

KARYA AKHIR

**EFEK PEMBERIAN AKTIVATOR KALSIMUM KLORIDA
TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH
FACTOR BETA* PADA *PLATELET RICH PLASMA*
DENGAN KONDISI PENYIMPANAN YANG BERBEDA**

***EFFECTS OF CALCIUM CHLORIDE ACTIVATOR ON
TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA LEVELS IN
PLATELET RICH PLASMA WITH DIFFERENT STORAGE
CONDITIONS.***

LISDIANA AMIN ASRI

C108216101



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EFEK PEMBERIAN AKTIVATOR KALSIUM KLORIDA TERHADAP
KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* PADA *PLATELET
RICH PLASMA* DENGAN KONDISI PENYIMPANAN YANG BERBEDA**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Spesialis-1 (Sp.1)

Program Studi Ilmu Patologi Klinik
Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu

Disusun dan Diajukan Oleh

LISDIANA AMIN ASRI

C108216101

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (SP-1)
PROGRAM STUDI ILMU PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

KARYA AKHIR

**EFEK PEMBERIAN AKTIVATOR KALSIMUM KLORIDA TERHADAP
KADAR TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA PADA PLATELET
RICH PLASMA DENGAN KONDISI PENYIMPANAN YANG BERBEDA**

Disusun dan diajukan oleh :

LISDIANA AMIN ASRI

Nomor Pokok : C108216101

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 3 Juli 2020
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

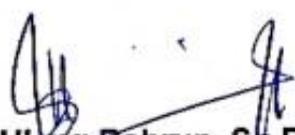
**Menyetujui
Komisi Penasehat,**


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

a.n. Dekan,
Wakil Dekan Bid. Akademik,
Riset dan Inovasi


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


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
NIP. 19671103 199802 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : **LISDIANA AMIN ASRI**

Nomor Pokok : **C108216101**

Program Studi : Ilmu Patologi Klinik

Konsentrasi : Program Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis 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 tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 3 Juli 2020

Yang menyatakan,


Lisdiana Amin Asri

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Kuasa, Maha Pemurah, Maha Pengasih dan Penyayang atas limpahan kasih dan anugerahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“EFEK PEMBERIAN AKTIVATOR KALSIMUM KLORIDA TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA* PADA *PLATELET RICH PLASMA* DENGAN KONDISI PENYIMPANAN YANG BERBEDA”** sebagai salah satu persyaratan dalam Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan koreksi dari semua pihak. Penulis juga menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan berkat bantuan dan partisipasi berbagai pihak. Dalam kesempatan ini, penulis menghaturkan terima kasih yang tulus kepada Komisi Penasihat Seminar Hasil Penelitian ini yaitu dr. Ulung Bahrun, SpPK(K), PhD. selaku Ketua Komisi Penasihat, Dr. dr. Tenri Esa, MSi, SpPK selaku Sekretaris Penasihat, Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS sebagai Anggota, dr. Rachmawati A. Muhiddin, SpPK(K) sebagai Anggota, dan dr. Darwati Muhadi, SpPK(K) Sebagai Anggota, yang telah memberikan kesediaan waktu, saran dan bimbingan sejak masa penelitian, penyusunan hingga seminar hasil penelitian ini.

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

1. Guru Besar di Bagian Patologi Klinik dan Guru Besar Emeritus FK-UNHAS, Alm. Prof. dr. Hardjoeno, SpPK(K), yang sampai akhir hayatnya beliau senantiasa mendukung pendidikan PPDS sejak awal, memberi bimbingan, petunjuk dan arahan kepada semua PPDS.
2. Guru sekaligus orang tua kami, dr. H.Ibrahim Abd.Samad, SpPK(K) dan dr.Hj. Adriani Badji, SpPK yang senantiasa mendukung pendidikan penulis sejak awal mendidik, membimbing dengan penuh ketulusan hati dan memberi nasehat kepada penulis.
3. Guru besar di Departemen Ilmu Patologi Klinik, Prof. dr. Mansyur Arif, PhD, SpPK(K), MARS guru kami yang telah membimbing, mengajar dan memberikan ilmu yang tidak ternilai dengan penuh ketulusan hati.
4. Guru kami, dr. Uleg Bahrun, SpPK(K), PhD, sekaligus Penasehat Akademik penulis yang senantiasa mendukung sejak awal pendidikan, dengan bijaksana membimbing, memberi nasehat dan semangat kepada penulis dalam menjalani pendidikan.
5. Ketua Departemen Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS Dr .dr. Yuyun Widaningsih, M.Kes, SpPK, guru kami yang senantiasa membimbing dan memberikan arahan kepada penulis dalam berbagai kegiatan, mengajar, memberi nasehat dan semangat serta mendorong penulis supaya lebih maju.
6. Ketua Program Studi Departemen Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS, Dr. dr. Tenri Esa, SpPK, MSi, yang juga merupakan pembimbing karya akhir ini, guru kami yang senantiasa memberi bimbingan, dukungan

dan semangat kepada penulis terutama dalam penyusunan karya akhir ini.

7. Sekretaris Program Studi Departemen Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS, dr. Rachmawati A. Muhiddin, Sp.PK(K), guru kami yang penuh kebijaksanaan dan senantiasa memberi bimbingan, nasehat dan semangat serta mendorong penulis supaya lebih maju
8. Guru kami, dr. Fitriani Mangarengi, SpPK(K), yang saat menjabat sebagai Ketua Program Studi selalu memberi semangat, mendukung dan membimbing penulis.
9. Semua guru, Supervisor di Departemen Ilmu Patologi Klinik FK-UNHAS 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 tesis ini.
11. Dosen-dosen Penguji: dr. Darwati Muhadi, SpPK(K) dan dr. Rachmawati A. Muhiddin, Sp.PK(K), yang telah meluangkan waktu untuk memberikan kami ilmu dan saran-sarannya dalam penyempurnaan tesis ini, yang telah memberi kesediaan waktu, saran dan bimbingan sejak masa penelitian, penyusunan hingga seminar hasil penelitian ini.

12. Direktur RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menjalani pendidikan di rumah sakit ini.
13. Kepala Instalasi Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar, Kepala Instalasi Laboratorium RSPTN UNHAS, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Labuang Baji, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Stella Maris, Kepala Instalasi Laboratorium RS. Ibnu Sina, Direktur UTD PMI, Kepala Unit Transfusi Darah Makassar, Ketua Departemen Ilmu Penyakit Dalam yang menerima dan membantu penulis dalam menjalani masa pendidikan.
14. Teman-teman sejawat PPDS Program Studi Ilmu Patologi Klinik, khususnya dr. Erika Rosaria Simbolon, dr. Zahra Inayah Kasim, dr. Evi Andriyani Lauddin dan dr. Dessy Iriana Iskandar yang telah berbagi suka dan duka selama masa pendidikan penulis, serta banyak memberikan bantuan, motivasi, dukungan dan semangat selama masa pendidikan dan penyelesaian tesis ini. Kebersamaan dan persaudaraan merupakan hal yang tak terlupakan dan semoga persaudaraan ini tetap terjaga.
15. Senior-senior terbaikku dr. Fatmawati Ahmad, SpPK, dr. Steven Tiro, SpPK, dr. Nunung M. Umar, SpPK, dr. Nelly, SpPK, dr. Andi Munawirah, SpPK, dr. Rahmawati, SpPK, dan dr. Hermawan.
16. Teman-teman sejawat PPDS lain yang turut membantu dalam semua proses penyelesaian karya akhir ini.

17. Teman-teman analis Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dan RS Universitas Hasanuddin terutama Rahmat yang sangat membantu dalam proses pengolahan sampel.
18. Staf Departemen Ilmu Patologi Klinik, Nurilawati, SKM atas semua bantuan dan dukungannya selama masa pendidikan dan penyelesaian karya akhir ini.
19. 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 orang tua saya tercinta, Muhammad Amin Asri dan Muhaenah Iskandar juga P. Saongku atas doa tulus, kasih sayang dan dukungan semangat maupun material selama ini. Terima kasih buat saudara-saudara saya tercinta Bripka Armansyah Amin Asri, S.M dan Andi Fatmawati A. Saharuddin yang telah memberikan dukungan doa dan semangat. Terima kasih kepada mertua saya, H. Andi Muhammad As'ad Didda dan Hj. P. Bididi, saudara-saudara ipar saya, serta seluruh keluarga besar atas kasih sayang dan dukungan serta doa tulus sehingga penulis dapat menyelesaikan setiap tahap dari proses pendidikan ini dengan baik.

Terima kasih yang paling dalam kepada suami tercinta Sultan Syahid Saade, ST, CIPM dan anak-anakku tercinta Besse Shofiyyah Hijri Sultan dan Baso Farid Atallah Sultan atas kasih sayang, dukungan semangat, pengorbanan, pengertian, doa yang tulus dan kesabaran dalam mengiringi penulis menjalani pendidikan 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 Tuhan YME senantiasa menyertai dan memberkati setiap langkah pengabdian kita. Amin.

Makassar, 3 Juli 2020

Lisdiana Amin Asri

ABSTRAK

Lisdiana Amin Asri. Efek Pemberian Aktivator Kalsium Klorida Terhadap Kadar *Transforming Growth Factor Beta* Pada *Platelet Rich Plasma* Dengan Kondisi Penyimpanan Yang Berbeda.
(dibimbing oleh Tenri Esa dan Uleng Bahrin)

Latar Belakang: *Platelet rich plasma* (PRP) adalah produk otolog yang diproduksi dari *whole blood* melalui proses sentrifugasi sehingga menghasilkan konsentrasi trombosit yang tinggi dalam volume plasma yang rendah. Konsentrasi trombosit yang tinggi akan meningkatkan kadar *growth factor*. Sampai saat ini, belum ada standar baku pembuatan PRP di Indonesia, termasuk pemberian aktivator maupun proses penyimpanannya terhadap kadar *growth factor*. **Tujuan:** Untuk mengetahui kadar *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β), pada *Platelet-Rich Plasma* (PRP) dengan preparasi yang berbeda, yaitu penggunaan aktivator Kalsium klorida (CaCl_2), dan pada penyimpanan dengan suhu dan waktu yang berbeda. **Metode:** Penelitian ini menggunakan desain penelitian *experimental laboratory*, melibatkan 16 volunteer yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. **Hasil:** Perbedaan rerata jumlah trombosit pra-perlakuan dan PRP ACD menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0,001$). Kadar trombosit PRP ACD ditemukan lebih tinggi dibandingkan kadar trombosit pra-perlakuan, yaitu 666,06 dibandingkan 326,44 atau terdapat peningkatan sebesar 104%. Hasil uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,001$) antara kadar TGF β pada produk PRP dengan *Acid Citrate Dextrose* (ACD) sebelum dan sesudah diaktivasi dengan CaCl_2 . Kadar TGF- β meningkat 3,12 kali. Rerata kadar *growth factor* TGF β berbeda secara signifikan ($p < 0,001$) antara produk PRP yang diaktivasi dengan CaCl_2 yang disimpan selama 1 jam pada suhu ruang, 24 jam pada suhu 4°C dan 7 hari pada suhu -80°C. **Kesimpulan:** Terdapat perbedaan kadar TGF- β pada produk PRP dengan antikoagulan *Acid Citrate Dextrose* (ACD) sebelum dan sesudah diaktivasi dengan CaCl_2 . Produk PRP ACD dengan penambahan aktivator CaCl_2 akan meningkatkan kadar TGF- β 3,12 kali. Terdapat perbedaan kadar TGF- β pada produk PRP dengan antikoagulan *Acid Citrate Dextrose* (ACD) pada penyimpanan dengan suhu dan waktu yang berbeda. 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.

Keywords: *Platelet Rich Plasma*, Trombosit, *Transforming Growth Factor-Beta Acid Citrate Dextrose*, Kalsium klorida.

ABSTRACT

Lisdiana Amin Asri. Effects of Calcium Chloride Activator on Transforming Growth Factor-Beta Levels in Platelet Rich Plasma with Different Storage Conditions.

(Supervised by Tenri Esa and Uleng Bahrhun)

Background: Platelet rich plasma (PRP) is an autologous product that is produced from all blood through a process of centrifugation that produces high platelets in low plasma volumes. High platelet concentration will increase levels of growth factors. There is no gold standard for the preparation of PRP in Indonesia, including the activator effects and the process of storing them against growth factor levels.

Aim: To determine the levels of Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β), in Platelet-Rich Plasma (PRP) with different preparations, the use of Calcium chloride (CaCl_2) activator, and storage with different temperatures and times.

Methods: This study used a laboratory experimental research design, involving 16 healthy volunteers that met the inclusion and exclusion criteria.

Results: Mean differences in the number of pre-set platelet counts and PRP ACD showed significant results ($p < 0.001$). PRP ACD platelet levels were found to be higher than pre-treatment platelet levels, which was 666.06 compared to 326.44 or an increase of 104%. Statistical test results showed a significant difference ($p < 0.001$) between TGF β levels in PRP products with ACD before and shown to be activated with CaCl_2 . TGF- β levels increased 3.12 times. The mean TGF β growth factor levels were significantly different ($p < 0.001$) between PRP products activated with CaCl_2 stored for 1 hour at room temperature, 24 hours at 4°C and 7 days at -80°C.

Conclusion: There are differences in TGF- β levels in PRP products with Acid Citrate Dextrose (ACD) anticoagulants before and after being activated with CaCl_2 . Platelet rich plasma ACD products by increasing the activator of CaCl_2 will increase TGF- β levels 3,12 times. There is a difference in TGF- β in PRP products with anticoagulant Acid Citrate Dextrose (ACD) in storage with different temperatures and times. The highest increase in TGF- β levels in PRP products activated with CaCl_2 stored for 1 hour at room temperature (increased 212%), and increased 28% in storage for 7 days at -80°C.

Keywords: *Platelet Rich Plasma, Platelet, Transforming Growth Factor-Beta Acid Citrate Dextrose, Calcium chloride.*

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------|
| HALAMAN JUDUL | I |
| PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR | ii |
| PRAKATA | iv |
| ABSTRAK | x |
| <i>ABSTRACT</i> | xi |
| DAFTAR ISI | xii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR SINGKATAN | xvi |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang | 1 |
| B. Rumusan Masalah | 6 |
| C. Tujuan Penelitian | 7 |
| 1. Tujuan Umum | 7 |
| 2. Tujuan Khusus | 7 |
| D. Hipotesis Penelitian | 7 |
| E. Manfaat Penelitian | 8 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 9 |
| A. Trombosit | 9 |
| 1. Definisi..... | 9 |
| 2. Struktur trombosit | 11 |
| 3. Fungsi Trombosit | 16 |
| B. Transforming Growth Factor Beta. | 26 |
| C. Platelet Rich Plasma..... | 32 |
| D. Aktivasi Trombosit pada Platelet Rich Plasma | 42 |
| E. Penyimpanan Produk Platelet Rich Plasma pada Suhu dan Waktu yang bervariasi..... | 46 |

| | | |
|---------|---|----|
| BAB III | KERANGKA PENELITIAN | 48 |
| | A. Kerangka Teori | 48 |
| | B. Kerangka Konsep | 49 |
| BAB IV | METODE PENELITIAN | 50 |
| | A. Desain Penelitian | 50 |
| | B. Tempat dan Waktu Penelitian | 50 |
| | 1. Tempat Penelitian | 50 |
| | 2. Waktu Penelitian | 50 |
| | C. Populasi Dan Sampel Penelitian | 50 |
| | D. Kriteria inklusi dan Eksklusi | 51 |
| | E. Izin Subyek Penelitian | 52 |
| | F. Cara Kerja | 52 |
| | G. Prosedur Pemeriksaan Laboratorium | 55 |
| | H. Definisi Operasional Dan Kriteria Objektif | 61 |
| | I. Metode Analisis | 63 |
| | J. Skema Alur Penelitian | 64 |
| BAB V | HASIL DAN PEMBAHASAN | 65 |
| | A. Hasil Penelitian | 65 |
| | B. Pembahasan | 69 |
| | C. Ringkasan Penelitian | 76 |
| BAB VI | SIMPULAN DAN SARAN | 77 |
| | A. Simpulan | 77 |
| | B. Saran | 77 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 81 |
| | LAMPIRAN | |

DAFTAR TABEL

| Nomor | | Hal |
|--------------|---|------------|
| 1. | Komponen granula alfa (α) pada trombosit | 11 |
| 2. | Faktor-faktor yang berperan dalam koagulasi | 14 |
| 3. | <i>Growth factors</i> pada trombosit dan fungsi biologisnya | 25 |
| 4. | Pemanfaatan PRP dalam Dunia Kedokteran | 36 |
| 5. | Karakteristik subyek penelitian | 65 |
| 6. | Jumlah Trombosit Pre-Perlakuan dan Pasca Perlakuan | 66 |
| 7. | Kadar TGF β sebelum dan sesudah diaktivasi dengan CaCl ₂ | 67 |
| 8. | Kadar TGF β sebelum dan sesudah diaktivasi CaCl ₂ dengan penyimpanan pada suhu dan waktu yang berbeda. | 68 |

DAFTAR GAMBAR

| Nomor | | Hal |
|--------------|--|------------|
| 1 | (a) Gambar Struktur trombosit (b) Trombosit Sebelum Teraktivasi (c) Trombosit Teraktivasi | 12 |
| 2 | Trombosit setelah teraktivasi berbentuk Cakram Bikonveks dan Trombosit Teraktivasi | 13 |
| 3 | <i>Platelete Diskoid</i> | 16 |
| 4 | Representasi Skematis Kejadian Intraseluler Selama Aktivasi trombosit. A. " <i>Inside</i> " <i>Out Signaling</i> B. " <i>Outside</i> " | 20 |
| 5 | <i>in Signaling</i> | 22 |
| 6 | A. Adhesi Trombosit, B. Mekanisme Hemostasis | 26 |
| 7 | Skema Kaskade Koagulasi Mekanisme <i>Transforming Growth Factor Beta</i> dalam | 31 |
| 8 | Penyembuhan Luka Mekanisme pembentukan fibrin yang diinduksi Ca^{2+} di plasma sitrat. | 72 |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|-------------------|---|
| ADP | : <i>Adenosine Diphosphate</i> |
| CaCl ₂ | : <i>Calcium Chloride</i> |
| ATP | : <i>Calcium</i> |
| Ca ²⁺ | : <i>Adenosine Triphosphate</i> |
| PRP | : <i>Platelet Rich plasma</i> |
| PPP | : <i>Platelet Poor plasma</i> |
| PDGF | : <i>Platelet Derived Growth Factor</i> |
| TGF-β | : <i>Transforming Growth Factor-β</i> |
| IGF-1 | : <i>Insulin-Like Growth Factor-1</i> |
| VEGF | : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| EGF | : <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| EDTA | : <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> |
| ACD | : <i>Acid Citrate Dextrose</i> |
| vWF | : <i>Von Willebrand Factor</i> |
| TXA ₂ | : <i>Tromboxane A₂</i> |
| TF | : <i>Tissue Factor</i> |
| MSCs | : <i>Mesenchymal Stem Cells</i> |
| RCF | : <i>Relative Sentrifugal Force</i> |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Platelet Rich Plasma (PRP) adalah plasma autologus yang memiliki konsentrasi trombosit di atas nilai normal. Maksud dari autologus yaitu berasal dari dalam organisme itu sendiri atau diambil dari darah manusia sendiri. Fragmen sel ini ditemukan dalam plasma darah, fraksi cairan kuning dari darah yang mengandung air, protein albumin, globulin, faktor pembekuan seperti fibrinogen dan protrombin. Sel-sel dalam PRP terdiri dari 94% trombosit, 1% eritrosit dan 1% leukosit. (Laftah, 2006; Zhang et al., 2018). Tiga protein yang terkandung dalam PRP yang dikenal sebagai molekul adhesi sel untuk osteokonduksi dan sebagai matriks untuk tulang, jaringan ikat dan migrasi epitel. Molekul adhesi sel ini adalah fibrin itu sendiri, fibronektin, dan vitronektin. Ketika plasma terpapar trombin, baik dengan penambahan trombin eksogen atau kontak dengan tromboplastin jaringan (juga dikenal sebagai *tissue factor*), kaskade koagulasi akan dimulai dan trombosit diaktifkan menghasilkan pembentukan bekuan fibrin (Lubkowska, Dolegowska, & Banfi, 2012)

Platelet Rich Plasma diperlukan dalam proses penyembuhan karena *natural growth factor* yang ada pada produk PRP itu sendiri. Tahun-tahun berikutnya, PRP mulai diteliti lebih jauh dan mulai digunakan dalam mempromosikan penyembuhan luka pada operasi maksilofasial.

Dampak besar ditunjukkan pada tahun 2009 ketika PRP digunakan sebagai prosedur terapi dalam penyembuhan cedera pergelangan kaki pada pemain olahraga, menjadi “perawatan baru” dalam bidang kedokteran olahraga. Saat ini PRP digunakan dalam merangsang penyembuhan luka pada kulit dan jaringan lunak, mempercepat penyembuhan luka pada pasien diabetes dan memfasilitasi proliferasi tulang dalam bedah ortopedi dan trauma. *Platelet Rich Plasma* ini juga banyak diaplikasikan dalam pembedahan maksilofasial, pembedahan tulang belakang, pembedahan plastik dan estetika, pembedahan jantung dan luka bakar. Ada banyak penelitian yang menunjukkan keberhasilan terapi dalam uji coba plasebo. Salah satu manfaat utama penggunaan PRP dalam operasi plastik adalah dalam penyembuhan luka kronis pada penderita ulkus diabetes. (Cozma, Raducu, & Jecan, 2016)

Platelet Rich Plasma pertama kali ditemukan oleh Ferrari pada tahun 1987 dan injeksi PRP pertama kali digunakan dalam operasi jantung. *Platelet Rich Plasma* merupakan produk biologis yang didefinisikan sebagai bagian dari plasma autologous melalui proses sentrifugasi dengan konsentrasi trombosit yang sangat tinggi. (Alves & Grimalt, 2018) *Platelet Rich Plasma* adalah fraksi plasma darah dengan konsentrasi trombosit 3-5 kali diatas nilai normal (konsentrasi trombosit pada *whole blood*). Konsentrasi trombosit yang tinggi akan meningkatkan kadar *growth factor*, kecuali pada pasien dengan kelainan fungsi trombosit yang menyebabkan *growth factor* dalam trombosit tidak dapat dilepaskan.

Banyaknya *growth factor* 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. *Growth factor* yang terdapat dalam PRP antara lain *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β), *Insulin-Like Growth Factor-1* (IGF-1), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), dan lain-lain. *Transforming Growth Factor-Beta* merupakan salah satu *growth factor* yang menginisiasi respon terhadap penyembuhan luka. (Dhurat & Sukesh, 2014) *Transforming Growth Factor-Beta* adalah *growth factor* yang dilepaskan dari granula trombosit, merupakan mitogen untuk fibroblas, sel otot polos, dan osteoblas. Selain itu, *Transforming Growth Factor-Beta* merangsang angiogenesis dan produksi matriks ekstraseluler. Injeksi TGF (4 dan 40 ng) setiap hari selama 40 hari menghasilkan peningkatan ketebalan tulang yang bergantung pada dosis. Selanjutnya, dosis 40 ng meningkatkan kekuatan mekanik. Berbeda dengan penelitian oleh Broderick et al. yang menyuntikkan dosis yang jauh lebih tinggi (335 g TGF) dalam model anjing humerus dan menemukan penurunan mineralisasi tulang. (Barry L. Eppley, 2004)

Variabilitas PRP tergantung pada dua faktor utama yakni karakteristik pasien dan metode preparasi PRP. (Chahla et al., 2017).

Karakteristik pasien diantaranya usia, jenis kelamin, dan konsumsi obat antiinflamasi non-steroid (Xiong et al., 2018; Taniguchi et al., 2019; Schippinger et al., 2015). Faktor lain yang terlibat dalam variabilitas PRP adalah metode persiapan PRP yang digunakan, seperti volume sampel, langkah sentrifugasi, kondisi penyimpanan, dan cara aktivasi PRP. (Foster et al. 2009; Lopez-Vidriero et al., 2010)

Berbagai protein bioaktif yang ada di dalam granula α akan dilepaskan setelah trombosit teraktivasi dan mengalami perubahan bentuk. Zat yang dapat mengaktivasi trombosit disebut agonis trombosit, misalnya asam arakidonat, kalsium, adenosin difosfat, trombin, adrenalin, kolagen, dan ristosetin. Setelah trombosit teraktivasi, granula α akan menempel pada membran sitoplasma trombosit dan mengeluarkan berbagai protein bioaktif yang dimilikinya, termasuk *growth factor*. (Hamilton, Tol, Knez, & Chalabi, 2013).

Menurut hasil penelitian Amable dkk, aktivasi PRP menggunakan CaCl_2 (kalsium klorida) mengakibatkan peningkatan kadar *growth factor*. Hamilton dkk, *platelet activator* CaCl_2 mempengaruhi kadar *growth factor* pada produk PRP (Amable et al., 2013; Hamilton et al., 2013). Konsentrasi *growth factor* pada setiap produk PRP sangat tergantung pada prosedur pemberian activator. (Roh, 2016)

Penggunaan antikoagulan merupakan faktor yang sangat penting dalam menjaga fungsi, integritas, dan morfologi trombosit. Beberapa

peneliti berpendapat bahwa penggunaan antikoagulan *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA) dapat merusak membran trombosit, dan merekomendasikan penggunaan *Acid Citrate Dextrose* (ACD). Studi Munawirah tahun 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, 2019)

Produk PRP juga perlu memperhatikan cara penyimpanannya. Idealnya suatu produk PRP yang telah dihasilkan dapat langsung diaplikasikan ke tubuh penderita untuk efektifitas yang lebih baik. Akan tetapi terkadang produk ini perlu dipakai berulang atau ditunda pemakaiannya, sehingga dalam penyimpanan perlu diperhatikan. Adanya gangguan fungsi platelet, perubahan kadar *growth factor*, atau terjadinya akumulasi sitokin-sitokin pirogen dan berkembang biakan bakteri. Belum banyak laporan yang menyebutkan kondisi ideal penyimpanan PRP untuk tetap mempertahankan kadar *growth factor* yang terkandung didalamnya; pada suhu berapa dan berapa lama penyimpanan yang efektif. Penelitian oleh Shiga dkk 2016 menyatakan bahwa penyimpanan PRP dalam bentuk *freeze-drying* masih dapat mempertahankan kadar *growth factor* sampai 8 minggu masa penyimpanan. Hosny dkk (2015) juga mendapatkan bahwa penyimpanan PRP dalam kondisi beku -40°C selama tiga minggu masih

dapat mempertahankan kadar *growth factor* yang terkandung di dalamnya. Namun demikian tidak semua rumah sakit atau laboratorium klinik memiliki fasilitas penyimpanan seperti itu.

Metode persiapan PRP masih belum sepenuhnya dipahami. Preparasi PRP tergantung pada beberapa karakteristik seperti jumlah trombosit, kecepatan dan lamanya sentrifugasi, ada atau tidaknya sel darah merah, dan penggunaan aktivator seperti trombin eksogen dan kalsium klorida. Variasi dalam produk PRP ini penting untuk dipertimbangkan oleh dokter karena beragamnya efek biologis yang mungkin terjadi berdasarkan pada perbedaan preparasinya. (Russell, Apostolakos, Hirose, Cote, & Mazzocca, 2013)

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti tertarik untuk membandingkan jumlah trombosit dan perbedaan kadar/konsentrasi TGF- β yang terdapat di dalam produk PRP setelah penambahan aktivasi trombosit CaCl_2 dan penggunaan antikoagulan ACD, dengan penyimpanan pada suhu ruang, *refrigerator* dan *freezer* yang umum terdapat laboratorium dan waktu penyimpanan yang bervariasi.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana perbedaan kadar TGF- β pada produk PRP dengan penggunaan antikoagulan ACD sebelum dan sesudah diaktivasi dengan CaCl₂?
2. Bagaimana perbedaan kadar TGF- β pada produk PRP dengan penggunaan antikoagulan ACD pada penyimpanan dengan suhu dan waktu yang berbeda?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum:

Untuk mengetahui kadar *Transforming Growth Factor-Beta*, pada Platelet-Rich Plasma dengan preparasi yang berbeda, yaitu penggunaan aktivator, dan pada penyimpanan dengan suhu dan waktu yang berbeda.

2. Tujuan Khusus :

1. Untuk mengetahui kadar TGF- β pada PRP ACD sebelum dan sesudah pemberian aktivator.
2. Untuk mengetahui kadar TGF- β pada PRP ACD yang disimpan pada suhu ruangan selama 1 jam
3. Untuk mengetahui kadar TGF- β pada PRP ACD yang disimpan pada Suhu 4°C selama 24 jam.
4. Untuk mengetahui kadar TGF- β pada PRP ACD yang disimpan pada Suhu -80°C selama 7 hari.

D. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat perbedaan kadar TGF- β pada produk PRP dengan *Acid Citrate Dextrose* (ACD) sebelum dan sesudah diaktivasi dengan CaCl₂.
2. Terdapat perbedaan kadar TGF- β pada produk PRP dengan *Acid Citrate Dextrose* (ACD) pada penyimpanan dengan suhu dan waktu yang berbeda.

E. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh penambahan aktivator trombosit CaCl₂, serta pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kadar TGF- β pada produk PRP.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan standar operasional yang baku dalam pengelolaan/pembuatan PRP untuk diaplikasikan secara klinis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Trombosit

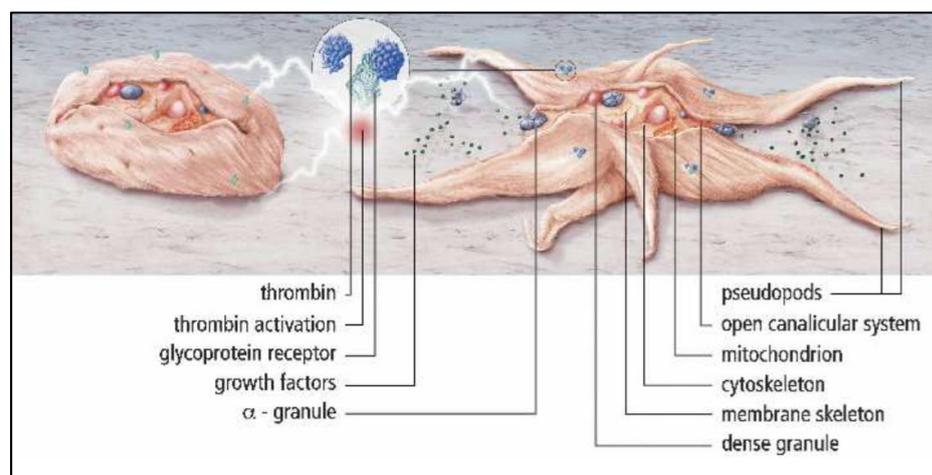
1. Definisi Trombosit

Trombosit adalah salah satu sel darah yang berfungsi untuk proses pembekuan darah. Nama lain dari trombosit adalah platelet. Trombosit ditemukan pertama kali pada tahun 1860 oleh Zimmerman. Jumlah trombosit normal dalam tubuh manusia adalah 150.000 – 400.000 trombosit per mikroliter darah. Trombosit adalah sel darah tak berinti yang berasal dari sitoplasma megakariosit. Umur trombosit berkisar antara 7-10 hari. (Barrett, et al, 2010) Jangka waktu tersebut yang mereka habiskan bersirkulasi dalam darah dalam bentuk istirahat (tidak teraktivasi). Ketika melekat pada endotelium yang terekspos atau diaktifkan oleh agonis, mereka berubah bentuk dan mengeluarkan isi granula (termasuk ADP, fibrinogen, dan serotonin), yang diikuti oleh agregasi trombosit. Inisiasi peristiwa pensinyalan dalam trombosit menyebabkan reorganisasi sitoskeleton trombosit, yang terlihat sebagai perubahan bentuk yang sangat cepat. (Rožman & Bolta, 2007)

Trombosit merupakan fragmen sel darah terkecil dan paling ringan yang memiliki fungsi penting dalam *recovery cells*. Fungsi utama trombosit adalah membentuk sumbat mekanis yang merupakan respon homeostasis normal terhadap cedera vascular melalui mekanisme adhesi, aktivasi, agregasi dan fusi trombosit. Selama cedera vaskular, trombosit akan

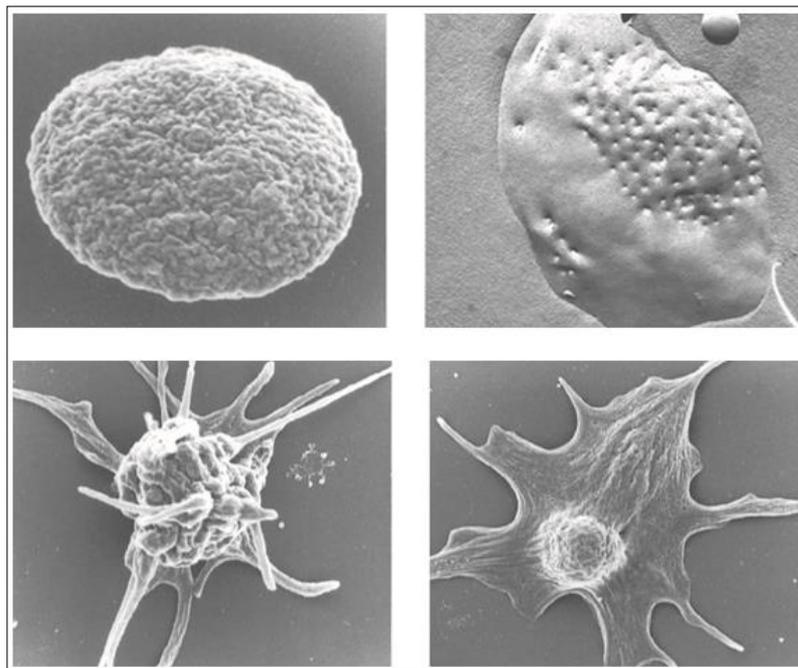
diaktifkan, dan granulanya akan melepaskan faktor yang meningkatkan koagulasi. Trombosit awalnya dianggap hanya memiliki aktivitas hemostatik, namun dalam beberapa tahun terakhir, penelitian dan teknologi ilmiah telah memberikan perspektif baru pada trombosit dan fungsinya. Studi menunjukkan bahwa trombosit mengandung banyak *growth factor* dan sitokin yang dapat mempengaruhi peradangan, angiogenesis, migrasi sel induk, dan proliferasi sel. (Alves & Grimalt, 2018)

Trombosit memiliki permukaan yang tidak teratur, bercak biru muda dan mengandung sejumlah butiran *azurophilic* kecil yang biasanya terkonsentrasi di tengah (Gambar 1). Trombosit diproduksi dari sel sumsum tulang yang disebut megakariosit. Megakariosit menjalani proses fragmentasi yang menghasilkan lebih dari 1.000 trombosit per megakariosit. (SN Wickramasinghe, 2013)



Gambar 1. Gambaran Skematik Trombosit non aktif menjadi trombosit teraktivasi (Everts et al., 2006)

Studi mikroskop elektron telah mengungkapkan bahwa trombosit yang tidak teraktivasi (istirahat) berbentuk seperti cakram bikonveks (gambar 2), memiliki permukaan yang berbelit-belit dan mengandung mitokondria, granul, dua sistem membran sitoplasma (sistem kanalikuli yang terhubung ke permukaan dan sistem tubular yang padat), mikrofilamen, mikrotubulus dan banyak molekul glikogen (Gambar 1). (SN Wickramasinghe, 2013; White, 2007)



Gambar 2. Trombosit Sebelum Teraktivasi Berbentuk Cakram Bikonveks dan Trombosit Teraktivasi (White, 2007)

2. Struktur Trombosit

Trombosit berukuran sangat kecil dan diskoid, berdiameter 3,0x0,5 μm . Ultrastruktur trombosit dibagi menjadi tiga komponen: membran trombosit, sitoskeleton, dan organel (Gambar 2). Struktur trombosit terdiri

atas; (Costache, 2018; Hoffbrand, Cavill, 2002; SN Wickramasinghe, 2013)

1. Zona perifer

Zona perifer terdiri atas glikoprotein, suatu membran ekstra yang terletak di bagian paling luar; di dalamnya terdapat membran plasma dan lebih dalam lagi terdapat sistem kanal terbuka.

- a. Glikoprotein Ib (GP Ib) adalah protein transmembran intrinsik, merupakan tempat pengikatan *Von Willebrand Faktor* (VWF). Ikatan VWF berguna untuk proses adhesi trombosit.
- b. Glikoprotein IIb-IIIa (GP IIb-IIIa) merupakan kompleks membran protein *calcium-dependent* yang berfungsi sebagai reseptor fibrinogen. Ikatan fibrinogen berperan untuk terjadinya agregasi trombosit.

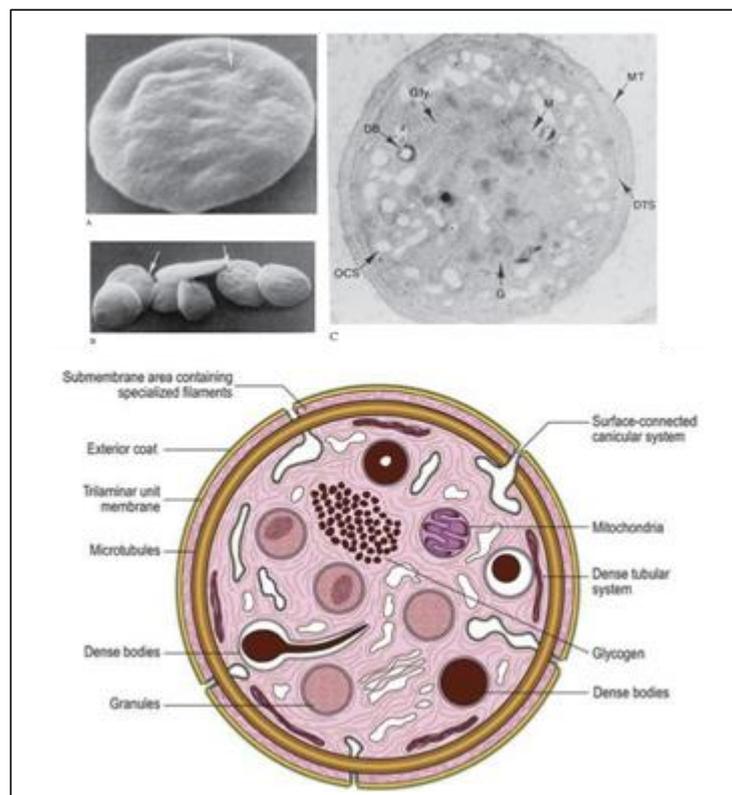
2. Zona struktur terdiri atas mikrotubulus dan mikrofilamen, sistem tubulus padat (berisi nukleotida adenin dan kalsium). Selain itu juga terdapat trombostenin, suatu protein penting untuk fungsi kontraktile, dan juga terdapat aktin dan myosin. Mikrotubular dan mikrofilamen berada di bawah membran glikoprotein trombosit yang membentuk pita melingkar berperan dalam penunjang sitoskeletal trombosit dan kontraksi sel yang distimulasi. (Hoffbrand, Cavill, 2002)

3. Zona organella

Terdiri atas granula padat, granula α dan organella (granula lisosom dan retikulum endoplasmik).

- a. Granula padat (granul δ) disebut juga *dense bodies* adalah partikel padat yang memperlihatkan bentuk *bull's eye* karena adanya zona *electron-lucent* antara sentral *electron-dense* dan membran pembatas. Granula padat mengandung adenosine diphosphat (ADP) dan kalsium dengan konsentrasi tinggi, demikian juga dengan serotonin dan nukleotida lain. Substansi tersebut dilepaskan pada saat stimulasi trombosit yang meningkatkan agregasi trombosit dan vasokonstriksi.
- b. Granula α berdiameter 200-500nm dengan jumlah lebih banyak yaitu sekitar 50-80 granula per trombosit, mengandung diantaranya faktor pembekuan, faktor V, VWF dan berbagai protein yang dihasilkan dari stimulasi trombosit, mencakup β -thromboglobulin, fibrinogen dan berbagai glikoprotein yang penting untuk adhesi, khususnya thrombospondin dan fibronektin. Granula α juga mengandung berbagai *growth factor* 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) dan lebih terperinci dapat dilihat pada Tabel 1. Granula α dapat mempotensiasi aksi thrombin, dan faktor mitogenik trombosit yang menstimulasi pertumbuhan sel endotel, sel otot polos dan fibroblas kulit. (Rožman & Bolta, 2007; Williams, 2009)

- c. Granul lysosomal (λ): sedikit lebih besar dari granul *dense* (*moderat electrone-dense*), mengandung asam fosfatase.
- d. Peroxisomes: granul ini lebih kecil dari granul α dan λ .



Gambar 3. Discoid platelets. The lentiform shape of blood platelets is well preserved in samples fixed in glutaraldehyde and critical point dried for study in the scanning electron microscope. The indentations apparent on the otherwise smooth surfaces of the platelets (arrows) indicate sites where channels of the open canalicular system communicate with the cell exterior (A: $\times 13,200$; B: $\times 35,000$). (C–E) Ultrastructural features observed in thin sections of discoid platelets cut in the equatorial plane (C,D) or cross section (E). Components include the exterior coat (E.C.), trilaminar unit cell membrane (C.M.), and submembrane area containing the specialized filaments (SMF) of the membrane skeleton. The plasma membrane indentations form the walls of the channels of the surface-connected or open canalicular system (C.S. and OCS). The circumferential band of microtubules (M.T.) is seen as a continuous band beneath the plasma membrane on the equatorial section and as small open cylinders at the ends of the platelet on the cross section. Glycogen granules (Gly) are prominent punctate structures in the cytoplasm, and residual Golgi zones (GZ) can be identified. Organelles include mitochondria (M), dense bodies (D.B.), and α -granules (G), many of which have regions of electron density (nucleoids). The dense tubular system (DTS and D.T.S.), the platelet equivalent of the sarcoplasmic reticulum, sequesters calcium (C: $\times 30,000$). (Williams, 2007)

4. Membran sistem terdiri dari kanalikuli dan sistem tubular padat.
- a. Kanalikuli merupakan membran glikoprotein membentuk suatu invaginasi kedalam struktur trombosit membentuk suatu

kanalikuli. Kanalikuli merupakan tempat untuk terjadinya proses penyerapan pelepasan isi dari granula trombosit selama proses hemostasis.

- b. Sistem tubular padat, disebut sistem tubular padat berupa material padat, yang berfungsi secara selektif mengikat kation divalent yang merupakan reservoir kalsium trombosit. (Hoffbrand & Moss, 2016; Kuter et al, 1998)

Tabel 1. Komponen Granula α pada Trombosit

| Category | Term | Biological activities |
|---|---|--|
| Adhesive proteins | VWf + propeptide, Fg, Fn, Vn, TSP-1, laminin-8 | Cell contact interactions, clotting, extracellular matrix composition |
| Clotting factors and associated proteins | Factor V/Va, factor XI, multimerin, gas6, protein S, high-molecular weight chininogen, antithrombin, tissue factor pathway inhibitor (TFPI) | Thrombin production and its regulation, angiogenesis |
| Fibrinolytic factors and associated proteins | Plasminogen, PAI-I, u-PA, osteonectin, alpha2-antiplasmin, histidine-rich glycoprotein, TAFI, α 2-macroglobulin | Plasmin production and vascular remodeling |
| Proteases and anti-proteases | Tissue inhibitor of metalloprotease-4 (TIMP-4), metalloprotease-4, platelet inhibitor of FIX, protease nexin-2, C1 inhibitor, α 1-antitripsin | Angiogenesis, vascular modeling, regulation of coagulation, regulation of cellular behavior |
| Growth factors, cytokines, and chemokines | PDGF, TGF β 1 and 2, EGF, IGF-1, VEGF (A and C), bFGF and FGF-2, hepatocyte GF, RANTES, IL-8, MIP-1 α , growth regulated oncogene- α , ENA-78, MCP-3, angiopoietin-1, IL-1 β , IGF BP-3, neutrophil chemotactic protein | Chemotaxis, cell proliferation and differentiation, angiogenesis |
| Basic proteins and others | PF4, β -thromboglobulin, platelet basic protein, connective tissue activating peptide III, neutrophil activating peptide-2, endostatin | Regulation of angiogenesis, vascular modeling, cellular interactions |
| Anti-microbial proteins | Thrombocidins | Bactericidal and fungicidal properties |
| Others | Chondroitin 4-sulfate, albumin, immunoglobulins | Diverse |
| Membrane glycoproteins | α IIb β 3, α 3, GPIb, PECAM-1, most plasma membrane constituents, receptors for primary agonists, CD40L, tissue factor, P-selectin | Platelet aggregation and adhesion, endocytosis of proteins, inflammation, thrombin generation, platelet-leukocyte interactions |

Sumber : *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries* (Rozman, Bolta, 2007)

Trombosit memegang peranan yang sangat penting dalam proses hemostasis. Hemostasis berasal dari kata *haima* yang artinya darah dan *stasis* berarti mempertahankan. Hemostasis dapat didefinisikan sebagai suatu proses biokimia dalam tubuh untuk menghentikan perdarahan dengan mempertahankan komposisi dan fluiditas darah di dalam pembuluh darah, serta mengembalikan struktur semula pembuluh darah bila terjadi kerusakan atau cedera vaskuler. Semua komponen hemostasis seperti pembuluh darah, trombosit, faktor-faktor koagulasi dan sistem fibrinolitik atau inhibitor pada tubuh manusia berada dalam keseimbangan yang sempurna pada kondisi yang sehat atau normal disebut dengan homeostasis. Apabila terjadi luka atau kerusakan pada jaringan vaskuler, maka keseimbangan tersebut menjadi terganggu dan segera terbentuk proses hemostasis. (Everts et al., 2006; SN Wickramasinghe, 2013)

Ada tiga fase yang saling berkaitan dalam mekanisme hemostasis, yaitu fase vaskuler, fase koagulasi dan fase fibrinolitik yang akan memastikan koagulasi terbatas pada lokasi cedera. Secara garis besar tahapan hemostasis sebagai berikut : (Everts et al., 2006; Hoffbrand, Cavill, 2002)

a. Fase Vaskuler

Fase ini disebut juga sebagai tahap hemostasis primer. Komponen yang terlibat dalam fase ini antara lain pembuluh darah dan trombosit.

Fase ini terbagi dalam dua tahapan yaitu :

1. Vasokonstriksi Kapiler

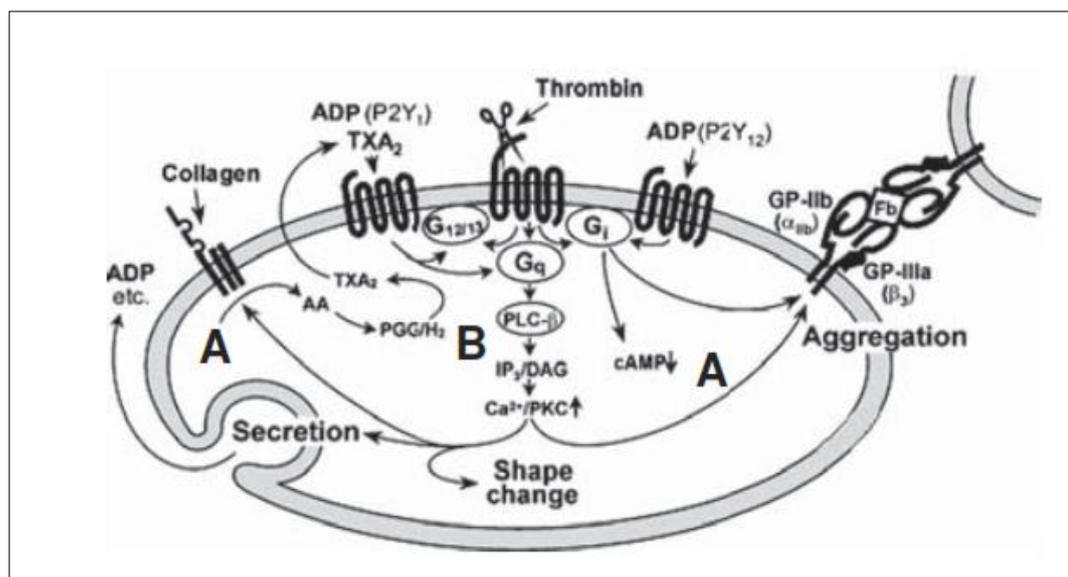
Bila pembuluh darah mengalami cedera, maka respon pertama kali berasal dari kapiler. Vasokonstriksi ini diaktivasi oleh serotonin (5-hydroxytryptamine) dan menyebabkan pengecilan pembuluh darah sehingga terjadi timbunan darah di sekitar kapiler yang mengurangi aliran darah pada daerah luka. Berkurangnya aliran darah ke daerah yang mengalami cedera akan memungkinkan pengaktifan kontak trombosit dan faktor-faktor pembekuan. (Everts et al., 2006)

2. Proses Trombosit

Mekanisme hemostasis pada proses ini dalam ini terbagi dalam tiga fase yaitu;

1. Adhesi trombosit dimediasi oleh molekul fibrinogen atau vWf, yang menghubungkan trombosit dengan menjembatani kompleks glikoprotein IIb/IIIa pada trombosit yang berdekatan dan membentuk agregat trombosit. Setiap platelet mengandung sekitar 50.000 hingga 80.000 molekul glikoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) di permukaannya. Fibrinogen dan vWf diikat dengan cara GP IIb/IIIa mula-mula harus dikonversi dari keadaan afinitas/aviditas rendah ke keadaan afinitas/aviditas tinggi dengan proses yang digambarkan sebagai "*inside out signaling*" yang dimulai selama dan setelah aktivasi trombosit (lihat Gambar 4). Trombosit dapat

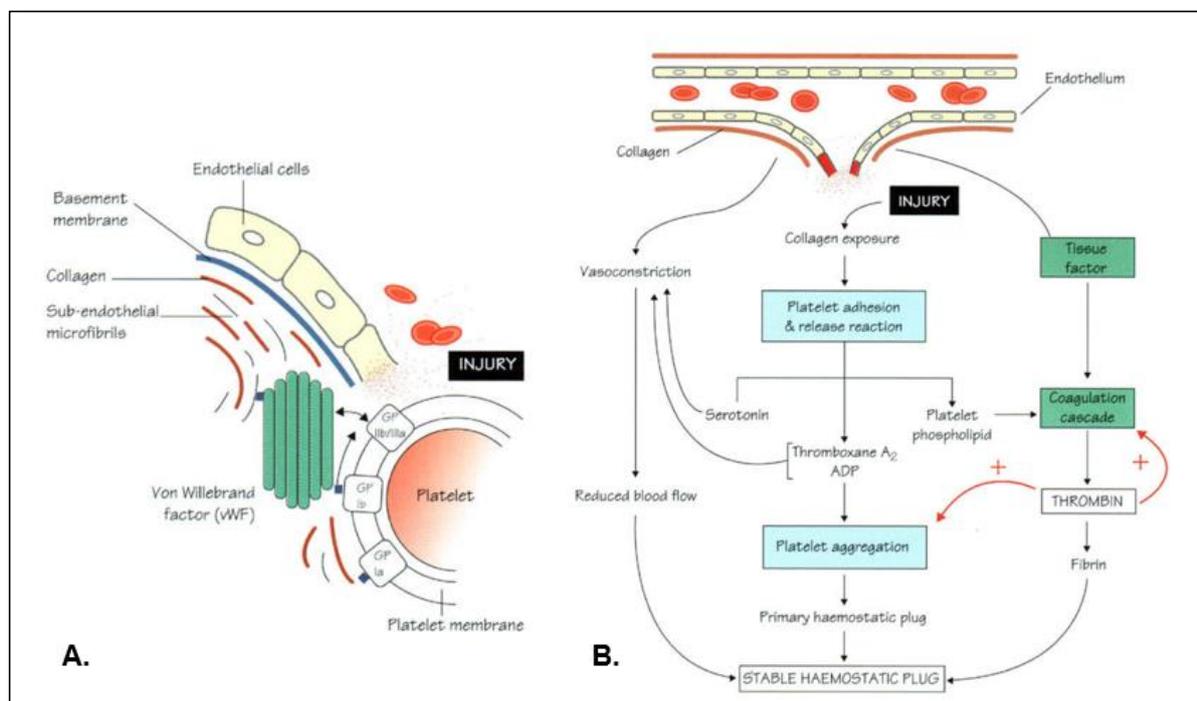
diaktifkan dengan beberapa mekanisme. Trombosit diaktifkan baik oleh adhesi pada molekul yang terpapar pada endotelium yang terluka, seperti vWf, kolagen, fibronektin, dan laminin, atau oleh agonis fisiologis seperti trombin, ADP, kolagen, tromboksan A₂, epinefrin, dan faktor pengaktif trombosit, yang berinteraksi dengan reseptor membran ekstraseluler spesifik, dan yang melalui *G-protein-coupled* atau mekanisme lain menginduksi pensinyalan intraseluler. Beberapa zat yang dilepaskan oleh sel-sel ini khususnya adenosin difosfat, serotonin, tromboxane, dan lainnya, dengan cara otokrin dan parakrine yang semakin meningkatkan aktivasi dan agregasi trombosit. (Rožman & Bolta, 2007; Varga-Szabo, Braun, & Nieswandt, 2009; White, 2007)



Gambar 4. Representasi Skematis Kejadian Intraseluler Selama Aktivasi Trombosit. A: "inside-out" signaling, B: "outside-in" signaling. (Rožman & Bolta, 2007)

2. Agregasi. Fase ini dimulai dengan melekatnya trombosit pada trombosit yang lainnya. Secara *In vivo*, agregasi trombosit sangat bergantung pada ikatan fibrinogen dengan integrin platelet $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb-IIIa). Selama proses agregasi, trombosit akan mengalami perubahan bentuk dari bentuk bulat menjadi cakram disertai dengan pembentukan pseupodi (Gambar 5). (Rožman & Bolta, 2007)
3. Sekresi. Selama aktivasi dan agregasi, trombosit yang saling melekat akan melepaskan isi granulanya dan juga mengaktifkan sintesis prostaglandin sehingga terbentuk tromboxan A₂ (TXA₂). Granula trombosit juga melepaskan kolagen, trombin, adenosin difosfat (ADP), adenosin trifosfat (ATP), serotonin, epinefrin, adrenalin, *anti-heparin platelet factor 4*, fibrinogen, beta tromboglobulin (βTG) serta berbagai *growth factor* yang berikatan dengan membran permukaan trombosit. Bahan agonis yang dilepaskan oleh granula menyebabkan trombosit membengkak dan menggumpal. isi granula trombosit yang disekresikan ke lingkungan luar memainkan peran penting dalam augmentasi dan perbanyakan sumbat hemostatik. Trombosit juga bertindak sebagai permukaan yang kaya fosfolipid untuk perakitan faktor koagulasi berikutnya selama proses pembekuan. Setelah pembentukan serat, trombosit juga berfungsi untuk

berkontraksi dan memperkuat bekuan darah. Masa agregasi trombosit akan melekat pada endotel sehingga terbentuk sumbat trombosit (*platelet plug*) dapat menutup luka pada pembuluh darah. Proses inilah yang akan menginisiasi fase koagulasi terutama faktor-faktor koagulasi. (Mehta and Hoffbrand, 2002; Francis, 2007; Hoffbrand and Moss, 2016)



Gambar 5. A. Adhesi Trombosit; B. Mekanisme Hemostasis (Hoffbrand, Cavill, 2002)

b. Fase Koagulasi

Koagulasi merupakan suatu proses perubahan bentuk darah dari bentuk cair hingga mengental sebagai hasil akhir dari transformasi protein yang larut menjadi tidak larut dan fibrinogen menjadi fibrin.

Proses ini melibatkan sejumlah besar faktor-faktor protein (Tabel 2) yang sebagian besar berupa pro-enzim (zymogen) yang diubah oleh partial proteolisis menjadi bentuk aktif. Hal ini sering disebut *secondary hemostasis*.(Williams, 2009)

Koagulasi merupakan bagian dari hemostasis yang bertanggungjawab terhadap proses pembekuan darah. Produk dari proses ini adalah fibrin yang mengandung gumpalan untuk menghentikan perdarahan dan memperbaiki vaskuler yang rusak. Hemostasis sekunder merupakan proses munculnya protein faktor koagulasi di plasma darah dan memberikan respon pada jalur kompleks untuk membentuk benang fibrin yang memperkuat *platelet plug*. Perubahan kondisi ini kemudian melibatkan adanya peningkatan aktivitas enzim yang pada tahap awal merangsang terjadinya proses pembentukan fibrin. Ion-ion kalsium, *platelet factor 3* dan jaringan tromboplastin memiliki fungsi yang penting dalam proses ini. (White, 2007; Williams, 2009)

Teori yang banyak digunakan untuk menerangkan proses pembekuan darah adalah teori Cascade yang dikemukakan oleh Mac Farlane, David dan Ratnoff. Mekanisme koagulasi dibagi menjadi dua, yaitu sistem intrinsik dan sistem ekstrinsik. Disebut jalur intrinsik, yaitu semua zat yang terikat dengan pembekuan darah berasal dari darah. Sedangkan jalur ekstrinsik menggunakan zat-zat yang bukan berasal dari darah tapi dari jaringan dan pembuluh yakni tromboplastin jaringan (tissue faktor). (Hoffbrand, Cavill, 2002; Williams, 2009)

Tabel 2. Faktor-faktor yang berperan dalam Koagulasi

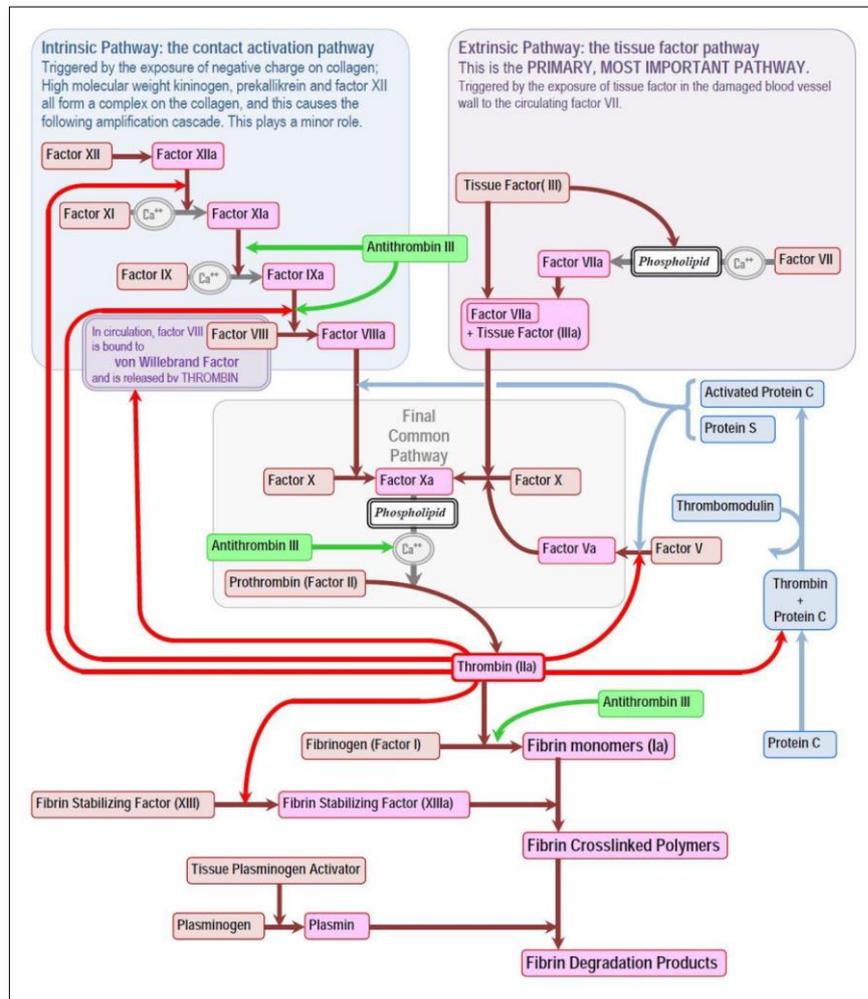
| Nomenclatur>Nama | | Berat Molekul | Fungsi |
|---|---|---------------|--|
| Factor I | Fibrinogen | 340000 | Pembentukan clot (fibrin) |
| Factor II | Prothrombin | 70000 | Benyuk aktifnya (IIa) mengaktivasi Factor I,V,VII,XIII, Protein C, Platelet |
| Factor III | <i>Tissue Thromboplastin</i> | 52000 | Kofaktor dari VIIa |
| Factor IV | <i>Calcium</i> | - | Dibutuhkan untuk faktor koagulasi yang akan berikatan dengan fosfolipid |
| Factor V | <i>Proaccelerin (Labile Factor)</i> | 330000 | Kofaktor X yang membentuk kompleks Prothrombinase |
| Factor VII | <i>Proconvertin (Stable Factor)</i> | 48000 | Serineprotease, mengaktivasi factor IX, X |
| Factor VIII | <i>Antihemophilic Factor A</i> | 270000 | Kofaktor bagi FIX, |
| | <i>Christmas Factor,</i> | | |
| Factor IX | <i>Antihemophilic Factor B</i> | 55000 | Mengaktivasi FX: membentuk kompleks tenase dengan FVIII |
| Factor X | <i>Stuart-Power Factor</i> | 56000 | Mengaktivasi FII, membentuk kompleks prothrombinase dengan FV |
| Factor XI | <i>Plasma Thromboplastin Antecedent (PTA)</i> | 160000 | Mengaktifkan FXII, FIX dan prekallikrein |
| Factor XII | <i>Hageman Factor</i> | 80000 | Mengaktivasi prekallikrein dan Fibrinolisis |
| Factor XIII | <i>Fibrin Stabilizing Factor</i> | 320000 | |
| <i>High Molecular Weight Kininogen (HMWK)</i> | <i>Fitzgerald Factor</i> | 160000 | Crosslink Fibrin |
| Prekallikrein | <i>Fletcher Factor</i> | 85000 | Mendukung aktivasi XII, XI dan prekallikrein |
| Von Willebrand Factor | | | Aktivasi XII dan prekallikrein; memotong HMWK |
| Fibronectin | | | Mengikat ke VIII, memediasi perlekatan platelet |
| Antithrombin III | | | Memperantarai perlekatan sel |
| Heparin cofactor II | | | Menghambat IIa, Xa dan protease |
| Protein C | | | Menghambat IIa, cofactor heparin dan dermatan sulfat (minor antithrombin) |
| Protein S | | | Inaktivasi Va dan VIIIa |
| Protein Z | | | Cofactor protein C yang aktif |
| <i>Protein Z-related</i> | | | Memediasi perlekatan thrombin ke fosfolipid dan menstimulasi degradasi faktor X oleh ZPI |
| <i>Protease Inhibitor (ZPI)</i> | | | Mendegradasi faktor X dan XI |
| Plasminogen | | | Menjadi plasmin, memotong fibrin dan protein lainnya |
| Alpha 2 antiplasmin | | | Menghambat Plasmin |
| <i>Tissue Plasminogen Activator (tPA)</i> | | | Mengaktivasi Plasminogen |
| Urokinase | | | Inaktivasi tPA dan Urokinase |
| <i>Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1)</i> | | | (endothelial PAI) |
| <i>Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI2)</i> | | | Inaktivasi tPA dan Urokinase (Placental PAI) |
| <i>Cancer Procoagulant</i> | | | Pathological factor X activator berhubungan dengan thrombosis kanker |

Sumber : *Pathophysiology of coagulation* (Hoffbrand, Cavill, 2002; Williams, 2009)

Reaksi awal pada sistem intrinsik adalah konversi faktor XII inaktif menjadi faktor XII aktif (XIIa). Aktivasi ini dikatalisis oleh kininogen HMW dan kalikrein. Faktor XII aktif kemudian mengaktifkan faktor XI, dan faktor XI aktif mengaktifkan faktor IX. Faktor IX yang aktif membentuk suatu kompleks dengan faktor VIII aktif. Kompleks IXa dan VIIIa mengaktifkan faktor X. Fosfolipid dari trombosit dan Ca^{2+} diperlukan untuk mengaktifkan faktor X secara sempurna. (White, 2007; Williams, 2009)

Sistem ekstrinsik dipicu oleh pelepasan faktor III (tromboplastin) dari jaringan yang mengaktifkan faktor VII. Faktor III dan faktor VIIa mengaktifkan faktor IX dan X. Dengan adanya fosfolipid, Ca^{2+} , dan faktor V, maka faktor X akan mengkatalisis konversi protrombin menjadi trombin. Selanjutnya trombin mengkatalisis konversi fibrinogen menjadi fibrin (Gambar 6). (White, 2007; Williams, 2009)

Pada lintasan terakhir yang sama, faktor Xa yang dihasilkan oleh lintasan intrinsik dan ekstrinsik, akan mengaktifkan protrombin(II) menjadi thrombin (IIa) yang kemudian mengubah fibrinogen menjadi fibrin. Pengaktifan protrombin terjadi pada permukaan trombosit aktif dan memerlukan perakitan kompleks protrombinase yang terdiri atas fosfolipid anionic platelet, Ca^{2+} , faktor Va, faktor Xa dan protrombin. (Hoffbrand, Cavill, 2002; Williams, 2009)



Gambar 6. Skema Kaskade Koagulasi (White, 2007)

Fungsi Non Hemostasis trombosit adalah membantu proses penyembuhan luka. Trombosit dalam membantu proses penyembuhan luka tidak terlepas dari *growth factor* pada trombosit yang mempengaruhi kemotaksis, diferensiasi, proliferasi, dan aktivitas sintesis sel sehingga mengatur remodeling fisiologis dan penyembuhan. Semakin banyak *growth factor* 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 *remodeling*) (Costache, 2018; Everts et al., 2006)

Peran trombosit dalam proses penyembuhan luka sangat berkaitan dengan tipe lesi yang pada akhirnya menentukan derajat penyembuhannya. Abrasi kulit parsial sembuh hampir seluruhnya dengan epitelisasi sedangkan ulkus kronik yang dalam bergantung pada sintesis matriks, angiogenesis, fibroplasia, dan kontraksi luka. Pada luka alami atau luka insisi akibat prosedur bedah, penyembuhan dimulai dengan pembentukan bekuan trombosit, aktivasi kaskade koagulasi dan degranulasi trombosit yang melepaskan banyak *growth factors*. Dalam dua hari masa penyembuhan luka, proses inflamasi dimulai dengan migrasi neutrofil dan makrofag ke area luka. Selanjutnya makrofag yang teraktivasi juga menghasilkan *growth factors* termasuk TGF β , PDGF, interleukin-1 (IL-1) dan *fibroblast growth factor* (FGF) (Everts et al., 2006).

Angiogenesis dan fibroplasia dimulai segera setelah hari ketiga, diikuti oleh sintesis kolagen pada hari ke 3-5. Proses ini menyebabkan peningkatan densitas dan kekuatan luka (yang kemudian menjadi salah

satu parameter penyembuhan luka pada luka-luka insisi bedah), dan kemudian diikuti oleh epitelisasi dan proses remodelling. Proses yang kompleks dalam proses penyembuhan luka ini sangat dipengaruhi oleh growth factors yang dilepaskan oleh trombosit teraktivasi dan salah satu growth factor yang berperan penting adalah TGF β (*Transforming Growth Factor Beta*) (Everts et al., 2006)

B. *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β)

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) adalah sitokin multifungsi prototipikal yang diisolasi dari trombosit dan telah diketahui karakteristiknya dari beberapa puluh tahun yang lalu. Nama ini berasal dari pengamatan bahwa TGF- β memiliki kemampuan menstimulasi sel-sel normal untuk tumbuh dalam media agar yang seolah-olah sel-sel tersebut telah diubah secara sengaja. Pada mamalia sitokin memiliki tiga isoform, TGF- β 1, TGF- β 2, dan TGF- β 3, yang sifat biologisnya identik. (Lifshitz & Frenkel, 2013). *Transforming Growth Factor Beta* dapat meningkatkan produksi trombopoietin oleh sel-sel stroma sumsum tulang. Thrombopoietin pada gilirannya akan menginduksi ekspresi megakaryocyte dari reseptor TGF- β , yang memungkinkan TGF- β untuk ikut serta dalam pematangan *colony-forming unit* megakaryocyte. *Transforming Growth Factor Beta* juga menginduksi sintesis protein matriks ekstraseluler, PAI-1, dan metalloproteinases. *Transforming Growth Factor Beta* ini telah terlibat dalam penyembuhan luka, keganasan, dan fibrosis jaringan. Selain itu, TGF- β dilaporkan dapat meningkatkan

agregasi trombosit melalui efek nontranskripsi. Migrasi sel endotel dihambat oleh TGF- β , tetapi bertindak sebagai chemoattractant untuk monosit dan fibroblas. *Transforming Growth Factor Beta* memiliki distribusi jaringan yang luas, tetapi pada trombosit hanya mengandung TGF- β 1. *Transforming Growth Factor Beta* yang dilepaskan dari trombosit dapat menstimulasi sel-sel otot polos untuk mengekspresikan dan melepaskan VEGF, sehingga memungkinkan TGF- β 1 mendukung reendotelisasi setelah cedera pembuluh darah. Gen TGF- β 1 memiliki kemampuan untuk berperan dalam mekanisme cedera jaringan, dan TGF- β 1 adalah isoform yang paling terlibat dalam fibrosis. (Roberts & Sporn, 1993, Gordon & Blobel, 2008; Poniatowski, Wojdasiewicz, Gasik, & Szukiewicz, 2015)

Transforming Growth Factor Beta disintesis sebagai molekul prekursor 391-asam-amino, secara proteolitik dipecah untuk menghasilkan fragmen peptida dan subunit 112-asam amino. *Transforming Growth Factor Beta* aktif adalah protein dimerik 25-kd yang terdiri dari dua subunit yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. *Transforming Growth Factor Beta* disekresikan dalam bentuk tidak aktif (laten) yang memerlukan aktivasi sebelum dapat memberikan efek biologis. Bentuk laten TGF- β 1 adalah kompleks dengan berat molekul tinggi di mana TGF- β 1 terikat secara non-kovalen ke peptida dimerik lain, peptida terkait-latensi yang terbentuk dari fragmen pembelahan dari prekursor TGF- β 1. *Transforming Growth Factor Beta* laten disimpan di permukaan sel dan dalam matriks ekstraseluler dan

dikonversi menjadi TGF- β 1 aktif. (Roberts & Sporn, 1993; Wayne A.Border, 2012)

Transforming Growth Factor Beta berikatan dengan tiga protein membran, disebut sebagai reseptor tipe I, II, dan III, yang ada pada hampir semua sel. Reseptor tipe I dan tipe II adalah transmembran serin-treonin kinase yang berinteraksi satu sama lain dan memfasilitasi pensinyalan satu sama lain. Reseptor tipe III, juga disebut betaglycan, adalah *membrane-anchored proteoglycan* yang tidak memiliki struktur pensinyalan tetapi bertindak untuk menghadirkan TGF- β ke reseptor lain. Efek TGF- β pada sintesis dan deposisi matriks ekstraseluler dimediasi oleh reseptor tipe I. Efek pada pertumbuhan dan proliferasi sel dimediasi oleh reseptor tipe II. Regulasi sekresi dan tindakan TGF- β 1 melibatkan peristiwa pasca-transkripsi yang kompleks, termasuk stabilisasi messenger RNA (mRNA), perakitan dan aktivasi kompleks TGF- β 1 laten, dan modulasi ekspresi reseptor. (Wayne A.Border, 2012)

Sitokin lain yang terlibat dengan TGF- β 1 dalam remodeling jaringan setelah cedera adalah *platelet-derived growth factor*, *basic fibroblast growth factor*, *tumor necrosis factor*, dan interleukin-1. Setiap sitokin memiliki peran sinergis yang khas dalam perbaikan jaringan. Efek dominan dari PDGF adalah untuk merangsang proliferasi dan migrasi sel; *Basic Fibroblast Growth Factor* menginduksi pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis); dan *Tumor Necrosis Factor* dan interleukin-1 meningkatkan peradangan, migrasi sel, dan proliferasi. *Transforming*

Growth Factor Beta memiliki peran yang unik dalam mekanisme penyembuhan luka yakni meningkatkan pengendapan matriks ekstraseluler. *Transforming Growth Factor Beta* juga bertindak sebagai regulator yang kuat untuk memperbaiki, mengoordinasikan atau menekan aktivitas sitokin lain. (Lifshitz & Frenkel, 2013; Wayne A.Border, 2012)

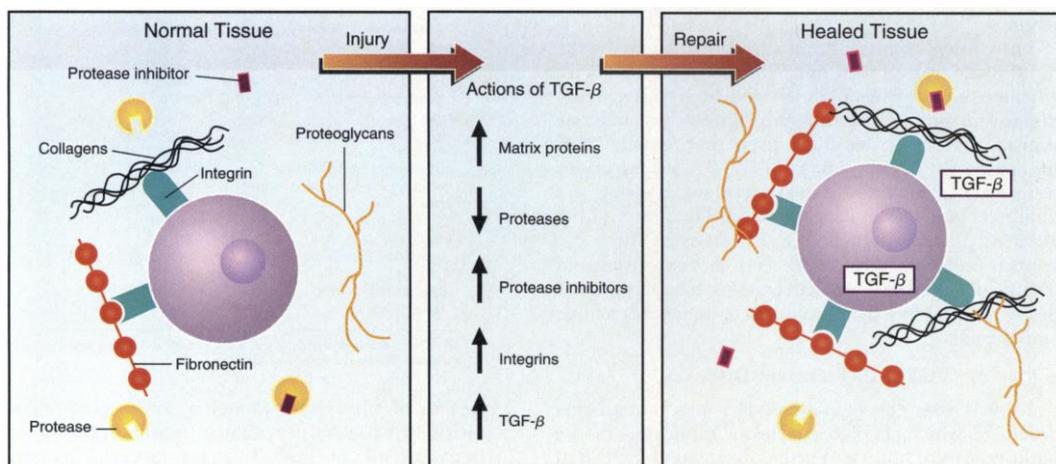
Paradigma untuk perbaikan jaringan secara umum, adalah suatu urutan kejadian biologis yang dimulai dengan hemostasis yang diinduksi trombosit, diikuti oleh masuknya sel-sel inflamasi dan fibroblast, pembentukan matriks ekstraseluler baru dan pembuluh darah (granulasi jaringan), dan proliferasi sel untuk menyusun kembali jaringan. *Transforming Growth Factor Beta* memainkan bagian penting dalam setiap peristiwa ini, yang sebagian besar TGF- β dapat direproduksi dalam jaringan normal. Trombosit mengandung konsentrasi tinggi TGF- β dan PDGF yang dilepaskan ke jaringan di lokasi cedera. *Transforming Growth Factor Beta* tidak aktif (laten), terikat secara lokal ke matriks ekstraseluler, juga dapat diaktifkan setelah cedera. *Transforming Growth Factor Beta* dalam konsentrasi femtomolar sangat kemotaksis untuk neutrofil, sel T, monosit, dan fibroblast. Sel-sel ini dapat diaktifkan karena mereka menghadapi konsentrasi TGF- β 1 yang lebih tinggi. Monosit mulai mensekresi *Basic Fibroblast Growth Factor*, *Tumor Necrosis Factor*, dan interleukin-1 serta fibroblast meningkatkan sintesis protein matriks ekstraseluler. *Transforming Growth Factor Beta* juga menginduksi baik sel infiltrasi dan sel resident untuk memperbanyak diri. Autoinduksi ini

memperkuat efek biologis TGF- β 1 di lokasi cedera dan mungkin memiliki peran sentral dalam fibrosis kronis. (Gordon & Blobe, 2008; Poniatowski et al., 2015; Wayne A.Border, 2012)

Transforming Growth Factor Beta pada konsentrasi fisiologis, mengatur *platelet-derived growth factor*, trombosit (dalam sel otot polos dan fibroblast), *basic fibroblast growth factor* (dalam sel endotel), dan *tumor necrosis factor*, dan interleukin-1 (dalam monosit) dengan merangsang atau menghambat produksi mereka atau memodulasi tindakan mereka untuk menyinkronkan dan mengontrol proses perbaikan. TGF- β 1 juga menghambat fungsi sel T dan sel B dan produksi *tumor necrosis factor* dan interleukin-1. (Wayne A.Border, 2012)

Transforming Growth Factor Beta juga memodulasi sitotoksitas makrofag dengan menekan produksi superoksida dan nitrat oksida. *Transforming Growth Factor Beta* dapat berfungsi baik sebagai agonis atau antagonis proliferasi dan peradangan sel, TGF- β 1 bekerja secara konsisten pada sel untuk menginduksi deposisi matriks ekstraseluler. Akumulasi matriks dalam jaringan adalah ciri patologis utama penyakit fibrotik. Matriks ekstraseluler adalah superstruktur dinamis makromolekul agregat mandiri, termasuk fibronektin, kolagen, dan proteoglikan, tempat sel menempel melalui reseptor permukaan yang disebut integrins. Matriks yang mengelilingi sel terus terdegradasi oleh protease. Gambar 7 mengilustrasikan bagaimana TGF- β 1 menyebabkan pengendapan matriks ekstraseluler dengan secara simultan merangsang sel untuk

meningkatkan beberapa kali lipat sintesis sebagian besar protein matriks, mengurangi produksi protease pengurai matriks, meningkatkan produksi inhibitor dari protease ini, dan memodulasi ekspresi dari integrin dengan cara yang meningkatkan adhesi seluler ke matriks. Efek komprehensif ini pada matriks ekstraseluler mencerminkan sifat biologis yang beragam dari TGF- β 1 dan juga dapat menjadi bagian dari umpan balik negatif yang biasanya mengatur ekspresi TGF- β 2. *Transforming Growth Factor Beta* berikatan dengan proteoglikan dalam matriks atau di permukaan sel, dan pengikatan tersebut dapat bertindak sebagai sinyal untuk menghentikan produksi TGF- β setelah perbaikan jaringan selesai. (Gordon & Blobel, 2008; Wayne A. Border, 2012)



Gambar 7. Mekanisme TGF β dalam Penyembuhan Luka (Border & Noble, 1994)

Fibrosis merupakan pembentukan jaringan ikat fibrosa yang berlebihan pada organ atau jaringan akibat proses fisiologis perbaikan jaringan. Produksi TGF- β 1 yang berlebihan atau berkelanjutan adalah

mediator molekuler utama dari fibrosis jaringan. Aplikasi topikal TGF- β mempercepat penyembuhan luka. Namun, potensi fibrogenik TGF- β terungkap dengan suntikan berulang dosis yang lebih tinggi. Dua minggu suntikan TGF- β 1 intravena menghasilkan efek sistemik yang serius pada tikus, termasuk fibrosis yang nyata pada ginjal dan hati dan di tempat injeksi. Cachexia parah dan fibrosis jaringan umum berkembang pada tikus yang diberi TGF- β 1 secara intraperitoneal selama 10 hari. (Everts et al., 2006; Wayne A.Border, 2012)

C. Platelet Rich Plasma

Trombosit memiliki sekitar 60 zat aktif biologis yang terlibat dalam mekanisme perbaikan jaringan seperti kemotaksis, proliferasi sel dan diferensiasi, angiogenesis, deposisi matriks intraseluler, modulasi imun, aktivitas antimikroba, dan remodeling. Zat aktif tersebut adalah berbagai macam *growth factor* (GF) yang paling penting dalam mekanisme perbaikan jaringan (lihat Tabel 2). *Growth factor* terkandung dalam alpha-granules dan badan granular lainnya dan dilepaskan pada sel tersebut teraktivasi. *Growth factor* menunjukkan kemampuan pembentukan jaringan yang luas, seperti inisiasi dan modulasi penyembuhan luka di kedua jaringan lunak dan keras. Beberapa dari banyak *Growth factor* yang dilepaskan oleh trombosit setelah aktivasi yang diidentifikasi sejauh ini adalah PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), TGF- α & β (*Transforming Growth Factor Alpha & Beta*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), IGF

(*Insulin Growth Factor*), PDEGF (*Platelet-Derived Epidermal Growth Factor*), IL-8 (*Interleukin-8*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*), CTGR (*Connective Tissue Growth Factor*), dan GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*). (Rožman & Bolta, 2007)

Platelet-Rich Plasma digunakan sebagai sumber *growth factor* trombosit. Trombosit dalam PRP diaktifkan dengan penambahan trombin dan kalsium, yang mempromosikan aktivasi trombosit dan kaskade koagulasi secara loop positif dan akhirnya menghasilkan pembentukan zat gelatin seperti trombus (gel trombosit). Trombosit yang diaktifkan terperangkap di jaringan fibrin, dan trombosit akan terus mengeluarkan isinya, sedangkan zat bioaktif juga perlahan akan dilepaskan. (Borghese et al., 2016; Rožman & Bolta, 2007)

Platelet-Rich Plasma autologous mulai dikembangkan pada awal 1970-an sebagai produk sampingan dari apheresis. Meskipun berbagai GF trombosit telah ditemukan pada saat itu, penggunaan klinis PRP teraktivasi (gel trombosit), jarang dilaporkan pada 1980-an. *Platelet-Rich Plasma* mulai populer setelah presentasi hasil penelitian oleh Whitman et al. pada tahun 1997. Peneliti ini menyampaikan bahwa, melalui aktivasi trombosit dalam gel dan pelepasan GF yang dihasilkan, penyembuhan luka lebih cepat sesuai dengan yang diharapkan.

Tabel 3. Growth Factors pada Trombosit dan Fungsi Biologisnya

| Growth factor | Wound-healing and tissue-forming ability |
|---|--|
| EGF (epidermal growth factor), β-Urogastron | <ul style="list-style-type: none"> Stimulates the proliferation of epidermal and epithelial cells, fibroblasts, and embryonic cells Chemoattractant for fibroblasts and epithelial cells Stimulates re-epithelialization, augments angiogenesis Influences the synthesis and turn-over of extracellular matrix |
| PDGF (platelet-derived growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> A and B isoforms are potent mitogens for fibroblasts, arterial smooth muscle cells, chondrocytes, and epithelial and endothelial cells Potent chemoattractant for hematopoietic and mesenchymal cells, fibroblasts, and muscle cells, stimulates chemotaxis toward a gradient of PDGF Activates TGF-β, stimulates neutrophils and macrophages, mitogenesis of fibroblasts and smooth muscle cells, collagen synthesis, collagenase activity, and angiogenesis |
| TGF-α (transforming growth factor alpha) | <ul style="list-style-type: none"> Resembles EGF, binds to the same receptor Stimulates mesenchymal, epithelial, and endothelial cell growth, endothelial chemotaxis, controls the epidermal development Stimulates the proliferation of endothelial cells, more potent than EGF Promotes the generation of osteoblasts, influencing them to lay down bone matrix during osteogenesis Affects bone formation and remodeling by inhibition of the synthesis of collagen and release of calcium |
| TGF-β1 (transforming growth factor beta) | <ul style="list-style-type: none"> Stimulates fibroblast chemotaxis and proliferation and stimulates collagen synthesis Decreases dermal scarring Growth inhibitor for epithelial and endothelial cells, fibroblasts, neuronal cells, hematopoietic cell types, and keratinocytes Antagonizes the biological activities of EGF, PDGF, aFGF and bFG |
| KGF or FGF-7 (keratinocyte growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> Most potent GF for skin keratinocytes, playing a role in tissue repair following skin injuries Promotes wound healing via proliferation, differentiation, angiogenesis, and cell migration Mitogen for many epithelial cells but not for fibroblasts and endothelial cells |
| aFGF or FGF-1 (fibroblast growth factor; acidic) | <ul style="list-style-type: none"> Participates in proliferation, differentiation, angiogenesis, and cell migration A mitogen for skin-derived keratinocytes, dermal fibroblasts, and vascular endothelial cells |
| bFGF or FGF-2 (fibroblast growth factor; basic) | <ul style="list-style-type: none"> Stimulates the growth of fibroblasts, myoblasts, osteoblasts, neuronal cells, endothelial cells, keratinocytes, and chondrocytes Stimulates angiogenesis, endothelial cell proliferation, collagen synthesis, wound contraction, matrix synthesis, epithelialization, and KGF production |
| VEGF/ VEP (vascular endothelial growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> Stimulates the proliferation of macrovascular endothelial cells. A strong angiogenic protein, induces neovascularisation Induces the synthesis of metalloproteinase, which degrades interstitial collagen type 1, 2, and 3 |
| CTGF (connective tissue growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> Induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells and angiogenesis A potent stimulator for the proliferation and differentiation of osteoblasts, stimulates the matrix mineralization |
| GM-CSF or CSF α (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) | <ul style="list-style-type: none"> Stimulates proliferation and differentiation of osteoblasts. Synergizes with Epo in the proliferation of BM progenitor cells. Strong chemoattractant for neutrophils |
| IGF (insulin-like growth factor) | <ul style="list-style-type: none"> Growth factor for normal fibroblasts, mitogenic in vitro for a number of mesodermal cell types Promotes the synthesis of collagenase and prostaglandin E2 in fibroblasts Stimulates collagen and matrix synthesis by bone cells, regulating the metabolism of joint cartilage |
| TNFα (tumor necrosis factor alpha) | <ul style="list-style-type: none"> Growth factor for fibroblasts Promotes angiogenesis |
| IL-1β (interleukin 1 β) | <ul style="list-style-type: none"> Inhibits the growth of endothelial cells and hepatocytes Activates osteoclasts, suppresses the formation of new bone. In low concentrations, however, promotes new bone growth Enhances inflammatory reactions and collagenase activity |
| IL-8 (interleukin 8) | <ul style="list-style-type: none"> Supports angiogenesis Mitogenic for epidermal cells |

(Sumber: *Use of Platelet Growth Factors In Treating Wounds and Soft-Tissue Injuries*. Rozman and Bolta, 2007)

Platelet-Rich Plasma semakin populer setelah tahun 1998 dan sekarang diterima secara luas bahwa strategi yang tepat untuk mempromosikan kaskade penyembuhan adalah dengan menggunakan PRP yang berisi *growth factor*, dan untuk penggunaan secara langsung (yaitu, secara topikal) pada tindakan bedah, luka, atau cedera maka dilakukan pemberian PRP dalam perawatan lukanya. Beberapa perusahaan merekomendasikan pemakaian PRP, yang kemudian diaktifkan dengan trombin autologous untuk mendegradasi trombositis. Namun, peralatan dan protokol menunjukkan hasil yang berbeda untuk pengumpulan trombositis PRP, yang diperkuat oleh variabilitas jumlah trombositis antar-individu dalam produk PRP (Tabel 4).

Kadar terapeutik dari jumlah aktual trombositis dalam PRP menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Marx dkk pada tahun 1998 mengaplikasikan PRP yang dikombinasi dengan cangkok tulang pada pasien defek mandibula menunjukkan perbaikan yang signifikan, meskipun PRP yang digunakan hanya mengandung jumlah trombositis di bawah 800.000 sel/ μ L atau 3-4 kali dari jumlah trombositis awal. Studi Weibrich dkk menunjukkan bahwa manfaat PRP dapat dilihat bila kadar trombositis sekitar 1.000.000 sel/ μ L. Studi Haynesworth dkk menunjukkan adanya respon selular *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) yang signifikan pada pertumbuhan tulang dengan jumlah trombositis dalam PRP 4-5 kali dari jumlah trombositis awal. Peningkatan jumlah trombositis yang sama

yakni 4-5 kali juga menunjukkan respon yang baik pada produksi kolagen dan proliferasi fibroblast.

Tabel 4. Pemanfaatan PRP dalam Dunia Kedokteran

| | |
|--|--|
| <p>Neurosurgery Pituitary tumor removal Skull base tumor resection Intradural procedures involving tumor or release of tethered cords Dural tumors Acoustic neuroma excisions (dura tears during laminectomy)</p> | <p>Augmentation & reduction mammoplasty Reconstructions Urology Radical retro-pubic prostatectomy, & retroperitoneal lymph node dissections</p> |
| <p>Oral and Maxillofacial Surgery Mandibular reconstruction Alveolar cleft repair Oral-nasal fistulas</p> | <p>Periodontal Surgery Dental implants Guided Bone Regeneration</p> |
| <p>Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery Radical neck dissections Pectoralis major myocutaneous flaps Facial fractures Reconstructions</p> | <p>Orthopedic/Spinal Surgery Total Hip Replacement Total Knee Replacement Scoliosis Repair Spinal Fusion All Open and Internal Reduction Fixation Operations Hand and Foot Surgery Bone Graft Surgery</p> |
| <p>Cosmetic Surgery Full and split-thickness skin grafts donor sites and recipient sites Skin flaps Bone grafts Metal implants Tissue expansion Aesthetic Surgery (Face Lifts, liposuction, etc)</p> | <p>Cardiothoracic Surgery Sternotomy Graft Conduit Sites Esophagogastrrectomy</p> |
| | <p>General Surgery Recurrent Hernia Repair Anal Fistula Bariatric Surgery</p> |

Sumber : Platelete Rich Plasma; Properties and Clinical Aplications (Smith RG, Gassmann CJ, 2007)

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

Pengobatan dengan PRP autologus umumnya dianggap aman pada pasien yang sudah memenuhi syarat dapat melakukan tindakan dengan PRP. Yang dapat melakukan pengobatan dengan PRP harus menjalani evaluasi hematologi terlebih dahulu sebelum dilakukannya pengobatan untuk menyingkirkan potensi koagulopati dan gangguan fungsi trombosit

Sejauh ini belum didapatkan studi yang melaporkan bahwa PRP menyebabkan efek samping hiperplasia, karsinogenesis, atau pertumbuhan tumor. *Growth factor* bertindak atas membran sel bukan dari mengaktifkan ekspresi gen normal. Kontraindikasi dari terapi ini adalah kelainan fungsi trombosit, trombositopenia, pasien dengan ketidakstabilan hemodinamik serta kehamilan. Pasien terlebih dahulu diberikan pengertian tentang kemungkinan gejala sementara setelah dilakukannya injeksi. Efek samping yang jarang dapat terjadi akibat injeksi seperti kemungkinan infeksi dan cedera neurovaskular. PRP ini bebas dari risiko penularan infeksi seperti Hepatitis B, Hepatitis C atau HIV. Pasien dengan kanker aktif, riwayat kanker, atau suspek penyakit onkologi harus konsultasi dengan dokter onkologi untuk menjalani terapi PRP. (Lee & Falowski, 2018)

Metode dasar pembuatan PRP dimulai dengan pengambilan plasma adalah pengambilan atau ekstraksi darah ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan. Darah lalu disentrifugasi dengan kecepatan tertentu untuk memisahkan plasma dari sel-sel darah merah berdasarkan

gradien kepadatannya. Belum ada standarisasi proses pembuatan PRP untuk memperoleh jumlah trombosit serta jumlah *growth factor* 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; Costache, 2018; Lee & Falowski, 2018)

- a. 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 *Platelet Poor Plasma* (PPP).
- b. Suhu selama proses pembuatan PRP sangat penting untuk mencegah aktivasi platelet. *American Association of Blood Bank* (AABB) merekomendasikan suhu 21-24°C saat sentrifugasi darah. Studi oleh Amabel dkk 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 selama 16 menit, temperatur memberikan efek positif pada suhu 12-18°C dan meningkatkan rasio peningkatan jumlah trombosit pada sentrifugasi pertama, dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara pengaruh suhu 12 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).

- c. Penggunaan antikoagulan merupakan faktor yang sangat penting dalam menjaga fungsi, integritas, dan morfologi trombosit sehingga mencegah aktivasi dan degranulasi platelet sebelum penggunaannya. Antikoagulan yang digunakan adalah sitrat dekstrosa formula A (ADC-A) yang merupakan gold standart. ACD-A bekerja dengan mengikat kalsium dan mencegah protein koagulasi untuk memulai kaskade koagulasi. Antikoagulan EDTA tidak rekomendasikan karena dapat merusak membran platelet sehingga faktor pertumbuhan keluar lebih dini. Beberapa peneliti berpendapat bahwa penggunaan antikoagulan *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA) dapat merusak membran trombosit, dan merekomendasikan penggunaan *Acid Citrate Dextrose* (ACD). Namun studi Araki dkk tahun 2012 menunjukkan bahwa

peningkatan trombosit dan kadar PDGF pada penggunaan antikoagulan EDTA menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan antikoagulan ACD

- 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 *Whole Blood* jika diposisikan berdiri akan terpisah menjadi plasma, sel darah putih dan sel darah merah 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

Pembuatan PRP dapat menggunakan dua metode yaitu metode PRP dan metode *buffy-coat*. Pada metode PRP, sentrifugasi pertama untuk memisahkan sel darah merah yang diikuti dengan sentrifugasi kedua untuk memadatkan trombosit yang disimpan dalam volume plasma akhir yang kecil. Pada metode *buffy-coat*, darah disentrugasi dengan kecepatan tinggi untuk menghasilkan *buffy-coat*, yang mengandung banyak leukosit dan kemudian disentrifugasi kembali untuk memisahkan sel darah putih dengan sel darah merah sebagai produk akhir. Dari

volume *whole blood* mL, 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.

Prosedur pada metode PRP

Ambil darah vena dan simpan dalam tabung 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 (*platelet poor plasma*) 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.

Prosedur pada metode Buffy Coat

Darah harus disimpan pada suhu 20°-24° sebelum sentrifugasi;

1. Lakukan sentrifugasi dalam kecepatan tinggi;

2. 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;
3. Hilangkan plasma *supernatant* dari bagian atas tabung;
4. Pindahkan lapisan tengah (*buffy coat*) ke tabung steril yang lain;
5. Lakukan sentrifugasi pada tabung berisi *buffy coat* tersebut dengan kecepatan rendah untuk memisahkan sel darah putih atau gunakan filter pemisah leukosit.

D. Aktivasi trombosit pada PRP

Istilah "aktivasi" mengacu pada 2 proses utama yang digunakan selama persiapan PRP: (1) degranulasi trombosit untuk melepaskan *growth factor* dari granula alfa dan (2) pembelahan fibrinogen untuk memulai pembentukan matriks, suatu proses pembekuan yang memungkinkan pembentukan gel trombosit, dan untuk membatasi sekresi molekul ke situs yang dipilih. Aktivasi merupakan langkah awal sebelum pemanfaatan produk PRP yang dilakukan dengan menambahkan trombin dan / atau kalsium klorida (CaCl_2), tetapi beberapa klinisi lebih suka menyuntikkan PRP dalam bentuk belum teraktivasi. *Platelet-Rich Plasma* dalam bentuk belum teraktivasi diberikan dengan pertimbangan bahwa trombosit secara spontan akan mengalami aktivasi setelah terpapar dengan kolagen asli. Saat ini masih kurang bukti data penelitian tentang pemanfaatan PRP yang paling cocok, produk PRP yang sudah diaktivasi atau yang belum teraktivasi. Strategi pemilihan produk PRP dalam

pengobatan didasarkan pada berbagai indikasi klinis (Cavallo et al., 2016). Aktivasi dengan dosis tinggi trombin telah dilaporkan menginduksi pelepasan segera *growth factor* dari trombosit, sedangkan dengan dosis rendah kalsium dan trombin mengurangi pelepasan *growth factor* segera (Roh, Kim, Park, & Oh, 2016)

Growth factor yang ada pada trombosit akan disekresikan sebanyak lebih dari 95% dalam 1 jam, dan mengalami proses degranulasi dalam trombosit dan sekresi *growth factor* hingga 3-5 hari. Setelah aktivasi dengan trombin dan ion kalsium; faktor pertumbuhan tetap aktif selama 7-10 hari. *Growth factor* PRP tidak pernah merusak sel atau nukleusnya, mereka tidak bersifat mutagenik, dan tidak memiliki kemampuan untuk menginduksi pembentukan tumor (Lubkowska et al., 2012)

Trombin adalah protease serin yang berasal dari protrombin yang mengkatalisis konversi fibrinogen menjadi fibrin, 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). Sekitar 70% pelepasan *growth factor* terjadi dalam 10 menit aktivasi dan hampir 100% pelepasan terjadi dalam satu jam, sedangkan Han et al melaporkan bahwa aktivasi dengan trombin eksogen sebenarnya memiliki efek penghambatan pada osteokonduktivitas matriks tulang demineralisasi. Efek samping potensial

dari trombin sapi eksogen termasuk perdarahan, trombosis, dan peningkatan kadar antibodi terhadap protein koagulasi manusia yang mengarah pada reaksi imun (Han B, Woodell-May J, Ponticiello M, Yang Z, 2009).

Kadar *growth factor in-vivo* tetap terjaga setelah dilakukan pembuatan PRP. Konsentrasi trombosit dalam PRP dapat meningkat delapan kali dari kadar trombosit di dalam darah sehingga kadar faktor pertumbuhan di dalam PRP juga meningkat delapan kali dan selama proses pengambilan atau pembuatannya tidak terjadi aktivasi dari trombosit. (Everts et al., 2006)

Granula alfa pada trombosit inaktif dalam PRP mengandung *growth factor* yang juga belum berfungsi karena belum dilepaskan atau kontak langsung dengan jaringan. Untuk menginisiasi pelepasan *growth factor* ini, trombosit harus diaktivasi. Trombosit yang telah dipisahkan dari komponen darah lainnya membutuhkan pemicu untuk mengaktifkan dalam penyembuhan luka dan hemostasis. Aktivasi ini dapat dilakukan dengan bantuan trombin. Trombosit kemudian berubah menjadi berbagai bentuk dan menyebar di jaringan luka. Ketika trombosit dalam PRP diaktifkan oleh trombin, trombosit melepaskan faktor pertumbuhan 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 (Bertrand-Duchesne, Grenier, & Gagnon, 2010; Everts et al., 2006)

Beberapa ahli bedah sebelumnya menggunakan trombin sapi untuk mengaktifkan trombosit, tetapi para ahli bedah berhenti menggunakan trombin sapi karena dicurigai menyebabkan penyakit stroke. Bovine trombin juga menyebabkan terbentuknya antibodi terhadap faktor pembekuan V,XI dan trombin sehingga dapat menyebabkan koagulopati yang mengancam nyawa. Aktivasi PRP mulai menggunakan CaCl_2 yang dapat menimbulkan agregasi trombosit (Everts et al., 2006; Lubkowska et al., 2012)

Penelitian Kikuchi juga menunjukkan bahwa konsentrasi *growth factor* yang diperoleh dengan menyimpan sampel PRP beku setelah aktivasi CaCl_2 lebih tinggi dibandingkan dengan sampel PRP yang dibekukan kemudian diaktivasi. Konsisten dengan hipotesis kami, sampel PRP yang diaktifkan CaCl_2 melepaskan lebih banyak faktor pertumbuhan daripada sampel PRP yang dibekukan kemudian diaktivasi. Sampel PRP yang dibekukan kemudian diaktivasi menyebabkan penghancuran fisik trombosit, sehingga akan mempengaruhi pelepasan *growth factor* dari trombosit. Kalsium klorida bereaksi di dalam PRP dan menghasilkan trombin autologus, yang kemudian mengaktifkan trombosit dan melepaskan faktor pertumbuhan (Whitman et al., 1997). Karena mekanisme aktivasi berbeda, konsentrasi *growth factor* yang diperoleh dari metode yang berbeda, juga berbeda konsentrasinya (Kikuchi et al., 2019).

Ketika menyelidiki perubahan kronologis dalam konsentrasi *growth factor* PRP pada permukaan implan yang digunakan dalam perawatan gigi, Sanchez et al. (2013) menemukan bahwa perbedaan dalam metode aktivasi dan jenis *growth factor* menyebabkan perbedaan dalam proses penyembuhan luka.

E. Penyimpanan Produk PRP pada Suhu dan Waktu yang bervariasi

Beberapa sampel PRP digunakan untuk mengevaluasi kapasitas pelepasan *growth factor* segera setelah pembuatan PRP dengan durasi penyimpanan 3, 6, dan 24 jam pada suhu 20°C. Pelepasan VEGF dan PDGF BB pada produk PRP yang diaktifkan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara 3 dan 6 jam dibandingkan dengan PRP yang tidak disimpan. Sebaliknya, penyimpanan 24 jam menunjukkan penurunan yang signifikan dari konsentrasi VEGF. Perubahan signifikan juga terjadi untuk PDGF-BB. Secara keseluruhan, percobaan stabilitas menunjukkan bahwa periode penyimpanan 6 jam mungkin kompatibel dengan pelestarian fungsionalitas trombosit dan kapasitas pelepasan *growth factor*, sedangkan durasi penyimpanan yang lebih lama menyebabkan faktor pertumbuhan dalam granula trombosit menurun (Bausset et al., 2012)

Penyimpanan PRP pada suhu 22°C dengan agitasi selama 7 hari, jumlah trombosit dan konsentrasi 8 jenis *growth factor* bertahan atau mencapai tingkat konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi *growth factor* yang diperoleh pada hari pertama (Wen et al.,

2018). Namun, Gary, dkk, mendapatkan hasil penelitian bahwa terjadi penurunan jumlah trombosit dan konsentrasi *growth factor* dalam produk PRP yang disimpan pada suhu kamar selama periode 8 hari (Moore et al., 2017). Hal ini menunjukkan bahwa viabilitas trombosit tetap baik pada suhu 22°C dengan agitasi selama 7 hari, kandungan *growth factor*-nya mungkin juga tetap dipertahankan untuk penggunaan yang efektif (Wen et al., 2018)

Durante et al. (2013) juga melaporkan perbedaan konsentrasi pada delapan jenis *growth factor* yang dilepaskan dari trombosit pada 5, 10, 20, 30, dan 60 menit setelah aktivasi melalui CaCl₂. Konsentrasi beberapa *growth factor* meningkat, sedangkan yang lain menurun. Di antara *growth factor* yang diselidiki dalam percobaan ini, konsentrasi PDGF-BB meningkat secara signifikan dalam 10 menit, tetapi tidak ada peningkatan yang diamati setelahnya (Durante et al., 2013). *Insulin-like growth factor-1* tidak menunjukkan perbedaan konsentrasi yang signifikan secara statistik pada setiap titik waktu. Su et al. (2008) melaporkan bahwa konsentrasi IGF-1 tidak berbeda secara signifikan pada 5, 60, 120, dan 300 menit setelah aktivasi (Su, Kuo, Nieh, Tseng, & Burnouf, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh Kushida et al (2014) juga mendapatkan hasil penelitian berupa produk PRP dengan peningkatan konsentrasi trombosit tiga sampai lima kali lipat dan peningkatan konsentrasi *growth factor* dari supernatan sampel yang diaktifkan dan disimpan pada suhu -80°C (Kushida et al., 2014)

Banyak faktor yang dapat menyebabkan aktivasi trombosit. Trombosit dapat mengalami aktivasi selama proses pembuatan PRP dan penyimpanan PRP. Konsentrasi *growth factor* pada produk PRP dapat dipertahankan selama 6 bulan pada penyimpanan -70°C (Lubkowska et al., 2012).