

PENGARUH SUHU DAN WAKTU PROSES PENCAIRAN PLASMA SITRAT BEKU TERHADAP PEMERIKSAAN PROTHROMBIN TIME

Effect of Temperature and Process Time for Frozen Citrate Plasma Thawing on Examination of Prothrombin Time

Yulianingsih, Ni Made¹; Marlina, Nina¹; Durachim, Adang¹; Hayati, Eem

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung

Email: mademadeyuli@gmail.com

ABSTRACT

The Prothrombin Time examination is used to test blood clotting factors in the extrinsic and shared pathways. The specimen used was citrate plasma. Citrate plasma stored at -20°C or colder is stable for 2 weeks. Prior to the examination, frozen citrate plasma was thawed at 37°C for 10 minutes. After dissolving citrate plasma can be used for examination up to 24 hours. The type of research used was experiments using citrate plasma done immediately, citrate plasma which was delayed, namely frozen in the freezer at -20°C then thawed at 37°C for 10 minutes and 15 minutes and frozen citrate plasma thawed at room temperature 20 -25°C for 10 minutes and 15 minutes. This study aims to determine whether there is an effect of temperature and frozen citrate plasma thawing time on the Prothrombin Time examination. The research subjects were normal plasma. Checking Prothrombin Time using the Electromechanical Clot Detection method. From the results of the research data using the GLM (Generalized Linear Model) statistical test, a significant value was obtained ($\alpha > 0.05$). So it can be concluded that there is no effect of temperature and frozen citrate plasma thawing time on the Prothrombin Time examination.

Key words: Plasma Citrate, Prothrombin Time, Temperature and Liquefaction Process Time

ABSTRAK

Pemeriksaan *Prothrombin Time* digunakan untuk menguji faktor pembekuan darah pada jalur ekstrinsik dan jalur bersama. Spesimen yang digunakan adalah plasma sitrat. Plasma sitrat yang disimpan pada suhu -20°C atau lebih dingin stabil selama 2 minggu. Sebelum dilakukan pemeriksaan, plasma sitrat beku dicairkan pada suhu 37°C selama 10 menit. Setelah cair plasma sitrat dapat digunakan untuk pemeriksaan sampai dengan 24 jam. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan menggunakan plasma sitrat dikerjakan segera, plasma sitrat yang dilakukan penundaan yaitu dibekukan pada freezer suhu -20°C kemudian dicairkan pada suhu 37°C selama 10 menit dan 15 menit serta plasma sitrat beku yang dicairkan pada suhu ruang 20-25°C selama 10 menit dan 15 menit. Penelitian ini bertujuan mengetahui ada tidaknya pengaruh suhu dan waktu proses pencairan plasma sitrat beku terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time*. Subjek penelitian adalah plasma normal. Pemeriksaan *Prothrombin Time* menggunakan metode Elektromekanik *Clot Detection*. Dari hasil data penelitian menggunakan uji statistik GLM (*Generalized Linear Model*), diperoleh nilai signifikan ($\alpha > 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh suhu dan waktu proses pencairan plasma sitrat beku terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time*.

Kata kunci: Plasma Sitrat, *Prothrombin Time*, Suhu dan Waktu Proses Pencairan

PENDAHULUAN

Hemostasis adalah respon fisiologis normal tubuh untuk pencegahan dan penghentian perdarahan atau pendarahan. Salah satu tes penyaring pada hemostasis adalah pemeriksaan *Prothrombin Time*. Pemeriksaan *Prothrombin Time* digunakan untuk menguji faktor dalam proses hemostasis yaitu faktor pembekuan darah pada jalur ekstrinsik dan jalur bersama^{1,2}.

Pada pemeriksaan *Prothrombin Time*, spesimen yang digunakan adalah darah sitrat dengan antikoagulan yang digunakan yaitu Natrium Sitrat 3,2%. Pada tahap pre analitik, darah sitrat dipisahkan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 3100 rpm selama 15 menit sehingga didapatkan spesimen yang digunakan pada pemeriksaan yaitu plasma sitrat. Stabilitas plasma sitrat dapat dipengaruhi oleh suhu dan lama proses simpan sehingga akan berakibat pada penurunan faktor koagulasi^{1,3}.

Dalam pemeriksaan *Prothrombin Time*, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) merekomendasikan bahwa untuk proses simpan plasma sitrat tidak lebih dari 24 jam pada suhu ruang. Menurut sumber lain, plasma sitrat masih stabil hingga 24 jam pada suhu ruang (20-25) dan suhu *refrigerator* (2-8°C). Jika dilakukan penundaan, plasma sitrat dapat disimpan pada *freezer* dengan suhu -20°C atau lebih dingin selama 2-5 hari. Plasma sitrat beku mengandung fraksi protein dan faktor V yang masih baik, kecuali faktor VIII yang sedikit lebih rendah. Faktor V dan faktor VIII dapat menurun setelah plasma beku dicairkan pada suhu 37°C, tetapi masih bisa digunakan untuk pemeriksaan setidaknya selama 24 jam^{4,5}.

METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen, dimana tujuannya mengetahui ada tidaknya pengaruh akibat dari suatu perlakuan. Pada penelitian ini, dilakukan pemeriksaan

Prothrombin Time pada spesimen plasma sitrat yang diberikan 5 perlakuan. Spesimen plasma sitrat yang tidak ditunda (diperiksa segera), spesimen yang dibekukan pada *freezer* kemudian dicairkan pada suhu 37°C yaitu pada inkubator selama 10 menit dan 15 menit, serta spesimen yang dicairkan pada suhu 20-25 °C yaitu pada suhu ruang selama 10 menit dan 15 menit. Berdasarkan rumus Gomes, sampel yang digunakan yaitu satu plasma normal kemudian dilakukan repetisi sebanyak 6 kali.

Data penelitian yang digunakan adalah data primer yang didapatkan melalui pemeriksaan *Prothrombin Time* pada spesimen plasma sitrat yang tidak ditunda (diperiksa segera), spesimen yang dibekukan kemudian dicairkan pada suhu 37°C selama 10 menit dan 15 menit, serta spesimen yang dicairkan pada suhu 20-25 °C selama 10 menit dan 15 menit.

Data yang diperoleh dari pemeriksaan *Prothrombin Time* disajikan dalam bentuk tabel. Kemudian hasil penelitian diuji secara statistik menggunakan uji statistik GLM (*Generalized Linear Model*) *repeated measured*.

Metode yang digunakan pada pemeriksaan *Prothrombin Time* yaitu Elektromekanik *Clot Detection*. Adanya Calcium Thromboplastin dalam reagen *Prothrombin time* akan bereaksi dengan faktor pembekuan I, II, V, VII dan X membentuk bekuan dalam plasma spesimen. Kemudian waktu terbentuknya bekuan akan dibaca secara Elektromekanik.

Penelitian sudah diajukan permohonan kaji etik kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bandung No.68/KEPK/EC/III/2023.

HASIL

Hasil analisis pada penelitian ini diperoleh dari pemeriksaan *Prothrombin Time* pada spesimen plasma sitrat yang tidak ditunda (diperiksa segera),

spesimen yang dibekukan pada *freezer* kemudian dicairkan pada suhu 37°C pada inkubator selama 10 menit dan 15 menit, serta spesimen yang dicairkan pada suhu 20-25 °C yaitu pada suhu ruang selama 10 menit dan 15 menit.

Sebelum dilakukan penelitian pemeriksaan *Prothrombin Time*, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan *Prothrombin Time* terhadap 2 level

kontrol menggunakan kontrol pabrikan yaitu *Lypocheck Coagulation*. Hal ini bertujuan sebagai upaya pemantapan mutu dan evaluasi proses analitik bahwa prosedur pemeriksaan telah dilaksanakan dengan baik dan benar.

Hasil pemeriksaan kontrol level 1 dan level 2 terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time* terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Data hasil kontrol *Prothrombin Time*

<i>Prothrombin Time</i> (detik)		Range ± 1 SD (detik)
Level 1	Level 2	
13,0	35,5	Level 1 = 12.45 – 13.75 Level 2 = 34.35 – 35.65
13,2	34,9	
12,7	34,7	
13,3	34,4	
13,7	34,7	

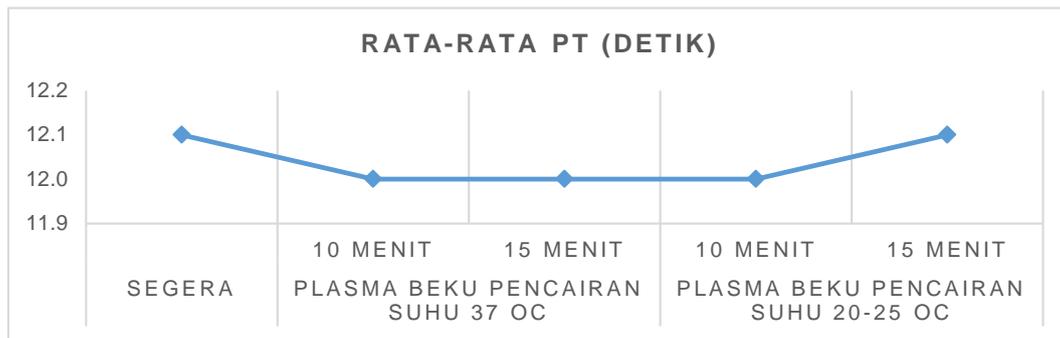
Dari seluruh hasil pemeriksaan kontrol *Prothrombin Time* yang telah dilakukan, semua nilai masuk dalam nilai rentang (TV ± 1 SD) Level 1 = 12.45 – 13.75 detik, dan Level 2 = 34.35 – 35.65 detik sehingga dinyatakan bahwa

seluruh kegiatan pemeriksaan spesimen valid.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap subjek penelitian terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time* diperoleh data sebagai terdapat pada tabel 2

Tabel 2. Data Hasil Pemeriksaan *Prothrombin Time*

Pengulangan	PT (detik)				
	Segera	Plasma beku pencairan suhu 37 °C		Plasma beku pencairan suhu 20-25 °C	
		10 menit	15 menit	10 menit	15 menit
1	11,8	11,6	11,8	12,0	12,0
	12,1	11,9	11,7	12,0	12,1
2	11,7	11,5	11,5	11,5	11,5
	12,1	11,9	11,9	12,0	12,2
3	11,7	12,1	11,8	12,0	11,9
	12,3	12,1	12,3	12,3	12,3
4	11,8	11,7	11,9	11,8	12,0
	12,5	12,2	12,4	12,2	12,3
5	11,6	11,9	11,6	12,0	11,9
	12,5	12,1	12,5	12,2	12,2
6	12,1	12,2	11,9	12,0	12,1
	12,5	12,4	12,1	12,4	12,4
Rata-rata	12,1	12,0	12,0	12,0	12,1



Gambar 1. Grafik rata-rata Hasil *Prothrombin Time*

Hasil *Prothrombin Time* dari spesimen plasma sitrat yang dikerjakan segera sebesar 12.1 detik, plasma sitrat yang dibekukan kemudian dicairkan pada suhu 37°C selama 10 menit sebesar 12.0 detik, plasma sitrat yang dibekukan kemudian dicairkan pada suhu 37°C selama 15 menit sebesar 12.0 detik, plasma sitrat yang dibekukan kemudian dicairkan pada suhu 20-25°C 10 menit sebesar 12.0 detik, dan spesimen plasma sitrat yang dibekukan

kemudian dicairkan pada suhu 20-25°C selama 15 menit sebesar 12.1 detik.

Data di atas menunjukkan perbedaan hasil dari masing-masing perlakuan tidak berbeda jauh. Namun untuk mengetahui perbedaan hasil yang signifikan diantara variasi waktu dan suhu pencairan plasma sitrat beku, maka selanjutnya dilakukan pengolahan data secara spesifik menggunakan Uji Statistik GLM (*Generalized Linear Model*).

Pengolahan Data secara Statistik

Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Pemeriksaan *Prothrombin Time Shapiro-Wilk*

Suhu Pencairan	Waktu Pencairan	Nilai Signifikan	Nilai α	Keterangan
Segera	Segera	0.113	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
37°C	10 menit	0.585	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
	15 menit	0.716	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
20-25°C	10 menit	0.064	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
	15 menit	0.306	>0.05	Tidak terdapat perbedaan

Pada uji normalitas diperoleh data hasil seperti tabel 3. Jumlah sampel yang digunakan yaitu 12, artinya jumlah spesimen data untuk masing-masing kelompok kurang dari 50. Sehingga digunakan uji normalitas dengan teknik *Saphiro-Wilk*. Hasil uji normalitas

Saphiro-Wilk diperoleh nilai sig > α (0,05) untuk semua perlakuan, sehingga dapat disimpulkan bahwa data hasil penelitian berdistribusi normal. Dengan demikian dapat dilanjutkan untuk dilakukan uji statistik GLM (*Generalized Linear Model*). Hasil uji statistik GLM

(*Generalized Linear Model*) terdapat pada table 4.

Tabel 4. Hasil Pemeriksaan *Prothrombin Time* dengan Uji Statistik GLM (*Generalized Linear Model*)

		Nilai Signifikan
Suhu dan Waktu	Pillai's Trace	0,183
Pencairan Plasma	Wilks' Lambda	0,183
Sitrat beku	Hotelling's Trace	0,183
	Roy's Largest Root	0,183

		Nilai Signifikan	Nilai α	Keterangan
Suhu dan Waktu Pencairan Plasma Sitrat beku	Sphericity Assumed	.103	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
	Greenhouse-Geisser	.137	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
	Huynh-Feldt	.116	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
	Lower-bound	.179	>0.05	Tidak terdapat perbedaan
	Sphericity Assumed			
	Greenhouse-Geisser			
	Huynh-Feldt			
	Lower-bound			

Berdasarkan tabel hasil uji GLM diatas, terdapat 4 hasil analisis yaitu Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace, dan Roy's Largest Root dari masing-masing analisis tersebut nilai Sig. dari output adalah 0,183. Karena nilai Sig (0,183) > α (0,05) untuk selanjutnya yang digunakan adalah data Sphericity Assumed dan diperoleh nilai Sig (0,103) > α (0,05). Dengan demikian maka H_0 diterima, hal ini berarti tidak ada pengaruh antara spesimen plasma sitrat yang dikerjakan segera, plasma sitrat yang dibekukan kemudian dicairkan pada suhu 37°C selama 10 menit dan 15 menit, serta plasma sitrat yang dibekukan kemudian dicairkan pada suhu 20-25°C selama 10 menit dan 15 menit terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time*.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan spesimen plasma sitrat normal yang sudah disentrifuge pada kecepatan 3100 rpm selama 15 menit. Plasma sitrat dialiquoting ke dalam *cup fisher* dengan volume 160 μ L, kemudian dibekukan pada *freezer* dengan suhu \pm 20°C. Saat pemeriksaan *Prothrombin Time*, *cup fisher* diambil sesuai dengan perlakuan yang digunakan, sehingga proses pencairan dilakukan satu per satu.

Dalam suatu studi, plasma sitrat yang disimpan pada suhu -20°C akan stabil selama 2 minggu. Berdasarkan hal tersebut dapat diartikan bahwa pada plasma sitrat beku, faktor koagulasi pada jalur ekstrinsik dan jalur

bersama masih dalam keadaan baik dan layak digunakan untuk pemeriksaan. Pada studi lain juga dijelaskan bahwa plasma sitrat juga dapat disimpan pada suhu -20°C akan stabil selama 2 minggu atau kurang. Penyimpanan plasma sitrat beku dalam waktu yang lebih lama dapat menggunakan freezer dengan suhu -70°C . Direkomendasikan menggunakan freezer yang tidak memiliki siklus pencairan otomatis dan suhu freezer harus dipantau secara berkala menggunakan thermometer agar suhu sesuai dengan yang dianjurkan. Ketidaksihesuaian suhu akan mengakibatkan degradasi faktor pembekuan⁶.

Sebelum dilakukan pemeriksaan, plasma sitrat beku harus dicairkan terlebih dahulu. Menurut studi, pencairan plasma sitrat dilakukan pada suhu 37°C selama 5 – 10 menit atau sudah mencair seluruhnya. Proses pencairan plasma sitrat beku dapat dilakukan menggunakan plasma thawer dengan suhu berkisar 30 - 37°C . Sebagai alternatif maka dapat menggunakan waterbath dengan suhu berkisar $30-37^{\circ}\text{C}$. Penggunaan suhu pencairan yang lebih tinggi akan berpengaruh pada rusaknya protein dan faktor pembekuan^{7,8}.

Dalam hipotesis penelitian ini terbukti, bahwa suhu dan waktu pada proses pencairan plasma sitrat tidak ada pengaruh terhadap hasil *Prothrombin Time*. Hal tersebut dikarenakan hasil *Prothrombin Time* masih sesuai dengan standar walaupun terdapat variasi hasil. Variasi hasil dapat terjadi karena pada plasma sitrat terdapat faktor koagulasi yang bersifat labil yaitu faktor V dan faktor VIII⁵.

Setelah plasma sitrat dicairkan, aktivitas faktor pembekuan, khususnya faktor V dan faktor VIII menurun secara bertahap. Terdapat juga faktor VII yang memiliki waktu paruh yang cukup pendek sehingga apabila pemeriksaan hemostasis tidak segera dilakukan maka akan menghambat faktor-faktor pembekuan yang mengakibatkan

penurunan aktivitas faktor pembekuan^{9,10}.

Pemeriksaan *Prothrombin Time* dipengaruhi juga oleh kestabilan dan tata cara pengambilan dan pengolahan spesimen. Hal tersebut tidak menjadi fokus utama petugas laboratorium. Hasil *Prothrombin Time* yang memanjang dan memendek juga sangat dipengaruhi oleh ketepatan saat proses pemipetan reagen, suhu dan waktu penyimpanan spesimen serta proses transportasi spesimen jika dibutuhkan. Pengaruh lama penyimpanan spesimen plasma sitrat terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time* dapat membuat terhambatnya aktivitas dari faktor-faktor pembekuan yang ada, sehingga hasil pemeriksaan dapat memendek atau rendah palsu. Hal tersebut terjadi dikarenakan karbondioksida akan keluar dari plasma sehingga menyebabkan pH plasma menjadi meningkat. Meningkatnya pH berakibat pada perubahan aktivitas faktor pembekuan yang bersifat labil yaitu faktor V dan faktor VII^{6,11}.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh suhu dan waktu proses pencairan plasma sitrat yang dibekukan terhadap pemeriksaan *Prothrombin Time*. Sehingga dapat dilakukan pemeriksaan *Prothrombin Time* menggunakan plasma sitrat beku yang dicairkan pada suhu 37°C selama 15 menit serta plasma sitrat beku yang dicairkan pada suhu $20-25^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit dan 15 menit. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk waktu pencairan kurang dari 10 menit. Dapat juga dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh suhu dan waktu pencairan plasma sitrat beku untuk parameter pemeriksaan koagulasi lain seperti APTT dan Fibrinogen.

DAFTAR RUJUKAN

1. Sridianti, (2022). Hemostasis: proses hemostatik, primer dan sekunder. <https://sridianti.com/hemostasis-proses-hemostatik-primer-dan-sekunder.html> Diakses pada Tanggal 11 Agustus 2022
2. Durachim, A., & Astuti, D. (2018). *Hemostasis*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
3. Gandasoebrata, R. (2016). *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: PT. Dian Rakyat
4. Waterbury, L. M. (2001). *Hematologi*. Jakarta: EGC
5. Foshat, M., Bates, S., dkk, (2015). *Effect of freezing Plasma at 20°C for 2 Weeks On Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, Dilute Russell Viper Venom Time, Activated Protein C Resistance, and D-Dimer Levels.*, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, Vol 21(1) 41-47
6. Dorothy M. Adcock., Steve Kitchen., Ray Dauer., Ann-Helen Kristoffersen., Giuseppe Lippi, Ian Mackie., Richard A. Marlal, Sukesh Nair. (2021). *International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.13702>. Diakses pada tanggal 27 Mei 2023
7. Adiyanti, S. S. (2014). Pre Analitik Pemeriksaan Hemostasis. Departemen Patologi Klinik FKUI-RSCM
8. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 91 Tahun 2015 tentang Standar Pelayanan Transfusi Darah
9. Hina Khawar., Walt Kelley., Joshua B. Stevens., Nilmarie Guzman. (2022). *Fresh Forezen Plasma (FFP)* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513347/>. Diakses pada tanggal 27 Mei 2023
10. Wiyata, B. (2014). APTT Masa Rekal PPT http://scholar.google.co.id/scholar?hl=id&as_sdt+0,5&as_vis+1&q=artikel+penyimpanan+plasma+untuk+uji+waktu+prothrombin. Diakses pada tanggal 27 Mei 2023
11. Price, S., & Lioraine, M. (2005). *Patofisiologi Klinik Proses-Proses Penyakit* (Vol 1 ed.). Jakarta: EGC.