

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Darah

2.1.1. Definisi Darah

Darah merupakan bagian dari tubuh yang jumlahnya 60-80% dari berat badan, dengan viskositas darah 4,5 kali lebih besar daripada air. Darah merupakan jaringan yang berbentuk cairan, terdiri dari dua bagian yaitu plasma darah dan sel darah. Plasma darah meliputi 55% volume darah merupakan substansi nonseluler, sedangkan 45% dari volume darah meliputi sel darah. Sel darah terdiri dari sel darah merah, sel darah putih, dan trombosit (Johan Sitompul, 2001).

2.1.2. Komposisi Darah

Komponen cairan darah dinamakan plasma, 91-92% terdiri dari air sebagai medium transport dan 7-9% terdiri dari zat padat. Zat-zat padat itu adalah protein-protein seperti albumin, globulin, dan fibrinogen serta unsur anorganik berupa natrium, kalsium, kalium, fosfor, besi, dan yodium. Unsur organik berupa zat-zat nitrogen, non protein, urea, asam urat, xantin, kreatinin, asam amino, lemak netral, fosfolipid, kolesterol, glukosa, dan berbagai enzim. Salah satu komponen yang penting adalah fibrinogen dengan jumlah 4%. Fibrinogen mempunyai peranan yang penting untuk pembekuan darah (Sylvia A. Price, dkk, 2005).

Plasma darah dapat dipisahkan didalam tabung yang berisi darah segar yang telah dibubuhi antikoagulan kemudian di sentrifuge sampai sel darah merah mengendap. Sel darah putih akan berada diatasnya dan membentuk lapisan yang

disebut buffy coat. Plasma darah berada di atas lapisan tersebut dengan kepadatan sekitar 1025 kg/m^3 . Plasma darah yang meliputi 55 % volume darah (Sacher,2004).

2.1.3. Plasma Sitrat

Plasma Sitrat adalah plasma yang diperoleh dari darah yang telah dicampur dengan antikoagulan natrium sitrat. Nama lain dari natrium sitrat adalah *Trisodium Citrate* dengan rumus molekul $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Trisodium Citrate* merupakan kristal atau serbuk putih yang tidak berbau dengan berat molekul 294,10. Antikoagulan ini mencegah pembekuan dengan mengikat kalsium dari darah membentuk kompleks kalsium sitrat yang larut, sehingga menghambat aktifitas fibrinogen menjadi fibrin, dan juga membantu platelet mempertahankan kemampuan fungsi mereka (Pollack B, 2001).

Sitrat digunakan untuk pemeriksaan koagulasi karena memiliki pH netral. Spesimen untuk pemeriksaan koagulasi didapatkan dari sembilan volume darah ditambah dengan satu volume antikoagulan Natrium Sitrat 3,2%. Plasma Sitrat didapat dari darah yang segera dicentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm (Manning R, 2006).

2.2. Hemostasis

2.2.1. Pengertian Hemostasis

Hemostasis adalah proses tubuh yang secara simultan menghentikan perdarahan dari tempat yang cidera, sekaligus mempertahankan darah dalam keadaan cair di dalam kompartemen vaskular. Pembuluh darah yang terluka akan

mengakibatkan vasokonstriksi pembuluh darah sehingga aliran darah ke pembuluh darah yang terluka menjadi berkurang. Trombosit akan berkumpul dan melekat pada pembuluh darah yang terluka untuk membentuk sumbat trombosit. Faktor pembekuan darah yang diaktifkan akan membentuk benang-benang fibrin yang akan membuat sumbat trombosit menjadi non permeabel sehingga perdarahan dapat dihentikan. Sistem yang berperan dalam hemostasis yaitu sistem vaskuler, trombosit dan faktor-faktor pembekuan darah (Sacher,2004).

2.2.2. Sistem Vaskuler

Sistem vaskuler berperan dalam mencegah perdarahan meliputi proses kontraksi pembuluh darah (vasokonstriksi) serta aktivasi trombosit dan pembekuan darah. Pembuluh darah yang mengalami luka akan menyebabkan terjadinya vasokonstriksi yang mula-mula secara reflektoris dan kemudian akan dipertahankan oleh faktor lokal seperti 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin), dan epinefrin. Vasokonstriksi menyebabkan pengurangan aliran darah pada daerah yang terluka. Vasokonstriksi mungkin dapat menghentikan perdarahan pada pembuluh darah kecil, sedangkan pada pembuluh darah besar masih diperlukan sistem lain seperti trombosit dan pembekuan darah (Sacher,2004).

Pembuluh darah dilapisi oleh sel endotel. Lapisan endotel yang rusak menyebabkan jaringan ikat di bawah endotel seperti serat kolagen, serat elastin dan membran basalis terbuka sehingga terjadi aktivasi trombosit.

2.2.3. Trombosit

Trombosit mempunyai peran penting dalam hemostasis yaitu pembentukan dan stabilisasi sumbat trombosit. Pembentukan sumbat trombosit terjadi melalui beberapa tahap yaitu adhesi trombosit, agregasi trombosit dan reaksi pelepasan (Sacher, 2004).

Pembuluh darah yang terluka akan menyebabkan sel endotel rusak, sehingga jaringan ikat di bawah endotel akan terbuka. Hal ini akan mencetuskan adhesi trombosit yaitu proses trombosit melekat pada permukaan asing terutama serat kolagen dengan reseptor permukaan kolagen spesifik glikoprotein Ia/IIa. Proses adhesi diperkuat dengan protein *von Willebrand Factor* (vWF) yang membentuk jembatan antara glikoprotein Ib/IX/V dan benang kolagen (Setyabudi R, 2007).

Trombosit membentuk agregasi dengan melekat pada trombosit lainnya yang menginduksi terjadinya sumbatan. Proses ini dirangsang oleh beberapa substansi misalnya *adenosine diphosphate* (ADP), kolagen, epinefrin, trombin dan asam arikodonat. Selama proses agregasi, trombosit akan mengalami perubahan bentuk bulat menjadi cakram disertai dengan pembentukan pseudopodi (Setyabudi R, 2007).

Granula trombosit akan berkumpul di tengah dan melepaskan isinya seperti ADP, ATP, serotonin, adrenalin, anti heparin, fibrinogen, epinefrin, nor-epinefrin dan beta tromboglobulin. Proses ini yang disebut sebagai reaksi pelepasan. Masa agregasi trombosit akan melekat pada endotel sehingga sumbat trombosit dapat menutup luka pada pembuluh darah. Proses ini akan menginisiasi fase koagulasi. (Setyabudi R, 2007)

2.2.4. Faktor Pembekuan Darah

Proses pembekuan darah terdiri dari rangkaian reaksi enzimatik yang melibatkan protein plasma yang disebut sebagai faktor pembekuan darah, fosfolipid dan ion kalsium. Faktor pembekuan darah dinyatakan dalam angka Romawi yang sesuai dengan urutan ditemukannya.

Tabel 2.1 Nomenklatur faktor pembekuan darah

Faktor	Nama	Sinonim
I	<i>Fibrinogen</i>	-
II	<i>Protrombin</i>	-
III	<i>Tissue Factor</i>	<i>Tissue Tromboplastin</i>
IV	Ion Kalsium	-
V	<i>Proaccelerin</i>	<i>Labile Factor</i>
VI	-	-
VII	<i>Proconvertin</i>	<i>Stable Factor</i>
VIII	<i>Antihemophilic Factor (AHF)</i>	<i>Antihemophilic Globulin (AHG)</i>
IX	<i>Plasma Thromboplastin Component (PTC)</i>	<i>Christmas Factor</i>
X	<i>Stuart Factor</i>	<i>Prower Factor</i>
XI	<i>Plasma Tromboplastin Antecedent (PTA)</i>	<i>Antihemophilic Factor C</i>
XII	<i>Hageman Factor</i>	<i>Contact Factor</i>
XIII	<i>Fibrin Stabilizing Factor (FSF)</i>	<i>Fibrinase</i>
-	<i>High Molecular Weight Kininogen (HMWK)</i>	<i>Fitzgerald Factor</i>
-	<i>Pre Kallikrein (PK)</i>	<i>Fletcher Factor</i>

Faktor-faktor pembekuan dengan pengecualian faktor III (tromboplastin) dan faktor IV (ion Ca), merupakan protein plasma. Mereka bersirkulasi dalam darah sebagai molekul-molekul nonaktif. Prekalikrein dan koninogen berat molekul besar, bersama-sama dengan faktor XI dan faktor XII dinamakan faktor kontak (Sylvia A.Price,dkk ,2005).

Pengaktifan faktor pembekuan diduga terjadi karena enzim memecahkan fragmen. Bentuk prekursor yang tidak aktif karena alasan ini dinamakan “prokoagulan”. Tiap faktor yang sudah diaktifkan, kecuali V, VIII, dan XIII serta

fibrinogen (faktor I), dalam enzim pemecah protein (protease serin), yang dengan demikian mengaktifkan prokoagulan berikutnya (Sylvia A.Price,dkk ,2005).

Hati adalah tempat sintesis semua faktor pembekuan kecuali faktor VIII atau mungkin XI dan XIII. Vitamin K mempertahankan kadar normal atau sintesis faktor-faktor protrombin (faktor II, VII, IX, dan X) (Sylvia A.Price,dkk ,2005).

2.2.5. Proses Pembekuan Darah

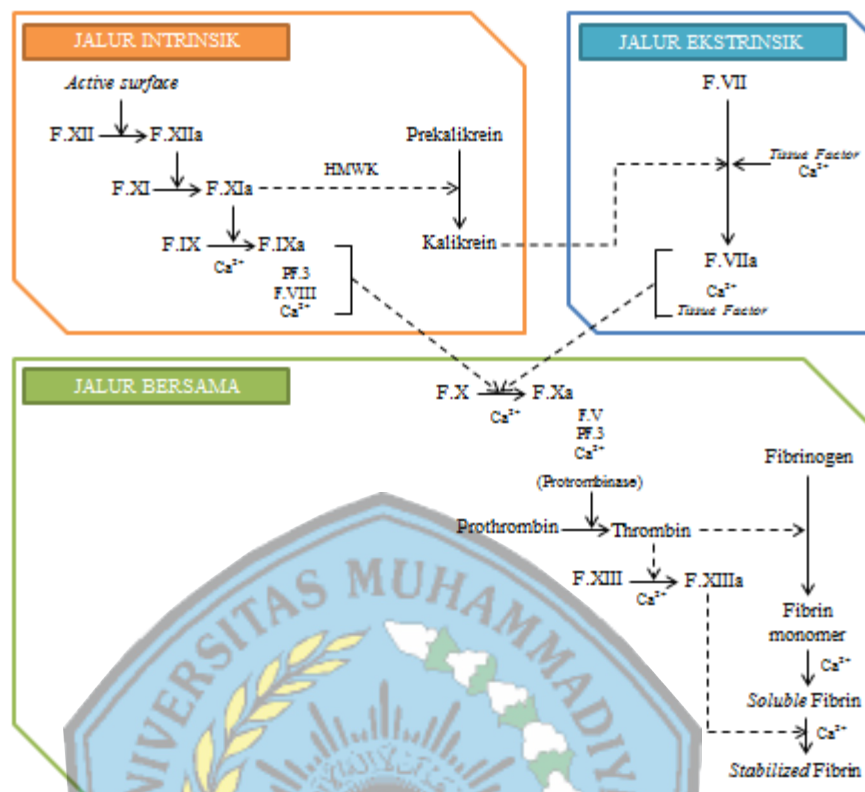
Proses pembekuan darah dimulai melalui dua jalur yaitu jalur intrinsik yang dicetuskan oleh aktivasi kontak dan melibatkan F.XII, F.XI, F.IX, F.VIII, HMWK, PK, platelet faktor 3 (PF3) dan ion kalsium, serta jalur ekstrinsik yang dicetuskan oleh tromboplastin jaringan dan melibatkan F.VII, ion kalsium. Kedua jalur ini akan bergabung menjadi jalur bersama yang melibatkan F.X, F.V, PF.3, protrombin dan fibrinogen (Setyabudi R, 2007).

Jalur intrinsik meliputi fase kontak dan pembentukan kompleks aktivator F.X. Kontak antara F.XII dengan permukaan asing seperti serat kolagen akan menyebabkan aktivasi F.XII menjadi F.XIIa. F.XIIa dengan kofaktor HMWK akan mengubah prekalikrein menjadi kalikrein yang akan meningkatkan aktivasi F.XII. Kalikrein akan mengubah F.VII menjadi F.VIIa pada jalur ekstrinsik dan mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin pada sistem fibrinolitik, serta mengubah kininogen menjadi kinin yang berperan dalam reaksi inflamasi. Aktivasi F.XII disamping mencetuskan pembekuan darah baik jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik, juga mencetuskan sistem fibrinolitik dan kinin. Reaksi selanjutnya pada jalur intrinsik adalah aktivasi F.XI menjadi F.XIa oleh F.XIIa dengan HMWK sebagai kofaktor. F.XIa dengan adanya ion kalsium akan

mengubah F.IX menjadi IXa. Reaksi terakhir pada jalur intrinsik adalah interaksi non-enzimatik antara F.IXa, PF.3, F.VIII dan ion kalsium membentuk kompleks yang mengaktifkan F.X. PF.3, F.VIII dan ion kalsium akan mempercepat pengaktifan F.X (Setyabudi R, 2007).

Jalur ekstrinsik terdiri dari reaksi tunggal dimana F.VII akan diaktifkan menjadi F.VIIa dengan adanya ion kalsium dan tromboplastin jaringan yang dikeluarkan oleh pembuluh darah yang luka. F.VIIa yang terbentuk akan mengaktifkan F.X menjadi F.Xa (Setyabudi R, 2007).

Jalur bersama meliputi pembentukan *protrombin converting complex* , aktivasi protrombin dan pembentukan fibrin. F.X menjadi F.Xa oleh adanya kompleks yang terbentuk pada jalur intrinsik dan atau F.VIIa dari jalur ekstrinsik. F.Xa bersama F.V, PF.3 dan ion kalsium membentuk *protrombin converting complex* yang akan mengubah protrombin menjadi trombin. Trombin merupakan enzim proteolitik yang mempunyai beberapa fungsi yaitu mengubah fibrinogen menjadi fibrin, mengubah F.XIII menjadi F.XIIIa, meningkatkan aktivitas F.V dan F.VIII, merangsang reaksi pelepasan dan agregasi trombosit. Trombin selanjutnya akan mengubah fibrinogen menjadi fibrin monomer. Fibrin monomer akan berubah menjadi *soluble* fibrin dengan adanya ion kalsium. *Soluble* fibrin dengan adanya F.XIIIa dan ion kalsium berubah menjadi *stabilized* fibrin (Setyabudi R, 2007).



Gambar 2.1 Skema Proses Hemostasis (Dikutip: Sacher AR, Mc Pherson AR, 200)

2.2.6. Mekanisme Kontrol Pembekuan Darah

Pembekuan darah merupakan proses autokatalitik dimana sejumlah enzim yang terbentuk pada tiap reaksi akan menimbulkan enzim dalam jumlah besar pada reaksi selanjutnya. Mekanisme kontrol diperlukan untuk mencegah aktivasi dan pemakaian faktor pembekuan darah secara berlebihan yaitu melalui aliran darah, mekanisme pembersihan (*clearance*) seluler dan inhibitor alamiah (Setyabudi R, 2007).

Aliran darah akan mengencerkan faktor pembekuan darah yang aktif dari tempat luka. Faktor pembekuan darah yang aktif juga dibersihkan dari sirkulasi darah oleh hati. Sel retikuloendotelial pada hati berperan dalam menghilangkan tromboplastin jaringan dan fibrin, sedangkan hepatosit menghilangkan F.IXa,

F.Xa dan F.VIIa. Dalam keadaan normal, plasma mengandung sejumlah protein yang dapat menghambat enzim proteolitik dan disebut sebagai inhibitor protease, seperti antitrombin III (AT-III), alfa-2 makroglobulin, C1 esterase inhibitor, alfa-1 antitripsin dan protein C (Setyabudi R, 2007).

AT-III memegang peranan penting dalam mekanisme kontrol karena disamping menghambat aktivitas thrombin, juga menghambat F.XIIa, F.XIa, F.Xa, F.IXa, F.VIIa, plasmin dan kallikrein. Alfa-2 makroglobulin merupakan inhibitor protease yang paling luas spektrumnya. Alfa-2 makroglobulin akan membentuk kompleks dengan enzim proteolitik, sehingga enzim yang terikat masih mempunyai aktivitas proteolitik, akan tetapi aktivitasnya menurun. C1 inhibitor mempunyai fungsi utama menghambat komponen pertama dari sistem komplemen. C1 inhibitor dapat menghambat F.XIIa, F.XIa dan kallikrein. Alfa-1 antitripsin adalah inhibitor protease yang paling tinggi kadarnya didalam plasma serta berperan menginaktifkan thrombin, F.Xia, kallikrein dan HMWK. Protein C berperan dalam menginaktifkan F.Va dan F.VIIIa. Protein C beredar dalam bentuk tidak aktif dan akan diaktifkan oleh thrombin dengan adanya kofaktor trombomodulin yang dikeluarkan oleh sel endotel. Protein C yang telah aktif akan memecah F.Va dan F.VIIIa menjadi bentuk yang tidak aktif dengan adanya kofaktor protein S (Setyabudi R, 2007).

2.2.7. Fibrinolisis

Fibrinolisis adalah proses penghancuran deposit fibrin oleh sistem fibrinolitik sehingga aliran darah akan terbuka kembali. Proses ini terjadi dengan tujuan untuk menjaga keseimbangan mekanisme hemostasis dalam tubuh. Enzim utama yang

berperan dalam proses ini adalah plasmin yang merupakan hasil dari aktivasi plasminogen. Plasmin merupakan enzim proteolitik yang akan menyerang formasi fibrin dengan memproduksi *Fibrin Degradation Product* (FDP). Mula-mula terbentuk fragmen X yang selanjutnya akan dipecah menjadi fragmen Y dan D. D-Dimer merupakan salah satu produk spesifik dari tahap degradasi fibrin. Aktivasi plasminogen terjadi melalui beberapa jalur dengan regulasi aktivator dan inhibitor (Setyabudi R, 2007).

2.2.7.1. Aktivator Plasminogen

Aktivator plasminogen meliputi:

2.2.7.1.1. Tissue Plasminogen Aktivator (t-PA)

Aktivator ini disintesis di endotelial sel dan dilepaskan dalam jumlah yang besar melalui berbagai rangsangan aktivitas seperti ketegangan vena, latihan fisik, stres, anoksia, asidosis. t-PA memiliki afinitas yang tinggi terhadap fibrin. Ikatan ini akan meningkatkan aktivitas plasminogen menjadi plasmin. t-PA yang berikatan dengan tumpukan fibrin diproteksi oleh inhibitorynya. Sejumlah besar t-PA dapat ditemukan di uterus, prostat dan paru-paru.

2.2.7.1.2. Urokinase-tipe Plasminogen Aktivator (u-PA)

Aktivator ini terdeteksi dalam plasma dan bersirkulasi dalam bentuk *zymogen*.

2.2.7.1.3. Faktor XII-aktif

Faktor XII dapat melakukan pro-fibrinolitik ketika dipisahkan dan diaktivasi oleh *kallikrein*.

2.2.7.2. Inhibitor Plasminogen

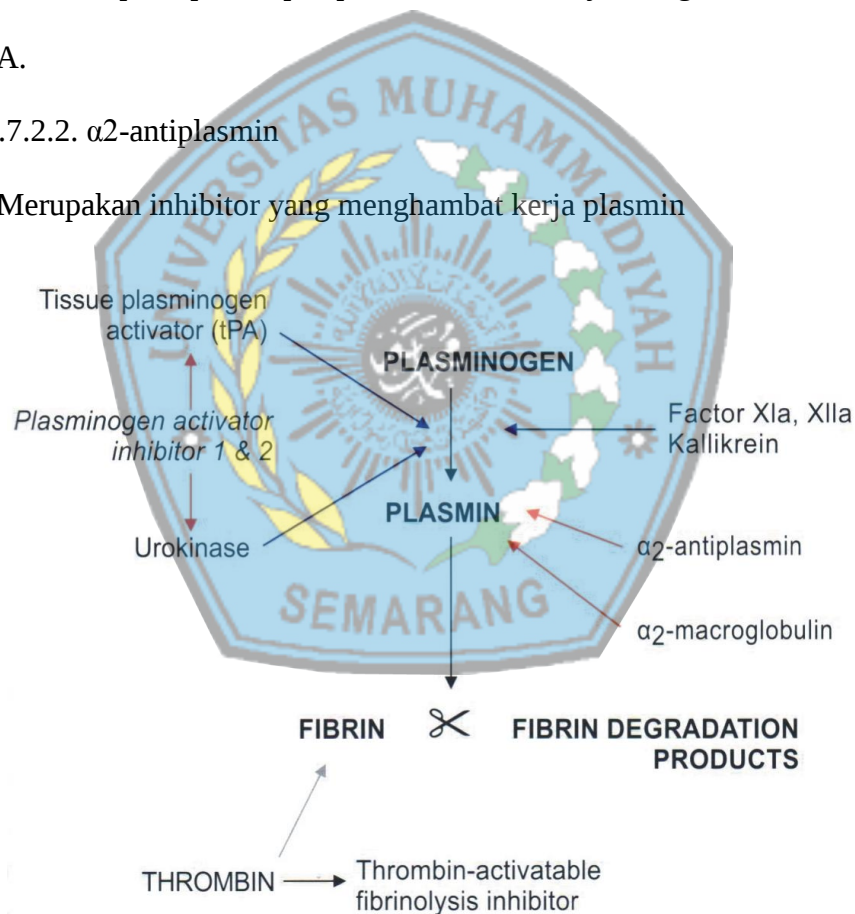
Inhibitor plasminogen meliputi:

2.2.7.2.1. Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)

PAI Menurut ICTH dapat dibagi menjadi 3 golongan, yaitu PAI-1, 2 dan 3. PAI-1 merupakan suatu glikoprotein yang disintesis oleh sel endotel. Didalam trombosit inhibitor ini juga ditemukan didalam granula alfa yang akan dikeluarkan pada proses pelepasan. PAI-1 bekerja menghambat urokinase dan t-PA.

2.2.7.2.2. α 2-antiplasmin

Merupakan inhibitor yang menghambat kerja plasmin



Gambar 2.2 Proses Fibrinolisis (Dikutip: Key N, Makris M, 2007)

2.2.8. *Protrombin Time*

2.2.8.1. **Pengertian Protrombin**

Protrombin atau faktor II adalah protein plasma yang dihasilkan oleh hati. Protrombin disintesis oleh hati dan merupakan prekursor tidak aktif dalam proses pembekuan. Sekresi Protrombin ke dalam plasma darah terjadi karena stimulasi dari tromboplastin dan ion kalsium pada proses pembekuan darah. Protrombin dikonversi menjadi thrombin oleh tromboplastin yang diperlukan untuk membentuk bekuan darah (Horsti J, 2002).

2.2.8.2. **Pengertian *Protrombin Time***

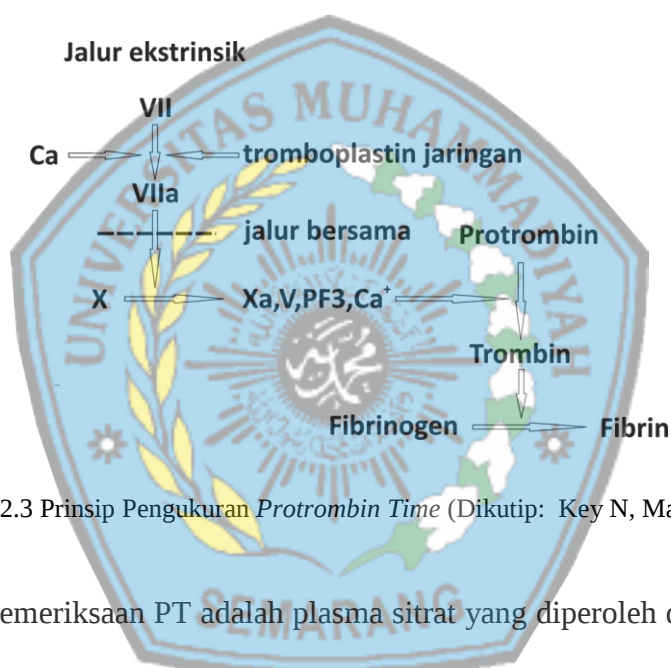
Protrombin Time adalah pemeriksaan laboratorium untuk menilai kemampuan faktor koagulasi jalur ekstrinsik: faktor VII (prokonvertin) dan jalur bersama, yaitu: faktor I (fibrinogen), faktor II (protrombin), faktor V (proakselerin), faktor X (faktor Stuart). Selain itu digunakan untuk memantau efek antikoagulan oral, karena obat golongan tersebut dapat menghambat pembentukan protrombin, faktor VII, IX dan X (Horsti J, 2002).

PT adalah uji koagulasi yang paling sering dilakukan. Reagen untuk PT adalah tromboplastin jaringan dan kalsium klorida. Apabila ditambahkan ke plasma yang mengandung sitrat, reagen-reagen ini akan menggantikan faktor jaringan untuk mengaktifkan faktor X dengan keberadaan faktor VII tanpa melibatkan trombosit atau prokoagulan jalur intrinsik. Untuk mendapatkan hasil PT normal, plasma harus mengandung paling sedikit 100 mg/dL fibrinogen dan faktor VII, X, V, dan protrombin 10%. Pemanjangan PT dapat terjadi karena defisiensi faktor koagulasi multipel, terapi antikoagulan oral, penyakit hati,

defisiensi vitamin K, dan defisiensi faktor-faktor pada jalur bersama (Horsti J, 2002).

2.2.8.3. Prinsip Pemeriksaan *Protrombin Time*

Prinsip pengukuran PT adalah menilai terbentuknya bekuan bila ke dalam plasma yang telah diinkubasi ditambahkan campuran tromboplastin jaringan dan ion kalsium, dengan reaksi sebagai berikut:



Gambar 2.3 Prinsip Pengukuran *Protrombin Time* (Dikutip: Key N, Makris M, 2007)

Bahan pemeriksaan PT adalah plasma sitrat yang diperoleh dari sampel darah vena dengan antikoagulan trisodium sitrat 3.2% (0.109 M) dengan perbandingan 9:1. Darah sitrat harus diperiksa dalam waktu selambat-lambatnya 2 jam setelah pengambilan. Sampel disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 2.500 g. Penyimpanan sampel plasma pada suhu 2-8 oC menyebabkan teraktivasinya F VII (prokonvertin) oleh sistem kalikrein. Tabung yang digunakan tabung khusus pemeriksaan PT yaitu tabung plastik sekali pakai, jika menggunakan tabung kaca pencucian harus bersih tidak boleh ada sisa sabun/detergent (Horsti J, 2002).

2.2.8.4. Metode Pemeriksaan *Protrombin Time*

2.2.8.4.1. Metode *Quick*

Metode ini ditemukan oleh *Armand Quick* (1894-1978). Metode ini yang paling banyak digunakan di dunia saat ini. Metode ini mengukur fibrinogen, Faktor II, V, VII dan X. Prinsip dari metode ini adalah dengan menambahkan 50 µl plasma ke dalam 100 µl reagen kemudian diukur waktu sampai terjadinya bekuan. Volume reagen yang digunakan 40% lebih kecil dari pada metode *Owren* (140 µl), yang berarti biaya per tes yang lebih kecil. Pemeriksaan bisa dilakukan dengan cara manual atau alat otomatis. Reagen yang digunakan mengandung faktor jaringan yang diambil dari sumber alam seperti Otak bovine, plasenta manusia, otak dan paru-paru kelinci (*Horsti J*, 2002).

2.2.8.4.2. Metode *Owren*

Metode ini ditemukan oleh *Paul Owren* (1905-1990). *Paul Owren* mempelajari Faktor V dan mulai mengembangkan pereaksi *thrombotest* (kombinasi tromboplastin reagen) dengan percobaan menggunakan pasien dengan terapi obat anti koagulasi. Metode *Owren* dominan di kawasan Nordik, Benelux dan Jepang. Metode ini mengukur koagulasi Faktor II, VII dan X. Bovine plasma (teradsorpsi dengan BaSO_4) digunakan sebagai sumber untuk menambahkan fibrinogen (Faktor I) dan Faktor V ke reagen tromboplastin. Metode ini tidak dapat digunakan untuk mendeteksi kekurangan Faktor V. Prinsip dari metode ini adalah dengan menambahkan 10 µl plasma dan 50 µl pengencer ke dalam 140 µl reagen kemudian diukur waktu sampai terjadinya bekuan. Volume sampel yang kecil (5% dalam campuran reaksi) membuat metode ini

kurang sensitive untuk variabel preanalitik seperti sitrat dan heparin dalam sampel. Pereaksi yang digunakan adalah jaringan yang diekstraksi dari sumber alam seperti bovin, otak monyet atau kelinci (Horsti J, 2002).

2.2.8.4.3. Metode Pengukuran *point-of-care testing* (POCT)

Teknologi point-of-care (POCT) menawarkan mode pengambilan sampel baru dan prinsip pengukuran untuk memantau pasien dengan terapi obat anti koagulasi. Instrumennya cocok untuk *self-testing* di rumah dengan menggunakan sampel darah kapiler tanpa antikoagulan. Instrumen POCT mengukur keseluruhan waktu pembekuan darah dengan aktivasi tromboplastin dalam detik dan hasilnya dinyatakan sebagai rasio, persentase atau INR (Horsti J, 2002).

2.2.8.4. Pelaporan Hasil dan Nilai Rujukan

Hasil pemeriksaan PT dapat dilaporkan dalam bentuk detik, rasio, aktivitas protrombin, dan INR. Ratio yaitu nilai PT pasien dan nilai rata-rata PT plasma normal. Hasil ini dipengaruhi oleh kepekaan tromboplastin yang dipakai dan teknik pemeriksaan. Karena itu pemeriksaan ini harus selalu dilakukan dengan disertai kontrol plasma normal. Nilai normal PT tergantung dari reagen, cara pemeriksaan dan alat yang digunakan. Sebaiknya setiap laboratorium mempunyai nilai normal yang ditetapkan sendiri dan berlaku untuk laboratorium tersebut (Sacher, 2004).

Perbedaan kepekaan reagen tromboplastin yang dipakai dan cara pelaporan hasil pemeriksaan PT menimbulkan kesulitan bila pemantauan dikerjakan di laboratorium yang berbeda-beda. Untuk mengatasi masalah tersebut, ICTH

(International Committee on Thrombosis and Haemostasis) dan ICSH (International Committee on Standardization in Haematology) merekomendasikan agar tromboplastin jaringan yang akan digunakan harus dikalibrasi terlebih dahulu terhadap tromboplastin rujukan dari WHO (World Health Organisation) untuk mendapatkan nilai ISI (international Sensitivity Index). Nilai ISI diberikan untuk reagen tromboplastin komersial untuk menentukan slope komparasi atau kepekaan relatifnya, serta perbandingannya dengan tromboplastin rujukan. Semakin rendah nilai ISI, maka semakin sensitif reagen tersebut. Adanya nilai ISI membuat hasil pemeriksaan PT dapat dilaporkan secara seragam dengan menggunakan INR (International Normalized Ratio) yang didapatkan dari nilai ratio dipangkatkan dengan nilai ISI dari reagen tromboplastin yang digunakan (Aulia D, 2007).

2.2.9. Pra Analitik Pemeriksaan Hemostasis

Adanya hasil tes yang tidak tepat dalam pemeriksaan hemostasis dapat disebabkan oleh keadaan diluar pemeriksaan itu sendiri terutama dalam proses pra analitik. Keadaan yang dapat menyebabkan kesalahan misalnya dari penanganan sampel yang tidak tepat, atau dari proses pengambilan sampel itu sendiri. Kesalahan tersebut menyebabkan hasil tes tidak menggambarkan keadaan sampel sesuai keadaan klinis pasien tersebut secara akurat. Hal yang perlu diperhatikan pada pra analitik pemeriksaan hemostasis terutama saat pengambilan darah vena antara lain identifikasi pasien, pemilihan lokasi vena, antikoagulan, cara pengambilan dan urutan penampungan, serta stabilitas dan penyimpanan sampel (Favaloro E.J, 2012).

2.2.9.1. Pengambilan darah vena

Pengambilan darah harus dilakukan oleh tenaga yang terlatih dan berpengalaman dan identifikasi pasien harus dilakukan dengan tepat sehingga dan pengambilan sampel dilakukan dari pasien yang benar. Pasien diminta menyebutkan nama lengkapnya, alamat, tanggal lahir atau nomor identifikasinya, selain itu pencantuman tanggal dan waktu pengambilan sampel juga harus diperhatikan (Favaloro E.J, 2012).

Pasien sebaiknya berada dalam keadaan santai, karena adanya stres dan aktivitas fisik yang berlebihan dapat menyebabkan perubahan dalam pembekuan darah yaitu akan meningkatkan faktor von willebrand dan fibrinolisis. Pasien juga sebaiknya tidak mengonsumsi makanan atau obat yang dapat mempengaruhi fungsi trombosit selama setidaknya 10 hari dan sebaiknya puasa *overnight* karena adanya kilomikron dapat mempengaruhi pemeriksaan. Terdapat beberapa obat yang dapat mempengaruhi fungsi trombosit, seperti aspirin, ibuprofen, indometasin, asam mefenamat, juga makanan seperti kopi dan alkohol. Posisi badan mempengaruhi konsentrasi komponen darah seperti perubahan dari berbaring ke berdiri mengurangi volume plasma sekitar 12% maka pengambilan darah cenderung dilakukan pada posisi berbaring. Istirahat selama 30 menit juga direkomendasikan untuk tes fibrinolisis (Favaloro E.J, 2012).

Pengambilan sampel yang berhubungan dengan pemberian obat harus diperhatikan (seperti APTT pada monitoring terapi heparin). Variasi diurnal dan makanan dapat memodifikasi beberapa parameter, maka darah sebaiknya diambil antara pukul 7-9 pagi, 12 jam setelah makan terakhir, dan pada keadaan telentang

yang bebas dari stres, kecuali jika efek obat perlu dimonitor waktunya seperti heparin (Ernst D.J, 2003).

Alat yang diperlukan untuk pengambilan darah vena antara lain adalah jarum, torniket, kapas alkohol, sarung tangan, tabung dan tube holder. Jarum yang digunakan harus sesuai dengan diameter vena. Jarum dengan diameter besar (16-18 gauge) digunakan untuk mengambil darah dalam jumlah besar seperti donor darah sehingga umumnya digunakan jarum ukuran 19-21 gauge. Penggunaan torniket adalah untuk membantu melihat lokasi vena lebih jelas. Jika penggunaan torniket > 1 menit maka kadar F VIII, faktor von willebrand dan *tissue plasminogen activator* akan meningkat, dan fibrinolisis akan teraktivasi. Hemokonsentrasi meningkatkan semua protein dalam darah sehingga torniket tidak boleh terlalu kencang dan harus dipasang tidak lebih dari 1 menit, saat darah sudah mengalir ke dalam tabung maka secepatnya torniket harus dilepas (Ernst D.J, 2003).

Sampel sebaiknya diambil tanpa bendungan sehingga darah dapat mengalir ke semprit dengan aliran kontinyu tanpa tahanan atau dengan adanya tekanan negatif dari tabung hampa udara (vakum), karena adanya bendungan yang terlalu lama pada vena dapat menyebabkan hemokonsentrasi, peningkatan aktivitas fibrinolitik, dan aktivasi sejumlah faktor pembekuan (Ernst D.J, 2003).

2.2.9.2. Antikoagulan, Rasio Volume Darah dan Nilai Hematokrit

Jenis, volume dan pH antikoagulan, rasio volume darah dan hematokrit merupakan beberapa hal yang termasuk variabel pra analitik dan dapat mempengaruhi tes koagulasi. NCCLS (sekarang *The Clinical and Laboratory*

Standard Institute (CLSI) sebelum 2003 merekomendasikan bahwa 5 ml darah pertama sebaiknya digunakan untuk pemeriksaan lain yang bukan hemostasis karena satu ml darah pertama dapat terkontaminasi oleh *tissue factor*, namun kini hal tersebut tidak berlaku lagi karena tidak ada bukti adanya perubahan efek pada pemeriksaan koagulasi. CLSI saat ini memperkenalkan '*coagulation before serum*', tes koagulasi yang sebaiknya tidak dilakukan setelah sampling pada tabung yang mengandung aktivator atau tabung yang mengandung antikoagulan lain seperti heparin dan EDTA karena dikhawatirkan dapat terjadi efek *carry over* dari bahan tambahan dari tabung sebelumnya ke tabung berikutnya yang kemudian akan mempengaruhi hasil. *Carry over* terjadi jika jarum yang digunakan untuk mengisi sebuah tabung memindahkan sedikit darah atau campuran antikoagulan dari darah tersebut ke tabung yang diisi berikutnya. Antikoagulan dan zat aditif lainnya pada tabung dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan pada tabung lainnya walaupun dari penelitian Fukugawa didapatkan bahwa efek *carryover* dari *clot activators* dalam tabung serum minimal. Urutan pengambilan tabung juga serupa pada penggunaan semprit. Jika 2 atau 3 tabung digunakan maka diisi volumenya sampai batas yang dianjurkan, selain itu CLSI juga menyatakan bahwa hasil tes PT dan APTT tidak terpengaruh bila dari tabung pertama (Favaloro E.J, 2012).

Sampel untuk pemeriksaan koagulasi harus menggunakan tabung yang mengandung antikoagulan yaitu sitrat. Adanya sitrat akan menyingkirkan kalsium sehingga tidak akan terjadi proses pembekuan. Konsentrasi sitrat yang direkomendasikan adalah 0.105-0.109 M (biasanya 3.2%) dengan rasio 9 volume

darah dengan 1 volume antikoagulan, sehingga penting untuk mengisi tabung sedikitnya 90% dari kapasitas tabung atau mencapai batas yang terdapat pada tabung untuk tercapainya rasio antar volume darah dan antikoagulan tersebut selain itu tabung juga harus dicampur merata dengan dibolak balik perlahan sebanyak 5-6 kali dan jangan dikocok supaya darah dengan antikoagulan menjadi homogen (Ernst D.J, 2003).

2.2.9.3. Stabilitas dan Penyimpanan

Jeda waktu antara sampling dan sentrifugasi sangat penting sehingga waktu kapan tepatnya sampel diambil perlu diketahui. Sebelum mengirim sampel ke laboratorium hemostasis maka harus disimpan dalam suhu ruangan untuk mencegah aktivasi dingin oleh F VII. Sebaiknya sampel dikirim secepat mungkin untuk mencegah deteriorisasi faktor pembekuan yang labil seperti F V dan VIII dan tidak perlu diantar dalam pendingin, namun pada suhu 15-22⁰ C. Sampel untuk pemeriksaan PT yang disentrifugasi atau tidak disentrifugasi dengan plasma berada di bagian atas dalam tabung tertutup dibiarkan pada suhu 18 – 24⁰ C harus diperiksa dalam waktu 24 jam setelah pengambilan. Sampel untuk pemeriksaan APTT pada pasien yang tidak mendapat heparin disimpan pada 2-4⁰ C atau 18-24⁰ C harus diperiksa dalam 4 jam, sedangkan untuk pemeriksaan APTT pada sampel yang diduga mengandung *unfractionated heparin* disimpan pada suhu 2-4⁰ C atau 18-24⁰ C yang harus dikerjakan dalam waktu 1 jam karena potensi netralisasi heparin oleh adanya pelepasan isi trombosit. Sampel untuk pemeriksaan lain (Trombin Time, Protein C, F V, F VIII) disimpan pada suhu 2-4⁰ C atau 18-24⁰ C, disentrifugasi dan diperiksa dalam waktu 4 jam (Ernst D.J, 2003).

Suhu yang ekstrim harus dihindari dan keterlambatan dalam transportasi dapat mempengaruhi faktor yang labil (FV, FVIII), sehingga menyebabkan waktu pembekuan memanjang dan hilangnya aktivitas faktor tersebut. Pada kasus tersebut, melakukan sentrifugasi dan pemisahan plasma yang diikuti dengan transpor plasma yang beku dapat dipertimbangkan. Umumnya, untuk mempertahankan integritas sampel, sampel harus dikerjakan secepatnya (idealnya dalam waktu 1 jam setelah pengambilan) dan tes dilakukan dalam waktu 4 jam (atau diproses dengan dilakukan sentrifugasi lebih dahulu dan plasma dibekukan). Selama disimpan dalam waktu yang singkat, sampel harus tetap tertutup dan berada dalam suhu kamar. Pemeriksaan yang mengalami penundaan selama 4 jam untuk APTT dan 24 jam untuk PT, maka plasma sebaiknya dipisahkan dari fraksi seluler dengan satu atau dua kali sentrifugasi, tanpa mengganggu *pellet* sel. Plasma yang sudah terpisah dapat disimpan dalam keadaan beku untuk dikerjakan tes selanjutnya. Plasma yang terpisah umumnya dapat disimpan pada suhu ruangan atau dalam lemari es selama beberapa jam tanpa ada efek pada koagulasi (Ernst D.J, 2003).

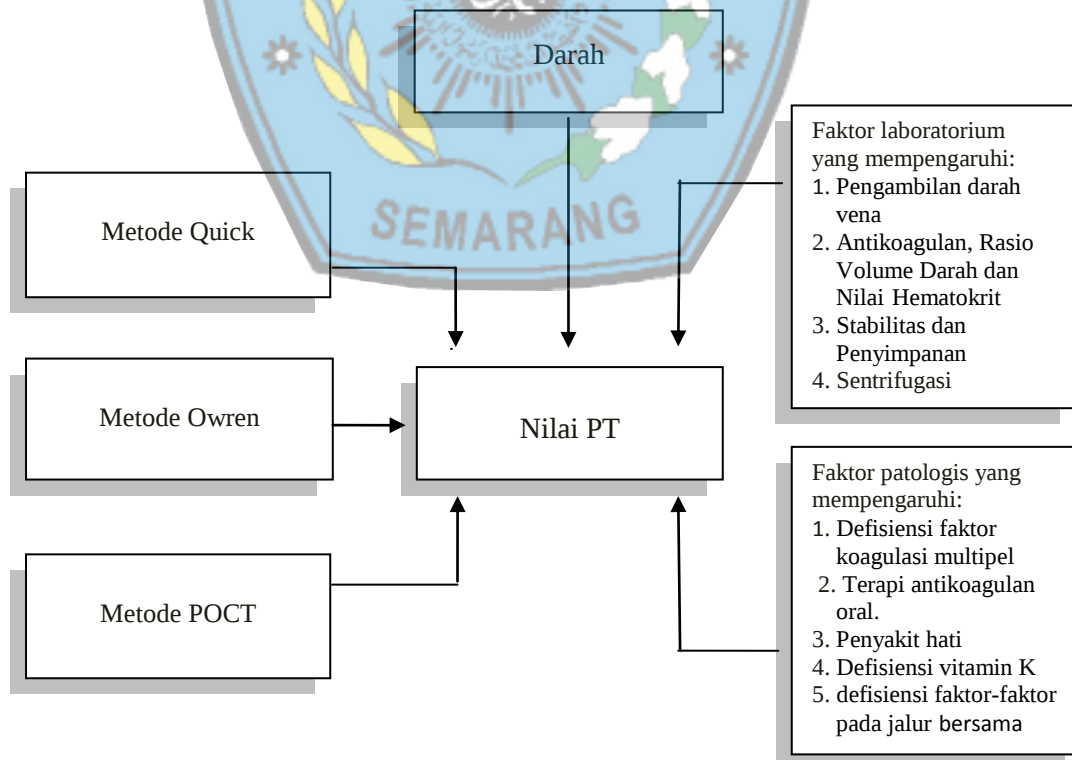
Plasma yang disimpan di lemari es, semakin rendah suhu *freezer*, semakin lama spesimen dapat disimpan. Umumnya tes pada sampel yang disimpan pada suhu di bawah -20°C dapat dikerjakan dalam waktu 2-4 minggu sedangkan tes pada sampel yang disimpan pada suhu -80°C dapat dikerjakan dalam waktu beberapa bulan dan terkadang beberapa tahun dalam *freezer* yang tidak mempunyai *defrost cycle* yang dapat mencairkan dan membekukan kembali sampel secara periodik selama penyimpanan. Sampel yang beku sebelumnya

harus dicairkan pada suhu 37°C selama 5-10 menit atau sudah mencair seluruhnya dan diperiksa secepatnya. Pemeriksaan yang tidak dapat dilakukan secepatnya maka sampel yang sudah dicairkan dapat disimpan dalam suhu $5-15^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam (Ernst D.J, 2003).

2.2.9.4. Sentrifugasi

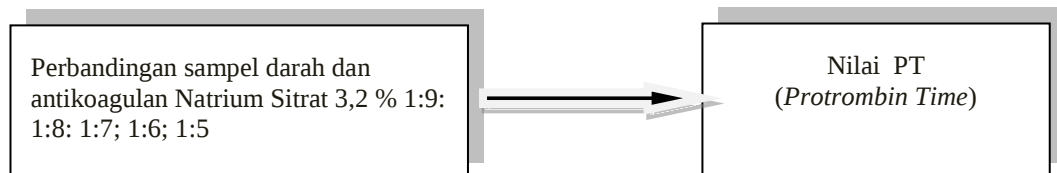
Sampel secara keseluruhan perlu diamati adanya bekuan. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 1500 g 15 menit pada suhu kamar untuk menghasilkan *platelet poor plasma* (PPP) dengan jumlah trombosit $< 10.000/\mu\text{l}$, disarankan untuk menggunakan *swing-out bucket rotor* untuk menghindari pencampuran kembali antara plasma dan trombosit (Favaloro E.J, 2012).

2.3. Kerangka Teori



Gambar 2.4. Kerangka Teori

2.4. Kerangka Konsep



Gambar 2.5. Kerangka Konsep

2.5. Hipotesis

Terdapat pengaruh perbandingan volume darah dan antikoagulan natrium sitrat 3,2% terhadap nilai PT (*Protrombin Time*).

