

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

Erlina Sih Mahanani¹, Nur Farda²

¹Dental School, Faculty of Medicine and Health Science UMY

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

E-mail : nurfarda@gmail.com

ABSTRACT

Swelling ratio is the ability of the scaffold to absorb the liquid while maintaining its balance at the same time. Therefore, the scaffold does not change in shape. Platelet-rich plasma (PRP) is an autologous concentration of platelets which contain growth factors. Platelet-rich plasma has an ability to incorporate with the scaffold for bone tissue engineering.

*Aimed of this study is to define the influence of incorporated PRP to synthetic coral scaffold to the swelling profile. The design of this study is experimental laboratory. Platelet-rich plasma was prepared by a double-spinning methode by Tabata. The blood sample was taken from lateral tail vein of wistar rats (*rattus norvegicus*). The synthetic coral scaffolds prepared from gelatin and calcium carbonate (CaCO_3). 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 ($n=3$). The synthetic coral scaffold dipped in $70\mu\text{l}$ of PRP for 15 minutes. Then the scaffolds were placed in the phosphate buffer saline and incubated for 48h at 37°C . The weight of the scaffold at swelling condition was measured every 30 minutes.*

The data were analyzed by Independent T test and the result showed no significant different between two groups in this research. However, the graphic showed that incorporated PRP synthetic coral scaffold had higher swelling ratio than non-incorporated PRP at the initial time.

According to this study, it can be concluded that the incorporation of PRP in synthetic coral scaffold has an affect to the swelling profile.

Keywords: *swelling, coral scaffold, gelatin, CaCO_3 , PRP*

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

Erlina Sih Mahanani¹, Nur Farda²

¹School of Dentistry, Faculty of Medicine and Health Science UMY

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

E-mail : nurfarda@gmail.com

INTISARI

Swelling ratio merupakan kemampuan perancah dapat menyerap cairan dengan tetap mempertahankan keseimbangannya, sehingga perancah tidak mengalami perubahan bentuk. *Platelet-rich plasma* merupakan konsentrasi platelet autologous yang kaya akan faktor pertumbuhan. PRP dapat diinkorporasikan dengan perancah untuk keperluan rekayasa jaringan tulang.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh inkorporasi PRP pada perancah koral buatan terhadap profil *swelling*. Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. *Platelet-rich plasma* dihasilkan dengan menggunakan metode Tabata yaitu dengan metode *double spinning*. Perancah yang digunakan adalah perancah koral buatan yang terbuat dari gelatin dan kalsium karbonat (CaCO_3). Enam perancah koral buatan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok yang diinkorporasikan dengan PRP (n=3) dan kelompok perancah yang tidak diinkorporasikan dengan PRP (n=3). Proses inkorporasi PRP pada perancah dilakukan selama 15 menit dengan cara 70 μ l PRP diteteskan pada perancah. Kemudian perancah dimasukkan ke dalam PBS dan diinkubasi selama 48 jam. Berat perancah saat terjadi *swelling* diukur setiap 30 menit. Hasil analisa data dengan *independent T test* menunjukkan tidak ada perbedaan antara perancah yang diinkorporasi PRP dengan perancah tanpa inkorporasi PRP. Namun, pada grafik menunjukkan kemampuan *swelling* perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP lebih tinggi dibandingkan dengan perancah koral buatan tanpa inkorporasi diawal waktu perendaman.

Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh inkorporasi PRP pada perancah koral buatan terhadap profil *swelling*.

Kata kunci : *swelling*, perancah koral, gelatin, CaCO_3 , PRP

Pendahuluan

Tulang memiliki kemampuan dapat memperbaiki diri apabila terjadi kerusakan yang ringan atau pada defek kecil. Namun apabila kerusakannya merupakan *critical defect*, proses perbaikan tulang membutuhkan intervensi dari luar seperti pemanfaatan teknologi rekayasa jaringan dalam bidang regeneratif¹. Secara umum, teknologi rekayasa jaringan mempunyai 3 faktor yang mempengaruhi keberhasilannya, yaitu sel, *scaffold* atau perancah, dan faktor pertumbuhan². Perancah merupakan kerangka sementara yang dapat memberikan dukungan mekanik untuk sel dapat menjalankan fungsinya, yaitu membentuk jaringan tulang yang baru³. Terdapat perkembangan baru adanya perancah koral buatan gelatin CaCO₃ yang memiliki sifat *biodegradable* dan *biocompatible* sehingga cocok digunakan sebagai kerangka sementara untuk proses regenerasi tulang. Faktor pertumbuhan dapat diperoleh dari PRP, yang merupakan konsentrasi *platelet* dalam plasma yang kaya akan faktor pertumbuhan. *Platelet-rich plasma* dapat digunakan sendiri maupun dikombinasikan dengan perancah dalam pemanfaatannya untuk membantu regenerasi tulang⁴. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh inkorporasi PRP pada perancah koral buatan CaCO₃ terhadap profil *swelling*.

Metode

Desain penelitian ini adalah penelitian laboratorium yang bersifat eksperimental menggunakan *post test design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Oktober-Desember 2016.

1. Persiapan perancah

Perancah yang digunakan adalah perancah koral buatan yang dikembangkan oleh tim peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Perancah tersebut terbuat dari gelatin dan kalsium karbonat (CaCO₃). Enam sampel perancah koral buatan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu : kelompok perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP (n=3) dan kelompok perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP (n=3). Berat perancah distabilkan terlebih dahulu dengan cara perancah dimasukkan ke dalam oven (Mommert, *Germany*) pada suhu 50°C.

2. Persiapan PR

Platelet-rich plasma didapatkan dari proses sentrifugasi darah tikus wistar (*Ratus norvegicus*) yang diambil melalui vena lateral ekor. 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 Klinik Universitas Gadjah Mada. Sisa darah yang

tersedia kemudian diolah dengan metode *double-spinning* dari Matsui dan Tabata (2012). Darah dimasukkan kedalam *microtube* 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 *microtube* kemudian 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 *micropipette* dan dipindahkan kedalam *microtube* baru yang kering dan steril. *Buffy coat* itu merupakan fase kaya platelet (PRP). *Platelet-rich plasma* yang telah didapatkan kemudian diambil sebanyak 50µl untuk diperiksa jumlah *platelet*nya di Laboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada .Inkorporasi PRP.

3. Proses inkorporasi

PRP pada perancah koral buatan CaCO₃ dilakukan dengan metode tetes. *Platelet-rich plasma* sebanyak 70 µl diambil menggunakan *micropipette* dan diteteskan pada 3 sampel perancah yang sebelumnya telah disiapkan dalam wadah. Saat proses inkorporasi, pastikan seluruh permukaan perancah koral buatan berkontak dengan PRP.

4. Pengukuran kemampuan *swelling*

Menyiapkan PBS dalam 6 wadah, masing-masing sebanyak 1,5 ml. Memasukkan semua sampel, baik yang telah diinkorporasikan dengan PRP maupun yang tidak diinkorporasikan dengan PRP ke dalam wadah yang sebelumnya sudah diisi PBS. Kemudian semua sampel dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C. Perancah kemudian ditimbang untuk mengetahui berat perancah dalam keadaan *swelling* setelah kontak dengan PBS. Pengukuran berat perancah dalam keadaan *swelling* dilakukan tiap rentan waktu 30 menit sampai jam ke-6. Kemudian dicek lagi beratnya setelah perendaman selama 24 jam. Pengukuran tiap sampel dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Ratio *swelling* perancah koral buatan dapat diketahui dengan rumus :

$$\text{Ratio } swelling (\%) = \frac{Ww - Wo}{Wo} \times 100$$

Wo adalah berat awal perancah sebelum direndam dalam PBS, sedangkan Ww adalah berat basah perancah setelah perendaman.

5. Pengukuran nilai *gel fraction*

Setelah 24 jam perendaman dalam PBS, perancah akan mengalami proses pemecahan yang disebut dengan *gel fraction*. Nilai *gel fraction* perancah koral buatan dapat diketahui melalui rumus berikut ini :

$$\text{Gel fraction (hydrogel\%)} \times 100$$

Wi merupakan berat awal perancah kering sebelum perendaman dan Wd adalah berat perancah kering yang tidak larut setelah perendaman.

Hasil Penelitian

Kemampuan *swelling* perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP maupun tanpa inkorporasi PRP dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. *Swelling ratio*

Waktu perendaman	Σ <i>Swelling ratio</i>	
	PRP	Non-PRP
30 menit	597,76 %	380,85 %
1 jam	434,90 %	331,52 %
1,5 jam	390,79 %	262,39 %
2 jam	362,16 %	241,47 %
2,5 jam	334,28 %	233,58 %
3 jam	245,02 %	225,21 %
3,5 jam	228,64 %	218,55 %
4 jam	207,87 %	218,21 %
4,5 jam	197,83 %	218,21 %
5 jam	187,93 %	211,21 %
5,5 jam	187,13 %	206,46 %
6 jam	186,37 %	201,73 %
24 jam	185,70 %	197,98 %

Hasil analisa data menggunakan independent T test dapat dilihat pada Tabel 2.

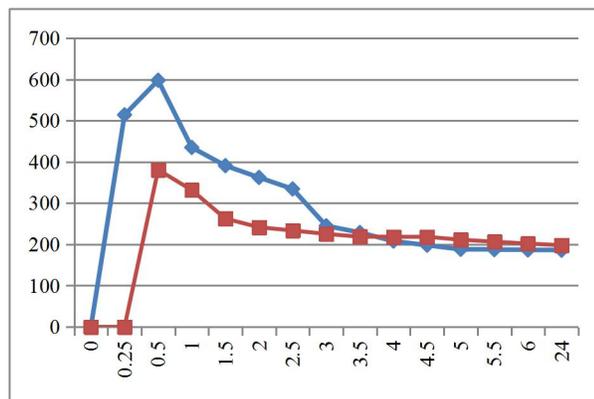
Table 2. *Independent t Test*

Waktu	Sig. (2-tailed)
30 menit	0,010*
1 jam	0,133
1,5 jam	0,103
2 jam	0,065
2,5 jam	0,105
3 jam	0,519
3,5 jam	0,692
4 jam	0,744
4,5 jam	0,363
5 jam	0,393
5,5 jam	0,449

6 jam	0,570
24 jam	0,668

Perbedaan profil *swelling* antara kelompok sampel yang diinkorporasikan dengan PRP dan kelompok perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP dapat dilihat pada grafik 1.

Grafik 1. Profil *swelling*



Keterangan grafik : warna biru menunjukkan profil *swelling* perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP. Warna merah menunjukkan profil *swelling* perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP. Grafik diatas menunjukkan adanya perbedaan profil *swelling* antara perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP dan perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP. Perancah yang diinkorporasikan dengan PRP mempunyai kemampuan *swelling* yang lebih tinggi dibandingkan dengan perancah tanpa inkorporasi PRP diawal waktu sampai dengan jam ke-3. Kemudian, kedua kelompok sampel perancah cenderung mengalami penurunan kemampuan *swelling* secara bertahap dan kemudian perancah cenderung mempertahankan kesetimbangannya yaitu disebut dengan fase equilibrium sampai pada jam ke-24.

Pembahasan

Hasil uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara sampel yang diinkorporasikan dengan PRP dan sampel tanpa inkorporasi PRP. Namun, pada grafik dapat dilihat terdapat perbedaan pergerakan profil *swelling* antara sampel PRP dan non PRP. Perancah yang diinkorporasikan dengan PRP mengalami proses *swelling* yang lebih cepat dibandingkan dengan perancah tanpa inkorporasi PRP diawal waktu perendaman sampai pada jam ke-3. Kemampuan *swelling* perancah meningkat secara drastis diawal waktu, kemudian mengalami penurunan dan selanjutnya perancah pada kedua kelompok sampel cenderung

mengalami proses kesetimbangan sampai jam ke-24 yang disebut dengan fase equilibrium. Perubahan rasio *swelling* perancah PVA/HA komposit hidrogel dibagi menjadi empat tahap, yaitu : meningkat secara cepat, menurun, menurun secara perlahan, dan kemudian stabil⁵. Proses pembengkakan awal merupakan proses yang diharapkan karena dapat meningkatkan porositas perancah sehingga dapat memfasilitasi *attachment* sel. Namun, pembengkakan yang terus menerus akan menyebabkan hilangnya integritas mekanik dan dapat menyebabkan tekanan ke jaringan sekitar⁶.

Perancah koral buatan hidrogel gelatin CaCO_3 ketika diinkorporasikan dengan PRP akan membuat PRP menjadi teraktivasi oleh karena adanya ion Ca. Kontak keduanya menyebabkan PRP mengeluarkan faktor-faktor pertumbuhan yang dapat berperan sebagai sinyal molekuler untuk sel dapat bermigrasi, berproliferasi, dan berdiferensiasi⁷. Secara umum, komponen koagulasi dalam plasma akan membentuk fibrin matrix dengan formasi 3 dimensi yang dapat berperan sebagai perancah alami untuk melekatnya sel dalam proses perbaikan jaringan⁸. Ion Ca sebagai cofaktor thrombin, dapat mengaktifkan protombin menjadi trombin yang dapat mengubah fibrinogen yang terkandung dalam PRP menjadi benang-benang fibrin⁹. Dapat diasumsikan dalam penelitian ini bahwa ion Ca yang terkandung dalam perancah koral buatan ketika berkontak dengan PRP saat inkorporasi maka akan terbentuk benang-benang fibrin. Selain itu, perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP mempunyai struktur yang lebih kuat karena terjadi ikatan elektrostatis antara fibrin yang dihasilkan dari aktivasi PRP dengan ion Ca yang terkandung dalam perancah koral buatan. Kombinasi antara jalinan benang-benang fibrin hasil aktivasi PRP dengan perancah kitosan berporus terbukti dapat meningkatkan kekuatan mekanik jalinan benang fibrin yaitu dengan membentuk ikatan elektrostatis¹⁰. Peningkatan kekuatan mekanik dari struktur perancah dapat memberikan keuntungan, karena perancah yang ideal adalah perancah yang mempunyai sifat mekanik yang cukup kuat untuk sel dapat melekat, berproliferasi, dan berdiferensiasi, dan cukup kuat untuk bertahan sampai jaringan tulang yang baru terbentuk².

Setelah 24 jam perendaman dalam PBS, perancah akan mengalami proses pemecahan struktur yang disebut dengan *gel fraction*. Proses tersebut ditandai dengan penurunan sifat mekanik perancah yang kemudian perancah akan terdegradasi. Terdapat perbedaan nilai *gel fraction* antara perancah koral buatan yang diinkorporasikan dengan PRP dan perancah koral buatan tanpa inkorporasi PRP. Nilai *gel fraction* pada perancah sebanding dengan berat akhir perancah dalam keadaan kering setelah perendaman dalam PBS, dimana semakin berat perancah kering maka nilai *gel fraction* semakin tinggi¹¹. Penambahan CaCl_2 pada perancah alginate tubular fiber dapat meningkatkan kekuatan ikatan permukaan perancah dan dapat membuat perancah lebih terintegrasi. Selain itu, dengan penambahan CaCl_2 sebagai agen *double crosslinking* juga dapat meningkatkan nilai *gel fraction* dari perancah tersebut¹². Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai *gel fraction* pada perancah yang diinkorporasikan dengan PRP memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan

perancah tanpa inkorporasi PRP. Hal tersebut berarti perancah yang diinkorporasikan dengan PRP mempunyai struktur yang lebih kuat yang ditandai dengan berat struktur perancah yang larut dalam PBS lebih sedikit dibandingkan dengan perancah tanpa inkorporasi PRP.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Berdasarkan grafik profil *swelling*, menunjukkan adanya perbedaan antara perancah yang diinkorporasi PRP dengan perancah tanpa inkorporasi PRP.
2. Perancah yang diinkorporasi PRP mempunyai kemampuan *swelling* yang lebih tinggi diawal waktu karena adanya jalinan benang fibrin hasil aktivasi dari PRP.

Daftar pustaka

1. Blackwood, K. A., Bock, N., Dargaville, T. R., & Woodruff, M. A. (2012). Scaffolds for Growth Factor Delivery as Applied to Bone Tissue Engineering
2. O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95
3. Chen, G., Ushida, T., & Tateishi, T. (2002). Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromol Biosci*, 67-77.
4. Rodriguez, I. A., Kalaf, E. A., Bowlin, G. L., & Sell, S. A. (2014). Platelet-Rich Plasma in Bone Regeneration: Engineering the Delivery for Improved Clinical Efficacy. *BioMed Research International* , 1-15.
5. Zhang, D.-k., Wang, D.-g., Duan, J.-j., & Ge, S.-r. (2009). Research on the Long Time Swelling Properties of Poly (vinyl alcohol)/ Hydroxylapatite Composite Hydrogel. *Journal of Bionic Engineering*, 22-28.
6. Pan, Y., Dong, S., Hao, Y., Chu, T., Li, C., & Zhang, Z. (2010). Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for tissue engineering. *Journal of Microbiology*, 4(9), 865–870.
7. Sánchez-González, D. J., Méndez-Bolaina, E., & Trejo-Bahena, N. I. (2012). Platelet-Rich Plasma Peptides: Key for Regeneration. *International Journal of Peptides*, 1-10.
8. Anitua, E., Zaiduendo, M., Troya, M., Padilla, S., & Orive, G. (2015). Leukocyte Inclusion within a Platelet Rich Plasma-Derived Fibrin Scaffold Stimulates a More Pro-Inflammatory Environment and Alters Fibrin Properties. *PLOS ONE* 10(3), 1-15.
9. 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.
10. 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.

11. Nagasawa, N., Yagi, T., Kume, T., & Yoshii, F. (2004). Radiation Crosslinking of Carboxymethyl Starch. *Carbohydrate Polymers* 58, 109–113.
12. Li, Y., Liu, Y., Li, S., Liang, G., Jiang, C., & Hu, Q. (2015). Novel Control of Gel Fraction and Enhancement of Bonding Strength for Constructing 3D Architecture of Tissue Engineering Scaffold with Alginate Tubular Fiber. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. xx No. xx, 1-6.