

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Telaah Pustaka**

##### **1. Pra Analitik Hematologi**

###### **a. Variabel Prekoleksi**

Persiapan pasien sebelum pengambilan darah harus diperhatikan untuk meminimalisir faktor fisiologis yang berhubungan dengan aktivitas yang mungkin dapat mempengaruhi hasil uji laboratorium. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil pemeriksaan diantaranya umur, ketinggian, dehidrasi, diet, variasi diurnal, terapi obat, olahraga, demam, jenis kelamin, ikterus, posisi, kehamilan, merokok, stres, suhu dan kelembapan (Kiswari, 2014).

###### **b. Variabel Koleksi**

Spesimen adalah bahan yang berasal dari manusia dapat berupa cairan tubuh, swab (olesan), kerokan, tinja (feses), dahak (sputum), jaringan atau organ, dan sebagainya yang diperoleh dengan tata cara tertentu untuk dilakukan pemeriksaan atau diuji laboratorium. Jenis spesimen yang digunakan untuk pemeriksaan hematologi yaitu berupa darah yang berasal dari pembuluh vena atau kapiler. Pengumpulan spesimen merupakan salah satu komponen pra analitik, yaitu suatu tahap atau proses yang dilakukan sebelum spesimen diproses dalam peralatan (instrumen pengujian) (Riswanto, 2013).

Spesimen darah diperoleh dengan cara melakukan pengambilan darah, proses ini disebut flebotomi (*phlebotomy*). Metode pengambilan darah meliputi tusukan vena (*venipuncture*) untuk memperoleh *whole blood*, tusukan kulit (*skin/dermal/capillary puncture*) untuk memperoleh darah kapiler, tusukan arteri (pembuluh nadi) untuk tujuan pemeriksaan tertentu (Riswanto, 2013).

#### 1) Pengambilan Sampel

##### a) Pengambilan Sampel dengan *Evacuated Tube System* (Sistem dengan Tabung Evakuasi)

Sistem ini disebut juga sistem tertutup, dimana darah dari pembuluh darah pasien mengalir melalui jarum masuk ke tabung tanpa terjadi kontak dengan udara luar. Sistem ini dapat menggunakan beberapa tabung dengan pengambilan darah vena tunggal. Sistem tabung evakuasi tersedia oleh beberapa produsen. Sistem tabung evakuasi memiliki tiga komponen dasar yaitu jarum, pemegang tabung, dan beberapa jenis tabung evakuasi. Jarum multi sampel, disebut demikian karena dapat digunakan untuk menampung darah kedalam beberapa tabung sekaligus pada sekali tusukan. Tabung pertama yang telah terisi dapat langsung diganti dengan tabung lainnya tanpa harus melepas jarum dari tempat tusukan. Ujung jarum yang lebih panjang menembus vena, sedangkan jarum yang lebih pendek menusuk sumbat

tabung selama proses pengumpulan spesimen (Kiswari,2014).

b) Pengambilan Sampel dengan *Syringe System* (Sistem Menggunakan Jarum Suntik)

Jarum suntik digunakan pada pasien yang memiliki pembuluh darah yang kecil. Sistem ini terdiri dari jarum suntik steril yang disebut jarum suntik hipodermik. Jarum suntik memiliki berbagai ukuran, panjang dan volume untuk keperluan yang berbeda - beda. Prosedur pengambilan darah secara umum menggunakan jarum suntik berukuran 21 – 23 , panjangnya 1,5 inci dan volumenya 2,5 – 10 mL. Darah yang diperoleh dalam jarum suntik terlebih dahulu dipindahkan ke tabung evakuasi, dengan cara menusukkan jarum menembus *stopper* tabung (Kiswari, 2014).

*Winged infusion set* atau jarum butterfly adalah alat diperlukan untuk pengambilan darah dari pembuluh darah yang kecil atau vena yang tidak tampak jelas, misalnya pada vena ditangan, vena pasien lanjut usia dan vena pada anak – anak. Jarum butterfly terdiri dari sebuah jarum *stainless steel* sepanjang  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{3}{4}$  inci yang secara permanen terhubung dengan plastik sepanjang 5 – 12 inci, dilengkapi dengan ekstensi dari bahan plastik yang menyerupai sayap kupu –

kupu yang menempel pada jarum dan terhubung dengan selang (Kiswari,2014).

Spesimen darah yang diperoleh harus dijamin kebermanfaatannya, spesimen tersebut harus diambil pada waktu yang tepat, pengambilan spesimen secara acak hanya dilakukan pada situasi darurat (Riswanto,2013).

## 2) Pengolahan Spesimen

### a) Sentrifugasi

*Centrifuge* merupakan alat yang digunakan untuk memutar darah pada kecepatan putar atau revolusi (*revolution per minute, rpm*) tertentu. Gaya sentrifugal pada putaran tersebut menyebabkan pemisahan sel – sel dan plasma atau serum. Tabung harus selalu tertutup selama sentrifugasi untuk mencegah kontaminasi, penguapan, pembentukan aerosol (substansi yang dilepaskan dalam bentuk kabut halus) dan perubahan pH. Sentrifugasi terhadap setiap spesimen cukup dilakukan sekali. Sentrifugasi berulang dapat menimbulkan risiko hemolisis serta perubahan analit yang dapat mempengaruhi hasil tes. Hal ini disebabkan karena mesin *centrifuge* menghasilkan panas selama pengoperasian, spesimen yang memerlukan suhu dingin harus disentrifugasi dalam *refrigerated centrifuge* yang terkontrol suhunya. Spesimen untuk pemeriksaan yang

memerlukan plasma ditampung dalam tabung berisi antikoagulan (misalnya Natrium sitrat) disentrifugasi tanpa penundaan waktu (Riswanto, 2013).

#### b) Pemisahan Alikuot

Serum atau plasma yang diperoleh setelah disentrifugasi, harus dipindahkan ke tabung aliquot menggunakan pipet. Spesimen dialirkan kedalam tabung aliquot dengan perlahan untuk menghindari kemungkinan pembentukan aerosol atau percikan. Serum atau plasma dari spesimen dengan zat aditif (zat antikoagulan) yang berbeda tidak boleh ditempatkan dalam tabung aliquot yang sama (Riswanto, 2013).

#### 3) Penolakan Spesimen

Spesimen yang telah dikumpulkan diberi label, diangkat dan diproses sesuai dengan prosedur yang ditetapkan, mencakup volume sampel untuk memenuhi kebutuhan khusus dan jenis wadah penampung. Kegagalan pada tahapan tertentu dapat mengakibatkan penolakan spesimen. Jenis spesimen yang tidak tepat, pengawet yang salah, hemolisis, lipemia, pembekuan dan lain – lain merupakan alasan dilakukan penolakan spesimen. Penolakan spesimen dapat menyebabkan penambahan biaya, waktu serta menyebabkan kerugian pasien, terutama ketika sampel darah dalam tabung disalahartikan (Kiswari,2014).

Plasma hemolisis yaitu Plasma atau serum secara visual berwarna kemerahan yang karena adanya hemoglobin yang berlebih yang disebabkan oleh eritrosit yang menyebar dalam serum atau plasma tersebut. Kejadian hemolisis sebagian besar disebabkan oleh teknik flebotomi dan penanganan sampel atau pengiriman sampel (faktor *in vitro*). Faktor *in vivo* terdiri dari berbagai penyakit yang menyebabkan hemolisis seperti, anemia hemolitik, hemoglobinopati, sepsis dan infeksi parasit (Oliveira dkk., 2017; Krasowski, 2019). Sampel plasma yang hemolisis dapat meningkatkan absorbansi spektrofotometri dan menyebabkan pembacaan absorbansi yang tinggi, yang dapat mengganggu deteksi bekuan oleh beberapa instrumen sehingga mempengaruhi keakuratan waktu pemeriksaan. Selain itu, hasil lisis sel termasuk faktor jaringan dapat mengaktifkan faktor koagulasi (Falvaloro dkk., 2008).

Plasma Lipemik terjadi karena adanya kandungan lemak (terutama trigliserida dalam darah yang diambil) dan tidak tergantung pada faktor yang berkaitan dengan flebotomi (Nikolac, 2014). Lipemia menyebabkan plasma atau serum keruh dan terlihat berwarna putih susu. Lipemia sebagian besar disebabkan karena pasien tidak puasa dan mengonsumsi makanan tinggi lemak sebelum dilakukan pengambilan darah (Oliveira dkk., 2017). Konsumsi makanan tinggi lemak meningkatkan konsentrasi

aktivasi F.VII (F.VIIa). Selain itu juga berpengaruh pada fungsi trombosit dan menyebabkan penurunan beberapa aktivitas faktor pembekuan (F.II, F.IX, F.X, F.VII, F.VIIa, F.XIIa). Gangguan analitik di beberapa pemeriksaan laboratorium (terutama berdasarkan deteksi bekuan secara *optical*) juga dapat terjadi tetapi dapat diminimalisir menggunakan prosedur mekanikal atau elektromekanikal, atau menggunakan alat ukur yang membandingkan absorpsi sampel pada dua panjang gelombang atau menggunakan pemeriksaan koagulasi dengan panjang gelombang alternatif (Favaloro dkk., 2008 ; Lippi dkk., 2006).

Plasma ikterik mengandung kadar bilirubin yang tinggi, kadar normal bilirubin adalah 0.5 mg/dL. Pada kasus hiperbilirubinemia kadarnya akan melebihi 1,5 mg/dL dan plasma akan terpengaruh. Gangguan dalam pengujian hemostasis terjadi karena adanya hiperbilirubinemia sebagian besar disebabkan oleh tumpang *spectral overlap* (yaitu, senyawa tersebut memiliki absorbansi tinggi antara 400 dan 520 nm, dengan puncak absorbansi sekitar 456 nm) (Lippi dkk., 2013).

#### 4) Penyimpanan Darah

Penyimpanan darah menyebabkan konstituen darah pada spesimen dapat berubah sebagai hasil dari berbagai proses, termasuk adsorpsi tabung kaca atau plastik, denaturasi protein, penguapan senyawa volatil, pergerakan air ke dalam sel yang

menyebabkan hemokonsentrasi serta aktivitas metabolisme leukosit dan eritrosit. Perubahan ini terjadi dalam berbagai kondisi, pada suhu kamar dan selama pendinginan atau pembekuan. Persyaratan penyimpanan bervariasi secara luas, berdasarkan studi stabilitas telah menunjukkan bahwa perubahan analit yang signifikan secara klinis terjadi jika serum atau plasma kontak dalam waktu yang lama dengan sel darah (Kiswari,2014).

## 2. Darah

Darah adalah jaringan cair yang terdiri atas dua bagian. Bahan interstisial adalah cairan yang disebut plasma dan di dalamnya terdapat unsur - unsur padat, yaitu sel darah merah. Volume darah keseluruhan kira - kira sebanyak satu per dua belas berat badan atau kira -kira 5 liter. Sekitar 55 persennya adalah cairan, sedangkan 45 persen sisanya terdiri atas sel darah (Pearce,2009). Darah adalah jaringan ikat atau konektif berbentuk cair terdiri dari 4 unsur seluler yaitu sel - sel darah merah (eritrosit), sel - sel darah putih (leukosit), sel -sel darah pembeku atau keping darah (trombosit) dan cairan darah (plasma darah) (D'Hiru, 2013).

Darah berfungsi dalam menjaga tekanan osmosis antara darah dan jaringan – jaringan sel tetap normal, menjaga supaya keseimbangan asam basa dalam darah tetap seimbang, mengatur suhu tubuh dan sebagai alat pertahanan terhadap serangan penyakit. Darah merupakan alat pengangkut utama (transportasi, distribusi dan sirkulasi) di dalam tubuh (D'Hiru, 2013).



Sel darah merah atau eritrosit berbentuk cakram bikonkaf, cekung pada kedua sisinya, dan berdiameter 6,7 - 8,0 milimikron (Rata - rata 7,2 milimikron), dalam 1 mm<sup>3</sup> darah terdapat kira - kira 5 juta butir sel darah merah. Sel ini berwarna kuning tua jika dalam jumlah banyak maka terlihat berwarna merah (tergantung konsentrasi oksigennya). Strukturnya terdiri dari pembungkus luar atau stroma yang berisi massa hemoglobin. Pembentukan sel - sel darah merah (hematopoesis) terjadi di dalam sumsum tulang terutama dari tulang pendek pipih dan tidak beraturan, jaringan kanselus pada ujung tulang pipa, sumsum dalam batang iga - iga dan sternum. Perkembangan sel darah merah dalam sumsum tulang melalui berbagai tahap, awalnya berbentuk besar dan berinti (nukleus), tidak mengandung hemoglobin, kemudian dimuati hemoglobin dan akhirnya kehilangan intinya, setelah itu diedarkan dalam peredaran darah (D'Hiru, 2013).

Rata - rata masa hidup sel darah merah selama 120 hari. Sel - sel darah merah yang telah rusak dan dihancurkan dalam sistem retikulum endotelium terutama dalam limfa dan hati. Globin dan hemoglobin dipecah menjadi asam amino untuk digunakan sebagai protein dalam jaringan. Zat besi (Fe) dalam heme (dari hemoglobin) dikeluarkan untuk digunakan kembali dalam pembentukan sel darah merah. Sisa heme direduksi menjadi biliverdin dan Karbon monoksida (CO) (D'Hiru, 2013).

Proses perdarahan menyebabkan hilangnya sel darah merah beserta hemoglobinnya. Sel - sel darah merah kemudian akan diganti dalam waktu

beberapa minggu berikutnya ketika terjadi perdarahan sedang. Tetapi jika kadar hemoglobin turun hingga 40%, maka diperlukan transfusi darah. Hemoglobin adalah protein yang kaya akan zat besi (Fe). Hemoglobin yang berikatan dengan oksigen akan membentuk oksihemoglobin didalam sel darah merah. Kadar hemoglobin darah normal adalah sekitar 15 gram setiap 100 mL darah (D'Hiru, 2013).

Sel darah putih (leukosit) memiliki warna bening (translucent). Bentuknya lebih besar jika dibandingkan dengan eritrosit, dalam setiap 1 mm<sup>3</sup> darah terdapat 4000 – 10.000 sel darah putih. Sel darah putih diproduksi dalam sumsum tulang. Sel ini memiliki sebuah inti yang dapat membelah menjadi banyak serta protoplasmanya bergranula (maka disebut granulosit). Leukosit terdiri dalam beberapa komposisi bentuk sel yang meliputi : limfosit, monosit, basofil, eosinofil dan neutrofil. Granulosit dan monosit memiliki peranan penting dalam perlindungan terhadap kuman – kuman penyakit. Kemampuan sel darah putih sebagai fagosit dapat memakan bakteri hidup yang masuk sebagai infektan ke dalam peredaran darah (D'Hiru, 2013).

Sel darah pembeku (trombosit), sel ini besarnya sepertiga ukuran sel darah merah, bentuknya tidak teratur, mudah pecah, dan tidak memiliki inti (nukleus). Setiap 1 mm<sup>3</sup> darah terdapat 150.000 – 400.000 sel trombosit. Sel – sel darah pembeku dibentuk dalam sumsum merah tulang. Trombosit berperan sangat penting dalam proses pembekuan

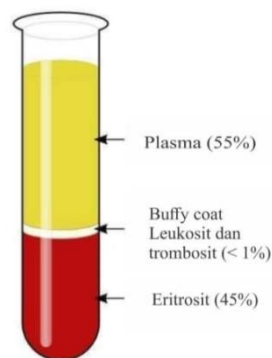
darah. Trombosit berperan dalam pembekuan darah, melindungi dari perdarahan masif yang diakibatkan luka atau trauma (D'Hiru, 2013).

### 3. Plasma

Plasma darah (cairan darah) adalah cairan berwarna kekuning-kuningan yang tidak memiliki sel-sel darah. Plasma darah memiliki senyawa penyangga (*buffer*) berupa hemoglobin, oksihemoglobin, bikarbonat, fosfat dan protein plasma yang berfungsi mengatur keseimbangan asam basa untuk menghindari terjadinya kerusakan jaringan. Plasma darah mendukung protein yang diperlukan untuk pembentukan jaringan, menyebarkan (mendistribusikan) cairan nutrisi sehingga semua sel tubuh menerima kebutuhan esensial dan berperan dalam transportasi bahan buangan (sisa metabolisme) ke berbagai organ ekskresi untuk dibuang (D'Hiru, 2013).

Plasma merupakan bagian cair dari darah yang ditambahkan bahan antikoagulan (anti pembekuan darah). Darah yang ditambahkan antikoagulan maka tidak akan terjadi pembekuan dan darah tetap cair. Darah yang ditambah antikoagulan setelah didiamkan beberapa menit atau telah disentrifugasi akan terpisah menjadi tiga bagian yaitu:

- a. Plasma, yang berada di lapisan atas berupa cairan berwarna kuning
- b. *Buffycoat*, yang berada di lapisan tengah, tipis merupakan lapisan sel leukosit dan trombosit
- c. Eritrosit berada di lapisan bawah (Riswanto, 2013).



Gambar 1. Darah dengan Antikoagulan  
Sumber : Kiswari,2014.

#### 4. Antikoagulan

Penambahan antikoagulan dilakukan supaya sampel darah tidak membeku. Aktivitas antikoagulan pada dasarnya adalah mengikat atau mengendapkan ion kalsium (Ca). Ion kalsium adalah salah satu faktor pembekuan (Faktor IV), tanpa kalsium pembekuan tidak terjadi, dan akan menghambat pembentukan trombin (Kiswari, 2014).

Natrium sitrat (*Sodium Citrate*) digunakan dalam bentuk larutan pada konsentrasi 3,2%. Natrium sitrat adalah jenis antikoagulan yang direkomendasikan oleh *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH) dan *International Society for Thrombosis and Haematology* sebagai antikoagulan yang terpilih untuk tes koagulasi. Cara

kerjanya dengan mengendapkan ion kalsium, sehingga ion kalsium menjadi bentuk yang tidak aktif. Selain untuk pemeriksaan koagulasi, natrium sitrat juga digunakan untuk pemeriksaan laju endap darah metode Westergreen (Kiswari, 2014).

Antikoagulan Natrium sitrat digunakan untuk pengujian sistem pembekuan darah karena memiliki kemampuan yang paling baik dalam memelihara faktor-faktor pembekuan darah dan mengembalikan kalsium ke dalam spesimen selama proses pemeriksaan serta dapat dengan mudah mengembalikan efek pengikatan (*binding*). Tabung Sitrat dapat dijumpai dalam bentuk tabung hampa udara (vakum) dengan tutup berwarna biru terang (Riswanto, 2013).

Mekanisme kerja dari antikoagulan Natrium sitrat mampu mencegah pembekuan darah, menghilangkan dan mengikat kalsium melalui kompleks kalsium sitrat, menginhibisi *aminotransferase* dan *alkali phosphatase*, serta menstimulasi *acid phosphatase*. Efek pemakaian antikoagulan Natrium sitrat konsentrasi rendah dapat mengakibatkan pemendekan *clotting time* dan terjadi klot, sedangkan efek pemakaian antikoagulan Natrium sitrat konsentrasi tinggi dapat menyebabkan *false prolonged coagulation time*. Rasio perbandingan darah dan antikoagulan untuk pemeriksaan koagulasi yaitu 9:1 (0,333 cc Na sitrat : 3 cc darah). Oleh karena 1 cc sama dengan 20 tetes, maka 0,333 cc atau 6,7 (7 tetes) Na sitrat : 3 cc darah (Tahono dkk., 2012).

## 5. Hemostasis

Hemostasis adalah suatu proses penghentian perdarahan secara spontan dari pembuluh darah yang mengalami kerusakan yang disebabkan oleh putus dan robeknya pembuluh darah, sedangkan thrombosis terjadi ketika endotelium yang melapisi pembuluh darah mengalami kerusakan atau hilang. Proses hemostasis meliputi proses pembekuan darah (koagulasi) serta melibatkan pembuluh darah, agregasi trombosit dan protein plasma baik yang menyebabkan proses pembekuan atau proses pelarutan bekuan (Durachim, 2018). Sistem yang berperan dalam proses hemostasis yaitu sistem vaskuler, trombosit dan pembuluh darah diantaranya :

### a. Sistem Vaskuler

Peran sistem vaskuler dalam mencegah perdarahan meliputi proses kontraksi pembuluh darah (vasokonstriksi) serta aktivasi trombosit dan pembekuan darah. Apabila pembuluh darah mengalami luka, akan terjadi vasokonstriksi yang awalnya secara reflektorik kemudian akan dipertahankan oleh faktor lokal seperti 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin) dan epinefrin. Vasokonstriksi akan menyebabkan pengurangan aliran darah pada daerah yang luka. Vasokonstriksi yang terjadi pada pembuluh darah kecil mungkin dapat menghentikan perdarahan, sedangkan pada pembuluh darah besar masih diperlukan sistem – sistem lain seperti trombosit dan pembekuan darah (Setiabudy, 2007).

Pembuluh darah dilapisi oleh sel endotel. Apabila lapisan endotel rusak maka jaringan ikat dibawah endotel seperti serat kolagen, serat elastin dan membrana basalis terbuka sehingga terjadi aktivasi trombosit yang menyebabkan adhesi trombosit serta pembentukan sumbat trombosit. Aktivasi faktor pembekuan darah baik jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik yang menyebabkan pembentukan fibrin juga terjadi (Setiabudy, 2007).

b. Sistem Trombosit

Trombosit berperan penting dalam hemostasis yaitu pembentukan dan stabilitas sumbat trombosit. Pembentukan sumbat trombosit terjadi melalui tiga tahap yaitu adhesi trombosit, agregasi trombosit dan reaksi pelepasan. Apabila pembuluh darah luka, maka sel endotel akan rusak sehingga jaringan ikat dibawah endotel akan terbuka. Hal ini akan memulai terjadinya adhesi trombosit yaitu proses dimana trombosit melekat pada permukaan asing terutama serat kolagen. Adhesi trombosit sangat tergantung pada protein plasma yang disebut faktor von Willebrand's (vWF) yang disintesis oleh sel endotel dan megakariosit. Faktor von Willebrand's (vWF) berfungsi sebagai jembatan antara trombosit dan jaringan subendotel. Selain melekat pada permukaan asing, trombosit akan melekat pada trombosit lain, proses ini disebut sebagai agregasi trombosit (Setiabudy,2007).

c. Sistem Pembekuan Darah

Pembekuan darah merupakan suatu proses reaksi kimia yang melibatkan protein plasma, fosfolipid dan ion kalsium (Kiswari, 2014). Teori yang banyak digunakan untuk menerangkan proses pembekuan darah adalah teori *cascade* atau *waterfall* yang dikemukakan oleh Mac Farlane, Davie dan Ratnoff. Menurut teori *cascade* setiap faktor pembekuan darah diubah menjadi bentuk aktif oleh faktor sebelumnya dalam rangkaian enzimatik. Faktor pembekuan beredar dalam darah sebagai prekursor yang akan diubah menjadi enzim apabila telah diaktifkan. Enzim ini akan mengubah prekursor selanjutnya menjadi enzim. Faktor pembekuan darah pertama kali bertindak sebagai substrat dan kemudian sebagai enzim (Setiabudy, 2007).

Faktor pembekuan merupakan komponen penting dalam pembentukan trombus. Faktor koagulasi disintesis terutama pada sel hati. Sebagian besar faktor beredar dalam sirkulasi darah dan berperan dalam proses koagulasi yang diberi tanda dengan angka romawi. Bentuk yang aktif dari faktor enzimatik tersebut ditandai dengan angka romawi yang diikuti dengan akhiran -a, misalnya faktor XII (tidak aktif), XIIa berarti dalam keadaan aktif. Penunjukkan angka romawi tidak menentukan urutan reaksi dalam proses pembekuan (Kiswari, 2014).



Tabel 1. Nomenklatur Faktor Pembekuan Darah

Faktor	Nama	Sinonim/nama lain
I	Fibrinogen	-
II	Prothrombin	-
III	Tissue factor	Tissue Thromboplastin
IV	Ion kalsium	-
V	Proaccelerin	Labile factor
VI	-	-
VII	Proconvertin	Stable factor
VIII	Antihemophile factor (AHF)	Antihemophile globulin (AHG)
IX	Plasma Thromboplastin Component (PTC)	Christmas factor
X	Stuart factor	Prower factor
XI	Plasma Thromboplastin Antecedent (PTA)	Antihemophilic factor C
XII	Hageman factor	Contact factor
XIII	Fibrin Stabilizing Factor (FSF)	Fibrinase Laki lorand factor
-	High Molecular Weight Kininogen (HMWK)	Fitzgerald factor
-	Pre Kallikrein (PK)	Fletcher factor

Sumber : Setiabudy, 2007.

Karakteristik faktor koagulasi dikelompokkan menjadi tiga yaitu, kelompok fibrinogen, kelompok protrombin dan kelompok kontak. Kelompok fibrinogen terdiri dari faktor I, V, VIII dan XIII. Faktor V dan VIII akan menurun kadarnya selama penyimpanan darah *in vitro*. Kelompok prothrombin terdiri dari faktor II, VII, IX dan X. Sintesis semua faktor ini tergantung pada vitamin K. Vitamin K tersedia melalui sumber makanan dan juga dihasilkan oleh bakteri usus. Kelompok ini dihambat oleh warfarin. Kelompok ini dianggap stabil dan tetap terpelihara dalam plasma selama penyimpanan. Kelompok kontak terdiri dari faktor XI, XII, prekallikrein (Faktor Fletcher) dan *High Molecular Weight*

*Kininogen* HMWK (Fitzgerald) yang merupakan faktor faktor yang terlibat dalam jalur koagulasi intrinsik (Kiswari, 2014).

Pembekuan akan terjadi karena adanya cedera vaskuler dalam keadaan homeostasis, diawali dengan vasokonstriksi (penyempitan pembuluh vaskuler) yang merupakan respon langsung terhadap cedera kemudian diikuti oleh adhesi trombosit pada kolagen dinding pembuluh yang terkena cedera. ADP (Adenosin difosfat) dilepaskan oleh trombosit yang menyebabkan mengalami agregasi. Sejumlah kecil trombin juga merangsang agregasi trombosit yang berguna untuk mempercepat reaksi. Faktor III dari membran trombosit juga mempercepat pembekuan plasma yang akan terbentuk sumbat trombosit yang kemudian segera diperkuat oleh protein filamentosa (fibrin). Produksi fibrin dimulai dengan perubahan faktor X menjadi XA, sebagai bentuk aktif faktor X. Faktor X dapat diaktifkan melalui dua jalur reaksi (D'Hiru, 2013).

Jalur intrinsik meliputi fase kontak dan pembentukan aktivator F.X. Aktivasi kontak dimulai oleh perubahan yang disebabkan oleh trauma vaskular. Adanya kontak antara F.XII dengan permukaan asing seperti serat kolagen akan menyebabkan aktivasi F.XII menjadi F.XIIa. Kofaktor *High Molecular Weight Kininogen* (HMWK) F. XIIa akan mengubah prakalikein menjadi kalikrein yang akan meningkatkan aktivasi F.XII. Selain itu

kalikrein akan mengaktifkan F.VII menjadi F.VIIa pada jalur ekstrinsik, mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin pada sistem fibrinolitik, serta mengubah kininogen menjadi kinin yang berperan dalam reaksi inflamasi. Aktivasi F.XII selain mencetuskan pembekuan darah baik jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik, juga menecetuskan 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 ini adalah reaksi non enzimatis antara F.IXa, PF.3, F.VIII dan ion kalsium membentuk kompleks yang mengaktifkan F.X. Walaupun F.IXa dapat mengaktifkan F.X, tetapi dengan adanya PF.3, F.VIII dan ion kalsium maka reaksi ini akan dipercepat (Setiabudy, 2007)

Jalur ekstrinsik koagulasi merupakan jalur yang diawali oleh masuknya tromboplastin jaringan ke dalam sirkulasi darah. Tromboplastin jaringan berasal dari fosfolipoprotein dan membran organel dari sel-sel jaringan yang terganggu. Fosfolipid trombosit tidak diperlukan untuk aktivasi pada jalur ekstrinsik karena faktor jaringan mempunyai pasokan fosfolipid sendiri (Kiswari, 2014). 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

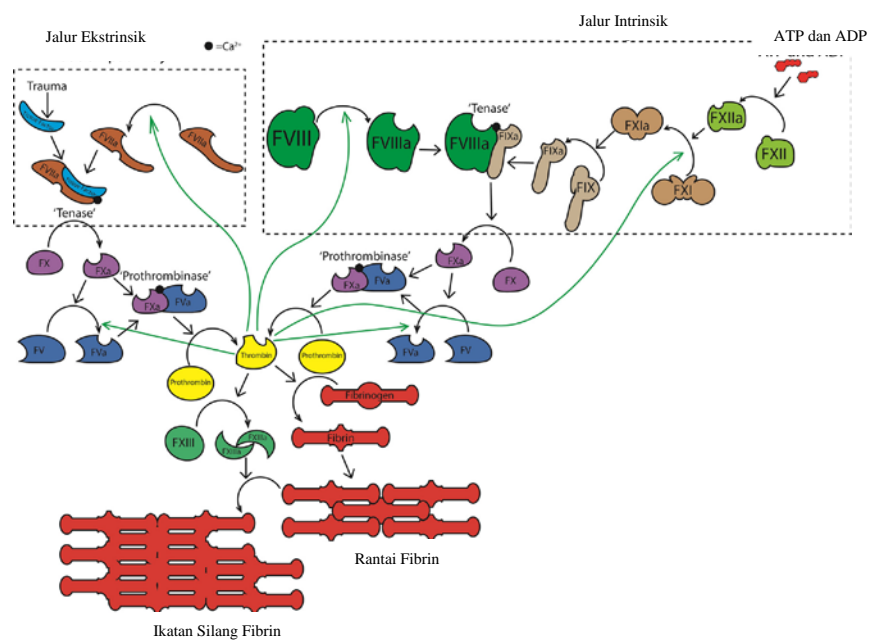
yang luka. Aktivasi F.VII menjadi F.VIIa terbukti dapat terjadi dengan adanya kalikrein. Hal ini membuktikan adanya hubungan antara jalur intrinsik dan ekstrinsik. F.VIIa yang terbentuk akan mengaktifkan F.X menjadi F.Xa (Setiabudy, 2007).

Jalur bersama meliputi pembentukan *prothrombin converting complex* (protrombinase), aktivasi protrombin dan pembentukan fibrin. Reaksi pertama pada jalur bersama adalah terjadi perubahan F.X menjadi F.Xa oleh adanya kompleks yang terbentuk pada jalur intrinsik dan F.VIIa dari jalur ekstrinsik. F.Xa bersama F.V, *platelet factor* (PF. 3) dan ion kalsium akan membentuk *prothrombin converting complex* yang mengubah protrombin menjadi trombin (Setiabudy,2007).

Trombin merupakan enzim proteolitik yang mempunyai beberapa proteolitik yang mempunyai beberapa fungsi yaitu mengubah fibrinogen menjadi fibrin, mengubah F.XIII menjadi F.XIIa, meningkatkan aktivitas F.V dan F.VIII, merangsang reaksi pelepasan dan agregasi trombosit. Reaksi selanjutnya trombin akan mengubah fibrinogen menjadi fibrin monomer (Setiabudy, 2007).

Fibrinogen terdiri dari 3 pasang rantai polipeptida yaitu 2 alfa, 2 beta dan 2 gamma. Trombin akan memecah rantai alfa dan beta pada N-terminal menjadi fibrinopeptida A,B dan fibrin monomer. Fibrin monomer akan mengalami polimerisasi untuk membentuk fibrin polimer. Mula-mula fibrin polimer yang

terbentuk bersifat tidak stabil karena mudah larut oleh adanya set tertentu seperti urea, sehingga disebut fibrin polimer soluble. Adanya F.XIIIa dan ion kalsium, maka fibrin polimer soluble akan diubah menjadi insoluble karena terbentuk ikatan silang antara 2 rantai gamma dari fibrin monomer yang bersebelahan. Aktivasi F.XIII menjadi F. XIIIa terjadi dengan adanya trombin (Setiabudy, 2007).



Gambar 2. Jalur Koagulasi  
Sumber : Campbell, 2020.

d. Hal – hal yang Perlu Diperhatikan pada Pemeriksaan Hemostasis

1) Urutan pengisian tabung

Pengambilan darah dapat dilakukan sekaligus untuk beberapa tabung. Pengambilan sampel ke dalam tabung *vacutainer* sebaiknya dengan urutan sebagai berikut:

- a) Tabung steril untuk kultur
- b) Tabung koagulasi
- c) Tabung untuk mendapatkan serum dengan atau tanpa aktivator pembekuan
- d) Tabung berisi heparin
- e) Tabung berisi EDTA
- f) Tabung inhibitor glikolitik

Pengisian tabung dalam urutan yang salah dapat menyebabkan gangguan dalam pengujian karena terjadi kontaminasi silang dari spesimen, tromboplastin jaringan atau mikroorganisme. Urutan pengisian tabung dimaksudkan untuk meminimalkan terjadinya masalah tersebut (Kiswari, 2014). Pemeriksaan koagulasi sebaiknya menggunakan tabung dengan antikoagulan Natrium sitrat 3,2% (0,109 M) dengan perbandingan 9 bagian darah dan 1 bagian Natrium sitrat, dianjurkan juga untuk memakai tabung urutan kedua untuk menghindari kontaminasi tromboplastin jaringan (Setiabudy, 2007).

## 2) Kontaminasi

Kontaminasi oleh tromboplastin jaringan akan mengaktifkan koagulasi jalur ekstrinsik dan dapat mengganggu tes koagulasi. Tromboplastin jaringan terdapat pada jarum selama proses

pengambilan darah vena dan mengisi tabung terlebih dahulu (Kiswari,2014).

3) Jarum dan Penampung

Dianjurkan memakai semprit plastik dan jarum yang cukup besar, paling kecil nomor 20 (Setiabudy, 2007). Penampung sampel yang digunakan terbuat dari gelas atau plastik yang telah dilapisi silikon lebih dianjurkan untuk mencegah terjadinya aktivasi faktor pembekuan (Setiabudy, 2007).

4) Kontrol

Setiap kali mengerjakan pemeriksaan koagulasi, sebaiknya diperiksa juga satu kontrol normal dan satu kontrol abnormal. Plasma yang dipakai sebagai kontrol tidak boleh ikterik, lipemik maupun hemolisis (Setiabudy, 2007).

5) Penyimpanan dan pengiriman bahan

Pemeriksaan koagulasi sebaiknya segera dikerjakan, karena beberapa faktor pembekuan bersifat labil. Plasma perlu disimpan dalam tempat plastik tertutup dan dalam keadaan beku bila pemeriksaan tidak dapat dilakukn dalam 4 jam setelah pengambilan darah. Plasma sitrat yang akan dikirim disimpan dalam tempat plastik tertutup dan diberi pendingin (Setiabudy, 2007).

#### 6. Pemeriksaan Thrombin Time (TT)

Waktu trombin adalah waktu yang diperlukan trombin untuk mengubah fibrinogen menjadi fibrin. Pemberian trombin ke dalam plasma segera mengubah fibrinogen menjadi fibrin tanpa dipengaruhi oleh faktor koagulasi jalur intrinsik maupun ekstrinsik. Pemeriksaan ini menguji kemampuan atau fungsi fibrinogen dan adanya zat penghambat (inhibitor) terhadap trombin. Trombin adalah enzim proteolitik yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin. (Riswanto, 2013). Masa trombin atau waktu pembekuan trombin (*Thrombin Clotting Time / TCT*) tidak dipengaruhi oleh defisiensi jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik, pemeriksaan *Thrombin Time* (TT) dilakukan untuk menilai fase akhir dari proses pembekuan (Kiswari, 2014).

*Thrombin Time* (TT) atau TCT juga dapat digunakan sebagai uji untuk menilai pengaktifan jalur fibrinolitik, karena pengaktifan jalur fibrinolitik menyebabkan pembebasan plasmin yang memecah fibrin dan fibrinogen, fibrinogen menurun, atau produk penguraian fibrinogen yang dibebaskan akan secara kompetitif menghambat interaksi trombin atau fibrinogen. Produk degradasi fibrinogen yang terdapat dalam sirkulasi inhibisi kompetitif interaksi trombin atau fibrinogen ini dapat menyebabkan pemanjangan waktu trombin (Riswanto, 2013).

Prinsip pemeriksaan ini adalah mengukur lamanya terbentuk bekuan pada suhu 37°C bila ke dalam plasma ditambahkan reagen trombin. Nilai normal tergantung dari kadar trombin yang dipakai. Hasil pemeriksaan TT atau TCT dipengaruhi oleh kadar dan fungsi fibrinogen serta ada tidaknya



inhibitor. TT atau TCT juga dapat memanjang apabila kadar fibrinogen kurang dari 100 mg/dL atau fungsi fibrinogen abnormal atau bila terdapat inhibitor seperti heparin atau FDP (*Fibrinogen Degradation Product*) (Setiabudy,2007).

Pembekuan yang dirangsang oleh trombin terjadi dengan sangat cepat dan tes ini dapat dibakukan untuk mendapatkan nilai normal yang dikehendaki biasanya berkisar 10 – 15 detik. Reagen trombin biasanya terbuat dari plasma lembu, dapat dimasukkan ke dalam plasma penderita untuk mengubah langsung fibrinogen menjadi fibrin (Kiswari, 2014).

Waktu trombin yang lebih dari 25 detik harus dilakukan percobaan ulang dengan menggunakan campuran plasma pasien dengan plasma kontrol normal dengan perbandingan 1:1. Penambahan plasma normal dengan plasma pasien dan campuran tersebut diukur masa trombin, dapat dibedakan apakah hasil masa trombin yang abnormal disebabkan oleh defisiensi fibrinogen atau bukan. Jika hasilnya normal maka kemungkinan dapat terjadi defisiensi fibrinogen. Jika masa trombin pada campuran tersebut hasilnya normal atau memendek hal ini dapat digunakan untuk mengetahui adanya inhibitor koagulasi (Riswanto, 2013).

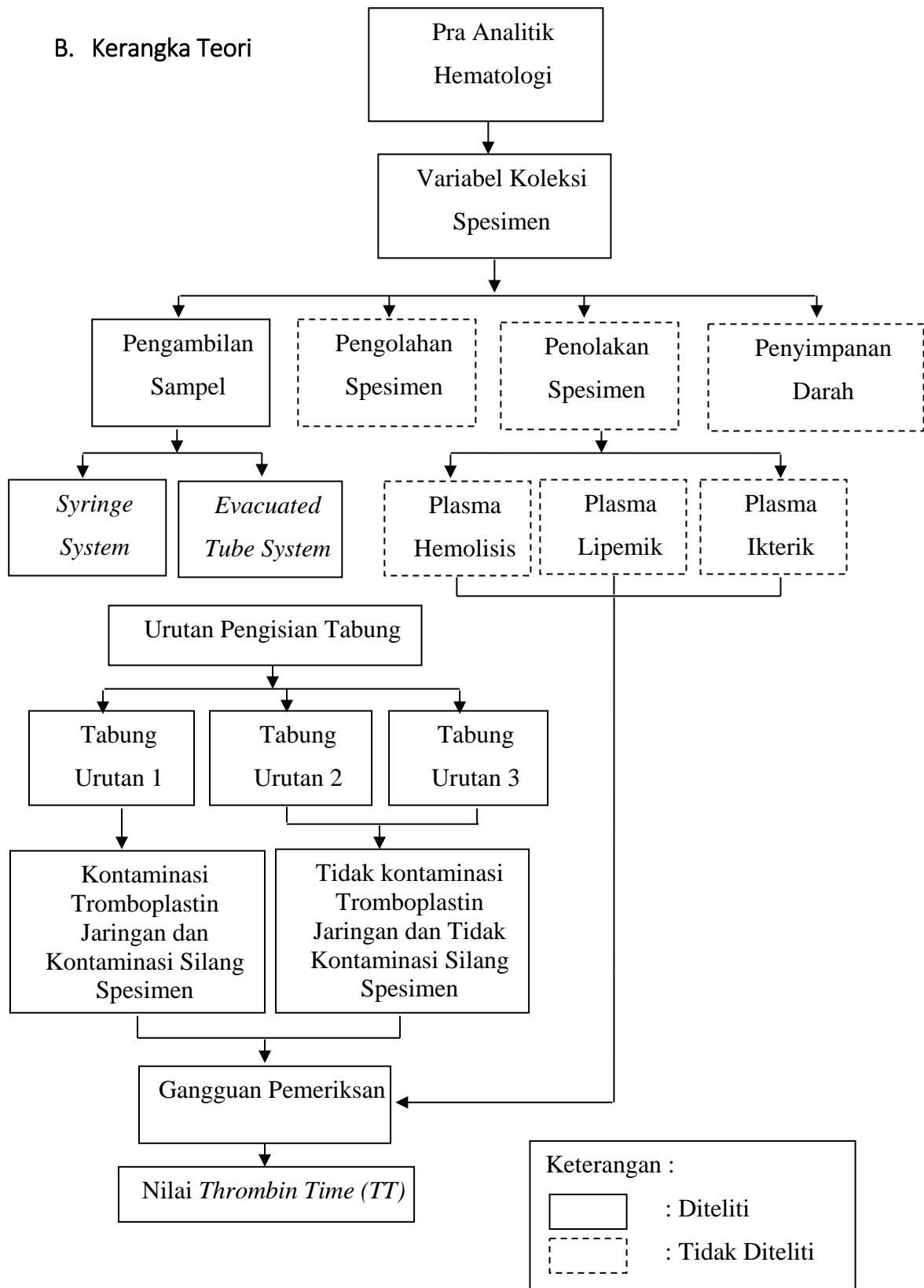
#### 7. Coagulation Analyzer

*Coagulation analyzer* atau *blood coagulation analyzer* merupakan alat yang berfungsi untuk mengukur kuantitas faktor - faktor yang berperan dalam proses hemostasis. Alat ini digunakan untuk mendeteksi kelainan pada pembekuan darah yang berhubungan dengan penyakit

tromboembolitik, trombositopenia, fungsi hati yang buruk, hemofilia, penyakit von willebrand dan kondisi lain serta untuk mengamati efek obat dan efek terapi komponen darah (Mengko, 2013).

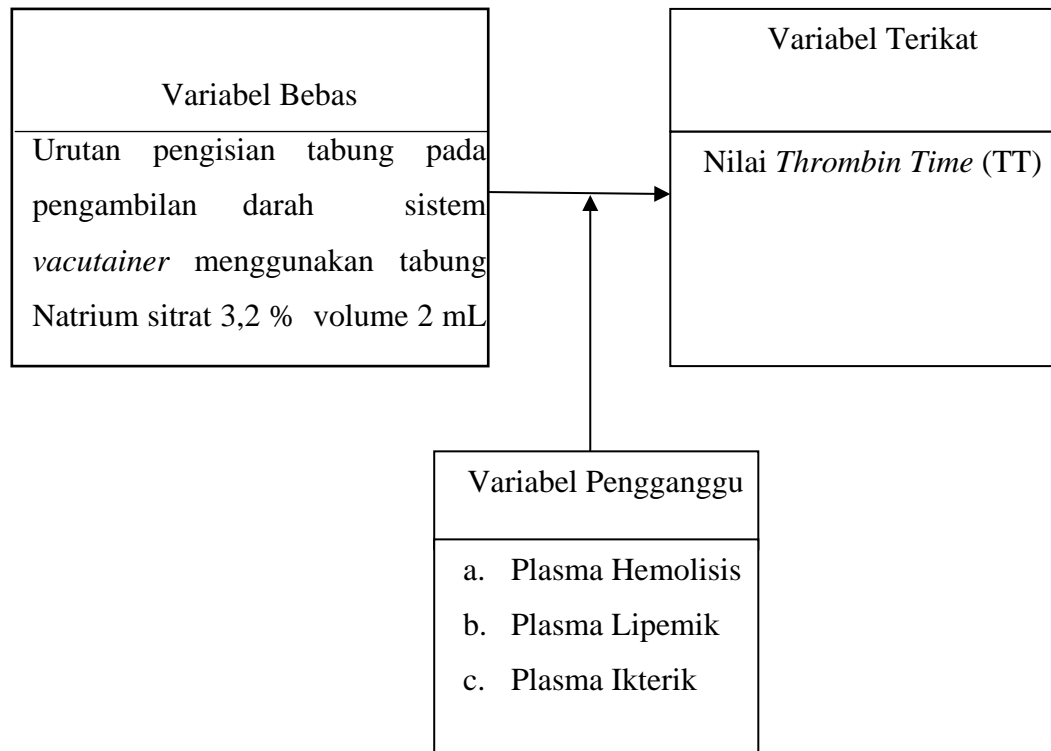
Prinsip kerja alat *coagulation analyzer* dengan deteksi mekanik atau kimia adalah menginkubasi plasma darah dalam jumlah tertentu serta periode waktu tertentu, kemudian dicampur dengan reagen sehingga terbentuk proses pembekuan, yang dideteksi dengan terbentuknya fibrin (Mengko, 2013).

*Coagulation analyzer* yang menggunakan metode deteksi optik (metode cahaya terhambur) pengukuran dilakukan dengan cara campuran antara plasma dan reagen dipaparkan dengan cahaya yang memiliki panjang gelombang 660 nm. Kekeruhan darah selama proses koagulasi dideteksi sebagai perubahan pada intensitas cahaya terhambur. Perubahan intensitas ini digambarkan kurva koagulasi yang sesuai sehingga waktu koagulasi dapat ditemukan yaitu dengan metode deteksi persentase (*percentage detection method*). Cahaya yang terhambur akan diterima oleh fotodiode, kemudian cahaya dikonversikan menjadi sinyal elektrik. Sinyal ini disimpan dan dihitung menggunakan komputer mikro untuk mendapatkan waktu koagulasi (Mengko, 2013).



Gambar 3. Kerangka Teori  
Sumber : Kiswari, 2014.

### C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 4. Hubungan Antar Variabel

### D. Hipotesis

Ada perbedaan nilai TT (*Thrombin Time*) pada tabung Natrium sitrat urutan pengisian pertama, kedua dan ketiga pada pengambilan darah sistem *vacutainer*.