

NASKAH PUBLIKASI

**PENGARUH INKORPORASI PRP PADA PERANCAH KORAL
BUATAN CaCO_3 TERHADAP PROFIL DEGRADASI**



Disusun oleh

NADYA KHAIRUNNISA

20130340114

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA**

2017

THE EFFECTS OF INCORPORATION PRP TOWARDS DEGRADATION PROFILE OF SYNTHETIC CORAL CaCO_3

Erlina Sih Mahanani¹, Nadya Khairunnisa²

¹Dental School, Faculty of Medicine and Health Science UMY

²Student of Dentistry, Faculty of Medicine and Health Science UMY

ABSTRACT

Degradation of scaffold is an important factor in the tissue engineering to form a newly tissue. Platelet-rich plasma (PRP) is one of bloods component which nourished by growth factor. Hydrogel scaffold degradation process which incorporated with PRP at the same time also created growth factor that is made by PRP. Aimed of this study is to develop the respons of PRP to the degradation profile on CaCO_3 scaffold.

*Platelet-rich plasma preparation was use the method from Tabata by double-spinning method. Blood was taken from lateral vein of wistar rats (*rattus norvegicus*). Six synthetic coral scaffolds were divided into two groups. First is PRP incorporation group ($n=3$) and the second is synthetic coral scaffolds without PRP as the control ($n=3$). Synthetic coral scaffolds dipped into $75\mu\text{l}$ of PRP for 15minutes. Incorporated and non-incorporated PRP on both sides were placed in 1 ml of PBS then incubated for 1 hours at 37°C . At different time intervals 1, 3, 6, 24, 48 and 96 hours the solution supernatant was removed and replaced with the same volume of fresh PBS solution. After 96 hours the solutions were changed with HCl 1N for accelerate solutions the incubated at same time intervals like PBS.*

The Independent T test showed no significant different on both incorporat^led or non-incorporated PRP. Meanwhile, based on the average graphic percentage a degradation showed movement on scaffolds curves without non-incorporated PRP was lesser than incorporated PRP. The conclusion, this thesis explains the influences of incorporated PRP with CaCo_3 scaffolds on degradation profile.

Keywords: Tissue Engineering, artificial scaffolds CaCo_3 , Platelet-rich plasma, Degradation

PENGARUH INKORPORASI PRP PADA PERANCAH KORAL BUATAN CaCO_3 TERHADAP PROFIL DEGRADASI

Erlina Sih Mahanani¹, Nadya Khairunnisa²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran dan Kesehatan UMY

²Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran dan Kesehatan UMY

INTISARI

Degradasi perancah merupakan salah satu faktor penting pada rekayasa jaringan untuk proses pembentukan jaringan baru. *Platelet-rich plasma* (PRP) merupakan komponen darah kaya akan *growth factor*. Proses degradasi perancah hidrogel yang diinkorporasikan dengan PRP terjadi bersamaan dengan perilsian *growth factor* yang di hasilkan oleh PRP.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh inkorporasi PRP terhadap proses degradasi perancah koral buatan CaCO_3 . Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium *in vitro*. *Platelet-rich plasma* dibuat berdasar metode Tabata yaitu dengan metode *double spinning*. Darah diambil dari tikus wistar melalui vena lateral ekor. Perancah dibagi menjadi dua kelompok yaitu perancah inkorporasi PRP (n=3) dan perancah non-inkorporasi PRP sebagai control (n=3). Perancah diinkorporasikan dengan PRP dengan mencelupkan perancah kedalam 75 μ l PRP selama 15menit. Perancah inkorporasi dan non-inkorporasi PRP di inkubasi selama 1jam. Setiap interval waktu yaitu pada jam ke 1, 3, 6, 24, 48 dan 96 larutan PBS diganti yang baru dengan volum yang sama. Setelah jam ke-96 larutan diganti dengan HCl 1N sebagai larutan akselerasi kemudian diinkubasi pada interval waktu yang sama seperti PBS.

Analisis data dengan *Independent sample t Test*. Hasil analisis data menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara perancah yang diinkorporasi PRP dengan perancah tanpa inkorporasi. Namun berdasarkan grafik rata-rata persentase degradasi terlihat pergerakan kurva perancah tanpa inkorporasi PRP lebih pendek dibandingkan dengan perancah inkorporasi PRP. Kesimpulan dari penelitian ini terdapat pengaruh PRP yang diinkorporasi dengan perancah koral buatan CaCO_3 terhadap profil degradasi.

Kata kunci: Rekayasa Jaringan, Perancah koral buatan CaCO_3 , *Platelet-rich plasma*, Degradasi.

1. Pendahuluan

Kerusakan jaringan tulang di bidang kedokteran gigi biasanya di sebabkan pengambilan jaringan yang cukup besar bisa di sebabkan karena tumor, abnormalitas kongenital, trauma, fraktur, ataupun periodontitis. Tubuh manusia mempunyai kemampuan untuk merekonstruksi tulang kembali, namun pada kerusakan yang cukup luas di perlukan intervensi untuk proses rekonstruksi tulang. Mengatasi hal tersebut maka di kembangkanlah suatu teknologi untuk merekonstruksi tulang yaitu dengan teknik rekayasa jaringan atau '*Tissue Engineering*'. Rekayasa jaringan atau '*Tissue Engineering*' adalah regenerasi jaringan pada tubuh yang melibatkan sel-sel, mediator biologik, seperti *growth factors* atau matriks biologi yang dapat di implementasikan pada tubuh manusia. Rekayasa jaringan umumnya di pengaruhi 3 elemen yaitu perancah (*scaffold*), *growth factors*, dan sel¹.

Biodegradasi artinya perancah harus dapat berdegradasi pada saat proses regenerasi bagian yang rusak telah selesai. Kecepatan degradasi dari perancah harus diatur sedemikian rupa sesuai dengan kecepatan pertumbuhan jaringan baru, agar pada saat proses regenerasi selesai perancah sudah benar-benar terdegradasi. Mekanisme terjadinya degradasi melibatkan proses secara fisik maupun secara kimia².

Platelet-rich plasma (PRP) merupakan komponen darah kaya akan trombosit dan *growth factors* yang dapat meningkatkan penyembuhan tulang dan membantu dalam proses regenerasi jaringan³. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Matsui dan Tabata proses degradasi perancah hidrogel yang diinkorporasikan dengan PRP terjadi bersamaan dengan perilsan growth factor yang di hasilkan oleh PRP⁴. Degradasi perancah merupakan parameter penting dalam proses terbentuknya jaringan baru².

Penelitian ini menginkorporasikan PRP dengan perancah koral buatan CaCO_3 kemudian mengamati profil degradasinya untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh PRP terhadap degradasi perancah yang digunakan.

2. Metode dan Meterial

Desain penelitian ini adalah eksperimental murni secara laboratoris *in vitro*. Penelitian dilakukan di laboratorium biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2.1. Persiapan perancah

Perancah yang digunakan adalah perancah koral buatan CaCO_3 yang dikembangkan oleh tim peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Perancah yang digunakan berjumlah 6 sampel kemudian dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama dengan inkorporasi PRP dan kelompok kedua tanpa inkorporasi PRP. Sebelum diinkorporasi berat perancah distabilkan terlebih dahulu dengan cara dioven (Memmert, *Germany*) pada suhu 50°C . Setelah itu, berat perancah disamakan masing 10mg.

2.2. Persiapan PRP

Darah yang digunakan untuk pengolahan PRP diambil dari tikus wistar *rattus norvegicus*). Lima belas ekor tikus wistar diambil darahnya melalui vena lateral ekor kemudian dikumpulkan dalam tabung *vacuntainer* ACD. Darah sebanyak 50 μl diambil untuk pemeriksaan *whole blood* di laboratorium patologi Universitas Gadjah Mada. Sisa darah yang tersedia kemudian diolah dengan metode *double-spinning* dari Matsui dan Tabata⁴. Darah dimasukkan kedalam mikrotube sebanyak 1ml kemudian disentrifugasi dua kali. Sentrifugasi pertama dilakukan dengan kecepatan 450 rcf/g selama tujuh menit pada suhu 4°C . Setelah sentrifugasi pertama dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy*

coat, dan eritrosit. Plasma dari bagian atas *microtube* diambil dengan *micropipette*, kemudian ambil bagian lapisan putih tipis diatas eritrosit dan pindahkan kedalam *microtube* 1,5 ml yang kering dan steril. Setelah lapisan putih terkumpul dalam mikrotub kemudia dilakukan sentrifugasi kedua dengan kecepatan 1600 rcf/g selama lima menit pada suhu 4°C. Setelah sentrifugasi kedua dilakukan akan terlihat tiga lapisan darah yaitu plasma, *buffy coat*, dan eritrosit. Plasma dibagian atas *microtube* diambil terlebih dahulu dengan *micropipette*. *Buffy coat* yang terletak pada bagian tengah diambil dengan menggunakan *micropippet* dan dipindahkan kedalam *microtube* baru yang kering dan steril. *Buffy coat* itu merupakan fase kaya platelet (PRP). *Platelet-rich plasma* yang telah selesai diolah kemudian diambil sebanyak 50µl untuk diperiksa jumlah plateletnya di laboratorium patologi Universitas Gadjah Mada .

2.3. Inkorporasi PRP

Perancah diinkorporasikan dengan PRP melalui metode celup. *Platelet-rich plasma* diambil dengan mikropipet sebanyak 40µl kemudian diletakkan kedalam mikrotube. Masukkan perancah kedalam mikrotube yang berisi PRP sampai perancah tertutup seluruhnya dengan PRP kemudian diamkan selama 15menit.

2.4 In vitro degradasi

Perancah yang telah diinkorporasi masing-masing dipindahkan kedalam mikrotub yang baru lalu diisi dengan larutan PBS sebanyak 1,5ml. Perancah tanpa inkorporasi masing-masing dimasukkan kedalam mikrotub lalu diisi dengan larutan PBS (*phospate-buffer saline*) sebanyak 1,5ml dan diinkubasi (*Mammert, Germany*) selama 1, 3, 6, 24, 48, 72 dan 96 jam pada suhu 37⁰C. Setiap interval waktu perancah disentrifugasi lalu larutan supernatan diambil dan dipindahkan kedalam kuvet spektrofotometer untuk diamati nilai absorbansi melalui spektrofotometer

UVmini-1240 Shimadzu dengan panjang gelombang 280nm lalu perancah diisi lagi dengan larutan PBS yang baru, hal tersebut dilakukan sampai jam ke-96. Setelah 96 jam, larutan PBS diganti dengan larutan akselerasi HCl 1N sebanyak 1,5ml dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1, 3, 6, 24, 48, 72 jam, dan seterusnya sampai perancah habis terdegradasi. Setiap interval waktu perancah disentrifugasi lalu larutan supernatan diambil dan dipindahkan kedalam kuvet spektrofotometer untuk diamati nilai absorbansi melalui spektrofotometer dengan panjang gelombang 280nm lalu perancah diisi lagi dengan larutan HCl 1N yang baru, hal tersebut dilakukan sampai perancah habis terdegradasi. Nilai persentase absorbansi perancah kemudia di hitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ degradasi membran per jam } X = \frac{\text{nilai absorbansi ke } X}{\text{nilai absorbansi } 100\%} \times 100\%$$

X=waktu perendaman

3. Hasil Penelitian

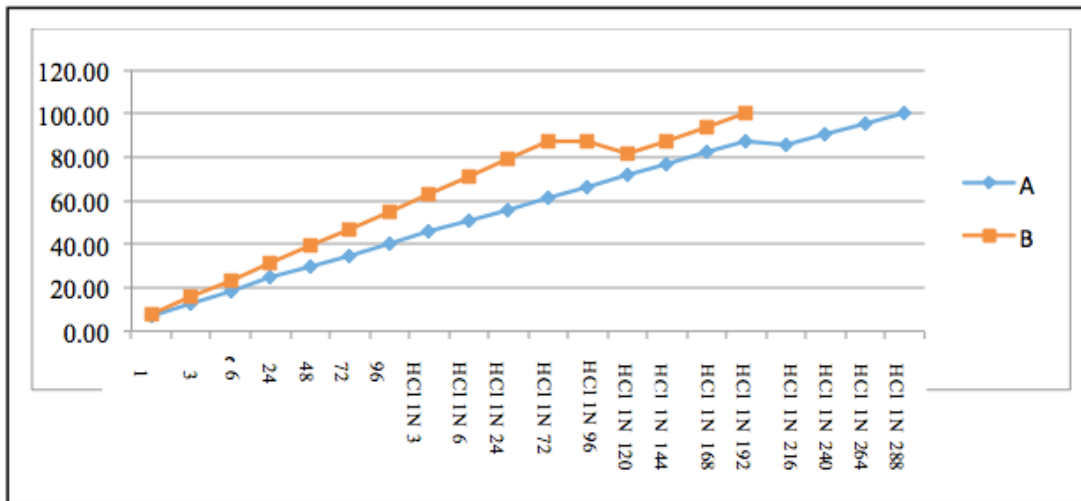
Nilai hasil perhitungan persentase degradasi perancah dapat dilihat melalui Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Absorbansi

Nilai Absorbansi Jam ke-	Kode Sampel					
	A1	A2	A3	B1	B2	B3
1	3,547	3,457	3,322	2,687	2,685	2,665
3	2,874	3,065	3,241	2,648	2,634	2,640
6	3,004	2,951	2,997	2,633	2,633	2,639
24	3,377	3,377	3,212	2,690	2,690	2,695
48	2,937	2,913	2,064	2,713	2,748	2,705
72	2,901	1,487	2,900	2,429	2,798	2,709
96	2,787	2,851	2,906	2,729	2,757	2,763
HCl 1N 3	2,902	2,761	2,914	2,749	2,832	2,819
HCl 1N 6	2,746	2,701	2,716	2,692	2,838	2,681
HCl 1N 24	2,714	2,662	2,698	2,673	2,707	2,686
HCl 1N 72	2,703	2,752	2,714	2,706	2,672	2,684
HCl 1N 96	2,674	2,667	2,657	2,656	-	2,634
HCl 1N 120	2,686	2,642	2,657	-	-	2,637
HCl 1N 144	2,700	2,646	2,656	-	-	2,638
HCl 1N 168	2,660	2,665	2,898	-	-	2,667
HCl 1N 192	2,651	2,629	2,641	-	-	2,647
HCl 1N 216	2,659	2,648	-	-	-	-
HCl 1N 240	2,651	2,650	-	-	-	-
HCl 1N 264	2,723	2,702	-	-	-	-
HCl 1N 288	2,663	2,669	-	-	-	-
Total	56,469	54,895	45,193	32,005	29,994	42,909

A: perancah inkorporasi PRP, B: perancah tanpa inkorporasi PRP

Tabel 1. Menunjukkan bahwa perancah tanpa inkorporasi PRP dengan kode B2 terdegradasi pada jam ke-72 dengan larutan HCl 1N. Diikuti dengan degradasi perancah dengan kode B1 pada jam ke-96 dengan HCl 1N. Perancah A3 dengan inkorporasi PRP mulai terdegradasi pada jam ke 192 dengan larutan HCL 1N.



A: perancah inkorporasi PRP, B: perancah tanpa inkorporasi PRP

Dilanjutkan degradasi perancah inkorporasi PRP kode A1 dan A2.

Gambar 1. Persentase rata-rata degradasi perancah dengan inkorporasi PRP dan perancah tanpa inkorporasi PRP

Gambar 1. Menunjukkan pergerakan degradasi perancah dengan inkorporasi PRP pada jam ke-1 sampai jam ke-3 dengan rata-rata persentase dari 6.59% menjadi 12.54% terjadi kenaikan hampir 6% sedangkan pada perancah tanpa inkorporasi PRP pada jam ke-1 sampai jam ke-3 rata-rata persentase degradasinya dari 7.85% menjadi 15.59% terjadi kenaikan hampir 8%. Berdasarkan Gambar 1. rata-rata persentase degradasi keduanya terus meningkat dapat dilihat degradasi perancah tanpa inkorporasi PRP mencapai 100% pada jam ke-192 larutan HCl 1N sedangkan perancah inkorporasi PRP mencapai 100% pada jam ke-288 larutan HCl 1N. hal ini menunjukkan bahwa degradasi perancah dengan inkorporasi PRP lebih lama dibandingkan perancah tanpa inkorporasi PRP.

4. Pembahasan

Degradasi perancah yang ideal harus terjadi seiring dengan laju pembentukan jaringan baru dan pada saat yang sama dapat mempertahankan integritas struktural sampai jaringan baru terbentuk⁵. Degradasi perancah dapat terjadi melalui mekanisme yang melibatkan proses fisik maupun kimia⁶.

Platelet-rich plasma terdiri dari faktor pertumbuhan, sitokin, dan trombin. Faktor yang diperlukan untuk aktivasi PRP diantaranya adalah kolagen, tromboxan, kalsium, magnesium, serotonin dan berbagai faktor agregasi lainnya⁷. Perancah yang digunakan pada penelitian ini adalah perancah coral buatan CaCO_3 . Kalsium yang terkandung dalam perancah apabila berkontak dengan PRP diasumsikan dapat membentuk benang-benang fibrin. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sadeghi-Ataabadi bahwa fibrin merupakan perancah yang dapat terbentuk melalui aktivasi dari molekul fibrinogen yang terkandung dalam PRP⁸. Fibrin pada PRP dapat teraktivasi oleh trombin, trombin teraktivasi akibat kalsium mengubah protrombin menjadi trombin, peran kalsium dalam proses koagulasi penting karena berperan sebagai aktivator trombin².

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sadeghi-Ataabadi, konsentrasi CaCl_2 yang tinggi dapat memperlambat proses degradasi hal ini disebabkan karena kalsium memiliki efek menghambat lisisnya fibrin. Selain itu, konsentrasi ion Ca yang tinggi secara signifikan dapat memperpanjang *clotting time* karena ion Ca yang tinggi dapat menurunkan aktivitas trombin. Sehingga dapat diasumsikan bahwa kalsium yang terkandung dalam perancah koral buatan dapat menghambat lisisnya fibrin, sehingga menyebabkan proses degradasi menjadi lebih lambat⁸.

Proses lisisnya fibrin disebut dengan fibrinolisis. Fibrinolisis terjadi akibat adanya aktivasi plasmin oleh plasminogen. Proses aktivasi plasmin distimulasi oleh adanya pemecahan fibrin kemudian plasmin akan memecah fibrin pada bagian spesifik. Serat

fibrin yang berasal dari PRP lebih tipis dan lebih padat. Semakin tipis serat fibrin maka semakin rendah laju fibrinolisisnya⁹.

5. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan terdapat pengaruh inkorporasi PRP pada perancah coral buatan CaCO₃ terhadap profil degradasi akibat kandungan kalsium yang terdapat pada perancah yang dapat mengaktivasi fibrin sehingga proses degradasi perancah dengan inkorporasi PRP terjadi lebih lambat dibandingkan perancah tanpa inkorporasi PRP.

Daftar Pustaka

1. Jimi, E., Hirata, S., Osawa, K., Terashita, M., Kitamura, C., & Fukushima, H. (2012). The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *International Journal of Dentistry*, 2012, 1–8.
2. Shimojo, A. A. M., Perez, A. G. M., Galdames, S. E. M., Brissac, I. C. D. S., & Santana, M. H. A. (2015). Performance of PRP associated with porous chitosan as a composite scaffold for regenerative medicine. *Scientific World Journal*, 1-13.
3. Liu, J., Nie, H., Xu, Z., Guo, F., Guo, S., Yin, J., Zhang, C. (2015). Construction of PRP-containing nanofibrous scaffolds for controlled release and their application to cartilage regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 1-20.
4. Matsui, M., & Tabata, Y. (2012). Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1792–1801.
5. O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95.

6. Saito, T., & Tabata, Y. (2012). Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy. *Acta Biomaterialia*, 8(2), 646–652.
7. Fernandes, G., & Yang, S. (2016). Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone Research*, 4(August), 16036.
8. Sadeghi-Ataabadi, M., Mostafavi-pour, Z., Vojdani, Z., Sani, M., Latifi, M., & Talaei-Khozani, T. (2016). Fabrication and Characterization of Platelet-Rich Plasma Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Materials Science & Engineering*, 1-41.
9. Weisel, J. W. (2007). Structure of fibrin: Impact on clot stability. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(SUPPL. 1), 116–124.