



Original Article

Perbedaan Jumlah Trombosit, Leukosit dan Eritrosit dengan Kecepatan Sentrifugasi yang Berbeda pada Pembuatan *Platelet Rich Plasma*

Dwi Fajaryani, Muji Rahayu, Edward Kurnia Setiawan Limijadi

Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi Semarang

Abstrak

p-ISSN: 2301-4369 e-ISSN: 2685-7898
<https://doi.org/10.36408/mhjcm.v7i1.421>

Diajukan: 5 Juli 2019
Diterima: 7 Oktober 2019

Afiliasi Penulis:
Bagian Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/
RSUP Dr. Kariadi
Semarang

Korespondensi Penulis:
Dwi Fajaryani
Jl. Dr. Sutomo No. 16, Semarang,
Jawa Tengah 50244,
Indonesia

E-mail:
dwifajaryani@yahoo.com

Latar belakang : *Platelet Rich Plasma* (PRP) adalah plasma dalam jumlah sedikit dengan jumlah trombosit banyak, didapatkan melalui sentrifugasi. Trombosit dalam PRP penting untuk penyembuhan luka dan memperbaiki jaringan rusak. Kecepatan sentrifugasi berperan penting dalam memisahkan sel darah merah dengan plasma dan menghasilkan platelet konsentrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit dengan kecepatan sentrifugasi yang berbeda pada pembuatan *platelet rich plasma*.

Metode : Penelitian belah lintang pada orang sehat di laboratorium RSUP Dr. Kariadi Semarang bulan Juli 2018. Darah vena ditampung dalam tabung sitras dan *Ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA). Darah EDTA untuk pemeriksaan hematologi rutin dengan *hematology analyzer*, hasil normal dilanjutkan pembuatan PRP dari darah sitras 3,2% dengan dua metode sentrifugasi, dengan kecepatan 100xg – 400x selama 10 menit (metode PRP1) dan kecepatan 540xg – 2270xg selama 10 menit (metode PRP2). Kedua produk PRP dilakukan pemeriksaan jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit. Data dianalisis dengan uji *Kruskall Wallis* dan *Mann Whitney*, signifikan bila $p < 0,05$.

Hasil : Sampel terdiri dari 35 orang responden. Terdapat perbedaan bermakna jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit pada pembuatan PRP-1 dan PRP-2 ($p < 0,001$)

Simpulan : Terdapat perbedaan jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit pada kecepatan sentrifugasi yang berbeda. Kecepatan sentrifugasi pada metode pembuatan PRP-1 disarankan dalam pembuatan PRP.

Kata kunci : PRP, trombosit, leukosit, eritrosit

The differences of platelets, leukocytes and erythrocytes count with different centrifugation rate on platelet rich plasma production

Abstract

Background : *Platelet Rich Plasma* (PRP) consisting of small amounts plasma with many platelet, which was obtained by centrifugation process. The plateletin PRP are essential for wound healing and repair of damaged tissue. The centrifugation velocity plays an important role in separating red blood cells by plasma and producing concentrated-platelets. This study aims to determine differences the number of platelets, leukocytes and erythrocytes with different centrifugation rates on platelet rich plasma production.

Methods:This cross sectional study was conducted on 35 healthy people in the laboratory of Kariadi Hospital Semarang in July 2018. The blood vein were collected in Citrate 3.2 % and *Ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) tubes. Sample EDTA for complete blood counts, if the results were normal then continued with PRP preparation in 2 different methods centrifugation (PRP 1 at 100xg-400xg for 10 minutes and PRP 2 at 540xg – 2270 xg for 10 minutes). Both of the PRP products were calculated the amounts of platelet, leukocytes, and erythrocytes. The data were analyzed by *Kruskall Wallis* and *Mann Whitney*, $p < 0.05$ was considered as significant.

Results : There was a significant difference between PRP-1 and PRP-2 method in platelet counts, leukocytes count and erythrocytes count ($p < 0.001$).

Conclusion : There was differences in platelet count, leukocytes count and erythrocytes count with different centrifugation rate. Centrifugation rate on PRP-1 method is recommended in the production of PRP.

Keywords : PRP, platelets, leukocytes, erythrocytes

PENDAHULUAN

Platelet Rich Plasma (PRP) adalah produk darah yang terdiri dari sejumlah plasma dalam jumlah sedikit dengan jumlah trombosit yang banyak, didapatkan melalui proses sentrifugasi dari sediaan *whole blood*.¹ Konsentrasi trombosit yang berada dalam PRP dilaporkan sangat penting dalam proses penyembuhan luka.³ PRP di RSUP Dr. Kariadi pada saat ini digunakan untuk kepentingan klinis pasien dengan osteoarthritis. Pembuatan PRP di RSUP Dr. Kariadi dengan kecepatan sentrifugasi 540 xg selama 10 menit pada sentrifugasi pertama dilanjutkan dengan kecepatan sentrifugasi 2270 xg selama 10 menit pada sentrifugasi kedua.⁴ Kecepatan sentrifugasi yang digunakan di laboratorium RS. Kariadi saat ini digunakan di bagian Ilmu/SMF Kesehatan kulit dan kelamin FK UGM/ RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, namun belum didapatkan data tentang jumlah trombosit yang dihasilkan dari sediaan PRP tersebut. Penelitian Perez, *et al*,⁵ mendapatkan kenaikan jumlah trombosit 5x dari jumlah trombosit sebelum preparasi melalui proses sentrifugasi 100 xg selama 10 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi kedua 400 xg selama 10 menit. Kontrol kualitas dari sediaan trombosit menurut *American Association of Blood Banks* dinilai dari jumlah volume sediaan, jumlah trombosit, fenomena *swirling* pada sediaan trombosit, pH, jumlah eritrosit yang tersisa, leukosit, dan sterilitas,⁶ pada penelitian ini jumlah leukosit dan eritrosit (yang tersisa) pada sediaan PRP menjadi salah satu kontrol kualitas dari sediaan PRP.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah trombosit, leukosit dan

eritrosit dengan kecepatan sentrifugasi yang berbeda pada pembuatan *platelet rich plasma*. Penelitian diharapkan dapat menjadi masukan dalam penyusunan metode pembuatan PRP dalam menghasilkan jumlah trombosit yang optimal dengan jumlah leukosit dan eritrosit yang minimal.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian dengan metode belah lintang (*cross sectional*) yang dilakukan selama 2-6 Juli 2018 di RSUP Dr. Kariadi Semarang. Penelitian melibatkan 35 orang sehat yaitu residen dan analis yang berdinis di Laboratorium RSUP Dr. Kariadi Semarang, berusia 25-45 tahun, terdiri dari 12 orang laki-laki dan 23 orang perempuan, tidak ada keluhan sewaktu penelitian, dari pemeriksaan tanda-tanda vital dan pemeriksaan fisik didapatkan hasil dalam batas normal dan pemeriksaan hematologi rutin dalam rentang normal dengan nilai trombosit $150-400 \times 10^3 / \mu\text{L}$, leukosit $3,6-11 \times 10^3 / \mu\text{L}$, eritrosit $4,4-5,9 \times 10^6 / \mu\text{L}$, dan Hb 12-17 g/dl. Sampel dengan riwayat kelainan sistem hematologi dan koagulasi, riwayat penyakit berat dan kronis, mengkonsumsi obat antikoagulan dalam 7 hari terakhir dikeluarkan dari penelitian ini. *Sampling* dilakukan dengan teknik *consecutive* pada residen dan analis laboratorium RSUP Dr. Kariadi yang bersedia ikut serta dalam penelitian ini dengan persetujuan *informed consent*. *Ethical clearance* diperoleh dari institusi Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang nomor : 439/EC/FK-RSDK/VII/2018

TABEL 1
Data deskriptif sampel

Variabel	F	%	Mean ± SD	Median (Min – Maks)
Jenis kelamin				
Laki-laki	12	34,3		
Perempuan	23	65,7		
Umur (tahun)			33,00 ± 4,71	
Pekerjaan				
Residen	25	71,4		
Analis	10	28,6		
Hematologi				
Hb (mg/dl)			13,60 ± 1,23	
Trombosit (x10 ³ /μL)				299 (165 – 403)
Leukosit (x10 ³ /μL)				6,7 (4,49 – 9,7)
Eritrosit(x10 ⁶ /μL)				4,79 (4,05 – 10,9)

Hb : hemoglobin

TABEL 2
Perbedaan Jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit pada sampel EDTA, PRP 1 dan PRP 2

Variabel	Median			p
	EDTA	PRP 1	PRP 2	
Trombosit (x10 ³ /μL)	299 (165 – 403)	593 (246 – 1311)	133 (53 – 621)	<0,001*
Leukosit (x10 ³ /μL)	6,7 (4,49 – 9,7)	0,1 (0 – 0,8)	0,1 (0 – 0,3)	<0,001*
Eritrosit(x10 ⁶ /μL)	4,79 (4,05 – 10,9)	0,02 (0 – 0,1)	0 (0 – 0,01)	<0,001*

*Kruskal Wallis

Sampel darah *whole blood* diambil sebanyak 12 ml dari responden, 2 ml di masukan ke dalam tabung dengan antikoagulan EDTA dan 2,5 ml dimasukan kedalam empat buah tabung dengan antikoagulan sitras 3,2%. Sampel dengan antikoagulan EDTA dilakukan pemeriksaan hematologi rutin menggunakan alat *hematology analyzer Sysmex XP-100* (Sysmex Corporation, Kobe, Jepang) dengan metode impedansi, selanjutnya sampel dengan hasil hematologi yang normal dilanjutkan dengan preparasi pembuatan PRP dari sampel dengan antikoagulan sitras 3,2% meliputi pembuatan PRP 1 dengan kecepatan sentrifugasi 100xg dilanjutkan 400xg selama 10 menit dan pembuatan PRP 2 dengan kecepatan sentrifugasi 540xg dilanjutkan 2300xg selama 10 menit dengan alat KUBOTA 4000 (Tokyo, Jepang). Sampel dari pembuatan PRP 1 dan PRP 2 selanjutnya di hitung jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit yang tersisa, kemudian hasilnya dibandingkan dengan nilai trombosit, leukosit, dan eritrosit sebelum

pembuatan PRP (sampel EDTA).

Data jumlah trombosit, leukosit dan eritrosit dengan distribusi tidak normal disajikan dalam bentuk median (nilai terendah – nilai tertinggi). Analisis statistik menggunakan uji komparatif numerik tidak berpasangan dengan *Kruskal Wallis* untuk lebih dari dua kelompok, satu kali pengukuran dan *Mann Whitney* untuk dua kelompok, satu kali pengukuran. Analisis data penelitian menggunakan SPSS 15.0.

HASIL

Penelitian ini merekrut sejumlah 41 sampel orang sehat, dari hasil hematologi rutin, terdapat nilai yang tidak memenuhi kriteria nilai normal sehingga yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sejumlah 35 sampel terdiri dari 12 laki-laki (34,3%) dan 23 perempuan (65,7%) dengan rata-rata rentang usia 33,00 ± 4,71. Data karakteristik subjek pada tabel 1 disajikan dalam bentuk

TABEL 3
Uji beda nilai trombosit pada kelompok EDTA, PRP 1 dan PRP 2

Trombosit	PRP 1	PRP 2
EDTA	<0,001	<0,001
PRP 1	–	<0,001

Mann Whitney

TABEL 4
Uji beda nilai leukosit pada kelompok EDTA, PRP 1 dan PRP 2

Leukosit	PRP 1	PRP 2
EDTA	<0,001	<0,001
PRP 1	–	0,872

Mann Whitney

TABEL 5
Uji beda nilai eritrosit pada kelompok EDTA, PRP 1 dan PRP 2

Eritrosit	PRP 1	PRP 2
EDTA	<0,001	<0,001
PRP 1	–	<0,001

Mann Whitney

rerata simpang baku untuk data berdistribusi normal dan disajikan dalam bentuk median untuk data berdistribusi tidak normal.

Uji *Kruskall Wallis* pada Tabel 2 menunjukkan terdapat perbedaan jumlah trombosit pada EDTA, PRP 1, PRP 2 dengan $p < 0,001$. Terdapat perbedaan jumlah leukosit pada EDTA, PRP 1, PRP 2 dengan $p < 0,001$. Terdapat perbedaan antara jumlah eritrosit pada EDTA, PRP 1, PRP 2 dengan $p < 0,001$. Uji *Mann Whitney* menunjukkan perbedaan antara jumlah trombosit dan eritrosit (tabel 3 dan tabel 5) antara EDTA dan PRP 1, EDTA dan PRP 2, PRP 1 dan PRP 2 dengan $p < 0,001$.

PEMBAHASAN

Sentrifugasi berperan penting dalam menghasilkan konsentrat trombosit dapat kita lihat di tabel 2 dengan kecepatan sentrifugasi 100xg selama 10 menit dilanjutkan dengan kecepatan 400xg selama 10 menit jumlah trombosit pada PRP 1 mengalami peningkatan. Jumlah trombosit pada PRP 2 berbeda jika dibandingkan dengan EDTA namun jumlahnya bervariasi setelah dilakukan

sentrifugasi dengan kecepatan 540xg selama 10 menit dilanjutkan dengan 2300xg selama 10 menit. Pergerakan partikel sel darah terhadap gaya sentrifugasi dan diameter rotor sangat berpengaruh selama proses sentrifugasi begitu juga friksi dari partikel terhadap *velocity* partikel dan viskositas cairan, pada sediaan *whole blood* gaya sentrifugasi dan waktu sentrifugasi akan membuat eritrosit mengendap di bawah, lapisan plasma beserta platelet berada di atasnya, sedangkan pada sentrifugasi yang kedua konsentrasi gradien menjadi lebih konsisten.⁷ Trombosit berada di lapisan atas eritrosit oleh karena itu terkadang eritrosit terbawa pada proses pipetasi menjadi hal yang sulit di hindari. Kecepatan sentrifugasi yang tinggi dapat mengaktifkan trombosit, merangsang pelepasan ADP dan ATP yang selanjutnya dapat merangsang terjadinya agregasi.⁸ Bervariasinya jumlah trombosit pada PRP 2 bisa diakibatkan terdapatnya pellet, yaitu jendolan trombosit dan eritrosit di bagian bawah PRP yang akan mempengaruhi jumlah trombosit.

Hasil penelitian Bausset, *et al*,⁹ menyebutkan trombosit konsentrat dihasilkan maksimal dari kecepatan sentrifugasi 130xg dilanjutkan dengan kecepatan 250xg selama 15 menit, bila di dibandingkan dengan jumlah trombosit *whole blood* hasilnya bermakna dengan nilai $p = 0,02$, jika dibandingkan dengan kecepatan 1000xg didapatkan $p = 0,14$. Peneliti juga mengalami kesulitan sewaktu melakukan resuspensi pelet trombosit pada kecepatan tersebut, ini berhubungan dengan agregasi trombosit yang menunjukkan dengan kecepatan sentrifugasi yang lebih tinggi dapat mengurangi fungsi trombosit dan berkurangnya pelepasan *growth factor*.

Bertolak belakang dengan penelitian Nugraha, *et al*,¹⁰ pada 30 sampel darah dari kantong donor darah yang berada di PMI Surabaya menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan antara 200–2300xg dengan *double* sentrifugasi selama 5–15 menit. Terjadi peningkatan jumlah trombosit tertinggi pada sediaan pada proses sentrifugasi pertama sebesar 1300xg selama 5 menit dan 2300 xg selama 7 menit untuk sentrifugasi kedua dengan menggunakan *Tube-Shaped "I"*, kenaikan jumlah trombosit mencapai 4,11 kali dari jumlah sebelum preparasi.

Tabel 4 menunjukkan perbedaan antara jumlah leukosit antara EDTA dan PRP 1, EDTA dan PRP 2 dengan $p < 0,001$, Tidak menunjukkan perbedaan antara PRP 1 dan PRP 2 dengan $p = 0,872$. Hal ini menggambarkan bahwa kualitas PRP 1 dan PRP 2 dinilai dari jumlah leukosit yang tersisa sudah cukup baik, dan dengan kecepatan sentrifugasi yang berbeda tidak mempengaruhi jumlah leukosit yang tersisa dalam sediaan PRP. Leukosit yang tersisa dalam sediaan trombosit konsentrat membawa dampak yang merugikan, dapat menurunkan nilai pH, meningkatkan konsumsi glukosa, meningkatkan produksi laktat dan

pelepasan LDH selama masa penyimpanan,¹¹ selain itu dapat juga meningkatkan reaksi inflamasi, menyebabkan rasa nyeri pada lokasi injeksi PRP, namun ada beberapa pendapat yang mengungkapkan bahwa VEGF dari leukosit dapat sebagai antimikroba dan memicu perbaikan jaringan.¹²

Tabel 5 menunjukkan perbedaan jumlah eritrosit antara EDTA dan PRP 1, EDTA dan PRP 2, PRP 1 dan PRP 2 dengan $p < 0,001$. Sisa jumlah eritrosit pada kedua sediaan menunjukkan perbedaan, dengan kecepatan sentrifugasi yang lebih rendah sisa jumlah eritrosit lebih banyak dibanding dengan kecepatan sentrifugasi yang lebih tinggi, hal ini terjadi karena dengan gaya sentrifugasi yang lebih tinggi eritrosit akan lebih cepat mengendap. Penelitian Raturi *et al*,¹¹ mendapatkan jumlah kontaminasi eritrosit dalam sediaan PRP $0,29 \pm 0,20$ ml. Kontaminasi eritrosit pada sediaan konsentrat trombosit dapat membentuk granul di bagian bawah botol penampung, dimana granul tersebut akan menyebabkan menempelnya trombosit dan leukosit dipermukaan granul tersebut dan dapat mempengaruhi jumlah dan kualitas trombosit konsentrat.¹⁰

Kelemahan dari penelitian ini adalah menilai kualitas PRP belum dari semua parameter indikator mutu, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan variabel yang lebih lengkap terutama yang menilai fungsi trombosit, kandungan *growth factor* dan indikator mutu pada pembuatan PRP.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan jumlah trombosit leukosit dan eritrosit dengan kecepatan sentrifugasi yang berbeda pada pembuatan *platelet rich plasma*. Kecepatan sentrifugasi yang rendah (100xg - 400xg selama 10 menit) dapat disarankan dalam pembuatan PRP karena menghasilkan jumlah trombosit yang lebih tinggi dengan, jumlah leukosit yang sama antara PRP 1 dan PRP 2 sebagai salah satu indikator mutu PRP.

DAFTAR PUSTAKA

1. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.
2. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, *et al*. Platelet-Rich Plasma: Quantitative Assessment of Growth Factor Levels and Comparative Analysis of Activated and Inactivated Groups. *Arch Plast Surg.* 2013;40:530-5.
3. Khalafi RS, Bradford DW, Wilson MG. Topical application of autologous blood product during surgical closure, following a coronary artery bypass graft. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34:360-4.
4. Budiyo A. Penggunaan PRP di bidang dermatologi. Bagian/SMF Ilmu kesehatan Kulit dan kelamin. FK UGM/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta. Available from : <http://andinanendra.wordpress.com/2011/prp-for-skin-rejuvenent>
5. Perez AGM, Lana JFSD, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD, Santana MHA. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet rich plasma. Hindawi. *ISRN Hematology.* 2014.
6. Kamruzzaman BM, Hasan A, Dhingra N. Standard Operating Procedures for blood transfusion, Directorate general of health services (BANBCT), Mokhal Technical Assistance by WHO and Supported by The OPEC Fondation for International Development, 2013. Available from www.who.int/bloodsafety/transfusion_service/sop-bts_bangladesh
7. Plao L, Park H, Jo CH. Theoretical prediction and validation of cell recovery rates in preparing platelet rich plasma through a centrifugation. *PLOS ONE.* 2017;12(11):1-25.
8. Kaushansky K, Lichtman MA, Kipps TJ, Prchal JT, Levi MM. *Williams Hematology* eight edition, 2010.
9. Bausset O, Giraudo L, Veran J, Magalon J, Coudreuse JM, Magalon G, *et al*. Formulation and storage of platelet rich plasma homemade product. *BioResearch Open Access, Mary Ann Liebert, Inc.* 2012;1(3):115-23.
10. Nugraha HK, Muljanti M, Hernaningsih Y, Nugraha J. Platelet rich plasma protocols : A Preliminary Study. *Indonesia journal of tropical and infectious disease.* 2012;3(2):104-7
11. Raturi M, Shastry S, Raj P. Cumulative quality assessment for whole Blood-derived platelets : a compliance review. *Global Journal of Transfusion Medicine.* 2017;2:38-43.
12. Satyam A. Preparation and quality control of autologous platelets for therapeutic applications. *Clinical Association Departement of Tranfusion Medicine. BLK Super Speciality Hospital, New Delhi.* 2015. Available from : <https://www.researchgate.net>