

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Darah

Darah merupakan salah satu jaringan dalam tubuh yang berbentuk cair berwarna merah. Karena sifat darah yang berbeda dengan jaringan lain, mengakibatkan darah dapat bergerak dari satu tempat ke tempat lain sehingga dapat menyebar ke berbagai kompartemen tubuh. Penyebaran harus terkontrol dan harus tetap berada pada satu ruangan agar darah benar-benar dapat menjangkau seluruh jaringan didalam tubuh melalui sistem yang disebut sistem kardiovaskular, yang meliputi jantung dan pembuluh darah. Dengan sistem tersebut darah dapat diakomodasikan secara teratur dan diedarkan menuju organ dan jaringan yang tersebar diseluruh tubuh. Darah didistribusikan melalui pembuluh darah dari jantung ke seluruh tubuh dan akan kembali lagi menuju jantung. Sistem ini berfungsi untuk memenuhi kebutuhan sel atau jaringan akan nutrient dan oksigen, serta mentransport sisa metabolisme sel atau jaringan keluar dari tubuh (Nugraha, 2015). Darah terdiri dari 4 unsur seluler, yaitu: sel-sel darah merah (eritrosit), sel-sel darahputih(leukosit), sel-sel darah pembeku atau keping darah (trombosit) dan cairan darah (plasma darah) (D'Hiru, 2013).

Darah berfungsi sebagai alat pengangkut (sirkulasi, distribusi dan transportasi) yaitu mengambil oksigen dari paru-paru untuk diedarkan ke seluruh jaringan tubuh, mengangkut karbondioksida dari jaringan untuk dikeluarkan melalui paru-paru, mengambil zat makanan dari usus halus untuk diedarkan dan dibagikan ke seluruh jaringan tubuh, mengeluarkan zat-zat yang tidak berguna bagi tubuh untuk dikeluarkan melalui kulit dan ginjal, sebagai pertahanan tubuh terhadap serangan penyakit, dan menyebarkan panas ke seluruh tubuh (Amalia dan Widuri, 2020).

Manusia umumnya mempunyai volume darah sekitar 70 mL setiap kilogram berat badan. Sebanyak 50-60% darah terdiri atas komponen cair, sisanya komponen padat berupa sel-sel darah. Komponen yang berupa cairan disebut plasma yang mengandung 90% air dan 10% bahan – bahan terlarut misalnya ion – ion, glukosa, asam amino, hormon dan berbagai macam protein. Protein dalam plasma terdiri dari serum albumin (alpha-1 globulin, alpha-2 globulin, beta globulin dan gamma globulin), fibrinogen, prothrombin dan protein essensial untuk koagulasi (Desmawati, 2013). Perbedaan antara plasma dan serum adalah plasma mengandung fibrinogen sedangkan serum tidak mengandung fibrinogen. Fibrinogen yang dikonversi menjadi fibrin bersifat tidak larut dan bersama eritrosit membentuk bekuan darah (Riswanto, 2013).

2. Jenis Spesimen

a. Darah utuh (*whole blood*)

Pada pemeriksaan hematologi biasanya yang digunakan adalah darah utuh (*whole blood*), yaitu darah yang sama bentuk/kondisinya seperti ketika beredar dalam aliran darah. Darah utuh (*whole blood*) ini berupa vena atau kapiler. Agar spesimen darah tidak membeku sebelum dilakukan pemeriksaan maka harus ditambah dengan antikoagulan. Jenis antikoagulan yang digunakan harus disesuaikan dengan jenis pemeriksaan yang akan dilakukan. Karena sel-sel darah dapat mengendap jika spesimen didiamkan beberapa saat, maka spesimen harus dicampur atau dihomogenkan minimal 2 menit sebelum dilakukan pemeriksaan (Riswanto, 2013).

b. Plasma

Plasma adalah bagian cair dari darah yang diberi antikoagulan. Jika darah ditambah antikoagulan, maka tidak akan terjadi pembekuan darah dan darah tetap cair. Darah yang ditambah antikoagulan tersebut setelah didiamkan beberapa menit atau disentrifugasi akan terpisah menjadi tiga bagian yaitu: plasma yang berada dilapisan atas berupa cairan berwarna kuning; buffycoat yang berada di lapisan tengah dan tipis, merupakan lapisan sel leukosit dan trombosit; serta eritrosit yang berada di lapisan bawah (Riswanto,2013).

c. Serum

Serum adalah bagian cair dari darah yang tidak diberi antikoagulan. Jika darah di dalam tabung didiamkan selama 5-10 menit, maka darah akan membeku. Darah akan terpisah dua bagian, yaitu serum berupa cairan berwarna kuning dan bekuan darah berupa massa solid berwarna merah (Riswanto, 2013).

3. Pemeriksaan Darah Lengkap

Pemeriksaan darah lengkap (Complete Blood Count/CBC) adalah pemeriksaan penyaring untuk menunjang diagnosa suatu penyakit serta melihat bagaimana respon tubuh terhadap suatu penyakit tersebut. Pemeriksaan darah lengkap terdiri dari beberapa parameter pemeriksaan yaitu hemoglobin, hematokrit, leukosit, trombosit, eritrosit, indek eritrosit, laju endap darah, hitung jenis leukosit, *platelet distribution* dan *redcell distribution* (Desmawati, 2013). Dalam pemeriksaan darah lengkap digunakan spesimen darah utuh (whole blood) yang dicampur (homogenisasi) dengan zat antikoagulan. Antikoagulan digunakan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah, sehingga darah tetap dalam kondisi cair. Penghomogenan darah harus dilakukan dengan segera. Penghomogenan darah dilakukan sesuai dengan gold standar. Menurut Decie and Lewis, cara yang dilakukan untuk menghomogenkan darah dapat menggunakan teknik inversi dan angka delapan. Jika homogenisasi tidak dilakukan akan menyebabkan

koagulasi sehingga akan mengganggu pemeriksaan darah lengkap (Deciedan Lewis, 1991; Katharyn, dkk 2008).

4. Antikoagulan

Antikoagulan merupakan zat yang berfungsi untuk mencegah terjadinya penggumpalan darah dengan cara mengikat kalsium atau menghambat pembentukan thrombin yang diperlukan untuk mengubah fibrinogen menjadi fibrin pada pembekuan darah. Spesimen darah yang akan diperiksa harus segera dicampur dengan antikoagulan sesuai dengan jenis pemeriksaan untuk mencegah pembekuan (Riswanto, 2013).

Antikoagulan yang sering digunakan dalam mencegah terjadinya penggumpalan darah adalah EDTA dan CPDA-1. Antikoagulan EDTA (*Ethylen Diamine Tetracetic Acid*) sering digunakan dalam pemeriksaan hematologi karena dapat mempertahankan morfologi sel, dan menghambat agregasi trombosit (Kiswari, 2014). Penggunaan EDTA sebaiknya harus diperhatikan batas waktu penyimpanannya, untuk memastikan agar hasil pemeriksaan dapat diandalkan. Secara medis, pengujian harus dilakukan dalam waktu 45 menit sampai 1 jam setelah pengumpulan sampel untuk menghindari terjadinya perubahan *in vitro* selama masa penyimpanan. Sedangkan antikoagulan CPDA-1 (*Citrat Phosphat Dextrose Adenin-1*) yang disimpan pada suhu 2-6°C dapat disimpan hingga 35 hari. Sitrat berguna untuk mengikat kalsium sehingga tidak terjadi koagulasi,

dextrose menyediakan sumber energi untuk sel darah merah, fosfat anorganik berfungsi meningkatkan viabilitas eritrosit, adenin eksogen oleh eritrosit untuk membentuk ATP. Dextrose dan adenin dapat mempertahankan ATP selama penyimpanan. Alasan disimpan pada suhu 2-6°C demi menjaga dextrose agar tidak cepat habis, serta mengurangi pertumbuhan bakteri kontaminan selama proses penyimpanan (Setyati, 2010).

5. Eritrosit

Fungsi utama sel darah merah atau eritrosit cukup sederhana, yaitu menyalurkan oksigen ke jaringan membantu membuang karbon dioksida dan proton yang dibentuk oleh metabolisme jaringan. Sel darah merah memiliki struktur yang jauh lebih sederhana dibandingkan kebanyakan sel pada manusia. Pada hakikatnya, sel darah merah merupakan suatu membran yang membungkus larutan hemoglobin (protein ini membentuk sekitar 95% protein intrasel sel darah merah), dan tidak memiliki organel sel, misalnya mitokondria, lisosom, atau aparatus Golgi. Sel darah merah manusia, seperti sebagian besar sel darah merah hewan, tidak berinti. Namun, sel darah merah tidak inert secara metabolis. Melalui proses glikolisis, sel darah merah membentuk ATP yang berperan penting dalam proses untuk mempertahankan bentuknya yang bikonkaf dan juga dalam pengaturan transpor ion (mis. oleh Na⁺-KATPase dan protein penukar anion) serta pengaturan air dalam keluar-masuk sel. Bentuk bikonkaf ini meningkatkan rasio

permukaan terhadap volume sel darah merah sehingga mempermudah pertukaran gas. Sel darah merah mengandung komponen sitoskeletal yang berperan penting dalam menentukan bentuknya (Murray, 2009).

Umur sel darah merah normal adalah 120 hari; hal ini berarti bahwa setiap hari terjadi penggantian kurang dari 1% populasi sel darah merah (200 milyar sel, atau 2 juta per detik). Sel darah merah baru yang terdapat di dalam sirkulasi masih mengandung ribosom dan elemen-elemen retikulum endoplasma. RNA ribosom dapat dideteksi dengan pemulasan yang sesuai (misalnya cresyl blue), dan sel yang mengandung RNA tersebut dinamai retikulosit; jumlah retikulosit dalam keadaan normal sekitar 1% jumlah total sel darah merah. Umur sel darah merah dapat sangat memendek pada keadaan anemia hemolitik (Murray, 2009). Pada keadaan ini, jumlah retikulosit meningkat pesat karena sumsum tulang berupaya mengompensasi penurunan pesat sel darah merah dengan meningkatkan jumlah sel darah merah muda baru di dalam sirkulasi.

Pembentukan sel darah merah diatur oleh eritropoietin. Eritropoietin merupakan regulator utama eritropoiesis pada manusia. Zat ini disintesis terutama oleh ginjal dan dikeluarkan ke dalam aliran darah sebagai respons terhadap hipoksia. Eritropoietin kemudian masuk ke dalam sumsum tulang dan berinteraksi dengan progenitor sel darah merah melalui reseptor spesifik. Reseptor merangsang aktivitas anggota tertentu dari kelas enzim yang terlibat dalam penyaluran sinyal ke hilir.

Eritropoietin berinteraksi dengan progenitor sel darah merah, yaitu burst-forming unit-erythroid (BFU-E), dan menyebabkannya berproliferasi serta berdiferensiasi. Selain itu, protein ini juga berinteraksi dengan progenitor tahap lanjut sel darah merah, yaitu colony-forming unit-erythroid (CFU-E), dan menyebabkannya berproliferasi dan berdiferensiasi lebih lanjut. Ketersediaan cDNA untuk eritropoietin memungkinkan diproduksinya hormon ini dalam jumlah besar untuk kepentingan analisis dan pengobatan (Murray, 2009). Dahulu, isolasi eritropoietin dari urine manusia hanya menghasilkan protein ini dalam jumlah yang sangat sedikit. Eritropoietin rekombinan terutama digunakan untuk mengobati beberapa keadaan anemia, seperti anemia akibat gagal ginjal.

6. *Automatic Hematology Analyzer DxH 500 Beckman Coulter*

Hematology analyzer adalah perangkat yang digunakan untuk melakukan pengukuran komponen-komponen yang ada didalam darah. *DxH 500* merupakan *hematology analyzer* otomatis kuantitatif multi parameter yang digunakan untuk diagnostik in vitro di laboratorium klinis (Beckman Coulter, 2018). *Automatic Hematology Analyzer DxH 500 Beckman Coulter* merupakan suatu penganalisis hematologi multi parameter untuk pemeriksaan kuantitatif yang meliputi WBC (*White Blood Count*), limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil, basofil, persentase limfosit, persentase monosit, persentase neutrofil, persentase eosinofil, persentase basofil, RBC (*Red Blood Count*), HGB (Hemoglobin), HCT

(Hematokrit), MCV (*Mean Corpuscular Volume*), MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*), RDW-CV, RDW-SD, PLT (Platelet), MPV (*Mean Platelet Volume*), WBC histogram, RBC histogram dan PLT histogram (Beckman Coulter, 2018).

Spesimen yang digunakan pada *Hematology Analyzer DxH 500 Beckman Coulter* adalah *whole blood* (vena dan kapiler) dengan antikoagulan K2EDTA dan K3EDTA. Volume *whole blood* yang disedot adalah 12 μL . Selain itu, pemeriksaan juga dapat dilakukan dengan metode *prediluted whole blood* (20 μL darah dalam 300 μL larutan pengencer). Volume *prediluted whole blood* yang disedot adalah 180 μL (Beckman Coulter, 2018).

Reagen yang digunakan adalah diluent, lyse dan cleaner. Diluent adalah larutan buffer isotonik penghasil formaldehida rendah yang disempurnakan. Diluent berfungsi untuk mengencerkan spesimen dan digunakan untuk membilas komponen modul analisis sampel. Reagen lyse adalah reagen bebas sianida yang melisiskan sel darah merah untuk pemeriksaan jumlah leukosit, klasifikasi subpopulasi leukosit dan pengukuran hemoglobin. Reagen cleaner adalah pembersih bebas azida, bebas formaldehida, biodegradable yang mengandung enzim proteolitik yang membantu menghilangkan penumpukan protein (Beckman Coulter, 2018).

Prinsip kerja *hematology analyzer* yaitu sampel darah yang sudah dicampur dengan reagen dilusi sebanyak 200x proses hemolyzing untuk mengukur jumlah leukosit. Selanjutnya sampel dilakukan dilusi lanjutan sebanyak 200x menjadi 40.000x untuk mengukur eritrosit dan trombosit. Prinsip yang digunakan pada *hematology analyzer* meliputi:

a. Prinsip Teknologi Impedance Flowcytometry

Flowcytometry didefinisikan sebagai pengukuran simultan beberapa karakteristik fisik dari sebuah sel tunggal yang telah tersuspensi dan dialirkan melalui suatu celah yang disebut Aperture. Pengukuran sel yang dapat digunakan pada Impedance Flowcytometry dengan menggunakan impedansi listrik dari sebuah sel. Impedansi adalah kuantitas kompleks yang dinotasikan dengan Z . dalam koordinat kartesius :

$$Z = R + jX$$

Bagian nyata dalam sebuah impedansi adalah Resistansi (R) dan bagian imajiner adalah reaktansi (X), secara dimensi impedansi sama dengan resistansi dan satuannya ialah ohm. Prinsip ini mengukur bahwa sebuah sel dianggap sebagai sebuah rangkaian listrik dari sebuah resistor dan kapasitor, ketika arus listrik dilewatkan pada sel tersebut akan terjadi tahanan listrik yang disebut sebagai impedansi.

Sel darah yang melewati aperture yang memiliki elektroda yang beraliran listrik konstan pada kedua sisinya maka akan terjadi

perubahan tahanan listrik pada kedua elektroda tersebut dan mengakibatkan timbulnya pulsa listrik. Jumlah pulsa listrik yang terukur per satuan waktu (frekuensi pulsa) dideteksi sebagai jumlah sel dan besarnya perubahan tegangan listrik (amplitudo) merupakan ukuran volume dari sebuah sel darah (Mengko.R, 2013).

b. Teknologi Laser – Based (optical) Flowcytometry

Prinsip yang digunakan adalah pendaran cahaya atau light scattering yang terjadi ketika sel mengalir melewati celah dan berkas cahaya yang di fokuskan ke sensing area yang ada pada aperture tersebut. Apabila cahaya mengenai sel, maka cahaya akan dihamburkan, dipantulkan atau dibiaskan ke semua arah dan beberapa detektor yang diletakkan pada sudut – sudut tertentu akan menangkap berkas – berkas sinar yang terpengaruh oleh sel tersebut (Mengko.R, 2013).

Pulsa cahaya yang berasal dari hamburan cahaya, intensitas warna atau fluoresensi akan diubah menjadi pulsa listrik. Oleh suatu program pada komputer, pulsa ini diubah untuk menghitung jumlah, ukuran, maupun isi bagian dalam sel yang merupakan ciri dari masing – masing sel. Hamburan cahaya dengan arah lurus (forward scatter light) mendeteksi volume dan ukuran sel. Sedangkan yang dihamburkan dengan sudut 90° menunjukkan informasi terkait isi granula sitoplasma. Pada metode pendaran

cahaya ini bisa dilakukan dengan penambahan pewarna pada reagen untuk lebih meningkatkan kemampuan deteksi dan mengenali ciri – ciri sel darah sehingga akan lebih banyak informasi yang di dapat untuk membedakan jenis sel (Mengko.R, 2013).

c. Teknologi Deteksi RF/DC

Pada jenis ini sel darah yang telah tersuspensi dilewatkan melalui aperture, sehingga mengubah resistansi arus searah (DC) dan resistansi sinyal frekuensi radio (RF) antara kedua elektroda. Ukuran sel dideteksi oleh perubahan resistensi pada arus searah dan kepadatan interior sel darah diukur oleh perubahan resistensi pada sinyal frekuensi radio. Dengan data ini ukuran dan kepadatan dari dalam sel dapat diketahui dan dianalisis distribusinya (Mengko.R, 2013).

d. Teknologi Hidrofokus

Dinamis Pada jenis ini detektor yang digunakan berupa nosel sampel yang berada di depan aperture pada posisi garis lurus dengan titik pusat. Ketika sel darah akan memasuki aperture sel diselubungi oleh larutan pereaksi. Seperti yang terlihat pada gambar dibawah ini dimana posisi ini sel – sel darah akan melalui celah aperture dalam garis lurus sehingga dapat mencegah pembentukan pulsa palsu dan berguna meningkatkan akurasi serta kecepatan dalam perhitungan sel darah (Mengko.R, 2013)

e. Teknologi VCS (*Volume, Conductivity and Laser Light Scatter*)

Teknologi ini mengukur volume, konduktivitas dan hamburan cahaya laser digunakan secara bersamaan pada setiap sel yang melewati aperture. Volume (V) diperoleh dari pengukuran impedansi listrik atau dengan Direct Current, Konduktivitas (C) mengukur ukuran inti dan kepadatan setiap sel dengan menggunakan radio frekuensi, sedangkan hamburan cahaya laser (S) mendeteksi struktur internal, granularitas dan karakteristik permukaan sel serta memberikan informasi mengenai bentuk dan struktur sel (Mengko.R, 2013).

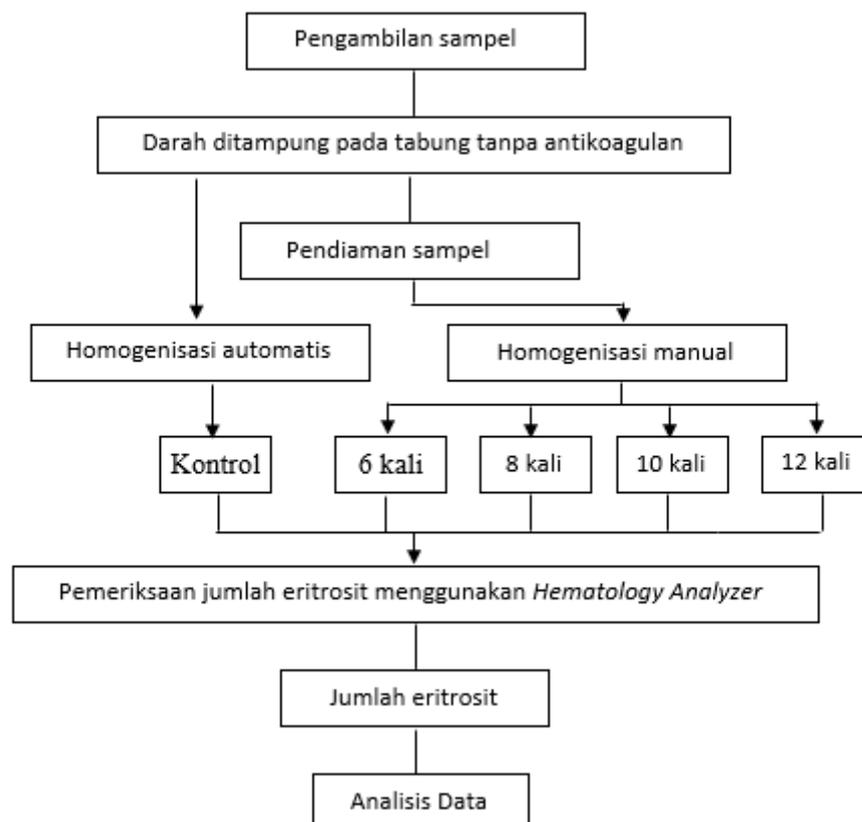
Hematology Analyzer DxH 500 Beckman Coulter memenuhi spesifikasi kinerja saat dioperasikan pada suhu 18-32°C (64,4-89,6°F). Jika suhu ruangan rata-rata berubah lebih dari 10°F atau 6°C ketika instrumen sudah dikalibrasi, maka verifikasi kalibrasi dan jika perlu kalibrasi ulang untuk memastikan kinerja yang optimal. Alat ini dapat disimpan pada suhu -10°C sampai 50°C (Beckman Coulter, 2018).

7. *Blood Roller Mixer*

Blood Roller Mixer berasal dari kata *blood* yang berarti darah, *roller* berarti gulungan berputar dan *mixer* berarti pengocok, maka dapat disimpulkan bahwa *Blood roller mixer* merupakan alat pengocok darah dengan gulungan atau rol yang berputar. Alat ini berfungsi untuk menghomogenkan darah atau mengocok sampel darah dalam sebuah venoject (tabung hampa udara steril) (Nugraha, 2010).

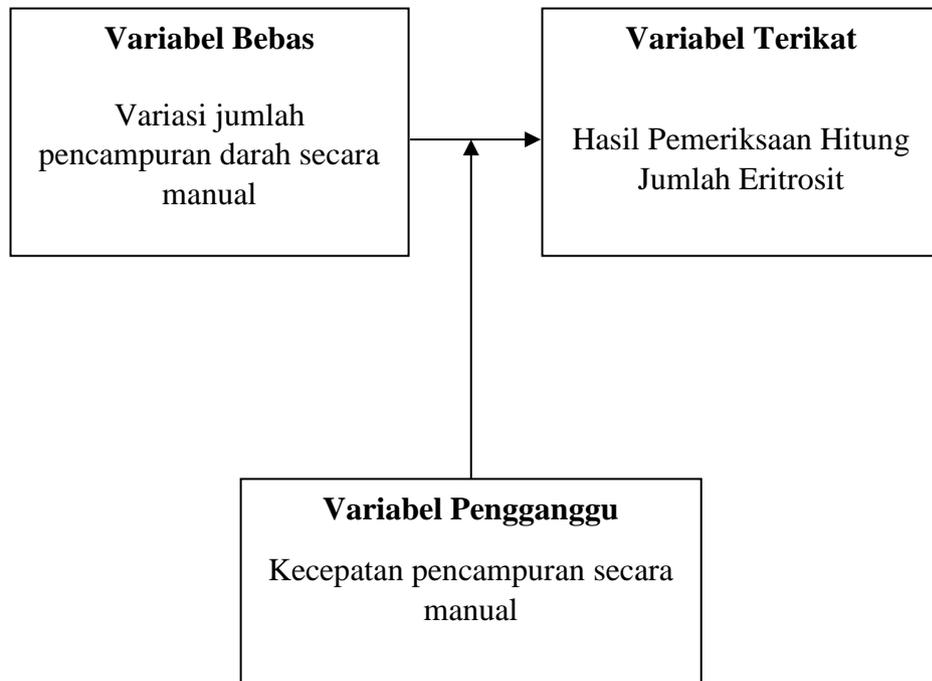
Blood roller mixer digunakan ketika sampel dalam *venoject* telah diletakkan tepat diantara rol yang berputar, maka sampel tersebut akan mulai tercampur mengikuti gerak roller nya. Berdasarkan prinsip kerjanya, alat *blood roller mixer* ini memiliki nilai RPM (*Rotate Per Minute*) sebagai kecepatan putaran dari pada rol tersebut dengan pilihan kecepatan 33 dan 40 RPM, kecepatan ini dipilih berdasarkan buku *District Laboratory Practise In Tropical Countries* (Cheesbrough, 2005).

B. Landasan Teori



Gambar 1. Landasan Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 2. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis Penelitian

Ada pengaruh dari variasi pencampuran sekunder pada darah antikoagulan secara manual terhadap hasil pemeriksaan hitung jumlah eritrosit.