

LEMBAR PENGESAHAN

KORELASI KADAR FIBRIN MONOMER (FM) DAN AKTIVITAS MIKROPARTIKEL (MP) DENGAN KADAR FIBRINOGEN PADA PASIEN AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA (AIHA)

Oleh:

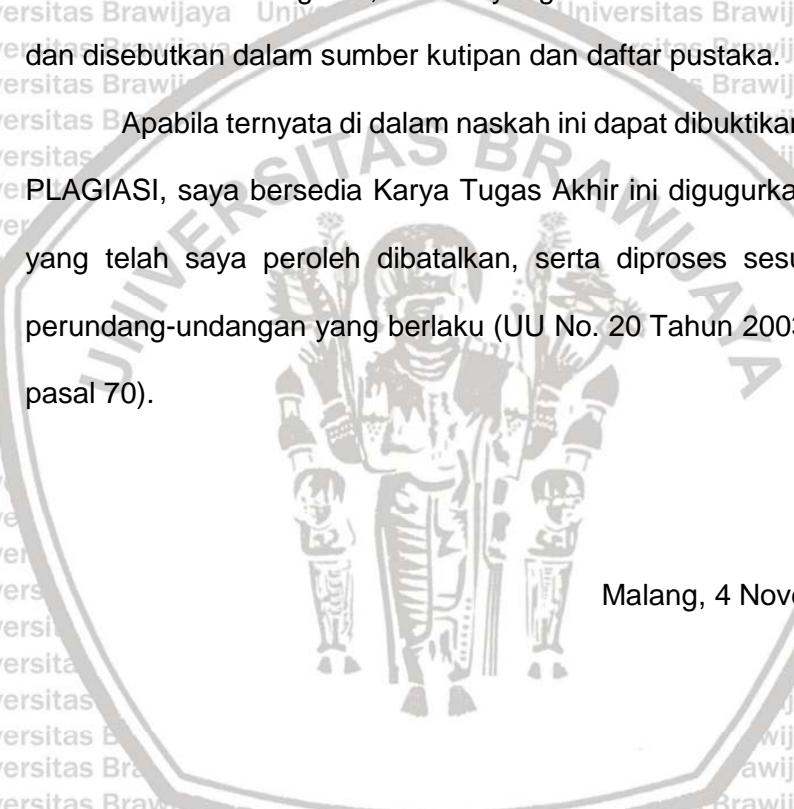
Dwi Priyadi Djatmiko

NIM 168070500111001

Telah disetujui menjadi Tesis dalam memenuhi
persyaratan memperoleh keahlian Spesialis Patologi Klinik
Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Ketua Program Studi

Dr. dr. Hani Susanti, SpPK(K)
NIP 19690117 199803 2 005



ORIGINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu

Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia Karya Tugas Akhir ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 4 November 2019

Nama : Dwi Priyadi Djatmiko

NIM : 168070500111001

PS : Spesialis I Patologi Klinik

KATA PENGANTAR

Puji dan Syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, atas berkat anugerah-Nya yang melimpah, kemurahan dan kasih setia yang besar akhirnya penulis dapat menyelesaikan Tesis dengan judul "**KORELASI KADAR FIBRIN MONOMER (FM) DAN AKTIVITAS MIKROPARTIKEL (MP) DENGAN KADAR FIBRINOGEN PADA PASIEN AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA (AIHA)**".
Tesis ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Spesialis Patologi Klinik pada Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
Selesainya penulisan Tesis ini tentunya tidak lepas dari bantuan berbagai pihak baik berupa masukan serta dukungan dalam bentuk apapun. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Dr. dr. Wisnu Barlianto, MSiMed, SpA (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Kohar Hari Santoso, SpAn, KIC, KAP selaku Plt Direktur Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang telah memberikan kesempatan untuk belajar dan bekerja di lingkungan Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang.
3. Dr. dr. Hani Susanti, SpPK (K) selaku Ketua Program Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik dan dr. Indah Adhita Wulanda, SpPK, MBiomed selaku Sekretaris Program Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik.
4. dr. Novi Khila Firani, MKes, SpPK sebagai pembimbing I dan Prof. Dr. dr. Kusworini, MKes, SpPK sebagai pembimbing II yang telah membimbing

- dan memberi motivasi penulis sehingga Tesis ini terselesaikan dengan baik.
5. dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, MKes, SpPK selaku ketua tim penelitian tentang mikropartikel yang telah membimbing, memberi masukan, dan memotivasi penulis sehingga Tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Dr. dr. Hani Susanti, SpPK (K) sebagai penguji I dan dr. Agustin Iskandar, MKes, SpPK sebagai penguji II yang bersedia menguji dan memberikan saran untuk penyempurnaan Tesis ini.
7. dr. Dian Sukma Hanggara, SpPK, MBiomed selaku Kepala SMF/Lab Patologi Klinik dan dr. Catur Suci Sutrisnani, MBiomed, SpPK selaku Kepala Instalasi Laboratorium Sentral RSUD Dr. Saiful Anwar Malang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik.
8. Dr. dr. Hani Susanti, SpPK (K) selaku dosen pembimbing akademik Penulis dalam Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik atas bimbingan, arahan, serta nasihat dalam menjalani pendidikan.
9. Segenap staf pengajar Patologi Klinik dan seluruh karyawan Instalasi Laboratorium Sentral RSUD Dr. Saiful Anwar Malang yang telah membagikan ilmu dan pengalaman serta kerjasamanya selama pendidikan dan penelitian.
10. Seluruh rekan sejawat PPDS Patologi Klinik FKUB teristimewa teman seangkatan dr. Elvin Richela Lawanto, dr. Jessica Santoso, dan dr. Yeti Indrawati atas kebersamaan dan kerja sama dalam mendukung dan membantu baik selama pendidikan maupun dalam penyelesaian Tesis.
11. Rekan sejawat FKUB yang merupakan satu tim penelitian mikropartikel, dr. Elvin Richela Lawanto, dr. Lydiana Parmadi, dan M. Syarif Utama atas

kerja sama yang solid dalam melakukan penelitian dan membantu dalam proses penyelesaian Tesis ini.

12. Kedua orang tua Penulis, Bapak Kosprajogi Djamiko dan Ibu Mila Darmawan yang selalu mendoakan dan memberikan semangat untuk kebaikan dan kebahagiaan Penulis dan terima kasih untuk dukungan dan kasih sayang yang tidak terbatas.
13. Adikku tercinta Grace Putri Djatmiko untuk semangat, dukungan, bantuan materiil dan imateriil sangat berharga yang selalu diberikan kepada Penulis serta doa untuk keberhasilan dan kebahagiaan bersama.
14. Partner serumah dr. I Komang Adi Widana yang telah memberikan semangat dan dukungan berupa tempat kerja yang memadai serta partner tersayang dr. Stephanie Darda Susilowati.
15. Segenap pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan banyak bantuan yang berharga.

Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa membalas kebaikan dan ketulusan semua pihak yang telah membantu penyelesaian Tesis ini dengan melimpahkan berkat dan karunia-Nya.

Penulis menyadari bahwa dalam Tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, oleh sebab itu Penulis mengharapkan kritik dan saran dari Pembaca agar tulisan ini dapat disempurnakan. Akhir kata semoga Tesis ini dapat bermanfaat dan memberi kebaikan bagi semua pihak.

Malang, 4 November 2019

Penulis

ABSTRAK

Djatmiko, Dwi Priyadi. 2019. **Korelasi Kadar Fibrin Monomer (FM) dan Aktivitas Mikropartikel (MP) dengan Kadar Fibrinogen Pada Pasien Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA)** Tesis Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing (1) dr. Novi Khila Firani, MKes, SpPK. Pembimbing (2) Prof. Dr. dr. Kusworini, MKes, SpPK.

Latar Belakang: Pasien AIHA dapat menunjukkan keadaan hiperkoagulasi dengan manifestasi klinis trombosis yang seringkali diabaikan. Dugaan komplikasi trombosis sering dihubungkan dengan tingginya kadar fibrinogen plasma. Fibrin monomer lebih spesifik dibandingkan fibrinogen sedangkan MP dapat menggambarkan kondisi trombosis lebih dini. Tujuan penelitian adalah mengetahui korelasi kadar FM dan aktivitas MP dengan kadar fibrinogen sehingga diharapkan ada kandidat penanda kecurigaan suatu kejadian trombosis pada pasien AIHA. **Metode:** Observasional analisis dengan pendekatan pengambilan data potong lintang. Empat puluh lima pasien AIHA dibagi menjadi 19 pasien dengan kadar fibrinogen normal dan 26 pasien dengan kadar fibrinogen tinggi yang kemudian diperiksa kadar FM plasmanya dengan prinsip *immunoturbidimetry* dan aktivitas MP dengan prinsip kronometrik menggunakan alat Sta compact max. Hasil dianalisis dengan uji beda Mann-Whitney U Test dan uji korelasi Spearman's rho menggunakan SPSS 20. **Hasil dan Pembahasan:** Kadar FM lebih tinggi ($p=0,030$) dan aktivitas MP lebih pendek secara signifikan ($p=0,011$) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi ($FM= 5,47 \pm 3,19 \mu\text{g/mL}$, $MP= 61,93 \pm 33,46 \text{ detik}$) dibandingkan dengan pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal ($FM= 3,55 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$, $MP= 95,94 \pm 42,64 \text{ detik}$). Kadar FM berkorelasi signifikan positif ($r= 0,545$, $p= 0,000$) dengan kadar fibrinogen dan aktivitas MP berkorelasi signifikan negatif ($r= -0,515$, $p= 0,000$) pada pasien AIHA. Hemolisis yang terjadi dapat memunculkan MP yang mengandung fosfolipid prokoagulan yang dapat menginduksi terjadinya trombosis. Semakin banyak MP tersebut semakin cepat pula waktu yang diperlukan untuk menyebabkan *clot* yang ditandai dengan waktu aktivitas MP yang memendek. Pembentukan fibrin dari turunan fibrinogen yang kemudian berubah menjadi fibrin monomer dan bekuan fibrin yang tidak larut merupakan proses lanjutan pengeluaran MP. **Kesimpulan:** Kadar FM dan aktivitas MP berkorelasi signifikan dengan kadar fibrinogen pada pasien AIHA. Perlu penelitian lanjutan untuk melihat apakah FM dan MP dapat berperan sebagai penanda trombosis pada pasien.

Kata kunci

Fibrin Monomer (FM), Mikropartikel (MP), fibrinogen, *Autoimmune Hemolytic Anemia* (AIHA)

Djatmiko, Dwi Priyadi. 2019. ***The Correlation between Fibrin Monomer (FM) Level and Micropartikel (MP) Activity with Fibrinogen Level in Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) Patient*** Thesis of Clinical Pathology Study Program Faculty of Medicine University of Brawijaya Malang. Advisor (1) dr. Novi Khilar Firani, MKes, SpPK. Advisor (2) Prof. Dr. dr. Kusworini, MKes, SpPK.

ABSTRACT

Background: Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is characterized by a hypercoagulable state with thrombotic complications as the manifestation. Furthermore thromboembolic complications have often connected with high plasma fibrinogen level. Fibrin monomer more specific than fibrinogen and MP can be early marker in thrombotic event. The aim was to determine correlation between FM level and MP activity with fibrinogen level so is expected to have thrombotic marker candidates in AIHA patient in the future. **Method:** Cross section-observational analytic with consecutive sampling. Forty five (45) AIHA patients were divided into: 19 patient with normal fibrinogen level (200-400 mg/dL) and 26 patient with high fibrinogen level (>400 mg/dL), then examined FM level with *immunoturbidimetry* method and MP activity with chronometric assayed used Sta compact max instrument. Data analysis used Mann-Whitney U Test dan Spearman's rho (SPSS 20). **Result and Discussion:** Significantly higher FM level ($p= 0,030$) and shorter MP activity ($p= 0,011$) found in AIHA patients with high level fibrinogen level (FM= $5,47 \pm 3,19$ μ g/mL, MP= $61,93 \pm 33,46$ detik) compared to in AIHA patient with normal fibrinogen level (FM= $3,55 \pm 1,20$ μ g/mL, MP= $95,94 \pm 42,64$ detik). FM level positively significant correlates ($r= 0,545$, $p= 0,000$) with fibrinogen level and MP activity negatively significant correlates ($r= -0,515$, $p= 0,000$) with fibrinogen level in AIHA patient. Hemolysis can produces MP contained phospholipid procoagulant that may induces thromboembolic complication. More MP in the sample, shorter time needed to make a clot, so we get shorter MP activity time. Fibrin production from fibrinogen converted into fibrin monomer that formed an insoluble complex in the bloodstream is generally from MP-induced coagulation. **Conclusion:** FM level and MP activity had significant correlation with normal and high fibrinogen, but need further study to determine the exact role of MP and FM as thrombotic marker in AIHA patient.

Keyword

Fibrin Monomer (FM), Micropartikel (MP), fibrinogen, *Autoimmune Hemolytic Anemia* (AIHA)

	DAFTAR ISI	
LEMBAR JUDUL		
LEMBAR PERSETUJUAN		ii
LEMBAR PENGUJI		iii
LEMBAR PENGESAHAN		iv
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS		v
KATA PENGANTAR		vi
ABSTRAK		ix
ABSTRACT		x
DAFTAR ISI		xi
DAFTAR TABEL		xiv
DAFTAR GAMBAR		xv
DAFTAR LAMPIRAN		xvi
DAFTAR SINGKATAN		xvii
BAB I PENDAHULUAN		1
1.1 Latar Belakang Penelitian		1
1.2 Rumusan Masalah		6
1.3 Tujuan Penelitian		6
1.3.1 Tujuan Umum		6
1.3.2 Tujuan Khusus		7
1.4 Manfaat Penelitian		7
1.4.1 Manfaat Akademis		7
1.4.2 Manfaat Praktis		7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA		8
2.1 Autoimmune Hemolytic Anemia		8

2.1.1 Etiologi	8
2.1.2 Patogenesis dan Patofisiologi	9
2.1.3 Klasifikasi	12
2.1.4 Gambaran Klinis dan Laboratorium	21
2.2 Trombosis pada <i>Autoimmune Hemolytic Anemia</i> (AIHA) dan Hubungannya dengan Fibrinogen, Fibrin Monomer (FM), dan Mikropartikel (MP)	23
2.3 Fibrin Monomer	27
2.4 Mikropartikel	29
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	34
3.1 Kerangka Konsep	34
3.2 Hipotesis Penelitian	35
BAB IV METODE PENELITIAN	36
4.1 Rancangan Penelitian	36
4.2 Populasi dan Sampel	36
4.2.1 Subyek penelitian	36
4.2.2 Besar Sampel	36
4.2.2.2 Kriteria Inklusi	37
4.2.2.3 Kriteria Eksklusi	37
4.3 Teknik Sampling	38
4.4 Variabel Penelitian	38
4.5 Definisi Operasional Variabel	39
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	40
4.7 Alat dan Bahan Penelitian	40
4.7.1 Alat	40
4.7.2 Bahan	40
4.8 Prosedur Penelitian	40
4.8.1 Pengambilan Sampel	40

4.8.2 Prosedur Pemeriksaan Kadar Fibrinogen	41
4.8.3 Prosedur Pemeriksaan Kadar Fibrin Monomer	42
4.8.4 Prosedur Pemeriksaan Aktivitas Mikropartikel	43
4.8.5 Rencana Pengolahan dan Analisis Data	44
4.8.6 Alur Prosedur Penelitian	45
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	46
5.1 Karakteristik Subyek Penelitian	46
5.2 Kadar Fibrinogen dan FM Plasma serta Aktivitas MP berdasarkan Kelompok Subyek Penelitian	47
5.3 Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA	48
BAB VI PEMBAHASAN	50
6.1 Karakteristik Subyek Penelitian	50
6.2 Kadar Fibrinogen dan FM Plasma serta Aktivitas MP berdasarkan Kelompok Subyek Penelitian	51
6.3 Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA	54
6.4 Keterbatasan Penelitian	55
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	56
7.1 Kesimpulan	56
7.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	62

DAFTAR TABEL	
Tabel 2.1 Klasifikasi AIHA	14
Tabel 2.2 Asal dan Antigen-antigen MP	32
Tabel 5.1 Karakteristik Subjek Penelitian	46
Tabel 5.2 Rerata Kadar FM dan Aktivitas MP pada Pasien AIHA dengan Kadar Fibrinogen Normal dan Tinggi	47
Tabel 5.3 Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA	48

	DAFTAR GAMBAR	
Gambar 2.1 Mekanisme Hemolisis	10	
Gambar 2.2 Algoritma Diagnostik AIHA	22	
Gambar 2.3 Skema Aktivasi Koagulasi	24	
Gambar 2.4 Pembentukan Fibrin Monomer	29	
Gambar 2.5 Gambaran Skematik Vesikel Ekstraseluler	31	
Gambar 2.6 Rentang Ukuran Tipe-tipe Utama Vesikel Membran	31	
Gambar 2.7 Trombogram	33	
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	34	
Gambar 5.1 Grafik Kadar FM dan Aktivitas MP	48	
Gambar 5.2 Grafik Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA	49	



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Data Dasar Penelitian	62
Lampiran 2 Hasil Analisis Data	63
Lampiran 3 Etik Penelitian	66

DAFTAR SINGKATAN	
ACS	: <i>Acute Coronary Syndrome</i>
AHG	: <i>Antihuman Globulin</i>
AIH	: <i>Auto-Immune Hepatitis</i>
AIHA	: <i>Autoimmune Hemolytic Anemia</i>
APTT	: <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>
CAD	: <i>Cold Agglutinin Disease</i>
CAS	: <i>Cold Agglutinin Syndrome</i>
CLL	: <i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
DAT	: <i>Direct Antiglobulin Test</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EMP	: <i>Endothelial Microparticle</i>
EV	: <i>Extracellular Vesicles</i>
F1+2	: Protrombin fragmen 1 dan 2
FDP	: <i>Fibrinogen Degradation Product</i>
FM	: <i>Fibrin Monomer</i>
FRM	: <i>Fibrin-Related Marker</i>
HA	: <i>Hemolytic Anemia</i>
Ig	: <i>Immunoglobulin</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
ITP	: <i>Immune Thrombocytopenic Purpura</i>
LMP	: <i>Leukocyte Microparticle</i>
MCV	: <i>Mean Corpuscular Volume</i>
MP	: <i>Mikropartikel</i>
MV	: <i>Microvesicle</i>
PCH	: <i>Paroxysmal Cold Hemoglobinuria</i>



PMP	: <i>Platelet Microparticle</i>
PT	: <i>Prothrombin Time</i>
RA	: <i>Rheumatoid Arthritis</i>
Rhesus	: <i>Rhesus</i>
RMP	: <i>Red Cell Microparticle</i>
SF	: <i>Soluble Fibrin</i>
SFMC	: <i>Soluble Fibrin Monomer Complex</i>
SLE	: <i>Systemic Lupus Erythematosus</i>
TAT	: <i>Thrombin-Antithrombin</i>
Th	: <i>T helper</i>
TMA	: <i>Thrombotic Microangiopathic</i>
TPP	: <i>Thrombotic Thrombocytopenic Purpura</i>
WAIHA	: <i>Warm Autoimmune Hemolytic Anemia</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya autoantibodi terhadap beberapa antigen yang diekspresikan pada permukaan eritrosit. Autoantibodi ini mengikat permukaan eritrosit sehingga menyebabkan destruksi dengan fagositosis yang diperantarai oleh Fc dan lisis yang diperantarai komplemen (Mqadmi *et al.*, 2005; Hoyer *et al.*, 2009; Dahal, *et al.*, 2013). Reaksi autoantibodi ini akan menimbulkan anemia akibat masa edar eritrosit dalam sirkulasi menjadi lebih pendek (Hoyer *et al.*, 2009). Hemolisis ringan dapat asimtotik sedangkan anemia pada hemolisis berat dapat mengancam jiwa dan menyebabkan angina dan dekompensasi kardiopulmonal (Shlomcik, 2013).

Insidensi AIHA dalam populasi secara kumulatif 3 tahun telah dilaporkan sebesar 4,44% (Schick, 2017). Studi lain melaporkan 1-3 kasus AIHA dalam 100.000 penduduk / tahun. *Autoimmune hemolytic anemia* (AIHA) dapat terjadi pada semua umur, lebih sering pada wanita namun jarang terjadi pada anak-anak dan memiliki berbagai penyebab (Liebman and Weitz, 2017). Hemolisis autoimun dapat primer atau sekunder karena kondisi seperti infeksi (virus atau bakteri), *Systemic Lupus Erythematosus* (SLE), *Auto-Immune Hepatitis* (AIH), dan influenza H1N1. (Friedberg *et al.*, 2009; Michel *et al.*, 2011; Keohane *et al.*, 2015).

Komplikasi tromboemboli sering dihubungkan dengan hemolisis, tetapi risiko trombosis pada AIHA seringkali diabaikan. Pasien AIHA dapat menunjukkan keadaan hiperkoagulasi dengan manifestasi klinis signifikan yang ditandai mulai dari *thrombotic microangiopathic* (TMA) *hemolytic anemia*(HA) sampai dengan trombosis vena hepatica, mesenterika, atau serebral, serta emboli paru yang

mengakibatkan kondisi disfungsi organ pada akhirnya karena iskemia (Cappellini, 2007). Konsekuensi lebih lanjut dari kerusakan membran sel eritrosit adalah peningkatan paparan prokoagulan, fosfolipid fosfatidilserin dan fosfatidiletanolamin, dari membran sel tersebut. Kerusakan membran sel juga meningkatkan kecenderungan sel eritrosit untuk melakukan agregasi. Fosfolipid meningkatkan pembentukan trombin yang mengarah pada aktivasi trombosit dan sel endotel. Oleh karena itu, hiperkoagulabilitas dapat dikaitkan dengan beberapa komplikasi hemolis yang berhubungan dengan disfungsi endotel dan pelepasan zat mediator inflamasi pada AIHA yang akan mengaktifkan koagulasi (Ruggeri and Rodeghiero, 2016).

Gold standard untuk menilai *flow stasis* dan trombosis pembuluh darah adalah angiografi (Mauchley, 2018). Angiografi merupakan pemeriksaan invasif yang dapat memberikan informasi yang baik mengenai trombus pada salah satu pembuluh darah bila dikerjakan oleh operator yang terlatih (Shuman, 2010). Metode pencitraan awal yang juga digunakan untuk mendiagnosis trombosis di suatu bagian tubuh pasien adalah *color doppler ultrasound*. Pemeriksaan pemeriksaan tersebut dianggap lebih rumit dan kurang hemat dari segi biaya meskipun memiliki sensitivitas dan spesifitas sampai dengan >90% (Tabakci, et al., 2017).

Trombosis dapat didiagnosis dengan berbagai pemeriksaan yang lebih sederhana dan kurang invasif seperti faal hemostasis, hitung jumlah trombosit, fibrinogen, dan *Fibrin-Related Marker* (FRM). Faal hemostasis adalah interaksi kompleks antara protein (prokoagulan, antikoagulan, fibrinolitik) dan sel (sel endotel, trombosit, eritrosit dan lekosit). Evaluasi laboratorium klasik hemostasis membagi elemen-elemen ini secara *in vitro* ke dalam reaksi terpisah atas dasar kaskade koagulasi klasik yang terdiri dari jalur ekstrinsik (*Prothrombin Time (PT)*), intrinsik (*Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)*), dan umum. Pemeriksaan



PT dan APTT hanya dapat menunjukkan keadaan trombosis lanjut pada pasien (Williams and MacIvor, 2013). Fibrinogen adalah glikoprotein plasma terlarut yang disintesis oleh hati dan merupakan kofaktor aktivasi trombus yang dapat secara langsung berkontribusi pada pembentukan plak karena akan diubah oleh trombin menjadi fibrin selama proses koagulasi (Hajsadeghi, 2012). Fibrinogen terakumulasi di tempat cidera pembuluh darah meskipun prosesnya masih minimal karena *adherence*-nya terhadap endotel dapat memediasi perkembangan trombus. Fibrinogen secara independen berkorelasi dengan kejadian trombus pembuluh darah (Tabakci, et al., 2017). Kadar fibrinogen dikatakan dapat mencerminkan kondisi trombosis pada pasien lebih awal dibandingkan pemeriksaan PT dan APTT serta dapat dijadikan sebagai pemeriksaan diagnostik trombosis yang terpercaya (Ariëns, 2011). Kadar fibrinogen diperiksa menggunakan perhitungan waktu pembekuan plasma yang berbanding terbalik dengan konsentrasi fibrinogen dalam plasma. Hal tersebut mendorong penggunaan fibrinogen sebagai penanda dugaan trombosis pada pasien (Tabakci, et al., 2017).

Performa fibrinogen sudah diteliti pada pasien dengan diagnosis trombosis vena dalam, sindrom koroner akut, penyakit arteri koroner, *atheroembolism*, infeksi, penyakit inflamasi kronis seperti penyakit autoimun, dan keganasan. Fibrinogen dihubungkan dengan trombogenisitas dan kejadian trombus pada beberapa penyakit tersebut. Kadar fibrinogen lebih tinggi secara signifikan pada pasien dengan kejadian trombus dibandingkan dengan kontrol. Bahkan kadar fibrinogen dilaporkan semakin tinggi secara signifikan pada pasien dengan trombosis obstruksi. Sensitivitas dan spesifitas kadar fibrinogen >400 mg/dL sebagai diagnosis trombosis pada pasien dengan penyakit yang terkait kondisi hiperkoagulabilitas berkisar antara 46-100% dan 75-93%. Hasil ini secara umum



lebih sensitif daripada pemeriksaan D-dimer (sensitivitas 22-100%). Selain itu, kadar fibrinogen juga memiliki korelasi dengan penanda trombosis yang lain seperti D-dimer ($r= 0,6-0,9$) dan *thrombin-antithrombin complex* (TAT) ($r= 0,4-0,9$) (Boisclair MD, et al., 1989; Stec et al., 2000; Danesh et al., 2005; Aykan et al., 2014). *Fibrin-related markers* (FRMs) seperti fibrin dan *fibrinogen degradation products* (FDPs), D-dimer dan *soluble fibrin* (SF) / *soluble fibrin monomer complex* (SFMC), dianggap berguna untuk diagnosis trombosis (Linkins et al., 2004; Wada, 2004). Fibrin monomer (FM) merupakan fibrinogen yang fibrinopeptida A dan B-nya telah dipotong oleh trombin. Polimerisasi FM nantinya langsung membentuk fibrin polimer sehingga FM berguna secara klinis dalam penegakan diagnosis trombosis lebih spesifik dibandingkan fibrinogen (Rodgers, 2015).

Akhir-akhir ini diketahui juga bahwa mikropartikel (MP) merupakan vektor dari molekul-molekul bioaktif, berperan penting dalam koagulasi, keradangan, aktivasi sel, dan metastase kanker (Lacroix et al., 2013). Dalam praktik klinis, *circulating MP* yang berasal dari sel-sel darah dan vaskuler meningkat pada berbagai kelainan protrombotik dan keradangan, penyakit-penyakit kardiovaskuler, kondisi-kondisi autoimun, penyakit-penyakit infeksius, dan kanker (Ataga, 2009). Belum ada penelitian tentang MP pada pasien AIHA sampai dengan saat ini.

Beberapa cara dapat digunakan untuk mendeteksi MP dan masing-masing cara deteksi ini memiliki kekuatan dan kelemahannya. Pilihan cara ini akan tergantung pada tujuan dari setiap penelitian. Deteksi MP biasanya dilakukan dengan mengetahui konsentrasi atau aktivitasnya. Pengukuran konsentrasi MP dalam volume sampel tertentu dikatakan kurang menggambarkan kontribusi MP tersebut dalam suatu proses patologi koagulasi karena ada bukti baru yang menunjukkan bahwa tidak semua MP mengekspresikan fosfatidilserin pada

permukaannya, namun hal tersebut tidak berlaku sebaliknya (Mooberry *et al.*, 2016). Ada penelitian yang menyebutkan bahwa waktu pembekuan sampel yang memendek lebih berhubungan dengan tingginya konsentasi MP dalam suatu sampel (Owen *et al.*, 2012). Pendeknya waktu pembekuan sampel memang lebih menggambarkan banyaknya ekspresi fosfatidilserin pada MP sehingga sampel dapat membeku. Pengukuran konsentrasi MP misalnya dengan *flowcytometry* memang akan memberikan informasi mengenai ekspresi protein atau komposisi biokimia MP tapi memakan biaya yang lebih besar (Lashin, 2015). Faktor-faktor lain yang dipertimbangkan ketika memilih pengukuran aktivitas MP pada penelitian ini adalah ketersediaan alat dan keahlian operator.

Peran fibrin monomer (FM) dan mikropartikel (MP) pada AIHA terkait dengan status *hypercoagulable* dan berhubungan dengan fibrinogen sebagai penanda dugaan komplikasi koagulasi berupa trombosis sehingga memberikan peluang untuk ketiganya dapat digunakan sebagai penanda penyakit yang potensial. Hitung MP selain dapat memberikan informasi diagnosis juga dapat menunjukkan prognosis yang berguna untuk monitoring respons terapi (Robert *et al.*, 2008, Gyoörgy *et al.*, 2011). Selama proses hemolisis yang memperpendek masa hidup eritrosit, *red cell microparticles* (RMP) dilepaskan bersama-sama dengan MP dari trombosit (*platelet microparticles* = PMP), endotel (EMP) dan leukosit (LMP). Hal tersebut mengakibatkan peningkatan MP juga dapat berguna untuk menggambarkan keparahan penyakit-penyakit dengan hemolisis (Johansen *et al.*, 2012).

Frekuensi trombosis bergantung pada penyakit yang mendasari. Tidak banyak penelitian yang menuliskan data trombosis pada AIHA padahal hasil otopsi pasien AIHA yang meninggal umumnya menunjukkan kejadian tromboemboli, misalnya emboli paru dan trombosis arteri brakialis atau vena porta (Hendrick, 2013). Selanjutnya, Hendrick (2013) melaporkan tromboemboli pada pasien



dengan AIHA sebanyak 17%. Kejadian trombosis juga dilaporkan sebesar 15% pada pasien penelitian Pullarkat *et al.* (2012) yang terdiagnos AIHA dengan antibodi antifosfolipid yang negatif. Trombosis yang merupakan komplikasi dini tapi fatal pada AIHA tersebut, sebenarnya dapat dievaluasi dengan tes penanda koagulasi yang telah ada seperti fibrinogen. Fibrin monomer (FM) dan MP sebagai alternatif penanda trombosis yang relatif lebih baru, diduga mempunyai hubungan bermakna dengan fibrinogen. Fibrin Monomer (FM) dikatakan lebih spesifik dibandingkan fibrinogen dalam penegakan diagnosis trombosis (Rodgers, 2015). Mikropartikel (MP) mengandung fosfolipid prokoagulan yang dapat menggambarkan dugaan trombosis lebih dini pada kondisi hemolisis (Johansen *et al.*, 2012). Harapannya, tidak hanya fibrinogen, tapi FM dan MP juga dapat menjadi kandidat penanda yang menunjukkan dugaan keadaan trombosis sehingga terapi pasien AIHA bisa lebih baik lagi dan morbiditas serta mortalitas akibat AIHA dapat ditekan. Berdasarkan uraian di atas, peneliti merasa perlu meneliti korelasi kadar FM dan aktivitas MP dibandingkan dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA. Alasan mengapa dibandingkan dengan kadar fibrinogen tersebut adalah kadar fibrinogen yang tinggi dapat dianggap sebagai penanda dugaan keadaan trombosis pasien.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana korelasi kadar Fibrin Monomer (FM) dan aktivitas Mikropartikel (MP) dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui korelasi kadar Fibrin Monomer (FM) dan aktivitas Mikropartikel (MP) dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui kadar FM pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal (200–400 mg/dL) dan tinggi (>400 mg/dL).
2. Mengetahui aktivitas MP pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal dan tinggi.
3. Membandingkan kadar FM dan aktivitas MP pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal dan tinggi.
4. Mengetahui korelasi kadar FM dan aktivitas MP dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Memperoleh pengetahuan tentang korelasi kadar FM dan aktivitas MP dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA serta memberi masukan dalam pengembangan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan antara FM dan MP dengan AIHA dan komplikasinya.

1.4.2 Manfaat Praktis

Jika diketahui korelasi kadar FM dan aktivitas MP dengan kadar fibrinogen, maka FM dan MP nantinya dapat digunakan sebagai kandidat alternatif penanda dugaan trombosis yang tidak invasif melengkapi pemeriksaan yang sudah ada untuk membantu klinisi dalam monitoring penatalaksanaan pasien dengan AIHA.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Autoimmune Hemolytic Anemia

Lebih dari 50% pasien AIHA ada kaitan dengan penyakit yang mendasarinya atau AIHA sekunder, di antaranya 18% kasus limfoma berkembang menjadi AIHA, 10% kasus *systemic lupus erithematosus* (SLE) berkembang menjadi AIHA, dan dapat ditemukan pada beberapa penyakit lainnya termasuk leukemia limfoblastik kronik dan Waldenstrom's macroglobulinemia. Sedangkan AIHA primer atau AIHA idiopatik, penyakit yang mendasarinya tidak diketahui, dan 65% dari AIHA primer terjadi pada wanita (Zeerleider, 2011). Empat puluh delapan sampai dengan tujuhpuluhan persen AIHA adalah AIHA tipe hangat (*warm AIHA*), sedangkan AIHA tipe dingin (*cold AIHA*) yang terdiri dari *cold agglutinin syndrome* (CAS) ditemukan 16%-32% dari kasus AIHA dan AIHA karena bifasik autoantibodi (*paroxysmal cold hemoglobinuria*) ditemukan 32% dari kasus AIHA, biasanya pada anak-anak, jarang orang dewasa, sedangkan AIHA karena *drug-induced* ditemukan 12–18% dari kasus AIHA (Gehrs and Friedberg, 2002).

2.1.1 Etiologi

Penyebab AIHA tidak diketahui. Beberapa hipotesis yang dilaporkan ada kaitannya dengan supresi sistem imun oleh aktivitas virus, perubahan keseimbangan antara limfosit T *supresor* dan T *helper*, atau karena terjadinya perubahan antigen permukaan eritrosit oleh virus atau obat atau kemungkinan terjadi reaksi silang antara antibodi yang distimulasi oleh antigen virus terhadap permukaan eritrosit (Oliveira *et al.*, 2006).

Autoantibodi juga bisa timbul karena disregulasi sistem imun dan hilangnya toleransi imun, terpapar antigen yang mirip dengan autoantigen atau *B-*

lymphocyte neoplasm. Tipe, jumlah dan durasi dari paparan antigen dan faktor genetik maupun lingkungan juga berpengaruh pada timbulnya autoantibodi (Michel, 2011; Jäger and Lechner, 2013).

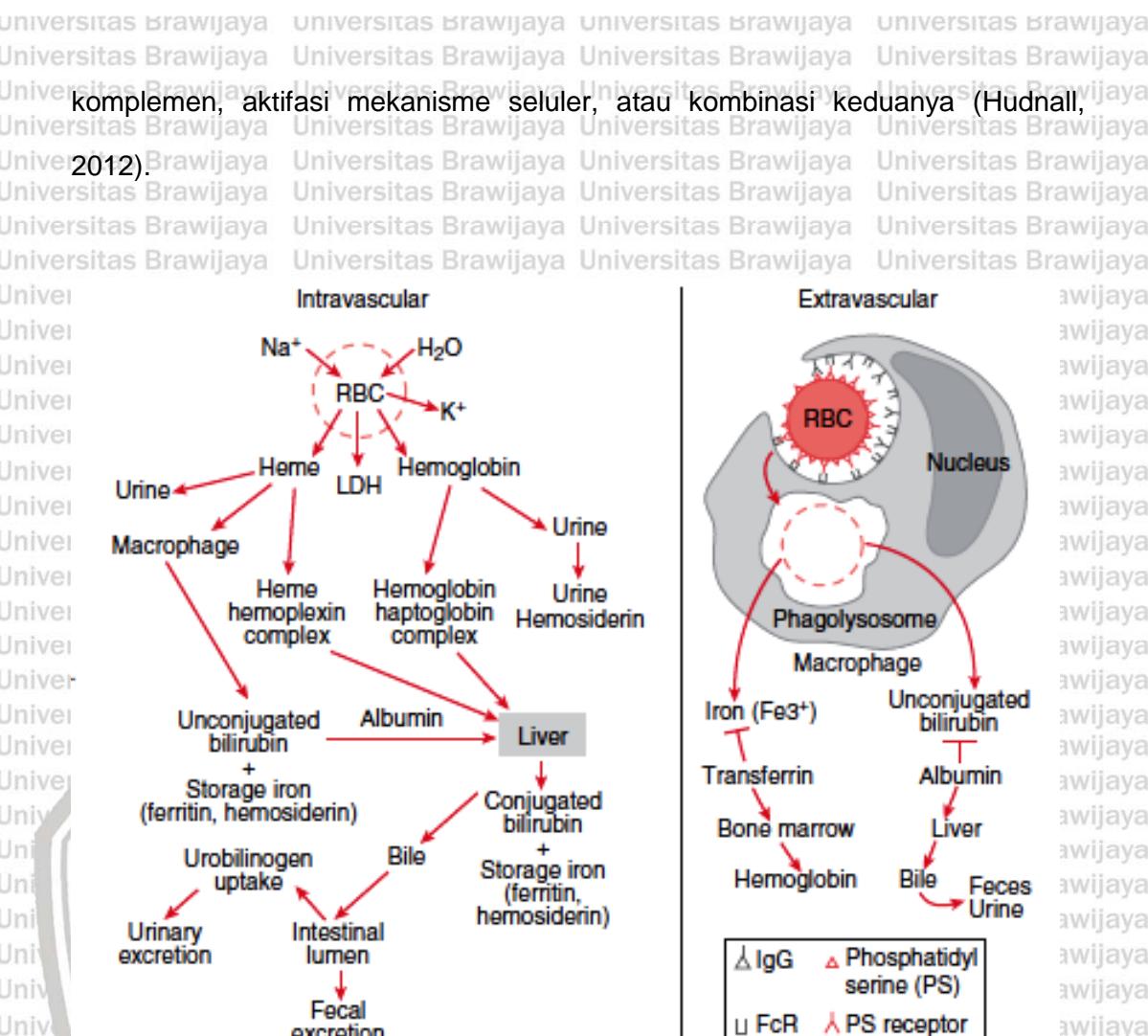
2.1.2 Patogenesis dan Patofisiologi

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) merupakan sebuah contoh autoimunitas tipe IIA. Pada kelainan ini, antigen *self* di permukaan eritrosit menstimulasi respons autoantibodi, yang menyebabkan ikatan autoantibodi pada permukaan eritrosit yang diikuti oleh lisisnya eritrosit yang dilapisi antibodi sistem retikuloendotelial limpa dan hepar. Mekanisme hemolisis bergantung terhadap tipe autoantibodi (Zhuang *et al.*, 2009; Stevens, 2010; Jäger and Lechner, 2013).

Dua isotipe antibodi yang paling sering berkaitan dengan anemia hemolitik imun adalah *immunoglobulin G* (IgG) dan *M* (IgM). *Immunoglobulin G* (IgG) merupakan monomer dengan struktur seperti Y dengan dua rantai berat yang identik (γ H-chains) dan dua rantai ringan (κ dan λ) yang dihubungkan dengan ikatan disulfida. Pada bagian atas dari *Y-like structure* adalah dua domain *antigen-binding* (Fab), yang masing-masing dibentuk dari N-terminal dari satu domain variabel rantai ringan dan berat. *Immunoglobulin G* (IgG) mempunyai satu domain Fc yang terdiri dari C-terminal dari dua rantai berat. *Immunoglobulin M* (IgM) merupakan pentamer yang terdiri dari 5 unit monomerik yang dihubungkan dengan ikatan disulfida pada C-terminal dari rantai beratnya (μ H-chains). Karena komposisi, struktur, dan ukuran dari IgG dan IgM berbeda, maka mekanisme untuk menyebabkan homolisisnya juga berbeda (Keohane *et al.*, 2015).

Penghancuran eritrosit secara prematur diperantarai oleh autoantibodi IgG, IgM, dan komplemen, sedangkan mekanismenya melalui aktivasi sistem





Gambar 2.1 Mekanisme hemolisis bisa terjadi secara intravaskuler atau ekstravaskuler. Hemolisis intravaskuler terjadi dalam aliran darah. Hemolisis ekstravaskuler terjadi dalam sumsum tulang, limpa atau hepar (Hudnall, 2012).

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) merupakan hasil dari hemolisis eritrosit yang terikat antibodi dan/atau komplemen. Autoantibodi ditujukan langsung terhadap antigen-antigen yang luas terekspresikan pada permukaan eritrosit, sehingga disebut sebagai *public antigens*, yang paling lazim adalah antigen-antigen Rhesus (Rh). Hemolisis ekstravaskuler eritrosit yang terikat antibodi dan/atau komplemen (opsonisasi) terjadi setelah fagositosis yang diperantara reseptor Fc oleh makrofag-makrofag limpa dan hepar. Meskipun limpa

merupakan tempat utama fagositosis, eritrosit yang teropsonisasi IgG kadar tinggi dan C3b juga mengalami fagositosis yang diperantara oleh sel Kupffer dalam hepar. Eritrosit yang teropsonisasi, terutama oleh IgM, isotipe imunoglobulin pentavalen dengan kemampuan mengikat komplemen, juga mengalami *intravascular complement-mediated hemolysis* (Hudnall, 2012). Hemolisis yang diperantara oleh antibodi IgM membutuhkan aktivasi sistem komplemen dan dapat menghasilkan baik hemolisis ekstra maupun intravaskuler. Ketika molekul IgM berikatan dengan permukaan eritrosit, aktivasi komplemen akan menyebabkan C3b terikat pada membran eritrosit, tetapi *complement inhibitor* akan mencegah terjadinya aktivasi komplit komplemen (*membrane attack complex*). Eritrosit yang disensitasi C3b akan dihancurkan di ekstravaskuler oleh makrofag di hati (sel Kupffer) yang memiliki reseptor C3b. Beberapa C3b pada permukaan eritrosit dapat memecah, yang mana akan meninggalkan fragmen C3d di permukaan eritrosit. Eritrosit yang hanya disensitasi oleh C3d tidak akan dihancurkan secara prematur dari sirkulasi karena makrofag tidak memiliki reseptor C3d. Pada kasus berat hemolisis imun yang diperantai oleh antibodi IgM, aktifasi komplemen akan terjadi jauh lebih hebat dan komplit (aktifasi dari C1 sampai C9), sehingga menyebabkan hemolisis intravaskuler secara cepat (Friedberg and Johari, 2014, Keohane, 2015).

Hemolisis yang diperantara oleh antibodi IgG terjadi dengan atau tanpa komplemen dan biasanya terjadi di ekstravaskuler. Eritrosit yang disensitasi oleh IgG akan dibuang dari sirkulasi oleh makrofag di limpa, yang memiliki reseptor komponen Fc pada IgG1 dan IgG3. Aktifasi komplit komplemen dari C1 sampai C9 jarang terjadi pada hemolisis yang diperantara IgG (kecuali dengan adanya anti-P pada *paroxysmal cold hemoglobinuria*). Bila terdapat IgG dan C3b yang sama-sama mengikat membran eritrosit, akan terjadi klirens yang lebih cepat pada sirkulasi oleh makrofag hati dan limpa. Sering terjadi eritrosit yang disensitasi IgG



hanya difagosit sebagian oleh makrofag, sehingga menghasilkan hilangnya sebagian membran. Proses ini menyebabkan adanya sferosit, dan merupakan sel yang khas pada hemolisis yang diperantarai IgG. Sferosit ini nantinya akan dibuang dari sirkulasi oleh makrofag limpa (Friedberg and Johari, 2014; Keohane, 2015).

2.1.3 Klasifikasi

Pada umumnya pembagian AIHA didasarkan pada suhu reaksi antara antibodi dengan antigen eritrosit, tapi ada juga yang membagi AIHA berdasarkan AIHA sekunder dan primer. Autoantibodi yang bereaksi kuat dengan eritrosit pada suhu 37°C atau dinamakan antibodi tipe hangat (*warm autoantibody*) dan afinitasnya akan berkurang pada suhu rendah atau di bawah 37°C, sedangkan autoantibodi yang berikatan kuat pada suhu 0-4°C dinamakan autoantibodi tipe dingin (*cold autoantibody*) dan afinitasnya akan berkurang pada suhu ruangan (Gehrs and Friedberg, 2002; Jäger and Lechner, 2013).

Keohane (2015) membagi AIHA menjadi empat kategori utama berdasarkan karakteristik autoantibodi dan mekanisme hemolisinya, yaitu sebagai berikut.

- *Warm Autoimmune Hemolytic Anemia*
- *Cold Agglutinin Disease*
- *Paroxysmal Cold Hemoglobinuria*
- *Mixed-Type Autoimmune Hemolytic Anemia*

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) tipe hangat dan dingin juga dikategorikan berdasarkan ada tidaknya penyakit yang mendasarinya, dibagi menjadi dua kategori sebagai berikut.

- Primer atau idiopatik: tidak dapat diidentifikasi penyakit yang mendasari
 - Sekunder: terdapat penyakit yang mendasarinya
- AIHA tipe hangat sekunder antara lain disebabkan oleh sebagai berikut:
- Penyakit limfoproliferatif, misal, *chronic lymphocytic leukemia* (CLL)
 - dan penyakit Hodgkin
 - Penyakit keganasan
 - Penyakit-penyakit autoimun lain, termasuk SLE dan *rheumatoid arthritis* (RA), *ulcerative colitis*, dan penyakit Crohn
 - Infeksi-infeksi virus dan bakteri-bakteri tertentu
 - Vaksinasi
 - Cangkok organ solid

(McKenzie and Williams, 2016)

Kurang lebih 50% kelainan limfoproliferatif menyebabkan AIHA tipe hangat (*warm AIHA*) dan tipe dingin (*cold AIHA*) dengan proporsi yang hampir sama, sedangkan penyakit autoimun merupakan penyebab utama *warm AIHA* dan penyakit-penyakit infeksi merupakan penyebab utama *cold AIHA*. *Autoimmune haemolytic anaemia* (AIHA) idiopatik lebih sering terjadi pada wanita dengan insiden puncak pada usia 40 sampai 50 tahun (Gehrs and Friedberg, 2002). Secara garis besar klasifikasi AIHA seperti terlihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi penyakit AIHA

AIHA	Penyebab	Ciri Khas
AIHA primär	tidak dikenali	peningkatan temperatur > 38°C
AIHA sekunder	infeksi, penyakit autoimun, penyakit limfoproliferatif, cangkok organ solid	peningkatan temperatur < 38°C
AIHA idiopatik	tidak dikenali	peningkatan temperatur < 38°C
AIHA nonidiopatik	infeksi, penyakit autoimun, penyakit limfoproliferatif, cangkok organ solid	peningkatan temperatur < 38°C



Tabel 2.1 Klasifikasi AIHA (Keohane, 2015)

	Warm Autoimmune Hemolytic Anemia	Cold Agglutinin Disease	Paroxysmal Cold Hemoglobinuria	Mixed-Type Autoimmune Hemolytic Anemia
Immunoglobulin class	IgG (rarely IgM, IgA)	IgM	IgG	IgG, IgM
Optimum reactivity temperature of autoantibody	37° C	4° C; reactivity extends to > 30° C	4° C	4°–37° C
Sensitization detected by direct antiglobulin test	IgG or IgG + C3d; only C3d uncommon	C3d	C3d	IgG and C3d
Complement activation	Variable	Yes	Yes	Yes
Hemolysis	Extravascular primarily	Extravascular; rarely intravascular	Intravascular	Extravascular and intravascular
Autoantibody specificity	Panreactive or Rh complex; rarely specific Rh or other antigen	I (most), i (some), Pr (rare)	P	Panreactive; unclear specificity

1. Warm Autoimmune Hemolytic Anemia

Warm autoimmune hemolytic anemia (WAIHA) merupakan bentuk anemia hemolitik autoimun yang paling sering terjadi, sekitar 70% kasus. Autoantibodi yang menyebabkan WAIHA bereaksi optimal pada 37°C, dan kebanyakan adalah IgG. *Warm autoimmune hemolytic anemia* (WAIHA) dapat diklasifikasikan lagi menjadi idiopatik dan sekunder. Pada pasien dengan WAIHA idiopatik, penyebabnya tidak diketahui. *Warm autoimmune hemolytic anemia* (WAIHA) sekunder dapat terjadi pada berbagai kondisi seperti penyakit limfoproliferatif (CLL, *B-lymphocytic lymphomas*, dan *Waldenstrom macroglobulinemia*), neoplasma nonlimfoid (*thyromoma* dan kanker kolon, ginjal, paru dan ovarium),



penyakit autoimun (RA, scleroderma, polyarteritis nodosa, Sjogren syndrome, dan SLE) penyakit imunodefisiensi dan infeksi virus. Onset terjadinya WAIHA biasanya bertahap, dengan gejala anemia (lemah, letih, pusing, sesak napas), tetapi beberapa kasus dapat terjadi akut dan mengancam nyawa dengan gejala demam, ikterik, splenomegali, dan hepatomegali, khususnya pada anak-anak dengan WAIHA sekunder yang disebabkan infeksi virus (Jäger, 2013; Friedberg and Johari, 2014).

Walaupun autoantibodi tersering yang menyebabkan WAIHA adalah IgG, pada beberapa kasus dapat melibatkan autoantibodi IgA dan juga autoantibodi warm-reacting IgM. Proses hemolitik yang terjadi pada WAIHA adalah ekstravaskuler, sedangkan hemolitik intravaskuler yang fulminan jarang terjadi (Jäger, 2013).

Hasil positif pada pemeriksaan DAT terdapat pada 95% pasien, dengan sekitar 85% pasien hanya memiliki autoantibodi IgG atau baik IgG maupun C3d pada sel eritrositnya, dan 10-14% hanya memiliki C3d. Antara 1-4% pasien memberikan hasil negatif pada pemeriksaan DAT yang bisa disebabkan oleh autoantibodi IgA atau IgM yang tidak terdeteksi oleh *polyspecific antihuman globulin* (AHG), IgA atau C3d dibawah nilai batas deteksi reagen, disosiasi antibodi IgG beraviditas rendah pada saat *washing phase* pada DAT, atau karena bermacam-macam kesalahan teknis. Oleh karena itu, hasil negatif pada DAT tidak menjamin pasien tersebut tidak menderita anemia hemolitik autoimun (Jäger, 2013; Friedberg and Johari, 2014, Keohane, 2015).

Warm autoantibodies biasanya *panreactive*, yang artinya mereka akan mengaglutinasi semua tes skrining, eritrosit donor, dan eritrosit pasien sendiri, sehingga spesifitas dari autoantibodi tidak jelas terlihat. Sebagian besar pasien (sekitar 80%), autoantibodi dapat terdeteksi di serum. Karena autoantibodi bersifat

panreactive, autoantibodi tersebut mungkin menyembunyikan reaksi dari aloantibodi dengan *panel cell* eritrosit. Bila transfusi eritrosit diperlukan, sangatlah penting untuk memeriksa apakah terdapat aloantibodi (Jäger, 2013).

Anemia pada WAIHA bisa ringan maupun berat, dengan umur eritrosit berkurang hingga 5 hari atau kurang. Pemeriksaan laboratorium untuk serum dan urin memberikan gambaran hemolitik ekstravaskuler yang terjadi karena *IgG-mediated immune hemolysis*. Terdapat polikromasi dan sferosit pada evaluasi apusan darah tepi. Adakalanya WAIHA terjadi bersama dengan *immune thrombocytopenic purpura* dan penurunan jumlah platelet, suatu kondisi yang dikenal sebagai *Evans syndrome*, yang mana sering terjadi pada anak-anak (Keohane, 2015).

2. Cold Agglutinin Disease

Cold agglutinins merupakan autoantibodi IgM yang bereaksi secara optimal pada suhu 4°C dan sering ditemukan pada individu-individu yang sehat. *Cold agglutinins* yang nonpatologik ini merupakan poliklonal, terjadi pada titer rendah (kurang dari 1:64 pada suhu 4°C), dan tidak bereaksi di atas 30°C. Kebanyakan penyakit *cold agglutinins* adalah monoklonal, terjadi pada titer tinggi (lebih dari 1:1000 pada suhu 4°C), dan dapat bereaksi pada suhu lebih dari 30°C. Karena *cold agglutinins* yang patologi dapat bereaksi pada suhu tubuh, maka dapat menyebabkan *cold agglutinin disease* (CAD). *Cold agglutinins* yang dapat mengikat antigen sel eritrosit mendekati atau pada suhu 37°C (*high thermal amplitude*) dapat menyebabkan gejala yang lebih berat. *Cold agglutinin disease* (CAD) akhir-akhir ini dikenal sebagai *clonal lymphoproliferative B cell disorder*.

Cold agglutinin disease (CAD) menjadi penyebab sekitar 15-20% dari seluruh kasus anemia hemolitik autoimun (Friedberg and Johari, 2014; Kechane, 2015).



Pada CAD, autoantibodi IgM mengikat antigen sel eritrosit setelah terpapar oleh dingin, terutama pada sirkulasi perifer dan pembuluh darah kulit, dimana temperatur dapat turun hingga 30°C. Selama transit melalui area yang lebih dingin, autoantibodi IgM akan mengaktifasi jalur komplemen klasik. Ketika sel eritrosit kembali ke sirkulasi sentral, antibodi IgM akan terdisosiasi, sedangkan komponen C3b akan tetap berada di sel eritrosit. Hemolitik yang terjadi sebagian besar ekstravaskuler oleh sel-sel makrofag hati, yang mana mempunyai reseptor C3b.

Namun, bila autoantibodi memiliki *high thermal amplitude* atau terdapat defisiensi protein pengatur komplemen, hemolis bisa terjadi intravaskuler (Berentsen *et al.*, 2006; Petz, 2008; Keohane, 2015).

Cold agglutinin disease (CAD) dapat diklasifikasikan lagi menjadi idiopatik dan sekunder. *Cold agglutinin disease* (CAD) sekunder yang terjadi akut disebabkan oleh infeksi *Mycoplasma pneumoniae*, infeksi mononukleosis, dan penyakit virus lainnya. *Cold agglutinins* pada penyakit ini merupakan IgM poliklonal, dengan distribusi rantai ringan κ dan λ yang normal. CAD sekunder kronis jarang ditemukan, biasanya terjadi pada individu-individu dengan usia pertengahan dan usia tua, dan autoantibodinya biasanya berupa IgM monoklonal dengan rantai ringan κ (Berentsen *et al.*, 2006; Petz, 2008; Keohane, 2015).

Manifestasi klinis pada CAD kronis sangatlah bervariasi. Kebanyakan pasien menderita anemia ringan, sedangkan yang lain dapat berubah menjadi anemia yang mengancam jiwa terutama setelah terpapar oleh temperatur yang dingin. Gejala yang lain berupa kelelahan, kelemahan, dispnea, pucat, dan akrosianosis. Beberapa pasien juga mempunyai episode hemoglobinuria terutama setelah terpapar temperatur yang dingin. Sedangkan pasien dengan CAD yang akut memiliki gejala hemolis yang ringan hingga berat yang tampak dalam 2 sampai 3 minggu setelah onset mononukleosis infeksius, infeksi *M. pneumonia*,

atau infeksi virus lainnya, dan sembuh secara spontan dalam hitungan hari atau beberapa minggu (Petz, 2008; Keohane, 2015). Pemeriksaan DAT menunjukkan hasil yang positif dengan *polyspecific AHG* karena adanya C3d pada permukaan sel eritrosit. Spesifikasi *cold agglutinin* paling sering adalah anti-I, tetapi bisa juga anti-i atau yang sangat jarang adalah anti-Pr. Sebenarnya semua sel eritrosit orang dewasa positif terhadap antigen I, sehingga anti-I akan mengagglutinasi semua skrining dan *panel cell*, eritrosit donor dan eritrosit pasien sendiri pada suhu ruang atau suhu yang lebih tinggi, tergantung pada *thermal amplitude* antibodi (Berentsen et al., 2006; Petz, 2008; Keohane, 2015).

Metode *cold agglutinin* biasa digunakan untuk mengetahui titer antibodi pada suhu 4°C. *Cold agglutinins* yang patologik, tiernya dapat mencapai 1:10.000 sampai 1:1.000.000 pada suhu 4°C. Spesimen darah untuk tes *cold agglutinin* harus dipertahankan pada suhu 37°C untuk mencegah terbentuknya ikatan autoantibodi terhadap sel eritrosit pasien sendiri, yang mana dapat menurunkan titer antibodi serum. Ketika terdapat *cold agglutinin* dengan titer yang tinggi, spesimen darah dengan EDTA dapat menunjukkan agglutinasi yang tampak mata pada tabung sampel di suhu ruangan atau lebih rendah. Agglutinasi juga dapat dilihat pada evaluasi apusan darah tepi. Spesimen darah dari pasien tersebut harus dihangatkan pada suhu 37°C selama 15 menit sebelum dilakukan analisis darah lengkap dengan menggunakan *automated hematology analyzers*. Agglutinasi sel eritrosit akan secara nyata meningkatkan MCV, menurunkan jumlah hitung eritrosit dan mengganggu indeks yang lain. Ketika sampel dihangatkan pada suhu 37°C, antibodi akan terlepas dari sel eritrosit dan biasanya agglutinasi akan menghilang. Bila tidak, dibutuhkan sampel baru yang dipertahankan pada suhu 37°C dari awal pengambilan sampel hingga waktu tes. Untuk menghindari terjadinya agglutinasi pada evaluasi apusan darah tepi, slide dapat dihangatkan



pada suhu 37°C sebelum dibuat apusan. *Cold agglutinin* juga dapat mengganggu

penentuan golongan darah ABO (Keohane, 2015)

3. Paroxysmal Cold Hemoglobinuria

Paroxysmal cold hemoglobinuria (PCH) merupakan bentuk akut dari *cold-reactive hemolytic anemia*. *Paroxysmal cold hemoglobinuria* (PCH) dapat idiopatik atau sekunder. Dulu PCH sekunder dihubungkan dengan stadium akhir dari sifilis, tetapi sekarang lebih sering terlihat pada anak-anak setelah terkena infeksi pernapasan oleh virus. *Paroxysmal cold hemoglobinuria* (PCH) jarang terjadi pada orang dewasa (Friedberg and Johari, 2014; Keohane, 2015).

Autoantibodi anti-P, yang disebut juga antibodi *Donath-Landsteiner*, merupakan *complement-binding IgG hemolysin* yang spesifik untuk antigen P pada sel eritrosit. Autoantibodi anti-P bersifat bifasik yang pada suhu dingin akan mengikat antigen P pada eritrosit dan mengaktifkan sistem komplemen, dan hemolisis terjadi hanya pada saat suhu hangat 37°C. Paparan terhadap suhu dingin tidak selalu dibutuhkan dalam manifestasi hemolisis *in vivo*. Autoantibodi anti-P mengikat antigen eritrosit secara optimal pada suhu 4°C dan mempunyai amplitudo termal kurang dari 20°C. Pada suhu yang lebih hangat, autoantibodi anti-P terdisosiasi dari eritrosit; titernya biasanya kurang dari 1:64 (Petz, 2008; Keohane, 2015).

Manifestasi klinis pada anak-anak biasanya demam akut, malaise, nyeri pada punggung, tungkai bawah dan/atau nyeri perut sekitar 1 sampai 2 minggu

setelah infeksi saluran napas atas. Pucat, kuning, dan urin berwarna gelap karena hemoglobinuria sering terjadi. Onset hemolisis yang mendadak menyebabkan anemia yang berat dengan kadar hemoglobin sering turun di bawah 5 gr/dL (Petz, 2008).





Retikulosit merupakan tanda yang khas, tetapi dapat didahului dengan retikulopenia. Evaluasi hapusan darah tepi menunjukkan adanya polikromasi dan sferosit, sedangkan skiztosit, eritrosit berinti, anisositosis, poikilositosis dan eritrofagositosis juga dapat diamati. Awalnya mungkin bisa terdapat leukopenia, namun kemudian terjadi leukositosis. Pemeriksaan untuk hemolisis intravaskuler juga memberikan hasil yang positif. DAT biasanya hanya memberikan hasil positif untuk C3d saja, karena autoantibodi anti-P terdisosiasi dari eritrosit pada suhu tubuh (Keohane, 2015).

Paroxysmal cold hemoglobinuria (PCH) adalah penyakit yang parah namun *self-limiting* dan sembuh dalam beberapa hari sampai beberapa minggu, dengan prognosis yang baik. Pada kebanyakan pasien, anemia yang terjadi biasanya berat dan dapat mengancam nyawa, oleh karena itu biasanya transfusi dibutuhkan sampai gejala-gejala menghilang. Karena autoantibodi anti-P hanya bereaksi pada suhu dingin dan darah dengan antigen P negatif sangat jarang, darah P-positif dapat ditransfusikan (Keohane, 2015).

4. Mixed-type Autoimmune Hemolytic Anemia

Mixed-type autoimmune hemolytic anemia jarang terjadi. Pada keadaan ini, pasien secara simultan membentuk suatu autoantibodi IgG dengan reaktivitas yang optimal pada 37°C (WAIHA) dan autoantibodi IgM patologik yang bereaksi secara optimal pada suhu 0°C sampai 10°C tetapi mempunyai amplitudo termal lebih besar daripada 30°C (CAD). Pasien dengan WAIHA dan cold aglutinin nonpatogenik (misalnya, aglutinin yang tidak bereaksi pada suhu lebih dari 20°C) tidak diklasifikasikan pada kategori ini karena cold aglutinin-nya tidak signifikan secara klinis (Petz, 2008; Keohane, 2015).

Hemolisis terjadi sebagai hasil dari kombinasi mekanisme intra dan ekstravaskuler. Penyakit ini biasanya kronis dengan episode intermiten anemia.

berat. DAT dapat menunjukkan hasil yang positif hanya pada IgG saja, C3d saja, atau IgG dan C3d. Autoantibodi hangat biasanya bersifat panreaktif dengan spesifikasi yang tidak jelas, dimana biasanya antibodi yang beraksi terhadap dingin mempunyai anti-I (Petz, 2008; Keohane, 2015).

2.1.4 Gambaran Klinis dan Laboratorium

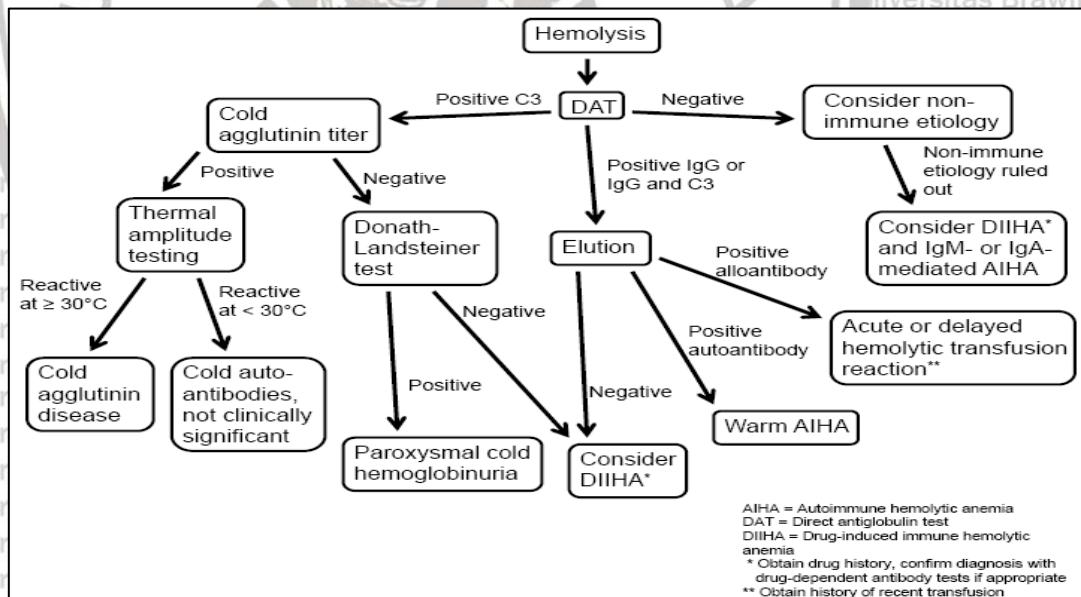
Temuan laboratorium pada AIHA sama pada anemia hemolitik lainnya, yaitu penurunan hemoglobin, peningkatan hitung retikulosit, peningkatan kadar serum bilirubin indirek dan laktat dehidrogenase, dan penurunan serum haptoglobin. Bila hemolisis yang terjadi didominasi oleh hemolisis intravaskuler atau hemolisis ekstravaskuler yang berat, kadar haptoglobin akan sangat rendah, kadar hemoglobin plasma akan meningkat, dan pasien mungkin mengalami hemoglobinuria atau bahkan hemosiderinuria (pada kasus hemolisis kronis). *Mean corpuscular volume* (MCV) mungkin meningkat karena retikulosis dan aglutinasi eritrosit (bila ada). Mungkin terjadi leukositosis dan trombositosis bersamaan dengan proliferasi eritroid dalam sumsum tulang. Pada evaluasi hapusan darah tepi ditemukan polikromasi, sferosit, dan kadang-kadang aglutinasi eritrosit. Sel eritrosit berinti, fragmentosit atau skistosit, dan eritrofagosit (sel fagosit yang sedang menfagositosis eritrosit) juga mungkin dapat diamati (Keohane, 2015).

Terdapatnya autoantibodi tidak selalu patogenik. Sekitar 1 dalam 10.000 donor darah sehat hasil tes autoantibodinya positif, yang frekuensinya semakin meningkat dengan bertambahnya usia. Pengikatan autoantibodi pada permukaan eritrosit dapat dideteksi secara laboratorium dengan pemeriksaan DAT.

Sedangkan autoantibodi yang bebas di serum/plasma dapat dideteksi dengan *indirect antiglobulin test* (IAT) (Blann and Ahmed, 2014). Adanya autoantibodi terhadap eritrosit juga tidak selalu menyebabkan hemolisis dan anemia. Sebagian besar pasien dengan konsentrasi autoantibodi yang rendah mempunyai DAT.



(direct Coombs' test) positif tapi tidak mengalami anemia dan gejala-gejala lainnya. Direct antiglobulin test (DAT) yang positif dapat disertai hemolisis oleh karena proses imun dan hemolisis oleh karena penyebab lain atau penyebab non-imun, sedangkan DAT negatif bisa juga disertai hemolisis (Zarandona and Yazer, 2006; Parjono dan Widayati, 2009). Sejumlah kecil pasien dengan DAT positif tanpa disertai pemendekan umur eritrosit atau tanpa disertai bukti-bukti hemolisis ditemukan pada 1%-15% pasien yang dirawat di rumah sakit. Hal ini mungkin disebabkan proses keradangan yang menyebabkan adsorpsi antibodi non spesifik pada permukaan membran eritrosit. Antibodi ini tidak berikatan secara imunologik dengan antigen spesifik eritrosit sehingga tidak menyebabkan hemolisis. Ketika derajat hemolisisnya signifikan maka anemia, ikterik, dan splenomegali dapat terjadi (Zarandona and Yazer, 2006).



Gambar 2.2. Algoritma diagnostik AIHA (Bain et al., 2016)

2.2 Trombosis pada Autoimmune Hemolytic Anemia dan Hubungannya

dengan Fibrinogen, Fibrin Monomer, dan Mikropartikel

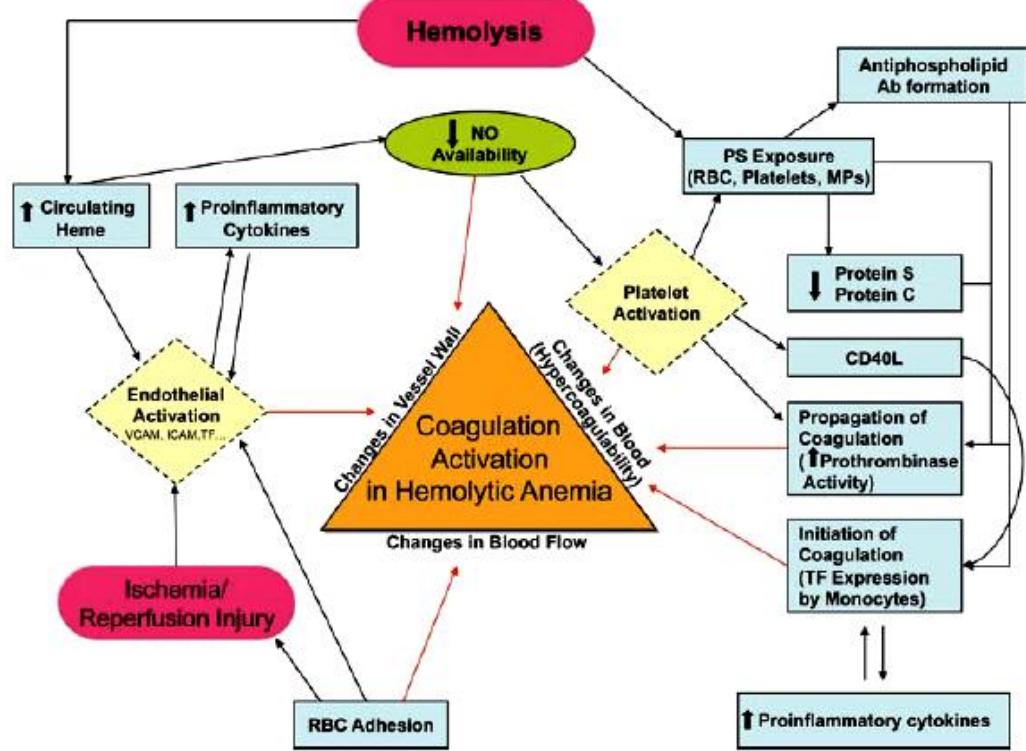
Adanya bukti bahwa AIHA ditandai oleh *hypercoagulable state*. Selain itu, terdapat peningkatan pembentukan trombin dan fibrin, peningkatan aktivitas faktor jaringan, dan peningkatan aktivasi trombosit, pasien dengan AIHA menunjukkan komplikasi trombosis, termasuk tromboembolisme vena, thrombosis paru *in situ*, dan stroke.

Mekanisme aktivasi koagulasi pada AIHA cenderung multifaktorial (Ataga, 2009).

Biasanya, *phosphatidylserine* ditemukan pada lapisan dalam membran sel, sedangkan fosfolipid yang mengandung kolin, seperti *fosfatidilkolin* dan *sphingomyelin*, terletak pada lapisan luar membran sel. Paparan *phosphatidylserine* abnormal berfungsi sebagai sinyal pengenalan untuk penghancuran sel selama apoptosis sel berinti dan tempat *docking* untuk kompleks enzimatik yang terlibat dalam jalur koagulasi dan antikoagulasi. Paparan eksternal dari *phosphatidylserine* mengubah sifat adesif dari eritrosit dan tampaknya terlibat dalam perubahan hemostatis yang diamati pada AIHA (Ataga, 2009).

Mikropartikel yang bersirkulasi (vesikel kecil dari membran yang dilepaskan oleh sel setelah aktivasi atau apoptosis), berasal dari eritrosit, trombosit, sel endotel dan monosit, juga dapat berkontribusi pada keadaan hiperkoagulasi pada AIHA. Jumlah total mikropartikel berkorelasi dengan D-dimer, kompleks trombin-antithrombin dan protrombin fragmen 1 dan 2 (F1 + 2) (peptida yang dilepaskan dari protrombin saat aktivasi pembentukan trombin) pada pasien AIHA. Hal ini menunjukkan bahwa mikropartikel dapat berkontribusi pada hiperkoagulasi yang diamati pada pasien dengan AIHA. Hubungan kuat mikropartikel dengan penanda fibrinolisis dan aktivasi koagulasi serta dengan penanda hemolitik menegaskan peran hemolisis dalam aktivasi koagulasi yang diamati pada pasien dengan AIHA (Ataga, 2009).





Gambar 2.3. Skema yang merepresentasikan mekanisme patofisiologis aktivasi koagulasi pada penyakit sickle cell disease dan anemia-anemia hemolitik yang lain. Berdasarkan pada triad Virchow, jalur-jalur yang digambarkan berperan pada aktivasi koagulasi (mungkin kadang thrombosis) dengan satu dari tiga mekanisme berikut: (i) perubahan-perubahan dinding pembuluh darah; (ii) perubahan-perubahan pada aliran darah; dan/atau (iii) perubahan-perubahan pada komposisi komponen darah ('hypercoagulability'). Ab: antibody; NO: nitric oxide; PS: phosphatidylserine; RBC: red blood cell; MPs: microparticles; TF: tissue factor. (Adapted from Ataga KI, Key NS. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:91-96) (Ataga, 2009)

Fibrinogen (faktor 1), salah satu reaktan fase akut, adalah glikoprotein plasma terlarut yang disintesis oleh hati dan merupakan kofaktor aktivasi trombus yang dapat secara langsung berkontribusi pada pembentukan plak karena akan diubah oleh trombin menjadi fibrin selama proses koagulasi (Hajsadeghi, 2012). Fibrinogen terakumulasi di tempat cidera pembuluh darah

meskipun prosesnya masih minimal karena *adherence*-nya terhadap endotel dapat memediasi perkembangan trombus. Fibrinogen secara independen berkorelasi dengan kejadian trombus pembuluh darah (Tabakci, *et al.*, 2017). Kadar fibrinogen dikatakan dapat mencerminkan kondisi trombosis pada pasien lebih awal dibandingkan pemeriksaan PT dan APTT serta dapat dijadikan sebagai pemeriksaan diagnostik trombosis yang terpercaya. Kadar fibrinogen yang lebih tinggi dapat menyebabkan peningkatan viskositas darah, peningkatan kepadatan serat dari bekuan fibrin, peningkatan resistensi dari bekuan fibrin terhadap fibrinolisis, dan perubahan sifat mekanik dari bekuan fibrin yang mengakibatkan kejadian trombosis. Fibrin adalah komponen struktural utama dari trombus. Konversi fibrinogen menjadi fibrin oleh trombin mengawali fibrin yang secara spontan membentuk gel dengan memproduksi serat yang mengikat trombosit dan menjebak sel darah lainnya (Ariëns, 2011). Kadar fibrinogen diperiksa menggunakan perhitungan waktu pembekuan plasma yang berbanding terbalik dengan konsentrasi fibrinogen dalam plasma. Hal tersebut mendorong penggunaan fibrinogen sebagai penanda trombosis pada pasien saat ini (Tabakci, *et al.*, 2017).

Performa diagnosis fibrinogen sudah diteliti pada pasien dengan trombosis vena dalam, sindrom koroner akut, penyakit arteri koroner, *atheroembolism*, infeksi, penyakit inflamasi kronis seperti penyakit autoimun, dan keganasan. Fibrinogen dihubungkan dengan trombogenitas dan kejadian trombus pada beberapa penyakit tersebut. Kadar fibrinogen lebih tinggi secara signifikan pada pasien dengan kejadian trombus dibandingkan dengan kontrol. Bahkan kadar fibrinogen dilaporkan semakin tinggi secara signifikan pada pasien dengan trombosis obstruksi. Sensitivitas dan spesifitas kadar fibrinogen >400 mg/dL sebagai diagnosis trombosis pada pasien dengan penyakit yang terkait kondisi



awijaya universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 awijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 awijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 awijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya
 awijaya hiperkoagulabilitas berkisar antara 46-67% dan 75-93%. Hasil ini secara umum
 awijaya lebih sensitif daripada pemeriksaan D-dimer yang juga memiliki sensitivitas
 awijaya beragam mulai dari 20-100%. Selain itu, kadar fibrinogen juga memiliki korelasi
 awijaya dengan penanda trombosis yang lain seperti D-dimer ($r= 0,6-0,9$) dan *thrombin-activating complex* (TAT) ($r= 0,4-0,9$) (Boisclair MD, et al., 1989; Stec et al., 2000; Danesh et al., 2005; Aykan et al., 2014).

Kadar fibrin monomer dalam plasma menunjukkan bahwa thrombin telah mengubah fibrinogen menjadi fibrin. Pembentukan fibrin di pembuluh darah didahului oleh pembentukan turunan fibrinogen yang telah digunakan sebagai penanda molekuler pembentukan fibrin intravaskuler dalam diagnosis laboratorium keadaan protrombosis dan trombosis. Fibrin monomer digabungkan dengan dua molekul fibrinogen dengan cepat, dan bentuk gabungan ini disebut SF. Ketika interaksi trombin-SF berlangsung, polimerisasi fibrin terjadi, sehingga menghasilkan polimer fibrin, dan seiring terus berlanjutnya polimerisasi, pada akhirnya menghasilkan trombogenesis (Wada and Sakuragawa, 2008).

Gold standard untuk menilai *flow stasis* dan trombosis pembuluh darah adalah angiografi (sensitivitas dan spesifikasi >90%) (Mauchley, 2018). Angiografi merupakan pemeriksaan invasif yang dapat memberikan informasi yang baik mengenai trombus pada salah satu pembuluh darah bila dikerjakan oleh operator yang terlatih (Shuman, 2010). Metode pencitraan awal yang juga digunakan untuk mendiagnosis trombosis di suatu bagian tubuh pasien adalah *color doppler ultrasound* (sensitivitas dan spesifikasi >90%). Pemeriksaan-pemeriksaan tersebut dianggap lebih rumit dan kurang hemat dari segi biaya (Tabakci, et al., 2017).



2.3 Fibrin Monomer

Fibrin-related markers (FRM) dihasilkan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3. Fraksinasi E fibrinogen diaktifkan oleh trombin, dan mudah digabungkan dengan fraksi D fibrinogen untuk membentuk fibrin monomer (FM). Fibrin monomer digabungkan dengan dua molekul fibrinogen dengan cepat, dan bentuk gabungan ini disebut SF. Ketika interaksi trombin-SF berlangsung, polimerisasi fibrin terjadi, sehingga menghasilkan polimer fibrin, dan seiring berlanjutnya polimerisasi, pada akhirnya menghasilkan trombogenesis. Karena sejumlah kecil trombin segera diinaktivasi oleh antitrombin, fibrinogen yang bersirkulasi, dan sebagainya, koeksistensi SF dan trombin penting untuk trombogenesis, menunjukkan bahwa tingkat SF yang meningkat merupakan keadaan pretrombotik. Polimer fibrin, yang distabilkan oleh faktor XIII (FXIII), terdegradasi oleh plasmin, dan sebagainya, dan polimer fibrin yang terdegradasi adalah fragmen protein yang disebut D-dimer. D-dimer tidak memiliki kemampuan pembentukan trombus itu sendiri, dan peningkatan D-dimer hadir mencerminkan hasil fibrinolisis sekunder setelah trombogenesis (Wada and Sakuragawa, 2008).

Pembentukan fibrin di pembuluh darah didahului oleh pembentukan turunan fibrinogen yang telah digunakan sebagai penanda molekuler pembentukan fibrin intravaskuler dalam diagnosis laboratorium keadaan protrombosis dan trombosis. Selama konversi fibrinogen menjadi fibrin, trombin memediasi pembelahan sepasang peptida fibrinopeptida A dan menghasilkan fibrin monomer, yang kemudian dipolimerisasikan untuk membentuk bekuan fibrin yang tidak larut. Molekul fibrin monomer, di sisi lain, membentuk kompleks larut dengan molekul fibrinogen dengan adanya konsentrasi yang cukup dari fibrinogen, dan kompleks ini telah didefinisikan sebagai kompleks fibrin monomer-fibrinogen terlarut. *Soluble fibrin precursor* yang dikenal sebagai *soluble fibrin monomer complexes* atau *soluble fibrin* muncul di darah sebagai hasil peningkatan.



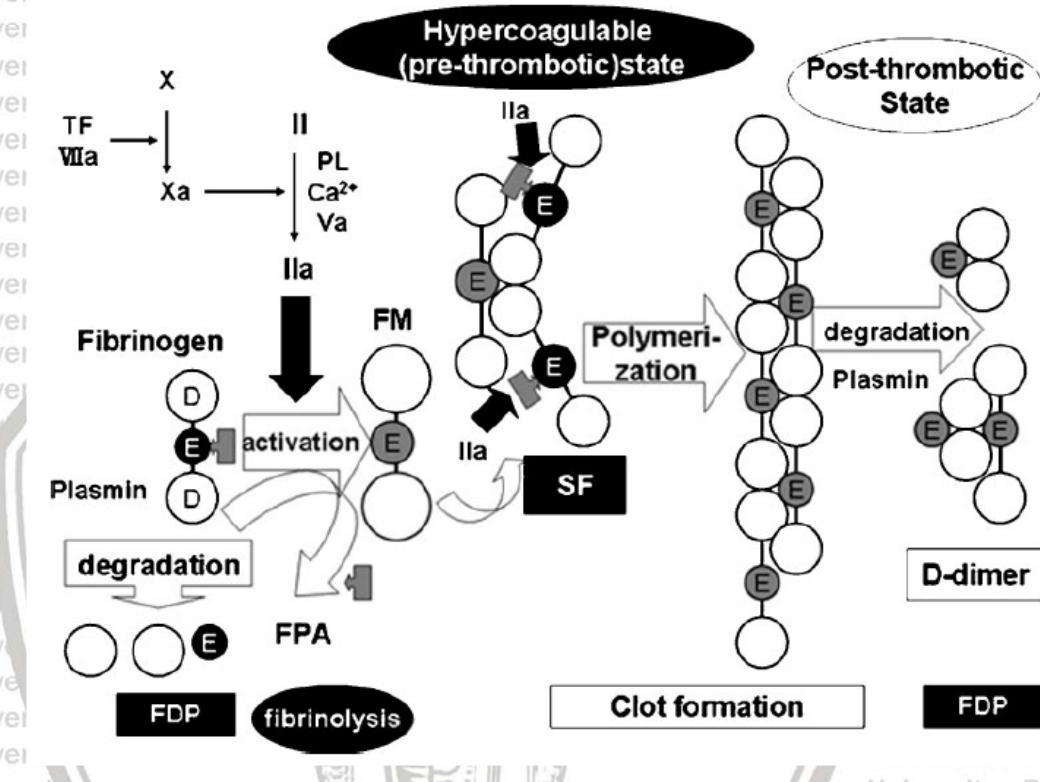


pembentukan trombin intravaskuler dan mencerminkan risiko tinggi klot intravaskuler atau pembentukan fibrin yang sedang berlangsung. Penentuan kuantitatif *soluble fibrin monomer complex* dalam darah didasarkan pada *immunoassay* yang membedakan antara fibrinogen dan turunan fibrinogen yang dimodifikasi oleh trombin. Pentingnya diagnosis *soluble fibrin monomer* ditunjukkan pada tromboemboli vena, trombosis arteri koroner, bypass kardiopulmoner, dan banyak kondisi lain yang terkait dengan trombofilia dan/atau kondisi trombosis. Penanda molekuler terkait fibrin lainnya disebut *fibrin degradation product* yang berasal dari pembelahan enzimatik fibrin dalam aksi plasmin, protease utama sistem fibrinolitik. Dibandingkan dengan polimer fibrin dan fibrin stabil, FM rapuh *in vivo*, karena fibrinolisis, sehingga dianggap sebagai penanda yang sensitif dari keadaan hiperkoagulasi. Dibandingkan dengan penanda tromboemboli rutin lainnya, kadar FM telah terbukti menjadi prediktor independen dari kejadian trombus sistemik (Litvinov and Weisel, 2016).

Fibrin monomer diukur menggunakan pemeriksaan *immunoturbidimetrik*

STA-Liatest FM dan *STAGO COMPACT MAX analyzer* (Diagnostic Stago, Prancis). Pemeriksaan didasarkan pada perubahan kekeruhan suspensi mikropartikel yang diukur dengan fotometri. Mikropartikel lateks, dilapisi dengan antibodi monoklonal yang spesifik untuk fibrin monomer, dicampur dengan plasma yang diperiksa. Reaksi antigen-antibodi yang dihasilkan menyebabkan aglutinasi mikropartikel yang mengakibatkan peningkatan kekeruhan media reaksi yang tercermin dari penurunan absorbansi dan diukur secara fotometri oleh alat pada 540 nm. Penurunan absorbansi berbanding terbalik dengan tingkat sFM yang ada pada sampel yang diperiksa yang diplotkan terhadap kurva kalibrasi yang dibuat dengan menggunakan kalibrasi level (*STA-Liatest FM Calibrator*) dan penyanga (*buffer STA-Owen-Koller*) sebagai titik nol. Untuk memastikan akurasi dan reproduksibilitas hasil, 2 tingkat kontrol yang berbeda menggunakan *STA-Liatest*

FM Control kit disertakan dalam pengukuran. Batas deteksi yang diamati adalah 2,0 $\mu\text{g/mL}$ dan pemeriksaannya linier sampai dengan 150 $\mu\text{g/mL}$. Reproduksibilitas yang dilaporkan berkisar antara 3,1 – 8,0%. *Reference range* yang dilaporkan <6,0 $\mu\text{g/mL}$ (Elged et al., 2016).



Gambar 2.4 Pembentukan Fibrin Monomer (Wada and Sakuragawa, 2008)

2.4. Mikropartikel

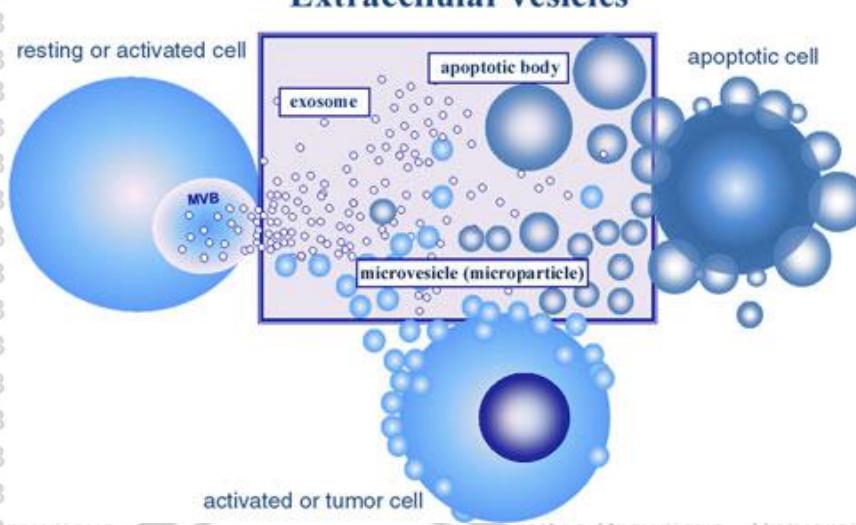
Ruang ekstraseluler organisme-organisme multiseluler mengandung larutan yang terdiri dari metabolit-metabolit, ion-ion, protein dan polisakarida. Di samping itu, lingkungan ekstraseluler ini juga mengandung sejumlah besar *mobile membrane-limited vesicles* yang dikenal dengan istilah *extracellular vesicles* (EVs). *Extracellular vesicles* (EVs) termasuk eksosom, activation- atau apoptosis-induced microvesicles (MVs)/microparticles dan apoptotic bodies (Gambar 2.4).



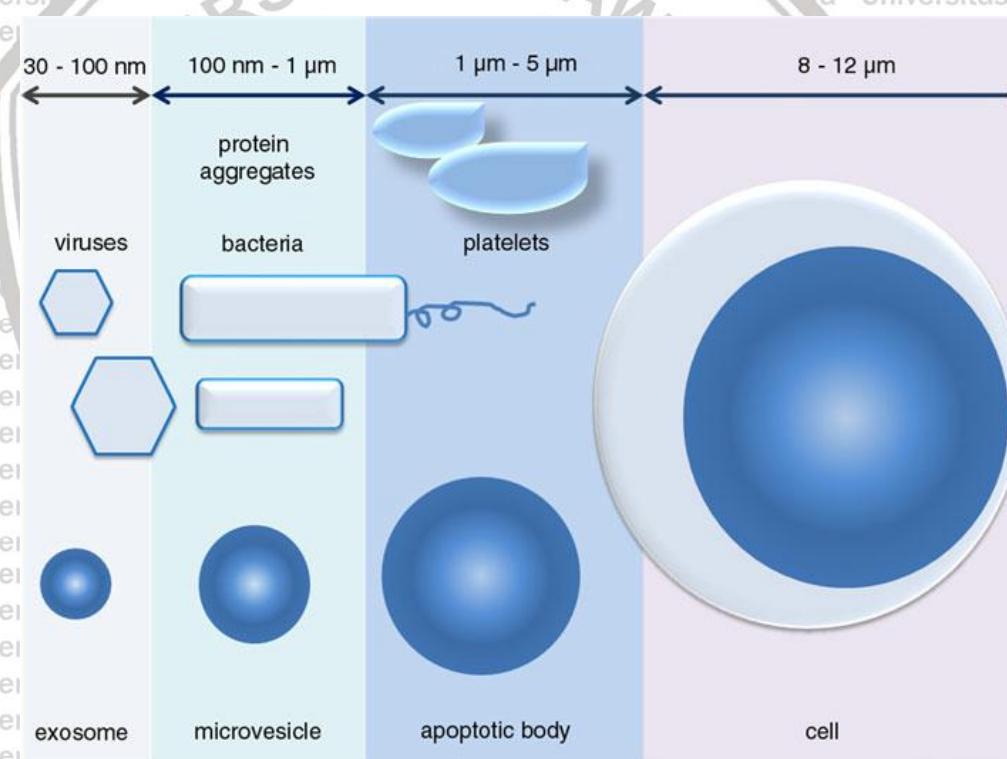
Kesenjangan antara *messengers* biologis molekuler dengan seluler diisi oleh vesikel-vesikel subseluler yang berbeda-beda dalam hal sifat-sifat regulator potennya. Fungsi-fungsi regulator diperantarai baik oleh reseptor-reseptor permukaan untuk memungkinkan interaksi-interaksi dengan sel-sel target, maupun oleh kandungan internal vesikel, yang dapat berfusi dengan kandungan sel. Vesikel-vesikel ini, yang biasanya disebut dengan *microparticles* (MPs) seluler secara konstan terdapat dalam sirkulasi dan dengan demikian dapat diimplikasikan dalam regulasi organ-organ dan jaringan yang letaknya jauh (Robert *et al.*, 2008; Gyoörgy *et al.*, 2011; Lacroix *et al.*, 2013).

Ukuran diameter MPs seluler heterogen, berkisar antara 0,1-1,0 μm , yang mengekspresikan antigen-antigen permukaan yang khas untuk parent cells-nya (Robert *et al.*, 2008; Gyoörgy *et al.*, 2011; Lacroix *et al.*, 2013). Ukuran tersebut untuk membedakan MPs dengan partikel-partikel yang lebih kecil yaitu, eksosom, dengan diameter kurang dari 0,1 μm , dan dari partikel-partikel yang lebih besar, yaitu, *apoptotic bodies* yang dibentuk oleh fragmen-fragmen sel yang mengalami apoptosis (Gyoörgy *et al.*, 2011; Shantsila *et al.*, 2014).

Berbagai sel nampaknya mempunyai mekanisme-mekanisme yang dapat menyebabkan dibentuknya MPs yang diperkaya dengan tipe-tipe spesifik protein membran dan molekul-molekul sub-membran. Ini mengimplikasikan adanya jalur-jalur sinyaling kompleks yang mengawali dan mengakhiri pembentukan MP. Tetapi bagaimanapun, peran biologis dan klinis MPs yang tepat tetap masih belum dipahami dengan baik. Ini terutama sebagian besar diakibatkan oleh keterbatasan-keterbatasan yang ada. Beberapa bukti mendukung bahwa pelepasan vesikel merupakan respons seluler adaptif yang universal (Gyoörgy *et al.*, 2011; Shantsila *et al.*, 2014).



Gambar 2.5 Gambaran skematik vesikel ekstraseluler. Populasi utama antara lain, eksosom, mikrovesikel, dan apoptotic bodies (Gyoörgy et al., 2011).



Gambar 2.6. Rentang ukuran tipe-tipe utama vesikel membran. Ukuran eksosom sebesar virus, mikrovesikel sebesar bakteri dan agregat protein (misal, kompleks imun). Baik apoptotic bodies maupun trombosit ukurannya berkisar antara 1–5 μm (Gyoörgy et al., 2011).

Sebagai contoh fungsi-fungsi penting MVs adalah: mempunyai aktifitas prokoagulan, merepresentasikan bentuk sekresi IL1b, berperan dalam patogenesis rheumatoid arthritis, berperan dalam karakter proinvasive tumor, induksi transformasi onkogenik seluler, komunikasi fetomaternal (Gyo'rgy et al., 2011).

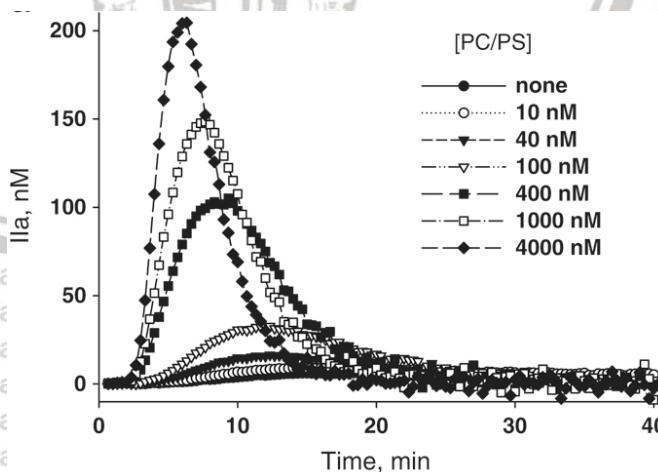
Tabel 2.2 Asal dan Antigen-Antigen MPs (Nomura et al., 2012)

Origin	Antigen
Platelet	CD42a (GPIX) CD42b (GP Ib) CD41 (GPIIb/IIIa, $\alpha_{IIb}\beta_3$) CD61 (GPIIIa) CD62P (P-selectin)
Monocyte Endothelial cell	CD14 (Endotoxin receptor) CD31 (PECAM-1) CD51 (Vitronectin receptor, $\alpha_v\beta_3$) CD54 (ICAM-1) CD62E (E-selection) CD105 (Endoglin) CD144 (VE-Cadherin) CD146 (MeLCAM)

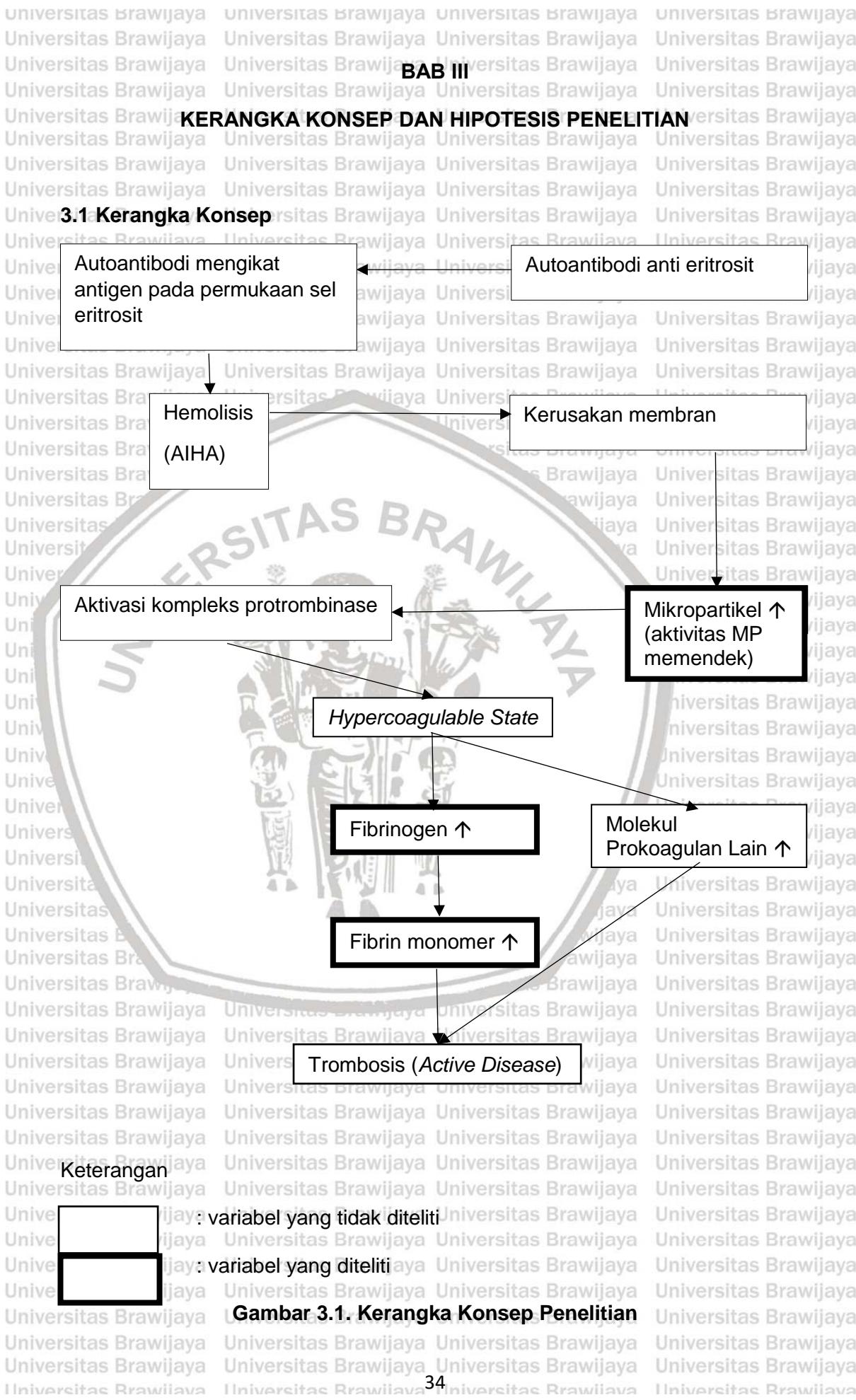
Sifat-sifat MP (Knijff-Dutmer et al., 2002; Distler et al., 2005, Lacroix et al., 2013):

1. Umum: dihasilkan selama apoptosis dan aktivasi
2. Ukuran: diameter kurang dari 1 μm
3. Struktur: vesikel yang dikelilingi membran, menampilkan molekul permukaan sel
4. Cross-talk: transfer molekul-molekul bioaktif di antara sel-sel
5. Aktivasi sel: memicu aktivasi sel dan pelepasan sitokin
6. Biomarker: biomarker untuk trombosis dan keradangan

Penelitian pada berbagai sistem *in vitro* menunjukkan bahwa mikropartikel merupakan mediator-mediator potensial yang penting pada interaksi-interaksi seluler. Dengan demikian, struktur-struktur subseluler dapat mentransfer molekul bioaktif antar sel, juga meregulasi berbagai macam proses, seperti keradangan, koagulasi, fungsi vaskuler, apoptosis, dan proliferasi sel (Distler *et al.*, 2005). Mikropartikel mengandung fosfolipid yang merupakan zat prokoagulasi dan akan menyebabkan terjadinya proses pembekuan karena merangsang terbentuknya protrombin dan turunannya. Adanya peningkatan jumlah fosfolipid prokoagulan pada MP dalam sirkulasi mengakibatkan formasi *clot* sehingga meningkatkan angka kejadian trombosis. Proses pembekuan tersebut akan berlangsung lebih cepat seiring dengan tingginya fosfolipid prokoagulan pada MP dalam sirkulasi. Penelitian Owen, *et al.* (2012) juga menunjukkan semakin banyak fosfolipid prokoagulan, semakin tinggi pula kejadian koagulasi yang digambarkan dengan terbentuknya trombin dan semakin pendek waktu yang dibutuhkan untuk proses tersebut (Gambar 2.7).



Gambar 2.7. Trombogram yang menunjukkan kadar fosfolipid prokoagulan (PC/PS: *phosphatidylcholine/phosphatidylserine*) berbanding lurus dengan proses koagulasi yang digambarkan dengan terbentuknya trombin (sumbu y) dan berbanding terbalik dengan waktu (sumbu x) (Owen, *et al.*, 2012).

**Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian**

Keterangan

Peristiwa utama dalam perkembangan autoimunitas adalah pengenalan *self-antigen* oleh limfosit autoreaktif, aktivasi sel tersebut untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor, dan kerusakan jaringan yang disebabkan oleh sel efektor dan produk-produknya. Produk yang dihasilkan oleh limfosit autoreaktif tersebut misalnya adalah autoantibodi anti eritrosit. Autoantibodi tersebut melekat dan menyebabkan kerusakan (hemolisis) eritrosit endogen yang menyebabkan anemia (Friedberg and Johari, 2014). Kerusakan membran eritrosit pada penyakit ini menimbulkan peningkatan paparan mikropartikel yang nantinya mengarah pada kondisi hiperkoagulasi akibat aktivasi kompleks protrombinase. Darah yang kontak dengan dinding (faktor jaringan) atau kolagen pembuluh darah yang rusak dan trauma terhadap darah itu sendiri dalam kondisi hiperkoagulasi akan meningkatkan monomer fibrin, mikropartikel, serta molekul prokoagulan lain. Hal tersebut dapat mengakibatkan trombosis dan semakin aktifnya penyakit tersebut.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Kadar Fibrin Monomer (FM) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal (200 – 400 mg/dL) lebih rendah daripada kadar Fibrin Monomer (FM) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi (>400 mg/dL).
2. Aktivitas Mikropartikel (MP) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal lebih panjang daripada aktivitas Mikropartikel (MP) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi.
3. Kadar Fibrin Monomer (FM) dan aktivitas Mikropartikel (MP) berkorelasi dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA.



METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional analisis dengan pendekatan pengambilan data potong lintang. Sumber data yang digunakan dalam penelitian

ini adalah data primer yang didapat dari hasil pemeriksaan kadar FM dan aktivitas MP serta kadar fibrinogen pada pasien AIHA serta data sekunder yang didapat dari rekam medis untuk menentukan subyek penelitian sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Subyek Penelitian

Populasi subyek penelitian adalah pasien AIHA di poliklinik rawat jalan dan rawat inap RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

4.2.2 Besar Sampel

Rumus yang digunakan untuk menentukan besar sampel pada penelitian ini adalah menggunakan rumus penentuan besar sampel analisis korelatif (Dahlan, 2010). Rumus tersebut adalah sebagai berikut.

$$n = \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta)}{0,5 \ln \left[\frac{1+r}{1-r} \right]} \right]^2 + 3$$

Keterangan:

n = jumlah sampel

– Kesalahan tipe I ($Z\alpha$)= ditetapkan sebesar 5% dengan hipotesis 2 arah, sehingga $Z\alpha = 1,96$

– Kesalahan tipe II ($Z\beta$)= ditetapkan 10% dengan hipotesis 2 arah maka $Z\beta = 1,28$

Koefisien korelasi minimal yang dianggap bermakna (r)= 0,75

Jumlah sampel yang didapatkan dari rumus tersebut adalah minimal sebanyak 15 orang. Untuk menghindari kesalahan dalam pemeriksaan kriteria inklusi, sampel ditambahkan 10% dari sampel yang didapatkan yaitu sebanyak 2 orang sehingga sampel yang digunakan menjadi sebanyak 17 orang untuk masing-masing kelompok.

4.2.2.2 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel pasien AIHA pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- Pasien usia 19-65 tahun.
- Pasien dengan diagnosis AIHA di poliklinik rawat jalan serta rawat inap RSUD dr. Saiful Anwar Malang yang pada penelitian ini ditegakkan berdasarkan

pemeriksaan $Hb < 12 \text{ g/dL}$ (perempuan) atau $< 14 \text{ g/dL}$ (laki-laki), DAT (+) dan didiagnosis secara klinis oleh dokter spesialis penyakit dalam.

- Pasien yang bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani *informed consent* yang telah disetujui oleh Komisi etik RSUD dr. Saiful Anwar Malang.

4.2.2.3 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi sampel penelitian ini adalah sebagai berikut.

- Pasien yang menderita *immune thrombocytopenic purpura* (ITP), *acute coronary syndrome* (ACS), sepsis, keganasan, autoimun lain seperti RA dan *thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP).

4.3 Teknik Sampling

Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan secara *consecutive sampling* yaitu pasien AIHA di poliklinik rawat jalan dan rawat inap RSUD dr. Saiful

Anwar pada saat periode penelitian dan lolos setelah dilihat dari kriteria inklusi dan eksklusi, diambil sampai sesuai jumlah sampel yang telah ditetapkan.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kadar fibrinogen pada pasien AIHA. Kadar fibrinogen normal adalah 200-400 mg/dL sedangkan kadar fibrinogen tinggi adalah >400 mg/dL. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar FM dan aktivitas MP.



4.5 Definisi Operasional Variabel

No.	Variabel	Definisi Operasional	Parameter/Alat ukur	Satuan	Skala	Nilai Normal
1.	AIHA	AIHA primer, anemia karena penghancuran eritrosit oleh autoantibodi	pemeriksaan penunjang laboratorium: Hb < 12 g/dL (perempuan) atau < 14 g/dL (laki-laki) (Sysmex XN-1000), DAT (+) dan didiagnosis secara klinis oleh dokter spesialis penyakit dalam.	-	Nominal	-
2.	Fibrinogen	Protein yang diperiksa dalam sampel plasma sitras yang berfungsi dalam proses hemostasis dengan menstimulasi pembentukan trombus dan diduga sebagai penanda trombosis bila kadarnya tinggi. Kadar fibrinogen normal dan tinggi yang digunakan penelitian ini.	Normal = 200-400 mg/dL Tinggi = >400 mg/dL (Sysmex CS-2100i)	mg/dL	Ratio	200 - 400
3.	Fibrin monomer	Fibrinogen yang berubah akibat aksi proteolitik trombin pada domain rantai α dan β N-terminalnya dalam sampel plasma sitras dan dianggap sebagai kandidat alternatif penanda trombosis yang lebih sensitif dan spesifik dibandingkan fibrinogen	Sta compact max	μ g/mL	Ratio	<5,2 μ g/mL
5.	Aktivitas mikropartikel	Waktu yang diperlukan oleh MP (partikel berukuran 0,1 – 1 μ m yang dilepaskan saat remodeling membran eritrosit dan trombosit yang berisi fosfolipid prokoagulan yang terlibat dalam trombosis, inflamasi, remodeling vaskuler, dan angiogenesis) membuat bekuan. Semakin pendek waktu yang diperoleh dari pengukuran aktivitas MP, semakin tinggi kadar MP dalam sampel tersebut sehingga semakin cepat terjadi bekuan.	Sta compact max	Detik	Ratio	72 ± 5,6

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral RSUD dr. Saiful Anwar Malang pada bulan Oktober 2018-Maret 2019.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat

1. Alat pengambilan sampel: spuit 5 mL, tabung plasma sitras

2. Alat pemeriksaan kadar fibrinogen: Sysmex CS-2100i

3. Alat pemeriksaan kadar FM dan aktivitas MP: Sta-compact max

4.7.2 Bahan

Sampel plasma Na sitras darah vena serta rekam medis.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pengambilan Sampel

Darah dari vena perifer pasien dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan trisodium sitras 3,2% dengan perbandingan darah:antikoagulan = 9:1 kemudian disentrifus 2500 g selama 15 menit sesegera mungkin dalam waktu 1 jam setelah pengambilan sampel. Plasma yang didapatkan dari hasil sentrifus tersebut kemudian diperiksa kadar fibrinogennya dengan alat Sysmex CS-2100i kemudian sisanya diambil dan disimpan pada suhu

$\leq -20^{\circ}\text{C}$. Sampel plasma yang disimpan lalu diperiksa kadar FM dan aktivitas MP maksimal 1 bulan dari waktu awal penyimpanan. Plasma yang telah disimpan pada suhu $\leq -20^{\circ}\text{C}$ dibiarkan mencair terlebih dulu pada suhu 37°C sebelum dimasukkan ke dalam alat *Sta-compact max* untuk diperiksa kadar FM dan aktivitas MP.

4.8.2 Prosedur Pemeriksaan Kadar Fibrinogen

Persiapan dan Penyimpanan Reagen Pemeriksaan Kadar Fibrinogen

Reagen dalam vial yang belum dibuka stabil sampai tanggal kadaluwarsa yang ditunjukkan pada label kemasan bila disimpan pada suhu 2-8 °C. Reagen thrombin (*Iyophilized bovine thrombin preparation* (± 100 IU/mL) dengan *stabilizer* dan *buffer*) tersebut dilarutkan dengan sejumlah air terdistilasi atau terdeionisasi sesuai label pada vial kemudian vialnya ditutup serta isinya dibiarkan larut dan dicampur rata sesaat sebelum digunakan. Stabilitas reagen setelah rekonstitusi:

- o 2-8 °C: 5 hari (vial tertutup)
- o 15-25 °C: 8 jam (vial tertutup)

Prinsip Pemeriksaan Kadar Fibrinogen

Enzim trombin mengubah protein fibrinogen yang larut dalam plasma menjadi polimernya yang tidak larut, fibrin. Waktu pembekuan plasma berbanding terbalik dengan konsentrasi fibrinogen dalam plasma (normal = 200 – 400 mg/dL). Waktu pembekuan yang didapat dengan cara ini kemudian dibandingkan dengan standar fibrinogen.

Quality Control Pemeriksaan Kadar Fibrinogen

Dua level material QC (normal dan patologi) diperiksa sebelum melakukan tes fibrinogen, setiap kalibrasi, ganti reagen, dan minimal setiap 8 jam/hari.

Material kontrol diproses dengan cara yang sama seperti sampel. Pengecekan alat, material kontrol, dan reagen dilakukan serta hasil pemeriksaan tidak dikeluarkan jika nilai kontrol di luar interval.



4.8.3 Prosedur Pemeriksaan Kadar Fibrin Monomer

Persiapan dan Penyimpanan Reagen Pemeriksaan Kadar FM

Reagen dalam vial yang belum dibuka stabil sampai tanggal kadaluwarsa yang ditunjukkan pada label kemasan bila disimpan pada suhu 2-8 °C. Reagen 1 (*buffer*) dan reagen 2 (suspensi mikropartikel lateks yang dilapisi dengan antibodi monoklonal anti FM manusia) dibiarkan pada suhu ruang (18-25°C) selama 15 menit sebelum digunakan. Masing-masing vial reagen tersebut kemudian diputar perlahan tanpa menghasilkan gelembung lalu tiap vial ditutup dengan *perforated cap* sesaat sebelum dipakai. Setelah dibuka, reagen 1 dan 2 stabil selama • 2 hari pada STA-compact max bila tetap berada dalam vial asli dengan *perforated cap*

- 15 hari pada suhu 2-8°C dalam vial dan tutup aslinya.

Prinsip Pemeriksaan Kadar FM

Pemeriksaan ini didasarkan pada perubahan kekeruhan suspensi mikropartikel yang diukur dengan fotometer. Suspensi mikropartikel lateks yang dilapisi ikatan kovalen dengan antibodi monoklonal spesifik terhadap ada atau tidaknya kompleks FM terlarut pada plasma yang akan diperiksa. Reaksi antigen-antibodi mengawali aglutinasi mikropartikel lateks yang menginduksi peningkatan kekeruhan media reaksi. Peningkatan kekeruhan ini digambarkan dengan peningkatan absorbansi yang nantinya akan diukur oleh fotometer. Peningkatan absorbansi sebanding dengan tingkat kompleks FM terlarut yang ada dalam sampel (normal <5,2 µg/ml). Pemeriksaan kompleks FM terlarut dalam sampel plasma akan dianalisis oleh alat pada panjang gelombang 540 nm segera setelah sampel dimasukkan.

Quality Control Pemeriksaan Kadar FM

Uji kalibrasi dilakukan dengan 5 *STA-FM calibrator* untuk mendapatkan kurva kalibrasi. Dua level kontrol yang berbeda memakai *STA-FM control* digunakan untuk QC.

4.8.4 Prosedur Pemeriksaan Aktivitas Mikropartikel

Persiapan dan Penyimpanan Reagen Pemeriksaan Aktivitas MP

Reagen dalam vial yang belum dibuka stabil sampai tanggal kadaluwarsa yang ditunjukkan pada label kemasan bila disimpan pada suhu 2-8 °C.

- Reagen 1 (plasma sitras manusia yang fosfolipid prokoagulannya sudah dihilangkan, *lyophilized*): 1ml air ditambahkan ke dalam tiap vial dan dibiarkan larut pada suhu kamar (18-25°C) selama 30 menit sebelum digunakan kemudian vial diputar perlahan untuk mendapatkan solusi yang homogen. Stabilitas reagen yang direkonstitusi dalam vial asli: 8 jam dalam *STA-compact max*.
- Reagen 2 (factor Xa bovine, ±0,04 IU/vial, *lyophilized*): 4 ml air ditambahkan ke dalam tiap vial dan dibiarkan larut pada suhu kamar (18-25°C) selama 30 menit sebelum digunakan kemudian vial diputar perlahan untuk mendapatkan solusi yang homogen. Stabilitas reagen yang direkonstitusi dalam vial asli: 8 jam dalam *STA-compact max*.
- Reagen 3 (plasma sitras manusia yang waktu pembekuannya dalam sistem STA-Procoag-PPL sudah diketahui): 1ml air ditambahkan ke dalam tiap vial dan dibiarkan larut pada suhu kamar (18-25°C) selama 30 menit sebelum digunakan sebagai kontrol normal, kemudian vial diputar perlahan untuk mendapatkan solusi yang homogen. Stabilitas reagen yang direkonstitusi dalam vial asli: 8 jam dalam *STA-compact max*.



- Reagen 4 (plasma sitras manusia yang waktu pembekuannya dalam sistem STA-Procoag-PPL sudah diketahui lebih rendah daripada reagen 3): 1ml air ditambahkan ke dalam tiap vial dan dibiarkan larut pada suhu kamar ($18-25^{\circ}\text{C}$) selama 30 menit sebelum digunakan sebagai kontrol patologi, kemudian vial diputar perlahan untuk mendapatkan solusi yang homogen. Stabilitas reagen yang direkonstitusi dalam vial asli: 8 jam dalam *STA-compact max.*

Prinsip Pemeriksaan Aktivitas MP

Prinsip pemeriksaan ini adalah pengukuran waktu pembekuan dengan adanya kalsium. Penambahan plasma yang tidak mengandung fosfolipid (reagen 1) membuat tes tergantung pada fosfolipid prokoagulan dari sampel yang diujicobakan. Penambahan reagen 2 (factor Xa) ke dalam sampel akan memicu kaskade koagulasi dari faktor Xa lalu waktu pembekuan akan diukur oleh alat. Waktu pembekuan sampel yang memendek (normal= $72 \pm 5,6$ detik) yang diukur dengan STA-Procoag-PPL menunjukkan peningkatan fosfolipid prokoagulan dalam MP.

Quality Control Pemeriksaan Aktivitas MP

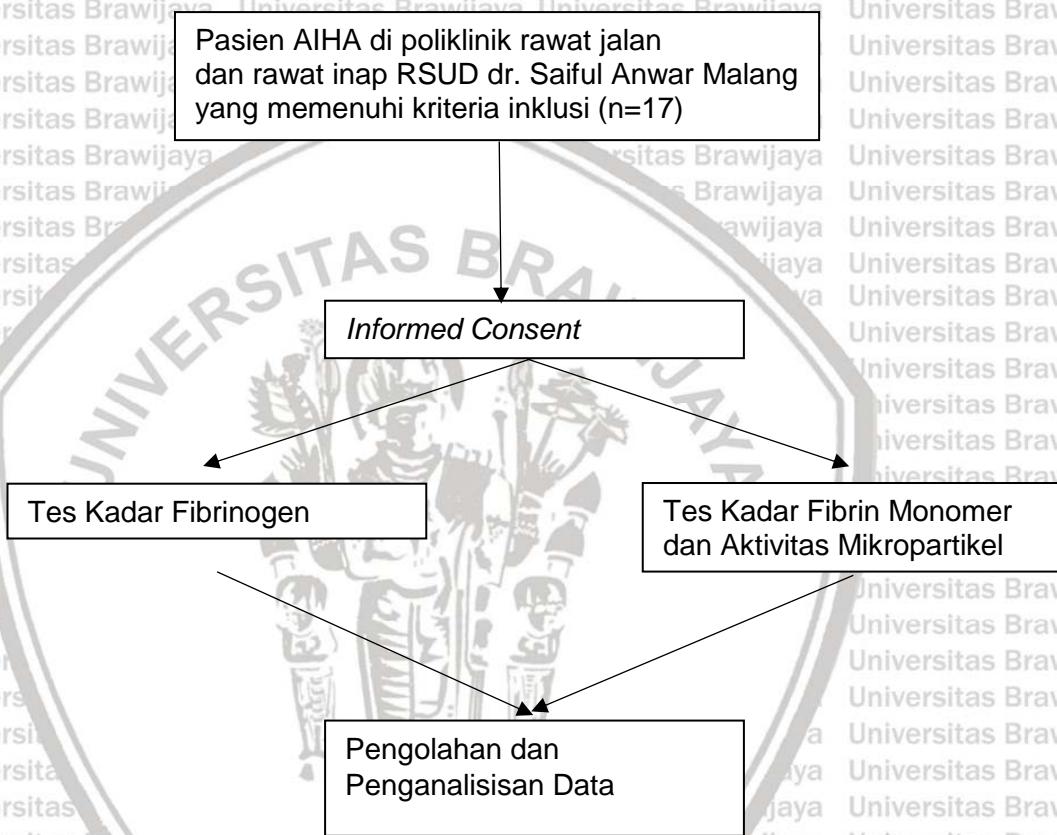
Quality control pemeriksaan MP menggunakan *P-PPL Control N* dan *P-PPL Control P*, reagen 3 dan 4, dengan cara memasukkan kontrol ke dalam alat pada tempat yang sudah disediakan.

4.8.5 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Data yang didapat dari hasil penelitian akan dianalisis secara analitik menggunakan perangkat lunak komputer SPSS 20. Semua data variabel ditabulasi secara manual sebelum dilakukan uji normalitas data. Setelah itu akan dilakukan analisis univariat yang digunakan untuk menentukan distribusi frekuensi

variabel terikat yaitu rerata dari kadar FM dan aktivitas MP. Uji Korelasi akan dilakukan terhadap data hasil pemeriksaan kadar FM dan aktivitas MP dibandingkan dengan kadar fibrinogen untuk menentukan hubungan sebagai penanda trombosis pada pasien dengan AIHA.

4.8.6 Alur Prosedur Penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Penelitian ini melibatkan 45 subyek penelitian ($n=45$) yang terdiri dari 19 pasien AIHA dengan kadar fibrinogen plasma normal serta 26 pasien AIHA dengan peningkatan kadar fibrinogen plasma ($>400 \text{ mg/dL}$) yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi serta menandatangani persetujuan (*informed consent*). Tabel

5.1 menyajikan karakteristik subyek penelitian berdasarkan usia dan jenis kelamin.

Dari keseluruhan sampel yang diperoleh, pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi didapatkan jumlah perempuan 14 orang, 2 orang lebih banyak daripada jumlah pasien laki-laki. Pada kelompok pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal didapatkan jumlah perempuan 10 orang yang juga lebih banyak daripada pasien laki-laki yang berjumlah 9. Kelompok pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal rata-rata berusia $35,16 \pm 5,20$ tahun. Sedangkan pada kelompok AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi menunjukkan angka $30,32 \pm 6,31$ tahun sebagai rerata usia.

Tabel 5.1 Karakteristik Subyek Penelitian (Data penelitian sesuai lampiran)

Karakteristik		AIHA dengan kadar fibrinogen normal	AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi	p
N = 19		N = 26		
Usia (tahun) (mean \pm SD)		$35,16 \pm 5,20$	$30,32 \pm 6,31$	0,362
Jenis Kelamin	Laki-laki	9	12	0,936
	Perempuan	10	14	0,936
Kadar Fibrinogen (mg/dL) (mean \pm SD)		$236,06 \pm 109,50$	$501,65 \pm 76,76$	0,030

5.2 Kadar Fibrinogen dan FM Plasma serta Aktivitas MP Berdasarkan

Kelompok Subyek Penelitian

Dalam penelitian ini kami mengukur kadar FM dan aktivitas MP pasien AIHA pada 2 kelompok subyek penelitian, kelompok AIHA dengan kadar fibrinogen plasmanya normal dan AIHA yang kadar fibrinogen plasmanya meningkat >400 mg/dL. Tidak ada perlakuan pada masing-masing kelompok. Hasil pemeriksaan kadar FM plasma serta aktivitas MP pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal dan dengan peningkatan fibrinogen dapat dilihat pada gambar 5.1.

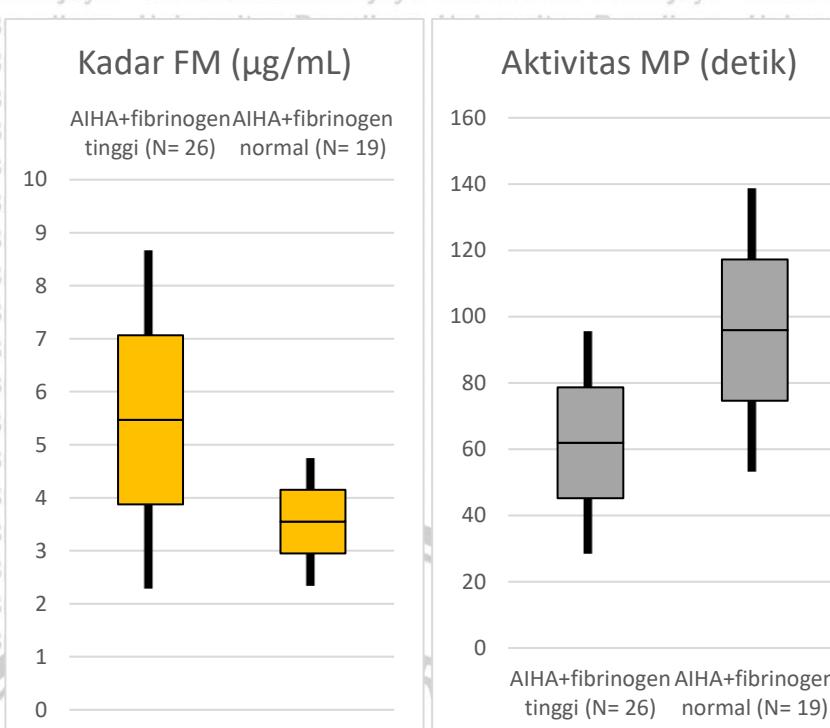
Tabel 5.2: Rerata Kadar FM dan Aktivitas MP pada Pasien AIHA dengan Kadar Fibrinogen Normal dan Tinggi.

Parameter	Kelompok	Rerata \pm SD	p
Kadar FM ($\mu\text{g/mL}$)	AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi (N=26)	$5,47 \pm 3,19$	0,030
	AIHA dengan kadar fibrinogen normal (N=19)	$3,55 \pm 1,20$	
Aktivitas MP (detik)	AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi (N=26)	$61,93 \pm 33,46$	0,011
	AIHA dengan kadar fibrinogen normal (N=19)	$95,94 \pm 42,64$	

Berdasarkan pada tabel 5.2 didapatkan parameter kadar FM pada

kelompok pasien AIHA dengan peningkatan fibrinogen memiliki kadar lebih tinggi dibandingkan kelompok pasien AIHA dengan fibrinogen normal serta didapatkan hasil perbedaan yang bermakna ($p=0,030$). Pada parameter aktivitas MP pada kelompok pasien AIHA dengan fibrinogen tinggi memiliki waktu yang lebih pendek dibandingkan kelompok pasien AIHA dengan fibrinogen normal ($p=0,011$).





Gambar 5.1: Grafik kadar FM ($\mu\text{g/mL}$) dan aktivitas MP (detik) plasma pada subyek AIHA dengan dan tanpa trombosis

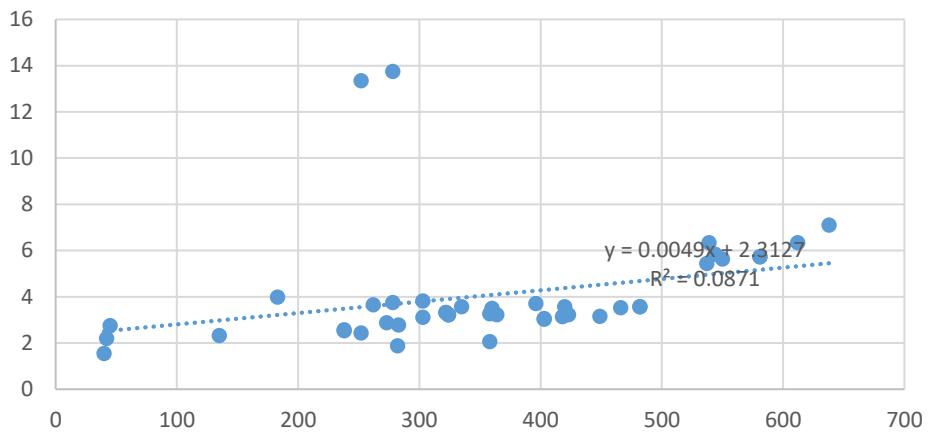
5.3 Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA

Hasil korelasi kadar fibrinogen dengan kadar FM dan aktivitas MP pada pasien AIHA baik dengan kadar fibrinogen normal maupun tinggi ditunjukkan pada tabel 5.3.

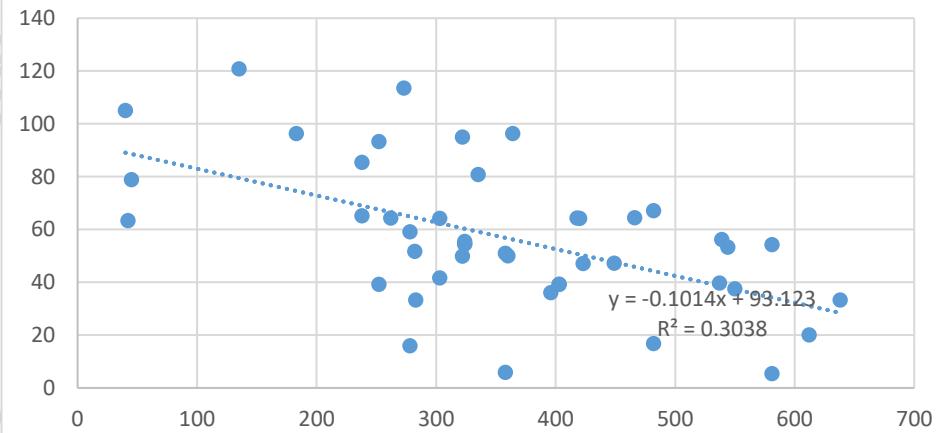
Tabel 5.3: Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA.

	Kadar FM	Aktivitas MP
Kadar Fibrinogen	$r= 0,545$ $p= 0,000$	$r= -0,515$ $p= 0,000$
Kadar FM		$r= -0,443$ $p= 0,002$

Korelasi Kadar FM dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA



Korelasi Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA



Universitas Brawijaya

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian observasional analitik dengan desain potong lintang yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antara kadar fibrinogen dengan kadar FM dan aktivitas MP pada pasien AIHA serta menunjukkan hasil penelitian yang sesuai dengan hipotesis yang telah dikemukakan. Selama penelitian ini didapatkan 45 subjek yang memenuhi kriteria inklusi, terdiri dari 24 pasien perempuan dan 21 pasien laki-laki. AIHA memang memiliki predileksi pada perempuan dengan rasio kejadian pada laki-laki:perempuan adalah 1:2 (Silberstein P, 2007) sampai dengan 2:3 (Alwar et al., 2010). Alasan tingginya prevalensi pada perempuan karena hubungannya dengan kelainan autoimun. Perempuan merespons infeksi, vaksinasi, dan trauma dengan peningkatan produksi antibodi dan respons imun *T helper (Th)2* lebih dominan dibandingkan respons Th1 dan inflamasi yang biasanya lebih dominan pada laki-laki (Fairweather et al., 2008).

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) dapat terjadi pada umur berapapun dan ras apapun (Silberstein, 2007). Penelitian Chaudhary et al. (2010) di populasi Kaukasia menunjukkan kejadian AIHA adalah pada usia 40 tahun ke atas. Penelitian yang ditulis oleh Alwar (2014) di Asia melaporkan pasien AIHA secara umum berada pada usia dekade kedua sampai ketiga sesuai rerata usia penderita pada penelitian ini yang juga didapatkan di dekade ketiga. Alasan kejadian AIHA pada usia yang berbeda tersebut belum diketahui secara pasti.

Tidak didapatkan adanya perbedaan yang bermakna pada jenis kelamin dan usia pasien AIHA.

6.2 Kadar Fibrinogen dan FM Plasma serta Aktivitas MP Berdasarkan

Kelompok Subyek Penelitian

Ada semakin banyak bukti bahwa anemia hemolitik autoimun dicirikan oleh keadaan hiperkoagulasi. Selain peningkatan trombin dan pembentukan fibrin, peningkatan aktivitas faktor jaringan, dan peningkatan aktivasi trombosit, pasien dengan anemia hemolitik menunjukkan komplikasi trombotik, termasuk tromboemboli vena, trombosis paru dan stroke. Mekanisme aktivasi koagulasi pada anemia hemolitik kemungkinan multifaktorial. (Ataga, 2009).

Peran fibrinogen dalam hemostasis dan trombosis tidak cukup dipahami meskipun fibrinogen diakui sebagai komponen kunci dari pembekuan darah. Hal ini mengakibatkan fibrinogen tetap menjadi bahan penelitian, termasuk dalam penelitian ini. Ada sejumlah mekanisme dimana kadar fibrinogen yang lebih tinggi dapat menyebabkan trombosis, termasuk peningkatan viskositas darah, peningkatan kepadatan serat bekuan fibrin, peningkatan resistensi bekuan fibrin terhadap fibrinolisis, dan perubahan sifat mekanik bekuan fibrin (Ariëns, 2011).

Penelitian klinis secara konsisten menunjukkan peningkatan kadar fibrinogen pada pasien dengan trombosis, sehingga kadar fibrinogen yang tinggi pada pasien AIHA dalam penelitian ini diduga erat kaitannya juga dengan kejadian trombosis pada AIHA. Epidemiologi kejadian trombosis pada AIHA menunjukkan adanya 17% pasien dengan diagnosis AIHA mengalami kejadian komplikasi tromboemboli (Hendrick, 2002). Sedangkan pada penelitian ini angka tersebut menunjukkan 58%, terdapat selisih yang cukup besar dengan penelitian sebelumnya.

Ketidaksesuaian ini dapat dijelaskan oleh fakta bahwa tempat penelitian ini berada pada rumah sakit rujukan tersier dimana kemungkinan penyakit yang diderita pasien sudah lebih parah. Satu hal lagi yang perlu diingat saat fibrinogen dikaitkan dengan dugaan kejadian trombosis adalah fibrinogen merupakan protein fase akut



yang selama peradangan akut kadarnya dapat melebihi normal (Kattula *et al.*, 2017). Penyebab ini dapat mengakibatkan selisih angka kejadian yang berbeda dengan penelitian sebelumnya tentang kejadian trombosis pada pasien AIHA. Biasanya, fosfatidilserin ditemukan di lapisan membran sel, sementara fosfolipid yang mengandung kolin, seperti fosfatidilkolin dan sphingomyelin, terletak di lapisan luar membran plasma. Pajanan fosfatidilserin abnormal berfungsi sebagai sinyal apoptosis sel berinti, dan sebagai *docking site* kompleks enzimatik yang terlibat dalam jalur koagulasi dan antikoagulasi. Paparan fosfatidilserin eksternal mengubah sifat adesif eritrosit dan tampaknya terlibat dalam perubahan hemostatik yang diamati pada anemia hemolitik. Jumlah eritrosit yang positif fosfatidilserin telah dilaporkan secara signifikan berkorelasi dengan fragmen prothrombin 1 dan 2 ($F1 + 2$), D-dimer dan kompleks plasmin-antiplasmin di AIHA, tetapi tidak ada korelasi yang ditemukan antara trombosit yang positif fosfatidilserin dan salah satu penanda hemostatik ini (Ataga, 2009). Mikropartikel (vesikel dari membran yang dikeluarkan oleh sel setelah aktivasi atau apoptosis) tersebut berasal dari eritrosit, trombosit, sel endotel dan monosit serta dapat berkontribusi pada keadaan hiperkoagulasi pada anemia hemolitik. Trombosit juga diaktifkan pada anemia hemolitik. Jumlah mikropartikel total yang berkorelasi dengan penanda koagulasi pada pasien AIHA menunjukkan bahwa mikropartikel dapat berkontribusi pada keadaan hiperkoagulabilitas yang diamati pada pasien dengan anemia hemolitik. Mikropartikel (MP) merupakan prokoagulan dini yang akan menginduksi proses koagulasi pada kejadian patologi trombosis pasien dengan AIHA (Said *et al.*, 2018). Proses koagulasi atau pembekuan akan berlangsung lebih cepat ketika terdapat MP dalam jumlah banyak sehingga pada pasien AIHA yang diduga trombosis dengan kadar fibrinogen yang tinggi didapatkan hasil waktu pembekuan atau aktivitas MP yang lebih pendek secara



signifikan dibandingkan dengan pasien AIHA yang kadar fibrinogennya normal dalam penelitian ini. Pembentukan fibrin di pembuluh darah merupakan proses lanjutan dari pengeluaran MP yang didahului oleh pembentukan turunan fibrinogen yang telah digunakan sebagai penanda molekuler pembentukan fibrin intravaskuler dalam diagnosis laboratorium keadaan protrombosis dan trombosis. Selama konversi fibrinogen menjadi fibrin, trombin memediasi pembelahan sepasang peptida fibrinopeptida A dan menghasilkan fibrin monomer, yang kemudian dipolimerisasikan untuk membentuk bekuan fibrin yang tidak larut. Molekul fibrin monomer lalu membentuk kompleks larut dengan molekul fibrinogen dengan adanya konsentrasi yang cukup dari fibrinogen, dan kompleks ini telah didefinisikan sebagai kompleks fibrin monomer-fibrinogen terlarut. *Soluble fibrin precursor* yang dikenal sebagai *soluble fibrin monomer complexes* atau *soluble fibrin* muncul di darah sebagai hasil peningkatan pembentukan trombin intravaskuler dan mencerminkan risiko tinggi klot intravaskuler atau pembentukan fibrin yang sedang berlangsung. Pentingnya diagnosis *soluble fibrin monomer* ditunjukkan pada tromboemboli vena, trombosis arteri koroner, bypass kardiopulmoner, dan banyak kondisi lain yang terkait dengan trombofilia dan/atau kondisi trombosis. FM lebih rapuh *in vivo* dibandingkan dengan polimer fibrin dan fibrin stabil karena fibrinolisis sehingga dianggap sebagai penanda yang sensitif dari keadaan hiperkoagulasi. Kadar FM telah terbukti menjadi prediktor independen dari kejadian trombus sistemik dibandingkan dengan penanda tromboemboli rutin lainnya (Litvinov and Weisel, 2016). Inilah yang dapat mengakibatkan hasil kadar FM pasien AIHA dengan peningkatan fibrinogen didapatkan lebih tinggi bermakna dibandingkan pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal.

6.3 Korelasi Kadar FM dan Aktivitas MP dengan kadar Fibrinogen pada Pasien AIHA

Hubungan antara kadar fibrinogen plasma dengan kadar FM dan aktivitas MP secara statistik dengans menggunakan uji korelasi Spearman menunjukkan nilai korelasi berturut-turut sebesar 0,545 dan -0,515 dengan nilai $p = 0,000$ untuk keduanya, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi sedang yang signifikan antara kadar fibrinogen plasma dengan kadar FM dengan arah hubungan yang positif tetapi korelasi dengan aktivitas MP menunjukkan arah hubungan yang negatif. Hal ini menunjukkan semakin tinggi kadar fibrinogen plasma maka kadar FM plasma akan semakin meningkat sedangkan waktu aktivitas MP akan semakin pendek. Semakin pendek waktu aktivitas MP menunjukkan kadar MP yang semakin tinggi pada sampel tersebut. Permukaan MP mengandung fosfolipid prokoagulan berupa fosfatidilserin yang akan mengawali proses koagulasi dan selanjutnya mengakibatkan konversi trombin. Aktivitas prokoagulan tersebut semakin tinggi seiring dengan semakin banyaknya jumlah fosfolipid prokoagulan pada MP. Tingginya aktivitas tersebut dapat diperkirakan melalui waktu pembekuan yang semakin pendek (Sørensen, 2012).

Dalam studi van Beers, et al. (2009) melaporkan mayoritas mikropartikel pada pasien AIHA berasal dari trombosit dan eritrosit, dan bahwa jumlah mikropartikel ini tidak berbeda secara signifikan antara kondisi aktif dan stabil. Penelitian sebelumnya oleh Shet, et al. (2009), juga melaporkan tidak ada mikropartikel yang berasal dari monosit atau sel endotel yang terdeteksi dan tidak ada mikropartikel yang mengekspresikan faktor jaringan yang diidentifikasi.

Mikropartikel dari eritrosit juga dikatakan berkorelasi kuat dengan kadar plasma penanda hemolitik (hemoglobin, $r = -0,58$, $p < 0,001$ (Beers, 2009), lactate dehydrogenase, $r = 0,59$, $p < 0,001$), aktivasi platelet/endotel (factor von Willebrand, $r = 0,44$, $p < 0,001$) serta koagulasi (fragmen F1+2 protrombin, $r = 0,59$, $p < 0,001$).



Selanjutnya, terjadinya fibrinogen bahkan fibrin monomer yang nantinya akan menjadi trombin dan kemudian trombin menjadi fibrin dapat tergantung pada jumlah total mikropartikel ($r= 0,63$, $p<0,001$) (Beers, 2009). Hubungan kuat mikropartikel yang dari eritrosit dengan penanda fibrinolisis dan aktivasi koagulasi serta penanda hemolitik semakin menegaskan peran hemolisis dalam aktivasi koagulasi yang diamati pada pasien dengan anemia hemolitik. Temuan ini mirip dengan yang ada dalam penelitian ini di mana korelasi diamati antara penanda koagulasi (fibrinogen) dan aktivitas MP ($r= -0,515$, $p<0,000$) dan FM ($r= 0,545$, $p<0,000$) pasien AIHA. Fibrin Monomer (FM) dan MP dihubungkan dengan fibrinogen yang dikatakan dapat menggambarkan dugaan trombosis pasien AIHA pada penelitian ini sedangkan *gold standard* untuk diagnosis kondisi trombosis pada pasien memang masih memerlukan pemeriksaan penunjang dengan angiografi yang lebih invasif atau *color doppler ultrasound* yang kurang ekonomis dan butuh operator terlatih.

6.4. Keterbatasan Penelitian

Tidak semua kelainan bisa dieksklusi dalam penelitian ini. Kriteria eksklusi

juga hanya berdasarkan diagnosis utama sehingga keadaan penyerta pasien seperti inflamasi akut yang sedang diderita dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan dan interpretasi parameter yang diukur.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Kadar Fibrin Monomer (FM) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal ($200 - 400 \text{ mg/dL}$) lebih rendah secara signifikan daripada kadar Fibrin Monomer (FM) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi ($>400 \text{ mg/dL}$).

2. Aktivitas Mikropartikel (MP) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen normal lebih panjang secara signifikan daripada aktivitas Mikropartikel (MP) pada pasien AIHA dengan kadar fibrinogen tinggi.

3. Kadar Fibrin Monomer (FM) dan aktivitas Mikropartikel (MP) berkorelasi sedang secara signifikan dengan kadar fibrinogen pada pasien dengan AIHA.

7.2 Saran

Perlunya penelitian lanjutan dengan analisis uji diagnosis untuk mengetahui performa FM dan MP sebagai penanda trombosis pada pasien dengan AIHA dibandingkan dengan angiografi atau *color doppler ultrasound*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alwar V, Shanthala DAM, Sitalakshmi S, and Karuna RK. 2014. Clinical Patterns and Hematological Spectrum in AIHA. *J Lab Physicians.* 2(1): 17-20.
- Ariëns, RAS. 2011. Elevated fibrinogen causes thrombosis. *Blood journal.* 117 (18): 4687-4688.
- Ataga KI. 2009. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias. *Haematologica.* 94(11): 1481-1483.
- Aykan AC, Gökdeniz T, Gündüz S, Astarcioğlu MA, Gürsoy AM, Ertürk E, et al. 2014. Value of Serum Fibrinogen Levels in the Assessment of Mechanical Prosthetic Valve Thrombosis.
- Bain BJ, Bates I, Laffan MA. 2016. *Dacie and Lewis practical haematology.* Elsevier Health Sciences.
- Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R, et al. 2006. Primary chronic cold agglutinin disease a population based clinical study of 86 patients. *Haematologica.* 91:460-466.
- Boisclair MD, Lane DA, Wilde JT, Ireland H, Preston FE, and Ofosu FA. 1990. A comparative evaluation of assays for markers of activated coagulation and/or fibrinolysis: thrombin-antithrombin complex, D-dimer and fibrinogen/fibrin fragment E antigen. *British Journal of Haematology.* 74: 471-79.
- Cappellini, Maria Domenica. 2007. Coagulation in the Pathophysiology of Hemolytic Anemias. *American Society of Hematology.* 74-78.
- Chaudhary, RK and Das, SS. 2010. AIHA: From lab to bedside. *Asian J Transfus Sci.* 8(1): 5-12.
- Dahal LN, Hall LS, Barker RN, and Ward FJ. 2013. Indoleamine 2,3 dioxygenase contributes to transferable tolerance in rat red blood cell inducible model of experimental autoimmune haemolytic anaemia. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology.* 173: 58-66.
- Dahlan. 2010. *Besar Sampel dan Cara Pengambilan Sampel Edisi ke-3.* Jakarta: Salemba Medika.
- Danesh J, Lewington S, Thompson SG, et al. Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular disease and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *J Am Med Assos.* 2005 (294): 1799-809.
- Distler JHW, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, and Distler O. 2005. REVIEW: Microparticles as Regulators of Inflammation Novel Players of Cellular Crosstalk in the Rheumatic Diseases. *Arthritis & Rheumatology.* 52 (11): 3337-3348.

- Elged AAE, El-Gamal RA, Bastawy S, Moselhy MS. 2016. Soluble fibrin monomer complex assay enhances early and accurate diagnosis of acute myocardial infarction. *Int J Clin Exp Pathol.* 9(5): 5801-5809.
- Fairweather DL, Kiss SF, and Rose NR. 2008. Sex Differences in Autoimmune Disease from Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology*. 173(3): 600-609.
- Friedberg R and Johari V. Autoimmune hemolytic anemia in Greer J, Foerster J, Rodgers G, et al. 2014. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th ed. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia: 746.
- Gehrs BC and Friedberg CR. 2002. Autoimmune hemolytic anemia. *American journal of hematology*. 69: 258-271.
- György B, Módos K, Paálninger E, Páloczki K, Pászto M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, and Buza's EI. 2011. Immunobiology e-Blood: Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*. 117 (4): 39-48.
- Hajsadeghi S, Kerman SR, Khojandi M, Vaferi H, Ramezani R, Jourshari NM, et al. 2012. Accuracy of D-dimer:fibrinogen ratio to diagnose pulmonary thromboembolism in patients admitted to intensive care units. *Cardiovasc J Afr.* 23 (8): 446-450.
- Hendrick, AM. 2013. Auto-immune Haemolytic Anaemia – a High-risk Disorder for Thromboembolism? *Hematology*. 8(1): 53-6.
- Jäger U and Lechner K. 2013. Autoimmune hemolytic anemia. In: Hoffman R, Benz E, Silberstein L, et al. *Hoffman Hematology Basic Principles and Practice* 6th ed. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier.
- Johansen ME, Jy W, Dudkiewicz PB, Ahn YS. 2012. Red Cell Microparticles (RMP) and Other Cell-Derived Microparticles (C-MP) in Hemolytic Anemias. *Blood*. 120: 51-58.
- Kattula S, Byrnes JR, and Wolberg AS. 2017. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37 (3): 13-21.
- Keohane E, Smith L, Walenga J. 2015. *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. Elsevier Health Sciences.
- Knijff-Dutmer EAJ, Koerts J, Nieuwland R., Kalsbeek-Batenburg EM, and van de Laar MAFJ. 2002. Elevated Levels of Platelet Microparticles Are Associated With Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 46 (6): 1498–1503.
- Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekkine M, Key NS, Dignat-George F, and on behalf of the ISTH SSC workshop. 2013. Official communication of the SSC: Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 11: 1190–1193.

- Lashin, Hazem Mohamed Shokry. 2015. *Microparticles as novel biomarkers/effectors in severe sepsis*. Queen Mary University of London.
- Liebman HA, Weitz IC. 2017. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am.* 101 (2): 351-359.
- Linkins LA, Bates SM, Ginsberg JS, Kearon C. 2004. Use of different D-dimer levels to exclude venous thromboembolism depending on clinical pretest probability. *J Thromb Haemost.* 2:1256–1260.
- Litvinov RI and Weisel JW. 2016. What is the biological and clinical relevance of fibrin. *Semin Thromb Hemost.* 42 (4): 333 – 343.
- Mauchley, David. 2018. *Optimal Management of Splenic/Portal Vein Thrombosis*. University of Colorado.
- Michel M. 2011. Classification and therapeutic approaches in autoimmune hemolytic anemia an update. *Expert Rev Hematol.* 4:607-618
- Mooberry MJ and Key NS. 2016. Microparticle Analysis in Disorders of Hemostasis and Thrombosis. *Cytometry A.* 89(2): 111-122.
- Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. 2008. REVIEW ARTICLE: Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis Research.* 123: 8–23.
- Oliveira MC, Oliveira BM, Murao M, Vieira ZM, Gresta LT, Viana MB. 2006. Clinical course of autoimmune haemolytic anemia: an observational study. *Journal de Pediatria.* 82: 58-62.
- Pacheco MM, García PM, and Diego MAP. 2019. Cell membrane. *Atlas of plant and animal histology*. Spain: University of Vigo.
- Parjono E, Widayati K. 2009. Anemia hemolitik autoimun dalam *buku ajar Ilmu Penyakit Dalam*, diperbaharui oleh Sudoyo W, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, edisi ke lima. Internal publishing: 1152-1156.
- Owen BAL, Xue A, Heit JA, and Owen WG. 2012. Procoagulant activity, but not number, of MP increases with age and in individuals after a single venous thromboembolism. *Thromb Ews.* 127 (1): 39-46.
- Petz, L. 2008. Cold antibody autoimmune hemolytic anemias. *Blood Rev.* 22:1-15.
- Pullarkat V, Ngo M, Iqbal S, Espina B, and Liebman H. 2012. Detection of lupus anticoagulant identifies patients with autoimmune haemolytic anaemia at increased risk for venous thromboembolism. *British journal of Haematology.* 118: 1166-9.
- Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud I, Giraudo I, Hauchard A, Sampol J and Dignat-george F. 2008. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 7: 190–197.
- Rodgers GM. 2015, chapter 8: Acquired Coagulation Disorders 8 and TTP in: Sterling T, Bennett • Christopher M. Lehman George M. Rodgers, Laboratory

- Hemostasis: A Practical Guide for Pathologists Second Edition, Springer International Publishing Switzerland 69 S.T. Bennett *et al.*, Laboratory Hemostasis: A Practical Guide for Pathologists, pp. 112-113.
- Ruggeri M and Rodeghiero F. 2016. Thrombotic risk in patients with immune haemolytic anaemia. *British Journal of Haematology*. 172: 131-146.
- Said AS, Rogers SC, and Doctor A. 2018. Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions. *Frontiers in Physiology*. 8: 1120.
- Schick P. 2017 Hemolytic Anemia. *WebMD*.
- Shantsila E, Montoro-García S, Gallego P, Lip GYH. 2014. Circulating microparticles: challenges and perspectives of flow cytometric assessment. *Thrombosis and Haemostasis*.
- Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, *et al.* 2003. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 97: 3972-5.
- Shlomcik M, Walport M, Travers P, Janeway CA. 2013. Immunobiology: The Immune System In Health and Disease 6th ed. New York: Garland Science.
- Shuman, Leigh S. 2010. The Catheter and The CT Scanner. *The Journal of Lancaster General Hospital*. 5 (1): 16-17.
- Silberstein, Peter. 2007. Autoimmune Hemolytic Anemia. *NEJM*. 1-6.
- Sørensen, Ditte. 2012. Assessment of procoagulant activity of microparticles. Medicine with Industrial Specialization Aalborg University.
- Stec JJ, Silbershatz H., Tofler GH, *et al.* Association of fibrinogen with cardiovascular risk factor and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation*. 2000 (102): 1634-38.
- Tabakci MM, Gerin F, Sunbul M, Toprak C, Durmus HI, Demir S, *et al.* 2017. Relation of Plasma Fibrinogen level With the Presence, Severity, and Complexity of Coronary Artery Disease. *Clinical & Applied Thrombosis/Hemostasis*. 23 (6): 638-644.
- Van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF *et al.* 2009. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. 94: 1513-9.
- Wada H. 2004. Disseminated intravascular coagulation. *Clin Chim Acta*. 344:13-21.
- William D, MacIvor, DC. 2013. Patient Is Clotting: What Do You Mean, the aPTT Is Prolonged? *WebMD*.
- Zarandona JM and Yazer MH. 2006 The role of the Coombs' test in evaluating hemolysis in adult. *CMAJ*. 305-307.

Zeerleider S. 2011. Autoimmune haemolytic anaemia- a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge. *The Netherland journal of medicine*. 69: 177-182.



Lampiran 1. Data Dasar Penelitian

No.	Jenis Kelamin 1=laki-laki, 2=perempuan	Usia tahun	Kadar Fibrinogen mg/dL	Kadar FM	Aktivitas MP detik
1	1	35	418	3.13	64.3
2	1	37	550	5.63	37.5
3	1	27	544	5.84	53.2
4	1	32	612	6.34	20
5	1	38	238	2.57	65.1
6	1	35	420	3.57	64.1
7	1	20	238	2.53	85.4
8	1	29	135	2.32	120.7
9	1	33	273	2.87	113.5
10	1	32	364	3.22	96.2
11	1	29	183	3.98	96.2
12	1	20	466	3.52	64.4
13	1	36	283	2.78	33.2
14	1	28	638	7.1	33.2
15	1	49	42	2.19	63.3
16	1	42	423	3.22	47.1
17	1	28	40	1.54	105
18	1	36	335	3.56	80.8
19	2	27	449	3.15	47.2
20	1	30	324	3.22	54.5
21	1	33	45	2.75	78.8
22	1	30	303	3.81	41.6
23	2	33	403	3.06	39.2
24	2	49	252	13.34	39.2
25	2	27	278	13.74	15.9
26	2	33	358	3.26	5.9
27	2	27	322	3.31	49.9
28	2	33	482	3.56	16.7
29	2	37	581	5.72	5.42
30	2	32	282	1.88	51.6
31	2	30	396	3.71	36
32	2	30	324	3.22	54.5
33	2	30	303	3.11	64.1
34	2	27	360	3.49	50
35	2	49	252	2.43	93.2
36	2	37	581	5.72	54.2
37	2	27	278	3.74	59.1
38	2	33	482	3.56	67.1
39	2	30	324	3.22	55.4
40	2	27	322	3.31	94.9
41	2	33	403	3.02	39.2
42	2	33	358	2.06	50.9
43	2	40	537	5.44	39.6



Universitas Brawijaya					
Universitas Brawijaya					
Universitas Brawijaya					
Universitas Brawijaya	44	2	41	539	6.34
Universitas Brawijaya	45	2	20	262	56.1
Universitas Brawijaya					3.65
Universitas Brawijaya					64.3

Lampiran 2. Hasil Analisis Data

2.1 Data Deskriptif Usia, Kadar FM, Aktivitas MP pada Pasien AIHA dengan Kadar Fibrinogen Normal dan Tinggi

Descriptives		
		Statistic
		Std. Error
	Mean	30.3158
	95% Confidence Interval for Lower Bound	27.2757
	Mean	33.3559
	Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	29.8509
	Median	30.0000
	Variance	39.784
Usia AIHA Fibrinogen Tinggi	Std. Deviation	6.30743
	Minimum	20.00
	Maximum	49.00
	Range	29.00
	Interquartile Range	6.00
	Skewness	1.195 .524
	Kurtosis	3.736 1.014
	Mean	35.1579
	95% Confidence Interval for Lower Bound	32.6521
	Mean	37.6637
	Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	34.8421
	Median	33.0000
	Variance	27.029
Usia AIHA Fibrinogen Normal	Std. Deviation	5.19897
	Minimum	27.00
	Maximum	49.00
	Range	22.00
	Interquartile Range	5.00
	Skewness	.928 .524
	Kurtosis	1.725 1.014
Kadar FM AIHA Fibrinogen Tinggi	Mean	5.4721 .73285
	Lower Bound	3.9324

	95% Confidence Interval for Mean	Upper Bound	7.0118
	5% Trimmed Mean		5.1879
	Median		4.3300
	Variance		10.204
	Std. Deviation		3.19442
	Minimum		2.32
	Maximum		13.74
	Range		11.42
	Interquartile Range		3.19
	Skewness		1.806 .524
	Kurtosis		3.004 1.014
	Mean		3.5537 .27533
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.9752
		Upper Bound	4.1321
	5% Trimmed Mean		3.4819
	Median		3.2200
	Variance		1.440
	Std. Deviation		1.20015
	Minimum		2.06
	Maximum		6.34
	Range		4.28
	Interquartile Range		.54
	Skewness		1.515 .524
	Kurtosis		1.782 1.014
	Mean		61.9332 7.67656
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	45.8053
		Upper Bound	78.0610
	5% Trimmed Mean		60.1802
	Median		53.1000
	Variance		1119.662
	Std. Deviation		33.46136
	Minimum		5.42
	Maximum		150.00
	Range		144.58
	Interquartile Range		39.60
	Skewness		1.133 .524
	Kurtosis		1.754 1.014
	Mean		95.9379 9.78286
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	75.3849
		Upper Bound	116.4909

		5% Trimmed Mean	96.8365
		Median	114.7000
		Variance	1818.383
		Std. Deviation	42.64250
		Minimum	16.70
		Maximum	159.00
		Range	142.30
		Interquartile Range	64.90
		Skewness	-.688 .524
		Kurtosis	-.658 1.014

2.2 Hasil Uji Normalitas Usia, Kadar FM, Aktivitas MP pada Pasien AIHA dengan Kadar Fibrinogen Normal dan Tinggi

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Usia AIHA Fibrinogen Tinggi	.204	19	.036	.873	19	.016
Usia AIHA Fibrinogen Normal	.187	19	.078	.910	19	.074
Kadar FM AIHA Fibrinogen Tinggi	.214	19	.022	.777	19	.001
Kadar FM AIHA Fibrinogen Normal	.337	19	.000	.785	19	.001
Aktivitas MP AIHA Fibrinogen Tinggi	.219	19	.017	.908	19	.068
Aktivitas MP AIHA Fibrinogen Normal	.248	19	.003	.906	19	.062

a. Lilliefors Significance Correction

2.3 Hasil Uji Beda Usia, Kadar FM, Aktivitas MP pada Pasien AIHA dengan Kadar Fibrinogen Normal dan Tinggi

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Usia is the same across categories of Dx.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.362	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Kadar FM is the same across categories of Dx.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.003	Reject the null hypothesis.
3	The distribution of Aktivitas MP is the same across categories of Dx.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	.011	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

2.4 Hasil Uji Kadar FM, Aktivitas MP dengan Kadar Fibrinogen Normal dan Tinggi pada Pasien AIHA

Correlations

		Fib1	FM1	PPL1
	Correlation Coefficient	1.000	.545**	-.515**
Fib1	Sig. (2-tailed)	.	.000	.000
	N	45	45	45
	Correlation Coefficient	.545**	1.000	-.443**
Spearman's rho	FM1	.000	.	.002
	N	45	45	45
	Correlation Coefficient	-.515**	-.443**	1.000
PPL1	Sig. (2-tailed)	.000	.002	.
	N	45	45	45

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 3. Etik Penelitian