

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

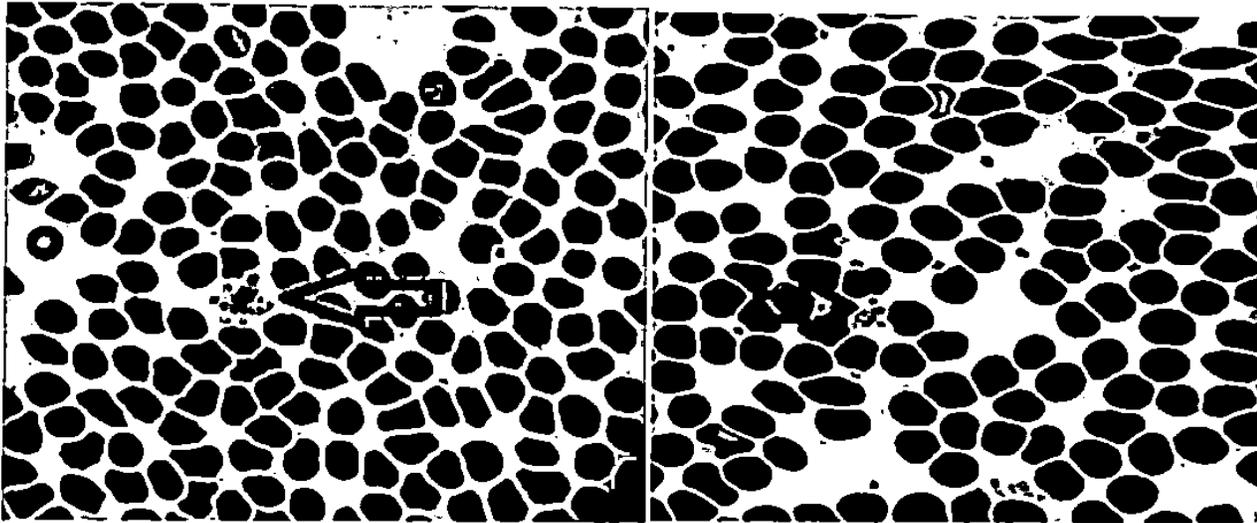
Penelitian diawali dengan membuat *platelet-rich plasma* dan membuktikan bahwa jumlah platelet pada *platelet-rich plasma* merupakan kelipatan dari jumlah platelet pada *whole blood*, berikut ini dijelaskan dalam tabel 1. Pembuatan *platelet rich plasma* terbukti benar terdapat kelipatan, maka jumlah *platelet-rich plasma* hasil sentrifugasi dijadikan sebagai jumlah platelet awal (A).

Tabel 1. Kelipatan Jumlah Platelet pada PRP

Sampel Darah	Jumlah Platelet <i>Whole Blood</i> (Ribu/mmk)	Jumlah Platelet PRP (Ribu/mmk)	Kelipatan PRP dari <i>Whole Blood</i>
Donor 1	109	743	6,8165
Donor 2	178	564	3,1685
Donor 3	226	578	2,5575

Perhitungan jumlah platelet dalam *whole blood* dan PRP dilakukan dengan pewarnaan giemsa. Berikut ini gambar hasil perhitungan giemsa dalam mikroskop dengan pembesaran 100x. Platelet tampak sebagai sel kecil, tidak berinti, bulat dengan sitoplasma berwarna ungu ke abu-abuan pucat yang berisi granula merah-ungu tersebar secara merata (Leeson dan Paparo, 1995).

Terlihat jumlah platelet yang lebih banyak pada gambaran pewarnaan giemsa pada PRP (gambar 3) dibandingkan dengan *whole blood* (gambar 4)



Gambar 3. Pewarnaan giemsa pada *whole blood*

Gambar 4. Pewarnaan giemsa pada *platelet-rich plasma*

Hasil pemuatan *platelet-rich plasma* pada gelatin hidrogel dapat diketahui dengan mengitung sisa *platelet-rich plasma* yang tidak termuat, diketahui dengan menghitung jumlah platelet sisa metode celup (B) dan platelet sisa metode tetes (C) dengan pewarnaan giemsa (tabel 2). Jumlah *platelet-rich plasma* yang termuat dalam gelatin hidrogel dapat diketahui dengan menggunakan rumus :

Jumlah PRP yang termuat dengan metode celup	=	A - B
--	---	-------

Jumlah PRP yang termuat dengan metode tetes	=	A - C
--	---	-------

Tabel 2. Jumlah Platelet (PRP) Sisa Metode Celup dan Tetes

Sampel Darah / Replikasi Perancah		Jumlah Platelet Sisa Celup (B) (Ribu/mmk)	Jumlah Platelet Sisa Tetes (C) (Ribu/mmk)
Donor 1	1	1686	750
	2	780	852
	3	754	1252
Donor 2	1	470	520
	2	514	470
	3	446	386
Donor 3	1	642	472
	2	520	456
	3	580	412

Tabel 3. Jumlah Platelet (*platelet-rich plasma*) yang Termuat dengan Metode Celup dan Tetes

Sample Darah / Replikasi Perancah		Jumlah Platelet Termuat Metode Celup (Ribu/mmk)	Jumlah Platelet Termuat Metode Tetes (Ribu/mmk)
Donor 1	1	57	7
	2	37	109
	3	11	509
Donor 2	1	94	44
	2	50	94
	3	118	178
Donor 3	1	64	106
	2	58	122
	3	2	166

Data yang diperoleh akan dianalisa dengan menggunakan Independent sampel t test (uji parametrik) jika distribusi data normal dan menggunakan Mann-Whitney (uji non-parametrik) jika distribusi data tidak normal. Untuk menentukan data tersebut normal maka harus dilakukan uji normalitas

Tabel 4. Hasil Case Processing Summary

Perlakuan		Case					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Jumlah Platelet	Celup	9	100,00%	0	0,00%	9	100,00%
yang Termuat	Tetes	9	100,00%	0	0,00%	9	100,00%

Dari tabel 4 kita dapat melihat jumlah sampel yang akan kita olah adalah sebanyak 9 untuk masing-masing metode celup dan tetes. Tidak terdapat data *missing* atau hilang.

Tabel 5. Hasil Uji Normalitas

Perlakuan		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Jumlah Platelet	Celup	0,956	9	0,778
yang Termuat	Tetes	0,753	9	0,006

Uji normalitas yang digunakan adalah Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang diuji ≤ 50 . Hasil uji normalitas didapatkan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas metode celup adalah 0,778 ($p > 0,05$) artinya normal. Sedangkan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas metode tetes adalah 0,006 ($p < 0,05$) artinya tidak normal. Oleh karena salah satu uji normalitas tidak normal maka disimpulkan bahwa data tidak normal. Sebelum menentukan data tidak berdistribusi normal, dilakukan terlebih dahulu transformasi data. Jika hasil transformasi data tetap menunjukkan data tidak normal, maka dilakukan uji Mann-Whitney (uji non-parametrik).

Tabel 6. Hasil Case Processing Summary Transformasi Data Metode Tetes

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
LnT	6	66,70%	3	33,30%	9	100,00%

Tabel 7. Hasil Uji Normalitas Transformasi Data Metode Tetes

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
LnT	0,899	6	0,368

Setelah dilakukan transformasi data, maka nilai signifikansi atau probabilitas 0,368 ($p > 0,05$), maka dapat disimpulkan bahwa data normal. Jika kedua data telah dikatakan normal, maka uji analisa yang dilakukan adalah Independent Sampel T Test.

Tabel 8. Hasil Uji Normalitas Metode Celup dan Tetes Hasil Transformasi Data Metode Tetes

Perlakuan		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
VAR0000	Celup	0,958	9	0,778
	Tetes	0,899	6	0,368

Tabel 9. Hasil Uji Independet Sampel T Test Group Statistics

Perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Jumlah Platelet yang Termuat	Celup	9	29,2222	61,00979	20,3366
	Tetes	6	4,6815	0,50502	0,20617

Tabel 10. Hasil Uji Independent Sampel T Test

		Levene's Test For Equality of Variance		t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
jumlah platelet yang Termuat	Equal Varince assumed	19,971	0,001	0,973	13	0,348	24,54077	25,22498
	Equal Varince not assumed			1,207	8,002	0,262	24,50477	20,33764

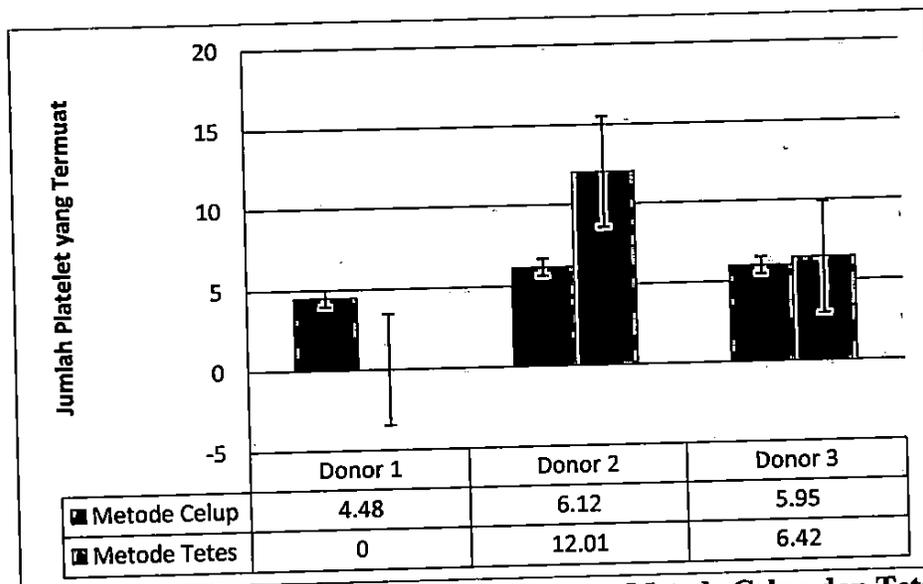
Pada kotak *Levene's Test*, nilai signifikansi 0,01 ($p < 0,05$) maka varians data kedua kelompok tidak sama. Namun, ketidaksamaan varians tidak menjadi syarat mutlak. Karena varians tidak sama, maka untuk melihat hasil uji t memakai hasil pada baris ke 2 atau *Equal variance not assumed*. Uji Independent Sanpel T Test yang dilakukan menggunakan Tingkat Kepercayaan 95 % dan nilai kesalahan 5 % artinya penelitian ini cukup ideal. Nilai signifikansi 0,262 ($p > 0,05$) artinya tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode celup dan tetes.

Pada grafik perbedaan metode celup dan tetes (gambar 5) terlihat terdapat perbedaan jumlah platelet yang termuat dalam gelatin hidrogel, metode celup lebih baik dibanding dengan metode tetes. Namun, perbedaan tersebut tidak berarti karena secara statistika nilai signifikansi menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode celup dan tetes

dalam pengukuran platelet yang piasnya pada gelatin hidrogel

Tabel 11. Mean dan Standart deviasi Metode Celup dan Tetes

Sampel Darah	Replikasi	Jumlah Platelet yang Termuat (%)	
		Metode Celup	Metode Tetes
Donor 1	1	7,76	0
	2	0	0
	3	0	0
Mean		2,58	0
Standart Deviasi		±4,480	0
Donor 2	1	16,66	7,8
	2	8,86	16,66
	3	20,92	31,56
Mean		15,48	18,67
Standart Deviasi		±6,11	±12,00
Donor 3	1	0	18,79
	2	10,3	19,85
	3	0	30,4
Mean		3,43	23,01
Standart Deviasi		±5,94	±6,41



Gambar 5. Grafik Perbedaan Jumlah Platelet Metode Celup dan Tetes dengan Standart Error Bar

Kesimpulannya bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode celup dan tetes untuk pemuatan *platelet-rich plasma* pada perancah gelatin hidrogel, kedua metode memuatkan jumlah platelet yang sama.

B. Pembahasan

Gelatin hidrogel merupakan hidrogel berbahan dasar gelatin yang dibuat melalui penyilangan hidrogel (Wu dan Ding, 2004). Gelatin hidrogel telah banyak digunakan di bidang kesehatan karena memiliki sifat biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang baik. Polimer alami seperti gelatin telah terbukti menjadi biomaterial yang lebih baik untuk regenerasi syaraf, memiliki ketersediaan yang memadai dan memiliki karakteristik fisik-mekanik yang baik (Abidin dkk, 2010). Terlebih lagi, aplikasi gelatin sebagai material perancah dalam *drug delivery system* diketahui dapat membawa *growth factor* sebagai senyawa bioaktif yang berperan dalam regenerasi tulang (Lu dkk, 2008).

Terdapat 11 hal yang harus terpenuhi dalam sebuah perancah yaitu *biokompatibilitas, biodegradabilitas, mechanical properties*, struktur perancah, *interface adherence*, porositas, *G Nature, processability, loading capacity release* kinetik, *stability dan binding affinity*. Berkaitan dengan kemampuan pemuatan *platelet-rich plasma* dalam gelatin hidrogel, maka dari 11 hal yang harus terpenuhi terdapat hal yang mempengaruhi dalam pemuatan *platelet-rich plasma* yaitu struktur perancah, *interface adherence* dan porositas. Sedangkan proses *release* sangat dipengaruhi oleh *loading capacity, release kinetik dan*

Interface adherence adalah bagaimana sel dapat menempel pada permukaan perancah dan membantu sel dalam proses adhesi dan proliferasi serta memfasilitasi sel-sel untuk bermigrasi. *Interface adherence* dipengaruhi oleh struktur perancah (Garg dkk, 2012).

Struktur perancah menggambarkan bahwa perancah secara makroskopis dan mikroskopis mempunyai permukaan yang baik dan rasio volume yang memberikan kemudahan kepada sel untuk melekat. Morfologi permukaan hidrogel sangat berpengaruh terhadap karakteristik membran hidrogel karena permukaan membran secara langsung berinteraksi dengan cairan atau lingkungan fisiologis tubuh (Swantomo dkk, 2008). Penelitian yang telah dilakukan Riskha dan Dian, 2014 menunjukkan bahwa proporsi gelatin yang banyak dapat menghasilkan permukaan membran yang berongga.

Hal yang dapat menentukan ukuran pori adalah volume polimer dan volume pelarut yang digunakan. Saat polimer menyatu dengan pelarut, volume polimer mengembang sedangkan volume pelarut dalam keadaan tetap sehingga adanya perbedaan akan menghasilkan pola berpori (Dulkha dan Sari, 2014).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Seebach dkk (2010) bahwa porositas antara 60-80 % dan ukuran pori 100-200 μ m merupakan kondisi ideal untuk perlekatan *mesenchymal stem cell* (MSC). Sel platelet yang mempunyai ukuran 2-5 μ m (Lesson dan Paparo, 1995), sangat mungkin untuk masuk kedalam gelatin hidrogel. Porositas yang rendah akan berpengaruh pada tingkat perlekatan *platelet rich plasma* (Seebach dkk 2010)

Selain struktur perancah, *Interface adherence* dan porusitas, terdapat faktor yang berhubungan dengan pemuatan platelet-rich plasma pada perancah, terutama perancah gelatin hidrogel yaitu *swelling ability* (kemampuan penyerapan air).

Swelling ability berkaitan dengan kemampuan perancah dalam melakukan proses absorpsi. Absorpsi merupakan kemampuan perancah dalam menyerap cairan dari lingkungan sekitarnya. Kemampuan hidrogel dalam penyerapan air dipengaruhi oleh adanya gugus fungsi bebas dalam jaringa struktur molekulnya yang dapat mengikat air. Beberapa gugus fungsi yang berpengaruh pada saat penyerapan adalah gugus $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-CONH$ dan $-SO_3H$ (Abidin dkk, 2012).

Selain itu ikatan hidrogen akan terbentuk melalui interaksi antara atom hidrogen dari air dengan atom oksigen dari polimer. Hal inilah yang menjadi salah satu faktor yang membantu mekanisme penyerapan air pada hidrogel (Swantomo dkk, 2008). Kadar air dalam hidrogel sangat tergantung dari konsentrasi formula yang digunakan pada saat fabrikasi perancah (Darwis dkk, 2010).

Mekanisme *swelling* pada hidrogel terjadi karena air akan berdifusi oleh tekanan osmotik hidrogel. Setelah mencapai tahap keseimbangan, air yang diserap akan terikat dengan gugus hidrogel membentuk ikatan hidrogen. Pada akhirnya air yang terserap ini kan tetap bertahan pada hidrogel sehingga polimer mengalami pengembangan atau *swelling* (Swastomo dkk, 2008).

Tekanan osmotik air lebih rendah dari tekanan osmotik hidrogel sehingga air

akan masuk ke hidrogel, karena zat akan berpindah dari tekanan osmotik rendah ke tekanan osmotik yang tinggi (Darwis dkk, 2010).

Sifat gelatin hidrogel yang tinggi akan air dan berupa gel pasti akan mengalami pengembangan setelah dimuatkan *platelet-rich plasma* (Bundela dan Bajpai, 2008).

Hal ini menjadi salah satu parameter yang penting untuk diketahui karena mempunyai korelasi terhadap kemampuan hidrogel dalam mengabsorpsi *platelet-rich plasma*. Membran hidrogel yang mengembang atau membengkak dalam medium cair menunjukkan bahwa polimer mampu mengabsorpsi dengan baik (Dulkha dan Sari, 2014).

Struktur perancah, porositas dan *interface adherence* setiap perancah gelatin hidrogel akan berbeda-beda tergantung dari proses sintesis dan teknik fabrikasi (Wattanutchariya dan Changkowchai, 2004). Berbagai jenis teknik fabrikasi digunakan dalam desain perancah untuk aplikasi rekayasa jaringan seperti metode *solvet casting*, *gas foaming*, *particulate leaching* dan *ice particle leaching* mempunyai kelebihan dan kekurangan (Darwis dkk, 2010).

Metode *ice particle leaching* yang dilakukan dalam penelitian Dulkha dan Sari (2014) menghasilkan gelatin hidrogel dengan porositas yang baik. Metode *ice particle leaching* dengan melelehkan partikel es memiliki keuntungan yaitu dapat mengontrol struktur pori, dapat memproduksi perancah yang lebih tebal dan dapat diaplikasikan pada porus perancah tiga dimensi untuk regenerasi tulang dalam rekayasa jaringan.

Metode Celup dan Tetes merupakan metode yang dapat digunakan dalam pemuatan *platelet rich plasma*. Dari hasil penelitian tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara pemuatan *platelet-rich plasma* dengan menggunakan metode celup atau metode tetes. Kedua metode tidak berpengaruh terhadap besarnya jumlah platelet yang termuat dalam gelatin hidrogel, hal yang berpengaruh adalah karakteristik dari gelatin hidrogel itu sendiri, yaitu struktur, porositas, *interface adherence* dan *swelling ability*.

Tentu saja untuk memuatkan *platelet-rich plasma* yang banyak pada gelatin, proses pembuatan gelatin harus diperhatikan, yaitu pada saat proses sintesis gelatin dan teknik fabrikasi nanogel.