

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Selama beberapa dekade terakhir, biologi molekuler telah merevolusi pendekatan pengobatan di beberapa spesialisasi medis dan membuka perspektif baru dalam praktik klinis. Salah satu inovasi yang berkembang pesat adalah penggunaan *Platelet Rich Plasma* (PRP) sebagai terapi yang efektif dan menjanjikan terutama karena sifat restoratif, anti inflamasi dan analgesiknya. Efek terapeutik PRP terutama berasal dari kandungan *Growth Factor* (GF) yang tinggi di dalam trombosit, salah satunya adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang berperan penting dalam angiogenesis, proliferasi dan migrasi sel, serta proses penyembuhan jaringan (Beitia *et al.*, 2025). *Growth factor* juga berperan dalam kemotaksis, neovaskularisasi dan sintesis matriks ekstraseluler serta penghambatan apoptosis, sehingga menjadikan PRP sebagai salah satu modalitas yang potensial dalam mempercepat proses penyembuhan jaringan dan regenerasi tulang (Pretorius *et al.*, 2023).

Di negara maju, sekitar satu sampai dua persen dari populasi diperkirakan akan mengalami luka kronis sepanjang hidupnya, dengan beban biaya perawatan yang signifikan. Kondisi ini menuntut adanya terapi yang efektif dan berbasis bukti, termasuk evaluasi objektif terhadap komponen biologis PRP seperti kadar GF (Ngoc Tuan, Tran Ngoc Tu and Tien Dung, 2021). Meskipun pembuatan PRP dikenal sebagai metode yang relatif sederhana, aman, hemat biaya, minimal invasif dan mudah digunakan, namun hingga saat ini belum terdapat standarisasi yang jelas dalam proses preparasinya (Liu *et al.*, 2021).

Variabilitas hasil PRP merupakan salah satu tantangan utama dalam penggunaannya secara klinis. Penelitian sebelumnya telah meninjau dan menyebutkan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas PRP antara lain yaitu, pentingnya pemilihan jenis antikoagulan yang digunakan, konsentrasi trombosit, proses sentrifugasi dan teknik aktivasi trombosit (Liu *et al.*, 2024; Pineda-Cortel *et al.*, 2024). Antikoagulan Sitrat dan *Acid Citrate Dextrose-A* (ACD-A) adalah dua jenis antikoagulan yang paling umum digunakan dalam preparasi PRP (Collins, Alexander and Barkatali, 2021). Beberapa studi sebelumnya juga menyebutkan bahwa belum ada standarisasi protokol pembuatan PRP, cara penggunaan dan penyimpanannya untuk uji klinis, sehingga efikasi PRP masih diperdebatkan dan menjadi permasalahan utama hingga saat ini (Liu *et al.*, 2024).

Di sisi lain, aktivasi trombosit merupakan tahap penting dalam pelepasan GF dari granula- α . Trombin dikenal sebagai aktivator trombosit yang kuat melalui mekanisme aktivasi reseptor *Protease-Activated Receptors* (PAR), yang memicu degranulasi trombosit dan pelepasan VEGF. Namun demikian, efektivitas aktivator trombin dalam meningkatkan kadar GF masih menunjukkan hasil yang bervariasi, yang kemungkinan dipengaruhi oleh kondisi preparasi PRP sebelumnya (Patel *et al.*, 2023; Wu, Chen and Chen, 2025).

Sebagian besar penelitian sebelumnya hanya mengevaluasi faktor-faktor tersebut secara terpisah, sehingga interaksi antara faktor biologis dan mekanik

dalam mempengaruhi pelepasan GF belum sepenuhnya dipahami. Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti tertarik untuk menganalisis peran aktivator trombin terhadap kadar GF khususnya VEGF dalam PRP yang dipreparasi dengan kondisi yang berbeda, yaitu pada penggunaan antikoagulan ACD-A dan Natrium Sitrat. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai peran aktivasi trombosit dalam konteks variasi metode preparasi PRP, serta berkontribusi dalam upaya standarisasi dan optimalisasi penggunaan PRP dalam praktik klinis.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut: Bagaimana pengaruh aktivator trombin terhadap kadar VEGF pada PRP yang dipreparasi menggunakan antikoagulan ACD-A dan natrium sitrat?

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1. Tujuan

A. Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh aktivator trombin terhadap kadar VEGF pada PRP yang dipreparasi menggunakan antikoagulan ACD-A dan Natrium Sitrat

B. Tujuan Khusus

1. Menganalisis perbedaan kadar VEGF pada PRP dengan antikoagulan ACD-A dan Natrium Sitrat sebelum penambahan aktivator trombin
2. Menganalisis perbedaan kadar VEGF pada PRP dengan antikoagulan ACD-A dan Natrium Sitrat setelah penambahan aktivator trombin
3. Menganalisis perbedaan kadar VEGF sebelum dan setelah penambahan aktivator trombin pada PRP dengan antikoagulan ACD-A
4. Menganalisis perbedaan kadar VEGF sebelum dan setelah penambahan aktivator trombin pada PRP dengan antikoagulan Natrium Sitrat

1.3.2. Manfaat

- A. Memberikan informasi ilmiah mengenai perubahan kadar VEGF setelah penambahan aktivator trombin pada PRP
- B. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh jenis antikoagulan terhadap karakteristik PRP
- C. Memberikan informasi ilmiah mengenai efektifitas aktivator trombin dalam meningkatkan pelepasan VEGF pada PRP

1.4 Hipotesis Penelitian

Terdapat peningkatan kadar VEG setelah penambahan aktivator trombin pada PRP dengan antikoagulan ACD-A dan Natrium Sitrat.

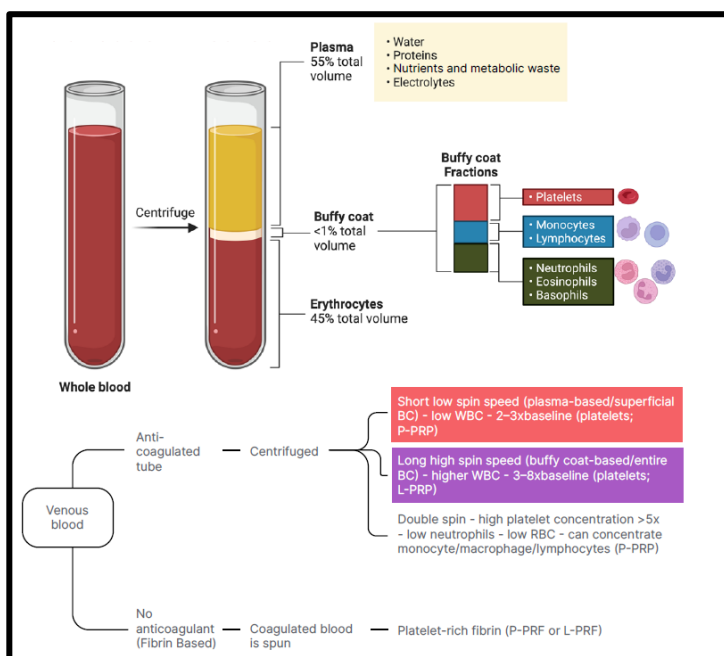
1.5 Kajian Teori

1.5.1 Platelet Rich Plasma

Platelet Rich Plasma (PRP) dikenal sebagai autolog platelet gel atau *Platelet Rich Growth Factors* (GFs) (Lu *et al.*, 2023). *Platelet Rich Plasma* diperoleh melalui proses sentrifugasi darah (*autologous blood*) yang bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi trombosit dalam volume plasma yang relatif kecil namun kaya akan GF. *Platelet Rich Plasma* secara potensial berperan dalam meningkatkan proses penyembuhan melalui pelepasan berbagai GF dan sitokin yang tersimpan dalam granula- α trombosit (Collins, Alexander and Barkatali, 2021). *Platelet Rich Plasma* merupakan preparat konsentrat trombosit yang meningkat antara empat hingga lima kali lebih tinggi dibandingkan dari jumlah basal trombosit dalam volume plasma yang relatif kecil (Buontempo *et al.*, 2023). Literatur menyebutkan bahwa konsentrasi sekitar 1.000.000 sel/ μ L dianggap memberikan efek terapeutik yang optimal, meskipun hubungan antara jumlah trombosit dan efektivitas klinis tidak selalu bersifat linear (Sharda and Flaumenhaft, 2018). Saat ini, PRP telah digunakan secara luas dalam berbagai bidang kedokteran, termasuk ortopedi dan traumatologi, oftalmologi, odontologi, estetika, pengobatan ulkus kaki diabetik serta gangguan muskuloskeletal (Liu *et al.*, 2024). Selain itu, PRP juga telah diaplikasikan dalam bidang bedah jantung, bedah anak, ginekologi, urologi dan bedah plastik (Lee *et al.*, 2023).

Platelet Rich Plasma dapat diformulasikan dengan berbagai metode, namun hingga saat ini belum terdapat konsensus internasional mengenai protokol standar dalam preparasinya (Liu *et al.*, 2024). Secara umum, proses pembuatan PRP dimulai dengan pengambilan *Whole Blood* (WB) ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan tertentu untuk memisahkan komponen darah berdasarkan gradien kepadatannya (Gambar 1). Setelah proses sentrifugasi, terbentuk tiga lapisan utama yaitu, eritrosit di bagian bawah, diikuti oleh *buffy coat* yang mengandung leukosit dan trombosit, serta lapisan plasma di bagian atas yang merupakan *Platelet Poor Plasma* (PPP). Fraksi plasma yang kaya trombosit kemudian dipisahkan dari PPP (Buontempo *et al.*, 2023).

Pedoman dari *The American Association of Blood Banking* (AABB) menyebutkan bahwa preparasi PRP umumnya dilakukan pada suhu ruang (berkisar 20-24°). Namun demikian, interaksi antara berbagai faktor dalam preparasi PRP, seperti jenis antikoagulan, proses sentrifugasi baik jumlah siklus dan kecepatannya, serta metode aktivasi trombosit, masih belum dapat sepenuhnya dipahami. Variasi faktor-faktor tersebut dapat mempengaruhi kualitas PRP termasuk jumlah trombosit dan pelepasan GF seperti VEGF (Pineda-Cortel *et al.*, 2024).



Gambar 1. Pemisahan plasma berdasarkan gradien kepadatannya
Sumber : (Buontempo et al., 2023)

Pembuatan PRP dapat dipreparasi melalui dua pendekatan utama atau strategi pemisahannya, yaitu metode berbasis plasma (*plasma-based method*) dan metode berbasis *buffy coat* (*buffy coat-based method*). Pada metode berbasis plasma, proses sentrifugasi dilakukan dalam dua tahap (*double spin*), sentrifugasi pertama bertujuan untuk memisahkan eritrosit dari plasma sedangkan sentrifugasi kedua bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi trombosit dalam volume plasma yang lebih kecil (Collins, Alexander and Barkatali, 2021).

a. Prosedur pada *plasma-based method* (Buontempo et al., 2023)

- 1) Darah vena diambil dan ditampung di dalam tabung yang mengandung antikoagulan.
- 2) Dillakukan sentrifugasi pertama (*soft spin*) dengan kecepatan rendah untuk memisahkan eritrosit dari plasma.
- 3) Fraksi plasma yang mengandung trombosit dipindahkan ketabung lain untuk proses sentrifugasi selanjutnya.
- 4) Dilakukan sentrifugasi kedua (*hard spin*) dengan kecepatan lebih tinggi untuk mengkonsentrasikan trombosit.
- 5) Setelah konsentrasi kedua, terbentuk lapisan PPP dan fraksi bawah yang mengandung trombosit terkonsentrasi (PRP).
- 6) Pisahkan PRP secara hati-hati menggunakan pipet untuk menghindari tercampurnya kembali dengan PPP.

Metode kedua yaitu metode berbasis *buffy coat* yang dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan yang lebih tinggi untuk menghasilkan lapisan *buffy coat*

yang mengandung trombosit dan leukosit, yang kemudian dapat disentrifugasi kembali untuk mendapatkan konsentrasi trombosit yang lebih tinggi. Dari seluruh volume WB dapat dihasilkan satu lapisan tipis *buffy coat* yang berisi leukosit dan trombosit meskipun terdapat kesulitan untuk memisahkan lapisan tipis ini dari lapisan dibawahnya yang berisi eritrosit (Collins, Alexander and Barkatali, 2021).

b. Prosedur pada *buffy coat method* (Buontempo *et al.*, 2023)

- 1) Darah vena diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan.
- 2) Sampel dipertahankan pada suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$ - 24°C dan segera diproses untuk menjaga viabilitas trombosit.
- 3) Dilakukan sentrifugasi dalam kecepatan tinggi (*hard spin*) untuk memisahkan komponen darah berdasarkan densitasnya.
- 4) Setelah sentrifugasi, terbentuk tiga lapisan utama, yaitu: eritrosit di bagian bawah, lapisan Tengah (*buffy coat*) yang mengandung trombosit dan leukosit, serta lapisan atas dibagian atas.
- 5) Pindahkan sebagian plasma bagian atas (*supernatan*) secara hati-hati.
- 6) Lapisan *buffy coat* kemudian diaspirasi dengan hati-hati dan dipindahkan ke tabung steril.
- 7) Sampel yang mengandung *buffy coat* kemudian disentrifugasi kembali untuk menkonsentrasikan trombosit.
- 8) Hasil akhir akan berupa konsentrat trombosit (PRP) dengan atau tanpa leukosit, tergantung metode pemrosesan lanjutan.

Protokol sentrifugasi dengan kecepatan yang lebih tinggi dilaporkan dapat meningkatkan konsentrasi trombosit dan berpotensi meningkatkan pelepasan GF. Penelitian lain menunjukkan bahwa peningkatan kecepatan dan durasi sentrifugasi, dapat meningkatkan pelepasan VEGF yang jauh lebih tinggi (Muthu, Krishnan and Ramanathan, 2022). Metode preparasi lebih lanjut berkontribusi pada heterogenitas, dengan protokol *double spin* dan *buffy coat* menghasilkan profil trombosit dan leukosit yang berbeda. Meskipun metode *double-spin* menawarkan kontrol yang lebih besar terhadap konsentrasi trombosit, metode *buffy coat* secara inheren memperkaya leukosit, sehingga setiap metode cocok untuk tujuan terapeutik yang berbeda (Wu, Chen and Chen, 2025).

Selama proses sentrifugasi, pergerakan partikel sel darah dipengaruhi oleh gaya sentrifugal, ukuran dan densitas partikel, serta viskositas medium. Pada sediaan *whole blood*, peningkatan gaya dan waktu sentrifugasi akan menyebabkan eritrosit mengendap di bagian bawah tabung, sedangkan plasma yang mengandung trombosit berada di bagian atas. Namun demikian, pada proses pemisahan dan pipetasi, terdapat risiko terbawanya eritrosit karena posisi trombosit yang berada tepat diatas lapisan eritrosit, sehingga memerlukan kehati-hatian dalam melakukan aspirasi (Fajaryani, Rahayu and Limijadi, 2020).

Keberadaan eritrosit dalam PRP berpotensi memberikan efek yang merugikan terhadap jaringan. Eritrosit dapat mengalami hemolisis baik akibat proses preparasi maupun mekanisme yang dimediasi imun, sehingga melepaskan hemoglobin kedalam plasma. Hemoglobin ekstraseluler diketahui dapat meningkatkan stress

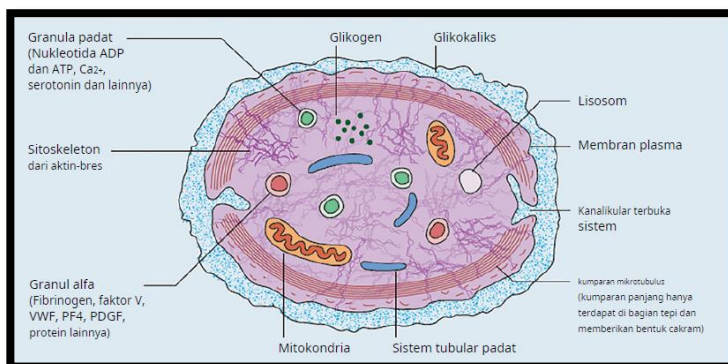
oksidatif melalui pembentukan radikal bebas, yang selanjutnya berpotensi menyebabkan kerusakan jaringan. Hemolisis dapat berdampak negatif terhadap kondrosit dan sinoviosit dengan menginduksi ekspresi enzim proteolitik yang berdampak negatif pada perbaikan tulang rawan. Oleh karena itu, penting untuk meminimalkan kontaminasi eritrosit selama proses preparasi PRP.

Selain eritrosit, leukosit merupakan komponen yang dapat ditemukan dalam PRP. Beberapa penelitian menyarankan bahwa keberadaan leukosit perlu dibatasi karena potensi efek proinflamasi (Tey *et al.*, 2022). Leukosit dapat melepaskan berbagai sitokin proinflamasi serta memodulasi aktivitas trombosit dan jaringan, yang pada akhirnya dapat meningkatkan risiko pembentukan jaringan parut (Pineda-Cortel *et al.*, 2024). PRP yang kaya leukosit (neutrofil) juga dilaporkan meningkatkan kadar mediator inflamasi seperti Interleukin 1β (IL- 1β), *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) dan *metalloproteinase* yang dapat mengganggu efek regeneratif trombosit (Saqlain *et al.*, 2023). Selain itu, aktivitas metabolik leukosit dapat menyebabkan penurunan pH, peningkatan konsumsi glukosa dan peningkatan produksi laktat (Fajaryani, Rahayu and Limijadi, 2020).

1.5.2 Trombosit dan *Growth Factor*

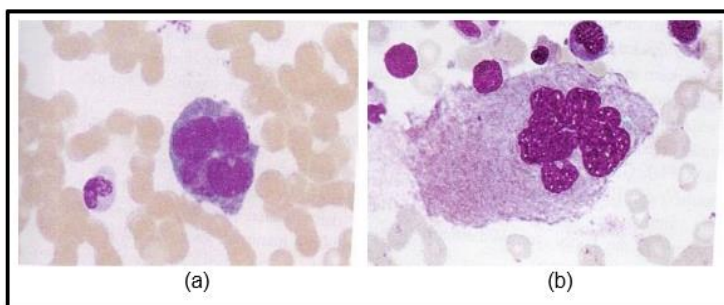
Sejak tahun 1980-an, trombosit telah diketahui memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka, tidak hanya dalam hemostasis tetapi juga sebagai sumber utama mediator biologis aktif yang terlibat dalam regenerasi jaringan (Liu *et al.*, 2024). Trombosit mengandung ribuan protein termasuk GF, mediator sistem imun, enzim, inhibitor enzim dan senyawa bioaktif lainnya. Faktor-faktor tersebut bekerja melalui berbagai mekanisme, seperti regulasi inflamasi, stimulasi angiogenesis, serta sintesis dan remodeling jaringan baru (Buontempo *et al.*, 2023).

Trombosit merupakan fragmen-fragmen sel granular, berbentuk cakram, tidak berinti, berdiameter dua sampai empat mikrometer dengan volume rerata 7-11 fL dan merupakan unsur seluler dari sumsum tulang terkecil untuk hemostasis (Hoffbrand *et al.*, 2024; Fountain and Lappin, 2025). Hitung trombosit normal di dalam darah tepi adalah 150.000 – 400.000 sel / μ L dengan proses pematangan selama tujuh sampai sepuluh hari di dalam sumsum tulang (Fountain and Lappin, 2025). Ultrastruktur trombosit dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Ultrastruktur trombosit
Sumber : (Hoffbrand *et al.*, 2024)

Megakariopoiesis dihasilkan di sumsum tulang dengan fragmentasi sitoplasma megakariosit. Prekursor megakariosit, yaitu megakarioblas yang berasal dari diferensiasi 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 dengan rasio nukleus: sitoplasma rendah (Gambar 3). Pada proses replikasi yang ke delapan kali, pertumbuhan sel tersebut akan berhenti dan kemudian sitoplasma menjadi granular lalu trombosit dilepaskan dalam bentuk platelet. Setiap megakariosit menghasilkan sekitar 4.000 trombosit. Interval waktu dari diferensiasi sel punca menjadi produksi trombosit adalah sekitar 10 hari (Hoffbrand *et al.*, 2024).



Gambar 3. Megakariosit
(a) Bentuk imatur dengan sitoplasma basofilik, (b) Bentuk matur dengan banyak lobus nukleus dan granulasi yang mencolok di sitoplasma
Sumber : (Hoffbrand *et al.*, 2024)

Peran utama trombosit terdiri dari fungsi hemostasis dan non hemostasis. Hemostasis terdiri dari tiga proses yaitu: (1) segera setelah cedera vaskular, pembuluh darah yang cedera mengalami vasokonstriksi untuk membatasi

kehilangan darah dilokasi cedera; (2) trombosit menempel pada dinding pembuluh darah yang cedera, aktif dan membentuk agregat yaitu sumbat trombosit; yang (3) akhirnya distabilkan oleh jaring fibrin padat yang terbentuk melalui kaskade koagulasi (Triyadi, 2021; Scridon, 2022).

Trombosit memiliki zona luar yang jernih dan zona dalam yang berisi organel-organel sitoplasmik. Permukaannya diselubungi reseptor glikoprotein yang digunakan untuk reaksi adhesi dan 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 menyebabkan tertutupnya luka pada pembuluh darah. Proses perlekatan ini akan memicu 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 *et al.*, 2024).

Dalam membantu proses penyembuhan luka, trombosit tidak dapat terlepas dari GF yang mempengaruhi kemotaksis, diferensiasi, proliferasi dan aktivitas sintesis sel yang mengatur *remodeling* fisiologis dan penyembuhan. Semakin banyak GF yang sampai ke lokasi luka maka semakin berpotensi 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 *growth factor* melalui *open canalicular system* yang berperan penting pada berbagai fase penyembuhan luka (fase inflamasi hingga fase remodeling) (Amin Asri, 2020; Hoffbrand *et al.*, 2024).

Trombosit dapat diaktivasi oleh *Adenosine Diphosphate* (ADP), trombin, epinefrin, tromboksan A₂, kolagen dan banyak senyawa lainnya. Agregat melalui pengikatan reseptor fibrinogen dan glikoprotein IIb/IIIa akan meningkatkan antigen permukaan yang dikenal sebagai “aktivasi trombosit marker”. Selama aktivasi morfologi trombosit umumnya berubah dari bentuk cakram (istirahat) ke bentuk bola bergulir, bentuk belahan dan akhirnya menyebar bentuk adhesi. Setelah trombosit diaktifkan, trombosit akan mengalami perubahan morfologis yang signifikan, menghasilkan pseudopodia memanjang. Aktivasi juga menyebabkan perubahan membran fosfolipid sehingga permukaan fosfatidilserin 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. 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 (Luzak, Golanski and Rozalski, 2025).

Trombosit mengandung tiga jenis granula antara lain yaitu granula- α , granula padat dan lisosom, serta mengandung lebih dari ribuan protein termasuk GF, enzim, inhibitor enzim dan senyawa bioaktif lainnya. Granula- α mengandung lebih banyak faktor pembekuan dan *von Willebrand Factor* (vWF). Trombosit merupakan sumber potensial protein aktif terapeutik seperti mitogenik, kemotaktik, adhesi, angiogenik dan protein antiangiogenik serta faktor neurotropik (Fountain and Lappin, 2025). Granula- α berdiameter 200 – 500 nm dengan jumlah lebih banyak yaitu sekitar 50 – 80 granula per trombosit, mengandung diantaranya faktor pembekuan, GF seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Insulin-like Growth Factor-1,2* (IGF-1, IGF-2), *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Connective Tissue Growth Factors* (CTGF) dan protein lain (Tabel 1). Setiap trombosit mengandung sekitar 80 granula- α yang mengandung GF juga protein adhesif, kemokin, fibrinolitik protein dan molekul pro-koagulan (Emril and Maulina, 2018; Patel *et al.*, 2023)

Tabel 1. Komponen granula α pada trombosit

Granula- α	Komponen
Molekul adhesi	P-selektin, fibronectin, vitronectin, vWF
Sitokin dan kemokin	Interleukin-1 β , CD40 ligand, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL4, CXCL12, CXCL16, <i>platelet factor-4</i>
Faktor koagulasi	Faktor V, factor XIII, vWF, <i>High Molecular Weight Kininogen</i> (HMWK), fibrinogen
Faktor antikoagulan	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i> , protein S
Faktor fibrinolisis	α 2-antiplasmin, <i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i> , <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
<i>Growth factors</i> dan angiogenetik faktor	VEGF, PDGF, TGF- β , EGF, IGF-1, FGF-2, HGF, CTGF
Protein lainnya	Albumin, kalsitonin, angiotensinogen, trombospodin

Sumber : (Scridon, 2022)

Beberapa GF yang penting sebagai bahan aktif didalam PRP antara lain yaitu VEGF, PDGF, TGF- β , EGF, IGF-1, FGF-2, HGF dan CTGF (Zhang *et al.*, 2025), (Patel *et al.*, 2023). *Growth factor* dapat menghasilkan efek teraupetik dengan mempercepat regenerasi endotel, epitel dan epidermal serta penyembuhan jaringan lunak dan keras, menstimulasi angiogenesis pada jaringan yang rusak, merangsang sintesis kolagen, menurunkan jaringan parut pada kulit, mempercepat respon homeostasis pada cedera sehingga merangsang proses penyembuhan luka (Collins,

Alexander and Barkatali, 2021; Ren *et al.*, 2024; Wulandari *et al.*, 2024). *Growth factor* menghasilkan efek menguntungkan pada penyembuhan jaringan lunak dan keras yang rusak dengan mendorong diferensiasi sel, proliferasi dan regenerasi (Liu *et al.*, 2024).

Tabel 2. Ringkasan *Growth Factor*

<i>Growth Factor</i>	Fungsi
VEGF	Angiogenesis Migrasi dan mitosis sel endotel Kemotaktik makrofag dan granulosit
TGF- β	Promosi proliferasi dan diferensiasi sel
IGF-1	Promosi, proliferasi dan diferensiasi sel pertumbuhan
PDGF	Angiogenesis Memacu aktivitas neutrofil, fibroblas dan makrofag Kemoatraktan/ proliferasi sel Meregulasi ekspresi GF yang lain
FGF	Angiogenesis Promosi proliferasi dan migrasi sel Promosi produksi kolagen dan perbaikan jaringan
HGF	Angiogenesis

Sumber : (Liu *et al.*, 2021; Tey *et al.*, 2022)

1.5.3 *Vascular Endothelial Growth Factor*

Vascular Endothelial Growth Factor merupakan GF proangiogenik dan limfangiogenik (Broussy, 2024). *Vascular Endothelial Growth Factor* memiliki lima famili dengan VEGF-A menjadi yang paling utama dalam mendorong pembentukan pembuluh darah, migrasi dan mitosis sel endotel. *Vascular Endothelial Growth Factor-B* (VEGF-B) bersifat kardioprotektif yang mendorong hipertrofi selama peningkatan permintaan, VEGF-C sebagai protein limfangiogenik kuat, VEGF-D mirip seperti VEGF-C namun memiliki kaitan yang menunjukkan adaptasi sistem limfatik sebagai respons terhadap penyakit kardiovaskular (Pineda-Cortel *et al.*, 2024).

Vascular Endothelial Growth Factor berperan dalam menginduksi permeabilitas sel endotel, proliferasi dan angiogenesis serta terlibat dalam pengaturan homeostasis organ, seperti otak, jantung, ginjal dan hati. *Vascular Endothelial Growth Factor* berperan dalam aplikasi terapeutik pada retinopati diabetik, kanker dan berfungsi dalam sel papila dermal pada fase anagen, mengatur perifolikular angiogenesis serta meningkatkan ukuran pembuluh perifolikular selama fase pertumbuhan anagen (Cavallo, et al. 2021).

Famili dari *VEGF* merupakan kumpulan dari GF yang terlibat dalam pembentukan sel darah dan pembuluh limfa selama perkembangan embrio dan

sebagai respons terhadap meningkatnya permintaan akibat berkurangnya pasokan dan pengiriman oksigen. *VEGF* bersifat spesifik terhadap reseptornya yang menginduksi aktivitas tirosin kinase yang menghasilkan angiogenesis dan pemeliharaan pembuluh darah yang spesifik organ (Pineda-Cortel *et al.*, 2024).

1.5.4 Antikoagulan ACD-A dan Natrium Sitrat

Prosedur pengambilan darah dalam memperoleh sampel PRP memerlukan penambahan antikoagulan untuk mencegah agregasi dan aktivasi prematur trombosit, sehingga pelepasan GF dapat terjadi secara optimal pada jaringan target (Carvalho *et al.*, 2024). Antikoagulan merupakan zat yang digunakan untuk mencegah pembekuan darah yang sebagian besar bekerja dengan mengikat ion kalsium (Ca^{2+}), sebagai kofaktor penting dalam kaskade koagulasi (Ramadas and Sharada, 2017). Pemilihan jenis antikoagulan berpengaruh signifikan terhadap konsentrasi dan status aktivasi trombosit, yang pada akhirnya menentukan kualitas PRP yang dihasilkan (Carvalho *et al.*, 2024). Antikoagulan yang umum digunakan dalam preparasi PRP antara lain ACD-A atau natrium sitrat. Natrium sitrat dapat mengikat Ca^{2+} dalam darah untuk membentuk kompleks kalsium sitrat yang larut sehingga mencegah pembekuan darah (Ramadas and Sharada, 2017).

Antikoagulan yang digunakan dalam preparasi PRP harus memiliki efek toksik minimal terhadap sel dan jaringan target pada lokasi aplikasi (Aizawa *et al.*, 2020). *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) umumnya tidak digunakan dalam kit preparasi PRP karena dapat mempengaruhi fluiditas membran serta mengganggu struktur glikoprotein, yang berpotensi menyebabkan aktivasi trombosit secara spontan (Carvalho *et al.*, 2024; Pineda-Cortel *et al.*, 2024). Sebaliknya, penggunaan ACD-A dilaporkan lebih mampu dalam mempertahankan karakteristik biologis trombosit. Beberapa penelitian melaporkan bahwa PRP yang dipreparasi menggunakan ACD-A menghasilkan pelepasan GF, termasuk VEGF, yang lebih tinggi dibandingkan dengan antikoagulan lainnya. Selain itu penelitian oleh Singh (2018) menunjukkan bahwa aspek morfologi trombosit seperti ukuran, bentuk dan pola aktivasi lebih terjaga pada sampel dengan ACD-A (Pachito *et al.*, 2020). Penelitian lain oleh Munawirah (2019) juga menunjukkan bahwa pada penggunaan antikoagulan ACD, menghasilkan peningkatan jumlah trombosit dan kadar PDGF yang lebih tinggi dibandingkan EDTA, yang diduga berkaitan dengan kemampuan ACD dalam mencegah agregasi trombosit secara lebih efektif (Munawirah Andi, Esa and Bahrin, 2019). Dengan demikian, pemilihan ACD-A sebagai antikoagulan tidak hanya berperan dalam mencegah koagulasi, tetapi juga dalam mempertahankan integritas struktural dan fungsional trombosit, yang berkontribusi terhadap optimalisasi pelepasan GF pada PRP.

1.5.5 Aktivator Trombin

Banyak protokol telah digunakan untuk aktivasi PRP antara lain melalui penambahan trombin, kalsium klorida (CaCl_2), maupun kombinasi keduanya, serta penggunaan kolagen tipe I (Pineda-Cortel *et al.*, 2024). Untuk meningkatkan

bioaktivitas PRP, beberapa penelitian menggunakan aktivasi dengan CaCl_2 atau trombin, yang terbukti dapat memicu pelepasan GF esensial dan mengoptimalkan potensi regeneratif PRP (Giannelli *et al.*, 2025). Trombin merupakan enzim kunci dalam kaskade koagulasi yang juga berfungsi sebagai agonis kuat trombosit. Trombin bekerja melalui aktivasi *Protease-Activated Receptors* (PAR), terutama PAR-1 dan PAR-4, yang memicu serangkaian respons trombosit berupa perubahan bentuk, peningkatan ekspresi reseptor permukaan, degranulasi, dan agregasi trombosit, yang pada akhirnya menyebabkan pelepasan VEGF dan GF lainnya (Gremmel *et al.*, 2021; Scridon, 2022). Perlu diklarifikasi bahwa Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP) merupakan analog sintetik yang meniru efek trombin pada reseptor PAR, bukan trombin itu sendiri.

Penelitian oleh Martineau pada tahun 2024 menunjukkan bahwa aktivasi menggunakan trombin maupun kombinasi trombin dan CaCl_2 menghasilkan kadar VEGF yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan CaCl_2 saja. Meskipun PRP telah banyak digunakan dalam pengobatan regeneratif, efektivitasnya masih menjadi perdebatan karena belum adanya standar baku dalam protokol preparasi dan aktivasi PRP, sehingga menghasilkan variabilitas biologis yang tinggi antar studi (Martineau, *et al.* 2024).

Sebagian besar GF dilepaskan secara cepat setelah aktivasi, dengan lebih dari 95% disekresikan dalam satu jam pertama, diikuti oleh pelepasan berkelanjutan selama beberapa hari akibat proses degranulasi lanjutan. Aktivitas biologis GF dapat bertahan hingga tujuh sampai sepuluh hari setelah aktivasi dengan trombin dan ion kalsium. *Growth factor* pada PRP umumnya tidak bersifat mutagenik dan tidak memiliki potensi tumorigenik (Prasad *et al.*, 2022). Selain itu, stabilitas GF juga dipengaruhi oleh kondisi penyimpanan. Penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi GF dalam PRP relatif stabil setelah pembekuan pada suhu -80°C , dengan masa simpan yang dapat mencapai minimal enam bulan tanpa penurunan signifikan (Liu *et al.*, 2024).

1.5.6 Pengaruh Aktivator Trombin dan Antikoagulan terhadap Kadar VEGF

Trombosit dapat diaktivasi oleh berbagai faktor, baik endogen maupun eksogen. Faktor endogen meliputi seperti trombin, kolagen dan fibronektin, sedangkan faktor eksogen dapat berupa kontak dengan permukaan asing selama proses preparasi. Aktivasi trombosit merupakan tahap penting dalam pemanfaatan PRP, karena proses ini memicu degranulasi granula- α dan pelepasan berbagai GF termasuk VEGF, yang berperan dalam angiogenesis dan penyembuhan jaringan.

Pelepasan GF terjadi secara cepat setelah aktivasi trombosit. Sekitar 70-95% GF dilepaskan dalam satu jam pertama, dengan pelepasan awal yang dimulai dalam 10 menit setelah aktivasi (Carvalho *et al.*, 2024). Selain itu, pelepasan VEGF dapat berlangsung secara progresif dari menit ke-15 hingga 24 jam, yang mencerminkan dinamika kinetik pelepasan GF yang kompleks (Pachito *et al.*, 2020). *Platelet Rich Plasma* yang banyak dievaluasi menggunakan metode berbasis ELISA dalam studi

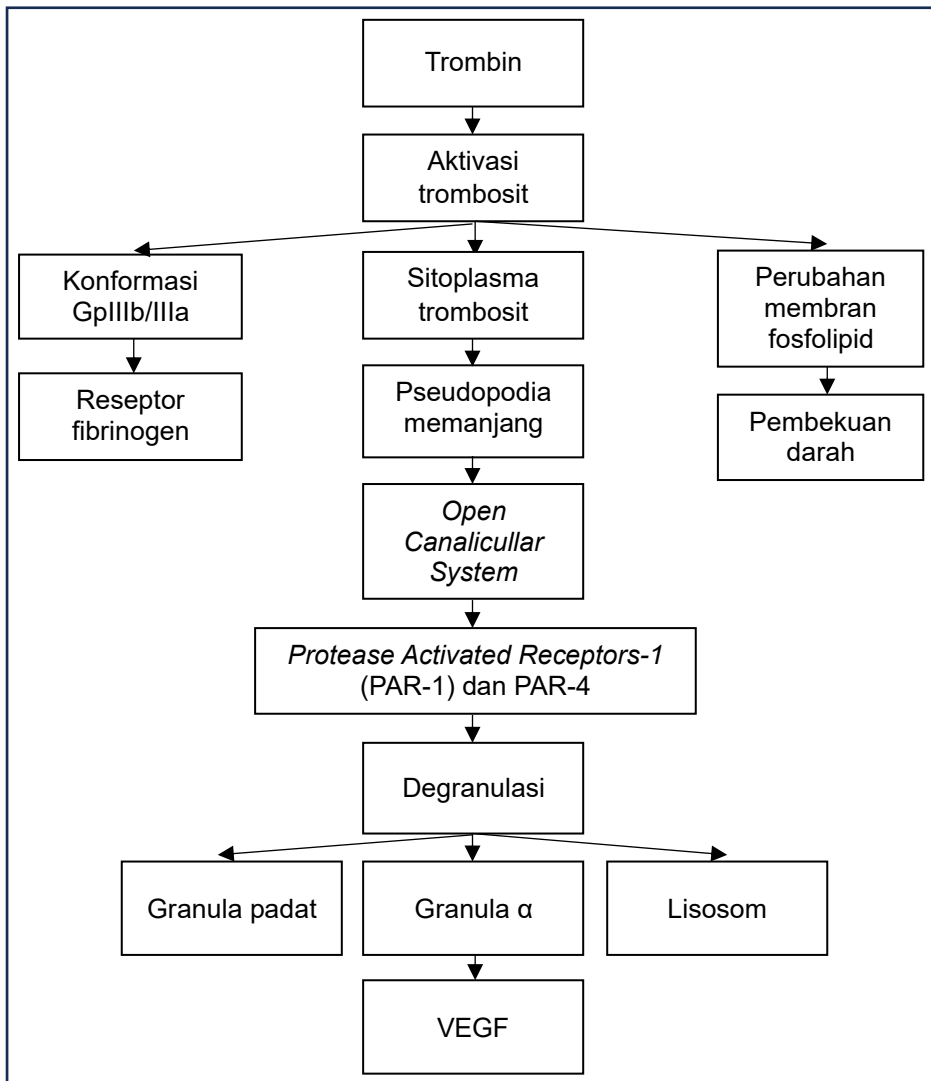
in vitro (Tey *et al.*, 2022). Namun hasil tersebut dapat bervariasi tergantung pada metode preparasi PRP, termasuk jenis antikoagulan yang digunakan.

Beberapa penelitian telah membandingkan pengaruh jenis antikoagulan terhadap karakteristik PRP. Amaral *et al.* (2016) melaporkan bahwa PRP yang diperoleh menggunakan natrium sitrat memiliki jumlah trombosit yang lebih tinggi dibandingkan ACD-A, namun tidak ditemukan perbedaan bermakna dalam konsentrasi VEGF. Sebaliknya, penelitian lain menunjukkan bahwa penggunaan ACD-A dapat menghasilkan konsentrasi trombosit yang lebih tinggi dibandingkan natrium sitrat (Pachito *et al.*, 2020). Perbedaan temuan ini menunjukkan bahwa pengaruh antikoagulan terhadap kualitas PRP masih belum konsisten, khususnya terkait konsentrasi VEGF.

Penelitian oleh Faraid (2021) menunjukkan bahwa kadar VEGF pada PRP meningkat secara bermakna setelah aktivasi dan penyimpanan selama tujuh hari pada suhu -20°C , dengan median 194,9 (109,7–654,0) ng/L ($p < 0,001$). Temuan ini mengindikasikan bahwa kombinasi proses aktivasi dan kondisi penyimpanan dapat mempengaruhi kadar GF yang terukur.

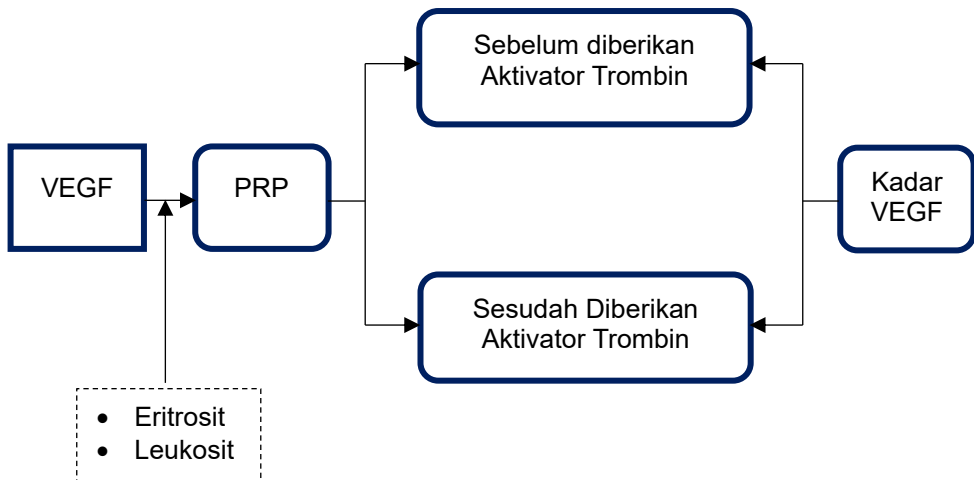
Trombin sebagai aktivator trombosit bekerja dengan cepat dalam memicu agregasi trombosit dan pelepasan GF. Selain itu, trombin mengonversi fibrinogen menjadi fibrin yang membentuk matriks fibrin sebagai *scaffold* biologis. Struktur fibrin yang dihasilkan cenderung relatif longgar dan mudah terdegradasi. Trombin juga memiliki efek biologis tambahan, seperti merangsang proliferasi sel (mitogenesis), pelepasan sitokin, serta berperan dalam regulasi fase inflamasi pada proses penyembuhan jaringan (Faraid, 2021).

1.6 Kerangka Teori



Keterangan : VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

Gambar 4. Kerangka Teori



Gambar 5. Kerangka Konsep

BAB II METODE PENELITIAN

2.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan desain penelitian *eksperimental laboratory*.

2.2. Tempat dan Waktu Penelitian

2.2.1. Tempat Penelitian

- a. Instalasi Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin untuk pengambilan sampel, pengukuran jumlah trombosit dan pembuatan PRP.
- b. *Hasanuddin University Medical-Research Center* (HUM-RC) untuk pemeriksaan kadar VEGF.

2.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan mulai bulan September – Oktober 2025.

2.3. Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah seluruh sampel *Whole Blood* menggunakan tabung ACD-A dan Natrium Sitrat dengan jumlah trombosit normal pada individu sehat.

2.4. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini mencakup seluruh darah dari donatur yang diperoleh dari sampel *Whole Blood* pada antikoagulan Natrium Sitrat dan ACD-A dengan peningkatan tiga sampai lima kali dari jumlah trombosit awal setelah dilakukan perlakuan.

2.5. Perkiraan Besaran Sampel

Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah :

$$(\Sigma N - 1) (r - 1) \geq 15 \text{ atau } r \geq \frac{(\Sigma N - 1)}{\Sigma N - 1} + 1$$

Keterangan :

ΣN : Jumlah perlakuan/intervensi

r : Jumlah repetisi untuk setiap perlakuan/intervensi

$$r \geq \frac{(15) + 1}{\Sigma N - 1}$$

$$r \geq \frac{(15) + 1}{2 - 1}$$

$$r \geq 16$$

Jumlah minimal repetisi/ sampel dalam kelompok perlakuan / intervensi penilaian ini adalah 16 sampel.

2.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

2.6.1. Kriteria Inklusi

- a. Individu sehat berusia 18 – 40 tahun.
- b. Bersedia menjadi donatur yang mendonorkan darah dalam penelitian dengan mengisi dan menandatangani *informed consent*.

2.6.2. Kriteria Eksklusi

Peningkatan jumlah trombosit pada PRP kurang dari tiga kali jumlah trombosit pada *Whole Blood*

2.7. Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Dalam pelaksanaan penelitian ini, setiap tindakan dilakukan seizin dan sepengetahuan sukarelawan dan/ atau keluarga yang dijadikan sampel penelitian melalui lembar *informed consent* dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan Nomor: 784/UN4.6.4.5.31/PP36/2025 dan izin penelitian dari Bidang Pendidikan dan Penelitian Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Nomor: 11105/UN4.24.1.1/PT.01.04/2025.

2.8. Cara Kerja

2.8.1. Alokasi Subjek

Penelitian dilakukan pada sukarelawan yang memiliki kriteria inklusi dan eksklusi di Unit Laboratorium RS UNHAS.

2.8.2. Cara Penelitian

- a. Dilakukan pencatatan identitas donatur yang memenuhi kriteria inklusi dan diberikan penjelasan lengkap kepada donatur atau keluarganya mengenai apa yang akan dilakukan terhadapnya dan

bila setuju diminta untuk mengisi kuisioner dan menandatangani *informed consent*.

- b. Dilakukan pengambilan darah vena pada tabung dengan antikogulan Natrium Sitrat sebanyak 3 cc dan tabung dengan antikoagulan ACD-A sebanyak 8 cc. Antikoagulan yang dipakai ACD-A merk BD Vacutainer yang mengandung Natrium Sitrat 3,3 mg/mL, Asam Sitrat 1,2 mg/mL, Dekstrosa 3,68 mg/mL, Pottasium Sitrat 0,03 mg/mL dan antikoagulan Natrium Sitrat merk BD Vacutainer yang mengandung *Buffered Sodium Citrate* (0,109 M, 3,2 %).
- c. Dilakukan pemeriksaan kadar trombosit sebelum disentrifugasi. Jika kadar trombosit normal yaitu berada pada nilai 150.000 – 450.000/ μ L maka dapat dilanjutkan ketahapan berikutnya.
- d. Cara pengolahan sampel pada tabung Natrium Sitrat dan ACD-A untuk memperoleh PRP :
 - i. Dilakukan sentrifugasi pada tabung Natrium Sitrat dengan kecepatan 636 g (RCF) selama 8 menit dan ACD-A dengan kecepatan 1767 g (RCF) selama 8 menit. (Munawirah Andi, Esa and Bahrn, 2019; Amin Asri, 2020; Faraid, 2021; Triyadi, 2021 ; Hettich Andreas, 2017).
 - ii. Dilakukan pengambilan *Platelet Poor Plasma* (PPP) pada 2/3 bagian atas dari tabung perlahan-lahan menggunakan pipet dan tip hingga tersisa 1/3 bagian bawah tabung yang merupakan PRP, kemudian PPP dapat disimpan di tabung lain.
 - iii. Dilakukan pengambilan *Platelet Rich Plasma* (PRP) pada area *buffy coat* masing-masing jenis tabung sebanyak $\pm$ 1 - 1,5 cc dan disatukan dalam *cup*, ditutup rapat dan diberi label.
 - iv. Dilakukan homogenisasi pada *cup*.
- e. Dilakukan pemeriksaan terhadap kadar trombosit pada sampel PRP, jika trombosit mengalami peningkatan 3 - 5 kali dari jumlah awal, maka dapat dilanjutkan pada pemeriksaan kadar VEGF sebelum penambahan aktivator.
- f. Sampel PRP pada masing-masing jenis antikoagulan dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu kelompok yang tidak diberi aktivator dan kelompok yang akan diberi aktivator.
- g. Ditambahkan aktivator sebanyak 10 μ L pada kelompok yang akan ditambahkan aktivator dan diinkubasi selama 60 menit.
- h. Dilakukan pemeriksaan VEGF pada seluruh sampel PRP dengan metode ELISA di *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUMRC).

2.8.3. Prosedur Tes Laboratorium Jumlah Trombosit

A. Tahap Pra Analitik

a. Persiapan Subjek Penelitian

- i. Dilakukan anamnesis mengenai obat yang dikonsumsi, riwayat perdarahan dan riwayat tranfusi darah

- ii. Dilakukan *informed consent* kepada donatur dan tidak ada persiapan khusus
- b. Persiapan Sampel Penelitian
Sampel darah ACD-A dan Natrium Sitrat, sebaiknya tes dilakukan selambat-lambatnya dalam waktu 2 jam.
- c. Persiapan alat dan bahan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Alat dan Bahan Tes Laboratorium Pemeriksaan Trombosit

Alat	Bahan
Mindray BC-780 <i>auto hematology analyzer</i>	<i>Whole Blood</i> dalam tabung Natrium Sitrat dan ACD-A
Tabung Na Sitrat	<i>M-5D Diluent</i>
Tabung ACD-A	<i>M-53 EO-I Lyse</i>
<i>Needle flashback dan Holder</i>	<i>M-53 EO-II Lyse</i>
Kapas alkohol	<i>M-53 LH Lyse</i>
Plester	<i>Fluorescent Dye</i>
<i>Tourniquet</i>	<i>Cleaner System</i>

B. Tahap Analitik

Prinsip tes dari pemeriksaan jumlah trombosit menggunakan prinsip variasi impedansi. *Electronic field* dibangkitkan disekitar celah mikro didalam ruang tempat sel-sel darah dilewatkan, eritrosit dan trombosit memiliki variasi impedansi yang spesifik.

a. Prosedur Kerja

- i. Nyalakan alat dengan menekan tombol *power*, tunggu sampai proses *start up* alat selesai (lampu instrument menyala berwarna hijau).
- ii. Lakukan kontrol pada alat sebelum sampel diperiksa.
- iii. Pilih *Worklist* pada menu, kemudian pilih *Regist* dan masukkan *barcode*.
- iv. Centang pilihan PLT+Diff pada pilihan pemeriksaan.
- v. Masukkan identitas, lalu tekan OK.
- vi. Pilih menu *manual analysis button*, kemudian masukkan kembali identitas.
- vii. Pilih pemeriksaan yang diinginkan PLT, Diff.
- viii. Masukkan sampel kedalam *sample tray*, kemudian tekan tombol *start*.
- ix. Tunggu hasil pemeriksaan keluar secara otomatis

C. Tahap Pasca Analitik

Nilai rujukan trombosit : 150.000 – 400.000 / μ L

2.8.4 Prosedur Tes Laboratorium Kadar VEGF

A. Tahap Pra Analitik

a. Persiapan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah sampel PRP yang telah *di resting* terlebih dahulu ± 15 menit di suhu ruang. Alat dan bahan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Alat dan Bahan Tes Laboratorium Kadar VEGF

Alat	Bahan
Air suling	Spesimen PRP
Pipet transfer	Larutan <i>Biotinylated Detection Ab</i>
Tabung sampel	Larutan Konjugat HRP
Kertas saring	<i>Wash Buffer</i>
Inkubator	<i>Stop solution</i>
<i>96 well micro ELISA plate</i>	<i>Assay diluent</i>
<i>Microplate reader</i>	Larutan standar
	<i>Konjugat HRP diluent</i>
	<i>Substrate reagen</i>

B. Tahap Analitik

Pemeriksaan ini menggunakan prinsip *Sandwich – Enzyme – Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pelat *micro ELISA* yang disediakan dalam kit ini telah dilapisi dengan antibodi khusus untuk *human VEGF*. Sampel (atau standar) ditambahkan ke *wells* (sumur) pelat mikro ELISA dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi deteksi biotinilasi spesifik untuk *human VEGF* dan konjugat *Avidin-Horseradish Peroxidase* (HRP) ditambahkan berturut-turut ke setiap sumur pelat mikro dengan baik dan diinkubasi. Komponen yang tidak berikatan akan terbuang dengan pencucian. Larutan substrat ditambahkan ke setiap sumur. Hanya sumur-sumur yang mengandung *human VEGF*, *biotinylated detection antibody* dan *konjugat Avidin-HRP* akan tampak berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan larutan penghenti dan warnanya berubah menjadi kuning. Kerapatan optik (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm ± 2 nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi *human VEGF*. Prosedur kerja dari pemeriksaan VEGF adalah sebagai berikut :

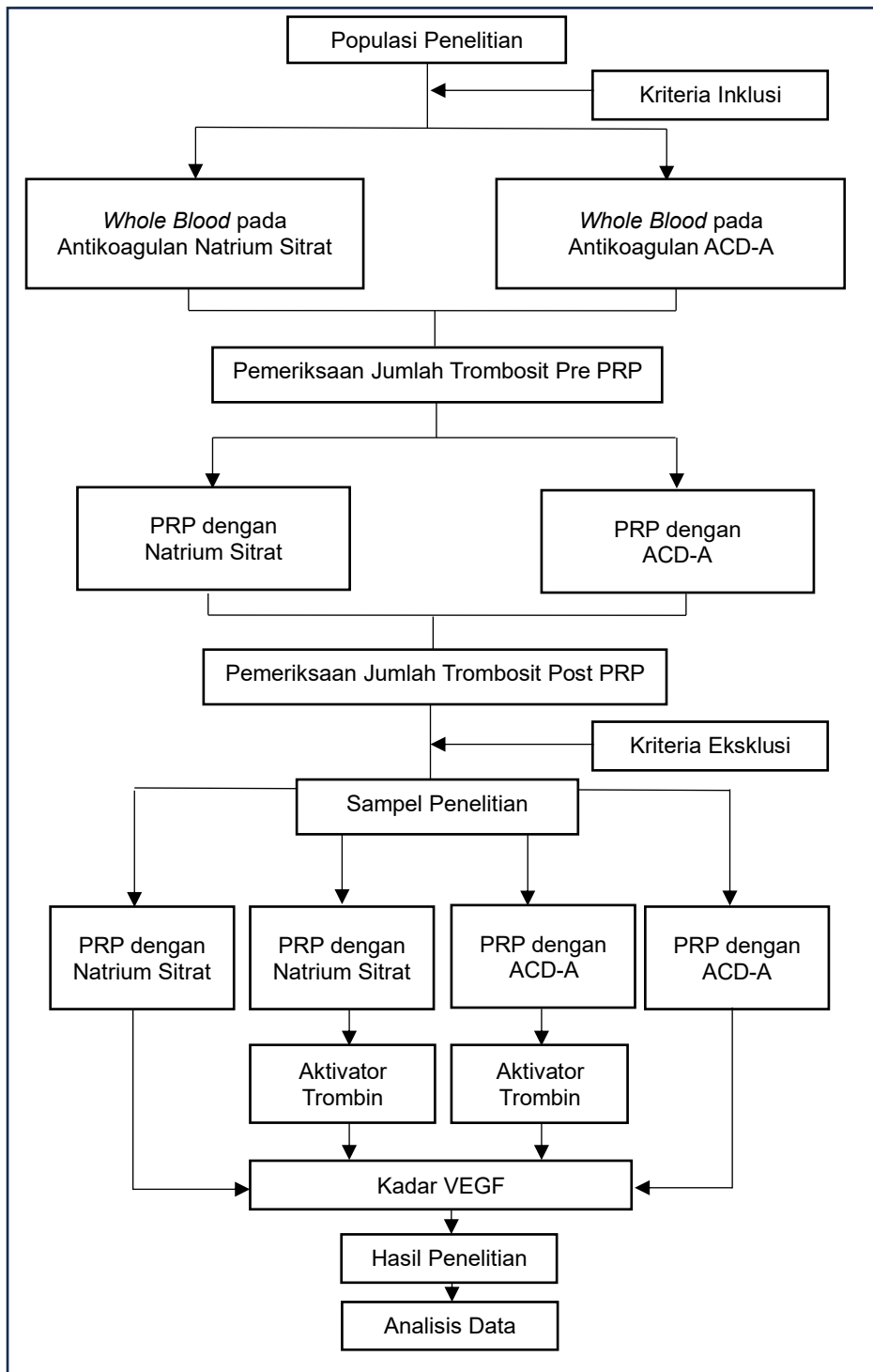
- a. Semua reagen, larutan standar dan sampel disiapkan. Label dan warna sampul vial/botol diperiksa, dipastikan cocok dan tidak ada kesalahan.

- b. Ditambahkan aktivator trombin sebanyak 10 μM pada kelompok sampel yang akan diaktivasi kemudian sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit.
- c. *Plate*, reagen dan sampel dibiarkan mencapai suhu kamar (18°C-25°C) secara alami sebelum memulai prosedur pengujian. Pemanas air tidak digunakan untuk memanaskan *plate*, reagen atau sampel.
- d. Piring dihapus dari kantong foil. *Plate* dilepas dan strip yang tidak terpakai dikembalikan ke kantong foil dengan paket pengering dan ditutup kembali untuk mencegah kelembapan.
- e. Dilakukan pengaturan pada *blank wells*, *standar wells*, *sample wells*.
- f. Ditambahkan larutan standar (S1, S2, S3, S4, S5) sebanyak 50 μL ke *well* sesuai standar, lalu ditambahkan sampel dari masing-masing kelompok sebanyak 50 μL ke dalam setiap *sample wells*.
- g. Ditambahkan *HRP-Conjugate reagent* sebanyak 100 μL ke setiap *well* kecuali *blank wells*. *Plate* ditutup dengan *closure plate membrane* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.
- h. Semua *well* (termasuk semua *blank well*) dicuci sebanyak 4 kali.
- i. *Chromogen solution A* ditambahkan sebanyak 50 μL ke setiap *well*.
- j. *Chromogen solution B* ditambahkan sebanyak 50 μL ke setiap *well*. (Larutan *Chromogen B* dilindungi dari cahaya).
- k. *Plate* diaduk secara perlahan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C (*plate* dilindungi dari cahaya).
- l. *Stop solution* ditambahkan sebanyak 50 μL ke setiap sumur.
- m. *Optical density* dibaca pada 450 nm menggunakan pembaca ELISA dalam waktu 15 menit setelah *stop solution* ditambahkan (sekitar 5 menit biasanya merupakan waktu terbaik).
- n. Konsentrasi VEGF didalam sampel dilihat dari nilai absorbansi sampel pada kurva standar yang dibuat berdasarkan nilai absorbansi dan konsentrasi larutan standar.

C. Tahap Pasca Analitik

Kurva standar dibuat dengan memasukkan OD rata-rata untuk setiap standar pada sumbu vertikal (Y) terhadap konsentrasi pada sumbu horizontal (X) dan menggambar kurva yang paling sesuai melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan ini dapat dilakukan dengan perangkat lunak berbasis komputer yang sesuai untuk kurva. Batas Linieritas: 31,25 – 2000 pg/mL (AssayGenie, 2025).

2.9 Skema Alur Penelitian



Gambar 6. Skema Alur Penelitian

2.10 Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

1. Jumlah trombosit adalah jumlah sel trombosit dalam darah yang dikumpulkan menggunakan antikoagulan Natrium Sitrat dan ACD-A, yang diukur dengan metode impedansi menggunakan alat *hematology analyzer* (Mindray BC-780, China) dan dinyatakan dalam satuan μL . Nilai rujukan jumlah trombosit adalah 150.000-400.000 μL .
2. *Platelet Rich Plasma* adalah fraksi plasma yang mengandung konsentrasi trombosit sebesar tiga sampai lima kali dari kadar trombosit darah awal (*whole blood*), yang diperoleh dari darah donatur melalui proses *single spin* sentrifugasi menggunakan alat *sentrifuge* Rotofix 32 A (MD) (Hettich, Jerman) dengan kecepatan 637 g selama 8 menit pada tabung Natrium Sitrat dan 1767 g selama 8 menit pada tabung ACD-A.
3. Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* adalah konsentrasi *growth factor* yang diukur dari sampel PRP menggunakan metode ELISA dengan kit *Human VEGF* (AssayGenie, Irlandia), sebelum dan sesudah penambahan aktivator trombin dan dinyatakan dalam satuan pg/mL.
4. Aktivator trombin dalam penelitian ini adalah *Thrombin Receptor Activating Peptide-6* (TRAP-6) (MedChemExpress, USA), yang ditambahkan ke dalam sampel penelitian dengan konsentrasi 10 μM untuk menginduksi aktivasi trombosit sehingga memicu pelepasan *growth factor*.
5. Antikoagulan ACD-A adalah antikoagulan dalam tabung pengumpul darah dengan tutup berwarna kuning, yang mengandung Natrium sitrat ($\text{Na}_3\text{Citrate}$) 3,3 mg/mL, *Citric acid* 1,2 mg/mL, *Dextrose* 3,68 mg/mL, *Potassium sorbate* 0,03 mg/mL (BD Vacutainer, USA).
6. Antikoagulan Natrium Sitrat adalah antikoagulan dalam tabung pengumpul darah dengan tutup berwarna biru bervolume 2,7 ml yang mengandung *Buffered Sodium Citrate* 0,109M (3,2%), (BD Vacutainer, USA).

2.11 Metode Analisis dan Pengolahan Data

Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak statistik SPSS versi 25.

Analisis yang dilakukan meliputi:

1. Analisis univariat

Analisis deskriptif untuk menggambarkan karakteristik data penelitian dalam bentuk nilai rerata, median, simpangan baku serta distribusi frekuensi.

2. Analisis bivariat

Beberapa analisis bivariat digunakan berdasarkan pertimbangan sebagai berikut :

- a. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk test* untuk menilai distribusi data (normal atau tidak normal), dengan nilai kemaknaan $p < 0.05$.

- b. Untuk menganalisis perbedaan kadar VEGF sebelum dan setelah penambahan aktivator trombin pada masing-masing tabung antikoagulan, digunakan uji *Wilcoxon Signed Rank*.
- c. Untuk menganalisis perbedaan kadar VEGF antara kelompok antikoagulan ACD-A dan natrium sitrat, digunakan uji Mann-Whitney U.
- d. Hasil uji statistik dinyatakan bermakna jika nilai $p \leq 0,05$.