pada tabung tersebut dengan kecepatan lebih tinggi untuk mendapatkan konsentrasi trombosit.
- 5) 2/3 bagian atas adalah PPP sedangkan 1/3 bagian bawah adalah konsentrat trombosit yang butirannya terendap di dasar tabung.

- 6) Pisahkan PPP dan dapatkan trombosit dalam volume plasma minimal 2 – 4 mL dengan menuang tabung secara perlahan.
- b. Prosedur pada metode *buffy coat* (Dhurat & Sukesh, 2014)
- 1) Darah harus disimpan pada suhu 20°C – 24°C sebelum sentrifugasi;
 - 2) Lakukan sentrifugasi dalam kecepatan tinggi;
 - 3) Tiga lapisan akan terbentuk berdasarkan kepadatannya: lapisan dasar mengandung sel darah merah, lapisan tengah mengandung trombosit dan sel darah putih (*buffy coat*) serta lapisan atas adalah PPP;
 - 4) Hilangkan plasma *supernatant* dari bagian atas tabung;
 - 5) Pindahkan lapisan tengah (*buffy coat*) ke tabung steril yang lain;
 - 6) Lakukan sentrifugasi pada tabung berisi *buffy coat* tersebut dengan kecepatan rendah untuk memisahkan sel darah putih atau gunakan filter pemisah leukosit.

Belum ada standarisasi proses pembuatan PRP untuk memperoleh jumlah trombosit serta jumlah GF secara pasti. Standarisasi ini harus memperhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas dari PRP. Faktor-faktor tersebut antara lain jumlah siklus sentrifugasi (tunggal atau ganda), temperatur saat proses pembuatan, kecepatan sentrifugasi, antikoagulan yang digunakan, teknik pengambilan sampel, dan lama sentrifugasi (Alsousou, Ali, Willett,

& Harrison, 2013; Dhurat & Sukesh, 2014; Lee & Falowski, 2018; Simion, Dinescu, Jianu, & Costache, 2018).

a. Jumlah siklus sentrifugasi

Jumlah siklus sentrifugasi terdiri atas sentrifugasi tunggal dan sentrifugasi ganda. Sentrifugasi tunggal didefinisikan sebagai pembuatan PRP dengan hanya menggunakan satu kali sentrifugasi, dan sentrifugasi ganda didefinisikan sebagai pembuatan PRP dengan dua kali sentrifugasi. Sentrifugasi ganda menunjukkan hasil yang lebih optimal dibandingkan dengan sentrifugasi tunggal. Hal ini terjadi karena pada sentrifugasi ganda, sentrifugasi pertama bertujuan untuk memisahkan sel darah merah dari plasma yang berisi trombosit, sel darah putih dan faktor – faktor pembekuan dan sentrifugasi kedua bertujuan untuk menghasilkan PRP dan memisahkannya dari PPP.

Amanda *et al.*, (2014) menunjukkan bahwa pemrosesan 3,5 mL darah pada $100 \times g$ (gravitasi) selama 10 menit (1 putaran), $400 \times g$ selama 10 menit (putaran ke-2) dan mengambil 2/3 dari plasma sisa, menghasilkan *platelet recovery* yang tinggi (70% – 80%) dan konsentrasi (5x) dalam integritas dan viabilitas trombosit. Penulis percaya bahwa waktu dan percepatan adalah parameter mendasar yang menentukan komposisi sampel PRP setelah langkah putaran pertama. Periode waktu yang lebih lama sedikit meningkatkan pemulihan trombosit dan menurunkan konsentrasi *white blood cell*

(WBC) di lapisan atas. Oleh karena itu, waktu bisa menjadi parameter kontrol ketika kadar WBC yang rendah, seperti granulosit dan limfosit, diperlukan dalam sampel PRP (Perez *et al.*, 2014).

b. Suhu

Suhu selama proses pembuatan PRP sangat penting untuk mencegah aktivasi platelet. *American Association of Blood Bank* (AABB) merekomendasikan suhu 21°C – 24°C saat sentrifugasi darah (Dhurat & Sukesh, 2014; Sweeny & Grossman, 2002). Banyak penulis telah menggunakan tingkat suhu 12°C – 16°C selama sentrifugasi untuk pemulihan trombosit terbaik. Macey.,*et al* (2002) juga menyatakan bahwa suhu dingin dapat menghambat aktivasi platelet dan ini mungkin penting dalam mendapatkan PRP dengan platelet yang layak (Macey *et al.*, 2002).

Studi oleh Amable *et al.*, (2013) menggunakan 17 perlakuan dengan kecepatan, lama, dan temperature yang bervariasi. Hasil menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh temperatur yang signifikan pada saat menggunakan sentrifugasi dilakukan pada durasi yang pendek, namun pada saat sentrifugasi dilakukan dilakukan selama 16 menit, temperatur memberikan efek positif pada suhu 12°C – 18°C dan meningkatkan rasio peningkatan jumlah trombosit pada sentrifugasi pertama, dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara pengaruh suhu 12°C dan 18°C terhadap rasio peningkatan jumlah trombosit pada sentrifugasi kedua. Oleh karena

itu, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan bila sentrifugasi pertama dan kedua dilakukan pada 18°C (suhu ruang) (Amable *et al.*, 2013).

c. Penggunaan antikoagulan

Penggunaan antikoagulan merupakan faktor yang sangat penting dalam menjaga fungsi, integritas, dan morfologi trombosit sehingga mencegah aktivasi dan degranulasi platelet sebelum penggunaannya (Dhurat & Sukesh, 2014). Banyaknya jenis antikoagulan yang digunakan dalam proses pembuatan PRP, beberapa peneliti berpendapat bahwa penggunaan antikoagulan *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA) dapat merusak membran trombosit dan GF teraktivasi lebih dini sehingga tidak merekomendasikan dan merekomendasikan penggunaan ACD (Anitua *et al.*, 2012). Antikoagulan yang digunakan adalah ACD-A yang merupakan gold standar. ACD-A bekerja dengan mengikat kalsium dan mencegah protein koagulasi untuk memulai kaskade koagulasi (Dhurat & Sukesh, 2014). Penelitian Munawirah (2019) menunjukkan bahwa pada penggunaan antikoagulan ACD, peningkatan trombosit dan kadar PDGF menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan antikoagulan EDTA. Hal ini disebabkan karena penggunaan ACD menunjukkan efektivitas yang lebih baik dalam mencegah agregasi trombosit (Munawirah A, 2019).

- d. Dalam proses pengambilan darah sebaiknya menggunakan jarum dengan ukuran besar (<22) untuk mencegah trauma dari platelet sehingga terjadi aktivasi trombosit yang tidak disengaja.
- e. Gaya gravitasi bumi mampu untuk memisahkan jenis partikel hanya saja memerlukan waktu yang cukup lama. Sebuah tabung antikoagulan yang berisi WB jika diposisikan berdiri akan terpisah menjadi plasma, WBC dan RBC pada dasar tabung. Untuk mempercepat sedimentasi, efek gravitasi diperkuat dengan gaya sentrifugal atau *Relative Sentrifugal Force* (RCF). Selain itu, potensi degradasi senyawa selama penyimpanan yang berkepanjangan lebih cepat, sehingga diperlukan proses pemisahan yang cepat.

6. Inkubasi dan Aktivasi Trombosit pada *Platelet Rich Plasma*

Proses pelepasan GF dalam PRP tergantung pada beberapa kondisi salah satunya inkubasi PRP. Studi Etulain *et al.*, (2018) dengan PRP diinkubasi pada 37⁰C, 23⁰C, dan 4⁰C selama 30 menit sebelum diaktivasi menemukan kadar VEGF, EGF, bFGF, IL-17, dan IL-8 sekresi total molekul ini tercapai ketika PRP diinkubasi pada suhu 4⁰C menunjukkan bahwa *cold preconditioning* memaksimalkan molekul pro-angiogenik (Etulain *et al.*, 2018).

Aktivasi trombosit merupakan langkah penting dalam protokol PRP yang efektif. Aktivasi terjadi setelah sentrifugasi dan memulai proses degranulasi trombosit. Degradasi trombosit melepaskan protein bioaktif yang dikenal sebagai GF yang meningkatkan mitosis sel, angiogenesis,

kondrogenesis, dan kemotaksis. Granula- α dari platelet yang belum teraktivasi pada PRP mengandung *platelet growth factor* (PGF) dalam sediaan yang bersifat non-fungsional, karena faktor-faktor ini belum diaktifkan ataupun belum berinteraksi dengan jaringan. Untuk menginisiasi *release* dari GF, trombosit harus diaktifkan (Widyadharna, 2013).

Aktivasi trombosit tergantung pada glikoprotein membran trombosit spesifik yang mengikat ligan, aktivasi kinase, influks kalsium sitoplasma dari sistem tubular padat dan ekstraseluler yang dapat diinisiasi *in vivo* oleh trombin, kalsium, kolagen dan mekanik trauma. Setiap trombosit mengandung sekitar 80 granula- α , selain GF juga mengandung protein adhesif, kemokin, fibrinolitik protein dan molekul pro-koagulan (Hamilton *et al.*, 2015).

Aktivasi trombosit melepaskan GF dari granula- α , sebuah proses yang dikenal dengan proses degranulasi. Aktivasi yang dimaksud mengacu pada 2 proses utama yang dimulai selama persiapan PRP: (1) degranulasi trombosit untuk melepaskan GF dari granula- α dan (2) pembelahan fibrinogen untuk memulai pembentukan matriks, proses pembekuan yang memungkinkan pembentukan gel trombosit (Cavallo *et al.*, 2016). Sekitar 70% GF yang tersimpan di dalam granula, akan dilepaskan dalam 10 menit dan kira-kira faktor tersebut akan dilepaskan seutuhnya dalam 1 jam. Setelah aktivasi PRP tercapai, jaringan fibrin mulai terbentuk dengan pelepasan GF cepat selama 1 jam pertama,

terus melepaskan sitokin dan GF mRNA selama setidaknya 7 – 10 hari (Liao, Marra, & Rubin, 2014; Matava, 2012).

Platelet rich plasma dapat diaktifkan dengan berbagai cara dan telah menjadi perdebatan tentang kebutuhan, dan metode aktivasi optimal yang digunakan dalam praktik klinis. Aktivasi trombosit dapat dilakukan secara endogen dan eksogen. Aktivasi endogen bergantung pada kolagen atau faktor koagulasi diekspresikan setelah injeksi. Harrison et al membandingkan konsentrasi TGF-B1, PDGF-AB, dan VEGF setiap hari selama 7 hari setelah aktivasi PRP dengan trombin atau kolagen (Lansdown & Fortier, 2017). Penggunaan trombin sebagai aktivator menghasilkan pelepasan segera GF menunjukkan pola pelepasan berkelanjutan GF selama 7 hari aktivasi dengan kolagen (Lansdown & Fortier, 2017).

Sebagai bagian dari jalur aktivasi trombosit melepaskan granula- α . Proses ini biasanya terjadi setiap kali trombosit bersentuhan dengan kolagen akibat cedera vaskular. Ini dapat dimanfaatkan dalam penggunaan klinis PRP dalam mengontrol waktu pelepasan GF. Tujuan aktivasi PRP eksogen menghasilkan PRF sebelum injeksi untuk memastikan terdapatnya GF dalam PRP. Aktivasi eksogen menghasilkan bekuan yang kemudian dapat ditanamkan di lokasi yang diinginkan. Matriks fibrin PRF memberikan kerangka struktural dengan GF (Lansdown & Fortier, 2017).

Trombin sapi telah digunakan sebagai salah satu metode untuk mengaktifkan PRP. Autologous thrombin adalah pilihan lain, baik dengan atau tanpa kalsium klorida. Trombin berfungsi untuk mengkatalisasi konversi fibrinogen menjadi fibrin. Ini telah terjadi terkait dengan perdarahan, trombosis, dan reaksi kekebalan. Kalsium klorida bisa digunakan sebagai aktivator eksogen lemah PRP, menyebabkan pelepasan PDGF-AA. Namun, mungkin mengalami nyeri yang meningkat akibat kalsium klorida karena pH-nya yang rendah (Lansdown & Fortier, 2017)

Tidak adanya konsensus dalam literatur tentang pilihan aktivator terbaik dan apakah PRP harus digunakan dengan atau tanpa aktivasi dalam praktik klinis. Metode aktivasi yang paling umum yaitu penggunaan trombin tunggal, atau trombin dengan kalsium klorida (CaCl_2) (Huber *et al.*, 2016). Aktivasi ini dapat diinduksi oleh bovine atau trombin autologus, CaCl_2 , kolagen, *freeze and thaw cycles* dan mekanik trauma (Huber *et al.*, 2016). Beberapa klinisi menggunakan kolagen lokal tipe I untuk memulai degranulasi in situ sementara yang lain menggunakan aktivator kalsium seperti CaCl_2 atau trombin autologous (Dhurat & Sukesh, 2014; R., 2017).

Growth factor yang ada pada trombosit akan disekresikan sebanyak lebih dari 95% dalam 1 jam, dan mengalami proses degranulasi dalam trombosit dan sekresi GF hingga 3-5 hari. Setelah aktivasi dengan trombin dan ion kalsium; GF tetap aktif selama 7-10

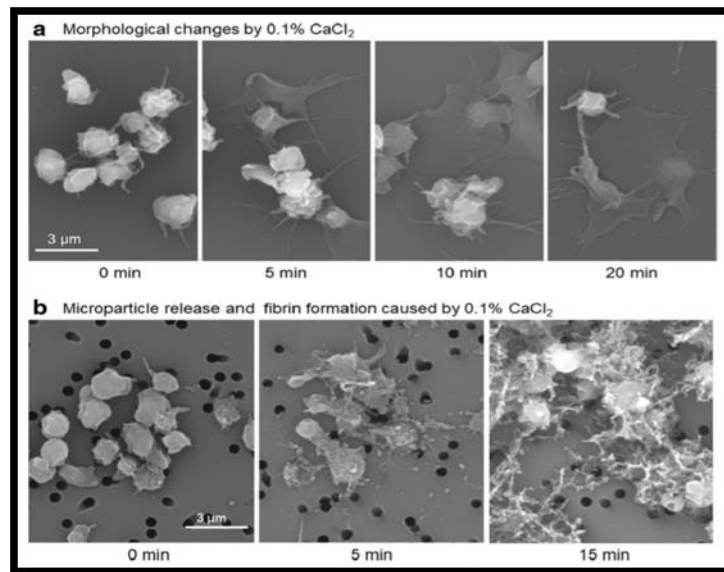
hari. *Growth factor* PRP tidak pernah merusak sel atau nukleus, tidak bersifat mutagenik, dan tidak memiliki kemampuan untuk menginduksi pembentukan tumor (Lubkowska, Dolegowska, & Banfi, 2012).

Metode aktivasi yang paling umum digunakan dalam praktek klinis saat ini diantaranya kalsium glukonat ($C_{12}H_{22}CaO_{14}$), kalsium klorida ($CaCl_2$), trombin autologus, kombinasi $CaCl_2$ + trombin, dan kolagen tipe I (Cavallo *et al.*, 2016). Secara *in vitro*, kalsium dan trombin banyak digunakan rutin menginduksi pelepasan GF dari PRP dalam praktik klinis untuk preaktivasi PRP (Hamilton *et al.*, 2015). Trombin dan $CaCl_2$ merupakan penginduksi agregasi yang digunakan dengan tujuan untuk mengaktifkan trombosit dan merangsang degranulasi sehingga dapat menyebabkan pelepasan GF (R., 2017). Trombin mengaktifkan trombosit secara langsung ketika ion kalsium mengisi kembali yang diikat oleh antikoagulan ACD-A (Borzini & Mazzucco, 2007; Eppley *et al.*, 2006).

Trombin merupakan agen aktivator trombosit yang paling poten. Trombin adalah enzim protease serin yang berasal dari protrombin yang mengkatalisis konversi fibrinogen menjadi fibrin sebagai bagian dari kaskade pembekuan, mengaktifkan trombosit dan mengakibatkan pelepasan isi granula. Kalsium klorida juga berfungsi untuk mengkatalisis konversi fibrinogen menjadi fibrin untuk membentuk agregasi agar secara efisien melokalisasi produk akhir ke tempat cedera sementara secara bersamaan mengaktifkan degranulasi

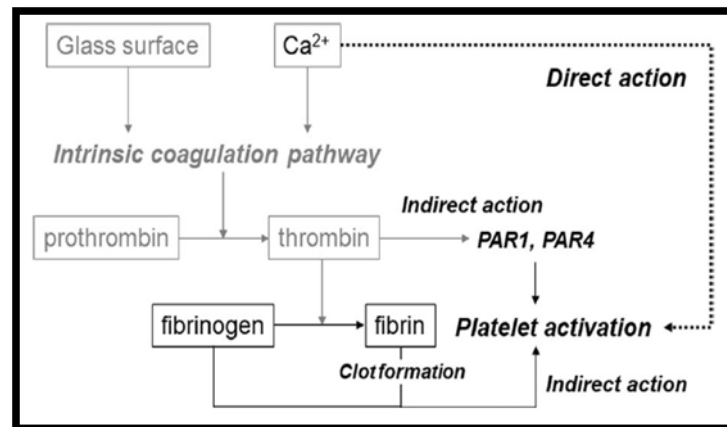
trombosit (Lubkowska *et al.*, 2012) Sebagai aktivator, trombin dengan cepat membentuk matriks fibrin yang padat. Soliditas matriks fibrin dapat menghambat migrasi sel. Ketika trombosit dalam PRP diaktifkan oleh trombin, trombosit melepaskan GF dan zat lain yang berfungsi untuk mempercepat proses penyembuhan luka dengan meningkatkan proliferasi sel, pembentukan matriks, produksi osteoid, penyembuhan jaringan ikat, angiogenesis, dan sintesis kolagen (Everts *et al.*, 2006; Lubkowska *et al.*, 2012). Dalam penelitian Bologna, sampel yang diaktifkan dengan trombin melepaskan GF tertinggi pada 15 menit, 30 menit, dan 1 jam (Widyadharma, 2013).

Penggunaan CaCl_2 dapat dipertimbangkan untuk mengkonversi autolog trombin menjadi protrombin yang memiliki efek menjebak trombosit dalam matriks fibrin (Gambar 10). Pengeluaran GF akan berlangsung secara gradual selama 7 hari (Widyadharma, 2013). Aktivasi CaCl_2 mengakibatkan pembentukan gumpalan yang kurang padat dibandingkan gumpalan yang diaktifkan trombin. Matriks fibrin yang kurang terkondensasi dapat membantu menjebak trombosit dan meningkatkan migrasi sel di tempat injeksi. Sampel yang diaktifkan dengan CaCl_2 melepaskan GF signifikan lebih tinggi daripada sampel yang diaktifkan kolagen (Cavallo *et al.*, 2016).



Gambar 10. Perubahan morfologi setelah penambahan CaCl₂ (Toyoda et al., 2018)

Mekanisme pembentukan fibrin yang diinduksi Ca²⁺ di plasma sitrat. Kalsium (Ca²⁺) mengaktifkan koagulasi jalur bersama selanjutnya mengaktifkan trombosit melalui produksi trombin dan fibrin. Sebagai mekanisme tambahan, Ca²⁺ secara langsung merangsang trombosit dalam proses koagulasi (Toyoda *et al.*, 2018). Penambahan aktivator trombosit berupa CaCl₂ akan meningkatkan konsentrasi Ca²⁺. Peningkatan konsentrasi Ca²⁺ dapat disebabkan oleh pelepasan Ca²⁺ dari intraseluler maupun akibat konsentrasi Ca²⁺ yang masuk dan melintasi membran plasma yang selanjutnya mengaktifkan trombosit oleh jalur otkrin dan mengakibatkan trombosit terus meningkatkan produksi tromboksan A₂ (TXA₂) aktivator yang disimpan dalam granula α, seperti ADP dan trombin sehingga mengaktifasi trombosit untuk mengeluarkan GF (Toyoda *et al.*, 2018) (Gambar 11).



Gambar 11. Mekanisme pembentukan fibrin yang diinduksi Ca²⁺ di plasma sitrat (Toyoda et al., 2018)

Kombinasi CaCl₂ dan trombin menghasilkan fibrin yang kaya trombosit. CaCl₂ menghambat sitrat yang memungkinkan plasma terkoagulasi sementara trombin menyebabkan fibrin berpolimerisasi menghasilkan gel terkoagulasi. Kombinasi tersebut menghasilkan gel lembut yang dapat diaplikasikan di ruang operasi untuk meningkatkan penyembuhan luka pasca operasi. Trombosit di dalam *soft gel* akan mengalami degranulasi dan melepaskan GF ke jaringan sekitarnya untuk meningkatkan angiogenesis, kondrogenesis, dan sekresi kolagen. Hasil dari penelitian Bologna menunjukkan degranulasi trombosit yang cepat dan pelepasan GF dalam sampel yang diaktifkan CaCl₂ dan trombin (Cavallo et al., 2016).

Sebuah studi yang dilakukan oleh Cavallo.,et al (2016) menemukan kadar VEGF pada menit 15 dan 30 pasca aktivasi menggunakan trombin, kombinasi CaCl₂ dan trombin menghasilkan jumlah kadar VEGF yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan CaCl₂

dan kolagen tipe I ($p < 0,05$). Setelah 1 jam, dengan hanya menggunakan salah satu aktivator, CaCl_2 , trombin menghasilkan kadar VEGF dalam jumlah yang sama, sedangkan kombinasi CaCl_2 dan trombin menghasilkan kadar VEGF lebih tinggi dengan nilai ($p < 0,05$). Kombinasi CaCl_2 dan trombin menghasilkan kadar VEGF yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hanya menggunakan satu aktivator trombin hingga 24 jam ($p < 0,05$) (Cavallo *et al.*, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.*, (2010) menyatakan aktivasi trombosit dengan, kolagen, dan kombinasi CaCl_2 dan kadar trombin yang rendah menunjukkan peningkatan signifikan dalam pelepasan VEGF (konsentrasi rata-rata 1264 pg/ml) dibandingkan menggunakan CaCl_2 dan kadar trombin yang tinggi (konsentrasi rata-rata 273 – 548 pg/ml) (E.-S. Kim, Kim, & Park, 2010). Penelitian lain yang dilakukan Huber *et al.*, (2016) menyatakan bahwa kadar PDGF-AA, EGF, dan VEGF sama dengan atau tanpa penambahan aktivasi menggunakan trombin (Huber *et al.*, 2016).

7. Penyimpanan Produk PRP pada Suhu dan Waktu yang bervariasi

Banyaknya faktor yang dapat menyebabkan aktivasi trombosit selama persiapan PRP. Trombosit dapat mengalami aktivasi selama pengumpulan, pemrosesan dan penyimpanan trombosit konsentrat. Penelitian oleh Hosnuter *et al.*, (2016) menyatakan bahwa GF (EGF, VEGF, PDGF-AB, IGF-1, TGF- β) dan kadar P-selectin secara signifikan menurun pada sampel PRP autologus yang disimpan pada -20°C

dibandingkan dengan kelompok kontrol, serta kadar GF pada hari ke 7 dan 14 menunjukkan bahwa PRP autologous dapat disimpan jam -20°C tanpa agen pengawet, meskipun studi *in vivo* diperlukan untuk mengevaluasi uji klinis dari kadar GF yang terdeteksi (Hosnuter *et al.*, 2017).

Studi lain dilakukan oleh Lisdiana (2020) dengan membandingkan perbedaan kadar TGF- β yang terdapat di dalam produk PRP setelah penambahan aktivasi trombosit CaCl_2 dan penggunaan antikoagulan ACD, dengan penyimpanan pada suhu ruang, suhu 4°C dan suhu -80°C serta waktu penyimpanan yang bervariasi. Pada penelitian ini didapatkan hasil peningkatan kadar TGF- β tertinggi pada produk PRP yang diaktivasi dengan CaCl_2 yang disimpan selama 1 jam pada suhu ruang (meningkat 212 %), dan menurun 28% pada penyimpanan selama 7 hari pada suhu -80°C . Akan tetapi, tidak semua rumah sakit atau laboratorium klinik memiliki fasilitas penyimpanan -80°C (Amin Asri Lisdiana, 2020; Hosny *et al.*, 2015; Shiga *et al.*, 2017).

C. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

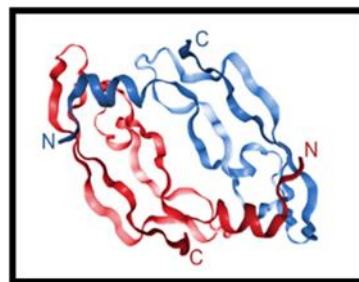
1. Definisi VEGF

Tahun 1989, Ferrara dan Henzel mengisolasi protein spesifik sel endotel yang terlepas dari sel follicular pituitari sapi yang dibiakkan. Mereka menamainya "*vascular endothelial growth factor*" untuk menunjukkan spesifisitas sel target dari molekul ini (Ferrara, 2004). Tahun 1997, Muller dan rekan kerja kemudian memperoleh struktur

kristal VEGF pada resolusi 1,93 Å. Resolusi struktur kristal VEGF telah menunjukkan bahwa VEGF adalah glikoprotein homodimerik yang membentuk homodimer antiparalel yang dihubungkan secara kovalen oleh dua jembatan disulfida, dua monomer VEGF ditampilkan dalam warna biru dan merah (Gambar 12) (Alsohaimi, 2019).

Gambar 12. Molekul protein dimerik VEGF (Alsohaimi, 2019)

Vascular endothelial growth factor juga disebut *vascular permeability factor* (VPF) secara biologis aktif sebagai homodimer



dengan berat molekul 40kD dan *vascular growth promoters* (VGP) dengan kemampuan kuat untuk menginduksi permeabilitas sel endotel, proliferasi serta angiogenesis. *Vascular endothelial growth factor* merupakan salah satu GF yang terdapat dalam kandungan PRP. *Vascular endothelial growth factor* terdiri atas lima isoform glikoprotein yang berbeda yaitu VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, dan *placenta growth factor* (PlGF). Isoform yang paling banyak disekresikan trombosit adalah VEGF-A (González et al., 2013; Maharaj & D'Amore, 2007).

2. Reseptor VEGF

Vascular endothelial growth factor diproduksi oleh berbagai jenis sel, dan terdiri atas 5 isoform dengan aktivitas biologis paralel, tetapi

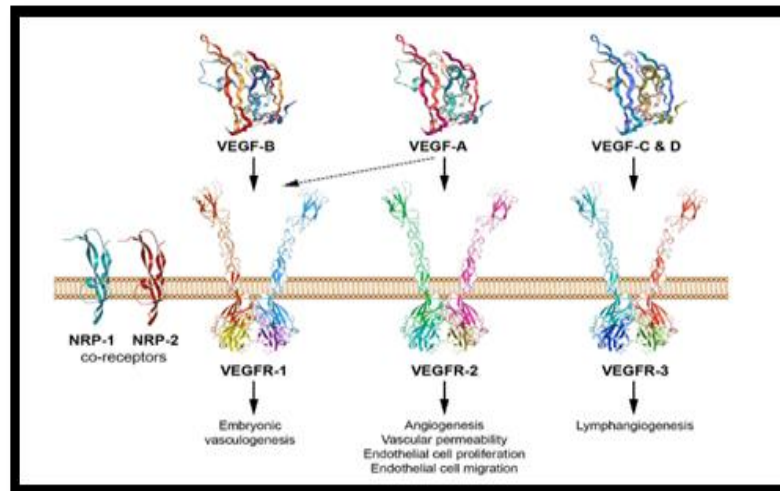
secara signifikan berbeda dalam bioavailabilitas. *Vascular endothelial growth factor* merupakan bagian dari sistem yang mengembalikan oksigenasi jaringan dalam kondisi hipoksia (Palmer & Clegg, 2014). Pada dasarnya, semua isomorf VEGF memiliki 8 residu sistein yang dikonservasi pada posisi konstan, yang sangat mirip PDGF seperti *Macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) dan *stem cell factor* (SCF) (Palmer & Clegg, 2014). Anggota sub-keluarga VEGF yang paling baik dipelajari adalah VEGF-A yang dapat ditentukan dalam plasma dan serum dalam jumlah yang dapat dideteksi. Karena *splicing* ekson alternatif, VEGF-A ada di setidaknya 4 isoform seperti VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, dan VEGF₂₀₆ sesuai dengan struktur asam amino primer (Ferrara & Kerbel, 2005), dengan isoform utama dari semua jenis VEGF menjadi varian VEGF₁₆₅ dari VEGF-A dan memberikan aktivitas biologis yang paling kuat (Ferrara, 2004).

Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) berikatan dengan tipe V keluarga reseptor tirosin kinase dengan afinitas dan selektivitas tinggi, menghasilkan sinyal intra-seluler (Stuttfeld & Ballmer-Hofer, 2009). Ligan VEGF menghantarkan efek angiogenik melalui ikatan yang spesifik dengan VEGFR. Ikatan tersebut mengakibatkan perubahan pada reseptor berupa dimerisasi dan berlanjut dengan sinyal transduksi melalui domain tirosin kinase. Ada 3 reseptor primer dan 2 buah ko-reseptor yang akan mengikat VEGF dan keluarganya, yaitu VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 dan ko-reseptor Neuropilin-1 dan

Neuropilin-2. Neuropilin tidak mempunyai domain/area intraseluler dan diduga meningkatkan afinitas VEGF pada reseptor primer (Alsohaimi, 2019).

Vascular endothelial growth factor reseptor ditandai memiliki bagian ekstraseluler yang terdiri dari 7 domain resebling molekul imunoglobulin manusia, transmembran tunggal, dan bagian intraseluler yang mengandung komponen tirosin-kinase. Sebagian besar diekspresikan pada sel-sel jaringan endotel, hematopoietik, dan ikat (Olsson, Dimberg, Kreuger, & Claesson-Welsh, 2006). Sampai saat ini, 3 sub tipe VEGFR didefinisikan, yaitu VEGFR-1, VEGFR-2, dan VEGFR-3 (Stuttfield & Ballmer-Hofer, 2009). Anggota sub-keluarga VEGF yang berbeda berinteraksi dengan reseptor, afinitas dan selektivitas variabel. VEGF-A dan B mengaktifkan VEGFR-1 untuk mempromosikan vasculogenesis embrionik. VEGF-A bekerja pada VEGFR-2 untuk mempromosikan angiogenesis dalam banyak kondisi fisiologis dan patologis. VEGF-C dan D bekerja pada VEGFR-3 dalam pembuluh darah limfatik untuk mendorong limfangiogenesis. Reseptor NRP

(neuropilin) bertindak sebagai reseptor bersama untuk meningkatkan pensinyalan VEGFR (Gambar 13) (Alsohaimi, 2019).



Gambar 13. Isoform VEGF (Alsohaimi, 2019)

3. Fungsi VEGF

Vascular endothelial growth factor merupakan suatu glikoprotein homodimerik dalam tubuh yang mempengaruhi vasopermeabilitas dan angiogenesis. Awalnya dinyatakan sebagai faktor permeabilitas, berdasarkan kemampuannya untuk meningkatkan permeabilitas mikrovaskular. *Vascular endothelial growth factor* merupakan mitogenik khusus untuk sel endotel vaskular. Waktu paruh VEGF 6 – 8 jam (Kasten *et al.*, 2012). Kadar VEGF dalam tubuh dapat dideteksi pada serum maupun plasma. Kadar VEGF dalam tubuh individu sehat berkisar antara 62 – 707 pg/ml pada serum dan 0 – 115 pg/ml pada plasma (Duh, 2008; Hoeben *et al.*, 2004).

Vascular endothelial growth factor merupakan GF yang sangat spesifik angiogenik, protein sinyal yang dihasilkan oleh sel-sel yang

merangsang vasculogenesis dan angiogenesis. *Vascular endothelial growth factor* adalah mediator utama dalam penyembuhan luka dan penginduksi utama angiogenesis karena merangsang kemotaksis dan proliferasi sel-sel endotel. *Vascular endothelial growth factor* juga terlibat dalam pengaturan homeostasis organ, seperti otak, jantung, ginjal, atau hati, dan perannya mungkin penting dalam regenerasi jaringan yang dimediasi sel (Anitua *et al.*, 2012).

Vascular endothelial growth factor juga merupakan anti-angiogenik pengobatan melalui penghambatan aktivasi VEGFR mungkin memiliki aplikasi terapeutik penting dalam penyakit seperti retinopati diabetik dan kanker (Alsohaimi, 2019; Zhao & Singh, 2018). *Vascular endothelial growth factor* juga berfungsi dalam sel papila dermal fase anagen, mengatur perifollicularangiogenesis, dan meningkatkan ukuran pembuluh perifollicular selama fase pertumbuhan anagen (Paus, 2008).

Eksresi VEGF ditemukan meningkat pada tumor yang tumbuh cepat dan dengan vaskularisasi yang tinggi dan penghambatan VEGF dengan antibodi monoklonal menghambat pertumbuhan tumor secara *in vivo*. Hipoksia menginduksi ekspresi VEGF pada tumor dan garis sel tumor myogenik glia. *Vascular endothelial growth factor* dan reseptornya penting dalam perkembangan embriogenik normal dan bahkan kerusakan gen VEGF heterozigot menyebabkan kematian embrio akibat kerusakan perkembangan angiogenesis. Karakteristik tersebut menyiratkan bahwa VEGF memegang peran penting dalam memediasi

komplikasi mikrovaskular yang tampak pada retinopati diabetik, karena ditandai dengan adanya iskemia jaringan, angiogenesis dan permeabilitas vaskular (Duh, 2008; Ozturk et al., 2009; Zhang & Ma, 2007).

Vascular endothelial growth factor terdiri dari beberapa isoform yang diperlukan untuk perkembangan normal dari pembuluh darah dan limfatik. *Vascular endothelial growth factor-A* juga merangsang proliferasi dan migrasi sel endotel - perubahan yang terkait dengan awal angiogenesis, terlibat dalam banyak proses patologis yang terkait dengan peningkatan angiogenesis dan atau kemampuan vaskular. Contoh VEGF-A memainkan peran penting adalah *rheumatoid arthritis* dan penyakit radang usus (Scaldaferri et al., 2009).

Studi molekuler telah menunjukkan bahwa VEGF-A mempromosikan permeabilitas pembuluh darah dan angiogenesis melalui interaksinya dengan VEGFR-2 pada sel endotel pembuluh darah (Zhao & Singh, 2018). Di mata, varian VEGF-A₁₆₅ sambatan VEGF-A telah terlibat sebagai penyebab revaskularisasi patologis dan memainkan peran yang lebih besar di retina neovaskularisasi okular (Jardeleza & Miller, 2009; Zhao & Singh, 2018). Retinopati diabetik adalah kondisi lain yang terkait dengan tingginya level intraokular VEGF-A (Kant, Seth, & Anthony, 2009). *Vascular endothelial growth factor* adalah faktor angiogenik yang bertanggung jawab untuk memicu kapiler proliferasi sel endotel di iris. Pada tahap lanjut retinopati diabetik

proliferatif, kadar VEGF dalam cairan vitreus diperkirakan tiga kali lebih tinggi daripada yang ada di mata normal (Artini *et al.*, 2019).

Vascular endothelial growth factor memiliki potensi untuk mempromosikan diferensiasi sel-sel progenitor umum untuk garis keturunan angiogenik dan osteogenik. Dalam perkembangan embrio, VEGF-A telah dianggap sangat penting untuk vaskularisasi dan pola pelat pertumbuhan tulang. *Vascular endothelial growth factor-A* memiliki terbukti meningkatkan pembentukan tulang di tulang panjang model cacat (Geiger *et al.*, 2005; Street *et al.*, 2002) mempromosikan diferensiasi osteoblas secara autokrin (Street *et al.*, 2002), menghambat osteoblas apoptosis (Street & Lenehan, 2009), dan menginduksi sel-sel endotel dari embrionik manusia sel induk (Nourse *et al.*, 2010).

Sebuah studi menunjukkan bahwa VEGF-A terutama oleh osteoblas, dilakukan melalui sel endotel (Clarkin, Emery, Pitsillides, & Wheeler-Jones, 2008) (Kasten *et al.*, 2012). Efek osteogenik dari VEGF-A pada osteoblas, seperti peningkatan pembentukan nodul tulang dan aktivitas alkali fosfatase, telah dilaporkan secara *in vitro* (Street *et al.*, 2002). Selain itu, VEGF-A meningkatkan penyembuhan tulang *in vivo* (Geiger *et al.*, 2005; Kasten *et al.*, 2012; Street *et al.*, 2002).

4. *Vascular Endothelial Growth Factor* dalam *Platelet Rich Plasma*

Penelitian Karina dkk., (2019) menyatakan bahwa produk PRP dari donor diabetes melitus memiliki konten VEGF lebih tinggi membuat aplikasi PRP autologous pada pengobatan ulkus kaki diabetik (Karina *et*

al., 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Hosny *et al.*, (2015) menyatakan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara konsentrasi VEGF setelah mengaktifkan sampel PRP segar dan *frozenthawed* selama satu dan tiga minggu dengan CaCl_2 atau CaCl_2 dengan trombin, dan juga tidak ada perbedaan signifikan yang ditemukan periode pembekuan diperpanjang dari satu hingga tiga minggu. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa jumlah trombosit tidak berkorelasi dengan tingkat variabel VEGF (Hosny *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.*, (2010) menyatakan aktivasi trombosit dengan, kolagen, dan jumlah CaCl_2 dan trombin yang rendah menunjukkan peningkatan signifikan dalam pelepasan VEGF (konsentrasi rata-rata 1264 pg/ml) dibandingkan menggunakan CaCl_2 tinggi dan trombin (konsentrasi rata-rata 273 – 548 pg/ml) (E.-S. Kim *et al.*, 2010).

Penelitian Anitua *et al.*, (2005) sel tendon yang dikultur mensintesis VEGF dan HGF PPP-*clot* dan PRP-*clot* melepaskan, sehingga jumlah yang disintesis secara signifikan lebih tinggi dengan supernatan dari gumpalan yang kaya trombosit daripada supernatan dari *platelet-poor clot* ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian bekuan yang kaya trombosit autologous mungkin bermanfaat untuk perawatan cedera tendon dengan menginduksi proliferasi sel dan mempromosikan sintesis faktor angiogenik selama proses penyembuhan (Anitua *et al.*, 2005).

Selama penyembuhan luka, VEGF memberikan efek parakrin yang kuat pada sel endotel. Oleh karena itu, VEGF mendukung proses angiogenesis luka, yang bertanggung jawab memulai proses angiogenesis dalam jaringan granulasi. Telah didemonstrasikan VEGF mewakili pengatur utama *vasculogenesis* fisiologis dan patologis, angiogenesis, limfangiogenesis, dan permeabilitas pembuluh darah (Chicharro-Alcántara *et al.*, 2018). Sampai saat ini, aplikasi VEGF telah dilaporkan dalam studi eksperimental dan klinis dengan hasil yang sukses mempercepat perbaikan luka oleh meningkatkan epitelisasi, angiogenesis dan pembentukan jaringan granulasi pada luka diabetes tikus model, flap kulit pada anjing, ulkus iskemik, dan pada pasien ulkus diabetes (Chicharro-Alcántara *et al.*, 2018).

Vascular endothelial growth factor merupakan faktor utama selama proses angiogenik. Terjadi ikatan reseptor VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (FLK-1/KDR), dan VEGFR3 (Flt-4) terdapat di sel endotel. Aktivitas VEGF dalam proses PRP dapat ditekan oleh reseptor terlarut sFlt, yang terdapat pada PRP tetapi tidak terdapat dalam *buffy-coat*, dan pengamatan ini menunjukkan bahwa sFlt-1 adalah berasal dari plasma (Isabel Andia & Abate, 2018).