

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Pengambilan Sampel dan Penanganannya

Sampel darah yang digunakan untuk pengujian kreatinin biasanya diambil melalui vena, dan proses pengolahan serta penyimpanan sampel ini sangat mempengaruhi hasil akhir pengujian. Salah satu aspek yang perlu diperhatikan adalah penggunaan tabung pengumpul darah yang mengandung antikoagulan, seperti *lithium heparin* (Sebayang, dkk 2020). *Lithium heparin* digunakan untuk mencegah pembekuan darah, sehingga memungkinkan plasma atau serum untuk tetap terpisah dari sel darah merah selama proses sentrifugasi. Pengambilan sampel darah yang cepat dan pengolahan yang tepat sangat penting untuk menjaga keakuratan hasil pengujian. Pemisahan plasma dari sel darah dilakukan paling lambat 2 jam setelah pengambilan spesimen (Permenkes 2013). Semakin lama waktu penundaan akan terjadi proses perubahan morfologi sel darah merah. Akibatnya, hasil pemeriksaan yang diperoleh tidak akurat (Aryani, 2021). Penundaan dalam proses pengolahan sampel, seperti menunda sentrifugasi selama beberapa jam setelah pengambilan darah, dapat mempengaruhi stabilitas biomarker dalam darah.

2. Tahap Pemeriksaan Laboratorium Klinik

a. Tahap pra analitik

Tahap pra analitik merupakan tahap persiapan awal, dimana tahap ini sangat menentukan kualitas sampel yang akan dihasilkan dan dapat mempengaruhi proses kerja berikutnya.

Menurut Permenkes (2013) tahap pra analitik meliputi:

1) Formulir permintaan pemeriksaan

Formulir permintaan pemeriksaan berisi identitas pasien secara jelas, mulai dari identitas pengirim (dokter, laboratorium, dll), nomor lab, tanggal pemeriksaan dan permintaan pemeriksaan.

2) Persiapan pasien

Pasien harus dipersiapkan dengan baik sesuai dengan persyaratan pengambilan spesimen untuk setiap pemeriksaan laboratorium.

3) Pengambilan dan penerimaan spesimen

Pengambilan spesimen harus dilakukan secara benar dengan memperhatikan waktu, lokasi, volume, cara, peralatan, wadah, spesimen, pengawet atau antikoagulan yang sesuai dengan persyaratan pengambilan spesimen.

4) Penanganan spesimen

Pengolahan spesimen dilakukan sesuai persyaratan dengan memperhatikan kondisi penyimpanan yang tepat,

penanganan spesimen untuk pemeriksaan khusus dan kondisi pengiriman spesimen yang sesuai.

5) Persiapan sampel untuk Analisa

Sampel yang akan dianalisa harus memenuhi persyaratan, volume memenuhi dan identifikasi sampel harus jelas.

b. Tahap analitik

Tahap analitik merupakan tahap pengerjaan pengujian sampel sehingga diperoleh hasil pemeriksaan. Tahap analitik meliputi:

- 1) Persiapan reagen
- 2) Pipetasi reagen atau sampel
- 3) Inkubasi
- 4) Pemeriksaan
- 5) Pembacaan hasil

c. Tahap pasca analitik

Tahap pasca analitik adalah usaha pengendalian faktor kesalahan pada data keluaran hasil pemeriksaan. Tahap pasca analitik meliputi:

- 1) Cara pencatatan hasil
- 2) Cara menegakkan diagnosis dari hasil pemeriksaan
- 3) Cara pelaporan
- 4) Keselamatan kerja

3. Tabung *Lithium Heparin* dan Pengaruhnya terhadap Hasil Pengujian

Antikoagulan adalah aditif yang menghambat darah dan/atau plasma dari pembekuan memastikan bahwa konstituen yang akan diukur tidak berubah secara signifikan sebelum proses analitis (Kiswari, 2014). Tabung vakum adalah tabung reaksi hampa udara yang terbuat dari kaca atau plastik, apabila dilekatkan pada jarum, darah akan mengalir masuk ke dalam tabung dan berhenti mengalir ketika sejumlah volume tertentu telah tercapai. Heparin digunakan sebagai antikoagulan *in vitro* dan *iv vivo* yang bertindak sebagai zat yang menonaktifkan faktor pembekuan darah, trombin (Turgeon, 2012). Heparin bertindak sebagai antikoagulan dengan menciptakan kompleks dengan antitrombin III. Kompleks ini menghambat trombin dan faktor X yang diaktifkan untuk mencegah koagulasi (Dickinson, 2013).



Gambar 1. *Vacutainer Lithium Heparin*
Sumber : Thomas Scientific, 2018

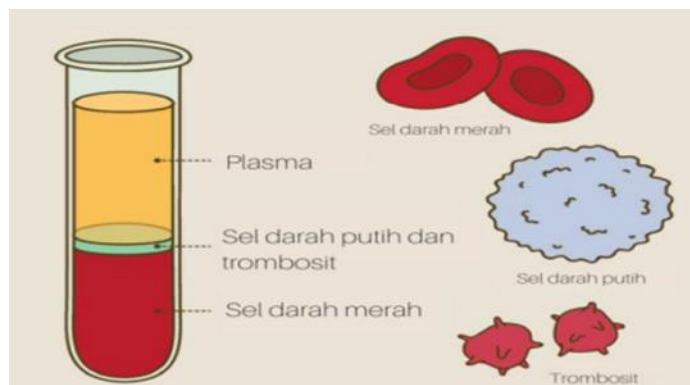
Lithium heparin adalah antikoagulan yang umum digunakan dalam pemeriksaan kimia darah (Kokasih, 2016). *Lithium heparin* tidak boleh digunakan untuk spesimen yang digunakan menguji kadar *lithium*. Heparin sodium adalah mukopolisakarida alami yang sebagian besar tersusun oleh sekuens dari disakarida trisulfat: L-iduronic acid-2-sulfate-D-glucosamine-N, 6-disulfate (Bioberica, 2006). Heparin sodium tidak boleh digunakan untuk spesimen yang digunakan untuk menguji kadar natrium (Kiswari, 2014). Amonium heparin adalah garam ammonium glikosaminoglikans sulfat yang hadir sebagai campuran molekul heterogen dari sifat mukopolisakarida campuran yang bervariasi dalam molekul. Ammonium heparin tidak boleh digunakan untuk mengukur ammonia dan kreatinin (Turgeon, 2012).

Tabung yang mengandung *Lithium Heparin* sering digunakan dalam pengumpulan sampel darah untuk pemeriksaan analisa kimia darah, pemeriksaan kadar ureum, pemeriksaan enzim AST, pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit dan kreatinin. Heparin bertindak sebagai antikoagulan yang mencegah pembekuan darah dengan menghambat faktor pembekuan tertentu, memungkinkan pemisahan plasma dari sel darah tanpa terjadinya koagulasi. Hal ini menjadikan *lithium heparin* tabung pilihan yang sering digunakan dalam laboratorium klinik, terutama untuk analisis yang membutuhkan plasma atau serum. Meskipun penggunaan *lithium heparin* dapat mencegah pembekuan darah, penundaan dalam pemrosesan sampel

darah dapat menyebabkan perubahan dalam komposisi darah. Misalnya, sel darah dapat mulai rusak dan melepaskan enzim atau metabolit ke dalam plasma yang dapat mempengaruhi kadar biomarker yang diukur, termasuk kreatinin.

4. Plasma

Plasma adalah supernatan darah yang hampir bebas dari sel yang mengandung antikoagulan dan diperoleh setelah sentrifugasi (WHO, 2002). Darah yang ditambah dengan antikoagulan tidak akan terjadi pembekuan dan darah akan tetap cair. Darah tersebut setelah didiamkan beberapa menit atau setelah dilakukan sentrifugasi akan terpisah menjadi tiga bagian yaitu plasma yang berada dilapisan atas berupa cairan berwarna kuning, *buffycoat* yang berada di lapisan tengah berupa lapisan tipis sel leukosit dan trombosit serta eritrosit yang berada di lapisan bawah (Riswanto, 2013).



Gambar 2. Komponen Darah
Sumber : Gunawan,2020.

Plasma masih mengandung fibrinogen, tidak mengandung faktor pembekuan II, V, VIII, tetapi mengandung serotonin tinggi. Dengan penambahan antikoagulan mencegah terjadinya pembekuan darah (Guder, 2009). Didalam darah 55% senyawa penyusunnya adalah plasma. Pada manusia, plasma darah tersusun atas 91% air, 7% sisa-sisa metabolisme dan sisanya berupa sari-sari makanan serta garam-daram mineral (Arifin, 2022). Menurut Mathew (2023) komposisi plasma terdiri dari beberapa penyusun diantaranya ada zat koagulan yang utamanya adalah fibrinogen yang berperan dalam koagulasi.

Tampilan sampel plasma hemotik, plasma ikterik dan plasma lipemik berpotensi mengganggu pemeriksaan (WHO,2002).

a. Plasma Hemolisis

Plasma hemolisis ditandai dengan lapisan berwarna merah muda sebagai akibat dari kekuatan dinding eritrosit (Kiswari, 2014). Hemolisis dapat terjadi akibat kesalahan dalam penanganan tabung setelah pengambilan darah (Lieseke dan Zeibig, 2017). Hemolisis fisik disebabkan oleh penghancuran eritrosit oleh hipotonisitas serta penurunan atau peningkatan tekanan, zat yang mencemari juga dapat menyebabkan hemolisis in-vitro (WHO, 2002).

b. Plasma ikterik

Plasma ikterik tampak berwarna kuning gelap atau kehijauan pada bagian darah yang cair dimana sering berkolerasi dengan kadar total bilirubin yang tinggi (Lieseke dan Zeibig, 2017). Bilirubin mengganggu sistem pengujian berbasis oksidase/peroksidase, bilirubin bereaksi dengan H_2O_2 yang terbentuk dalam sistem pengujian menyebabkan hasil lebih rendah secara sistematis dalam prosedur enzimatik yang digunakan untuk pengukuran kreatinin (WHO, 2002).

c. Plasma Lipemik

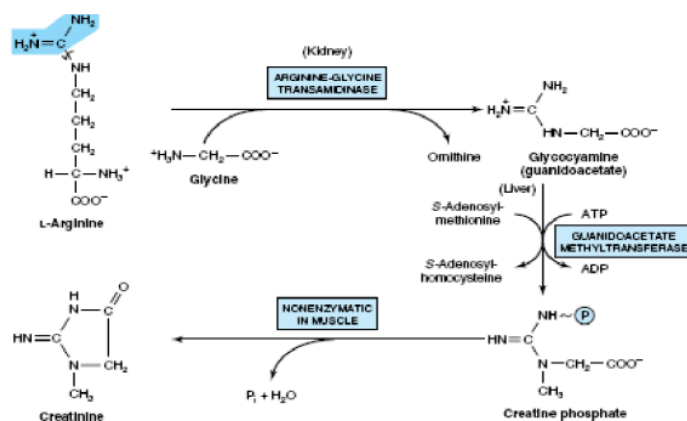
Lipemik terjadi akibat peningkatan konsentrasi trigliserida dalam plasma/serum karena asupan makanan dan perubahan metabolisme lipid. Lipemia mengganggu pengukuran fotometrik dengan hamburan cahaya dan penyerapan cahaya (WHO, 2002). Plasma lipemik berwarna putih susu karena hiperlipidemia (peningkatan kadar lemak dalam darah) atau adanya kontaminasi bakteri.

5. Kreatinin

Kreatinin adalah produk sampingan dari metabolisme otot yang dihasilkan secara konstan oleh tubuh. Proses pembentukan kreatinin dimulai dengan fosfokreatin di otot, yang kemudian terdegradasi menjadi kreatinin dan dibuang melalui ginjal (Lum dkk, 2020). Nilai normal kadar kreatinin pada wanita adalah 0,6 – 1,1 mg/dl

sedangkan pada laki-laki adalah 0,7 – 1,3 mg/dl (DiaSys). Proses pembentukan kreatinin dimulai dengan fosfokreatin di otot, yang kemudian terdegradasi menjadi kreatinin dan dibuang melalui ginjal. Kreatinin diproduksi dalam jumlah yang relatif stabil dan sebagian besar dikeluarkan dari tubuh melalui urine. Kadar kreatinin dalam darah sering digunakan sebagai indikator utama untuk menilai fungsi ginjal. Peningkatan kadar kreatinin dalam darah dapat menunjukkan gangguan pada fungsi ginjal, karena ginjal yang tidak berfungsi dengan baik akan mengalami kesulitan dalam menyaring kreatinin dari darah.

Pembentukan kreatinin dimulai dengan transamidinasi dari arginin menjadi glisin membentuk asam guanidoasetat (GAA). Reaksi tersebut terjadi terutama di ginjal, GAA diangkut ke hati dan dimetilasi oleh S-adenosil metionin untuk membentuk kreatin. Kreatin memasuki sirkulasi dan 90% digunakan dan disimpan oleh jaringan otot. Dalam reaksi yang dikatalisis oleh kreatin fosfokinase sebagian besar kreatin otot mentransfer ikatan fosfat energi tinggi dari ATP menjadi kreatin fosfat.



Gambar 3. Biosintesis Kreatin dan Kreatinin

Sumber: Murray, 2003.

6. Metode pemeriksaan Kreatinin

Pada penelitian ini pemeriksaan kadar kreatinin dilakukan menggunakan metode Jaffe. Prinsip pemeriksaan kreatinin yaitu kreatinin akan bereaksi dengan asam pikrat dalam suasana basa membentuk kompleks warna kuning-oranye, kompleks warna yang terbentuk dibaca secara kolorimetri pada panjang gelombang 500-560 nm. (Kee, 2007). Reaksi Jaffe akan efektif jika terjadi pada pH 10,0 – 11,7 (Rustini, 2015).

Reaksi:

Kreatinin + asam pikrat $\rightarrow$ kreatinin pikrat kompleks

Keuntungan dari reaksi Jaffe adalah sederhana dan penggunaannya mendapat dukungan klinisi secara luas selama bertahun-tahun. Kerugian dari reaksi Jaffe adalah gangguan yang signifikan dari senyawa-senyawa selain kreatinin.

Menurut Turgeon (2012) Kromogen non-kreatinin yang bereaksi dengan reaksi Jaffe meliputi:

a. Protein

Reaksi Jaffe terganggu dengan keberadaan protein dan beberapa bentuk degradasinya. Albumin adalah protein utama yang disintesis oleh hati dan bersirkulasi dalam darah (Turgeon, 2012). Penggunaan asam pikrat dengan konsentrasi dikisaran 5-20 mmol/l (90-360 mg/dL) mencegah albumin bereaksi dengan pikrat menghasilkan kromogen non kreatinin (Spencer, 1986). Kecepatan reaksi antara protein dengan pikrat tidak menjadi cepat pada waktu 80-100 detik setelah pencampuran. Peningkatan spesifisitas uji kinetik dicapai dengan memilih waktu pengukuran 20-80 detik (Burtis, 2012). Untuk mengatasi hasil yang tinggi palsu konsentrasi asam pikrat yang digunakan sebesar 20 mmol/l dengan interval pembacaan dilakukan pada waktu 60 detik setelah pencampuran.

b. Glukosa

Senyawa yang memiliki gugus metilen aktif memiliki potensi untuk bereaksi dengan pikrat, hal tersebut terjadi pada sampel yang terkandung aseton dan glukosa. Konsentrasi glukosa 60-90 mmol/L (1080-1620 mg/dL) dapat mengurangi pengukuran kadar sebanyak 30% (Burtis,2012).

c. Piruvat

Selama penyimpanan, glukosa dalam sampel mengalami proses glikolisis menghasilkan asam piruvat yang menjadi pengganggu pemeriksaan kadar kreatinin (Pahwa, 2015). Pemisahan serum dari komponen seluler yang tertunda menyebabkan peningkatan hasil kreatinin karena akumulasi piruvat dengan reaksi Jaffe.

d. Keton

Keton yang berasal dari pemecahan lipid meningkat untuk memenuhi kebutuhan energi akibat penurunan pemanfaatan karbohidrat seperti diabetes, kelaparan dan muntah. Interferensi asetoasetat bervariasi dari peningkatan yang dapat diabaikan hingga peningkatan 3,5 mg/dl (310 $\mu\text{mol/L}$) pada konsentrasi kreatinin yang tampak pada konsentrasi asetoasetat 144mg/dL (Burtis, 2012). Keton bereaksi cepat dengan kreatinin pikrat dalam 20 detik setelah pencampuran reagen dan sampel menyebabkan hasil tinggi palsu (Burtis, 2012).

e. Konsentrasi Natrium Hidroksida

Konsentrasi natrium hidroksida adalah sejumlah mmol natrium hidroksida dalam liter. Natrium hidroksida (NaOH) digunakan sebagai pengatur pH yang kestabilannya kurang tahan terhadap perubahan suhu sehingga dapat mempengaruhi

hasil reaksi (Rustini, 2015). Natrium hidroksida meningkatkan laju pembentukan kompleks berwarna dan mempercepat kerusakan. Pada konsentrasi diatas 9000 mg/dL, terjadi penurunan kompleks berwarna menyebabkan hasil rendah palsu. Konsentrasi diatas 3600 mg/dL meningkatkan absorbansi dengan hasil kreatinin tinggi palsu (Burtis, 2012).

Zat pengganggu lain pada metode Jaffe adalah guanidin, hemoglobin F dan sefalosporin. Laju pembentukan kompleks jaffe dan absorptivitas kompleks bergantung pada suhu, dengan perbedaan terukur yang teramati antara 25°C sampai 37°C, akibatnya kontrol suhu merupakan komponen penting dalam reproduktifitas pengujian (Burtis, 2012).

7. Penyimpanan Sampel Terhadap Kadar Kreatinin

Stabilitas sampel serum dan plasma heparin pemeriksaan kreatinin pada suhu 4 – 25°C mencapai 7 hari menurut leaflet reagen DiaSys. Beberapa faktor yang menyebabkan penyimpanan analit kreatinin meningkatkan hasil akibat tidak spesifiknya metode Jaffe oleh gangguan piruvat, asam askorbat, protein, glukosa (Turgeon, 2012), suhu (Pahwa, 2015) dan pH (Hosten, 1990). Penggunaan NaOH sebagai pengatur pH memiliki beberapa kelemahan yakni kestabilan pH yang kurang tahan terhadap perubahan suhu dapat mempengaruhi hasil reaksi pada kadar tertentu. Kontaminasi bakteri pada sampel yang disimpan terlalu lama akan mendapatkan hasil

kreatinin rendah palsu. Mekanisme timbulnya gangguan ini akibat pertumbuhan bakteri yang dapat memperlambat laju reaksi Jaffe (Newman, 1999). Bakteri penghasil asam laktat merupakan salah satu bakteri yang cenderung tertarik pada habitat yang mengandung glukosa dan bakteri ini akan memfermentasikan senyawa tersebut menjadi asam laktat (Hasan, 2006).

8. Proses Sentrifugasi dan Dampaknya terhadap Kadar Kreatinin

Sentrifugasi adalah proses pemisahan komponen-komponen darah menggunakan gaya sentrifugal. Pada proses ini, darah akan diputar dalam tabung centrifuge dengan kecepatan tinggi, yang menyebabkan pemisahan antara plasma atau serum dengan sel-sel darah. Pada prinsipnya sentrifugasi memanfaatkan percepatan sentripetal sehingga menyebabkan zat padat terpisah sepanjang arah radial (bagian bawah tabung). Jika perputaran semakin cepat maka akan semakin banyak sedimen atau endapat yang terbentuk (Noer dan Ritonga, 2021).

Proses sentrifugasi umumnya dilakukan segera setelah pengambilan sampel untuk memastikan bahwa plasma atau serum yang digunakan dalam pengujian adalah komponen darah yang tidak tercampur dengan sel darah merah, yang dapat mengandung zat-zat yang mempengaruhi hasil pengujian. Sampel darah dapat tertunda dalam pengolahannya, seperti ketika waktu sentrifugasi tidak dilakukan segera setelah pengambilan darah. Penundaan ini dapat menyebabkan

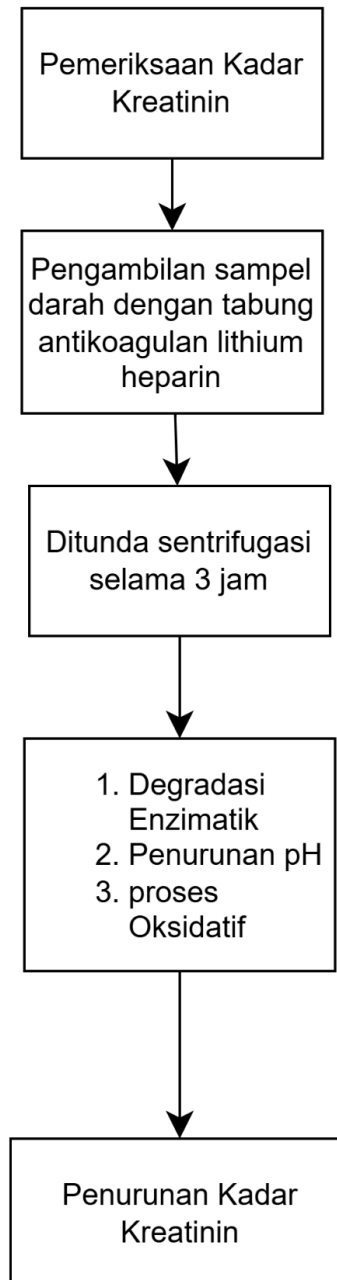
reaksi kimia atau perubahan fisik dalam sampel, seperti degradasi komponen darah atau perubahan interaksi antar sel darah dan plasma (Chikomba dkk, 2020). Dalam kadar kreatinin, penundaan dalam pemrosesan sampel dapat mempengaruhi konsentrasi kreatinin yang terukur, baik karena perubahan komponen darah atau karena perubahan kimiawi dalam sampel yang tertunda (Azizah,2023).

9. Faktor yang Mempengaruhi Kadar Kreatinin

Peningkatan kadar kreatinin menunjukkan indikasi penyakit ginjal atau kerusakan nefron lebih dari 50% (Soewoto, dkk., 2001). Kadar kreatinin yang rendah berkaitan dengan massa otot yang rendah seperti pada wanita dan seseorang dengan penyakit kronis, malnutrisi akibat asupan protein yang rendah membatasi pembentukan kreatinin, wanita hamil (terjadi peningkatan laju filtrasi glomerulus ginjal), penyakit hati lanjut menyebabkan berkurangnya produksi kreatinin akibat penurunan sintesis hati dan juga pada kondisi tubuh dengan kelebihan cairan. Kadar kreatinin yang tinggi akibat dari aktifitas fisik yang berlebih seperti olahraga karena terjadi peningkatan pemecahan fosfokreatin yang terdapat didalam otot sebagai cadangan energi tubuh (Guyton, 2014). Diet kaya daging atau mengonsumsi suplemen kaya kreatin dapat meningkatkan konsentrasi kreatin intramuskular sehingga meningkatkan performa dan adaptasi tubuh atlet saat latihan (Kreider, 2017). Kreatin meningkat setelah asupan makanan kaya daging meskipun fungsi ginjal normal, karena proses pemasakan daging

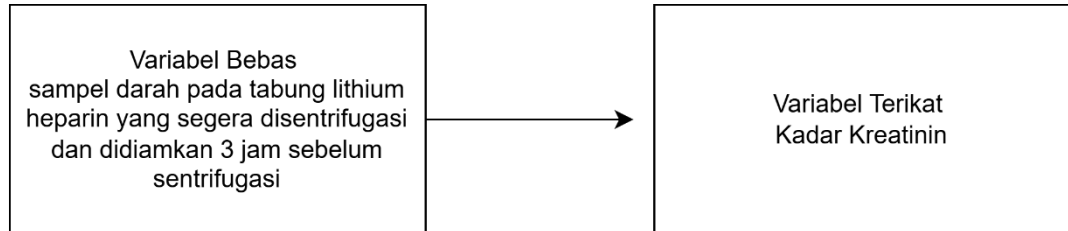
mengkonversi kreatin menjadi kreatinin (Rustini, 2015). Pengaruh obat-obatan (vitamin c, sefalosporin, aldedon, aspirin dan co-trimexazole), dan seseorang dengan usia lanjut memiliki keterbatasan fungsi organ ginjal. Beberapa faktor dapat mempengaruhi kadar kreatinin dalam sampel darah, termasuk metode pengambilan darah, jenis tabung yang digunakan, waktu penundaan sebelum pengolahan, serta suhu penyimpanan sampel. Penundaan dalam pengolahan sampel dapat menyebabkan degradasi atau perubahan dalam komponen darah yang mempengaruhi kadar kreatinin yang terukur (Ruslin,2020).

B. Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 5. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis Penelitian

Terdapat perbedaan hasil kadar kreatinin pada plasma *Lithium Heparin* yang segera disentrifugasi dan ditunda sentrifugasi selama 3 jam