

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Darah

Darah adalah komponen esensial makhluk hidup yang berada dalam ruang vaskuler, karena perannya sebagai media komunikasi antar sel ke berbagai bagian tubuh dengan dunia luar karena fungsinya membawa oksigen dari paru-paru ke jaringan dan karbondioksida dari jaringan ke paru-paru untuk dikeluarkan, membawa zat nutrisi dari saluran cerna ke jaringan kemudian mengantarkan sisa metabolisme melalui organ sekresi seperti ginjal, menghantarkan hormon dan materi-materi pembekuan darah (Desmawati, 2013).

Plasma darah yaitu bagian cair darah (55%) yang sebagian terdiri dari air (92%), 7% protein, 1% nutrisi, hasil metabolisme, gas pernafasan, enzim, hormon-hormon, faktor pembekuan dan garam-garam organik. Protein-protein dalam plasma terdiri dari serum albumin (alpha-1 globulin, alpha-2 globulin, beta globulin dan gamma globulin), *fibrinogen*, *prothrombin* dan protein esensial untuk koagulasi. Serum albumin dan gamma globulin sangat penting untuk mempertahankan tekanan osmotik koloid dan gamma globulin juga mengandung antibodi (*immunoglobulin*) seperti IgM, IgG, IgA, IgD, dan IgE untuk mempertahankan tubuh terhadap mikroorganisme (Desmawati, 2013).

B. Hemostasis

Hemostasis adalah mekanisme untuk menghentikan dan mencegah pendarahan. Bila terdapat luka pada pembuluh darah, akan terjadi *vasokonstriksi* pembuluh darah yang dapat mengurangi aliran darah ke pembuluh darah.

Kemudian trombosit akan berkumpul dan melekat pada bagian pembuluh darah yang terluka untuk membentuk sumbat trombosit. Faktor pembekuan darah yang diaktifkan akan membentuk benang-benang *fibrin* yang akan membuat sumbat trombosit sehingga perdarahan dapat dihentikan (Setiabudy, 2009).

Proses *hemostasis* tersebut terjadi tiga reaksi yang terlibat diantaranya reaksi vaskuler berupa *vasokonstriksi* pembuluh darah, reaksi seluler yaitu pembentukan sumbat trombosit dan reaksi biokimiawi yaitu pembentukan *fibrin*. Faktor-faktor yang memegang peranan dalam proses *hemostasis* adalah pembuluh darah, trombosit dan faktor pembekuan darah. Selain itu faktor lain yang juga mempengaruhi *hemostasis* adalah faktor ekstravaskuler, yaitu jaringan ikat sekitar pembuluh darah dan keadaan otot (Setiabudy, 2009).

Menurut A.V.Hoffbrand, J.E.Pettit, dan P.A.H. Moss (2012) tiga reaksi dalam proses *hemostasis* yaitu :

1. Vasokonstriksi pembuluh darah

Vasokonstriksi segera pada pembuluh darah yang terluka dan konstriksi reflex pada arteri kecil dan arteriol disekitarnya menyebabkan perlambatan awal aliran darah ke daerah perlukaan. Jika terdapat kerusakan yang luas, reaksi vaskular ini mencegah keluarnya darah. Aliran darah yang berkurang memungkinkan aktivasi kontak pada trombosit dan faktor koagulasi. Zat amine yang dilepaskan selama pembentukan *fibrin*, juga mempunyai aktivitas *vasokonstriksi*.

2. Reaksi seluler yaitu pembentukan sumbat trombosit

Setelah timbul kerusakan pada lapisan endotel, terjadi pelekatan awal trombosit pada jaringan ikat. Kolagen dan trombin yang dihasilkan pada lokasi

cedera menyebabkan trombosit melepaskan isi granularnya dan mengaktifkan sintesis prostaglandin. Agregasi trombosit yang berkelanjutan menyebabkan membesarnya sumbat hemostasis yang segera menutupi daerah jaringan ikat.

3. Reaksi biokimiawi pembentukan *fibrin*

Setelah terjadi cedera vaskular, aktivasi faktor jaringan mengaktifkan faktor VII untuk mengawali kaskade koagulasi. Agregasi trombosit dan reaksi pelepasan mempercepat proses koagulasi dengan cara menyediakan fosfolipid membran yang berlimpah. Trombin yang dihasilkan pada daerah cedera, mengubah *fibrinogen* plasma yang terlarut menjadi *fibrin*, memperkuat agregasi dan sekresi trombosit dan mengaktifkan faktor XI dan XIII serta kofaktor V dan VIII.

C. Mekanisme Pembekuan Darah (Koagulasi)

Mekanisme pembekuan darah berlangsung secara bertahap sedemikian rupa sehingga salah satu faktor koagulasi diubah menjadi aktif diakhiri dengan pembentukan *fibrin* (bekuan) (Desmawati, 2013). Faktor koagulasi atau faktor pembekuan darah adalah protein yang terdapat dalam darah (plasma) yang berfungsi dalam proses koagulasi. Proses pembekuan darah bertujuan untuk mengatasi *vascular injury* sehingga tidak terjadi pendarahan berlebihan, tetapi proses pembekuan darah ini dilokalisir pada daerah *injury* (Bakta, 2013).

Menurut Desmawati (2013) tiga jalur yang dilalui untuk menjadi *fibrin* :

1. Jalur intrinsik

Jalur ini mulai setelah kontak dengan permukaan tertentu, menyebabkan XII → XIII ini terjadi karena kontak dan kolagen dan substansi dinding menurun. Pendarahan yang rusak karena luka XIIa akan mengubah tiga jenis enzim yaitu :

- Prekalikrein
- XI
- Proaktifatur plasminogen (sistem fibrinolitik)

Aktivasi XII merupakan awal dari proses pembekuan darah sekaligus awal dari aktivasi sistem fibrinolitik dan komplemen. Prekalikrein diubah menjadi kalikrein yang kemudian memecah *High Molecular Weight Kinninogen* (HMWK) menjadi fragmen polipeptida vaso aktif yang bersifat vasodilatasi pembekuan darah → menurunkan tekanan darah, mengikat permeabilitas kapiler dan merangsang faktor kemotaktik. Sebaliknya khalisein menunjukkan umpan balik (+) terhadap XII → mengaktifkan XII → XIIa. XIIa mengubah XI → XIa dan reaksi ini memerlukan HMWK selanjutnya XIa mengaktifkan IX → IXa dengan bantuan Ca pada tahap bereaksinya Xia bersama XIII dan Ca dan PF³ (platelet faktor 3) faktor trombo → mengaktifkan X-Xa.

2. Jalur ekstrinsik

Suatu *lipoprotein* yang dilepas dari jaringan yang rusak disebut dengan faktor jaringan trombopla jaringan. Faktor ini mengaktifkan VII → VIIa dengan bantuan Ca VII. Ini merupakan serisi protease kuat yang mampu mengaktifkan X-Xa adanya kalikrein dapat meningkatkan fungsi VIIa. Adanya dugaan bahwa VIIa dapat mengaktifkan X → Xa secara tidak langsung (indirek) yang lebih dulu mengaktifkan X, selanjutnya proses koagulasi berlanjut menjadi jalur bersama.

3. Jalur bersama

Setelah X-Xa, Xa berinteraksi dengan PF³, Ca dan *cofaktor* V → mengaktifkan II → IIa (*prothrombin-thrombin*) II (*thrombin*) mengubah I (*fibrinogen*) jadi Ia (*fibrin*=bekuan). *Thrombin* IIa juga merupakan serisi protease

kuat. Jumlah *thrombin* yang dihasilkan oleh 1 mL plasma bila dilepaskan sekaligus mampu membekukan seluruh darah dalam sirkulasi. Disamping mengubah *fibrinogen* → *fibrin*, *thrombin* juga meningkatkan reaksi pelepasan trombosit dan aktivasi V, VII, dan XIII pada akhirnya proses koagulasi *thrombin* mengubah *fibrinogen* → *fibrin* yang mulanya monomer secara spontan menjadi *fibrin* polimer yang sifatnya *irreversibel*.

D. Faktor Pembekuan

Faktor pembekuan menurut Ronald A.Sacher (2012) yaitu :

Faktor I (*fibrinogen*) adalah suatu *glikoprotein* 340 kilodalton (kd) dan terdiri dari tiga pasang rantai polipeptida. Zat ini disintesis di hati memiliki waktu paruh sekitar 3,5 sampai 4 hari. Kadar *fibrinogen* meningkat pada stress hemostatik, dan juga pada stress nonspesifik seperti peradangan, kehamilan, dan penyakit autoimun. Konsentrasi normal dalam plasma adalah 150 sampai 400 mg/dL.

Faktor II (*prothrombin*) adalah suatu *glikoprotein* dengan berat molekul 70.000 dalton. Zat ini berkaitan erat dengan faktor VII, IX, dan X. Bersama-sama membentuk faktor dependen-vitamin K. Keempatnya dibentuk di hati dan memerlukan vitamin K larut lemak untuk sintesisnya. Keempat ‘faktor hati’ ini stabil terhadap panas dan mempertahankan potensinya di darah atau plasma yang telah disimpan. *Prothrombin* memiliki waktu paruh 0,5 sampai 3 hari.

Faktor III (faktor jaringan atau *tromboplastin jaringan*). Zat ini merupakan suatu *glikoprotein* dengan berat molekul 44 kd yang berkaitan erat dengan *fosfolipid*. Gen untuk faktor jaringan terletak di kromosom 1. Jaringan

yang paling aktif adalah otak, paru, dan plasenta, tetapi semua jaringan memiliki aktivitas pendorong terbentuknya bekuan ini.

Faktor IV atau kalsium terionisasi, penting untuk pengaktifan faktor IX, faktor X untuk konversi *prothrombin* menjadi *thrombin* oleh Xa, dan untuk polimerisasi monomer *fibrin*. Harus terdapat 2,5 mg/dL kalsium sebelum dapat terjadi koagulasi *in vivo* atau *in vitro*. Hipokalsemia tidak pernah menyebabkan gangguan perdarahan klinis karena gangguan saraf hemodinamik, serta aritmia jantung, timbul jauh sebelum terjadi gangguan pembekuan. Antikoagulan, misalnya sitrat, oksalat, dan *ethylenediaminetetraacetate* (EDTA) menyebabkan kelasi kalsium dan antikoagulasi darah dengan menghambat penyediaan kalsium untuk koagulasi.

Faktor V adalah protein rantai tunggal berat molekul 300 kd yang disintesis di hati dan megakariosit. Gen yang mengkode faktor V juga terletak di kromosom 1. Struktur gen faktor V memperlihatkan banyak kemiripan dengan faktor VIII, dan keduanya adalah faktor koagulasi yang labil. Aktivitasnya cepat menghilang apabila darah atau plasma yang diberi antikoagulan disimpan dalam keadaan cair. Aktivitas juga cepat hilang dari sirkulasi darah dan memiliki waktu paruh hanya 15 sampai 25 jam. Faktor V juga merupakan ko-faktor penting pada kemampuan protein C aktif (*activated protein C, APC*) untuk berfungsi sebagai antikoagulan fisiologik. Mutasi yang mengenai arginin 506 menjadi glutamin (faktor V Leiden) diperkirakan menjadi penyebab hampir 40% kasus trombofilia idiopatik dan herediter. Dengan demikian, faktor V adalah prokoagulan sekaligus antikoagulan yang penting.

Istilah “faktor VI” tidak digunakan.

Faktor VII adalah *glikoprotein* rantai tunggal dengan berat molekul 50 kd. Faktor VII memiliki waktu paruh paling singkat dari semua faktor koagulasi (5 jam) dan merupakan salah satu faktor hati yang dependen vitamin K. Sekuens asam aminonya sangat mirip dengan faktor-faktor dependen vitamin K lainnya. Faktor ini paling cepat menurun setelah pemberian antagonis vitamin K seperti antikoagulan oral.

Faktor VIII (faktor *antihemofilik*) adalah suatu molekul besar berat molekul 330 kd yang memiliki beberapa fungsi fisiologik. Aktivitas prokoagulan berada di molekul ini, yang tersusun menjadi sebuah rantai berat dengan berat molekul 200 kd dan sebuah rantai ringan 80 kd, yaitu fragmen berberat molekul rendah yang ditentukan oleh sebuah gen di kromosom X. Faktor ini mampu menormalkan waktu pembekuan pada pasien hemofilia A. Pria yang kromosom X-nya mengandung gen VIII defektif akan menderita hemofilia A. Faktor ini dahulu disebut sebagai VIII:C. Faktor VIII adalah salah satu dari beberapa protein pembekuan yang tidak seluruhnya disintesis di hati, dan zat ini tampaknya juga disintesis oleh sel endotel semua jaringan. Faktor VIII memiliki waktu paruh biologis yang singkat, yaitu sekitar 12 jam dan menghilang cukup cepat dari plasma yang disimpan di lemari pendingin.

Faktor *von Willebrand* (vWF) adalah faktor yang memperbaiki gangguan waktu perdarahan pada penyakit *von Willebrand*. vWF dan faktor VIII adalah dua protein berbeda yang beredar sebagai satu kompleks dalam plasma. vWF berfungsi mengangkut dan menstabilkan faktor VIII. Ekspresi antigenik vWF disebut vWF:Ag. Sifat lain vWF yang mendorong agregasi trombosit dengan keberadaan antibiotik ristocetin disebut kofaktor ristocetin atau aktifitas vWF

(dahulu disebut sebagai “VIII:RCO”). Kelainan kuantitatif dan kualitatif vWF seperti yang dijumpai pada penyakit von Willebrand diwariskan secara otosomal. vWF disintesis oleh sel endotel dan pada kenyataannya disimpan di sel-sel di dalam apa yang dinamakan sebagai badan *Weibel-Pelade*. vWF beredar dalam plasma dalam konfigurasi multimerik.

Faktor IX atau faktor Christmas, komponen tromboplastin plasma adalah faktor hati dependen-vitamin K yang lain. Penyakit hemofilia B, atau penyakit *Christmas*, sangat mirip dengan defisiensi faktor VIII (hemofilia A) dalam aspek klinis dan laboratorium umum. Faktor ini memiliki waktu paruh fisiologis sekitar 24 jam, tetapi tetap berada dalam konsentrasi tinggi dalam plasma cair yang disimpan. Faktor ini juga terdapat di serum. Berat molekul protein diperkirakan antara 56 sampai 110 kd.

Faktor X (58,8 kd), yang disebut juga sebagai faktor *Stuart* atau faktor *Stuart-Power*, adalah faktor hati dependen-vitamin K yang lain. Faktor ini merupakan protein kunci untuk masuk ke jalur bersama. Gen untuk faktor X terletak di kromosom 13. Defisiensi kongenital terisolasi dapat terjadi, walaupun jarang, dan menyebabkan perdarahan yang cukup berat. Penyakit ini juga dapat timbul sebagai defisiensi didapat pada beberapa kasus amiloidosis. Faktor ini memiliki waktu paruh biologis sekitar 40 jam.

Faktor XI adalah suatu *glikoprotein* 143 kd yang disintesis di hati dan beredar dalam plasma dalam bentuk terikat (kompleks) dengan HMWK. Namun faktor XI tidak berkurang pada penyakit hati, dan tidak dependen vitamin K. Faktor ini stabil dalam darah atau plasma yang disimpan dan terdapat di serum. Defisiensi terisolasi terjadi sebagai suatu sifat resesif autosomal, terutama pada

orang keturunan *Yahudi Ashkenazi*, yang frekuensi gennya adalah 1 dari 8. Gen untuk faktor XI terletak di kromosom 4. Setelah defisiensi faktor VIII dan IX, defisiensi faktor XI adalah defisiensi kongenital tersering berikutnya, tetapi diatesis perdarahan yang terjadi relatif ringan. Waktu paruh biologis adalah sekitar 2 hari.

Faktor XII, yang sering disebut sebagai faktor *Hageman*, adalah suatu globulin beta rantai tunggal yang memiliki berat molekul sekitar 76 kd. Faktor ini tampaknya merupakan salah satu penghubung dengan jalur-jalur fisiologis lain, termasuk pengaktifan kontak pembekuan, pengaktifan jalur kini, pengaktifan komplemen, dan pengaktifan fibrinolisis. Faktor ini diaktifkan *in vitro* melalui kontak dengan permukaan bermuatan negatif (misal, kaca) dan *in vivo* oleh berbagai komponen sel seperti asam lemak, serebrosida, jaringan seperti kulit, dan endotoksin. Kemampuannya mengaktifkan faktor XI juga diperkuat oleh dua faktor lain, faktor Fletcher dan HMWK. Defisiensi faktor Hageman secara paradoks tidak berkaitan dengan masalah hemostatik yang bermakna, tetapi cenderung berkaitan dengan gangguan trombotik. Waktu paruh faktor Hageman adalah 60 sampai 70 jam.

Faktor XIII, yang juga disebut faktor stabilisasi *fibrin* (FSF), menstabilkan perubahan monomer *fibrin* menjadi polimer *fibrin* dan bekuan yang stabil. Pada kenyataannya, faktor ini ikut serta dalam pembentukan sejumlah ikatan antarmolekul stabilisator antara protein-protein plasma dan protein matriks ekstrasel. Faktor ini tampaknya disintesis di hati dan megakariosit, dan lebih dari separuh faktor darah XIII terdapat di trombosit. Sisanya beredar dalam ikatan dengan fibrinogen. Faktor XIII memiliki waktu paruh biologik yang lama (5

sampai 10 hari), tetapi menghilang saat plasma diubah menjadi serum. Defisiensi faktor XIII menyebabkan kecenderungan perdarahan, perlambatan penyembuhan luka, dan abortus spontan rekuren.

E. Prothrombin Time (PT)

PT adalah uji koagulasi yang paling sering dilakukan. Reagen untuk PT adalah *tromboplastin jaringan* dan kalsium terionisasi. Reagen-reagen ini akan menggantikan faktor jaringan untuk mengaktifkan faktor X dengan keberadaan faktor VII tanpa trombosit atau prokoagulan jalur intrinsik apabila ditambahkan ke plasma yang mengandung sitrat. Untuk mendapatkan hasil PT yang normal, plasma harus mengandung paling sedikit 100 mg/dL *fibrinogen* dan kadar faktor VII, X, V, dan *prothrombin* yang memadai (Ronald A.Sacher, 2012).

Pemanjangan PT sebagai temuan tersendiri dengan aPTT normalnya terjadi hanya pada defisiensi faktor VII. Pemanjangan PT dan aPTT dapat terjadi karena berbagai sebab, termasuk defisiensi faktor koagulasi multiple, terapi antikoagulan oral, penyakit hati, defisiensi vitamin K, dan defisiensi faktor-faktor jalur bersama (Ronald A.Sacher, 2012).

Nilai PT bergantung pada jenis reagen yang digunakan sehingga memperlihatkan variasi antar laboratorium yang lebar. *International Normalized Ratio* (INR) yang membandingkan reagen tromboplastin lokal terhadap suatu *International Reagent*. Dengan demikian, setiap reagen memiliki nilai relatif *International Sensitivity Index* (ISI) dalam kaitannya dengan reagen standar yang memiliki nilai ISI 1,0. Dengan demikian, nilai PT yang dikoreksi untuk rasio ini akan menghasilkan INR yang “dinormalkan” diseluruh laboratorium, tanpa bergantung pada variabilitas reagen yang digunakan. INR mudah diaplikasikan

untuk menstandarisasi intensitas antikoagulan tanpa bergantung pada variasi diberbagai laboratorium. Dengan demikian, INR hanya bermanfaat dalam peresepan antikoagulan oral dan tidak memiliki makna pada pasien yang waktu *prothrombinnya* memanjang karena penyebab selain pemakaian antikoagulan (misal, penyakit hati, malabsorpsi, atau defisiensi vitamin K). INR dihitung dengan rumus :

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{PT Pasien}}{\text{PT (rerata kontrol)}} \right] \text{ISI}$$

Pemeriksaan ini digunakan untuk menguji pembekuan darah melalui jalur ekstrinsik dan jalur bersama yaitu faktor pembekuan VII, X, V, *prothrombin*, fibrinogen. Selain itu juga dapat dipakai untuk memantau efek antikoagulan oral karena golongan obat tersebut tersebut menghambat pembentukan faktor pembekuan *prothrombin*, VII, IX dan X. Prinsip pemeriksaan ini adalah mengukur lamanya terbentuk bekuan bila kedalam plasma yang diinkubasi pada suhu 37°C, ditambahkan reagen tromboplastin jaringan dan ion kalsium (Setiabudy, 2009).

Hasil pemeriksaan ini dipengaruhi oleh kepekaan tromboplasin yang dipakai dan oleh teknik pemeriksaan. Karena pemeriksaan ini selalu harus dilakukan duplo dan disertai kontrol dengan plasma normal. Jika hasil PT memanjang maka penyebabnya mungkin kekurangan faktor-faktor pembekuan di jalur ekstrinsik dan bersama atau adanya inhibitor (Setiabudy, 2009).

F. Activated Parsial Thromboplastin Time (aPTT)

Uji ini dilakukan pada sampel darah yang telah diberi sitrat. Plasma dikeluarkan dan diletakkan di tabung sampel, tempat zat itu direkalsifikasi, dan ditambahkan suatu reagen yang mengandung faktor aktif permukaan seperti

kaolin dan *fosfolipid*. Kaolin meningkatkan kecepatan pengaktifan kontak, *fosfolipid* membentuk permukaan pada mana reaksi substrat enzim koagulasi dapat berlangsung dan kalsium menggantikan kalsium yang dikelasi oleh sitrat. Waktu yang diperlukan untuk membentuk suatu bekuan adalah waktu *tromboplastin parsial* (aPTT). aPTT “yang diaktifkan” dalam keadaan normal bervariasi dari 28 sampai 40 detik. Uji ini dapat dilakukan secara manual, tetapi lebih sering dievaluasi dengan menggunakan instrument otomatis yang mengeluarkan reagen yang bersangkutan. aPTT menilai jalur koagulasi intrinsik dan jalur koagulasi bersama. Uji ini mengukur adanya faktor-faktor VIII, IX, XI, dan XII, yang semuanya harus ada dalam kadar memadai agar hasil uji normal. Faktor X dan V, *prothrombin* dan *fibrinogen* juga harus ada. Faktor VII tidak diperlukan untuk aPTT karena uji ini melewati jalur ekstrinsik. aPTT lebih sensitif dalam mendeteksi defisiensi minor jalur bersama daripada waktu *prothrombin*. Sebagai patokan, kadar faktor dibawah 30% normal akan memperpanjang aPTT (Ronald A.Sacher, 2012).

Prinsip pemeriksaan ini adalah mengukur lamanya terbentuk bekuan bila kedalam plasma ditambahkan reagen tromboplastin parsial dan activator serta ion kalsium pada suhu 37°C. Reagen tromboplastin parsial adalah fosfolipid sebagai pengganti *platelet faktor 3* (Setiabudy, 2009).

G. Waktu Pembekuan Trombin

Uji waktu pembekuan trombin mengukur waktu yang diperlukan oleh sampel darah yang diberi sitrat untuk membeku setelah ditambahkan kalsium dan sejumlah tertentu trombin. Dengan demikian uji ini mengevaluasi interaksi *thrombin-fibrinogen*, yaitu bahwa uji ini melewati baik jalur ekstrinsik maupun

intrinsik dan menilai tahap-tahap akhir jalur bersama. Karena itu, waktu *thrombin* mungkin memanjang apabila defisiensi *fibrinogen* atau apabila terdapat antikoagulan dalam darah yang aktif dan mengintervensi kerja *thrombin*, seperti heparin (Ronald A.Sacher, 2012).

H. Antikoagulan

Antikoagulan merupakan zat yang berfungsi untuk mencegah terjadinya penggumpalan darah dengan cara mengikat kalsium atau menghambat terbentuknya *thrombin* yang diperlukan untuk mengubah *fibrinogen* menjadi *fibrin*. Antikoagulan dan sampel darah harus dicampur dengan segera dan dengan cara yang baik dan benar untuk mencegah terjadinya pembekuan (Nugraha, 2015).

Jenis antikoagulan yang dipakai untuk pemeriksaan PT adalah *sodium citrat* atau *trisodium citrate dihidrat* yang memiliki rumus kimia $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. *Sodium citrat* menghambat *koagulasi* dengan cara mengendapkan ion kalsium, sehingga menjadi bentuk yang tidak aktif (Nugraha, 2015). Konsentrasi sitrat yang direkomendasikan *International Committee for Standardization in Hematology* (ICSH) dan *International Society for Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) adalah 0.105-0.109 M (biasanya 3.2%) dengan rasio 9 volume darah dengan 1 volume antikoagulan, sehingga penting untuk mengisi tabung sedikitnya 90% dari kapasitas tabung atau mencapai batas yang terdapat pada tabung untuk tercapainya rasio antar volume darah dan antikoagulan tersebut selain itu tabung juga harus dicampur merata dengan dibolak balik perlahan sebanyak 5-6 kali dan jangan dikocok supaya darah dengan antikoagulan menjadi homogen (Favaloro, Adcock Funk, and Lippi, 2012).