

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan *platelet-rich plasma* (PRP) dalam regenerasi jaringan mengalami perkembangan yang cukup pesat seiring dengan banyaknya penelitian dan aplikasi di bidang klinis. *Platelet* adalah fragmen sitoplasma megakariosit yang terbentuk dalam sumsum tulang. *Platelet* merupakan bagian terkecil dari sel darah yang berbentuk bulat atau oval dan tidak memiliki inti tetapi mengandung sejumlah organel. Strukturnya terdiri dari mitokondria, mikrotubulus dan 50 – 80 butiran granul (α, δ, λ). Sebuah granul α memiliki lebih dari 30 protein bioaktif, kemokin dan berbagai faktor pertumbuhan (*Growth Factor*) seperti *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Harison, 1993). Faktor pertumbuhan ini dapat dimanfaatkan untuk terapi perbaikan jaringan di berbagai cabang ilmu kedokteran seperti bedah mulut, bedah plastik, bedah kraniofasial, bedah jantung, ortopedi, neurologi, kedokteran olah raga, dan dermatologi (Cole *et al.*, 2010 ; Eppley *et al.*, 2006).

Pada kasus – kasus perbaikan jaringan, faktor pertumbuhan seperti TGF- β akan menstimulasi *fibroblast* dan meningkatkan pembentukan matrik ekstraseluler (ECM). *Transforming Growth Factor – β* juga meningkatkan kolagenasi untuk proses penyembuhan luka. Faktor pertumbuhan lain seperti PDGF juga berfungsi dalam perbaikan jaringan tulang dengan menstimulasi produksi kolagen tipe 1 yang menginduksi sintesis tulang (Koerner *et al.*, 2008). Dalam proses perbaikan jaringan tendon IGF dapat menstimulasi proliferasi dan diferensiasi dari *myoblast* (Hormon, 2010).

Gel PRP pertama kali dikenalkan sebagai bahan alternatif pengganti *fibrin glue* pada rekonstruksi bedah maksilofasial yang membutuhkan *graft* tulang pada tahun 1997 (Whitaker *et al.*, 2001). Platelet gel yang kaya faktor pertumbuhan ini memberikan percepatan terjadinya regenerasi terhadap penyembuhan tulang dan jaringan lunak yang mengalami cedera.

Secara umum, *platelet* yang digunakan untuk aplikasi klinis berasal dari pasien itu sendiri (*autologous*). Penggunaan produk *autologous* ini menghilangkan kekhawatiran terjadinya reaksi *immunologis* dan penularan penyakit (Alsousou *et al.*, 2009). Namun terapi *autologous* tidak dapat dilakukan pada pasien yang mengalami defisiensi atau kelainan fungsi *platelet*. Hal ini menyebabkan penggunaan *autologous* rentan terhadap besar variabilitas, karena konsentrasi *platelet* bervariasi antar individu. Sehingga, sulit untuk melakukan evaluasi hasil secara ilmiah (Rozman, 2002). Beberapa pasien juga tidak memiliki keberanian untuk dilakukan pengambilan darah dalam jumlah yang banyak. Oleh sebab itu penggunaan *allogenic* (berasal dari individu lain dalam satu spesies) PRP sangat dibutuhkan sebagai alternatif lain terapi faktor pertumbuhan.

Sumber *allogenic* PRP yang mempunyai kuantitas dalam jumlah besar dan telah terstandarisasi, aman, serta terjangkau tersedia dalam jumlah yang melimpah di unit transfusi darah. *Platelet* yang dihasilkan unit transfusi mempunyai batas usia 3 – 7 hari, setelah itu *platelet* tidak dapat digunakan. Sehingga tiap tahunnya terdapat banyak unit *platelet* yang terbuang. Pada tahun 2001 di Amerika Serikat tercatat 1,234.000 dari total 12,898.000 produksi *platelet* (9,5%) melampaui batas waktu penggunaan sehingga tidak dapat digunakan dan dibuang (Sullivan *et al.*, 2007). Pada studi kasus yang lain, tercatat dari beberapa rumah sakit terdapat variasi yang berbeda dari persentase *platelet* yang terbuang berkisar 2% dan 13,8 % (Novis *et al.*, 2002).

Seharusnya unit *platelet* yang terbuang ini dapat dikelola sebagai sumber *allogenic* PRP untuk terapi perbaikan jaringan.

Penggunaan *allogenic* PRP ini masih harus dilakukan beberapa studi kasus, karena meskipun *platelet* adalah sel yang tidak memiliki inti, membran *platelet* mengandung beberapa molekul imunoglobulin, seperti MHC (*Major Histocompatibility Complex*) kelas I, Fc reseptor, dan *binding* molekul. Membran *platelet* juga mengandung antigen ABO dan beberapa antigen polisakarida golongan darah yang sangat penting dalam transfusi darah (Rozman, 2002). Oleh karena itu, diperlukan suatu proses untuk menurunkan reaksi imun yang ditimbulkan dari penggunaan *allogenic* PRP.

Penggunaan *allogenic* PRP yang dikombinasikan dengan *autologous mesenchymal stem cell* (MSC) dan *deproteinised bone graft* (DPB) pernah dilakukan untuk terapi *defect* tulang panjang. *Allogenic* PRP dibuat dalam bentuk gel dengan penambahan thrombin dan CaCl_2 diinjeksikan intramuskular 1 minggu setelah transplantasi *autologous* MSC dan DPB. Pemantauan terhadap respon imun dilakukan dengan pemeriksaan populasi limfosit T CD4/CD8 pada minggu 1, 4 dan 12. Hasil pemeriksaan populasi limfosit T CD4/CD8 menunjukkan adanya peningkatan pada minggu 1 yang disebabkan adanya reaksi inflamasi yang terjadi setelah transplantasi. Populasi limfosit T CD4/CD8 mulai menurun pada minggu ke 4 dan kembali ke nilai normal (20 – 30%) pada minggu ke 12. Data tersebut menunjukkan rendahnya respon imun terhadap penggunaan gel PRP. Gel yang terbentuk diasumsikan dapat melapisi permukaan membran *platelet* yang mengandung molekul antigen, sehingga penggunaan *allogenic* gel PRP tidak menimbulkan respon imun (Zhang *et al.*, 2013).

Penggunaan *allogenic* PRP aman dilakukan apabila antigen pada permukaan membran platelet dihambat aktivitasnya seperti dengan pembuatan lapisan gel (Zhang

et al., 2013). Penggunaan gel PRP ini mempunyai beberapa kelemahan diantaranya tidak dapat dilakukan penyimpanan dalam jangka waktu yang lama.

Peneliti mencari suatu metode untuk mengolah produk *allogenic* PRP ini menjadi produk yang mudah penyimpanan dan penggunaannya. Metode yang dipilih untuk mengolah PRP adalah metode *Freeze drying*. *Freeze drying* merupakan suatu metode *cryopreservasi* yang terdiri dari tiga tahap yaitu : pembekuan dari jaringan (*freezing*) -83°C , pengeringan primer dengan sublimasi terhadap jaringan yang membeku (*primary drying*) dan akhirnya pengeringan sekunder untuk membuang sisa – sisa air yang terkandung dengan teknik pemanasan (*secondary drying*) (Seller dan Johnson, 2000). Adanya proses pembekuan hingga -83°C diharapkan dapat merusak struktur molekul – molekul antigen yang terdapat pada permukaan membran *platelet*. Rusaknya molekul – molekul antigen ini diasumsikan dapat menurunkan aktivitasnya sebagai antigen, sehingga tidak direspon oleh sistem imun tubuh resipien (penerima donor *allogenic* PRP). Upaya penurunan reaksi imun juga dilakukan dengan penggunaan radiasi sinar gamma. Radiasi sinar gamma yang digunakan sebesar $25 \text{ KG}\gamma$. Penyinaran radiasi sinar gamma ini selain bertujuan untuk sterilitas produk, diasumsikan penyinarannya dapat merusak struktur molekul – molekul antigen pada permukaan membran *platelet*.

Keunggulan lain dari metode *freeze drying* adalah sistem pengeringannya tidak menggunakan panas tinggi, sehingga sangat baik digunakan untuk zat – zat yang rentan terhadap panas. Faktor – faktor pertumbuhan yang terkandung dalam platelet merupakan molekul protein yang rentan terhadap panas. Sehingga penggunaan metode ini dinilai tepat untuk mengolah produk *allogenic* PRP. Penggunaan metode ini diharapkan selain untuk menurunkan resiko immunologis juga dapat mempertahankan kandungan faktor pertumbuhan dalam PRP, dimana faktor

pertumbuhan inilah yang sangat penting untuk terapi perbaikan jaringan. Evaluasi pengaruh proses *freeze drying* terhadap faktor pertumbuhan yang terdapat dalam PRP dilakukan dengan penghitungan kadar TGF- β 1 sebelum dan sesudah proses tersebut. *Transforming Growth Factor- β 1* dipilih dalam pemeriksaan ini karena merupakan salah satu faktor pertumbuhan paling dominan yang menunjukkan keterlibatannya dalam perbaikan jaringan dan produksi matriks ekstra seluler.

Evaluasi respon imun terhadap penggunaan *allogenic freeze dried PRP* dilakukan dengan pengamatan terhadap terjadinya reaksi inflamasi / peradangan (pemantauan terhadap suhu tubuh kelinci) dan pembentukan antibodi primer (IgM). Penggunaan *allogenic PRP* yang mengandung HPA (*Human Platelet Antigen*) dapat menimbulkan terjadinya reaksi inflamasi / peradangan, karena sistem imun tubuh akan menghancurkan setiap benda asing (antigen) yang masuk ke dalam tubuh. *Platelet* yang mengandung HPA akan direspon oleh sistem imun tubuh melalui pergerakan neutrofil menuju daerah peradangan. Neutrofil memulai proses peradangan melalui vasodilatasi (pelebaran pembuluh darah) dan meningkatkan permeabilitas kapiler. Sel ini juga melepaskan zat – zat kimia yang menarik sel darah putih lain ke tempat peradangan dengan proses yang disebut kemotaksis. Basofil yang ikut tertarik ke daerah peradangan akan teraktivasi, sehingga menghasilkan histamin, bradikinin, dan serotin. Zat – zat ini juga meningkatkan permeabilitas kapiler dan aliran darah ke daerah peradangan. Peningkatan permeabilitas kapiler dan aliran darah menyebabkan kemerahan / ruam (rubor) pada daerah peradangan (Corwin, 2009). Interaksi mediator kimiawi ini juga menghasilkan pirogen endogen yang dapat memicu demam (peningkatan suhu tubuh) melalui hipotalamus (Harti, 2013).

Apabila *platelet* yang mengandung HPA tersebut lolos dari barrier respon non spesifik tersebut maka substansi tersebut akan masuk dan berikatan dengan sel

limfosit T dan B. Sel limfosit T yang berikatan dengan HPA *platelet* akan mengalami maturasi, sehingga akan terjadi peningkatan sel T sitotoksik (CD8+) dan sel T helper (CD4+). Sitokin yang dihasilkan oleh maturasi limfosit T akan memicu proliferasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang menghasilkan antibodi (IgM). *Allogenic freeze dried PRP* yang digunakan dalam penelitian ini diasumsikan molekul imunoglobulinnya, seperti MHC kelas I, Fc reseptor, dan *binding* molekul yang terdapat pada permukaan membran *platelet* serta antigen permukaan seperti HPA dan antigen ABO telah mengalami kerusakan akibat proses *freeze drying*, sehingga tidak akan direspon oleh sistem imun tubuh sebagai antigen. Penggunaan produk *allogenic freeze dried PRP* ini tidak akan meningkatkan suhu tubuh dan tidak memicu timbulnya antibodi (IgM). Sehingga produk ini dapat menjadi alternatif terapi faktor pertumbuhan yang aman dan efektif (karena proses *freeze drying* tidak memberikan perubahan kadar yang bermakna terhadap kandungan faktor pertumbuhan dalam PRP).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang pemikiran tersebut maka dapat dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah ada pengaruh proses *freeze drying* terhadap kadar TGF- β 1 dalam PRP ?
2. Apakah penggunaan *allogenic freeze dried PRP* dapat menimbulkan respon peradangan ?
3. Apakah penggunaan *allogenic freeze dried PRP* dapat meningkatkan pembentukan antibodi primer (IgM) ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh dari proses *freeze drying* terhadap kadar TGF – β 1 yang terkandung di dalam PRP.
2. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian *allogenic freeze dried* PRP terhadap respon peradangan.
3. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian *allogenic freeze dried* PRP terhadap peningkatan pembentukan antibodi primer (IgM)

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis adalah sebagai informasi ilmiah tentang pengaruh proses *freeze drying* terhadap kadar faktor pertumbuhan dan mekanisme reaksi imunologi dari penggunaan *allogenic freeze dried* PRP dibandingkan dengan penggunaan *autologus*.
2. Manfaat praktis adalah memudahkan aplikasi klinis dari penggunaan terapi PRP sehingga pasien tidak harus diambil darah apabila ingin terapi PRP.
3. Pemanfaatan bahan yang terbuang dari unit transfusi darah.