

Platelet Rich Plasma (Prp) dari Limbah Darah Sapi sebagai Obat Luka Bakar pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus)

Platelet Rich Plasma (Prp) From The Waste Of Cow's Blood As A Cure For Burns In Rat (Rattus Norvegicus)

Rahmad Dwi Ardiansyah, Riefky Pradipta Baihaqie, Muhammad Nuriy Nuha Naufal,
Muhamad Atabika Farma Nanda, Aprilia Maharani, Yuda Heru Fibrianto

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
Email: rahmad.dwi.a@mail.ugm.ac.id

Naskah diterima: 24 Januari 2018, direvisi: 29 Januari 2019, disetujui: 6 Nopember 2019

Abstract

The burn is tissue damage to the skin caused by exposure to high heat, chemicals or electric current. Skin or tissue that burns will become necrotic tissue. Platelet Rich Plasma (PRP) is a platelet that is concentrated in a little plasma. PRP is used to stimulate and accelerate the healing of bone and soft tissue because it contains growth factor. PRP is obtained by blood centrifugation to get the most of platelets by minimizing plasma. The purpose of this study was to prove the ability of PRP from the waste cow's blood to accelerate the healing of rat burns. Experimental animals used in this study were 10 white rats. An iron with round shape heat in fire, then stick into rats skin to make wound. The experimental design were used 5 groups. Groups 1-3 were animal with 10%, 20%, 30% PRP concentration treatment. The other 2 groups would be the negative control (not treated) and the positive control (placenta extract 10% + neomycin sulfate 0,5%). The parameters used to measure the rate of wound healing is the healing time and the type of tissue that is formed. The data were analyzed using One-way Analysis of variance (Anova) with Kruskal-Wallis statistical method in 95% significant rate. The result showed there is a significant difference between treatments. The results shown by the best healing wounds treated with PRP concentration of 30%. Tissues analysis were done by making preparations of histopathological from the skin. The results showed that the treated wounds healed but the untreated wound, ephitelization were not formed yet.

Key words: blood, burns; growth factor; Platelet Rich Plasma; Slaughterhouse

Abstrak

Luka bakar adalah kerusakan jaringan pada kulit akibat terkena panas tinggi, bahan kimiawi maupun arus listrik. Luka bakar akan lama penyembuhannya tergantung derajat keparahan luka. *Platelet Rich Plasma (PRP)* merupakan platelet/trombosit yang terkonsentrasi pada sedikit plasma. PRP digunakan untuk menstimulasi dan mempercepat kesembuhan pada tulang dan jaringan lunak karena mengandung *growth factor*. PRP didapat dengan cara mensentrifuse darah hingga didapatkan bagian terbanyak dari platelet dengan meminimalisir plasma. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan kemampuan PRP dari limbah darah sapi untuk mempercepat kesembuhan pada luka bakar tikus. Hewan coba yang dipakai pada penelitian ini adalah tikus putih sebanyak 10 ekor dibagi menjadi 5 kelompok. Besi panas berbentuk bulat dengan diameter 1x1 cm dipanaskan dengan api, lalu ditempelkan pada kulit. Kelompok perlakuan diberi PRP dengan konsentrasi 10%, 20% dan 30% dengan salep *vaselin album*, kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan dan kelompok kontrol positif yang diberi obat yang terbuat dari ekstrak plasenta sapi 10%+*neomycin sulfate* 0,5%. Parameter yang dipakai untuk mengukur tingkat kesembuhan luka adalah waktu kesembuhan dan pemeriksaan histopatologi. Data dianalisis

dengan metode statistik *One-way Analsisis of variance* (Anova) tingkat signifikansi 95% yang dilanjutkan dengan *Kruskal-wallis*. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan signifikan antara PRP konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan kontrol positif dengan kontrol negatif. Konsentrasi PRP yang optimal adalah 20%. Pemeriksaan mikroskopik pada jaringan kulit dilihat dengan pembuatan preparat histopatologi. Hasil menunjukkan bahwa luka pada kelompok perlakuan dan kontrol positif tampak sembuh, sedangkan kelompok kontrol negatif epitelisasi belum tertutup jelas.

Kata kunci: limbah darah sapi; luka bakar; *Platelet Rich Plasma*

Pendahuluan

Luka adalah hilang atau rusaknya kesatuan/komponen jaringan yang secara spesifik terdapat substansi jaringan yang rusak atau hilang. Beberapa ahli berpendapat luka adalah suatu gangguan dari kondisi normal pada kulit (Taylor, 1997). Luka bakar adalah kerusakan jaringan pada kulit akibat terpajan panas tinggi, bahan kimiawi maupun arus listrik (Moenadjat, 2002). Kulit atau jaringan tubuh yang terbakar akan menjadi jaringan nekrotik. Jaringan nekrotik ini tidak dapat dibuang segera tetapi tetap melekat di tubuh penderita untuk waktu yang relatif lama (Marzoeki, 1993).

Rumah Potong Hewan (RPH) adalah suatu bangunan atau kompleks bangunan dengan desain dan syarat tertentu yang digunakan sebagai tempat memotong hewan bagi konsumsi masyarakat umum (Anonim, 2010). Seekor sapi yang disembelih menghasilkan limbah darah kurang lebih sebanyak 28 liter. Limbah darah ini mencemari air dan berdampak pada kualitas fisik air yaitu warna dan pH disamping itu total padatan terlarut, padatan tersuspensi, kandungan lemak, *Biological Oxygen Demand* (BOD), ammonium, nitrogen, fosfor akan mengalami peningkatan. Hal tersebut dapat menurunkan kualitas air dan mengganggu kesehatan bila dikonsumsi (Sanjaya, 1996)

Komponen darah terdiri dari plasma, sel darah merah, sel darah putih dan platelet. Platelet adalah sel darah berbentuk diskoid kecil berukuran 1-3 μ m. Jumlah rata-rata platelet dalam sirkulasi darah antara 1,5-3,0x10⁵/mL, dan dalam *in vivo* waktu bertahan platelet sekitar 7 hari (Everts, 2006). Jumlah platelet normal pada darah antara 150.000/ μ l sampai 350.000/ μ l, dan rata-rata sekitar 200.000/ μ l (Marx, 2001). Platelet dibentuk dari megakariosit dan disintesis di sumsum tulang. Platelet mempunyai ring dari

mikrotubulus kontraktile di sekeliling bagian luarnya, mengandung aktin dan myosin. Bagian dalam platelet, beberapa struktur intraseluler menunjukkan kandungan glikogen, lisosom, dan 2 tipe granula yaitu *dense granula* dan α granula. *Dense granula* yang mengandung ADP, ATP, serotonin, dan calcium. α granula mengandung faktor penjadalan, *growth factor*, dan protein lain (Everts, 2006). Platelet dengan konsentrasi 1.000.000 platelet/ μ l dalam 5 ml volume plasma telah terbukti dapat mempercepat penyembuhan tulang dan jaringan lunak (Marx, 2001). Berdasarkan teori diatas dilakukan penelitian tentang *Platelet Rich Plasma* (PRP) dari limbah darah sapi sebagai obat luka bakar pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Materi dan Metode

Darah sapi diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH) Giwangan di Yogyakarta. Darah sapi ditampung dengan *Falcon® tube* yang telah ditambahkan *ethylene deamine tetra acetic acid* (EDTA) untuk mencegah penggumpalan darah. Perbandingan antara EDTA dan darah adalah 1:9. Darah yang sudah ditampung dalam *Falcon® tube* di sentrifuge dengan kecepatan 2400 rpm selama 10 menit. Bagian padat atau pellet dibuang, sehingga tertinggal bagian plasma saja. Plasma disentrifuge dengan kecepatan 3600 rpm selama 15 menit. Bagian *Platelet Rich Plasma* (PRP) dipisahkan dengan membuang bagian *Platelet Poor Plasma* memakai spet (Tozum, 2003). PRP yang telah didapat dicampurkan langsung secara homogen dengan basis krim. Perbandingan untuk pembuatan krim PRP 10% adalah 15 gram basis krim ditambahkan dengan 1,5 ml PRP. Krim PRP 20% adalah 15 gram basis krim ditambahkan dengan 3 ml PRP. Krim PRP 30% adalah 15 gram krim ditambahkan dengan 4,5 ml PRP.

Tikus putih di adaptasikan selama 1 minggu pada kandang di Laboratorium Practical Animal, Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Jumlah tikus yang dipakai sebanyak 10 ekor dan diberi 5 perlakuan yang berbeda. Tikus terlebih dahulu dianestesi menggunakan ketamine 10% dengan dosis 25 mg/Kg. Luka bakar pada tikus dibuat dengan mencukur rambut pada bagian punggung terlebih dahulu. Besi dengan diameter 1x1 cm dipanasi terlebih dahulu menggunakan bunsen selama 15 menit. Besi panas ditempelkan pada kulit selama 3 detik. Luka diberikan pada 5 bagian tempat untuk kontrol (-), kontrol (+), krim PRP 10%, krim PRP 20%, dan krim PRP 30%. Kontrol negatif tidak diberi pengobatan, sedangkan kontrol positif diberi obat komersial yang terbuat dari ekstrak plasenta 10%, *neomycin sulfate* 0,5%, dan basis gel. Setiap pagi dan sore dilakukan pengobatan dengan cara mengolesi obat-obat tersebut secara topikal.

Parameter yang dipakai untuk mengukur tingkat kesembuhan luka adalah waktu kesembuhan dengan melihat ukuran luka setiap 3 hari dan tipe jaringan yang terbentuk. Data waktu kesembuhan luka dianalisis dengan metode statistik *One-way Analysis of variance* (Anova) tingkat signifikansi 95% dengan *Kruskal-wallis*. Analisa data tipe jaringan yang terbentuk dilakukan dengan pembuatan dan pembacaan preparat histopatologi.

Hasil dan Pembahasan

Berikut ini adalah tabel hasil pengukuran luka setiap 3 hari, dihitung dari besaran luka menggunakan milimeter blok.

Luka bakar yang diberikan obat dengan salep PRP 10% memiliki waktu kesembuhan luka lebih

cepat daripada kontrol (+) dibuktikan dari ukuran luka pada kulit tikus. PRP 20% maupun PRP 30% pertumbuhan luka relatif sama tetapi lebih cepat daripada kontrol (-), kontrol (+) maupun 10%. Hasil analisis dengan metode *One-way Analysis of variance* (Anova) dengan *Kruskal-wallis* ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan kontrol negatif, sementara itu tidak ada perbedaan yang signifikan antara kontrol + dengan PRP 10%. Kontrol positif dengan PRP 20% dan 30% terdapat perbedaan yang signifikan. PRP 20% dan 30% tidak ada perbedaan yang signifikan.

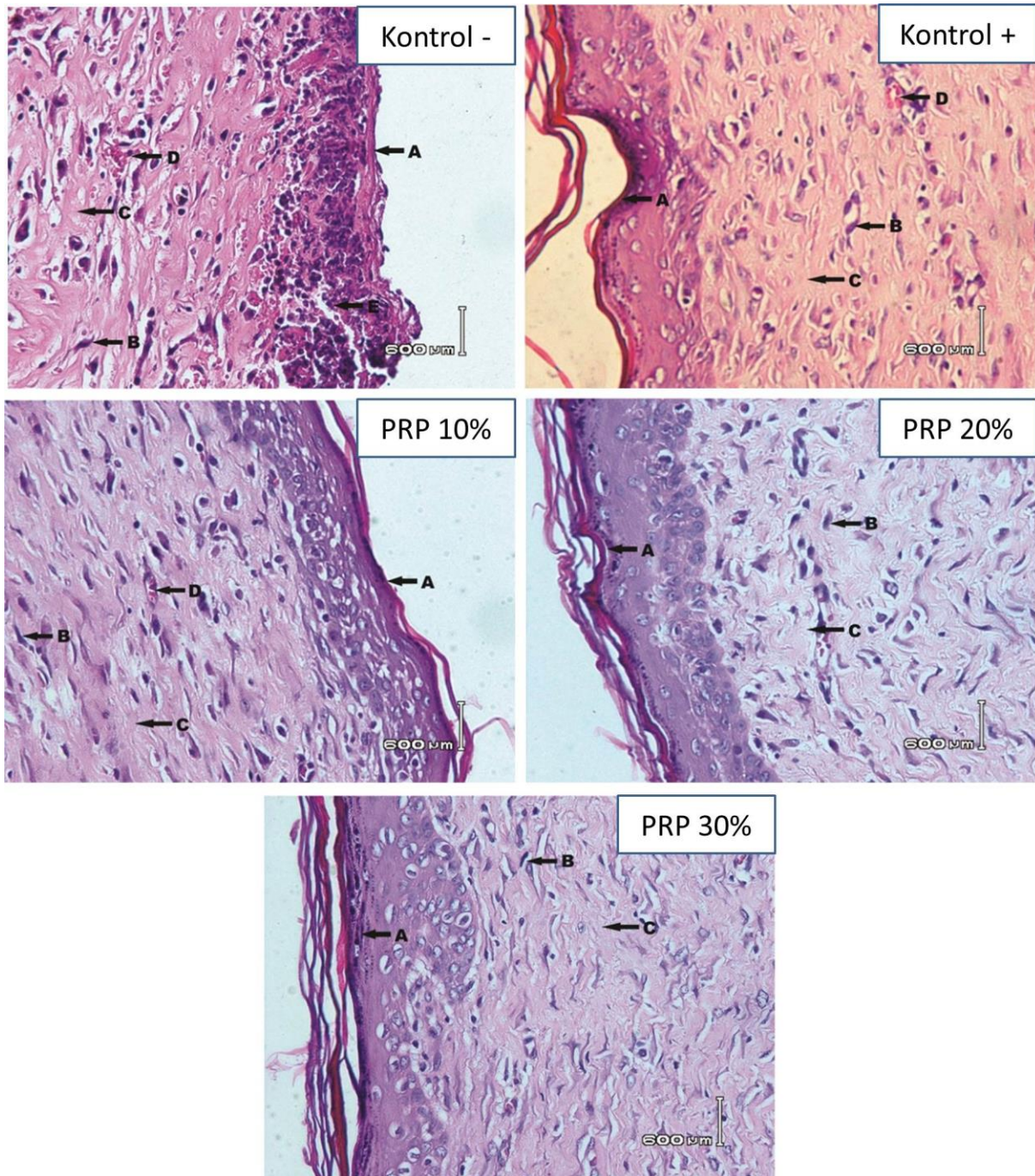
Pemeriksaan Histopatologi

Hasil pembacaan preparat histopatologi menunjukkan bahwa tipe kesembuhan luka bervariasi pada masing-masing perlakuan Berikut ini adalah gambaran histopatologi kulit pada hari ke 14:

Pada kontrol (-), epitelisasi epidermis belum menutup jaringan luka, infiltrasi neutrofil, limfosit, plasma sel, makrofag dan fibrin serta hancuran sel di epidermis; *scab*/keropeng yang berisi hancuran sel masih terlihat di epidermis; tampak fibroblast di dermis; infiltrasi neutrofil, limfosit di sub kutan dan muskularis; dan infiltrasi limfosit dan makrofag di dermis. Hasil pembacaan preparat histopatologi pada kontrol (-) menunjukkan bahwa luka belum sembuh secara sempurna. Hasil ini sangat berbeda dengan Kontrol (+), Salep PRP 10%, 20%, dan 30% yang menunjukkan kesembuhan luka prima. Hal tersebut ditandai dengan tampak epitelisasi epidermis sudah menutup permukaan luka, lapisan dermis banyak tampak terisi jaringan ikat kolagen padat, tampak fibroblast di dermis, infiltrasi

Tabel 1. Hasil pengukuran luka setiap 3 hari

| Hari ke- | Kontrol (-) | Kontrol (+) | Krim PRP 10% | Krim PRP 20% | Krim PRP 30% |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | 12,20 ±1,304 | 8,80 ±0,837 | 9,40 ±1,673 | 10,20 ±0,447 | 10,20 ±0,447 |
| 4 | 12,60 ±1,140 | 10,60 ±2,702 | 9,60 ±1,140 | 9,80 ±0,447 | 9,20 ±0,447 |
| 7 | 12,40 ±1,140 | 11,20 ±1,304 | 9,20 ±0,837 | 9,20 ±0,447 | 9,00 ±0,707 |
| 10 | 11,80 ±0,447 | 11,40 ±1,140 | 9,80 ±1,304 | 9,60 ±1,342 | 9,20 ±1,095 |
| 13 | 11,20 ±0,447 | 10,40 ±0,894 | 9,40 ±0,548 | 9,20 ±0,837 | 8,20 ±0,837 |
| 16 | 9,20 ±1,304 | 7,60 ±1,817 | 6,60 ±1,140 | 5,60 ±1,342 | 4,60 ±1,342 |
| 19 | 8,20 ±1,304 | 6,00 ±1,225 | 4,60 ±1,140 | 4,20 ±1,095 | 3,40 ±0,894 |
| 22 | 7,00 ±1,414 | 4,20 ±1,483 | 3,40 ±1,140 | 2,80 ±0,447 | 1,80 ±0,447 |
| 25 | 2,40 ±1,949 | 0 | 0 | 0 | 0 |



Gambar 1. Gambaran histopatologi kulit. Keterangan: A. Keratin; B. Fibroblast; C. Jaringan ikat kolagen padat; D. Sel radang; E. Scab

limfosit di dermis sedikit, dan infiltrasi neutrofil, limfosit di subkutan dan muskularis sedikit.

Infiltrasi sel radang biasanya terjadi pada hari 2-4 pasca terjadinya luka, hal ini diakibatkan karena trombosit yang dilepaskan saat terjadi luka menarik sel-sel radang ke daerah luka. Infiltrasi sel radang terutama neutrofil berfungsi untuk memfagositosis bakteri yang mengontaminasi luka (Rozman dan Bolta, 2007). Jumlah infiltrasi sel radang harusnya menurun setiap harinya,

apabila masih terdapat infiltrasi sel radang tersebut menunjukkan bahwa luka masih belum sembuh secara optimal. Fibroblast pertama muncul pada hari ketiga pasca terjadinya luka dan akan mencapai puncak pada hari ketujuh. Fibroblast bermigrasi ke daerah luka akan memulai sintesis matriks ekstraseluler dan bertahap digantikan oleh matriks kolagen, kejadian ini berlangsung hingga dua minggu pasca luka. Matriks kolagen apabila terdeposisi dalam jumlah yang cukup pada daerah

luka maka fibroblast akan berhenti memproduksi kolagen (Singer dan Clark, 1999). Fibroblast berperan serta dalam proses angiogenesis dengan cara menstimuli makrofag untuk menghasilkan berbagai jenis growth factor (Gabriel dan Mussman, 2009). Angiogenesis merupakan proses pembentukan darah baru yang berperan dalam pembentukan jaringan granulasi. Proses angiogenesis akan berhenti melalui apoptosis (*programmed cell death*). Pada fase ini fibroplasia dan angiogenesis merupakan proses terintegrasi dan dipengaruhi oleh substansi yang dikeluarkan oleh platelet dan mikrofas (Robert, 2004).

Protein yang terkandung dalam α -granule dari platelet yang sangat berpengaruh pada kesembuhan luka, termasuk didalamnya adalah *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) dengan isomer $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, dan $\alpha\beta$, *Transformer Growth Factor* (TGF)- β dengan isomer $\beta 1$ dan $\beta 2$, *Platelet Factor 4* (PF4), *Interleukin* (IL), *Platelet-Derived Angiogenesis Factor* (PDAF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Platelet-Derived Endothelial Growth Factor* (PDEGF), *Epithelial Cell Growth Factor* (ECGF), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *osteocalcin*, *osteonectin*, *fibrinogen*, *vitronectin*, *fibronectin*, dan *thrombospondin* (TSP). Protein ini secara kolektif adalah anggota dari kelompok *growth factor*, *cytokines*, dan *chemokines* yang termasuk dalam protein sekretori (Eppley, et.al, 2006). Menurut Everts (2006) platelet juga mengandung *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) (Eppley, et.al, 2006).

Peran platelet pada tahap kesembuhan luka adalah sebagai berikut: 1) Degranulasi Platelet: kerusakan jaringan, PDGF dan FGF mulai diproduksi oleh sel yang terluka. Platelet membentuk sumbat pada tempat itu, dan akan memulai degranulasi dengan merilis *growth factor*, PDGF dan TGF- β adalah *growth factor* yang sangat penting pada tempat luka dan mulai melakukan proses penyembuhan luka. Karakteristik dari molekul PGF adalah kemotaktik dan mitogenik yang berhubungan dengan sel radang seperti neutrofil, monosit, dan makrofag. 2) Aksi Inflamasi: dosis tunggal PDGF yang diberikan pada luka insisi menunjukkan bahwa terjadi respon radang dengan peningkatan

pemasukan netrofil dan makrofag. 3) Deposisi Matrik: fase sintesis matrik dan deposisi matrik, PGF kembali melakukan peran dominan. Pada penelitian, bahwa dosis tunggal dari PDGF meningkatkan volume granulasi jaringan sebesar 200% setelah 7 hari. Pemberian TGF- β secara tunggal pada luka, itu menyatakan bahwa matrik sebagian besar membentuk kolagen baru. 4) Produksi Kolagen: Produksi koagen kolagen sangat penting dalam penyembuhan luka, yang diinisiasi aksi kemotaktik dan mitogenik dari fibroblast oleh FGF. 5) Epitelialisasi: Pemberian secara topikal *Epidermal Growth Factor* (EGF) memulai untuk mempercepat epitelialisasi. PDGF sangat penting dalam epitelialisasi, bersama dengan FGF meningkatkan kontraksi dan waktu remodeling (Everts, 2006). Platelet juga mempunyai aktifitas antimikroba yang dapat mencegah terjadinya infeksi pada luka, platelet mengandung dan melepaskan protein yang bersifat mikrobisidal yaitu *termed platelet microbicidal proteins* (PMPs) atau *thrombin-induced PMPs* (tPMPs) jika dirangsang dengan mikroorganisme atau agonis trombosit berhubungan dengan infeksi pada vitro (Yeaman & Arnold, 1999).

Kesimpulan

Berdasarkan paparan hasil analisis makroskopis dan mikroskopis dapat ditunjukkan bahwa salep *Platelet Rich Plasma* yang dihasilkan dari limbah darah sapi memiliki kemampuan yang lebih baik dibandingkan dengan obat luka bakar komersial.

Daftar Pustaka

- Anonim. (2010). *Peraturan Menteri Pertanian Nomor 13/Permentan/Ot.140/1/2010 Tentang Persyaratan Rumah Potong Hewan Ruminansia Dan Unit Penanganan Daging (Meat Cutting Plant)*. Kementerian Pertanian Republik Indonesia
- Eppley, B.L., Pietrzak, W.S. dan Blanton M. (2006). *Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery. Plastic Reconstructive Surgery Volume 118 (6)*

- Everts, P.A.M., Johannes, T.A.K., Gernot, W., Jacques P.A.M.S., Johannes H., Eddy, P.O., Hemk A.M.B., dan Andre, V.Z. (2006). *Platelet-Rich Plasma and Platelet Gel: A Review*. JECT, 2006:38:174-187
- Gabriel A, Mussman, J. (2009). Wound Healing, Growth Factor. Department of Plastic Surgery. Loma Linda University School of Medicine. Birmingham.
- Marx, R.E.(2001). *Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP?*. Implant Dentistry Vol. 10 No. 4. USA: Lippincott Williams & Wilkins
- Marzoeki, D. (1993). *Ilmu Bedah Luka dan Perawatannya*. Surabaya: Airlangga University Press
- Moenadjat, Y. (2003). *Luka Bakar: Pengetahuan Klinik Praktis*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI
- Robert F. (2004). Wound Healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9: 283-289.
- Rozman P, Bolta Z. (2007). Use of platelet growth factor in treating wounds and soft tissue injuries. *Acta Dermatoven APA*, 16(4).
- Sanjaya A.W., Sudarwanto M, dan Pribadi E.(1996). *Pengelolaan Limbah Cair Rumah Potong Hewan di Kabupaten Dati II Bogor*. Bogor: Media Veteriner Vol III (2)
- Singer AJ, Clark RA. (1999). Cutaneous wound healing. *NEJM*, 341(1).
- Taylor, C. (1997). *Fundamental of Nursing The Art and Science of Nursing Care*. 4th Edition. Philadelphia: JB Lippincoff hal 699-705.
- Tozum T.F. dan Demiralp, B. (2003). Platelet-Rich Plasma: A Promising Innovation in Dentistry. di dalam *Clinical Practice Canada: Journal of the Canadian Dental Association*. Vol 69 No 10.
- Yeaman, M.R. dan Arnold, SB. (1999). Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat Volume 2, Issue 2, Pages 116–126*.