

KAPPA TEST WITH PLATELET RICH PLASMA (PRP) AND PLATELET POOR PLASMA (PPP) BLOOD PREPARATION METHOD FOR EXAMINING THE VALUE OF ACTIVATED PARTIAL TROMBOPLASTIN TIME (APTT) AND PLASMA PROTROMBIN TIME (PPT)

Ratih Hardisari, Supartuti

Health Analyst Department, Health Polytechnic of Ministry of Health in Yogyakarta

Ngadinegaran MJ III/62 Yogyakarta 55143; email: ratihhardisari@gmail.com

ABSTRACT

Examining the Activated Partial Thromboplastin (APTT) and Plasma Protrombin Time (PPT) is sort series of examining homeostasis which is conducted in order to have screening test for homeostasis disorder. This examination used plasma sample in which there were solidification factors which could be influenced by thrombocyte existence. The centrifuging of citrate blood sample which was conducted too fast or too slow would cause plasma condition with the number of thrombocyte. Practical in some laboratories were not yet been uniformed, mainly in centrifuging of citrate blood to obtain citrate plasma with less thrombocyte contents. To identify the value of Kappa by compatibility test between two methods PRP and PPP to examine PPT and APTT. This experiment is true experiment with post test research design without control. Citrate plasma sample was obtained from 10 sample of students' blood which had one pair, 2 treatments; by centrifuging 3000 rpm for 10 minutes for PPP and centrifuging 1000 rpm for 10 minutes for PRP. Then, both methods (PPP and PRP) were examined by using PPT and APTT parameter. In the result of PPT examination in the sample of PRP plasma, the average value was 11.6 seconds. In the sample of PPP, the average value was 11.0 seconds. The result of APTT examination in PRP sample, the average value was 34.27 seconds while in PPP sample was 33.18 seconds. There were compatibility in the result, either PPP method and PRP for PPT and APTT examination (Kappa = 1).

Keywords: PRP, PPP, APTT, PPT, Kappa.

INTISARI

Latar Belakang : Pemeriksaan Activated Partial Thrombolastin Time (APTT) dan Plasma protrombin Time (PPT) merupakan serangkaian jenis pemeriksaan hemostasis dilakukan dalam rangka uji screening atas kelainan hemostasis. Pemeriksaan ini menggunakan sampel plasma yang didalamnya terdapat faktor-faktor pembekuan yang dapat dipengaruhi keberadaan sel trombosit. Pemusingan sampel darah sitrat yang dilakukan terlalu cepat atau terlalu lambat akan menyebabkan kondisi plasma dengan variasi jumlah trombosit. Praktek di sebagian laboratorium belum ada keseragaman terutama pemusingan darah sitrat untuk mendapatkan plasma sitrat dengan kandungan sedikit trombosit.

Tujuan penelitian : Untuk mengetahui nilai Kappa dari uji kesesuaian antara dua metode PRP dan PPP untuk pemeriksaan PPT dan APTT.

Metode penelitian : Penelitian ini merupakan penelitian true experiment dengan rancangan penelitian post test without control. Sampel plasma sitrat didapatkan melalui 10 sampel darah sisa yang berpasangan satu 2 perlakuan yaitu dengan pemusingan 3000 rpm selama 10 menit untuk PPP dan pemusingan 1000 rpm selama 10 menit untuk PRP. Kemudian kedua metode (PPP dan PRP) diperiksa dengan parameter PPT dan APTT.

Hasil penelitian : Pada hasil pemeriksaan PPT pada sampel plasma PRP didapatkan nilai rerata 11,6 detik pada sampel PPP didapatkan rerata 11,0 detik. Hasil pemeriksaa APTT pada sampel PRP nilai rerata 34.27 detik dan pada sampel PPP rerata 33,18 detik. Ada kesesuaian hasil yang sangat baik antara metode PPP dan PRP untuk pemeriksaan PPT dan APTT (Kappa=1)

Kesimpulan : Ada kesesuaian hasil yang sangat baik antara metode PPP dan PRP untuk pemeriksaan PPT dan APTT (Kappa=1)

Kata kunci : PRP, PPP, APTT, PPT, Kappa

PENDAHULUAN

Hemostasis adalah mekanisme tubuh untuk menghentikan perdarahan secara spontan. Hemostasis didukung oleh beberapa sistem, yaitu sistem vaskuler, trombosit dan pembekuan darah. Pemeriksaan hemostasis biasanya dilakukan sebelum operasi. Beberapa klinisi membutuhkan pemeriksaan hemostasis untuk semua penderita preoperasi, tetapi ada juga yang membatasi hanya pada penderita dengan riwayat gangguan hemostasis. Beberapa jenis tes penyaring hemostasis adalah, *Bleeding Time* (BT), hitung trombosit, *Protrombin Time* (PT), *Activated Partial Tromboplastin Time* (APTT) dan *Trombin Time* (TT).¹

Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam pemeriksaan APTT adalah perbandingan Na-sitrat sebagai antikoagulan dan lama pendiaman darah-sitrat (Jones dan Wickramasinghe,1995). Selain itu, plasma untuk pemeriksaan APTT adalah *Platelet-Poor Plasma* (PPP). PPP adalah plasma dengan jumlah trombosit <10.000/mm³. Pembuatan PPP sangat dipengaruhi oleh kecepatan dan waktu sentrifugasi. Menurut *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), PPP diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 2000 g (3500 rpm) selama 10 menit atau dengan kecepatan lebih rendah selama 10-30 menit.²

Pemeriksaan hemostasis khususnya PPT dan APTT sangat dipengaruhi oleh faktor pra analitik saat persiapan plasma sitrat. Ada faktor-faktor yang diperhatikan sejak cara pengambilan darah, dosis dan pencampuran darah sitrat, pemusingan, pengiriman dan penyimpanan sampel. Faktor analitik teknik pemeriksaan, alat atau instrumentasi, kalibrasi alat. Pemusingan sampel darah sitrat sampai saat ini belum ada keseragaman setiap laboratorium tentang berapa lama dan berapa kecepatan pemusingan sehingga diperoleh sample plasam sitrat yang tepat. Akibatnya plasma sitrat bisa dalam kondisi plasma kaya trombosit (PRP) atau plasma miskin trombosit (PPP).³

Semua hasil pemeriksaan tidak dapat terlepas dari faktor kesalahan, Faktor factor tersebut tersebut instrumentasi kususnya coagulometer, sentrifugasi dan perbandingan darah dengan antikoagulan⁴. Laboratorium terakreditasi sudah melakukan pemantapan mutu internal baik pada praanalitik, analitik dan pascaanalitik untuk mengurangi kesalahan dalam pengukuran suatu parameter

klinik .Penelitian di laboratorium terakreditasi ini ingin mengetahui adakah kesesuaian antara dua metode PPP dan PRP pada pemeriksaan PPT pemeriksaan PPT dan APTT.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen untuk menguji kesesuaian hasil antara 2 metode preparasi darah yaitu sampel PPP dan PRP dalam penentuan nilai APPT dan APP.Penelitian dilakukan di lokasi yang dipilih secara purposive yakni di laboratoriu klinik yang sudah terakreditasi di wilayah Kotabaru Kota Yogyakarta.

Model penelitian adalah berupa sampel darah dilakukan pemusingan dengan 2 kecepatan yang berbeda yaitu 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan sampel miskin trombosit (PPP) dan 1000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan sampel kaya trombosit (PRP) .Wadah yang direkomendasikan untuk menampung plasma untuk pemeriksaan hemostasis menggunakan tabung kaca yang berlapis silicon atau dari bahan plastik, kedua bahan ini permukaan dalam lebih halus sehingga tidak memacu aktivasi trombosit. Instrumentasi meliputi pipet otomatis, sentrifius dan koagulometer harus selalu dikalibrasi secara rutine untuk menjamin kualitas hasil pengukuran. Cara penggunaan alat alat tersebut dilakukan sesuai IKA (Instruksi Kerja Alat) . Laboratorium. tempat penelitian menggunakan coagulometer Sysmex CA-50 .

Perhitungan jumlah sampel minimum menggunakan perhitungan kappa berdasarkan perhitungan oleh Lee (2000) untuk nilai $\alpha=0,05$ dan $\beta=0,1$ (Power = $1-\beta$). Asumsi nilai parameter bebas yaitu $p_1=0,5$, $p_2=0,505$, $p_3=0,505$ dan asumsi $\Delta k=0,2$. Pada table 3.1 pada Lee (2000) diperoleh jumlah sampel minimum (n) sebesar 9 sampel. Bila β diambil 0,2 diperoleh $n=7$ dan $\beta=0,05$ diperoleh $n=11$. Untuk penelitian ini diambil sampel 10 untuk memenuhi nilai $\beta=0,1$. Teknik pengambilan sampel menggunakan cara *quota purposive sampling*. Perlakuan dengan metode preparasi PRP dan PPP menggunakan 10 *paired sample* yang kemudian dilakukan semuanya mendapat pemeriksaan PPT dan APPT.⁴

Analisis diskriptif dilakukan dengan menyajikan hasil dalam bentuk tabel dan grafik untuk mengetahui selisih atau perbedaan tinggi rendahnya nilai APTT, PPT masing-masing jenis plasma PRP dan PPP. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji Kappa untuk mengetahui nilai kesesuaian hasil kedua metode yaitu menggunakan rumus Koefisien Kappa dari Cohen (κ) didefinisikan oleh Fleiss yaitu,

$$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

Dengan $p_0 = p_{11} + p_{22}$ dan $p_e = p_{1.} \cdot p_{.1} + p_{2.} \cdot p_{.2}$, perhitungan menggunakan tabel 2 x 2 Uji Koefisien Kappa.⁴

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan perbedaan nilai *Activated Partial Tromboplastin Time* (APTT) dan *Plasma Protrombin Time* (PPT) pada sampel plasma sitrat dengan keadaan *Platelet Rich Plasma* (PRP) dan dalam keadaan *Platelet Poor Plasma* (PPP) di laboratorium klinik sudah terakreditasi di daerah Kotabaru Yogyakarta terhadap 10 sisa sampel darah pasien yang kemudian perlakukan dengan dua pemusingan untuk mendapatkan PPP dan PRP untuk diperiksa nilai PPT dan APTT, selanjutnya dilakukan analisis diskriptif untuk menentukan nilai maksimum, nilai minimum, rerata, dan simpang baku yang dapat dilihat pada table 2 berikut.:

a. Analisis Diskriptif

Tabel 2. Analisis Deskriptif

Pemeriksaan	Metode Preparasi	Minimum (detik)	Maksimum (detik)	Rerata (detik)	Simpang baku	Nilai
PPT	PRP	11,0	12,2	11,6	0,40552	Normal
	PPP	10,3	11,9	10,97	0,49227	Normal
APTT	PRP	31,1	37,2	34,27	1,87679	Normal
	PPP	30,5	35,2	33,18	1,46652	Normal

Untuk mengetahui hasil selisih atau perbedaan panjang pendeknya nilai PTT pada plasma PPP dan PRP adalah :

$$\frac{\text{Rerata nilai PTT pada PRP} - \text{rerata nilai PPT PRP}}{\quad} \times 100\%$$

$$\begin{aligned}
 & \text{Rerata nilai PTT PRP} \\
 &= \frac{11,6 - 10,97}{10,97} \times 100 \% \\
 &= 5,74
 \end{aligned}$$

Besar selisih nilai PPT pada sampel PRP terhadap PPP adalah $\pm 5,74$ detik, suatu nilai yang cukup panjang dan potensi menjadi nilai yang abnormal .karena nilai rujukan PPT pada 10,0- 14,0 detik dengan selisih terhadap nilai plasma kontrol 2 detik.

Untuk mengetahui hasil selisih atau perbedaan panjang pendeknya nilai APTT pada plasma PPP dan PRP adalah :

$$\begin{aligned}
 & \frac{\text{Rerata nilai APTT pada PRP} - \text{rerata nilai APPT PRP}}{\text{Rerata nilai APTT PRP}} \times 100\% \\
 &= \frac{34,27 - 33,18}{33,18} \times 100 \% \\
 &= 3,28
 \end{aligned}$$

Besar selisih nilai APPT pada sampel PRP terhadap PPP adalah $\pm 3,28$ detik, suatu nilai yang relatif dalam batas toleransi .karena nilai rujukan APPT pada 25,0- 35,0 detik dengan selisih terhadap plasma kontrol adalah 5 detik.

b. Analisis Kappa

Penentuan uji Kappa untuk mengetahui nilai kesesuaian hasil kedua metode preparasi (PPP dan PRP). Dengan persamaan dari Cohen diperoleh nilai kapa ≈ 1 untuk pemeriksaan PPT dan APTT yang menunjukkan interpretasi hasil yang sangat baik dari kesesuaian antara kedua metode tersebut. Dengan demikian metode preparasi PPP dan PRP untuk pemeriksaan APTT dan PPT memiliki kesesuaian hasil yang sangat tinggi.

Dari hasil penelitian didapatkan kecenderungan plasma dengan kandungan trombosit yang kaya trombosit (PRP) dan plasma miskin trombosit (PPP) masih dalam batas normal. Hasil pemeriksaan APTT pada sampel PRP dan pada sampel PPP secara statistik tidak ada perbedaan bermakna. Dalam interpretasi hasil

pemeriksaan PPT dan APTT ada acuan untuk menyatakan patologis tidaknya hasil tes dengan mengacu pada nilai pada plasma kontrol. Untuk APTT toleransi nilai sampel tes terhadap plasma kontrol adalah ± 5 detik sedangkan pada PPT toleransi nilai sampel dengan plasma kontrol adalah 2 detik. Artinya jika hasil sampel tes masih masuk batas toleransi tersebut masih dimasukkan kriteria nilai normal.

Hasil penelitian dengan rerata pada sampel pada PPT yang nilai (normalnya 10 - 14 detik) dengan toleransi terhadap nilai PPT plasma kontrol ± 2 detik didapatkan semua hasil penelitian hasilnya diantara nilai normal. Sedangkan untuk hasil pemeriksaan APTT (nilai normal :25-35 detik) dengan toleransi terhadap nilai APPT plasma kontrol ± 5 detik didapatkan semua sampel masuk dalam rentalam rentang nilai normal.

Pada sampel PPP dan PRP secara teknis berbeda cara memperolehnya tetapi hasil pemeriksaan PPT dan APTT menunjukkan nilai normal. Hal ini sesuai dengan Uji Kappa dengan nilai 1 untuk pemeriksaan PPT dan APTT artinya hasil interpretasinya sangat baik dari kesesuaian kedua metode dalam sampel antara PPP dan PRP.

Pada laboratorium yang terakreditasi sudah ada standar kerja untuk persiapan sampel pemeriksaan APTT dan PPT dalam hal pemusingan menggunakan sentrifius. Di laboratorium tempat penelitian ini , sehari hari pemusingan sampel darah sitrat dipusingkan pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit (plasma PPP). Hasil penelitian ini dengan membandingkan pemusingan antara 1000 rpm dan 3000 rpm ternyata hasil PPT dan APTT masih rentang normal, artinya ada kesesuaian.

Melihat selisih hasil PPT antara sampel PPP dan PRP (5,74) menunjukkan sebenarnya plasma PRP ternyata memberikan nilai yang lebih panjang, sedangkan secara teoritis semakin banyak trombosit akan semakin memacu aktifitas mekanik maupun chemis sehingga akan mempercepat masa koagulasi.

Sel trombosit dalam plasma dengan jumlah yang sedikit memberikan gambaran saat penetapan PPT dan APTT bahwa yang terukur hanyalah faktor

faktor pembekuan jalur ekstrinsik, jalur instrinsik maupun jalur bersama. Hal ini karena trombosit yang mengandung jumlah yang signifikan dari berbagai faktor koagulasi yaitu fibrinogen, faktor V, von Willebrand faktor, faktor XI, faktor XIII dan *High Molekular Weight Kininogen* (HMWK). Beberapa dari faktor-faktor ini (fibrinogen, faktor V, vWF dan HMWK) dapat memicu aktivasi faktor faktor pembekuan untuk meningkatkan aktifitas koagulasi, sehingga plasma untuk tes PPT dan APTT direkomendasikan dengan sampel miskin trombosit.⁵

Kandungan fibrinogen dalam sel trombosit secara biokimia berbeda dengan fibrinogen plasma, Fibrinogen yang terikat dipermukaan (*Surface-bound fibrinogen*) yang penting untuk agregasi trombosit dilanjutkan dengan induksi oleh ADP dan mungkin terlibat dalam fungsi trombosit yang lain. Von Willebrand Factor (vWF), merupakan suatu subunit dari faktor VIII yang mempunyai berat molekul besar, terdapat dalam megakariosit, pada membrane trombosit, dan konsentrasi yang lebih besar pada α -granule. Susunan plasma dan bentuk trombosit dari vWF berikatan ke glikoprotein dan glikolipid pada membran trombosit, walaupun hanya vWF plasma yang penting untuk adhesi trombosit normal.⁵

Dengan hasil penelitian ini menurut peneliti perlu di analisis faktor pre analitik misal pengambilan darah, homogenisasi sampel, suhu ruang dan instrumentasi . Pengambilan darah dengan beberapa kali penusukan, pemasangan tourniquet terlalu lama memungkinkan sampel darah tercampur tromboplastin jaringan yang akan memacu aktifitas jalur ekstrinsik (PPT). Berikutnya sampel yang tidak homogen sempurna dengan antikoagulan akan memulai koagulasi lebih cepat, demikian juga dengan suhu ruang yang tinggi akan meningkatkan aktifitas faktor pembekuan . Faktor instrumentasi terutama sentrifius dan koagulometer yang tidak teratur dilakukan kalibrasi dapat memberikan hasil yang kurang akurat.

Semua hasil pemeriksaan tidak dapat terlepas dari faktor kesalahan. nilai parameter sebenarnya yang akan ditentukan dari suatu perhitungan analitik tersebut adalah ukuran ideal. Nilai tersebut hanya bisa diperoleh jika semua

penyebab kesalahan pengukuran dihilangkan dan jumlah populasi tidak terbatas. Faktor penyebab kesalahan ini dapat disebabkan oleh berbagai hal antara lain adalah peralatan, reagensia, dan kondisi pengukuran dan lain-lain. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengurangi kesalahan dalam pengukuran analitik adalah dengan proses kalibrasi⁷.

Mengacu pada konsep teoritis kemudian membandingkan dengan hasil penelitian yang diperoleh, ada keterbatasan penelitian ini terutama jumlah sampel yang terbatas, sehingga perlu penelitian lanjutan dengan proporsi jumlah sampel yang lebih banyak lagi untuk memastikan bahwa sampel untuk pemeriksaan PPT dan APTT dipastikan PPP sehingga diyakini hanya factor ekstrinsik (PPT) dan intrinsik (APTT) saja yang terkoreksi.

KESIMPULAN

Ada kesesuaian hasil yang sangat baik antara metode PPP dan PRP untuk pemeriksaan PPT dan APTT (Kappa=1).

DAFTAR PUSTAKA

1. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2007. *Hemostasis dan Trombosis (Edisi ke-3)*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
2. Sultan, A. 2007. Five-Minute Preparation of Platelet-Poor Plasma for Medical Laboratory Technology. *Eastern Mediteranean Health Journal Vol.16 No.2 Th. 2010*. Sharjah : University of Sharjah.
3. Suliarni. 2003. Aktifitas Faktor VII pada Sepsis. *USU Digital Library* . Diunduh pada 20 November 2012.
4. Lee, T-S., 2002, *On Determination of Sample Size for the Positive Kappa Coefficient*, <http://www.amstat.org/sections/SRMS/proceedings/y2002/files/JSM2002-001144.pdf> > (Accessed 4 April 2015)
5. Hoffbrand, A.V., Petit, J.E., Mosskapita, P.A.H.. 2005. *Kapita Selekt Hematologi (Edisi 4)*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.

6. Mehta, A. dan Hoffbrand, V.. 2002. *At a Glance Hematologi (Edisi ke-2)*. Jakarta : penerbit Erlangga
7. Tahir, Iqmal. Arti Penting Kalinrasi pada Proses Pengukuran Analitik : Aplikasi pada Penggunaan pHmeter dan Spektrofotometer UV-Vis.*Paper Seri Manajemen Laboratorium*. Diunduh pada tanggal 14 Desember 2012 dari www.ugm.ac.id