

UPAYA OPTIMASI PEMBUATAN PLASMA KAYA TROMBOSIT SEBAGAI PENGOBATAN SEL PUNCA

(Optimization Attempt on Platelet Rich Plasma Preparation for Stem Cell Therapy)

Meiti Muljanti, Yetti Hernaningsih, Hans K Nugraha, Jusak Nugraha

ABSTRACT

Stem cells have a remarkable potential to act as a self renewal in the related system. The proliferation of stem cells can be stimulated by Platelet Rich Plasma (PRP) growth factor. PRP has a potential application for aesthetics, traumatology and maxillofacial surgery. The optimization method could be carried out by a double centrifugation, which is reliable and simple in producing an optimal PRP. The samples were obtained from healthy volunteers; 10 mL of blood was needed to produce 1 mL PRP. CBC test was then performed, in order to know the platelet count before and after double centrifugation. This method used four variations of speed and time. Four variations of speed and time were used to find the optimization result, which yield the highest platelet count and the highest PDGF level released after platelet activation. The measurement of Platelet Derived Growth Factor (PDGF-BB) level was done using ELISA method. Twenty first samples, resulted in a variation of platelet counts, the mean was 0.89 times. About 60% of platelet counts showed a decrease with the lowest value 0.01 times and 40% of the platelet counts showed an increase with the highest value 3.94 times. The study was repeated using "T" tubes, the highest increase of platelet count and PDGF-BB level was obtained by centrifugation at 900 g, 5 minutes duration, then followed by 1500 g, for 15 minutes. In this study protocol, the production of optimal PRP was not yet found, however it provided some important information. In this case, the influence of separation process and skill was more important than the centrifugation speed. The researchers suggested that the measurement of PDGF-BB level should be done immediately after PRP harvest.

Key words: PRP, stem cells, PDGF-BB

ABSTRAK

Sel punca memiliki pengaruh luar biasa sebagai sistem peremajaan internal. Proliferasi sel punca dirangsang faktor pertumbuhan yang terdapat di *Platelet Rich Plasma* (PRP). Pemakaian PRP digunakan untuk kecantikan, masalah traumatologi dan bedah maksilofasial. Optimasi metode pemusingan ganda dianggap dapat dipercaya dan sederhana dalam menghasilkan PRP terbaik. Sampel diperoleh dari peserta relawan yang sehat, diperlukan 10 mL darah untuk mendapatkan 1 mL PRP. Uji darah lengkap dilakukan untuk mengetahui jumlah trombosit sebelum dan setelah dua tahap pemusingan dengan empat ragam kecepatan dan waktu. Keempat ragam waktu dan kecepatan dipakai untuk menemukan hasil optimasi, yang mendapatkan jumlah platelet tertinggi dan kadar PDGF tertinggi yang dilepaskan setelah aktivasi platelet. Pengukuran kadar *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF-BB) menggunakan metode ELISA. Penelitian terhadap 21 sampel, diperoleh hasil jumlah trombosit yang beragam dengan rerata 0,89 kali. Sebanyak 60% jumlah trombosit menurun dengan nilai terendah 0,01 kali dari jumlah awal, 40% jumlah trombosit meningkat dengan nilai tertinggi 3,94 kali dari jumlah awal. Penelitian diulang menggunakan tabung "T", peningkatan jumlah trombosit dan kadar PDGF-BB paling tinggi diperoleh pada kecepatan pemusingan 900 g, 5 menit, kemudian 1500 g, 15 menit. Laporan penelitian yang menyatakan hasil PRP terbaik belum berhasil dikemukakan, tetapi dapat diberikan beberapa keterangan penting. Pemisahan dan keterampilan lebih berpengaruh daripada kecepatan pemusingan. Pengukuran kadar PDGF-BB harus dilakukan segera setelah mendapatkan PRP.

Kata kunci: PRP sel punca, PDGF-BB

PENDAHULUAN

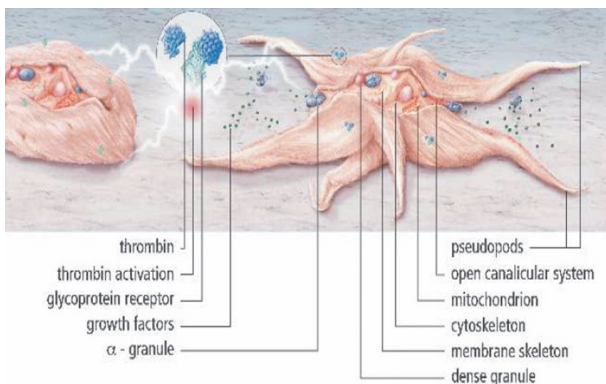
Sel punca memiliki pengaruh luar biasa, mulai awal kehidupan dan pertumbuhannya, hingga sebagai sistem perbaikan internal. Sel tersebut berproliferasi dan berdiferensiasi tanpa batasan tertentu untuk kemudian menjadi sel lain selama kehidupan.

Trombosit mengandung granula alfa (α), yang didalamnya terdapat banyak faktor pertumbuhan dan protein lain yang dapat memanggil dan merangsang

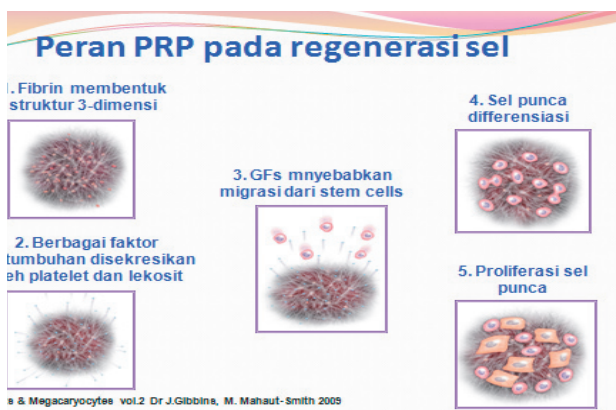
sel punca ke tempat terjadinya aktivasi trombosit berada dan melakukan regenerasi di sana. Aplikasi PRP untuk memanggil dan merangsang sel punca ini telah digunakan untuk pengobatan bidang kecantikan, traumatologi dan bedah maksilofasial. PRP dapat mempercepat penyembuhan luka, menurunkan infeksi, nyeri dan perdarahan pascabedah, juga memberi hasil bermakna pada pengobatan pengencangan wajah (*face lift*) dan cangkok kulit (*skin graft*).¹⁻⁶ Bakuan

pembuatan PRP sendiri dari berbagai kecepatan pemusingan maupun metode pemisahannya.

Trombosit merupakan fragmen sitoplasma megakariosit, berdiameter antara 1–4 μm yang dibentuk di sumsum tulang. Trombosit tidak memiliki nukleus, tetapi memiliki organel seperti: mitokondria, mikrotubuli dan granula (α , γ , δ). Granula α memiliki lebih dari 30 protein bioaktif yang berperan dalam penghentian perdarahan dan perbaikan jaringan. Jumlah normal trombosit adalah antara 150.000–300.000/ μL . PRP merupakan trombosit terpekatkan, kaya akan tujuh (7) protein faktor pertumbuhan yaitu: 3 isomer *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF $\alpha\alpha$, PDGF $\beta\beta$, PDGF $\alpha\beta$), 2 isomer *Transforming Growth Factors- β* (TGF β_1 dan TGF β_2), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) serta *Epithelial Growth Factor* (EGF). Perbedaan aturan kerja pembuatan PRP menyebabkan ketidaksamaan jumlah dan pengaruh biologis trombosit. Menurut Marx⁷ trombosit yang rusak atau dianggap *nonviable*, tidak akan mengeluarkan faktor pertumbuhan bioaktif, sehingga PRP yang dihasilkan mengecewakan. PRP untuk penerapan pengobatan diperlukan



Gambar 1. “resting platelet” dan “activated platelet”, granula α berisi faktor pertumbuhan.⁵



Gambar 2. Peran PRP pada regenerasi sel.¹¹

sekitar 1.000.000 trombosit/ μL . Bila darah utuh berisi 200.000 \pm 75.000/ μL , maka PRP untuk penerapan pengobatan harus memiliki persentase kenaikan rerata sekitar 400% dari jumlah trombosit awal.⁷⁻¹⁰ Peran PRP pada regenerasi sel, dilukiskan pada Gambar 2.

Metode pemusingan tunggal telah dibuktikan oleh Kurita *et al*¹² yaitu dapat menghasilkan PRP, tetapi tidak akan membuat yang sebenarnya (“sejati”). Dengan cara ini terbentuk tiga lapisan berdasarkan kepadatan komponen darah, lapisan terbawah terdiri dari eritrosit (berat jenis=1,09), yang tengah lapisan (*buffy coat*) yang tersusun dari trombosit dan leukosit (berat jenis=1,06) sedangkan yang atas dari plasma (berat jenis=1,03) merupakan campuran PRP dan *Platelet Poor Plasma* (PPP), sehingga menghasilkan trombosit yang berkadar rendah. Saat ini di pasaran sudah tersedia peralatan untuk membuat PRP. Metode pemusingan ganda tetap lebih banyak dipakai untuk pembuatan PRP, karena dianggap dapat dipercaya dan relatif sederhana dalam menghasilkan PRP yang bermutu, sehingga merupakan yang terbaik dan layak untuk pengobatan. Di samping jumlah pemusingan, peningkatan gaya gravitasi (g) dapat meningkatkan jumlah trombosit, tetapi mengaktifasi trombosit secara dini. Trombosit juga dapat diaktifasi secara dini oleh penghisapan dengan pipet dan pemakaian antikoagulan yang penggunaannya berlebihan.^{7,12-17} Tujuan penelitian ini dengan 2 tahap pemusingan, diharapkan menghasilkan PRP optimal dengan peningkatan jumlah trombosit dan kadar PDGF-BB yang tinggi untuk penerapan pengobatan sel punca.

METODE

Penelitian ini merupakan kajian percobaan laboratoris dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik, Departemen/Instalasi Patologi Klinik, FK Unair/RSUD Dr. Soetomo, Surabaya.

Sampel yang akan digunakan berasal dari peserta penelitian sehat, sebanyak 21 sampel yang diperoleh dari 12 orang. Besar sampel pada penelitian ini menggunakan 4 (empat) perlakuan, dengan perhitungan sebagai berikut¹⁸

$$P(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$n \geq 5$$

p: Jumlah perlakuan

Tiga orang diantaranya diambil darah sebanyak 20 mL dan dikerjakan pada 4 ragam kecepatan pemusingan, sedangkan 8 orang lainnya diambil

darah masing-masing 5 mL untuk satu macam kecepatan pemusingan. Satu orang diambil sebanyak 10 mL untuk dikerjakan dengan metode tabung "I". Untuk mendapatkan PRP sebanyak 1 mL dibutuhkan sampel darah dengan antikoagulan sitrat dengan perbandingan darah: antikoagulan adalah 9:1.^{9,19,20}

Pemeriksaan darah lengkap dengan *hematology analyzer cell dyne ruby* untuk mengetahui jumlah trombosit sebelum dan setelah pemusingan ganda. Aturan kerja kecepatan dan waktu pemusingan memiliki ruang jarak yang lebar dan beragam. Yaitu pemusingan pertama antara 72–1400 g dengan waktu 4–15 menit, sedangkan yang kedua antara 400–2500 g lama waktu 6–15 menit, dilakukan dalam keadaan suhu ruang. Penelitian ini dilakukan dalam empat ragam kecepatan dan waktu.^{8,17,20–22}

Pengukuran kadar faktor pertumbuhan dilakukan terhadap supernatan yang diperoleh dari PRP setelah diaktivasi dengan kalsium glukonas 10% diinkubasi selama satu (1) jam pada suhu ruang sampai kemudian menjadi gel setelah dipusingkan dengan putaran 3000 g selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh segera disimpan pada suhu –20°C yang akan bertahan selama enam (6) bulan. Pada penelitian ini diukur kadar *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF-BB) menggunakan metode *Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay* (ELISA) (*Human PDGF-BB Platinum, REF. BMS2071, Lot 69093001*). Ragaman kadar PDGF-BB yang diperoleh dari PRP, menurut Eppley⁹ adalah $(17 \pm 8) \times 10^3$ pg/mL, sedangkan menurut Weibrich¹⁹ adalah $(10 \pm 8) \times 10^3$ pg/mL.^{3,9,19,23}

Aturan kerja metode memusingkan ganda meliputi tahap kesatu (1) putaran cepat (*hard spin*) untuk memisahkan eritrosit dari plasma yang berisi trombosit, leukosit serta faktor pembekuan, tahap kedua (2) putaran lambat (*soft spin*) untuk memisahkan trombosit, leukosit dan sedikit sisa eritrosit dari plasma.¹⁷ Setelah melalui dua (2) tahapan pemusingan ini diharapkan dapat menghasilkan PRP dengan jumlah terbaik untuk menerapkan pengobatan. Trombosit mengandung granula α yang melepaskan faktor pertumbuhan, antara lain PDGF-BB. Sekresi faktor pertumbuhan memerlukan aktivator, antara lain kalsium glukonas.⁹ PDGF-BB yang disekresi merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang baik untuk pembaharuan sel termasuk yang di kulit.³

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di 21 sampel dengan empat ragam kecepatan dan waktu pemusingan, hasil jumlah trombosit yang diperoleh beragam dengan rerata 0,89 kali. Cara kesatu (I), yaitu pemusingan 600 g, selama lima (5) menit dan dilanjutkan yang berikutnya 2000 g, selama enam (6) menit. Dari lima (5) sampel tiga (3) di antaranya mengalami penurunan jumlah trombosit, sehingga rerata peningkatan adalah 0,916 kali, artinya rerata trombosit menurun dibandingkan dengan sebelum dipusingkan. Cara kedua (II) yaitu pemusingan 900 g, selama lima (5) menit dan dilanjutkan 1500 g, 15 menit. Sebanyak empat (4) sampel mengalami penurunan jumlah trombosit, sehingga rerata peningkatan jumlahnya hanya 0,288 kali artinya banyaknya menurun tajam. Di kelompok ini, empat (4) sampel mengalami penurunan hingga di bawah $30.000/\mu\text{L}$ dari jumlah awal $200.000/\mu\text{L}$. Cara ketiga (III) yaitu pemusingan 1200 g, selama lima (5) menit dan 2000 g, selama enam (6) menit. Seperti halnya kelompok pertama (I) dan kedua (II), di kelompok ini rerata peningkatan jumlah trombosit 0,802 kali. Di kelompok ini, tiga (3) sampel di antaranya mengalami penurunan jumlah trombosit tetapi, tidak serendah kelompok kedua (II). Satu-satunya rerata peningkatan jumlah trombosit di atas satu (1) kali adalah kelompok keempat (IV) yaitu pemusingan 1300 g, selama lima (5) menit dan 2300 g, selama tujuh (7) menit (lihat Tabel 1). Lima (5) sampel dari kelompok ini, tiga (3) di antaranya mengalami kenaikan jumlah trombosit bahkan satu (1) sampel meningkat hingga empat (4) kali (400%).⁷

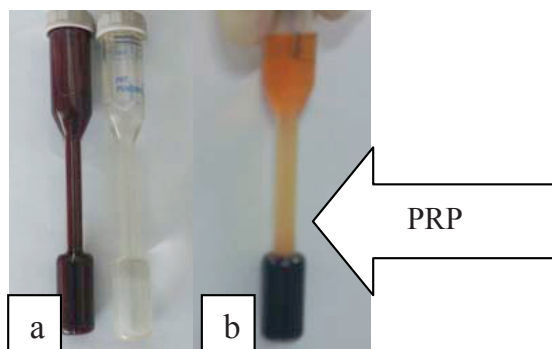
Sebanyak 60% jumlah trombosit menurun dengan nilai terendah 0,01 kali dari jumlah trombosit awal, 40% jumlah trombosit meningkat dengan nilai tertinggi 3,94 kali dari jumlah trombosit awal. Semua sampel diukur kadar PDGF-BB dan hasilnya beragam antara 131,6–3560 pg/mL. Di tabel 1, ditunjukkan bahwa kadar PDGF-BB tidak sebanding dengan peningkatan jumlah trombosit. Rerata peningkatan trombosit terendah (0,288 kali) ternyata kadar PDGF-BBnya tertinggi (2098,72 pg/mL), sedangkan rerata trombosit tertinggi (1,572 kali) dengan kecepatan pemusingan 1300 g, selama lima (5) menit dengan pusingan 2300 g. Selanjutnya selama tujuh (7) menit, kadar PDGF-

Tabel 1. Rerata jumlah trombosit setelah pembuatan PRP metode memusingkan ganda dan kadar PDGF-BB

Pemusingan ke I		Pemusingan ke II		Rerata Peningkatan Trombosit (kali)	Rerata Kadar PDGF-BB (pg/mL)
Kecepatan (g)	Waktu (menit)	Kecepatan (g)	Waktu (menit)		
600	5	2000	6	0,916	1753,18
900	5	1500	15	0,288	2098,72
1200	5	2000	6	0,802	1533,06
1300	5	2300	7	1,572	1085,1

BBnya terendah (1085,1 pg/mL). Penelitian ini juga memisahkan PRP menggunakan tabung khusus berbentuk huruf "T" yang mampu memisahkannya dari komponen lainnya di kolom tertentu (lihat Gambar 3). Hasil PRP sebelum pemusingan 204.000/ μ L, setelah dipusingkan 900 g, selama lima (5) menit dan yang 1500 g, selama 15 menit menghasilkan trombosit 2.107.000/ μ L dengan kadar PDGF-BB 4647 pg/mL yaitu merupakan peningkatan jumlah trombosit paling tinggi (10,3 kali) untuk kadar yang sama.

Penerapan pengobatan sel punca: Trombosit mengandung granula α yang melepaskan faktor pertumbuhan antara lain PDGF-BB. Sekresi faktor pertumbuhan memerlukan aktivator, antara lain kalsium glukonas.⁹ PDGF-BB yang disekresi merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang baik untuk pembaharuan sel termasuk yang di kulit.³ Penelitian dilanjutkan dengan penerapan pada seorang peserta telitian dengan cara mengoleskan PRP di kulit wajah, dengan harapan dapat terjadi pembaharuan sel kulit wajah (Gambar 4).



Gambar 3. a) Darah dalam tabung "T" sebelum pemusingan
b) PRP terlihat jelas di bagian tabung yang menyempit



Gambar 4. a) Sebelum penerapan PRP (4 April 2012).
b) dua (2) minggu setelah penerapan PRP sebagai pengobatan dengan sel punca (21 April 2012)

Di wajah seorang peserta telitian tampak perubahan struktur kulit daerah pipi, dahi dan dagu yang menjadi lebih rata, halus dan kencang. Garis kerut di sekitar hidung, bawah mata dan bibir terlihat berkurang.

Pada penelitian ini jumlah trombosit ada yang mengalami peningkatan, tetapi kondisi ini masih jauh dari tujuan yang diharapkan untuk penerapan pengobatan yaitu 400% atau 1.000.000 trombosit/ μ L.⁷ Metode memusingkan ganda menghasilkan peningkatan yang tidak menetap, artinya ada yang meningkatkan jumlah trombosit, tetapi ada yang menurun. Hal ini antara lain disebabkan karena faktor keterampilan teknis, terutama dalam pemisahan setelah pemusingan. Pengambilan *buffy coat* dan seluruh plasma dengan pipet pasteur usai pemusingan. Tahap pertama (1) cukup sulit untuk teknis yang belum berpengalaman. *Buffy coat* yang sebenarnya terdapat banyak trombosit, tetapi hanya terambil sebagian dan berakibat tidak terambil maksimal bahkan mungkin hanya sedikit. Pemisahan trombosit tahap kedua (2) antara PPP (supernatan atas) dan PRP (1 mL supernatan bawah) juga memerlukan keterampilan tersendiri. Faktor keterampilan pemisahan ini, menjadi penyebab jumlah trombosit turun dari nilai awal dan peningkatan hingga 400% atau 1.000.000 trombosit/ μ L tidak tercapai.⁷ Dari segi alat seperti pemusingan dan ketepatan ukuran kecepatan telah sesuai dan dalam kondisi baik.

Faktor keterampilan yang kurang dalam tehnik pemisahan ini juga didukung oleh hasil yang memuaskan ketika dicoba mendapatkan PRP dengan tabung khusus yang mampu memisahkan PRP dari komponen lainnya di kolom tertentu tetapi harganya mahal. Walaupun hal tersebut memberikan hasil peningkatan 10,3 kali (1033%) (trombosit awal 204.000/ μ L, setelah pemusingan dengan tabung "T" yang berkecepatan 900 g, selama lima (5) menit dan 1500 g dan 15 menit yang memberikan hasil 2.107.000/ μ L).

Dalam kondisi normal, kadar PDGF-BB setelah aktivasi trombosit seharusnya berhubungan linear dengan jumlah trombosit. Semakin banyak jumlah trombosit yang teraktivasi, semakin banyak granula α yang mensekresi PDGF-BB. Namun, pada penelitian ini terdapat ragam hasil PDGF-BB berdasarkan jumlah trombosit. Beberapa di antaranya ada trombosit yang jumlahnya mencapai ratusan ribu/ μ L, tetapi kadar PDGF-BBnya hanya ratusan pg/mL. Sebaliknya terdapat jumlah trombosit yang hanya mencapai ribuan/ μ L, tetapi kadar PDGF-BBnya mencapai ribuan pg/mL. Pada penelitian ini kadar PDGF-BB diperiksa dalam waktu yang bersamaan, sedangkan pada tahap pemusingan trombosit tidak dalam waktu bersamaan. Sampel untuk pemeriksaan PDGF-BB dikumpulkan

antara Januari 2012 sampai Maret 2012 (3 bulan) dan disimpan pada suhu -20°C . Sampel untuk pemeriksaan PDGF-BB tidak berubah pada suhu penyimpanan -20°C selama enam (6) bulan.²³ Penyimpanan sampel dilakukan setelah tahap penambahan kalsium glukonas untuk aktivasi trombosit dan dipusingkan, selanjutnya supernatan diambil dengan harapan banyak mengandung PDGF-BB hasil lepasan granula α trombosit yang telah teraktivasi. Kadar rendah PDGF-BB diperoleh dari sampel yang disimpan lama, sedangkan yang didapatkan relatif baru menghasilkan kadar PDGF-BB lebih tinggi. Hal ini memberitahukan bahwa pemeriksaan PRP yang segera, akan memberikan hasil yang lebih baik. Diperkirakan PDGF-BB selama penyimpanannya mengalami kerusakan.

Hasil PDGF-BB tertinggi adalah 3560 pg/mL, menurut telitian Weibrich¹⁹ nilai rentang kadar PDGF-BB PRP berkisar antara 2.000–18.000 pg/mL. Pada penelitian ini terdapat lima (5) sampel yang berkadar di rentang tersebut, sedangkan kadar PDGF-BB PRP hasil pusingan menggunakan tabung “I” dan selanjutnya segera diperiksa PDGF-BB adalah 4647 pg/mL.

SIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menggunakan 21 sampel dengan hasil yang masih relatif kasar, karena itu perlu dikaji lebih lanjut menggunakan jumlah yang lebih banyak dengan selang ragam kenaikan kecepatan dan waktu pemusingan yang lebih sempit. Walaupun pada penelitian ini aturan kerja atau protokol untuk menghasilkan PRP yang terbaik belum bisa diformulasikan, tetapi didapatkan hasil yang menunjukkan kemampuan peningkatan trombosit dan peningkatan PDGF-BB yang bermakna, serta pengamatan yang penting, yaitu proses dan cara memisahkan dan keterampilan lebih berpengaruh daripada kecepatan pemusingan. Diperlukan teknisi terlatih pada tahap pemisahan PRP setelah pemusingan. Di kajian ini ternyata tabung khusus “I” memberikan hasil yang lebih baik daripada bentuk yang lain. Pengukuran PDGF-BB disarankan dilakukan dalam waktu cepat setelah mendapatkan hasil PRP, untuk memperoleh hasil yang terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Smith RG, Gassman CJ, and Campbell MS. Platelet Rich Plasma: Properties and Clinical Applications, *The Journal of Lancaster General Hospital*. 2007; 2 (2): 73–77.
- Borrione P, Gianfrancesco AD, Pereira MT, Pigozzi F Platelet-rich plasma in muscle healing. *Am J Phys Med Rehabil*. 2010; 89 (10): 854–61.
- Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 118 (6): 147e–15.
- Steenvoorde P, van Doorn LP, Naves C, Oskam J. Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds. *Journal of Wound Care*. 2008; 17 (2): 60–63.
- Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco Jerez L. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65 (6): 1084–1093.
- Yu W, Wang J, Yin J. Platelet-Rich Plasma: A Promising Product for Treatment of Peripheral Nerve Regeneration after Nerve Injury. *Int J*. 2011; 121 (4): 176–80.
- Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62 (4): 489–96.
- Guyton AC, Hall JE. *Guyton and Hall Buku Ajar Fisiologi kedokteran*. Edisi 11, Jakarta, EGC. 2008; 480–492.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet Rich Plasma Implications for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 114 (6): 1502–8.
- Sipe JB, Waits CA, Skikne B. et al. The presence of bone morphogenetic proteins (BMPs) in megakaryocytes and platelets. Presented at the 24th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2002; 17 (1): 20–24.
- J. Gibbins, M. Mahaut-Smith. The role of PRP in cell regeneration. *Platelets & Megacaryocytes* 2009; 2: 452–6.
- Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Drago J. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration from Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems. *Am J Sports Med*. 2011; 39 (2): 266–271.
- Kurita M, Aiba-Kojima E, Shigeura T, et al. Differential effects of three preparations of human serum on expansion of various types of human cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122 (2): 438–448.
- Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107 (1): 229–237.
- Woodell-May JE, Ridderman DN, Swift MJ, Higgins J. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: Validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2005; 16 (5): 749–756.
- Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62 (1): 1403–07.
- Nagata MJH, Messori MR, Furlaneto FAC et al. Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *Eur J Dent*. 2010; 4 (1): 395–401.
- Sudigdo Sastroasmoro, Sofyan Ismael, *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*, Jakarta, PT Gramedia Pustaka, 1995: 50–56.
- Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex and platelet count. *J of Maxillo-Facial Surgery*, 2002; 30 (2): 97–102.
- Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. *Int. J. Periodontics Restorative Dent*. 2002; 22 (6): 547–57.
- Welsh WJ. Autologous platelet gel: Clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmetic Derm*. 2000; 1 (1): 13.
- Jo CH, Roh YH, Kim JE, Shin S, Yoon KS, Noh JH. Optimizing Platelet-Rich Plasma Gel Formation by Varying Time and Gravitational Forces During Centrifugation. *J Oral Implantol*. 2011; 10 (1563): 10–11.
- Manual Quantikine Human PDGF-BB Immunoassay, R&D Systems Inc, 2011; 2–14.