

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks dan dinamis, berperan penting dalam kemampuan tubuh untuk memperbaiki jaringan yang rusak dan mempertahankan integritas struktural dan fungsionalnya (Patel *et al.*, 2023). Data Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2018 menunjukkan bahwa prevalensi kejadian luka sayat/teriris di Indonesia sebesar 20,1% jiwa dan prevalensi kejadian luka di Sulawesi Selatan yaitu 11,0% (Toppino *et al.*, 2022). Perkembangan terbaru diketahui bahwa *growth factors* ternyata memegang peranan penting dalam melakukan proliferasi, regenerasi dan diferensiasi jaringan sehingga merangsang peningkatan penyembuhan luka secara alami. *Platelet rich plasma* (PRP) telah muncul sebagai pilihan terapi yang menjanjikan dalam penyembuhan luka (Patel *et al.*, 2023). Trombosit yang teraktivasi akan melepaskan butirannya yang salah satunya adalah *Alpha (α) granules* sehingga merangsang kaskade inflamasi dan proses penyembuhan luka. *Alpha granules* ini mengandung protein larut dan *growth factors* yang berperan dalam mengatur kaskade koagulasi, meningkatkan regenerasi dan proses penyembuhan luka untuk membantu mengatasi kerusakan jaringan (Wulandari and Oktariana, 2024). Platelet dalam PRP penting untuk penyembuhan luka dan memperbaiki jaringan yang rusak. Pemilihan antikoagulan yang tepat pada PRP sangat penting untuk menjaga fungsi, integritas, dan morfologi platelet secara optimal (Dashore *et al.*, 2021).

Platelet Rich Plasma (PRP) merupakan plasma darah yang mengandung platelet dengan konsentrasi lebih tinggi sekitar 4-5x dibandingkan pada *whole blood*. Autologous PRP berasal dari darah pasien sendiri yang disentrifugasi kemudian menghilangkan komponen eritrosit (Cao *et al.*, 2021). *Platelet Rich Plasma* pertama kali digunakan oleh Helene Matras pada tahun 1972 untuk membantu penyembuhan luka (Clarissa, Nugraha and Ruddy, 2019). *Alpha granules* pada PRP mengandung *growth factor* seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), *platelet derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factor-10* (IGF-10), dan interleukin-6 (IL-6). Mekanisme kerja PRP dalam aplikasi klinis sangat membantu terutama dalam terapi, sehingga PRP digunakan sebagai sebuah prosedur terapi dan memungkinkan dalam proses penyembuhan luka karena terdapat *natural growth factor* didalam PRP itu sendiri (Muthu *et al.*, 2022; Margiana *et al.*, 2023). *Transforming Growth Factor Beta* merupakan salah satu *growth factor* yang dilepaskan dari *alpha granules* yang merupakan mitogen untuk fibroblas, sel otot polos, dan osteoblas. yang menginisiasi respon terhadap penyembuhan luka (Dhurat & Suresh, 2014). Penyembuhan luka merupakan suatu proses kompleks interaksi antar sel dan matriks, yang diregulasi

oleh *growth factor* pada berbagai tahapan yang berbeda. TGF- β memiliki reseptor pada tendon, tulang, kartilago dan otot (Reksodiputro, 2023).

Antikoagulan adalah zat yang bekerja untuk menekan, memperlambat, atau mencegah pembekuan darah. Cara kerja antikoagulan dengan mengikat ion kalsium atau dengan cara menghambat aktivitas trombin (Clarissa, Nugraha and Ruddy, 2019). Jumlah platelet sangat mempengaruhi kualitas dari PRP karena semakin tinggi jumlah platelet maka semakin banyak *growth factor* yang akan dilepaskan (Yuliandari, 2021). *Platelet Rich Plasma* biasanya menggunakan tabung yang memiliki antikoagulan *acid citrate dextrose* (ACD) atau natrium sitrat (Clarissa, Nugraha and Ruddy, 2019). *Alpha granules* dari platelet yang belum teraktivasi pada PRP mengandung *growth factor* dalam sediaan yang bersifat non-fungsional, karena faktor-faktor ini belum dirilis ataupun belum berinteraksi dengan jaringan sehingga platelet harus diaktivasi untuk merilis *growth factor*. Trombin merupakan agen aktivator platelet yang paling poten (Putu and Widyadharma, 2013).

Dasar ilmiah yang mendasari terapi PRP adalah ketika dilakukan injeksi PRP di lokasi cedera, maka dapat memicu untuk dimulainya perbaikan jaringan melalui pelepasan banyak faktor aktif biologis (*growth factors*, sitokin, lisosom) dan protein *adhesi* yang berperan dalam memulai kaskade hemostatik, sintesis jaringan ikat baru, dan revaskularisasi. Tingginya konsentrasi platelet dan berbagai *growth factors* didalamnya telah membuat PRP dimanfaatkan pada banyak cabang ilmu kedokteran seperti bedah mulut, bedah plastik, bedah kraniofasial, bedah jantung, ortopedi, neurologi, kedokteran olahraga, dan dermatologi (Kim et al., 2014). Kerusakan jaringan memicu proses perbaikan yang dapat dimulai dengan pembentukan klot platelet, aktivasi kaskade pembekuan dan degradasi platelet yang akan diikuti dengan sekresi *growth factors*. Selama 2 hari pertama, proses inflamasi diinisiasi oleh migrasi neutrofil dan makrofag pada area jejas. Aktivasi makrofag juga berdampak pada rilisnya berbagai faktor yang terdiri dari TGF- α , TGF- β , PDGF, IL-1 serta *fibroblast growth factor*. Angiogenesis dan fibroplasia dimulai pada hari ketiga diikuti dengan dimulainya sintesa kolagen pada hari 3-5. Proses selanjutnya diikuti dengan epitelisasi dan proses remodeling sehingga dapat disimpulkan bahwa PRP dapat memperbaiki kerusakan jaringan (Partan, R, et al., 2022). Konsentrat PRP ini dapat merangsang pelepasan *growth factors* untuk memulai penyembuhan pada cedera kronis dan mempercepat proses perbaikan pada cedera akut. Data klinis dan riset yang ada menunjukkan bahwa penggunaan terapi ini sangat aman, memiliki resiko minimal untuk terjadinya efek samping, alergi, maupun reaksi penolakan karena PRP diambil dari darah pasien sendiri. Peraturan mengenai formulasi dan komposisi PRP yang dapat diinjeksikan masih belum jelas, ditambah lagi komposisi PRP yang sangat bervariasi dalam hal jumlah platelet, kandungan sel darah putih, kontaminasi sel darah merah, dan konsentrasi *platelet growth factors* (Everts et al., 2020).

Platelet Rich Plasma memiliki peran multifungsi dalam perbaikan dan regenerasi jaringan, memberikan efek yang melampaui kapasitasnya yang sudah dikenal untuk melepaskan *growth factor*. Molekul adhesi platelet, termasuk integrin

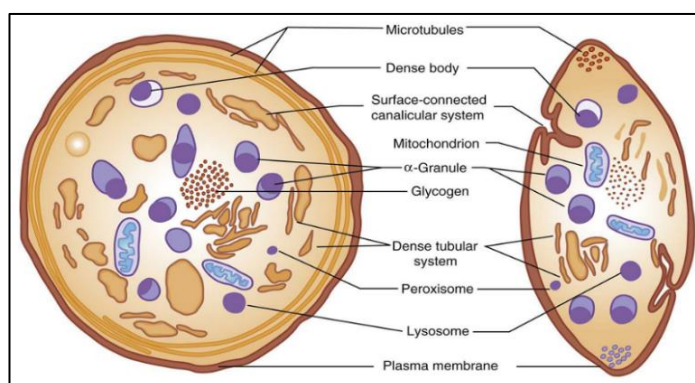
dan selektin, memulai dan menstabilkan interaksi antara platelet-leukosit dan platelet-endotel, menghubungkan cedera vaskular dengan aktivasi imun. Proses yang bergantung pada adhesi ini tidak hanya memfasilitasi hemostasis tetapi juga mendorong perekrutan sel imun, sehingga menjembatani perbaikan luka dengan imunomodulasi. Kapasitas ganda ini merangsang perbaikan sekaligus mengurangi peradangan merupakan terapi yang unik. Efek imunomodulator PRP semakin diperkuat oleh pengaruhnya terhadap imunitas bawaan dan adaptif. Serotonin (5-HT) dan CD40L yang berasal dari platelet berperan sebagai mediator penting dalam meningkatkan fungsi sel T dan B sekaligus memodulasi aktivitas sel dendritik. Efek tersebut menggambarkan potensi PRP untuk mengatur respons imun terintegrasi yang mendukung pemulihan jaringan. Angiogenesis adalah proses penting lainnya yang sebagian besar dimediasi oleh VEGF dan PDGF-BB, meskipun bergantung pada konsentrasi platelet yang optimal, dengan kadar yang terlalu tinggi secara paradoks dapat mengganggu pembentukan pembuluh darah. Mekanisme yang saling terkait ini menjelaskan mengapa PRP memiliki beragam aplikasi di berbagai bidang medis. Penggunaan di bidang ortopedi memiliki efek angiogenik dan imunoregulatornya berkontribusi pada penyembuhan tendon, tulang rawan, dan tulang. Dalam dermatologi dan estetika, kemampuannya untuk merangsang angiogenesis dan remodeling dermal mendukung terapi peremajaan kulit dan restorasi rambut. Dalam kedokteran gigi dan bedah mulut, PRP mempercepat penyembuhan luka dan osseointegrasi, sementara dalam perawatan luka PRP mengurangi peradangan dan meningkatkan pembentukan jaringan granulasi. Secara keseluruhan, PRP mewakili terapi yang aktif secara biologis dan serbaguna, yang kompleksitas mekanistiknya secara langsung mendukung berbagai aplikasi klinisnya (Wu, W. *et al.*, 2025).

Penelitian studi Munawirah pada tahun 2019 menunjukkan bahwa pada penggunaan antikoagulan *Acid Citrate Dextrose* (ACD), peningkatan platelet dan kadar PDGF menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan antikoagulan *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (EDTA). Hal ini disebabkan karena penggunaan ACD menunjukkan efektivitas yang lebih baik dalam mencegah agregasi platelet. (Munawirah, 2020). Studi Anton pada tahun 2021, terdapat peningkatan kadar PDGF-BB yang tidak bermakna pada produk PRP sebelum aktivasi dan PRP teraktivasi selama 1 jam pada suhu ruang, serta terdapat perbedaan bermakna kadar PDGF-BB PRP teraktivasi selama 7 hari pada suhu -20°C. Penelitian yang dilakukan Lisdiana pada tahun 2021 didapatkan hasil peningkatan TGF- β 3,12 kali pada produk PRP ACD setelah penambahan aktivator CaCl₂, serta peningkatan 212% kadar TGF- β tertinggi setelah disimpan selama 1 jam pada suhu ruangan dan menurun 28% setelah disimpan selama 7 hari pada suhu -80°C. Berdasarkan uraian dari beberapa penelitian tersebut didapatkan bahwa aktivasi platelet dan pelepasan *growth factors* yang optimal perlu untuk memperhatikan beberapa hal seperti penggunaan antikoagulan dan jenis aktivator sehingga peneliti tertarik untuk meneliti tentang pengaruh aktivator trombin terhadap

kadar *transforming growth factor beta* pada *platelet rich plasma* dengan antikoagulan natrium sitrat dan *acid citrate dextrose A*.

1.1.1. Platelet

Platelet adalah keping darah pembeku dengan ukuran lebih kecil daripada sel yang lain dan berjumlah sekitar $150-400 \times 10^3/\mu\text{L}$ pada orang dewasa (Samad R, *et al*, 2014). Morfologi platelet jika dilihat dari mikroskop elektron menunjukkan beberapa glikoprotein reseptor, dua macam granula di sitoplasma, dan *contractile cytoskeleton*. Dua macam granula yang terdapat pada platelet yaitu *Alpha (α) granules* dan *Dense granules*. *Alpha granules* mengandung fibrinogen, faktor V dan VIII, *von Willebrand factor* (vWF), *fibronectin*, kemokin, *platelet factor 4* (*heparin-binding chemokine*), growth factor seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β), serta memiliki molekul *adhesi P-selectin* pada membrannya. *Dense granules* mengandung molekul agregasi yang kuat seperti *adenosin difosfat* (ADP), *adenosine triphosphate* (ATP), serotonin, *ionized calcium*, histamin, dan epinefrin. *Contractile cytoskeleton* terdiri dari *dense microtubules* dan mikrofilamen sirkumferensial yang mempertahankan bentuk cakram dari platelet (Nayak R, *et al.*, 2017). Aplikasi klinis awal PRP, *alpha granule* merupakan struktur intra-platelet yang paling banyak karena adanya faktor koagulasi, sejumlah besar *growth factors*, dan regulator angiogenesis dengan fungsi trombotik yang minimal. Fungsi keseluruhan dari granula platelet spesifik ini adalah untuk merekrut dan mengaktifkan sel imun lain atau menginduksi peradangan sel endotel. Konstituen granula padat seperti ADP, serotonin, polifosfat, histamin, dan epinefrin lebih tersirat sebagai pengubah aktivasi dari platelet dan pembentukan trombus. Jumlah interaksi potensial, baik langsung maupun tidak langsung, antara platelet dan sel reseptor lainnya sangat luas. Akibatnya, banyak efek inflamasi dapat ditimbulkan oleh PRP saat diaplikasikan dalam lingkungan jaringan lokal yang patologis (Everts *et al.*, 2020). Gambar 1 menunjukkan morfologi platelet beserta komponen utamanya.



Gambar 1. Platelet dengan komponen utama yang terlihat dengan mikroskop elektron dan sitokimia (Sumber : *Wintrobe's Clinical Hematology.15 Edition*)

Platelet berperan penting dalam mekanisme pembekuan darah dengan melepaskan zat di tempat cedera atau luka dan bersama dengan faktor pembekuan lain akan membentuk anyaman protein yang kuat (fibrin) (Samad R, *et al*, 2014). Tahapan atau proses hemostasis dibagi menjadi tiga langkah utama yaitu spasme vaskuler (vasokonstriksi vaskuler), pembentukan sumbat platelet → Hemostasis primer, koagulasi darah → Hemostasis sekunder. Proses hemostasis akan dipertahankan keseimbangannya melalui mekanisme kontrol pembekuan darah, proses fibrinolisis. Hemostasis primer mulai terjadi dalam beberapa detik setelah terjadi kerusakan endotel dan berlanjut dengan pembentukan plak platelet. Proses ini faktor endotel dan platelet memegang peranan yang sangat penting. Pada hemostasis sekunder, proses koagulasi darah terdiri dari rangkaian enzimatik yang melibatkan banyak protein plasma yang disebut sebagai faktor koagulasi darah. Proses pembekuan darah dimulai melalui dua jalur, yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. Jalur intrinsik dicetuskan oleh aktivasi kontak dan melibatkan beberapa faktor pembekuan (F). F.XII, F.XI, F.IX, F.VIII, *High Molecular Weight Kininogen* (HMWK), prekalkrein (PK), *platelet factor 3* (PF3) dan ion kalsium. Jalur ekstrinsik dicetuskan oleh tromboplastin jaringan dan melibatkan F.VII dan ion kalsium. Kedua jalur ini kemudian bergabung menjadi jalur bersama yang melibatkan F.X, F.V, PF3, protrombin, dan fibrinogen (Umar I, Sujud RW., 2020).

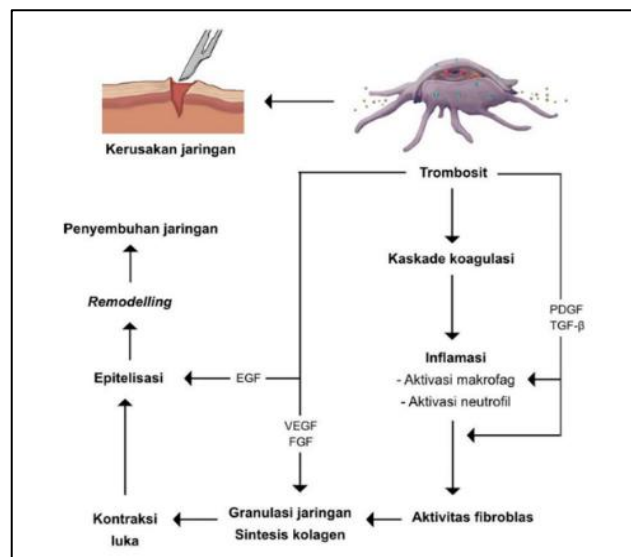
Perkembangan teknologi dan penelitian, didapatkan bahwa ternyata platelet memiliki multi fungsi, dan terkait dengan berbagai penyakit serta terapi. Fungsi platelet tersebut dibawakan oleh beberapa mediator yang terdapat di dalam granula platelet. *Growth factors* yang dikeluarkan oleh platelet mengawali dan mengatur penyembuhan luka pada jaringan lunak dan keras serta *growth factors* tersebut dapat ditemukan dalam PRP dengan jumlah yang besar (Reksodiputro, 2023). Berbagai *growth factors* dan molekul pro-inflamasi dan anti-inflamasi terletak di bawah lapisan membran sitoplasma dari trombosit, terutama dalam *alpha granule* dan lisosom, dan kompartemen intraseluler inilah yang ketika diaktifkan akan melepaskan molekul yang diperlukan untuk PRP (Gorodilova *et al.*, 2024). *Platelet Rich Plasma* yang kaya akan *growth factors* yang memainkan peran penting dalam proses penyembuhan jaringan, angiogenesis, proliferasi fibroblas, osteogenesis, serta regenerasi jaringan lunak dan keras (Everts *et al.*, 2020; Marckmann *et al.*, 2023).

1.1.2. Platelet Rich Plasma (PRP)

Platelet Rich Plasma merupakan produk darah yang diambil dari pasien itu sendiri (autologous), yang terdiri dari sejumlah plasma dalam jumlah sedikit dengan kandungan konsentrasi platelet atau platelet yang tinggi yakni 3 sampai 5 kali lebih tinggi dan didapatkan melalui proses sentrifugasi dari sediaan *whole blood*. (Wulandari and Oktariana, 2024). *Platelet Rich Plasma* secara potensial dapat meningkatkan proses penyembuhan dengan penghantaran berbagai jenis *growth*

factor dan sitokin dari *alpha granul* yang terdapat pada platelet. Banyaknya *growth factor* yang terkandung dalam PRP, menyebabkan PRP berfungsi mempercepat regenerasi endotel, epitel dan epidermal, menstimulasi angiogenesis, merangsang sintesis kolagen, mempercepat penyembuhan jaringan lunak, menurunkan jaringan parut pada kulit, mempercepat respon hemostasis pada cedera, hingga merangsang proses penyembuhan luka (Dhurat *et al*, 2014).

Kadar terapeutik dari jumlah platelet dalam PRP menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Berbagai studi yang ada seperti studi *Weibrich* dkk menunjukkan bahwa manfaat PRP dapat dilihat bila kadar platelet sekitar 1.000.000 sel/ μ L, sedangkan studi *Haynesworth* dkk menunjukkan adanya respon selular dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) yang signifikan pada pertumbuhan tulang dengan jumlah platelet dalam PRP 4-5 kali dari jumlah platelet awal. Peningkatan jumlah platelet ini menunjukkan respon yang baik terhadap produksi kolagen dan proliferasi fibroblast. Studi dari Marx., *et al* (1998), mengaplikasikan PRP yang dikombinasi dengan cangkok tulang pada pasien defek mandibula menunjukkan perbaikan yang signifikan, meskipun PRP yang digunakan hanya mengandung jumlah platelet di bawah 800.000 sel/ μ L atau 3 – 4 kali dari jumlah platelet awal. Berbagai studi tersebut dapat disimpulkan bahwa jumlah platelet pada PRP memberikan manfaat terapeutik bila jumlah platelet sekitar 1.000.000 sel / μ L, sesuai dengan peningkatan 5-6 kali dari jumlah platelet awal pasien pada umumnya sekitar 150.000-300.000 sel/ μ L (Haynesworth, Kadiyala, & Liang, 2002;). Pada teori lainnya, platelet yang tinggi pada PRP idealnya berkisar antara 200 hingga 1000 x 10³/mL yang dapat digunakan untuk meningkatkan konsentrasi *growth factors* (Saqlain *et al.*, 2023). Hal ini menunjukkan bahwa injeksi PRP memerlukan waktu untuk bekerja dan secara bertahap dapat mengurangi gejala. Dasar ilmiah yang mendasari terapi PRP adalah ketika dilakukan injeksi PRP di lokasi cedera, maka dapat memicu untuk dimulainya perbaikan jaringan melalui pelepasan banyak faktor aktif biologis (*growth factors*, sitokin, lisosom) dan protein *adhesi* yang berperan dalam memulai kaskade hemostatik, sintesis jaringan ikat baru, dan revaskularisasi. Data klinis dan riset yang ada menunjukkan bahwa penggunaan terapi ini sangat aman, memiliki resiko minimal untuk terjadinya efek samping, alergi, maupun reaksi penolakan karena PRP diambil dari darah pasien sendiri (Kumar, Jashanpreet and Singh, 2022).



Gambar 2. Peran *growth factors* yang berasal dari platelet dalam penyembuhan luka (Reksodiputro, 2023)

Terapi PRP didasarkan pada fakta bahwa *platelet growth factors* (PGFs) mendukung tiga fase penyembuhan luka dan kaskade perbaikan yaitu peradangan, proliferasi dan remodeling (Everts *et al.*, 2020). Faktor yang berperan dalam proses pembuatan PRP antara lain (Lee & Falowski, 2018) :

a. Pengambilan Darah

Proses pembekuan darah dipengaruhi dari lama waktu saat pengambilan sampel. Jarum dengan lubang yang lebih besar harus digunakan saat mengambil darah untuk menyiapkan PRP, sebaiknya 21G atau lebih besar. Penelitian Mani *et al* membandingkan jarum 21G dan 21G *butterfly cannula* untuk pengambilan darah dan tidak menemukan bukti aktivasi platelet di kedua jarum pada 25 relawan. Penelitian Lippi *et al* menemukan kadar d-dimer yang lebih tinggi (tanda aktivasi platelet) dan jumlah platelet yang lebih rendah dengan jarum berukuran lebih kecil yaitu 23G dan 25G. Meskipun perbedaannya minimal, hasilnya masih signifikan secara statistik. Oleh karena itu, jarum berukuran 21G atau lebih besar harus digunakan untuk mengambil darah saat menyiapkan PRP. Waktu pengambilan darah juga merupakan parameter penting. Penelitian Mirondan *et al* menemukan bahwa bekuan PRF yang dihasilkan berkurang hingga 23% jika waktu dari pengambilan darah hingga dimulainya sentrifugasi melebihi 120 detik (Dashore A, *et al.*, 2021).

b. Suhu

American Association of Blood Banks Technical Manual menyarankan untuk tidak mendinginkan darah di bawah 20°C sebelum memulai persiapan PRP. Paparan suhu di atas 42°C dan dalam jangka waktu yang lama menyebabkan

kerusakan platelet. Penelitian Maurer *et al* menemukan bahwa terjadi perubahan pada morfologi platelet pada suhu 37°C dan 42°C. Anehnya, mereka menemukan perubahan dalam morfologi platelet dan tanda-tanda aktivasi platelet (bentuk platelet bulat menggantikan bentuk cakram saat istirahat) ketika diinkubasi pada suhu 22°C. Sebuah studi oleh Amable *et al* menunjukkan konsentrasi platelet yang tinggi dalam PRP dan konsentrasi *growth factors* yang tinggi (pasca-aktivasi) dalam PRP yang diproduksi menggunakan sentrifus dengan suhu yang dikontrol. Sebagai perbandingan, Fukaya *et al* menggunakan sentrifus biasa yang suhunya tidak dikontrol dan menghasilkan PRP dengan konsentrasi platelet tinggi dan konsentrasi *growth factors* yang tinggi (pasca-aktivasi). Hasil yang saling bertentangan ini menunjukkan bahwa uji coba terkontrol acak lebih lanjut perlu dilakukan untuk menyimpulkan perlunya sentrifus yang dikontrol suhu untuk persiapan PRP (Dashore A, et al., 2021).

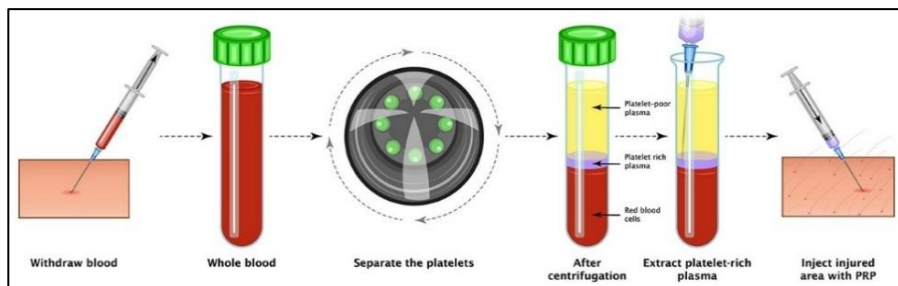
c. Sentrifugasi

Proses untuk memisahkan komponen darah membutuhkan waktu yang lama pada aplikasinya tanpa sentrifugasi. Sebuah tabung dengan anti-koagulan yang berisi *whole blood* dibiarkan tegak lurus di tempatnya akan terpisah menjadi fraksi plasma, *buffy coat* dan sel darah merah. Proses untuk mempercepat pemisahan komponen seluler darah dibutuhkan efek gravitasi menggunakan 'gaya sentrifugal' oleh alat sentrifugasi dan bisa ribuan kali gaya gravitasi. Pemisahan komponen seluler darah dapat dilakukan dengan proses yang dikenal sebagai sentrifugasi diferensial. Proses sentrifugasi diferensial yaitu kecepatan gaya sentrifugal yang dapat disesuaikan untuk memisahkan komponen seluler dan membiarkan komponen yang lain berada dalam suspensi. *Relative Centrifugal Force* (RCF) adalah gaya yang diperlukan untuk memisahkan dua fase, gaya ini disebut lapangan sentrifugal relatif yang dinyatakan sebagai kelipatan dari medan gravitasi bumi (g) sehingga dengan mempercepat 'g' sedimentasi dapat cepat dicapai (Dhurat *et al*, 2014). Sentrifugasi harus menghasilkan kekuatan yang cukup untuk memisahkan komponen darah tanpa merusak komponen darah itu sendiri, yang mana metode *single spin* dan *double spin* dengan gaya sentrifugal antara 350 dan 2000 g dengan waktu sentrifugasi 3 sampai 15 menit dapat dilakukan sehingga didapatkan lapisan terakhir membentuk PRP dengan jumlah platelet yang bervariasi akan tetapi kadar platelet yang lebih tinggi tidak signifikan dengan peningkatan efek PRP. Kadar platelet untuk fungsi yang optimal dianggap dua hingga tiga kali lipat dibandingkan kadar dalam darah (Dhurat *et al*, 2014; Sánchez et al., 2019).

Standarisasi untuk pembuatan PRP belum ada untuk memperoleh jumlah platelet serta jumlah *growth factors* secara pasti sehingga proses ini harus memperhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas dari PRP. Metode sentrifugasi pada PRP terdiri dari metode *single spin* dan *double spin*. Metode *single spin* didefinisikan sebagai pembuatan PRP hanya dengan

menggunakan satu kali sentrifugasi yang mana bertujuan untuk memisahkan sel darah merah dari plasma yang berisi platelet, sel darah putih dan faktor-faktor pembekuan. Metode *double spin* didefinisikan sebagai pembuatan PRP dengan dua kali sentrifugasi yang bertujuan untuk menghasilkan PRP dan memisahkannya dari *Platelet Poor Plasma* (PPP) (Bausset et al., 2012; Perez et al., 2014). Proses awal dalam pembuatan PRP dimulai dengan mengambil sampel darah dan di masukkan ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan. darah lalu disentrifugasi dengan kecepatan tertentu untuk memisahkan plasma dari sel-sel darah merah berdasarkan gradien kepadatannya (Lee & Falowski, 2018). Persiapan PRP, platelet diaktifkan menggunakan trombin dan setelah teraktivasi platelet akan melepaskan *alpha granule* yang mengandung berbagai macam faktor yang terlibat dalam banyak fungsi fisiologis, seperti perbaikan luka, koagulasi, peradangan, angiogenesis, dan keganasan (Zhang J, et al., 2019). Protokol single spin pada PRP :

1. Ambil whole blood dan masukkan ke dalam tabung dengan antikoagulan (ACD-A atau CPD).
2. Sentrifugasi pada 1000g selama 8-10 menit pada suhu kamar.
3. Buang PPP dan aspirasi PRP (plasma + buffycoat tipis) hingga kurang lebih 1-2 mL di atas lapisan RBC. Homogenkan (Theodore E, et al, 2019).



Gambar 3. *Platelet Rich Plasma* (PRP) preparation (Sumber : Wu,W. et al. 2025)

Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk membandingkan berbagai metode preparasi PRP, tetapi sebagian besar berfokus pada metode *double spin* yang membutuhkan waktu jauh lebih lama serta alat yang lebih dibandingkan dengan metode *single spin*. Penelitian yang dilakukan Ghanem L, et al (2025) menyatakan bahwa metode *single spin* lebih baik dalam mengobati pasien dengan alopesia androgenik dibandingkan dengan metode *double spin* karena Pertama, metode *single spin* menghasilkan lapisan platelet yang lebih homogen dan natural dibandingkan metode *double spin* yang kehilangan platelet signifikan pada *second spin* yang berarti kadar *growth factor* lebih tinggi pada *single spin*; Kedua, *single spin* menghasilkan *activated* PRP secara natural yang melepaskan *growth factor* secara bertahap melalui mekanisme aktivasi fisiologi sedangkan *double spin* cenderung menghasilkan *exogenously activated* yang

cepat namun singkat; Ketiga, *single spin* lebih efektif dalam terapi alopecia androgenik karena jumlah platelet yang lebih tinggi; Keempat, pada *single spin* justru menguntungkan untuk alopecia androgenik meskipun *double spin* menghasilkan *leukocyte-poor* PRP, leukosit pada *single spin* berperan pro-regeneratif melalui *secondary cytokine cascade* yang mendukung *hair follicle neogenesis* pada kondisi alopecia androgenik yang membutuhkan regenerasi cepat (Ghanem L, *et al.*, 2025). Penelitian Theodore E, *et al* (2019) melakukan studi komprehensif untuk menguji efisiensi dan konsistensi enam metode *single spin* pada persiapan PRP yang sering digunakan di praktik klinik swasta karena waktu dan biaya yang lebih rendah dibandingkan metode *double spin*. Penelitian ini menekankan kepraktisan dari *single spin* yaitu waktu singkat, biaya rendah, dan memberikan hasil platelet lebih dari 50%, meskipun tidak memeriksa *growth factor* tetapi studi ini memberikan dasar untuk penelitian selanjutnya terkait dosis respons PRP (Theodore E, *et al.*, 2019).

d. Antikoagulan

Antikoagulan adalah zat yang bekerja untuk menekan, memperlambat, atau mencegah pembekuan darah, atau agen yang bekerja seperti demikian. Cara kerja antikoagulan yaitu dengan mengikat ion kalsium atau dengan cara menghambat aktivitas dari trombin. *Platelet rich plasma* biasanya menggunakan tabung yang memiliki antikoagulan *Acid Citrate Dextrose* atau Natrium sitrat (Clarissa, Nugraha and Ruddy, 2019). Sangat penting untuk memilih antikoagulan yang mampu mempertahankan fungsionalitas, integritas, dan morfologi platelet sebaik mungkin. Berkenaan dengan jenis antikoagulan yang digunakan, sebagian besar peneliti setuju untuk tidak menggunakan EDTA karena dapat merusak membran platelet (Aminkov k., 2019).

e. Aktivasi platelet pada *Platelet Rich Plasma*

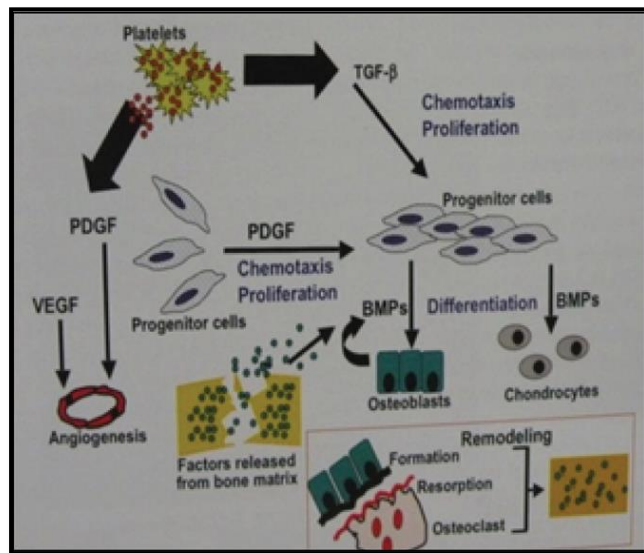
Aktivasi platelet merupakan langkah penting dan integral dalam pemeliharaan hemostasis secara normal. Selama proses ini, platelet menunjukkan kemampuan untuk melekat pada lokasi kerusakan dinding pembuluh darah karena adanya ikatan protein matriks subendotel dengan reseptor glikoprotein pada permukaan platelet. Langkah selanjutnya sebagai hasil aktivasi adalah agregasi platelet dan pembentukan bekuan putih untuk menghentikan pendarahan, dengan partisipasi beberapa reseptor dan ligan seperti *von Willebrand factor*, fibrinogen, dan fibronektin. Aktivasi platelet mengakibatkan perubahan bentuk sel menjadi seperti cakram akibat terbentuknya sejumlah besar pseudopodia aktin, sehingga membentuk agregat satu sama lain dan sel lainnya (Gorodilova *et al.*, 2024). Platelet dapat diaktifkan secara eksogen oleh trombin, CaCl_2 atau trauma mekanis. Kolagen merupakan aktivator alami PRP sehingga bila PRP digunakan pada jaringan lunak tidak perlu diaktifkan secara eksogen. Setelah platelet diaktifkan, jaringan fibrin (fibrinogen-fibrin) mulai terbentuk, memantapkan plasma dan menciptakan bekuan atau membran fibrin

(Dhurat & Sukesh, 2014). *Alpha granule* pada platelet yang inaktif dalam PRP mengandung *growth factors* yang belum berfungsi karena belum dilepaskan atau kontak langsung dengan jaringan. Proses untuk menginisiasi pelepasan *growth factors* ini, platelet harus diaktivasi. Platelet yang telah dipisahkan dari komponen darah lainnya membutuhkan pemicu untuk diaktifkan dalam proses penyembuhan luka serta hemostasis. Aktivasi ini dapat dilakukan dengan bantuan trombin (Everts *et al.*, 2020).

Kontraindikasi terapi PRP mencakup pasien dengan gangguan pendarahan, pasien yang mengkonsumsi obat antikoagulan, dan pasien yang memiliki infeksi atau keganasan. Pasien dengan kondisi medis tertentu, seperti penyakit autoimun atau pasien yang sedang hamil, mungkin bukan kandidat yang ideal untuk terapi PRP. Evaluasi medis menyeluruh diperlukan untuk menentukan kelayakan setiap pasien, dengan mempertimbangkan riwayat medis pasien, status kesehatan saat ini, dan potensi kontraindikasi. Reaksi alergi dapat terjadi jika pasien menunjukkan hipersensitivitas terhadap komponen apa pun dalam PRP atau bahan yang digunakan dalam proses persiapan PRP meskipun minimal dan jarang terjadi (Patel *et al.*, 2023). *Platelet rich plasma* ini harus 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 sebelum menjalani terapi PRP. (Lee & Falowski, 2018).

1.1.3. *Transforming Growth Factors Beta* (TGF- β)

Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) adalah salah satu dari *growth factor* yang berefek penting pada proses penyembuhan luka karena kemampuannya menginduksi akumulasi jaringan konektif dan mengontrol pertumbuhan mikrovaskuler (Putrie *et al.*, 2023). Ada tiga isoform dari TGF- β yakni TGF- β 1 yang mengandung 390 asam amino, TGF- β 2 yang mengandung 412 asam amino dan TGF- β 3 yang mengandung 412 asam amino (Laidling *et al.*, 2020). *Transforming Growth Factor Beta* bertindak sebagai imunomodulator yang ampuh dalam membantu mengatur respons peradangan terhadap cedera dan juga merangsang diferensiasi dari fibroblas menjadi miofibroblas, yang sangat penting untuk proses penyembuhan luka dan remodeling jaringan (Patel *et al.*, 2023). Fungsi dari TGF- β bervariasi dan berefek penting pada proses penyembuhan luka karena kemampuannya menginduksi akumulasi jaringan konektif dan mengontrol pertumbuhan mikrovaskuler (Laidling *et al.*, 2020). *Transforming Growth Factor Beta* juga akan mengaktifkan monosit dalam makrofag untuk meningkatkan respon terhadap inflamasi serta banyak ditemukan pada proses peradangan, angiogenesis dan revitalisasi selama proses penyembuhan luka (Putrie *et al.*, 2023).



Gambar 4. Growth factors yang dilepaskan dari Alpha (α) granules (VEGF = vascular endothelial growth factor, PGDF = platelet-derived growth factor, TGF- β = transforming growth factor). (Sumber : Mohan SP, et al. 2019)

Transforming growth factor beta yang disekresikan kebanyakan disimpan dalam matriks ekstraseluler sebagai protein laten, yaitu kompleks inaktif yang mengandung prekursor TGF- β dan berikatan kovalen dengan *TGF β -binding protein* yang disebut *Latent- TGF- β Binding Protein* (LTBP). Pengikatan LTBP oleh protein matriks *thrombospondin* atau *cell-surface integrin* memicu perubahan konformasi LTBP yang menyebabkan pelepasan TGF- β yang aktif. Alternatif lainnya adalah pemutusan ikatan protein dengan *matriks metalloproteinase* (MMP) yang juga menghasilkan aktivasi TGF- β (Hermendy and Pawarti, 2017). Proses awal penyembuhan luka TGF- β dilepaskan oleh sel monosit yang teraktivasi untuk menstimulasi monosit mengekspresikan sejumlah peptide lainnya seperti TGF- α , IL-1, dan PDGF. *Transforming growth factor beta* selain dilepaskan oleh monosit, juga dilepaskan oleh platelet dan fibroblast dalam luka. *Transforming Growth Factor Beta* merupakan salah satu *growth factor* yang unik karena disekresikan dalam kompleks laten dan disimpan dalam matriks ekstraseluler. Efek biologis dari *growth factor* ini hanya dapat terjadi bila ada aktivasi ligan. Aktivasi TGF- β membutuhkan kompleks ligan yg lebih besar dari matriks ekstraseluler dan proses proteolisis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa TGF- β 1 dapat diaktivasi oleh plasmin, *matriks metalloproteinase*, thrombospondin-1, pH rendah, dan spesies oksigen reaktif. (Xu, Xin, et al., 2018). Latent TGF- β diaktivasi oleh berbagai jalur secara in vivo yaitu :

a. Aktivasi Proteolitik

Plasmin dan *matriks metalloproteinase* telah diidentifikasi sebagai aktivator dari TGF- β yang merupakan enzim primer yang termasuk dalam degradasi matriks

ekstraseluler. Protease dapat memecah ikatan antara TGF- β dan kompleks ligan panjang sehingga dapat mengaktivasi kompleks ligan panjang. Protease dapat membagi *latent associated protease* (LAP) untuk mengeluarkan TGF- β dalam bentuk aktif. (Xu, Xin, et al.,2018)

b. Aktivasi oleh *Thrombospondin-1* (TSP-1)

Thrombospondin-1 adalah kompleks glikoprotein multifungsional yang memediasi interaksi sel ke sel dan sel ke matriks. *Thrombospondin-1* berperan penting dalam proses penyembuhan luka, hemostasis, proliferasi dan adhesi sel, remodeling matriks ekstraseluler, dan aktivasi *growth factor* (misalnya TGF- β). *Thrombospondin-1* juga berperan dalam fibrosis jaringan melalui aktivasi TGF- β . Peran utama dari TSP-1 dalam aktivasi TGF- β melalui mobilisasi molekuler yang diperlukan untuk perbaikan jaringan. Kompleks TGF- β laten, TSP-1 mengaktivasi TGF- β melalui ikatan spesifik antara type 1 repeats 9TSRs dengan LAP dan ligan yang matur. Aktivasi TGF- β yang dimediasi oleh TSP-1 diamati pada fibrosis multiorgan. Ekspresi TSP-1 diinduksi oleh spesies oksigen reaktif, glukosa tinggi, dan angiotensin II. Selain itu, aktivasi TGF- β tersebut juga terlibat dalam proses penyembuhan luka. Hal ini dapat berdampak pada makrofag dan angiogenesis kapiler, dan inflamasi persisten serta granulasi jaringan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa implantasi subkutan dari TSP-1 dapat meningkatkan level TGF- β aktif dan menginduksi migrasi fibroblas. Overekspresi TSP-1 pada *scleroderma* dan keloid menginduksi peningkatan aktivitas TGF- β . Hal ini mendukung keterlibatan TSP-1 terhadap aktivasi TGF- β dalam proses penyembuhan luka dan sklerosis. (Xu, Xin, et al.,2018).

1.1.4. Aktivasi platelet pada Platelet Rich Plasma

Aktivasi merupakan langkah awal sebelum pemanfaatan produk PRP yang dapat dilakukan secara endogen dan eksogen. Aktivasi platelet membuat *alpha granule* akan melepaskan banyak *growth factors* dan sitokin yang berhubungan dengan penyembuhan jaringan yang rusak dan anti-inflamasi, termasuk *growth factors* yang berasal dari platelet (Arita and Tobita, 2024). Platelet mengandung lebih dari 1100 protein termasuk *growth factors*, mediator imun, enzim, penghambat enzim, dan senyawa bioaktif lainnya. Faktor ini dapat meningkatkan perbaikan jaringan melalui berbagai mekanisme termasuk pengaturan regulasi peradangan, angiogenesis, sintesis, dan remodeling jaringan baru. Biomolekul dari PRP diketahui cepat dilepaskan sehingga PRP dapat kehilangan aktivitasnya dalam waktu singkat dan menjadi tantangan dalam praktik klinis (Sc *et al.*, 2016). Platelet ketika diaktivasi maka banyak molekul aktif biologis dilepaskan sehingga sifat platelet inilah yang menentukan kapan waktu yang tepat untuk pemberian terapi PRP. Berbagai *growth factors* dan molekul pro-inflamasi serta anti-inflamasi terletak di lapisan membran sitoplasma, terutama di *alpha granule* dan lisosom, dan intraseluler inilah yang ketika

diaktifkan akan melepaskan molekul yang diperlukan untuk PRP (Gorodilova *et al.*, 2024).

Kolagen dan aktivator trombin mengaktifkan platelet melalui mekanisme yang berbeda, yang mana secara fisiologis aktivasi platelet terjadi setelah kontak dengan dinding pembuluh darah yang terluka dan interaksi selanjutnya dengan kolagen dan *Von Willebrand Factor* (Gorodilova *et al.*, 2024). Aktivasi secara endogen pada PRP masih dalam bentuk belum teraktivasi dan diberikan dengan pertimbangan bahwa platelet secara spontan akan mengalami aktivasi setelah terpapar dengan kolagen. Aktivasi platelet ini memerlukan mekanisme yang lebih lama daripada proses aktivasi platelet yang dimediasi secara eksogen. *Platelet Rich Plasma* yang diaktivasi dengan cara fisiologis akan meningkatkan *growth factors* nya dalam tahap *recovery cells*. Aktivasi ini juga dapat dilakukan secara eksogen salah satunya dengan bantuan trombin tetapi beberapa klinisi lebih suka menyuntikkan PRP dalam bentuk belum teraktivasi (Carvalho *et al.*, 2024). Aktivasi PRP secara eksogen dapat diinduksi oleh *bovine* atau *autologous* trombin, kalsium klorida, dan trauma mekanis (Gorodilova *et al.*, 2024). Penelitian dari *Park and collaborators* menunjukkan bahwa trombin adalah agonis kuat yang menginduksi sitokin dan pelepasan *growth factors* jika dibandingkan dengan kalsium atau kolagen. Setelah aktivasi PRP tercapai, jaringan fibrin mulai terbentuk dengan pelepasan *growth factors* yang banyak dan cepat pada jam pertama, selanjutnya melepaskan sitokin dan *growth factors* yang dihasilkan dari mRNA setidaknya 7 hari berikutnya (Sc *et al.*, 2016). Agen ini menginduksi reaksi koagulasi cepat dalam PRP, yang mengakibatkan degranulasi platelet dan pelepasan *growth factors*. Metode ini sangat cocok untuk praktik klinis di mana aktivasi yang cepat dan tidak rumit diperlukan (Gorodilova *et al.*, 2024).

Aktivasi platelet oleh trombin dimediasi oleh *protease activated receptor* (PAR). Trombin memiliki tiga reseptor pada permukaan platelet yaitu PAR1, PAR4, dan GPIb-IX. Stimulasi dari trombin menyebabkan PAR1 akan membentuk heterodimer dengan PAR4 yang akan meningkatkan pembelahan dari PAR4. Trombin akan mengikat dan memotong *G-protein-coupled receptors* (GPCR) untuk membentuk urutan terminal NH2 baru yang berfungsi sebagai ligan internal yang nantinya akan berinteraksi dan mengaktifkan pensinyalan reseptor. Hubungan antara pensinyalan GPIb-IX yang diinduksi oleh trombin dan pensinyalan PAR diperlukan untuk respon platelet yang optimal (Estevez & Du, 2017). Trombin yang diinduksi akan teraktivasi bergantung pada dosis, dengan PAR-1 yang memediasi aktivasi platelet pada konsentrasi trombin rendah dan PAR-4 pada konsentrasi trombin tinggi (Gorodilova *et al.*, 2024). *Growth factors* yang ada pada platelet akan disekresikan lebih dari 95% dalam 1 jam, dan mengalami proses degranulasi dalam platelet dan sekresi *growth factors* hingga 3-5 hari. Setelah aktivasi dengan trombin *growth factors* tetap aktif selama 7-10 hari. Penurunan dari kadar *growth factors* dapat terjadi setelah dilakukan aktivasi, hal ini kemungkinan terjadi karena *growth factors* lebih banyak terjebak di dalam serat fibrin setelah teraktivasi sehingga terjadi pelepasan dan

degradasi *growth factors* yang lebih lambat (Du, Miao, Li, Shi, & Hu, 2018). Memastikan *growth factors* hanya dilepaskan ketika di jaringan target, maka agregasi dan aktivasi platelet tidak boleh terjadi selama pengambilan darah dan persiapan PRP (Carvalho *et al.*, 2024).

1.1.5. Antikoagulan

Antikoagulan merupakan zat yang digunakan untuk mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat fungsi beberapa faktor pembekuan darah (Abbas A, *et al.*, 2020). Pemilihan antikoagulan yang tepat pada PRP sangat penting untuk menjaga fungsi, integritas, dan morfologi platelet secara optimal. Pemilihan antikoagulan yang tepat merupakan langkah kritis dalam preparasi PRP. Antikoagulan *acid citrate dextrose-A* (ACD-A), *trisodium citrate* (TSC), *citrate phosphate dextrose adenine* (CPDA), heparin, dan EDTA merupakan antikoagulan umum yang digunakan untuk berbagai tujuan preparasi komponen darah. *Acid citrate dextrose-A* memiliki pH lebih rendah dan konsentrasi ion kalsium ekstraseluler lebih rendah dibandingkan TSC sehingga memungkinkan pencegahan agregasi platelet yang lebih baik (Dashore *et al.*, 2021). Terkait dengan pemilihan antikoagulan, sebagian besar ahli menyarankan untuk tidak menggunakan EDTA karena potensinya merusak membran platelet. Antikoagulan yang mengandung sitrat dan dektrosa atau natrium sitrat direkomendasikan untuk pembuatan PRP karena menjaga kualitas platelet. *Commercial kits* PRP sebagian besar menggunakan natrium sitrat dan ACD, namun belum ada kesepakatan mengenai antikoagulan yang paling efektif untuk PRP karena hasil penelitian menunjukkan data yang saling bertentangan terkait tingkat pemulihan platelet dan *growth factors*. Proses persiapan PRP menggunakan antikoagulan untuk *whole blood* yang berfungsi untuk mencegah pembekuan darah dan menjaga platelet dalam keadaan inaktif sehingga mencegah pelepasan *growth factors* sebelum terpapar ke jaringan target. *Acid Citrate Dextrose* sering digunakan untuk mengawetkan darah untuk transfusi, karena dektrosa mendukung metabolisme dan viabilitas sel darah (Carvalho *et al.*, 2024).

Beberapa penelitian, antikoagulan ACD-A lebih unggul daripada *trisodium citrate* (TSC) dan heparin dalam menjaga integritas membran platelet dan mencegah aktivasi platelet yang tidak disengaja selama sentrifugasi. Aktivasi, PRP yang diproduksi menggunakan ACD-A, melepaskan lebih banyak TGF- β 1 secara signifikan dan menghasilkan proliferasi sel stroma sumsum tulang manusia yang lebih baik dibandingkan dengan heparin atau TSC dan antikoagulan lainnya. Penelitian Mussbacher *et al* menilai tingkat aktivasi platelet setelah penyimpanan darah dalam antikoagulan yang berbeda selama 30 menit. Hasilnya, tidak terlihat peningkatan konsentrasi platelet factor 4 (PF4) ketika *citrate theophylline adenosine dipyridamole* (CTAD) dan ACD-A digunakan sebagai antikoagulan yang menunjukkan tidak adanya aktivasi platelet. Natrium sitrat tidak menunjukkan peningkatan konsentrasi PF4 ketika darah disimpan pada suhu 4°C. Temuan ini

menunjukkan keunggulan ACD-A dibandingkan natrium sitrat dalam mencegah aktivasi platelet (Dashore A, *et al.*, 2021).

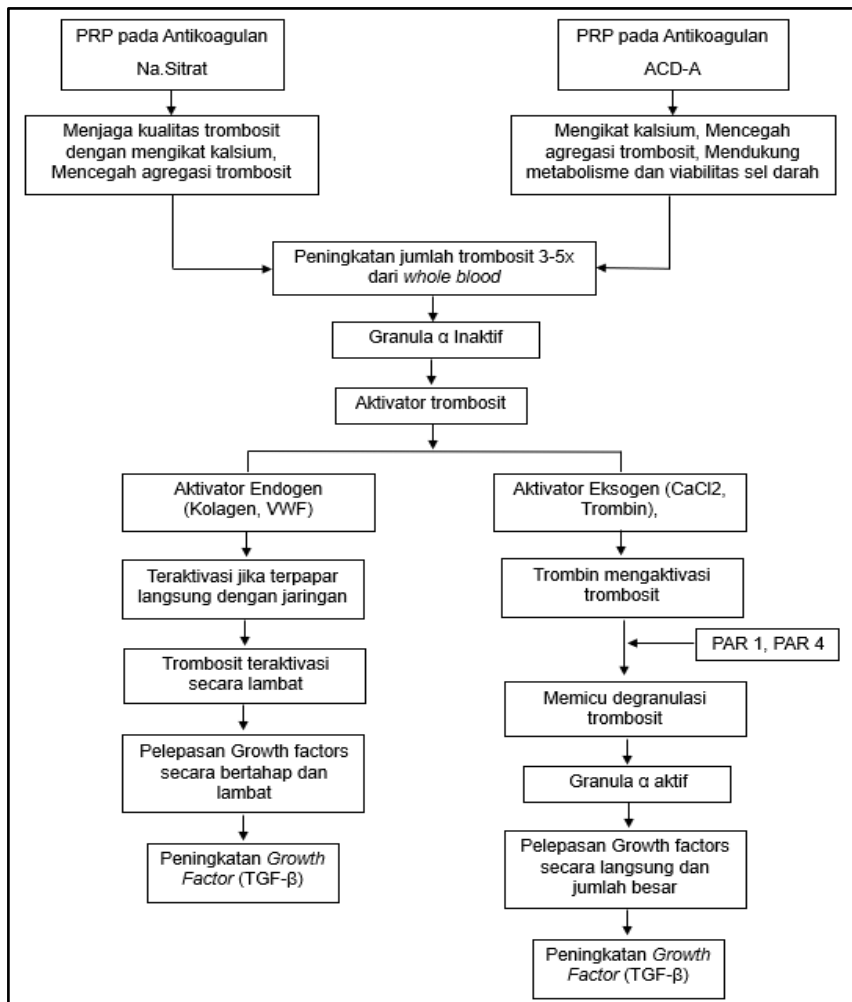
a. Natrium Sitrat

International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) dan *International Society for Thrombosis and Haematology* telah merekomendasikan natrium sitrat sebagai antikoagulan untuk pemeriksaan koagulasi (Kiswari, 2014). Antikoagulan natrium sitrat memiliki mekanisme yang sama dalam mencegah pembekuan darah yaitu dengan cara mengikat ion kalsium menjadi bentuk garam kalsium hingga ion kalsium tersebut tidak dapat melakukan pengaktifan faktor-faktor koagulasi (Yayuningsih dkk, 2017). Natrium sitrat mengikat ion kalsium (Ca^{2+}) esensial untuk faktor koagulasi (II, VII, IX, X), menghentikan kaskade koagulasi ekstrinsik/intrinsik secara reversibel sehingga memungkinkan platelet tetap utuh dan non-aktif selama sentrifugasi serta menghindari pelepasan dini PDGF, TGF- β , VEGF dari *alpha granules*. Saat pengaplikasian, rekalsifikasi (CaCl_2 /trombin) memulihkan Ca^{2+} untuk aktivasi platelet dan agregasi lokal. Kandungan sitrat berguna untuk mengikat kalsium sehingga tidak terjadi aktivitas koagulasi (Nugraha *et al.*, 2012; Dhurat *et al.*, 2014).

b. *Acid Citrate Dextrose* (ACD)

Antikoagulan yang direkomendasikan pada pembuatan PRP adalah ACD yang merupakan *gold standar*. Antikoagulan ACD khususnya formula ACD-A, bekerja pada pembuatan PRP dengan mencegah koagulasi darah serta mempertahankan viabilitas dan aktivitas biologis platelet. Komponen sitrat mengikat ion kalsium (Ca^{2+}) secara reversibel, menghambat aktivasi faktor koagulasi (II, VII, IX, X) sehingga darah tidak beku selama pengambilan dan sentrifugasi tanpa mengaktifkan platelet. *Acid Citrate Dextrose-A* memiliki pH yang lebih rendah dan konsentrasi ion kalsium ekstraseluler yang lebih rendah sehingga hal ini memungkinkan mencegah agregasi platelet yang lebih baik. Dekstrosa berfungsi sebagai sumber energi glukosa melalui glikolisis anaerob, menjaga membran platelet utuh dan sekresi *growth factors* (PDGF, TGF- β) lebih optimal (Dhurat *et al.*, 2014).

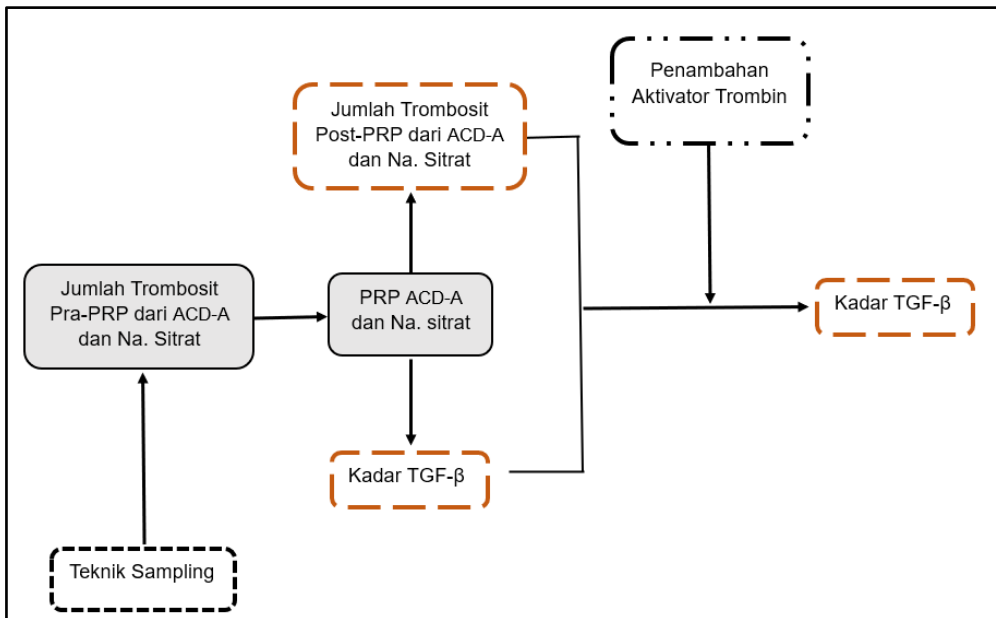
1.1.6. Kerangka Teori



Keterangan :

ACD-A	: Acid Citrate Dextrose A
TGF-β	: Transforming Growth Factor-β
VWF	: Von Willebrand Factor
PAR	: Protease Activated Receptor

1.1.7. Kerangka Konsep



Keterangan :



: Variabel bebas



: Variabel tergantung



: Variabel Antara



: Variabel Perancu

1.2. Rumusan Masalah

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

“Bagaimanakah pengaruh aktivator trombin terhadap kadar TGF- β pada PRP dengan antikoagulan natrium sitrat dan ACD-A?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis perbedaan kadar TGF- β pada PRP dengan antikoagulan natrium sitrat dan ACD-A setelah penambahan aktivator trombin

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Diketahui jumlah platelet pada antikoagulan Natrium Sitrat dan antikoagulan ACD-A sebelum dan sesudah PRP
- b. Diketahui kadar TGF- β pada PRP dengan menggunakan antikoagulan Natrium Sitrat dan antikoagulan ACD-A sebelum dan sesudah aktivator trombin
- c. Menganalisis kadar TGF- β pada PRP dengan menggunakan antikoagulan natrium sitrat sebelum dan sesudah pemberian aktivator trombin
- d. Menganalisis kadar TGF- β pada PRP dengan menggunakan antikoagulan ACD-A sebelum dan sesudah pemberian aktivator trombin

1.4. Hipotesis Penelitian

- a. Terdapat perbedaan jumlah platelet pada PRP yang menggunakan antikoagulan natrium sitrat dan antikoagulan ACD-A sebelum dan sesudah PRP.
- b. Terdapat perbedaan kadar TGF- β pada PRP yang menggunakan antikoagulan natrium sitrat dan antikoagulan ACD-A setelah pemberian aktivator trombin.

1.5. Manfaat Penelitian

- a. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh penggunaan antikoagulan natrium sitrat dan ACD-A serta penambahan aktivator trombin terhadap kadar TGF- β pada PRP
- b. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan standar operasional yang baku dalam pengelolaan/pembuatan PRP untuk diaplikasikan secara klinis

BAB II METODE PENELITIAN

2.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Instalasi Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Universitas Hasanuddin untuk pengambilan sampel, pemeriksaan Darah lengkap serta pembuatan PRP, dan Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) untuk pemeriksaan kadar TGF- β . Penelitian dilakukan pada tanggal 31 Oktober 2025 sampai selesai.

2.2. Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan berbagai alat dan bahan untuk mendukung proses pengumpulan dan analisis data. Alat yang digunakan menggunakan metode ELISA. Formulir *informed consent* disiapkan untuk pengumpulan data administratif dan evaluasi volunteer pada penelitian ini. Perlengkapan pengambilan darah seperti alkohol swab, jarum, kapas, dan tabung vakutainer. Penelitian ini juga menggunakan form pengumpulan data dan kode subjek untuk menjaga identitas dan kerahasiaan volunteer pada penelitian ini.

2.3. Metode Penelitian

2.3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *Experimental Laboratory* yang bertujuan untuk menganalisis perbedaan kadar TGF- β pada PRP dengan antikoagulan natrium sitrat dan ACD-A setelah penambahan aktivator trombin.

2.3.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian adalah volunteer yang merupakan individu sehat. Sampel penelitian adalah populasi terjangkau yang memenuhi kriteria penelitian (kriteria inklusi). Pengumpulan sampel dilakukan dengan cara *consecutive sampling* yaitu semua volunteer yang memenuhi kriteria penelitian dimasukkan dalam sampel penelitian sampai besar sampel yang diperlukan terpenuhi.

2.3.3. Kriteria Inklusi

- a. Individu sehat usia 18-40 tahun.
- b. Tidak mengonsumsi obat-obatan yang mempengaruhi platelet seperti trombolitik atau *Non Steroid Anti Inflammatory Drug* (NSAID) minimal 7 hari sebelum pengambilan darah
- c. Individu yang tidak memiliki kelainan fungsi platelet yang diketahui melalui anamnesis
- d. Bersedia menjadi volunteer dalam penelitian dengan mengisi dan menandatangani *informed concent*.

2.3.4. Kriteria Eksklusi

- Sampel plasma ikterik, lipemik dan hemolisis dan tidak dapat dilakukan pengambilan sampel ulang
- Individu yang memiliki jumlah platelet awal $<150.000/\mu\text{L}$ dan $>400.000/\mu\text{L}$

2.3.5. Perkiraan Besaran Sampel

Menurut Frederer, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental adalah:

$$(\sum N-1) (r-1) \geq 15 \text{ atau}$$

$$r \geq \frac{15}{\sum N - 1} + 1$$

Keterangan:

$\sum N$: Jumlah perlakuan/intervensi

r : Jumlah repetisi untuk setiap perlakuan/intervensi

$$r \geq \frac{15}{\sum N - 1} + 1$$

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

$$r \geq 16$$

2.3.6. Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini akan dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, seluruh data yang diperoleh dari formulir pengumpulan data dan hasil laboratorium dikoding dan dimasukkan ke dalam perangkat lunak pengolahan statistik, yaitu SPSS versi 25.0. Untuk data numerik seperti jumlah platelet dan kadar TGF- β , apabila didistribusikan secara normal, maka akan dianalisis menggunakan *paired t-test* untuk melihat perbedaan rerata sebelum dan sesudah aktivasi trombin. Namun, jika data tidak berdistribusi normal maka digunakan uji non-parametrik *Wilcoxon signed-rank test* sebagai alternatif. Nilai $p < 0,05$ akan dianggap bermakna secara statistik dalam penelitian ini.

2.3.7. Izin Studi dan Kelayakan Etik Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan nomor 589/UN4.6.4.5.31/PP36/2025

Informed consent tertulis diperoleh dari seluruh volunteer pada penelitian ini sebelum dilakukan intervensi. Data volunteer dijaga kerahasiaannya dan hanya digunakan untuk keperluan akademik

2.4. Pelaksanaan Penelitian

2.4.1. Alokasi Subyek

Penelitian dilakukan pada volunteer yang merupakan individu sehat dan memenuhi kriteria inklusi di Laboratorium Patologi Klinik RS UNHAS.

2.4.2. Cara Penelitian

- a. Dilakukan pencatatan identitas volunteer
- b. Memberikan penjelasan lengkap mengenai apa yang akan dilakukan terhadap mereka dan apabila setuju mereka akan mengisi dan menandatangani *informed consent*
- c. Subyek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi akan dilakukan pengambilan darah vena tabung dengan antikoagulan ACD-A 8 cc sebanyak 2 buah dan tabung dengan antikoagulan Na.Sitrat 2,7 cc sebanyak 3 buah.
- d. Kadar platelet dihitung pada masing-masing tabung sebelum diberi perlakuan sentrifugasi. Jika kadar platelet $< 150.000/\mu\text{l}$ dan $> 400.000/\mu\text{l}$ maka sampel di eksklusi. Jika kadar platelet normal ($150.000/\mu\text{l} - 400.000/\mu\text{l}$), maka dilanjutkan dengan prosedur berikutnya
- e. Cara pengolahan sampel pada tabung ACD-A dan Na Sitrat :
 - 1) Siapkan darah vena pada tabung ACD-A dan Na. Sitrat;
 - 2) Jangan dinginkan darah tersebut sebelum atau selama pemisahan platelet;
 - 3) Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 637 g (2100 RPM) selama 8 menit pada tabung Na Sitrat; dan sentrifugasi dengan kecepatan 1767 g (3500 RPM) selama 8 menit pada tabung ACD-A
 - 4) 2/3 bagian atas adalah PPP (platelet poor plasma) sedangkan 1/3 bagian bawah adalah PRP (platelet rich plasma)
 - 5) Ambil PPP dengan perlahan lahan dengan menggunakan spuit hingga tersisa 1/3 bagian bawah yang merupakan PRP;
 - 6) Homogenkan PRP
- f. PRP yang dihasilkan dari tabung ACD-A dan tabung Na.Sitrat di periksakan platelet dan TGF- β sebelum penambahan aktivator trombin.
- g. PRP didiamkan di suhu ruang selama 15 menit dan ditambahkan aktivator trombin dengan perbandingan 1:10. Pemeriksaan kadar TGF- β dilakukan lagi setelah 1 jam pemberian aktivator trombin pada PRP yang dihasilkan dari tabung ACD-A dan tabung Na.Sitrat. Pemeriksaan TGF- β dengan

metode ELISA di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center*

2.5. Prosedur Pemeriksaan Laboratorium

2.5.1. Jumlah Platelet

- a. Persiapan Sampel
 - 1) Sampel darah dari tabung ACD-A dan tabung Na.Sitrat
 - 2) Anamnesis mengenai riwayat perdarahan, obat yang dikonsumsi dan riwayat transfusi darah
- b. Alat dan bahan Penelitian

Alat : Mindray BC-700 auto hematology analyzer

Bahan : *Whole blood* dalam tabung ACD-A dan tabung Na.Sitrat

Reagen :

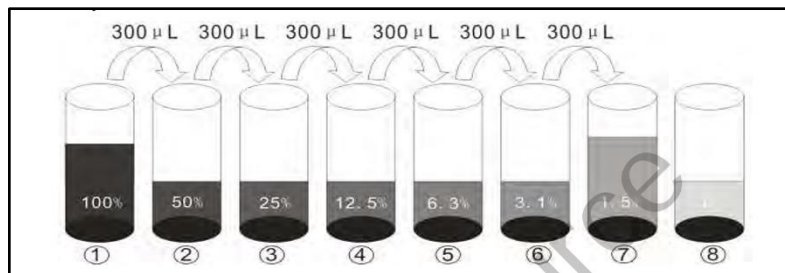
- Cellpack DCL	- Flurocell WNR
- Cellpack DST	- Flurocell WDF
- Cellpack DFL	- Flurocell RET
- Sulfolyser	- Flurocell PLT
- Lysercell WNR	- Cellclean
- Lysercell WDF	- XN Checch
- Lysercell WPC	- XN Calibrator
- c. Prinsip Tes

Pemeriksaan jumlah platelet adalah menggunakan prinsip variasi impedansi. *Electronic field* dibangkitkan disekitar celah mikro di dalam ruang dimana sel-sel darah dilewatkan, RBC dan PLT memiliki variasi impedansi yang spesifik.
- d. Cara Kerja
 - 1) Alat dinyalakan dengan menekan tombol power, tunggu sampai proses start up alat selesai (lampu instrument menyala berwarna hijau)
 - 2) Lakukan kontrol pada alat sebelum sampel pasien diperiksa
 - 3) Pada menu dipilih Worklist, kemudian pilih Regist dan masukkan barcode.
 - 4) Pada pilihan pemeriksaan centang pilihan PLT+Diff
 - 5) Identitas pasien dimasukkan, lalu tekan OK.
 - 6) Dipilih menu Manual analysis button, kemudian masukkan kembali nomor rekam medis pasien.
 - 7) Dipilih pemeriksaan yang diinginkan PLT, Diff_
 - 8) Sampel dimasukkan kedalam sample tray, kemudian tekan tombol start.
 - 9) Hasil pemeriksaan akan keluar secara otomatis
- e. Nilai Rujukan

PLT : $150-400 \times 10^3/\mu\text{L}$

2.5.2. Kadar TGF- β

- a. Persiapan Sampel
Siapkan sampel PRP dari tabung Na.sitrat dan ACD-A. Ambil sampel dan segera lakukan pengujian atau sampel dapat disimpan pada suhu -20°C atau -80°C (1-3 bulan)
- b. Alat dan Bahan Penelitian
 - i. Alat :
 - Mikropipet dan tip pipet sekali pakai
 - Inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
 - Tabung bersih
 - Kertas saring
 - Air suling
 - Spektrofotometer panjang gelombang $450 \pm 10 \text{ nm}$.
 - ii. Bahan
 - Spesimen Platelet Rich Plasma (PRP)
 - Reagen Human TGF- β ELISA kit (MyBioSource., 2021)
 - iii. Persiapan Reagen
 - a) Semua reagen harus dikeluarkan dari lemari es 20 menit sebelum digunakan dan mulai pengujian setelah mencapai suhu ruangan.
 - b) Encerkan larutan pencuci dengan air suling (1:25), setelah itu simpan kembali sisa larutan ke dalam kotak
 - c) Larutan standar : Tambahkan 1.0 mL pengencer standar ke dalam vial standar liofilisasi dan diamkan selama 30 menit. Setelah standar benar-benar larut, homogenkan kembali dan beri label pada tabung. Disarankan untuk menggunakan konsentrasi larutan standar : 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 pg/mL.
Catatan : Pastikan larutan standar liofilisasi benar-benar larut dan tercampur rata
 - d) Metode pengenceran standar sampel : Ambil 7 tabung bersih dan beri label dengan konsentrasi yang diharapkan (500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 0 pg/mL). Tambahkan 300 μL Pengencer Standar ke setiap tabung. Pipet 300 μL pengencer dari standar yang telah dilarutkan dan tambahkan ke tabung berlabel 500 pg/mL, lalu aduk rata. Pipet lagi 300 μL pengencer dari tabung 500 pg/mL, lalu tambahkan ke tabung 250 pg/mL, dan aduk rata. Ulangi langkah-langkah ini hingga standar 15,6 pg/mL. Pengencer Standar dalam tabung 0 pg/mL adalah kontrol negatif.



- e) Biotinylated Antibody : Ambil volume larutan Biotinylated Antibody yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji, dan encerkan dengan pengencer antibodi dengan perbandingan 1:100. Ini harus disiapkan 30 menit sebelumnya dan sangat disarankan untuk tidak menggunakannya kembali untuk pengujian tambahan.
- f) Enzyme Conjugate : Ambil larutan Enzyme Conjugate dalam jumlah yang sesuai dengan jumlah sumur yang akan diuji, dan encerkan dengan pengencer enzim dengan perbandingan 1:100. Ini harus disiapkan 30 menit sebelumnya dan sangat disarankan untuk tidak menggunakannya kembali untuk pengujian tambahan.
- g) Color Reagent : Siapkan larutan Color Reagent 30 menit sebelumnya dengan menambahkan Color Reagent A dan Color Reagent B dengan perbandingan 9:1.
- h) Metode Pencucian :
 - Automatic plate washing : Jumlah buffer pencuci yang dibutuhkan adalah 350 μ L, dan interval injeksi dan ekstraksi sebaiknya sekitar 20-30 detik. Harap pahami dengan baik cara pengoperasian sebelum menggunakan mesin ini.
 - Manual plate washing : tambahkan 350 μ L larutan pencuci ke setiap sumur dan diamkan selama 30 detik. Goyangkan pelat untuk menghilangkan cairan sebanyak mungkin, dan tepuk-tepuk pelat dengan kertas penyerap jika perlu. Selama proses pencucian pelat, harap perhatikan langkah-langkah penambahan larutan pencuci untuk menghindari kontaminasi dan perpindahan antar sumur. (MyBioSource., 2021)

c. Prinsip Tes

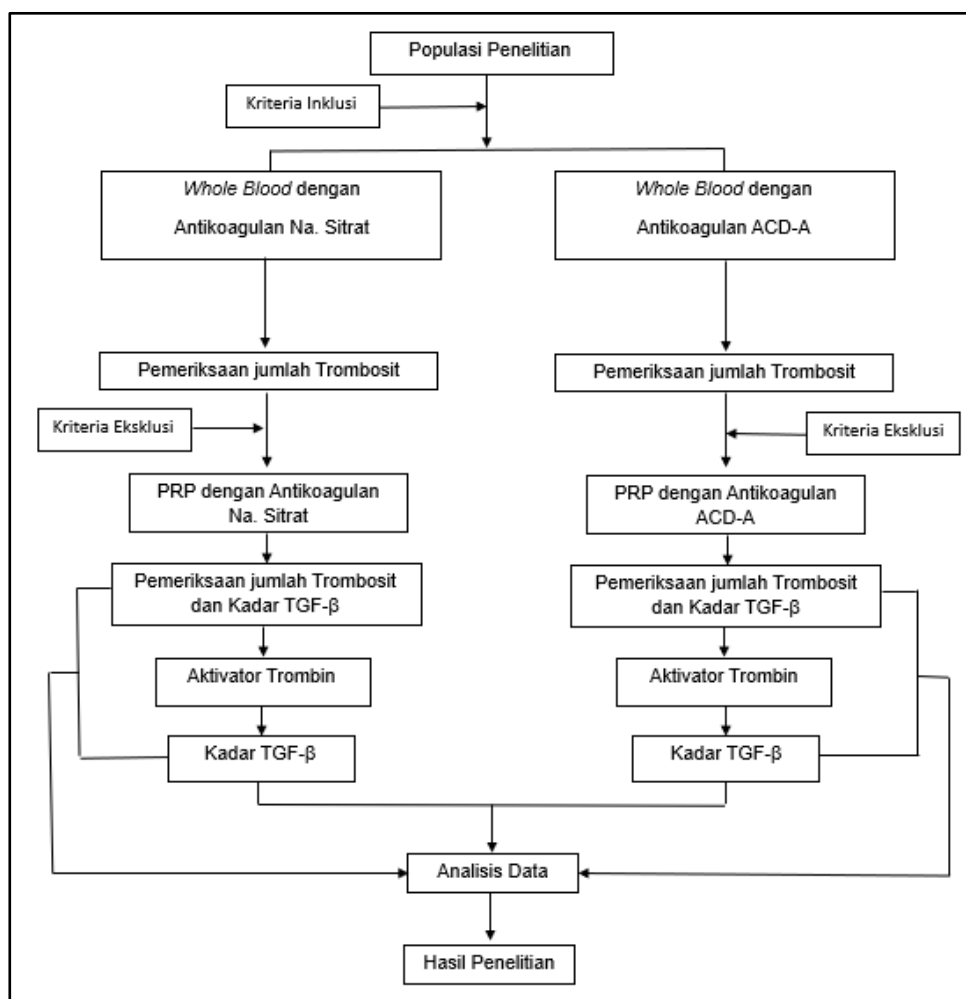
Pemeriksaan menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Plate telah dilapisi dengan antibodi *Human TGF- β . Transforming Growth Factor Beta* yang terdapat dalam sampel akan berikatan dengan antibodi pada sumur tes. Antibodi *Human TGF- β* yang terbiotinilasi kemudian ditambahkan dan selanjutnya berikatan dengan *Human TGF- β* sampel membentuk kompleks antibodi TGF- β -antibodi terbiotinilasi (sandwich). *Streptavidin HRP* ditambahkan ke dalam sumur

tes dan berikatan dengan antibodi *Human* TGF- β terbiotinilasi. *Streptavidin-HRP* yang tidak terikat dengan antibodi *Human* TGF- β terbiotinilasi terbuang melalui proses pencucian. Larutan substrat ditambahkan ke dalam sumur tes dan menyebabkan terbentuknya warna dengan intensitas yang sesuai dengan kadar TGF- β . Reaksi ini dihentikan dengan menambahkan larutan asam (stop solution) dan konsentrasi larutan kemudian dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.

d. Cara Kerja

- Semua reagen disiapkan, larutan standar dan sampel. Semua reagen sebaiknya didiamkan pada suhu kamar sebelum digunakan.
- Jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian ditentukan. Masukkan strip ke dalam bingkai untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada 2-8°C.
- Ditambahkan 50 μ L larutan standar ke dalam sumur standar. Perhatikan untuk tidak menambahkan antibodi ke dalam sumur karena larutan standar mengandung antibodi biotinilasi.
- Ditambahkan 50 μ L sampel ke sumur sampel dan kemudian tambahkan 100 μ L antibodi human anti- TGF β ke sumur sampel, kemudian tambahkan 100 μ L *streptavidin-HRP* ke sumur sampel dan sumur standar (Tidak pada sumur kontrol). Campurkan dengan baik. Tutupi plate dengan *sealer* dan inkubasi selama 120 menit pada suhu 37°C.
- *Sealer* dilepaskan dan cuci plate 4 kali dengan buffer pencuci. Rendam sumur dengan minimal 0,35 mL *buffer* pencuci selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi semua sumur dan cuci 5 kali dengan *buffer* pencuci kemudian rendam sumur dengan *buffer* pencuci. Keringkan plate dengan kertas saring.
- Ditambahkan 100 μ L larutan substrat D ke setiap sumur dan kemudian tambahkan 100 μ L larutan substrat D ke setiap sumur standar. Inkubasi plate yang sudah ditutup dengan *sealer* yang baru selama 10 menit pada suhu 37°C dalam ruang gelap.
- Ditambahkan 100 μ L *stop solution* ke setiap sumur, warna biru akan berubah menjadi kuning dengan segera.
- Ditentukan *optical density* (nilai OD) dari setiap sumur segera menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm dalam waktu 10 menit setelah penambahan *stop solution*.

2.6. Skema Alur Penelitian



2.7. Definisi Operasional dan Kriteria Obyektif

- a. *Platelet Rich Plasma* (PRP) merupakan produk darah yang diambil dari pasien itu sendiri (autologous), yang terdiri dari sejumlah plasma dalam jumlah sedikit dengan kandungan konsentrasi platelet atau platelet yang cukup tinggi yakni 3 sampai 5 kali lebih tinggi dan didapatkan melalui proses sentrifugasi dari sediaan *whole blood*.
- b. Platelet adalah keping darah pembeku dengan ukuran lebih kecil daripada sel yang lain dan berjumlah sekitar $150-400 \times 10^3/\mu\text{L}$ pada orang dewasa.
- c. *Transforming Growth Factor Beta* merupakan salah satu dari *growth factor* yang berefek penting pada proses penyembuhan luka karena kemampuannya menginduksi akumulasi jaringan konektif dan mengontrol pertumbuhan mikrovaskuler. Kadar growth factor TGF- β dalam sampel PRP diukur dengan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (by MyBioSource), satuannya dinyatakan dalam pg/mL.
- d. Aktivator Trombin adalah protease serin yang berasal dari protrombin yang mengkatalisis konversi fibrinogen menjadi fibrin, mengaktifkan platelet dan mengakibatkan pelepasan isi granula.
- e. Natrium sitrat merupakan sitrat yang paling umum digunakan. Antikoagulan sitrat mencegah pembekuan darah dengan cara mengikat kalsium. Tabung natrium sitrat memiliki penutup berwarna biru muda.
- f. *Acid Citrat Dextrose A* (ACD-A) merupakan antikoagulan yang terdiri dari asam sitrat untuk mencegah koagulasi dengan cara mengikat kalsium tanpa banyak memengaruhi sel dan platelet, serta dektrosa yang berfungsi sebagai nutrisi dan pengawet sel darah merah dengan menjaga viabilitasnya. Tabung ACD-A memiliki tutup berwarna kuning.