

616.135
SOT
u ci.



**UJI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN
SEDIAAN APUS DARAH TEPI
DALAM MENILAI
FUNGSI AGREGASI TROMBOSIT**

OLEH : SOTIANINGSIH

**PPDS-1 PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
RSUP DOKTER KARIADI
SEMARANG
2001**

UPT-PUSTAK-UNDIP

**UJI DIAGNOSTIK
PEMERIKSAAN SEDIAAN APUS DARAH TEPI
DALAM MENILAI FUNGSI AGREGASI TROMBOSIT**

**KARYA ILMIAH AKHIR
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS -1
PATOLOGI KLINIK**

**PADA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

Oleh : SOTIANINGSIH


**Karya ilmiah akhir ini telah dipertahankan
di hadapan tim penguji PPDS-1 Patologi Klinik FK UNDIP Semarang
pada tanggal 16 Agustus 2001
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Pembimbing II



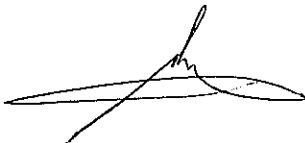
Dr. Purwanto AP SpPK
NIP 131252963

Pembimbing I



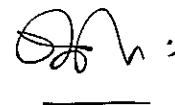
Dr. AP Pradana SpPK-KH
NIP 130219409

**Ketua Program Studi
Patologi Klinik FK UNDIP**



Dr. Lisyani Suromo SpPK (K)
NIP 130354869

**Kepala Bagian
Patologi Klinik FK UNDIP**



Dr. Purwanto AP SpPK
NIP 131252963

ABSTRACT

Background : Platelet has an important role in hemostasis. This role may depends either on its count or its function. One of the commonly required to evaluate platelet function is the Platelet Aggregation Tests (nephelometric method), but this test is quite expensive at present time and has not been done by many clinical laboratories. Due to this reason, a cheaper platelet function test which requires no special equipment will be investigated by means of peripheral blood smear.

Objective : This investigation is intended to introduce another diagnostic value for aggregation function, ie: peripheral blood smear which is more simple, cheaper and applicable in remote rural country medical centres (Puskesmas). In this investigation the sensitivity, specificity, positive and negative predicted value were analysed.

Material and method : Adrenalin 3 μ M as an inductor for aggregation is added in 3,8% sodium citrate anticoagulated venous blood. Blood smear being made prior to and 3 seconds post adrenalin induction. Evaluation of platelet clumps focused at the medial, lateral and mediolateral areas within zone VI. The number of platelet clumps are compared to the total number of platelets. Velaskar's formula is used to obtain the final results. The results of 65 samples obtained by blood smear are compared to that by the nephelometric method. From the points of Receiver Operator Curve (ROC) show the cut off of hypoaggregation, normoaggregation and hyperaggregation. After identifying the cut off of hypoaggregation-normoaggregation and hyperaggregation-normoaggregation, the diagnostic test is analyzed.

Results : The results show that the bottom limit of normoaggregation is 54 % and the highest is 70 %. A diagnostic test of platelet aggregation by blood smear compared to the one by nephelometric method is indicated to determine whether it's hypoaggregation or not, has 73.33 % sensitivity , 86.00 % specificity , 61.11 % positive predicted value and 91.49 % negative predicted value. While the test used to determine normoaggregation or not, has 57.89 % sensitivity, 60.42% specificity, 39.29 % positive predicted value and 78.38 % negative predicted value. To determine hyperaggregation or not, the test has 64.52% sensitivity, 74.29%

specificity, 69.97 % positive predicted value and 70.27% negative predicted value. Correlation test of blood smear and nephelometric method has $r=0,463$; $p=0,000$ ($p<0,01$). Paired t test has $p=0,357$ ($p>0,05$)

Conclusions : The blood smear for platelet aggregation test can be used as a substitution test for the nephelometric method.

Key words: Platelet Aggregation Test, nephelometric, blood smear

ABSTRAK

Latar belakang : Trombosit mempunyai peran penting pada pembentukan sumbat hemostasis. Penilaian trombosit meliputi jumlah dan fungsi. Metoda untuk pemeriksaan fungsi agregasi trombosit yang banyak dilakukan saat ini adalah TAT metoda nefelometrik, namun tidak semua laboratorium dapat mengerjakannya. Untuk mengatasi hal tersebut dilakukan percobaan pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit yang dapat dikerjakan di semua laboratorium, tidak memerlukan alat khusus dan murah.

Tujuan : mengetahui kesesuaian hasil dan nilai diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik yang meliputi sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan nilai ramal negatif.

Bahan dan metoda : Dilakukan pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik dari 65 subyek yang ada. Antikoagulan yang digunakan Natrium citrate 3,8 %. Sediaan apus dibuat sebelum dan setelah 3 menit pemberian induktor adrenalin $3\mu\text{M}$. Penilaian fungsi agregasi trombosit berdasarkan pembacaan pada zone VI daerah medial, lateral dan mediolateral. Dihitung banyaknya trombosit yang berkelompok dibandingkan total trombosit. Hasil yang didapat dimasukkan ke rumus Velaskar. Hasil pemeriksaan sediaan apus dibandingkan dengan hasil TAT metoda nefelometrik dan dicari batas hipoagregasi, normoagregasi dan hiperagregasi dengan bantuan titik-titik kurva ROC. Dari hasil yang didapat dilakukan uji korelasi, uji beda t berpasangan dan uji diagnostik antara pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik.

Hasil penelitian : Didapatkan hasil batas bawah normoagregasi 54% dan batas atas normoagregasi 70%. Pada uji korelasi antara pembaca I dan TAT metoda nefelometrik didapatkan $r=0,463$; $p=0,000$ ($p<0,01$) dan pada uji beda t berpasangan didapatkan $p=0,357$ ($p>0,05$). Uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik untuk menentukan hipoagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas 73,33%, spesifisitas 86,00%, nilai ramal positif 61,11% dan nilai ramal negatif 91,49%. Sedang untuk menentukan normoagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas 57,89%, spesifisitas 60,42%,

nilai ramal positif 39,29% dan nilai ramal negatif 78,38%. Untuk menentukan hiperagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas 64,52%, spesifisitas 74,29%, nilai ramal positif 68,97% dan nilai ramal negatif 70,27%.

Kesimpulan : Metoda sediaan apus darah tepi dapat dipakai untuk menilai fungsi agregasi trombosit seperti halnya TAT metoda nefelometrik.

Kata kunci : tes agregasi trombosit, nefelometrik, sediaan apus.

RIWAYAT HIDUP

Nama : Sotianingsih

Alamat : Jl. Pekunden Timur V no 14 Semarang

Tempat dan tanggal lahir : Tegal, 23 Februari 1966

Agama : Katholik

Nama orang tua : Alm. Haryanto dan Sulistiowati

Status perkawinan : Kawin

Suami : Samsirun Halim

Anak : 1. Jonathan Alvin Nugraha Halim
2. Stefanie Natalia Halim
3. Paulus Billy Kurniawan Halim

Riwayat pendidikan : Lulus SD Pius di Tegal, 1978
Lulus SMP Pius di Tegal, 1981
Lulus SMA Loyola di Semarang, 1984
Lulus FK UNDIP di Semarang, 1991

KATA PENGANTAR

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kepada Allah SWT karena hanya berkat dan rahmatNya saya dapat menyelesaikan tulisan ini sebagai karya akhir dalam rangka penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran UNDIP, RSUP dr Kariadi Semarang.

Sehubungan dengan selesainya karya akhir saya, perkenankan dengan tulus hati kami mengucapkan rasa terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada dr.AP Pradana SpPK-KH selaku pembimbing karya akhir ini yang telah banyak memberikan perhatian, dukungan, bimbingan dan waktunya. Terima kasih yang dalam kepada dr. Purwanto AP SpPK selaku pembimbing dan Ketua Bagian Patologi Klinik FK UNDIP yang tidak henti-hentinya memberikan motivasi dan dukungan.

Rasa terima kasih dan penghargaan juga kami haturkan kepada :

1. Dr. Lisyani Suromo SpPK(K) selaku Ketua Program Studi PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP dan guru yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk membuat dan menyelesaikan karya akhir dan pendidikan kami.
2. Dr. Latijani Djamil SpPK(K) selaku Kepala Instalasi dan guru kami yang telah memberikan kami kesempatan menimba banyak ilmu selama pendidikan
3. Prof. DR. Dr. Ag. Soemantri Hardjojuwono SpA(K) yang telah menguji dan memberikan masukan yang amat berguna

4. Dr. MI Tjahjati SpPK guru kami yang telah banyak memberikan perhatian, dukungan dan bantuan yang tak ternilai besarnya untuk menyelesaikan karya akhir ini.
5. Dr. Affandi Ichsan SpPK(K) guru kami yang telah memberikan perhatian, gagasan dan dukungan demi selesainya karya akhir ini
6. Dr. Sabardiman SpPK(K) yang dengan tulus hati memberi kekuatan batin selama menempuh pendidikan
7. Dr. Imam Budiwiyono SpPK guru kami yang telah memberikan perhatian, gagasan dan dukungan demi selesainya karya akhir ini
8. Dr. Banundari Rachmawati SpPK guru kami yang telah memberikan masukan untuk perbaikan karya akhir ini
9. Dr. Anggoro DB Sachro DTM&H, SpA (K), dekan FK UNDIP atas kesempatan yang diberikan sehingga kami dapat menyelesaikan karya akhir dan pendidikan kami
10. Dr. H. Gatot Suharto M Kes MMR, direktur RSUP dr. Kariadi atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan sehingga kami dapat menyelesaikan karya akhir dan pendidikan kami
11. Dr. Hertanto Wahyu Subagio MS yang tanpa pamrih telah memberikan perhatian dan bantuan terutama dalam hal metodologi penelitian
12. Sr. Ignace Marie OSF, dr. Astronia SpPK dan seluruh karyawan laboratorium Rumah Sakit St Elisabeth Semarang yang telah banyak memberi dukungan, kesempatan dan bantuan

13. Dr. Wahyu Rochadi MSc dan segenap Staf Clinical Epidemiology and Biostatistics Unit FK UNDIP Semarang yang memberi masukan tentang metodologi penelitian
14. Seluruh staf Instalasi Patologi Klinik RSUP dr Kariadi pada umumnya dan ibu Sulistioningsih khususnya yang telah banyak berjasa selama pendidikan dan pembuatan karya akhir ini
15. Dr. Budi Mulyono SpPK dan dr. Usi Sukorini SpPK bagian Patologi Klinik UGM Yogyakarta yang telah memberi masukan tentang penelitian pemeriksaan sediaan apus untuk menilai fungsi agregasi trombosit
16. Seluruh karyawan laboratorium Prodia yang memberikan keterangan dan bantuannya
17. Semua teman residen Patologi Klinik yang banyak memberikan motivasi, dukungan dan bantuan
18. Suami dan anak-anak saya tercinta yang telah banyak berkorban dan memberi kekuatan sehingga saya bisa menyelesaikan karya akhir dan pendidikan ini
19. Ibu yang saya hormati, hanya dengan restu , doa dan bantuan beliau saya mampu menyelesaikan karya akhir dan pendidikan ini
20. Adik sepupuku Robby dan Ferry yang telah membantu memecahkan masalah yang muncul dalam pembuatan karya akhir ini

Akhirnya kami menyadari bahwa karya akhir ini masih banyak kekurangannya, oleh karena itu saran dan kritik akan kami terima dengan hati terbuka demi perbaikan di masa mendatang.

Semoga Tuhan memberkati.

Semarang, Agustus 2001

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
ABSTRACTS	iii
RIWAYAT HIDUP	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GRAFIK	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. LATAR BELAKANG	1
1.2. PERUMUSAN MASALAH	2
1.3. TUJUAN PENELITIAN	3
1.3.1. TUJUAN UMUM	3
1.3.2. TUJUAN KHUSUS	3
1.4. MANFAAT PENELITIAN	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. TROMBOSIT	4
2.1.1. ASAL TROMBOSIT	4
2.1.2. MORFOLOGI TROMBOSIT	5
2.1.3. FUNGSI TROMBOSIT	7
2.2. MEKANISME AGREGASI TROMBOSIT	12
2.3. METODA PEMERIKSAAN AGREGASI TROMBOSIT	15
2.3.1. METODA NEFELOMETRIK	15
2.3.2. PERHITUNGAN SISA TROMBOSIT BEBAS	16
2.3.3. CARA WU & HOAK	16
2.4. PEMERIKSAAN SEDIAAN APUS DARAH TEPI UNTUK MENILAI FUNGSI AGREGASI TROMBOSIT	16

2.5. KERANGKA TEORI	19
2.6. KERANGKA KONSEP	20
2.7. DEFINISI OPERASIONAL	20
2.7.1. VARIABEL BEBAS	20
2.7.2. VARIABEL TERGANTUNG	20
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1. DISAIN PENELITIAN	21
3.2. RUANG LINGKUP PENELITIAN	21
3.3. POPULASI	21
3.4. SAMPEL	21
3.4.1. KRITERIA INKLUSIF	22
3.4.2. KRITERIA EKSKLUSIF	22
3.5. JUMLAH SAMPEL	22
3.6. STRATEGI PENELITIAN	24
3.7. BAKU EMAS	25
3.8. PEMERIKSAAN AGREGASI TROMBOSIT	25
3.8.1. METODA NEFELOMETRIK	25
3.8.2. CARA SEDIAAN APUS DARAH TEPI	32
3.9. PENGOLAHAN DATA	35
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1. KESIMPULAN	48
5.2. SARAN	49
RINGKASAN	50
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

No	halaman
1. Perbedaan bagian von Willebrand (VIII:vWF) dan bagian koagulan (VIII:C)	9
2. Substansi yang dilepaskan oleh trombosit	9
3. Berbagai induktor yang dipakai untuk agregasi trombosit	17
4. Tabel 2X2 antara pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik pada berbagai nilai kemungkinan batas bawah normoagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi	40
5. Tabel 2X2 antara pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik dengan berbagai nilai kemungkinan batas atas normoagregasi dari pemeriksaan sediaan apus darah tepi	41
6. Sensitivitas dan spesifisitas beberapa titik yang mungkin sebagai batas hipoagregasi dan tidak hipoagregasi	43
7. Sensitivitas dan spesifisitas beberapa titik yang mungkin sebagai batas hiperagregasi dan tidak hiperagregasi	43
8. Tabel 2X2 hasil hipoagregasi dan tidak hipoagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik	45
9. Tabel 2X2 hasil normoagregasi dan tidak normoagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik	46
10. Tabel 2X2 hasil hiperagregasi dan tidak hiperagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik	47
11. Tabel 2X2 dan rumus dalam uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik	57

12. Data pembacaan 25 sediaan apus darah tepi pada menit ke-3 dan 5 (penelitian pendahuluan)	58
13. Uji beda t berpasangan pembacaan 25 subyek sediaan apus darah tepi pada menit ke-3 dan 5 (penelitian pendahuluan)	59
14. Hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi (pembaca I)	60
15. Jumlah trombosit, kadar trigliserida serta hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi oleh pembaca I dan pembaca II	62
16. Uji korelasi dan uji beda t berpasangan hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi oleh pembaca I dan pembaca II	64
17. Hasil pemeriksaan sediaan apus dan hasil TAT metoda nefelometrik	66
18. Deskripsi hasil pemeriksaan pembaca I, pembaca II dan hasil TAT metoda nefelometrik	68
19. Uji beda t berpasangan dan uji korelasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik	71

DAFTAR GRAFIK

No	halaman
1. Agregasi trombosit dalam % pada berbagai interval waktu setelah pemberian induktor adrenalin 3 μ M	18
2. Kurva agregasi trombosit dengan berbagai macam induktor	31
3. Kurva ROC untuk mencari batas hipoagregasi dan normoagregasi	44
4. Kurva ROC untuk mencari batas hiperagregasi dan normoagregasi	44
5. Scatter diagram hubungan antara pembaca I dan pembaca II	65
6. Diagram bar hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi pembaca I, pembaca II dan TAT metoda nefelometrik	69
7. Scatter diagram hubungan antara sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik	72
8. Hasil TAT metoda nefelometrik	75

DAFTAR GAMBAR

No	halaman
1. Gambaran skematis potongan melintang dan sagital trombosit	6
2. Faktor VIII:vWF dan faktor VIII:Ag pada adhesi trombosit	8
3. Molekul faktor VIII (VIII:vWF) yang terdiri dari banyak subunit	8
4. Respon trombosit terhadap stimulus	13
5. Tahap awal agregasi trombosit. Reseptor fibrinogen akan terbuka dan fibrinogen akan melekat menjadi jembatan antar trombosit	14
6. Skema pembuatan PPP dan PRP	26
7. Kurva agregasi trombosit: tipe I,II dan III	29
8. Daerah baca pemeriksaan sediaan apus darah untuk menilai fungsi agregasi trombosit	33
9. Gambaran trombosit yang berkelompok dan tidak berkelompok pada sediaan apus darah tepi	34
10. Gambar keadaan trombosit dalam sediaan apus darah tepi	73

DAFTAR LAMPIRAN

No	halaman
1. Tabel 2X2 dan rumus dalam uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik	57
2. Data pembacaan 25 sediaan apus darah tepi pada menit ke-3 dan 5 (penelitian pendahuluan)	58
3. Uji beda t berpasangan pembacaan 25 subyek sediaan apus darah tepi pada menit ke-3 dan 5 (penelitian pendahuluan)	59
4. Hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi (pembaca I)	60
5. Jumlah trombosit, kadar trigliserida serta hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi oleh pembaca I dan pembaca II	62
6. Uji korelasi dan uji beda t berpasangan hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi oleh pembaca I dan pembaca II	64
7. Scatter diagram hubungan antara pembaca I dan pembaca II	65
8. Hasil pemeriksaan sediaan apus dan hasil TAT metoda nefelometrik ...	66
9. Deskripsi hasil pemeriksaan pembaca I, pembaca II dan hasil TAT metoda nefelometrik	68
10. Diagram bar hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi pembaca I, pembaca II dan TAT metoda nefelometrik	69
11. Uji beda t berpasangan dan uji korelasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik	71
12. Scatter diagram hubungan antara sediaan apus darah tepi dan TAT meoda nefelometrik	72

13. Gambar agregasi trombosit dalam sediaan apus darah tepi	73
14. Hasil TAT metoda nefelometrik	75

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Trombosit adalah sel darah tak berinti berasal dari sitoplasma megakariosit. Sel ini memegang peranan penting pada hemostasis dengan pembentukan sumbat hemostatik untuk menutup luka. Sumbat hemostatik dibentuk melalui tahapan adhesi trombosit, reaksi pelepasan dan agregasi trombosit (1,2,3,4,5).

Kelainan trombosit baik dari segi kualitas maupun kuantitas akan menimbulkan gangguan baik perdarahan maupun trombosis, oleh karena itu selain jumlah, penilaian fungsi trombosit juga penting (3,4,5,6,7,8,9,10). Fungsi trombosit yang sering diperiksa adalah fungsi agregasi (2,3,7,8,9,11,12,13,14).

Sampai saat ini metoda yang banyak dipakai untuk mengetahui fungsi agregasi trombosit adalah tes agregasi trombosit (TAT) metoda nefelometrik (9,11,13,15,16,17,18,19,20). Pada pemeriksaan ini agregasi trombosit akan terlihat dalam bentuk kurva berdasarkan transmisi cahaya yang meningkat. Metoda pemeriksaan ini belum dapat dikerjakan oleh setiap laboratorium karena memerlukan alat khusus dan induktor ADP 5 μ M yang relatif mahal.

Sediaan apus darah tepi adalah pemeriksaan yang dapat dikerjakan oleh setiap laboratorium, mudah dan murah. Pada sediaan apus terlihat kelompok-kelompok trombosit yang berada terutama di pinggir dan ujung sediaan (21) seperti halnya sel besar. Hal ini menggambarkan keadaan trombosit yang ada. Keadaan dimana kelompok trombosit besar dan banyak

menggambarkan keadaan kecenderungan agregasi lebih tinggi daripada gambaran kelompok trombosit yang kecil dan sedikit. Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit (untuk selanjutnya disebut pemeriksaan sediaan apus darah tepi) menilai persentase trombosit yang berkelompok dibandingkan total pada waktu sebelum dan sesudah 3 menit pemberian induktor. Metoda ini diharapkan dapat dipakai sebagai metoda lain untuk menilai fungsi agregasi trombosit yang dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas dan murah (19). Metoda ini juga diharapkan dapat dipergunakan sebagai pemeriksaan skrining sebelum melakukan TAT metoda nefelometrik.

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi menggunakan induktor adrenalin 1 mg/ml (adrenalin 3 μ M) (19). Adrenalin 3 μ M mempunyai sifat sebagai induktor lemah seperti ADP 5 μ M (13), tersedia di semua pelayanan pengobatan sampai tingkat puskesmas dan murah.

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas, timbul masalah yang diajukan pada penelitian ini : sejauh manakah pemeriksaan sediaan apus darah tepi dapat menilai fungsi agregasi trombosit bila dibandingkan dengan TAT metoda nefelometrik, bagaimana kesesuaian hasil pemeriksaannya

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum :

Untuk mengetahui kesesuaian hasil dan nilai diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik.

1.3.2. Tujuan Khusus :

1.3.2.1. Untuk mendiskripsikan hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi dalam menilai fungsi agregasi trombosit

1.3.2.2. Untuk mendiskripsikan hasil TAT metoda nefelometrik

1.3.2.3. Untuk mengetahui kesesuaian antara hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi dengan hasil TAT metoda nefelometrik

1.3.2.4. Untuk mengetahui nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan nilai ramal negatif pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1.4.1. Memperkenalkan pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit sehingga diharapkan dapat menjadi cara lain untuk mengetahui fungsi agregasi trombosit yang mudah, murah dan dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas yang tidak tersedia sarana TAT metoda nefelometrik

1.4.2. Pemeriksaan sediaan apus darah tepi diharapkan dapat juga dipergunakan sebagai pemeriksaan skrining sebelum melakukan TAT metoda nefelometrik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TROMBOSIT

2.1.1. ASAL TROMBOSIT

Trombosit dihasilkan di dalam sumsum tulang dengan cara melepaskan diri (fragmentasi) dari perifer sitoplasma sel induknya (megakariosit) melalui rangsangan trombopoetin. Megakariosit berasal dari megakarioblas yang timbul dari proses diferensiasi sel asal hemapoetik. Precursor mieloid paling awal yang membentuk megakariosit diberi istilah CFU_{GEMM} ($CFU = \text{Colony Formig Unit in culture medium}$). Progenitor yang lebih matang dan khusus megakariosit dinamakan CFU_{meg} .

Megakariosit matang, dengan proses replikasi endomitotik inti secara sinkron, volume sitoplasmanya bertambah besar pada waktu jumlah inti bertambah dua kali lipat. Biasanya pada keadaan 8 inti, replikasi inti lebih lanjut dan pertumbuhan sel berhenti, sitoplasma menjadi granular dan selanjutnya trombosit dibebaskan. Setiap megakariosit menghasilkan sekitar 4000 trombosit. Pada manusia interval waktu dari diferensiasi sel asal sampai dihasilkan trombosit kurang lebih 10 hari. Umur trombosit normal 7 – 10 hari, diameter trombosit rata-rata 1-2 μm dan volume sel rerata 5,8 fl. Hitung trombosit normal sekitar $2,5 \times 10^5 / \text{ml}$ (batas 1,5 – 4 x $10^5 / \text{ml}$) (1,2,3,4).

2.1.2. MORFOLOGI TROMBOSIT

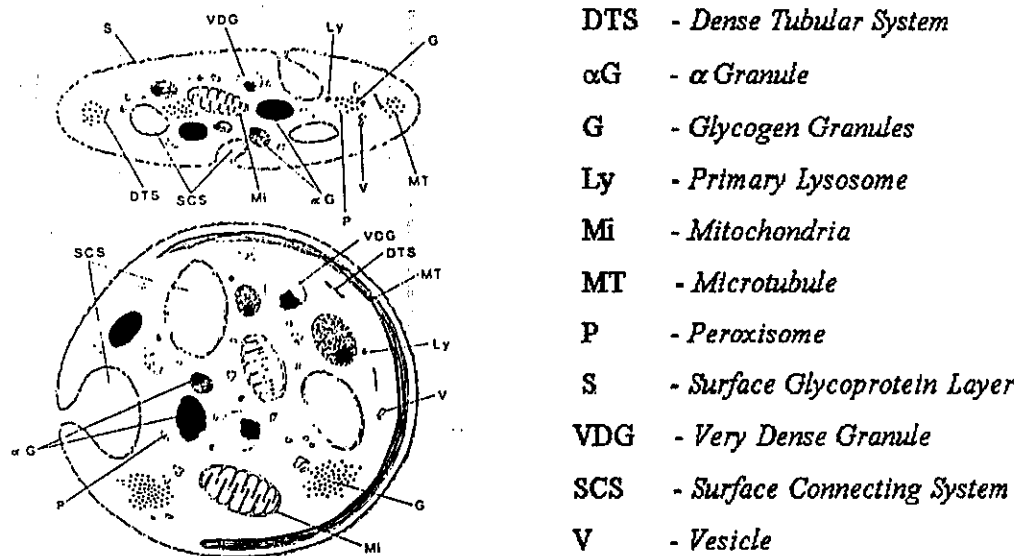
Dalam keadaan inaktif, trombosit bentuknya seperti cakram bikonveks dengan diameter 2 – 4 μm dan volume 7 – 8 fl. Dengan mikroskop elektron, trombosit dapat dibagi menjadi 4 zone dengan masing-masing zone mempunyai fungsi khusus. Keempat zone adalah *zona perifer* yang berguna untuk adhesi dan agregasi, *zone sol-gel* menunjang struktur dan mekanisme kontraksi, *zone organel* yang berperan dalam pengeluaran isi trombosit serta *zone membran* yang merupakan jalan keluar dari isi granula saat pelepasan.

Zona perifer terdiri atas 3 bagian yaitu selubung eksternal (glikokaliks), unit membran dan daerah submembran. Selubung eksternal lebih tebal dan padat dari sel lain dan banyak mengandung glikoprotein (GP) yang beberapa diantaranya berfungsi sebagai reseptor antara lain GP I dan GP V sebagai reseptor trombin, GP Ib merupakan reseptor untuk faktor von Willebrand, dan GP IIb dan IIIa untuk reseptor fibrinogen (22,23,24,25). Unit membran terdiri atas 2 lapis fosfolipid dengan komponen protein transmembran. Molekul fosfolipid tersusun asimetri dan dapat mengalami translokasi dari sisi yang satu ke sisi lain. Fosfolipid ini berperan dalam proses pembekuan darah. Fosfolipid ini dipengaruhi lipid plasma dan diet seseorang. Unit membran juga mengandung enzim yang bekerja pada metabolisme cAMP. Daerah sub membran adalah ruang antara unit membran dengan mikrotubulus, mengandung filamen sub membran, yang berfungsi menjaga bentuk trombosit, pembentukan pseudopodi dan retraksi bekuan.

Zona sol gel adalah matriks kental di dalam trombosit, terdiri atas protein yang dapat dibentuk menjadi *fibrous element* yaitu mikrotubulus dan

mikrofilamen. Mikrofilamen memegang peranan penting dalam mekanisme kontraktile trombosit. Mikrotubulus membentuk lingkaran pada ekuator dan menjaga bentuk cakram trombosit.

Zona organel berisi berbagai organel yang tersebar secara acak pada trombosit yang tidak aktif tetapi akan terkumpul di tengah jika trombosit menjadi aktif. Daerah ini melakukan fungsi respirasi, ekskresi juga produksi, menyimpan dan melepaskan enersi. Granula padat mengandung antara lain kalsium, ADP, ATP dan serotonin yang akan dikeluarkan saat reaksi pelepasan. Organel lain adalah granula alfa, mitokondria, lisosom, dan glikogen. Granula alfa berisi faktor trombosit 4, β tromboglobulin, PDGF, fibrinogen, faktor V, dan faktor vonWillebrand (26,27).



Gambar 1. Gambaran skematis potongan melintang dan sagital trombosit

(Firkın 1984)

Zona membran terdiri atas *surface connecting system* (SCS) dan *dense tubular system* (DTS). SCS merupakan invaginasi membran yang berkelok-kelok ke bagian dalam trombosit sehingga memperluas permukaan trombosit dan memudahkan masuknya bahan dari plasma. Selain itu saluran ini juga merupakan jalan keluar bahan yang disekresi dari granula. DTS berasal dari *smooth endoplasmic reticulum* dan merupakan tempat penyimpanan kalsium juga tempat metabolisme prostaglandin (1,2,3,4,5,6,7).

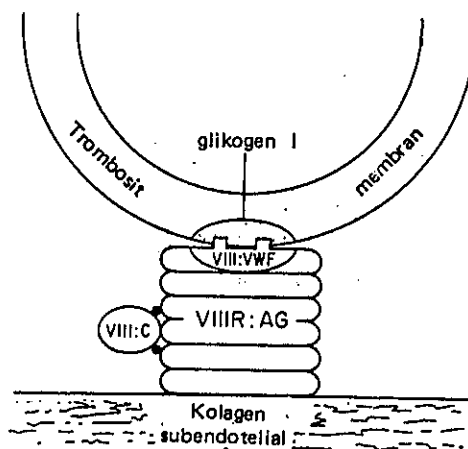
2.1.3. FUNGSI TROMBOSIT

Trombosit berperan dalam pembentukan sumbatan mekanis selama respon hemostatik normal terhadap luka vaskular. Hal ini terjadi karena fungsi trombosit: adhesi, pelepasan, agregasi, aktivitas prokoagulan, dan fusi.

2.1.3.1. ADHESI TROMBOSIT

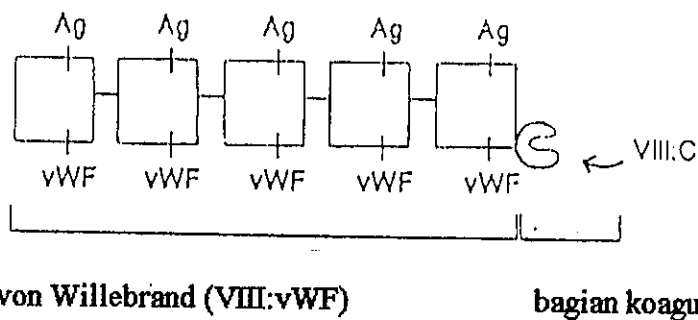
Bila ada perlukaan pembuluh darah, trombosit akan melekatkan diri pada jaringan ikat subendotelial yang terbuka. Proses melekatnya trombosit pada suatu permukaan yang bukan sesamanya disebut sebagai fungsi adhesi trombosit (3).

Fungsi adhesi tergantung pada glikoprotein membran permukaan trombosit dan faktor VIII: vWF bersama dengan faktor VIII: Ag (antigen yang berhubungan dengan faktor VIII) yang merupakan fraksi utama molekul faktor VIII (27)



Gambar 2. Faktor VIII : vWF dan faktor VIII: Ag pada adhesi trombosit
(Hoffbrand 1987)

Faktor VIII merupakan molekul besar yang multimerik yang terdiri dari bagian von Willebrand (VIII:vWF) dan bagian koagulan (VIII:C) seperti terlihat pada gambar 3. Kedua bagian tersebut mempunyai perbedaan yang dijelaskan pada tabel 1.



Gambar 3. Molekul faktor VIII (VIII:vWF) yang terdiri banyak subunit yaitu: VIII:Ag dan VIII:vWF serta unit koagulan kecil yang disebut VIII:C (Jobe 1992)

Kolagen dan trombin mengaktifkan sintesis prostaglandin trombosit yang mengarah ke pembentukan zat labil, tromboksan A2 yang merendahkan kadar cAMP trombosit dan mengawali reaksi pelepasan. Zat ini tidak hanya memperkuat agregasi trombosit tetapi juga memiliki aktivitas vasokonstriksi kuat. Reaksi pelepasan dihambat oleh zat yang meningkatkan kadar cAMP trombosit antara lain prostasiklin yang disintesis oleh sel endotel pembuluh darah.

2.1.3.3. AGREGASI TROMBOSIT

Trombosit mempunyai daya kohesi satu dengan lainnya karena pengaruh adanya ADP dan tromboksan A2. Daya kohesi ini disebut fungsi agregasi trombosit (18). Adanya pelepasan ADP dan tromboksan A2 menyebabkan trombosit yang ada beragregasi pada tempat luka pembuluh darah. ADP menyebabkan trombosit membengkak dan mempermudah membran trombosit yang berdekatan saling melekat satu sama lain.

Setelah terjadi reaksi pelepasan tambahan ADP dan tromboksan A2 akan menyebabkan terjadinya agregasi trombosit sekunder. Proses ini berjalan terus mengakibatkan pembentukan massa trombosit yang cukup besar untuk menyumbat daerah luka endotel (2)

2.1.3.4. AKTIVITAS PROKOAGULAN TROMBOSIT

Trombosit ikut aktif berinteraksi dengan sistem koagulasi (2,13,28,29). Pada permukaan selnya terdapat tempat-tempat pengikatan spesifik untuk faktor koagulasi V yang telah mendapat rangsangan yaitu faktor V aktif (Va), yang kemudian akan mengikat faktor Xa, faktor I, XI, V, faktor Fitzgerald dan faktor von Willebrand (2). Penulis lain ada yang

DIPOSIAAN ENDIT

mengatakan bahwa trombosit teraktivasi melepaskan 5 prokoagulan yaitu III, IV, V, VIII dan XIII (28)

Pembentukan kompleks faktor-faktor koagulasi pada permukaan trombosit yang teraktivasi ini, akan memperkuat aktivitas prokoagulan dengan meningkatkan konsentrasi faktor-faktor yang dibutuhkan dalam proses koagulasi dan dapat melindungi faktor-faktor tersebut terhadap pengaruh inaktivasi oleh inhibitor-inhibitor protease dalam plasma

Aktivasi trombosit dan pembentukan fibrin juga berpengaruh terhadap mekanisme pengaturan kekuatan negatif, seperti sistem fibrinolitik, protein C dan pembuatan prostasiklin serta AT III. Sistem yang mendukung kekuatan negatif ini menjadi lebih aktif untuk mempertahankan keseimbangan antara terbentuknya fibrin dan penghancurannya agar tidak sampai timbul hal-hal yang patologik seperti trombosis.

Reaksi meningkatkan aktifitas kekuatan negatif di atas sangat penting, karena kompleks protrombinase yang dihimpun oleh kelompok faktor-faktor Xa, Va, Ca⁺⁺ pada permukaan trombosit yang terangsang itu mampu meningkatkan jumlah pembuatan trombin (suatu agregator yang sangat kuat) yang kadarnya mencapai sebesar 278.000 kali bila dibandingkan kadar yang dihasilkan oleh Xa sendiri (2).

2.1.3.5. FUSI TROMBOSIT

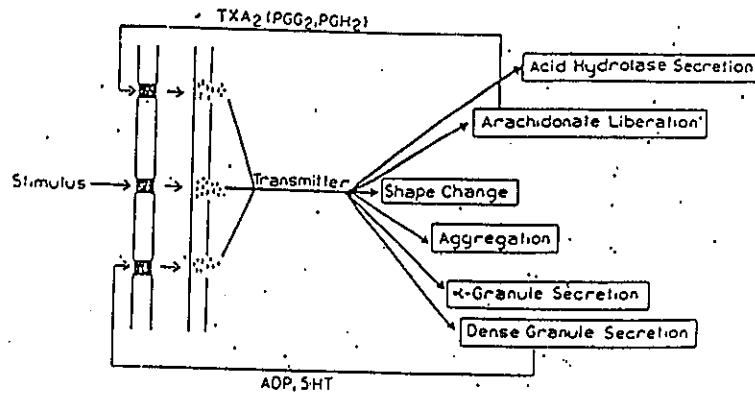
Konsentrasi tinggi ADP, enzim-enzim yang dibebaskan selama reaksi pelepasan dan tromboastenin bersama-sama menyebabkan fusi ireversibel trombosit yang beragregasi pada tempat luka vaskuler. Trombin juga mendorong fusi trombosit dan pembentukan fibrin memperkuat

stabilitas sumbatan trombosit yang sedang berkembang. Faktor pertumbuhan yang dilepaskan dari granula spesifik merangsang sel otot polos pembuluh darah untuk memperbanyak diri dan ini dapat mempercepat kesembuhan vaskuler setelah luka (2)

2.2. MEKANISME AGREGASI TROMBOSIT

Agregasi trombosit adalah perlekatan antar sesama trombosit. Dalam keadaan tidak aktif, trombosit tidak mudah melekat karena glikoprotein pada permukaan trombosit mengandung molekul asam sialat yang mengakibatkan permukaan bermuatan negatif sehingga trombosit saling tolak menolak. Agregasi trombosit dapat dirangsang oleh berbagai induktor antara lain : ADP, epinefrin, dan kolagen (2,3,4,11,18,19).

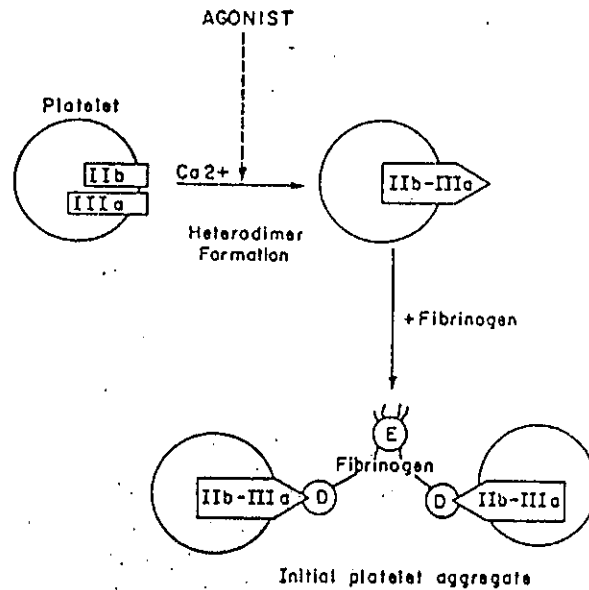
Respons trombosit tergantung dari kekuatan induktor. Mula-mula induktor berinteraksi dengan reseptor pada membran trombosit. Tiap reseptor mengontrol sejumlah transmitter yang akan dilepaskan kedalam sitoplasma. Kemungkinan transmitter tersebut adalah ion Ca. Kadar transmitter yang dikontrol oleh berbagai induktor berbeda tergantung kekuatan induktor. Respons trombosit tergantung kadar *transmitter* yang dilepaskan ke dalam sitoplasma. Jika diurutkan berdasarkan kadar transmitter dari yang rendah sampai tinggi, maka urutan respons trombosit adalah perubahan bentuk, agregasi trombosit, pelepasan asam arakhidonat, sekresi dari granula padat dan sekresi dari granula α , lalu sekresi hidrolase asam (13, 26)



Gambar 4. Respon trombosit terhadap stimulus (Rahajuningsih 1997)

Berdasarkan kekuatannya, induktor dapat dibedakan atas lemah, sedang dan kuat. Yang termasuk induktor lemah adalah ADP dan adrenalin, induktor sedang adalah Tromboksan A₂ (TxA₂) sedang induktor kuat adalah trombin dan kolagen.

Agregasi yang diinduksi oleh ADP memerlukan kation divalen seperti Ca atau Mg dan fibrinogen yang berfungsi sebagai kofaktor. Mula-mula ADP berikatan dengan reseptor dan menginduksi perubahan bentuk trombosit dari cakram menjadi bulat dengan tonjolan pseudopodi. Kemudian reseptor untuk fibrinogen (GP IIb dan GP IIIa) terbuka dan fibrinogen akan melekat pada reseptor dan menjadi jembatan antar trombosit (22,23,24,25). Struktur fibrinogen berupa 2 domain D di lateral dan domain E di sentral (8). Jadi pada tahap awal terjadinya agregasi 2 trombosit melekat pada sepasang domain D dari molekul fibrinogen yang sama.



Gambar 5. Tahap awal agregasi dimana 2 trombosit melekat pada sepasang domain D dari molekul fibrinogen yang sama (Bithehl 1993).

Agregasi trombosit yang terjadi bersifat reversibel bila kadar ADP yang dipakai sebagai induktor kecil. Bila kadar ADP lebih tinggi, maka akan terjadi pelepasan asam arakhidonat yang selanjutnya akan diubah menjadi prostaglandin G₂ (PGG₂), PGH₂ dan TxA₂ yang akan menimbulkan sekresi ADP dari granula sehingga terjadi agregasi yang irreversibel.

Untuk merangsang agregasi, kolagen memerlukan struktur fibriler. Setelah kolagen melekat pada reseptornya di membran trombosit, terjadi interaksi antara permukaan trombosit dengan fibriler kolagen yang akan memberi signal untuk mobilisasi ion Ca. Selanjutnya akan dilepaskan asam arakhidonat dan terbentuk TxA₂ yang akan merangsang sekresi ADP dari granula dan terjadi agregasi trombosit yang irreversibel.

Trombin adalah induktor fisiologis yang paling kuat dan mampu untuk merangsang perubahan bentuk, pelepasan asam arakhidonat, agregasi dan sekresi dari berbagai granula .

Jadi agregasi trombosit dapat terjadi melalui 3 jalur yaitu jalur pertama sekresi ADP dan jalur kedua pembentukan TxA₂. Jalur ketiga adalah agregasi trombosit yang terjadi setelah perangsangan dengan trombin kadar tinggi walaupun jalur ADP dan TxA₂ dihambat. Diduga perantara jalur ini adalah Platelet Activating Faktor (PAF). PAF dilepaskan oleh basofil yang telah disensitisasi oleh antigen, karena itu PAF juga merupakan perantara yang penting pada peradangan dan reaksi alergi (2,3).

2.3. METODA PEMERIKSAAN AGREGASI TROMBOSIT

Agregasi trombosit dapat diperiksa dengan beberapa metoda.

2.3.1. METODA NEFELOMETRIK (CARA BORN)

Metoda nefelometrik berdasarkan perubahan transmisi cahaya. Cara ini merupakan metoda pemeriksaan agregasi trombosit yang paling sering dipakai. Bahan yang digunakan adalah *Platelet Rich Plasma* (PRP). PRP diinkubasi pada suhu 37°C dan diaduk dengan *stirrer*. Apabila ditambahkan induktor, maka trombosit akan beragregasi sehingga transmisi cahaya melalui PRP meningkat. Perubahan transmisi cahaya ini dapat direkam dan dicetak, dan dinilai berdasarkan puncak dan bentuk kurva yang terbentuk (4,9,18,19,20).

2.3.2. PERHITUNGAN SISA TROMBOSIT BEBAS

Metoda ini memakai darah lengkap maupun PRP sebagai bahan pemeriksaan. Prinsipnya jika ke dalam darah atau PRP yang diinkubasi pada 37^o C dan diaduk dengan *stirrer* ditambahkan induktor, maka trombosit akan beragregasi sehingga trombosit bebas berkurang. Setiap interval waktu tertentu, dihitung sisa trombosit bebas dan dihitung persentasinya terhadap jumlah trombosit sebelum penambahan induktor. Semakin banyak sisa trombosit bebas berarti trombosit yang beragregasi semakin sedikit (13, 19,30)

2.3.3. CARA WU & HOAK

Cara WU & Hoak menilai ada tidaknya agregasi trombosit in vivo. Pada cara ini darah pasien dimasukkan ke dalam 2 botol, botol I berisi EDTA, dan botol II berisi EDTA dan formalin. EDTA bersifat mencegah terjadinya agregasi trombosit, sedangkan formalin mencegah terlepasnya trombosit yang telah beragregasi. Dihitung jumlah trombosit dari kedua botol tersebut. Jika sudah terjadi agregasi trombosit in vivo, jumlah trombosit bebas dalam botol II akan lebih rendah daripada botol I (13,19)

2.4. PEMERIKSAAN SEDIAAN APUS DARAH TEPI UNTUK MENILAI FUNGSI AGREGASI TROMBOSIT

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit diperkenalkan oleh Velaskar DS dan Chitre pada tahun 1982 (19). Bahan yang digunakan pada pemeriksaan cara ini adalah *whole blood*. Pengambilan darah dilakukan dengan menghindari bendungan/stasis berlebihan dan kontaminasi jaringan.

Antikoagulan yang digunakan adalah Natrium Citrate 3,8% dengan perbandingan darah : antikoagulan 9:1. Antikoagulan ini merupakan antikoagulan terpilih untuk pemeriksaan hemostasis karena disamping mengikat ion Ca, juga sebagai pengawet untuk faktor II dan VIII. Dibandingkan Oksalat faktor V lebih stabil dalam Natrium Citrate. Calcium dan Natrium membentuk kompleks terlarut dengan cepat, sebaliknya Calcium dan Oksalat membentuk kompleks yang tidak larut secara lambat. Dengan alasan di atas untuk pemeriksaan hemostasis digunakan antikoagulan Natrium Citrate bisa dengan konsentrasi 0.129M (3.8%) atau 0.105M (3.2%) dengan perbandingan 9 bagian darah dan 1 bagian Natrium Citrate (18, 32,33,34,35).

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai agregasi trombosit menggunakan induktor sebagai pemacu terjadinya agregasi trombosit. Induktor yang sering dipakai pada tes agregasi trombosit adalah ADP, adrenalin, dan kolagen (tabel 3) (13,18,19,20,31). Bisa juga dipakai Ristocetin sebagai induktor yang hanya dipergunakan jika ada kecurigaan kearah penyakit von Willebrand atau sindroma Bernard Soulier.

Tabel 3. Berbagai induktor yang dipakai untuk tes agregasi trombosit (Rahajuningsih 1997)

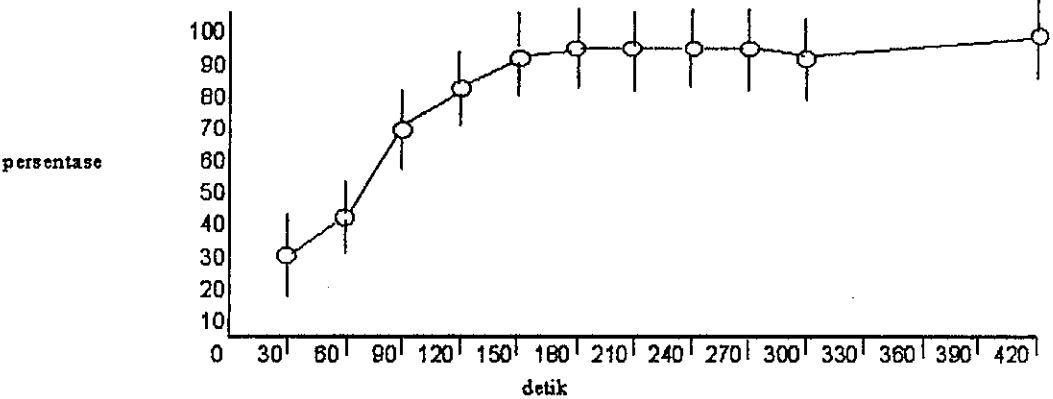
Induktor	Pelarut stock	Kadar stock	Kadar larutan kerja	Kadar akhir
ADP	Saline	1 μ M	100 μ M	10 μ M
			50 μ M	5 μ M
			25 μ M	2,5 μ M
			10 μ M	1 μ M
Adrenalin	Sodium meta bisulfit 0,1 %	1 μ M	200 μ M	20 μ M
			20 μ M	2 μ M
Kolagen		1 mg/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml
			40 μ g/ml	4 μ g/ml
Ristocetin	Salin	20 mg/ml	15 mg/ml	1,5 mg/ml
			12 mg/ml	1,2 mg/ml

Untuk penilaian fungsi agregasi trombosit dihitung banyaknya trombosit bebas dan trombosit yang beragregasi. Velaskar membaca seluruh zona dari tepi sediaan apus ke tepi berikutnya, dan dihitung persentase trombosit yang beragregasi dibandingkan total trombosit (trombosit yang beragregasi dan trombosit bebas) (19). Penilaian agregasi trombosit pada menit tertentu dihitung berdasarkan rumus di bawah ini (rumus Velaskar) (19)

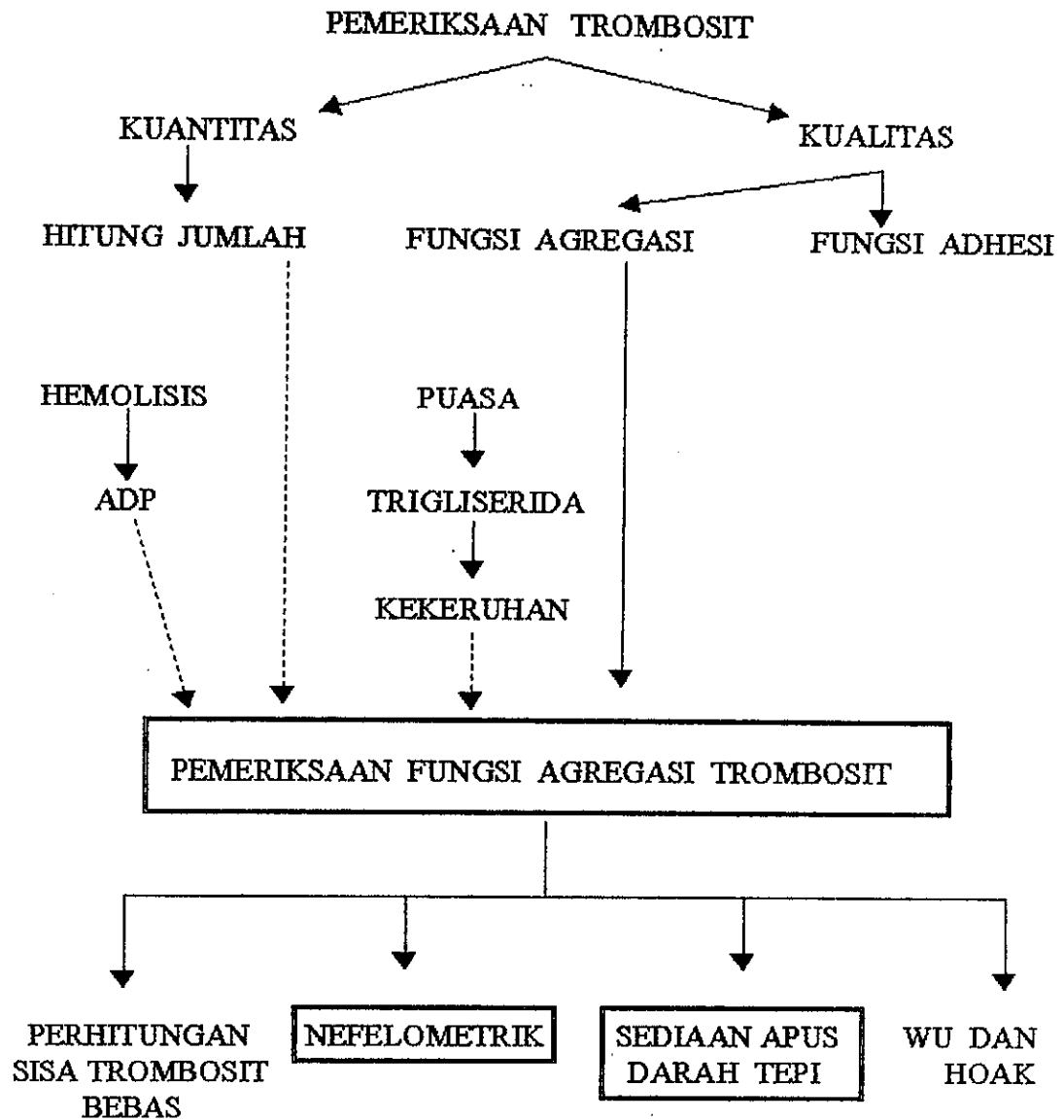
$$\text{agregasi dengan koreksi} = \frac{(\text{persentase agregasi total} - \text{awal}) \times 100}{100 - \text{persentase agregasi awal}}$$

Velaskar menggunakan prosedur ini dengan mengikuti dari sebelum diberi induktor, dan menit ke menit setelah diberi induktor. Agregasi maximal tercapai mulai menit ke-3. Hal ini terlihat pada grafik 1. Penelitian Velaskar tersebut mempunyai simpang baku 3,84

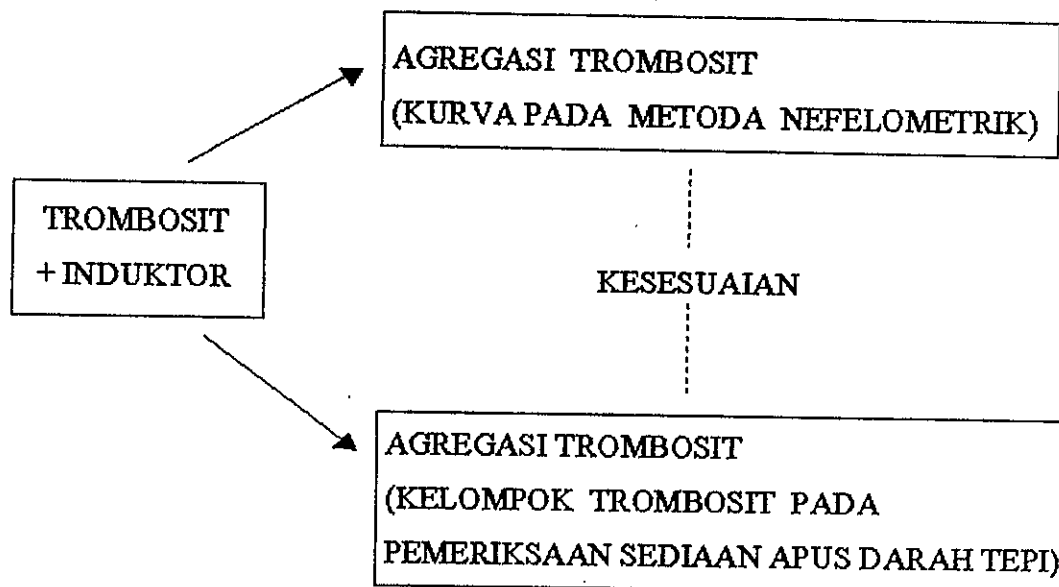
Grafik 1. Agregasi trombosit dalam % pada berbagai interval waktu setelah pemberian induktor adrenalin 3 μM (Velaskar 1982)



2.5. KERANGKA TEORI



2.6. KERANGKA KONSEP



2.7. DEFINISI OPERASIONAL

2.7.1. Variabel bebas

2.7.1.1. Induktor : adalah bahan yang dapat memacu terjadinya agregasi trombosit, dalam penelitian ini dipakai ADP 5 μ M untuk TAT metoda nefelometrik dan adrenalin 3 μ M untuk pemeriksaan sediaan apus darah tepi.

2.7.2. Variabel tergantung

2.7.2.1. Agregasi trombosit : adalah beberapa trombosit yang membentuk kelompok-kelompok yang terlihat dalam pembacaan sediaan apus darah tepi atau secara nefelometrik dalam bentuk kurva yang disebabkan oleh transmisi cahaya melalui PRP meningkat.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. DISAIN PENELITIAN

Disain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah uji diagnostik

3.2. RUANG LINGKUP PENELITIAN

- ◆ Ruang lingkup bidang ilmu yang diteliti ialah bidang ilmu Patologi Klinik dengan titik berat pada cabang ilmu Hematologi dalam metode pemeriksaan.
- ◆ Lokasi penelitian ini dilakukan di suatu laboratorium rumah sakit swasta di Semarang

3.3. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah : subyek yang melakukan pemeriksaan agregasi trombosit di suatu laboratorium rumah sakit swasta di Semarang yang memenuhi kriteria inklusif.

3.4. SAMPEL

Pengambilan sampel secara purposif, yaitu semua subyek yang melakukan TAT metoda nefelometrik tanpa melihat umur, jenis kelamin dan diagnosis dengan :

3.4.1. Kriteria Inklusif

3.4.1.1. Subyek puasa 12 jam (kadar trigliserida < 200 mgr/dl dan sampel tidak keruh)

3.4.2. Kriteria Eksklusif

3.4.2.1. Jumlah trombosit < $1,5 \times 10^5$ atau $> 4 \times 10^5$ /ml

3.4.2.2. Terjadi hemolisis

3.5. JUMLAH SAMPEL

Besar sampel dihitung berdasarkan perhitungan besar sampel untuk 2 mean

$$N = 2 \left[\frac{(Z\alpha - Z\beta) \delta}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2$$

Dimana α = level significance

$1 - \beta$ = besar power

δ = simpang baku

$\mu_1 - \mu_2$ = besarnya perbedaan 2 mean yang ingin dapat dideteksi

Bila diterima tingkat *significance* (α) = 0,05 dan kemungkinan mendeteksi perbedaan 85% (power) dan perbedaan mean sebesar 2 atau lebih bermakna secara klinik, maka besar sampel dengan perkiraan simpang baku = 3,84 adalah :

$$Z\alpha = 1,96$$

$$\delta = 3,84$$

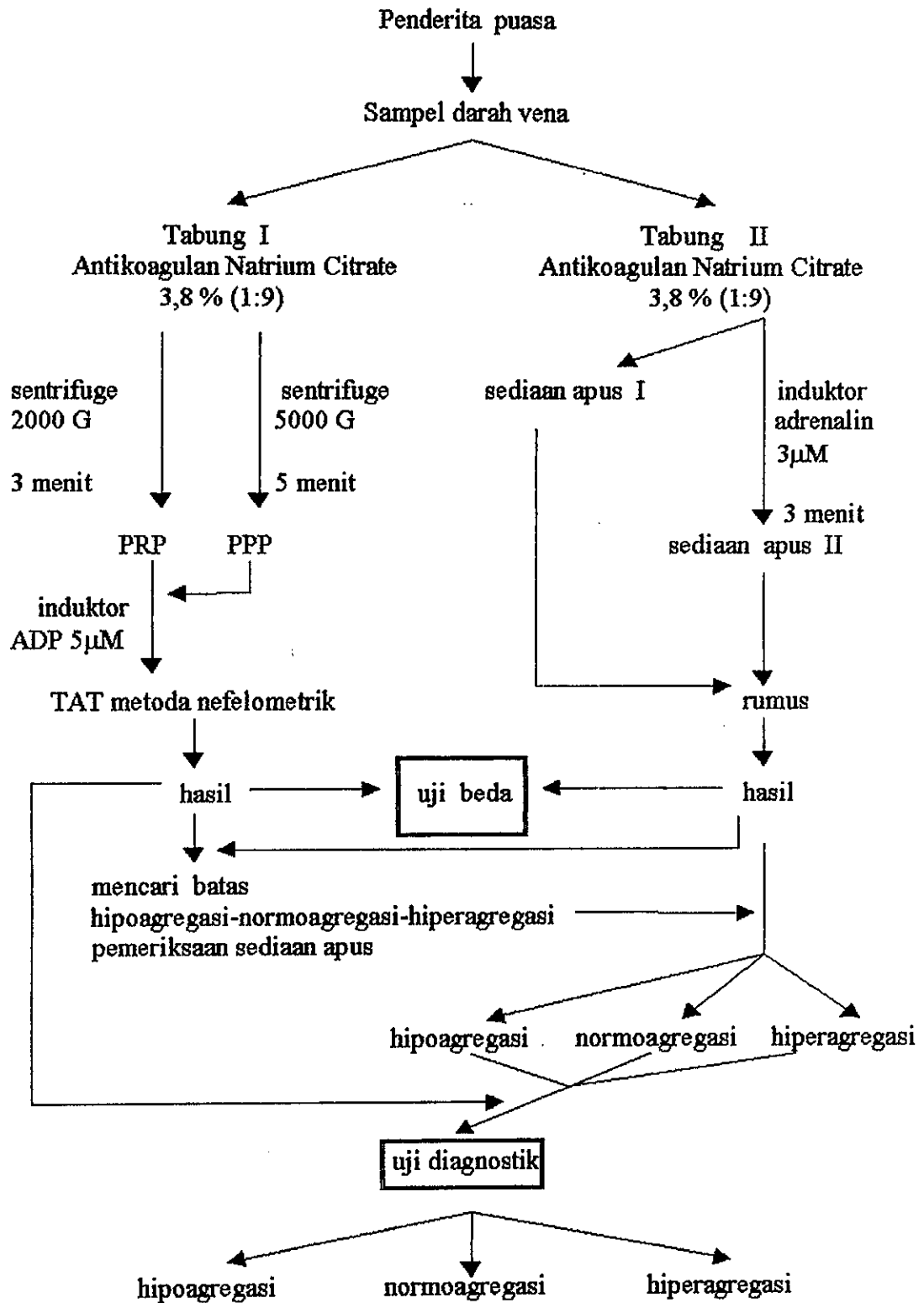
$$Z\beta = -1,02$$

$$\mu_1 - \mu_2 = 2$$

$$N = 2 \left[\frac{(Z\alpha - Z\beta) \delta}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2 = 2 \left[\frac{(1,96 + 1,02) 3,84}{2} \right]^2 = 65$$

Jadi besar sampel penelitian sebanyak 65 .

3.6. STRATEGI PENELITIAN



3.7. BAKU EMAS

Baku emas pada penelitian ini adalah hasil TAT metoda nefelometrik.

3.8. PEMERIKSAAN FUNGSI AGREGASI TROMBOSIT

3.8.1. METODA NEFELOMETRIK (CARA BORN)

3.8.1.1. REAGEN

ADP reagen, catalog No 885-3 (*Adenosine 5'-diphosphate, lyophilized with buffer salts*)

3.8.1.2. PERSIAPAN

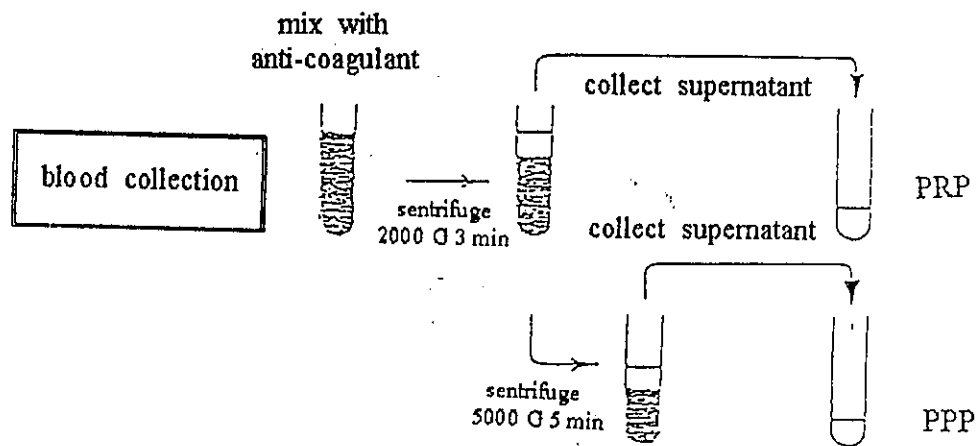
Larutan ADP disiapkan dari reagen ADP, catalog No. 885-3, with 1.0 mL *deionized water* untuk mendapatkan larutan yang mengandung ADP 2×10^{-4} mol/L. Digoyangkan agar tercampur. Biarkan vial pada suhu kamar (18-26°C) selama 15 menit sebelum dipergunakan (18).

3.8.1.3. PENGAMBILAN DAN PENYIMPANAN SAMPEL

Pengambilan dilakukan dengan menghindari bendungan/stasis lama dan kontaminasi jaringan. Darah yang didapat dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan Natrium Citrate 3,8% dengan ratio perbandingan darah: antikoagulan 9:1 (18,32,33,34,35).

TAT metoda nefelometrik menggunakan PRP (Plasma kaya trombosit) dan PPP (Plasma miskin trombosit). Untuk menyiapkan PRP tutup tabung dan biarkan pada suhu kamar 18-26°C, kemudian sampel antikoagulasi disentrifuge pada 2000 G selama 3 menit (36). Pindahkan *supernatant* (PRP) secara hati-hati dengan menggunakan pipet plastik (lihat gambar 6). Masukkan *supernatant* tersebut kedalam tabung yang berlabel

PRP. Untuk menyiapkan PPP sentrifuge ulang sampel darah sisa pada 5000 G selama 5 menit dan suhu kamar 18-26°C. Pindahkan supernatant (PPP) pada tabung yang sudah berlabel PPP. Pemeriksaan harus dilaksanakan 30 menit – 4 jam sejak sampel diambil (18,33).



Gambar 6. Skema pembuatan PRP dan PPP (Diane JN 1993)

3.8.1.4. ALAT DAN BAHAN

3.8.1.4.1. ALAT

- ◆ *Agregometer trombosit*
- ◆ *Chart recorder*

3.8.1.4.2. MATERIAL

- ◆ *Kuvet dan Teflon magnetic stirring bars*
- ◆ *Pipet dengan disposable plastic tips 50 µl, 450 µl, 500 µl*
- ◆ *Sentrifuge*
- ◆ *Tabung plastic dan tutupnya*
- ◆ *Plastic transfer pipets*

3.8.1.4.3. BAHAN

- ◆ Reagen ADP
- ◆ Buffer pelarut

3.8.1.5. PROSEDUR PEMERIKSAAN

- ❖ Disiapkan PRP dan PPP
- ❖ PRP sebanyak 450 μ l dimasukkan ke dalam *aggregation cuvet* yang sudah berisi *stiring bar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 menit
- ❖ PPP sebanyak 500 μ l dimasukkan ke dalam *aggregation curve* tanpa *stiring bar*
- ❖ Kuvet yang berisi PRP dan PPP diletakkan pada tempat yang tersedia dan dibuat garis dasar sesuai petunjuk
- ❖ Induktor ADP diinkubasi pada suhu kamar, kemudian ditambah buffer pelarut dengan perbandingan 1:1 untuk mendapatkan ADP 5 μ M. Goyangkan agar tercampur dan ditambahkan ke kuvet PRP sebanyak 50 μ l
- ❖ Direkam respon agregasi trombosit selama 10 menit

Faktor-faktor teknis yang perlu diperhatikan agar pada tes agregasi trombosit didapatkan hasil yang sesuai keadaan yang sebenarnya adalah (13,37) :

1. Darah diambil dalam keadaan puasa. Kadar trigliserida sangat bervariasi setelah makan. Untuk menghindari kekeruhan yang terjadi akibat peningkatan kadar

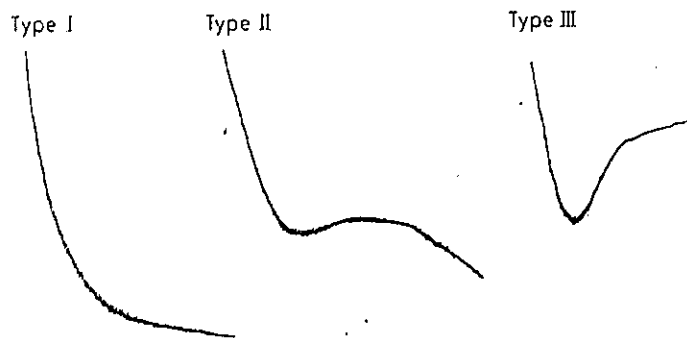
trigliserid setelah makan maka sampel diambil dalam keadaan puasa 12 jam (17,38).

2. Darah diambil dengan semprit plastik dan ditampung dalam tabung plastik atau gelas berlapis silikon. Tujuannya adalah mencegah perlekatan trombosit dengan permukaan gelas.
3. Sentrifugasi dilakukan pada suhu kamar bukan 4°C, karena suhu dingin akan menghambat agregasi trombosit.
4. Setelah disentrifuge, PRP dibiarkan 30 menit pada suhu kamar sebelum tes dikerjakan, karena sentrifugasi dapat menyebabkan pelepasan ADP sehingga mengakibatkan trombosit refrakter terhadap induktor.
5. Tabung ditutup untuk menghindari perubahan pH.
6. Pemeriksaan harus dikerjakan dalam waktu kurang dari 3 jam setelah pengambilan darah.
7. Jika jumlah trombosit kurang dari 150×10^9 atau lebih dari 400×10^9 /l agregasi trombosit lambat dan lemah.
8. Kecepatan pengaduk (stirrer) kurang dari 800 rpm atau lebih dari 1200 rpm memperlambat agregasi. Jika tidak ada stirrer, tak ada respons terhadap induktor.
9. Kuvet yang kotor dapat menimbulkan *oscilasi* yang irreguler sebelum penambahan induktor.
10. Plasma yang hemolisis tidak dapat dipakai, sebab ADP dari eritrosit akan mempengaruhi hasil pemeriksaan.
11. Tiap laboratorium dapat menentukan nilai rujukan sendiri.

3.8.1.6. INTERPRETASI HASIL

Untuk interpretasi hasil pemeriksaan agregasi trombosit perlu diperhatikan jenis dan kadar induktor, bentuk kurva, % agregasi maksimal dan nilai rujukan yang berlaku.

Agregasi yang terjadi dapat bersifat *irreversible*, *double-wave* atau *reversible*, seperti yang ditunjukkan pada gambar 7.



Gambar 7. Kurva agregasi trombosit : tipe I (*irreversible aggregation*); tipe II (*double-wave aggregation*); tipe III (*reversible aggregation*) (Agnoli 1977)

Pada keadaan normal, dengan induktor ADP kadar rendah ($1 \mu\text{M}$) transmisi cahaya akan meningkat sedikit lalu menurun lagi. Agregasi yang terjadi bersifat reversible artinya trombosit yang sudah melekat lepas lagi (deagregasi). Dengan kadar ini nilai rujukan titik maksimal kurva yang ditentukan adalah 8-21 % dengan alat PACKS-4 (35). Jika dijumpai kurva agregasi yang irreversible atau agregasi maksimal lebih dari nilai rujukan, dapat dikatakan kemampuan agregasi meningkat (13).

Dengan induktor ADP $2,5 \mu\text{M}$ agregasi trombosit yang terjadi diikuti reaksi pelepasan ADP. ADP yang disekresi dari granula padat akan

merangsang agregasi lebih lanjut, sehingga dapat dijumpai kurva bifasik (double-wave aggregation). Dengan kadar ini nilai rujukan titik maksimal kurva adalah 25-40 % (33).

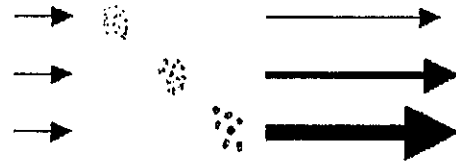
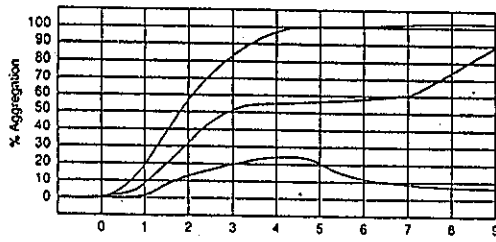
Bila kadar induktor ADP 5 μM , bentuk kurva yang terjadi lebih bervariasi dengan nilai rujukan titik maksimal kurva 45-65 % (33).

Jika kadar ADP sebagai induktor 10 μM , hanya dijumpai 1 gelombang yang *irreversible* karena gelombang primer dan sekunder menjadi satu. Nilai rujukan titik maksimal kurva yang ditentukan untuk ADP 10 μM adalah 78-99 % (33). Jika dijumpai agregasi maksimal kurang dari nilai rujukan atau dijumpai *deagregasi* maka dapat dikatakan kemampuan trombosit untuk beragregasi kurang.

Bila digunakan induktor adrenalin kadar 0,2 μM sebagian besar agregasi yang terjadi bersifat *reversible* atau mengalami *deagregasi*. Dengan adrenalin 2 μM semua agregasi yang terjadi bersifat *irreversible*

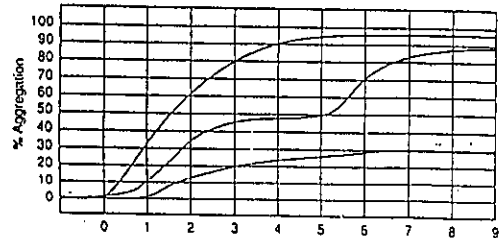
Induktor kolagen (4 $\mu\text{g/ml}$) akan menimbulkan *lag phase* diikuti kurva monofasik yang *irreversible*. *Lag phase* menunjukkan waktu yang diperlukan kolagen fibriler untuk berinteraksi dengan trombosit.

Induktor ristocatin dengan kadar 1,2 mg/ml akan menimbulkan kurva monofasik *irreversible*.



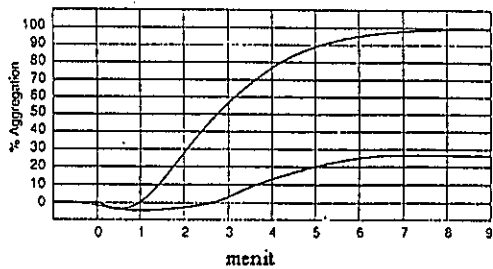
Normal Response to 10 μ M ADP – Primary and Secondary slopes indistinguishable, aggregation > 60%
 Normal Response to 5 μ M ADP – Primary and Secondary slopes distinctly biphasic
 Abnormal Response to 10 μ M ADP – aggregation < 60%

(a) ADP



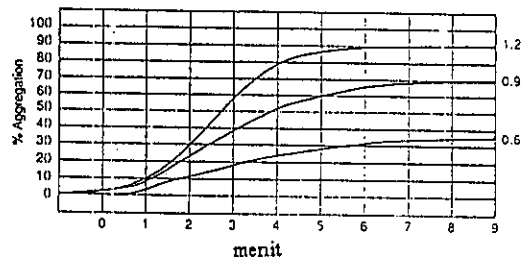
Normal Response to 10 μ M Epinephrine – Primary and Secondary slopes indistinguishable, aggregation > 60%
 Normal Response to 2 μ M Epinephrine – Primary and Secondary slopes distinctly biphasic; aggregation > 60%
 Abnormal Response to 10 μ M Epinephrine – aggregation < 60%

(b) adrenalin



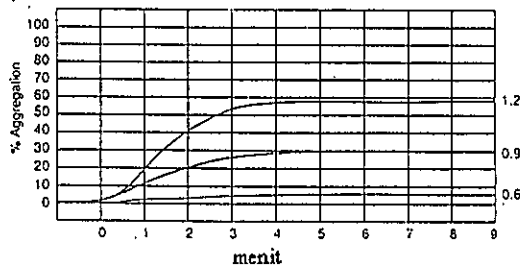
Normal Response to 10 μ g Collagen – lag phase < 60 seconds
 Abnormal Response to 10 μ g Collagen – prolonged lag phase

(c) kolagen



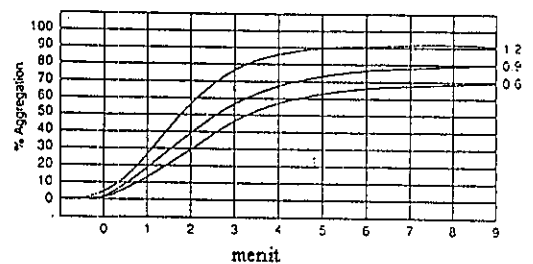
Normal Response – aggregation > 60% with < 1.2 mg/mL ristocetin; response decreases proportionately with 0.9 and 0.6 mg/mL ristocetin

(d) ristocetin



Response of Type I von Willebrand's – aggregation < 60% with 1.2 mg/mL ristocetin; response decreases proportionately with 0.9 and 0.6 mg/mL ristocetin

(e) ristocetin-tipe I vWD



Response of Type IIb von Willebrand's – aggregation > 60% with 1.2 mg/mL ristocetin; increased response to 0.9 and 0.6 mg/mL ristocetin

(f) ristocetin-tipe IIb vWD

Grafik 2. Kurva agregasi trombosit dengan berbagai macam induktor (a) ADP dengan disertai perubahan transmisi cahaya pada pemberian ADP 5 μ M, (b) adrenalin, (c) kolagen, (d) ristocetin, (e) ristocetin-tipe I vWD, (f) ristocetin-tipe IIb vWD (Bode 1993)

Selain hal tersebut di atas, dari kurva agregasi trombosit dapat dilakukan penilaian lebih rinci (3,9,13) yaitu :

- Slope menunjukkan bagian kurva yang paling curam berupa peningkatan mm/30 detik.
- % deagregasi yaitu % penurunan transmisi cahaya dari agregasi maksimal pada menit ke 10.
- Agregasi spontan yaitu agregasi yang terjadi tanpa penambahan induktor.

3.9.2. CARA SEDIAAN APUS DARAH TEPI

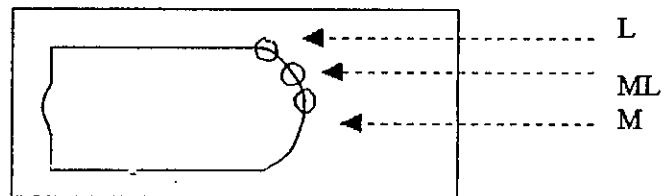
3.9.2.1. ALAT DAN BAHAN

- *Vacutainer natrium citrate 3,8%*
- Pipet lekosit
- *Adrenalin bitatras 3 μ M*
- Cat Giemsa dan metilalkohol
- Obyek glass
- Mikroskop elektrik
- *Counter*

3.9.2.2. PROSEDUR PEMERIKSAAN

- Diambil darah vena pada v. Mediana Cubiti menggunakan *vacutainer* dengan tabung berisi 0,5 ml natrium citrate 0,129 M 3,8 % sebanyak 2 tabung masing- masing untuk pengambilan darah hingga volume menjadi 5 ml

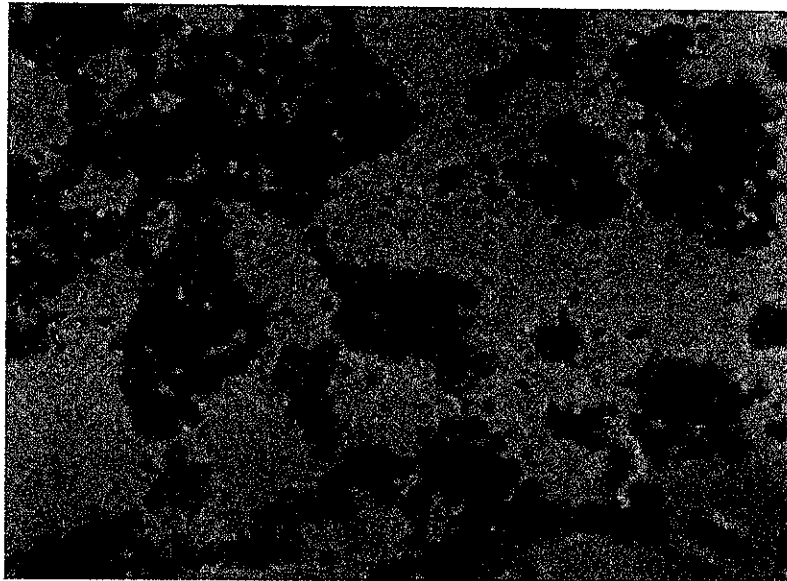
- Tabung I berisi 5 ml darah dan antikoagulan, dilakukan TAT metoda nefelometrik
- Tabung II berisi 5 ml darah dan antikoagulan, untuk pemeriksaan sediaan apus darah tepi
- Dari tabung II diambil darah 10 μ l dengan pipet lekosit dan dibuat sediaan apus (0 menit).
- Pada sisa darah yang ada ditambahkan adrenalin bitartras 3 μ M dengan perbandingan adrenalin bitartras 3 μ M : darah natrium citrate adalah 1:10, digoyang agar tercampur rata. Ditunggu 3 menit dan dengan pipet lekosit diambil 10 μ l, dibuat sediaan apus (3 menit).
- Sediaan apus ditunggu kering dan difiksasi dengan metilalkohol selama 5 menit kemudian dicat Giemsa yang telah diencerkan (1 : 9) selama 20 menit, lalu bilas dengan air suling dan biarkan kering.
- Pemeriksaan sediaan apus darah tepi dilakukan pada perbatasan zone VI dan ekor daerah lateral, medial dan mediolateral.



Keterangan : M = medial
 ML = mediolateral
 L = lateral

Gambar 8. Daerah baca pemeriksaan sediaan apus darah tepi pada perbatasan zone VI dan ekor daerah lateral, medial dan mediolateral

- Dihitung jumlah trombosit pada masing-masing kumpulan trombosit yang ada dan jumlah trombosit yang tersebar pada 1 lapangan pandang dengan pembesaran 400X (lensa okuler 10X dan lensa obyektif 40X)
- Prosentase trombosit yang beragregasi dihitung berdasarkan jumlah trombosit yang berkelompok dibandingkan jumlah trombosit total (trombosit berkelompok dan tidak berkelompok). Dihitung dari preparat hapus I (0 menit) dan preparat hapus II (3 menit).



Gambar 9. Gambaran trombosit yang berkelompok dan tidak berkelompok pada preparat hapus darah tepi

- Hasil pembacaan dimasukkan ke dalam rumus Velaskar

$$\text{agregasi dengan koreksi} = \frac{(\text{prosentase agregasi menit ke-3} - \text{menit ke-0}) \times 100}{100 - \text{prosentase agregasi menit ke-0}}$$

- Pembacaan diulang oleh pembaca kedua tanpa mengetahui hasil pembacaan sebelumnya.

3.10. PENGOLAHAN DATA

Data yang telah terkumpul dilakukan tabulasi dan dianalisis menggunakan uji statistik sebagai berikut :

- ❖ Untuk menggambarkan hasil pemeriksaan pembaca pertama, pembaca kedua dan TAT metoda nefelometrik dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan komputer perangkat lunak SPSS (Statistical Product and Service Solutions) versi 7,5
- ❖ Kesesuaian antara hasil pemeriksaan pembaca pertama dan kedua dianalisis dengan uji korelasi Pearson menghitung koefisien korelasi dan uji beda dengan tes t berpasangan menggunakan komputer perangkat lunak SPSS versi 7,5
- ❖ Kesesuaian hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik dianalisis dengan uji korelasi Pearson menghitung koefisien korelasi dan uji beda dengan tes t berpasangan menggunakan komputer perangkat lunak SPSS versi 7,5
- ❖ Penghitungan sensitivitas dan spesifisitas pada berbagai titik batas antara hipoagregasi dan tidak hipoagregasi dan batas hiperagregasi dan tidak hiperagregasi dihitung manual dengan tabel 2 X 2
- ❖ Batas antara hipoagregasi dan tidak hipoagregasi, serta batas antara hiperagregasi dan tidak hiperagregasi dicari dengan kurva ROC. Hasil

UNIVERSITAS - UNDIK

pemeriksaan pembaca pertama digolongkan hipoagregasi, normoagregasi dan hiperagregasi berdasarkan batas tersebut.

- ❖ Uji diagnostik dilakukan secara manual dengan tabel 2X2, kemudian dihitung sensitifitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan nilai ramal negatif.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit diperkenalkan pertama kali oleh Velaskar DS dan Chitre AP tahun 1982, dimana sediaan apus darah tepi dibaca sebelum pemberian induktor dan tiap 30 detik hingga menit ke-8 setelah pemberian adrenalin 1 mg/ml. Hasil yang didapatkan terlihat pada grafik 1. Kurva yang terbentuk naik setelah pemberian induktor. Pada menit ke-3 kurva mulai mendatar yang menunjukkan terjadi agregasi trombosit maksimal. Atas dasar itu diambil menit ke-3 sebagai waktu untuk menilai agregasi trombosit sesudah pemberian induktor adrenalin 1 mg/ml ($3\mu\text{M}$).

Untuk mengetahui kesesuaian antara pembacaan menit ke-3 dan pembacaan menit ke-5 dilakukan penelitian pendahuluan pada 25 sampel, dianalisis dengan uji korelasi Pearson dan uji beda t berpasangan. Pada uji korelasi Pearson didapat $r = 0,458$ dan $p = 0,021$ ($p < 0,05$). Hal ini berarti pembacaan pada menit ke-3 mempunyai korelasi positif cukup dan bermakna dengan pembacaan menit ke-5. Hasil uji beda t berpasangan $p = 0,993$ ($p > 0,05$), berarti pembacaan pada menit ke-3 dan pembacaan pada menit ke-5 tidak berbeda secara statistik. Berdasarkan hal itu sediaan apus darah tepi diperiksa sebelum pemberian induktor (0 menit) dan 3 menit setelah pemberian induktor adrenalin $3\mu\text{M}$.

Daerah baca yang diambil oleh peneliti sebelumnya (Velaskar DS dan Chitre AP 1982) meliputi semua zona (19) sedangkan berdasarkan pengamatan kami kelompok trombosit cenderung berada di tepi atau ujung sediaan apus. Hal ini sesuai dengan pendapat Gandasoebrata 1985 (21). Berdasarkan hal tersebut kami mengambil

daerah baca di tepi dan ujung sediaan apus darah tepi. Dengan melihat bahwa garis axial membagi sediaan apus menjadi 2 daerah yang simetris maka daerah baca yang diambil adalah zone perbatasan VI dan ekor di medial, mediolateral dan lateral pada 1 sisi.

Selama bulan April dan Mei 2001 didapatkan 65 subyek penelitian. Semua subyek dalam keadaan puasa 12 jam pada saat diambil darah. Semua sampel dilakukan pemeriksaan kadar trigliserida dan jumlah trombosit. Hasil tercantum dalam tabel 15. Tidak ada sampel yang keruh (kadar trigliserida < 200 mg/dl), tidak ada jumlah trombosit < $1,5 \times 10^5$ atau > 4×10^5 / ml. Tidak ada sampel yang hemolisis. Dari 65 sampel yang ada semua dilakukan pemeriksaan fungsi agregasi trombosit dengan pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik.

Hasil pemeriksaan fungsi agregasi trombosit dengan pemeriksaan sediaan apus darah tepi oleh pembaca I dan pembaca II dan TAT metoda nefelometrik dapat dilihat pada tabel 15. Pembaca pertama mempunyai rentang pembacaan dari 8% hingga 99%, mean / rata-rata 63,68 % dan SD 20,74. Pembaca kedua mempunyai rentang pembacaan dari 0% hingga 99%, mean / rata-rata 67,15% dan SD 20,62. TAT metoda nefelometrik mempunyai rentang pembacaan dari 4,10% hingga 117,50%, mean / rata-rata 66,67 % dan SD 28,02.

Untuk melihat kesesuaian antara pembaca I dan pembaca II dilakukan uji korelasi Pearson dan uji beda t berpasangan. Pada uji korelasi Pearson didapatkan hasil koefisien korelasi $r = 0,643$ dan $p=0,000$ ($p < 0,01$). Hal ini berarti hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi pembaca I berkorelasi positif kuat dan bermakna dengan pembaca II. Pada uji beda t berpasangan didapatkan hasil $p=0,113$

($p > 0,05$). Hal ini berarti hasil pembaca I dan hasil pembaca II tidak berbeda secara statistik. Sehingga data yang diperoleh dari pembaca I bisa dianalisis lebih lanjut.

Untuk mengetahui kesesuaian antara pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik dilakukan analisis dengan uji korelasi Pearson dan uji beda t berpasangan. Pada uji korelasi Pearson didapatkan koefisien korelasi $r = 0,463$ dengan $p = 0,000$ ($p < 0,01$). Hal ini berarti hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi mempunyai korelasi positif cukup dan bermakna dengan TAT metoda nefelometrik.

Pada uji beda t berpasangan didapatkan hasil $p = 0,357$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan keduanya tidak berbeda secara statistik, sehingga pemeriksaan sediaan apus dapat dipakai sebagai cara lain untuk menilai fungsi agregasi trombosit seperti halnya TAT metoda nefelometrik.

Untuk mengetahui nilai diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dilakukan analisis secara bertahap. Mula-mula dicari batas antara hipoagregasi - normoagregasi - hiperagregasi dengan kurva ROC. Tabel 4 adalah tabel 2X2 untuk menentukan titik-titik pada kurva ROC dalam mencari batas hipoagregasi dan tidak hipoagregasi. Tabel 5 adalah tabel 2X2 untuk menentukan titik-titik kurva ROC dalam mencari batas hiperagregasi dan tidak hiperagregasi.

Tabel 4. Tabel 2X2 dari pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan pemeriksaan TAT metoda nefelometrik pada berbagai nilai kemungkinan batas bawah normoagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi (a) 45% (b) 52% (c) 53% (d) 54% (e) 56% (f) 57% (g) 58% (h) 62%

a. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 45%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	9	5	14
	TIDAK HIPOAGREGASI	6	45	51
JUMLAH		15	50	65

b. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 52%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	9	6	15
	TIDAK HIPOAGREGASI	6	44	50
JUMLAH		15	50	65

c. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 53%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	9	7	16
	TIDAK HIPOAGREGASI	6	43	49
JUMLAH		15	50	65

d. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 54%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	11	7	18
	TIDAK HIPOAGREGASI	4	43	47
JUMLAH		15	50	65

e. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 56%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	11	8	19
	TIDAK HIPOAGREGASI	4	42	46
JUMLAH		15	50	65

UPT-PUSTAK-UNDIP

f. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 57%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	11	9	20
	TIDAK HIPOAGREGASI	4	41	45
JUMLAH		15	50	65

g. Tabel 2X2 pada batas bawah normoagregasi 58%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	11	12	23
	TIDAK HIPOAGREGASI	4	38	42
JUMLAH		15	50	65

h. Tabel 2X2 bila batas bawah normoagregasi 62%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPOAGREGASI	11	15	26
	TIDAK HIPOAGREGASI	4	35	39
JUMLAH		15	50	65

Tabel 5. Tabel 2X2 dari pemeriksaan agregasi trombosit dari sediaan apus darah tepi dibandingkan pemeriksaan TAT secara nefelometrik pada berbagai nilai kemungkinan batas atas normoagregasi dari pemeriksaan sediaan apus (a) 74% (b) 73% (c) 72% (d) 70% (e) 69% (f) 68% (g) 67% (h) 66%

a. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 74%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	14	8	36
	TIDAK HIPERAGREGASI	17	26	29
JUMLAH		31	34	65

b. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 73%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	15	8	23
	TIDAK HIPERAGREGASI	16	26	42
JUMLAH		31	34	65

c. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 72%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	18	8	23
	TIDAK HIPERAGREGASI	13	26	42
JUMLAH		31	34	65

d. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 70%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	21	8	29
	TIDAK HIPERAGREGASI	10	26	36
JUMLAH		31	34	65

e. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 69%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	21	8	29
	TIDAK HIPERAGREGASI	10	26	36
JUMLAH		31	34	65

f. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 68%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	21	8	29
	TIDAK HIPERAGREGASI	10	26	36
JUMLAH		31	34	65

g. Tabel 2X2 pada batas atas normoagregasi 67%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	22	12	34
	TIDAK HIPERAGREGASI	9	22	31
JUMLAH		31	34	65

h. Tabel 2X2 bila batas atas normoagregasi 60%

		TAT (NEFELOMETRIK)		JUMLAH
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI	
SEDIAAN APUS	HIPER AGREGASI	23	13	36
	TIDAK HIPERAGREGASI	8	21	29
JUMLAH		31	34	65

Berdasarkan tabel-tabel tersebut dihitung sensitivitas dan spesifisitas beberapa titik yang diduga menjadi batas antara hipoagregasi - normoagregasi - hiperagregasi yang digambarkan pada tabel 6 untuk mencari batas hipoagregasi dan bukan hipoagregasi dan tabel 7 untuk mencari batas hiperagregasi dan bukan hiperagregasi.

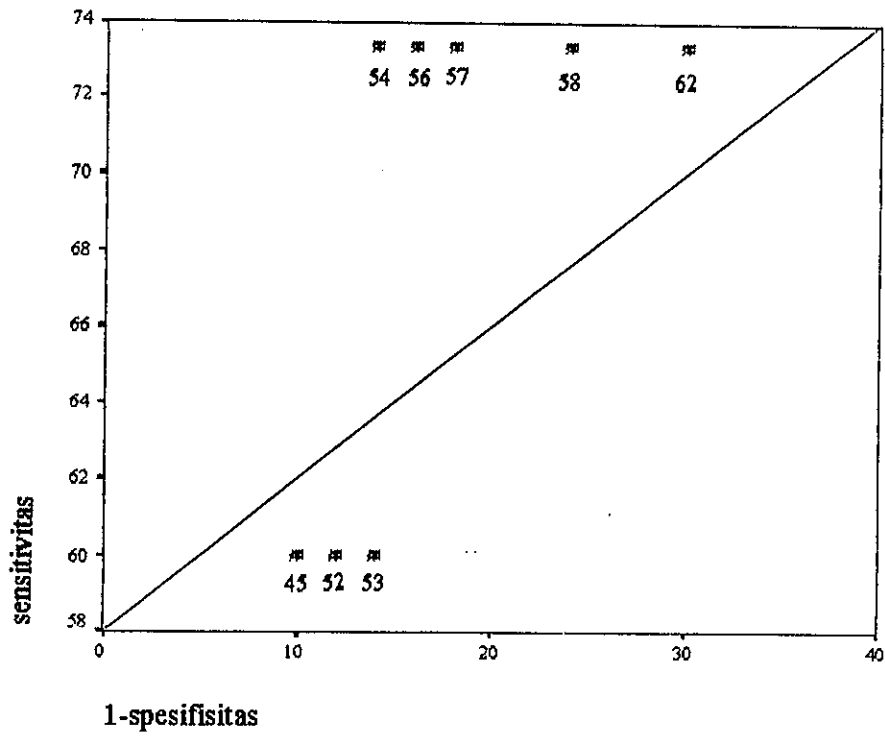
Tabel 6. Sensitivitas dan spesifisitas beberapa titik yang mungkin sebagai batas hipoagregasi dan tidak hipoagregasi

BATAS BAWAH NORMOAGREGASI	SENSITIVITAS (%)	SPESIFISITAS (%)	1 - SPESIFISITAS (%)
45	60,00	90,00	10,00
52	60,00	88,00	12,00
53	60,00	86,00	14,00
54	73,33	86,00	14,00
56	73,33	84,00	16,00
57	73,33	82,00	18,00
58	73,33	76,00	24,00
62	73,33	70,00	30,00

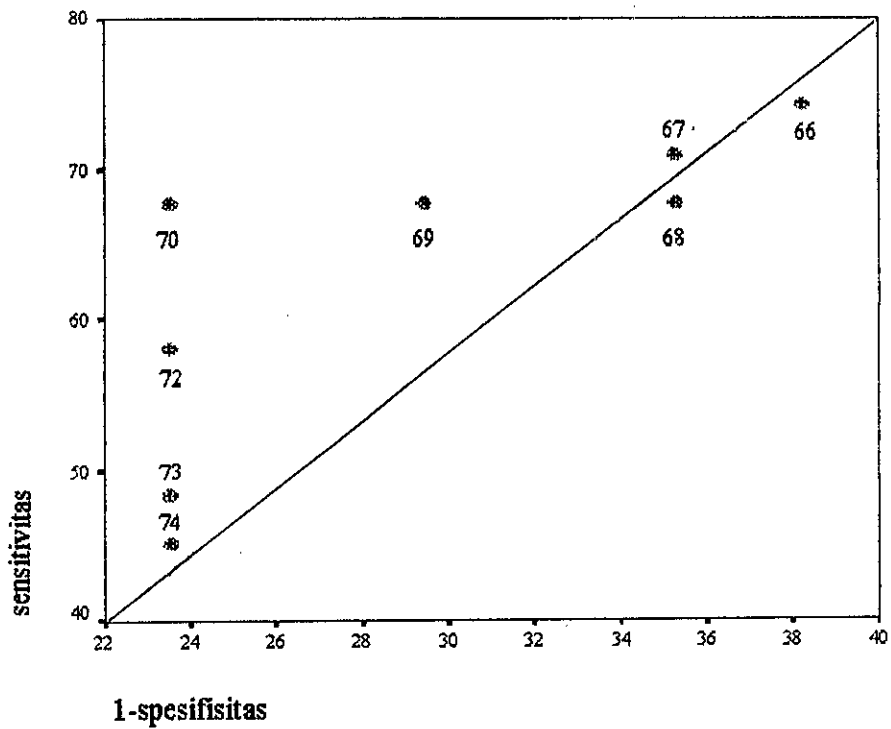
Tabel 7. Sensitivitas dan spesifisitas beberapa titik yang mungkin sebagai batas hiperagregasi dan tidak hiperagregasi

BATAS ATAS NORMOAGREGASI	SENSITIVITAS (%)	SPESIFISITAS (%)	1 - SPESIFISITAS (%)
74	45,16	76,47	23,53
73	48,39	76,47	23,53
72	58,06	76,47	23,53
70	67,74	76,47	23,53
69	67,74	70,59	29,41
68	67,74	64,74	35,29
67	70,97	64,74	35,29
66	74,19	61,77	38,23

Berdasarkan data tabel 6 dibuat kurva ROC untuk menentukan batas antara hipoagregasi dan tidak hipoagregasi. Berdasarkan tabel 7 dibuat kurva ROC untuk menentukan batas antara hiperagregasi dan tidak hiperagregasi.



Grafik 3. Kurva ROC untuk mencari batas hipoagregasi dan normoagregasi.



Grafik 4. Kurva ROC untuk mencari batas hiperagregasi dan normoagregasi.

Titik batas diambil dari titik terjauh dari garis diagonal, yaitu titik 54 pada kurva ROC grafik 3 dan titik 70 juga pada kurva ROC grafik 4. Didapatkan hasil batas bawah normoagregasi 54% sebagai batas untuk menentukan keadaan hipogregasi atau tidak dan batas atas normoagregasi 70% sebagai batas untuk menentukan keadaan hipergregasi atau tidak. Sehingga pada pemeriksaan sediaan apus darah tepi dikatakan hipoagregasi bila didapatkan hasil di bawah 54%, normoagregasi 54-70 % dan hiperagregasi lebih dari 70%.

Dengan adanya batas tersebut hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi dapat dikategorikan hipoagregasi, normoagregasi atau hiperagregasi. Uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi dilakukan dengan membandingkan hasil pemeriksaan yang diperoleh yang sudah dikategorikan hipoagregasi, normoagregasi atau hiperagregasi dengan hasil TAT metoda nefelometrik yang juga dikategorikan hipoagregasi, normoagregasi atau hiperagregasi seperti yang digambarkan pada tabel 9. Untuk itu dibuat tabel 2X2 antara hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan hasil TAT metoda nefelometrik.

Tabel 8. Tabel 2X2 hasil hipoagregasi dan tidak hipoagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik

		TAT (NEFELOMETRIK)	
		HIPOAGREGASI	TIDAK HIPOAGREGASI
SEDIAAN APUS DARAH TEPI	HIPOAGREGASI	11	7
	TIDAK HIPOAGREGASI	4	43

UPT-PUSTAK-UNDIP

Dari tabel 2X2 diatas dilakukan perhitungan sebagai berikut :

Sensitivitas : $\frac{11}{15}$: 73,33% Nilai ramal positif : $\frac{11}{18}$: 61,11%

Spesifisitas : $\frac{43}{50}$: 86,00% Nilai ramal negatif : $\frac{43}{47}$: 91,49%

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit mempunyai sensitivitas : 73,33%, spesifisitas : 86,00%, nilai ramal positif : 61,11%, nilai ramal negatif : 91,49% dibandingkan pemeriksaan TAT metoda nefelometrik dalam hal menentukan keadaan hipoagregasi atau tidak

Tabel 9. Tabel 2X2 hasil normoagregasi dan tidak normoagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik

		TAT (NEFELOMETRIK)	
		NORMOAGREGASI	TIDAK NORMOAGREGASI
SEDIAAN APUS DARAH TEPI	NORMOAGREGASI	11	17
	TIDAK NORMOAGREGASI	8	29

Dari tabel 2X2 diatas dilakukan perhitungan sebagai berikut :

Sensitivitas : $\frac{11}{19}$: 57,89% Nilai ramal positif : $\frac{11}{28}$: 39,29%

Spesifisitas : $\frac{29}{48}$: 60,42% Nilai ramal negatif : $\frac{29}{37}$: 78,38%

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit mempunyai sensitivitas : 57,89%, spesifisitas : 60,42%, nilai ramal positif : 39,29%, nilai ramal negatif : 78,38% dibandingkan TAT metoda nefelometrik dalam hal menentukan keadaan normoagregasi atau tidak.

Tabel 10. Tabel 2X2 hasil hiperagregasi dan tidak hiperagregasi pemeriksaan sediaan apus darah tepi dibandingkan TAT metoda nefelometrik

		TAT (NEFELOMETRIK)	
		HIPERAGREGASI	TIDAK HIPERAGREGASI
SEDIAAN APUS DARAH TEPI	HIPERAGREGASI	20	9
	TIDAK HIPERAGREGASI	11	26

Dari tabel 2X2 diatas dilakukan perhitungan sebagai berikut :

Sensitivitas : $\frac{20}{31}$: 64,52% Nilai ramal positif : $\frac{20}{29}$: 68,97%

Spesifisitas : $\frac{26}{35}$: 74,29% Nilai ramal negatif : $\frac{26}{37}$: 70,27%

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit mempunyai sensitivitas : 64,52%, spesifisitas : 74,29%, nilai ramal positif : 68,97%, nilai ramal negatif : 70,27% dibandingkan pemeriksaan TAT metoda nefelometrik dalam hal menentukan keadaan hiperagregasi atau tidak.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Hasil pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit mempunyai rentang dari 8% hingga 99%, rata-rata 63,68 % dan SD 20,74
- 5.1.2. Hasil TAT metoda nefelometrik mempunyai rentang dari 4,10% hingga 117%, rata-ratanya 66,67% dan SD 28,02
- 5.1.3. Hasil uji korelasi Pearson mendapatkan koefisien korelasi $r=0,463$ dengan $p=0,000$ ($p<0,01$). Berarti pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik mempunyai korelasi positif cukup dan bermakna. Pada uji beda t berpasangan antara pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik didapatkan $p=0,357$ ($p>0,05$). Berarti keduanya tidak berbeda secara statistik.
- 5.1.4. Uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit dibandingkan baku emas TAT metoda nefelometrik menunjukkan sensitivitas : 73,33%, spesifisitas : 86,00%, nilai ramal positif: 61,11%, nilai ramal negatif : 91,49% untuk menentukan keadaan hipoagregasi atau tidak. Sedangkan untuk menentukan keadaan normoagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas : 57,89%, spesifisitas : 60,42%, nilai ramal positif : 39,29%, nilai ramal negatif : 78,38% . Untuk menentukan keadaan hiperagregasi atau tidak sensitivitasnya : 64,52%, spesifisitas : 74,29%, nilai ramal positif : 68,97%, nilai ramal negatif : 70,27%

5.2. Saran

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi dapat dipakai untuk menilai fungsi agregasi trombosit di laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas yang tidak mempunyai fasilitas TAT metoda nefelometrik atau sebagai pemeriksaan skrining sebelum melakukan TAT metoda nefelometrik.

RINGKASAN

Sampai saat ini metoda yang banyak dipakai untuk menilai fungsi agregasi trombosit adalah TAT metoda nefelometrik. Sayangnya tidak semua laboratorium dapat mengerjakan pemeriksaan ini karena memerlukan alat khusus dan induktor yang cukup mahal.

Velaskar DS dan Chitre AP memperkenalkan pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menilai fungsi agregasi trombosit. Metoda ini diharapkan dapat dikerjakan disetiap laboratorium, mudah dan murah.

Diteliti tentang sejauh manakah pemeriksaan sediaan apus darah tepi dapat menilai fungsi agregasi trombosit dibandingkan TAT metoda nefelometrik, bagaimana kesesuaian hasilnya.

Dilakukan pemeriksaan terhadap 65 subyek. Sampel yang digunakan diambil dari v. Mediana Cubiti dengan menggunakan *vacutainer*. Tabung *vacutainer* berisi 0,5 ml *natrium citrate* 0,129 M 3,8 %. Digunakan 2 tabung masing-masing untuk pengambilan darah hingga volume menjadi 5 ml. Tabung I berisi 5 ml darah dan antikoagulan *natrium citrate*, dilakukan TAT metoda nefelometrik. Tabung II berisi 5 ml darah dan antikoagulan *natrium citrate*, untuk pemeriksaan sediaan apus darah tepi. Dari tabung II diambil darah 10 μ l dengan pipet lekosit dan dibuat sediaan apus (0 menit). Pada sisa darah yang ada ditambahkan adrenalin bitartras 3 μ M dengan perbandingan adrenalin bitartras 3 μ M : darah *natrium citrate* adalah 1:10 lalu digoyang agar tercampur rata, 3 menit kemudian dengan pipet lekosit diambil 10 μ l dan dibuat sediaan apus (3 menit). Sediaan apus dicat Giemsa. Pembacaan sediaan apus darah tepi dilakukan pada zone VI daerah lateral, medial dan

UPT-PUPTA N. PADIP 50

mediolateral. Dihitung banyaknya trombosit yang berkelompok dibandingkan total trombosit ketiga daerah baca tersebut. Hasil pembacaan sediaan apus menit ke-0 dan menit ke-3 dimasukkan ke rumus Velaskar dan dihitung hasil pemeriksaan fungsi agregasi trombosit.

Dilakukan pembacaan oleh 2 orang dan dibandingkan hasilnya untuk menghindari subyektifitas. Antara pembaca I dan pembaca II terdapat korelasi positif kuat bermakna ($r=0,643$ dan $p=0,000$) dan tidak berbeda secara statistik ($p=0,113$).

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi dan TAT metoda nefelometrik berkorelasi positif cukup dan bermakna ($r=0,463$ dan $p=0,000$) dan tidak berbeda secara statistik ($p=0,357$).

Uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menentukan hipoagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas 73,33%, spesifisitas 86,00%, nilai ramal positif 61,11% dan nilai ramal negatif 91,49%.

Uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menentukan normoagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas 57,89%, spesifisitas 60,42%, nilai ramal positif 39,29% dan nilai ramal negatif 78,38%.

Uji diagnostik pemeriksaan sediaan apus darah tepi untuk menentukan hiperagregasi atau tidak mempunyai sensitivitas 64,52%, spesifisitas 74,29%, nilai ramal positif 68,97% dan nilai ramal negatif 70,27%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bithell TC. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Wintrobe's clinical hematology. 9th ed. Lea & febiger. London 1993 : 511-39
2. Hoffbrand, AV, Pettit JE. Trombosit, pembekuan darah dan hemostasis. Dalam : Hoffbrand, AV, Pettit JE ed. Essential Haematology. Terjemahan : Darmawan I. Ed 2. EGC penerbit buku kedokteran. Jakarta 1987: 201-18
3. Firkin BG. Morphology of the platelet. In: Firkin BG ed. The platelet and its disorders. MTP Press limited. Victoria 1984: 9-14
4. Coller BS. Platelets and thrombolytic therapy. The New England Journal of Medicine. Vol 322. No 1. 1990 : 33-42
5. Siti Boedina Kresno. Pengantar Hematologi dan imunohematologi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta 1988: 118-20
6. Ortho Diagnostika. Pengamatan lebih dekat terhadap hemostasis. Dalam : Ortho Diagnostika. Pengantar koagulasi. Terjemahan Ortho Diagnostics Raritan. 1979: 3-5
7. Phillips J, Murray P, Crocker J. Disorders of haemostasis. In: Phillips J, Murray P, Crocker J ed. The Biology of disease. Blackwell science. 1995 : 174-82
8. Bithell TC. The physiology of primary hemostasis. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN ed. Wintrobe's clinical hematology. 9th ed. Lea & febiger. London 1993 : 541-65

9. Bithell TC. Blood coagulation. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN ed. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9 th ed. Lea & febiger. London 1993 : 567-615
10. Hoffbrand, AV, Pettit JE. Kelainan perdarahan karena abnormalitas pembuluh darah dan trombosit. Dalam : Hoffbrand, AV, Pettit JE ed. *Essential Haematology*. Terjemahan : Darmawan I. Ed2. EGC penerbit buku kedokteran. Jakarta 1987: 227-30
11. Aulia D. Pemeriksaan penyaring pada kelainan hemostasis. Dalam Rahajuningsih DS ed. *Hemostasis dan Trombosis*. Balai Penebit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta 1992: 17-25
12. Liesner RJ, Machin SJ. ABC of clinical haematology: platelet disorders. *BMJ* 1997; 314: 809
13. Rahajuningsih DS. Agregasi Trombosit. *Patologi Klinik FKUI* Jakarta 1997 : 1-11
14. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest*. Vol 105. No 6. March 2000 : 783-791.
15. Rahajuningsih DS. Obat penghambat agregasi trombosit. *Majalah Farmakologi dan Terapi Indonesia*. Vol 6. No1-2. Jakarta 1989: 1-11
16. Ruggeri ZM. Old concepts and new developments in the study of platelet agregation. *J Clin Invest*. Vol 105. No 6. March 2000 : 699-701
17. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 1 st. ed. JB Lippincott company. Philadelphia 1982 : 381-2

18. Platelet aggregation reagents: collagen, ADP, epinephrine. Sigma diagnostics. St. Louis 1994 : 1-4
19. Velaskar DS, Chitre AP. A new aspect of platelet aggregation and a test to measure it. AJCP. Vol 77. No 1. 1982 : 267-71
20. Agnoli A, Prencipe M, Pissarri FM, Cecconi V. Platelet aggregation in cerebrovascular patients. In : Agnoli A, Fazio C ed. Platelet Aggregation in the pathogenesis of cerebrovascular disorders. Springer-verlag. New York 1977 : 129-33
21. Gandasoebrata. Penuntun laboratorium klinik. Dian rakyat. Cet V. Jakarta 1985: 23-35
22. Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, Dannhauser D, Lazzaro AR, Girolami A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIb-IIIa. Journal of Clinical Pathology. Vol 47. 1994 : 625-30
23. Madan M, Berkowitz CD, Tchong JE. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. Circulation. Vol 98. 1998 : 2629-35
24. Makkar RR, Litvack F, Eigler NL, Nakamura M, Ivey PA, Forrester JS et al. Effects of GP IIb/IIIa receptor monoclonal antibody (7E3), heparin, and aspirin in an ex vivo canine arteriovenous shunt model of stent thrombosis. Circulation. Vol 95. 1997 : 1015-21
25. Kaplan AV, Leung LL, Leung WH, Grant GW, McDougall IR, Fischell TA. Roles of thrombin and platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa in platelet subendothelial deposition after angioplasty in an ex vivo whole artery model. Circulation. Vol 84. 1991 : 1279-88

26. Christopoulos C, Mattock C. Platelet satellitism and alpha granule proteins. *Journal of Clinical Pathology*. Vol 44. No 9. 1991 : 788-9
27. Jobe ML. Mechanisms of coagulation and fibrinolysis. In Steininger AL, Steinemartin EA, Koepke JA eds. *Clinical hematology principles, prosedures, correlations*. JB Lippincott company. Philadelphia 1992 : 564
28. Japimoru J. Parameter risiko trombosis pada penyakit kardio dan serebrovaskular. *Forum Diagnosticum* 4. Jakarta 1999: 1-15
29. Phillips J, Murray P, Crocker. Disorders of haemostasis. In: Phillips J, Murray P, Crocker (eds). *The biology of disease*. Blackwell Science limited. Oxford 1995: 174-82
30. Benner KU, Tamblyn CH, Swank RL, Seaman GVF. Platelet count ratio (PCR) as an additional parameter in the quantitation of aggregation in vitro. *Thrombosis Research*. Vol 17. 1980 : 801-8
31. Bode AP. Evaluation of platelet function. Helena laboratories. Newcastle 1993 : 1
32. Bambang Sutrisno J.S. Bahan pemeriksaan hematologi, cara memperoleh dan mempersiapkannya. *Workshop diagnosa hematologi I. Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran UNDIP*. Semarang 1987: 31
33. Helena laboratories. Reagent platelet aggregasi Helena. Helena. 1-11
34. Becton Dickinson & company. Characteristics of blood specimens and selected anticoagualans. *Asia pacific analyte notes*. 1997: 1-9
35. Narayanan S: Preanalytical aspect of coagulation testing. *Hematologica*. Vol 80 (supplement to no 2). 1995: 1-6

UPT-PUSTAKA-UNDIP

36. Diane JN. Platelet transfusion. In : Nathan DC, Oski FA. Hematology of infancy and children. WB Saunders company. 4th ed. Vol 2. Philadelphia 1993: 1781-3
37. Laffan MA, Bradshaw AE. Investigation of haemostasis. In: Dacie SJV, Lewis SM ed. Practical haematology. Churchill Livingstone. 8th ed. New York 1995: 305-6
38. Mutanen M, Freese R. Polyunsaturated fatty acids and platelet aggregation. Nutrition. Vol 7. 1996 : 14-9