

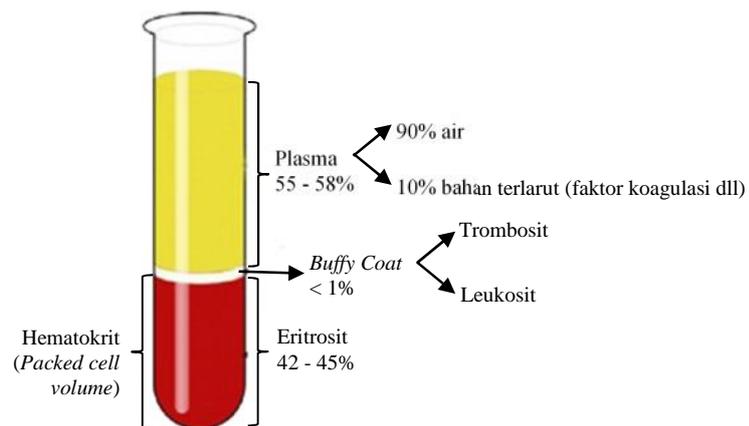
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Telaah Pustaka

##### 1. Komponen Darah

Darah merupakan jaringan ikat yang terdiri dari sel-sel yang tersuspensi dalam plasma. Plasma adalah komponen cairan darah yang berwarna kekuningan (Bararah dkk., 2017). Plasma mengandung 90% air dan 10% sisanya adalah bahan-bahan terlarut (Bain, 2010) misalnya mineral, garam, vitamin, faktor koagulasi, dan elemen organik. Sebanyak 55-58% darah terdiri atas cairan, sisanya berupa sel darah sebanyak 42-45%. Sel-sel darah tersuspensi dalam plasma, terdiri dari eritrosit (sel darah merah) sebanyak 42-45%, leukosit (sel darah putih) dan trombosit (platelet) kurang dari 1% (D'Hiru, 2013).



Gambar 1. Komponen Sel Darah (Darah yang Telah di Sentrifugasi)  
Sumber : D'Hiru, 2013 ; Kiswari, 2014.

Hitung darah lengkap (CBC, *complete blood count*) bertujuan menentukan apakah ada peningkatan atau penurunan jumlah sel darah, untuk mendeteksi gangguan tertentu yang mengganggu kesehatan. Nilai normal bervariasi tergantung umur, jenis kelamin dan suku/kelompok (Huisman, 2016). Uji CBC terdiri dari pemeriksaan kandungan sel darah terutama leukosit, trombosit dan eritrosit dengan parameter terkait (*Packed cell volume*, konsentrasi hemoglobin) (Wood dkk., 1999 dalam Ali dkk., 2020).

## 2. Eritrosit

### a. Definisi dan Fungsi

Sel darah merah atau eritrosit berbentuk bulat cakram bikonkaf, berwarna merah, hampir semuanya sama besar dan tidak berinti. Komponen utama eritrosit adalah hemoglobin (Hb) untuk mengangkut O<sub>2</sub> dan CO<sub>2</sub> serta mempertahankan pH normal melalui reaksi buffer intraseluler. Diameter rata-rata eritrosit adalah 7,2 µm. Melalui mikroskop, eritrosit tampak bulat, berwarna merah, dan dibagian tengahnya tampak lebih pucat, disebut *central pallor* yang diameternya kira-kira sepertiga dari keseluruhan diameter eritrosit.

Bila terjadi peningkatan kualitas volume sel darah merah disebut polisitemia, jika terjadi penurunan jumlah sel darah merah maka akan timbul anemia. Anemia adalah pengurangan jumlah eritrosit, kuantitas hemoglobin, dan volume sel darah merah (hematokrit) per 100 mL darah. Jenis anemia tergantung dari unsur yang mengalami defisiensi

(anemia defisiensi B<sub>12</sub>, asam folat, atau besi) (Kiswari, 2014). Jumlah eritrosit dinyatakan sebagai jumlah sel per milimeter kubik (mm<sup>3</sup>) atau juta sel/ $\mu$ L. Batas normal pria : 4,5-5,9 juta sel/ mm<sup>3</sup>, dan wanita : 4,0–5,2 juta sel/ mm<sup>3</sup> (D'Hiru, 2013).

#### b. Eritropoiesis

Eritropoiesis adalah proses produksi eritrosit, yaitu merupakan proses diferensiasi dari sel induk hematopoietik menjadi eritrosit yang matang. Umur eritrosit kira-kira 120 hari, maka 1/120 dari jumlah eritrosit hilang setiap hari, dan retikulosit dalam jumlah yang sama dilepaskan dari sumsum tulang ke dalam sirkulasi. Eritrosit tua yang lisis digantikan oleh sumsum tulang dengan eritrosit baru melalui proses eritropoiesis.

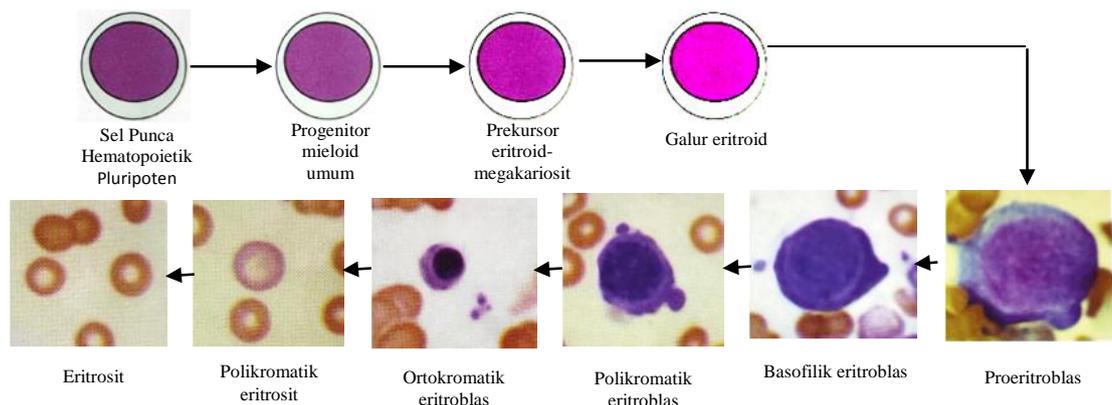
Eritropoiesis normal terjadi di sumsum tulang, prosesnya diatur oleh eritropoietin, yaitu hormon yg secara langsung mempengaruhi aktivitas sumsum tulang. Hormon ini sangat peka terhadap perubahan kadar O<sub>2</sub> jaringan. Eritropoietin 90% dihasilkan di sel interstitial peritubular ginjal & 10% di hati dan tempat lain sebagai stimulus untuk pembentukan tekanan O<sub>2</sub> dalam ginjal. Tingkat oksigenasi berbanding terbalik dengan kadar eritropoietin. Sensor oksigen di ginjal mengirimkan pesan ke sumsum tulang, jika jaringan ginjal mengalami hipoksia maka akan diproduksi eritropoietin, sel induk berdiferensiasi ke dalam jalur eritroid, sel paling muda membutuhkan waktu 4-5 hari untuk

menjadi retikulosit muda. Retikulosit muda memasuki sistem peredaran darah, sebanyak 0.5-1.5% dari jumlah eritrosit, akan menjadi eritrosit dalam 1 hari, untuk mengganti eritrosit tua yang telah lisis. Ketika jumlah eritrosit yang mengandung hemoglobin meningkat, maka kapasitas pembawa oksigen darah meningkat, sehingga pasokan oksigen ke jaringan menjadi normal. Produksi dan diferensiasi, perkembangan, serta pematangan semua sel darah yang terjadi di sumsum tulang menghasilkan 3 miliar eritrosit per hari per kg berat badan (Kiswari, 2014).

Proses pembentukan eritrosit dari proeritroblas dalam keadaan normal memerlukan waktu 5-9 hari (Bain, 2010). Tahapan pematangan eritroid menjadi sel matang adalah sebagai berikut :

- 1) Tahap pertama setelah koloni eritroid membentuk unit suatu sel dengan nukleus (inti) yang sangat besar adalah tahap proeritroblas.
- 2) Tahap dimulainya sintesis hemoglobin dengan nukleus (inti) sedikit mengecil dan memadat adalah tahap basofilik eritroblas.
- 3) Tahap terakhir dari sintesis DNA dan pembelahan sel dengan nukleus (inti) semakin mengecil adalah tahap polikromatik eritroblas atau normoblas.
- 4) Tahap dimana nukleus (inti) mulai mengekerut dan terjadi autolisis, sehingga nukleus sisa disingkirkan dan dipisahkan dari sel. nukleus (inti) yang sangat besar adalah tahap ortokromatik eritroblas.

- 5) Tahap dimana sel sudah tidak memiliki nukleus (inti) akan tetapi masih tersisa benang benang retikulumnya didalam sel dan mulai memasuki sirkulasi atau biasa disebut eritrosit muda dengan nukleus (inti) yang sangat besar adalah tahap retikulosit (polikromatik eritrosit).
- 6) Tahap dimana sel sudah tidak memiliki nukleus (inti) dan berbentuk diskus (lempengan) yang dapat bergerak dalam ruang rapat untuk mengambil atau melepaskan oksigen adalah Tahap eritrosit (Kiswari, 2014).



Gambar 2. Eritropoiesis

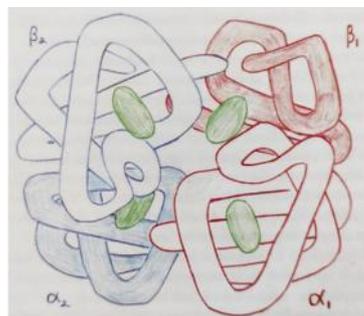
Sumber : Bain, 2010 ; Kiswari 2014.

Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk eritropoiesis adalah asam amino, Fe, vitamin B12 dan asam folat, vitamin C, vitamin B, vitamin E, mineral seperti Cu, Co dan *growth factor* yaitu eritropoitin. Produksi eritropoitin meningkat pada kasus; anemia, metabolik dan struktur Hb tidak dapat melepaskan O<sub>2</sub> secara normal, O<sub>2</sub> atmosfer rendah, dan gangguan fungsi jantung atau paru, kerusakan sirkulasi ginjal dan peningkatan massa eritrosit.

Berbagai keadaan klinik selain uremia yang berhubungan dengan defisiensi produksi eritropoietin yaitu: anemia pada prematuritas, anemia karena inflamasi kronik (Arthritis Rematoid, *Inflammatory bowel disease*, infeksi kronik, dan AIDS), anemia pada keganasan (dengan atau tidak dengan pemberian kemoterapi) (tumor solid, *multiple myeloma*, dan limfoma maligna) (Notopoero, 2007).

### 3. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) merupakan komponen utama eritrosit, merupakan 90% bobot kering eritrosit. Hemoglobin berupa protein terkonjugasi yang berfungsi untuk transportasi oksigen ( $O_2$ ) dan karbon dioksida ( $CO_2$ ). Molekul hemoglobin terdiri dari empat rantai polipeptida (globin) setiap rantai memiliki kantong yang dalam, tempat penyimpanan gugus heme yang mengandung besi. Hemoglobin normal pada orang dewasa yaitu HbA terdiri dari 2 rantai alfa globulin dan 2 rantai beta globulin (Asti, 2001 ; Bain, 2010).



Gambar 3. Molekul Eritrosit, Menunjukkan Dua Rantai Globin Alfa dan Dua Rantai Globin Beta serta Empat Gugus Heme (warna hijau).

Sumber: Bain, 2010.

Pada bayi yang masih dalam kandungan atau yang sudah lahir terdiri dari beberapa rantai beta dan molekul hemoglobinnya terbentuk dari 2 rantai alfa dan 2 rantai gama yang disebut sebagai HbF. Variasi pada masing-masing rantai polipeptida yang melekat pada heme dapat membedakan berbagai jenis hemoglobin : hemoglobin A1 (HbA1), A2 (HbA2), F (HbF). Pada orang dewasa normal susunan hemoglobin adalah 97% HbA1, 2% HbA2, dan 1% HbF. Suhu tinggi, pH rendah dan konsentrasi 2,3-difosfoglisarat akan menurunkan afinitas hemoglobin terhadap oksigen (Bain, 2010).

Hemoglobin dari sel darah merah tua dipecah menjadi hem dan globin dalam makrofag terutama di limfa, sumsum tulang dan hati. Globin akan diurai menjadi asam-asam amino pembentuknya yang kemudian dapat digunakan kembali sedangkan hem akan terurai menjadi bilirubin terutama di sel retikuloendotel hati, limpa dan sumsum tulang (Murray dkk., 2009 dalam Rozali, 2020). Cincin porfirin hem dioksidasi oleh enzim heme oksigenase membentuk pigmen hijau yaitu biliverdin, melepaskan zat besi dalam bentuk ferri ( $Fe^3$ ) dan melepaskan karbon monoksida (CO). Biliverdin kemudian direduksi menjadi pigmen kuning yang disebut bilirubin. Bilirubin yang terbentuk memiliki sifat tidak larut dalam air disebut juga bilirubin tidak terkonjugasi. Bilirubin ini berikatan dengan albumin dan dikonjugasikan di hati dengan asam glukoronat yang dikatalisis oleh enzim glukoronil transferase menjadi bilirubin glukoronida

yang bersifat larut dalam air disebut juga bilirubin terkonjugasi (McPherson dan Pincus, 2011).

Hemoglobin mengandung zat besi yang diperlukan untuk bergabung dengan oksigen, gejala kekurangan oksigen seperti nafas pendek adalah gejala pertama anemia (kekurangan zat besi). Penurunan Hb terjadi pada ibu hamil, luka pendarahan, infeksi kronis, penyakit kronis, tumor, gangguan hati, kekurangan vitamin, mineral dan gangguan kesehatan lainnya. Konsentrasi hemoglobin dinyatakan dalam gram hemoglobin per seratus milimeter darah (g/100mL) atau gram per desiliter (g/dL). Pada pria : 13,5-17,5 g/dL, sedangkan pada wanita : 12,0-16,0 g/dL (D'Hiru, 2013).

#### **4. Hematokrit**

Hematokrit (HCT) menunjukkan volume darah lengkap yang terdiri dari sel darah merah. Pengukuran ini merupakan persentase sel darah merah dalam darah setelah spesimen disentrifugasi dan dinyatakan dalam milimeter kubik sel padat per 100 ml darah atau dalam volume/100 mL. Pengukuran ini dihubungkan dengan tingkat kekentalan darah. Makin tinggi persentasenya makin kental darah. Normalnya pada pria : 40-48% sedangkan untuk wanita : 37-43% (D'Hiru, 2013).

Peningkatan jumlah eritrosit dapat terjadi dari kondisi yang tidak berhubungan dengan meningkatnya produksi eritropoetin adalah polisiemia relatif, ini terjadi saat peningkatan hematokrit yang disebabkan

oleh menurunnya volume plasma, dimana jumlah eritrosit total tidak bertambah. Selain itu, kehilangan cairan tubuh dan volume plasma karena kondisi dehidrasi, seperti diare atau luka bakar, dapat meningkatkan hematokrit. Pemeriksaan hematokrit merupakan sering dilakukan dalam diagnosa berbagai macam penyakit diantaranya Demam Berdarah Dengue (DBD), anemia, polisitemia dan diare berat (Sutedjo, 2009 dalam Permadi dkk., 2018).

#### **5. *Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)***

*Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)* merupakan indeks eritrosit. Nilainya dapat diperoleh dari perhitungan eritrosit, hemoglobin maupun hematokrit (Destanto, 2012 ; Wahdaniah, 2018).

##### **a. *Mean Corpuscular Volume (MCV)***

Untuk mengetahui ukuran eritrosit diperoleh dengan cara menghitung Volume eritrosit rata-rata (MCV). Nilai MCV diperoleh dengan membagi hematokrit dengan jumlah eritrosit. Volume eritrosit rata-rata (MCV) dipakai sebagai indikator anemia. Dinyatakan dalam mikrometer kubik, atau femtoliter ( $1 \times 10^{-15}$  L) dengan batas normal 81 sampai  $96 \mu\text{m}^3$ . Sel eritrosit dalam batas tersebut dinamakan

normositik, ukuran lebih kecil dari  $81 \mu\text{m}^3$ , jika ukuran lebih besar dari  $96 \mu\text{m}^3$  menunjukkan sel makrositik (D'Hiru, 2013).

b. *Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)*

Konsentrasi hemoglobin rata-rata (MCH) adalah mengukur banyaknya hemoglobin yang terdapat dalam satu eritrosit per milimeter kubik darah. MCH diperoleh dengan cara membagi jumlah hemoglobin dalam 1000 mL darah dengan jumlah sel darah merah per milimeter kubik darah. MCH dinyatakan dalam pikogram (pg) hemoglobin per sel eritrosit. Nilai normal 27 sampai 31 pg per sel darah (D'Hiru, 2013).

c. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)*

Konsentrasi hemoglobin eritrosit rata-rata (MCHC) dalam pemeriksaan dipakai sebagai indeks saturasi eritrosit dalam darah, yaitu dengan cara mengukur banyaknya hemoglobin dalam 100 eritrosit padat. MCHC didapat dengan membagi hemoglobin dengan hematokrit, dinyatakan dalam gram per 100mL atau gram per desiliter. Batas normal 30 sampai 36 g/100mL darah. Darah seperti ini dinamakan normokrom (D'Hiru, 2013).

Indeks eritrosit sangat berguna dalam menentukan kemungkinan penyebab anemia (Bain, 2010). Jumlah eritrosit, Hb, HCT, indeks eritrosit (MCV, MCH, MCHC) dan variasi morfologinya banyak digunakan untuk menegakkan banyak penyakit. Penentuan nilai ini penting dalam menetapkan kelainan anemia secara morfologis (Esa dkk., 2006). Anemia bukan suatu diagnosis melainkan manifestasi dari perubahan patofisiologis

yang diungkap dalam anamnesis dan pemeriksaan fisik yang teliti serta didukung oleh pemeriksaan laboratorium. Anemia diklasifikasikan menurut bentuk morfologi eritrosit dan indeks-indeksnya atau secara etiologi (D'Hiru, 2013).

Klasifikasi anemia menurut morfologinya, ada tiga :

- a. Anemia normositik normokrom, pada anemia jenis ini ukuran dan bentuk eritrosit normal, hemoglobin jumlah normal (MCV dan MCHC normal-rendah). Penyebabnya adalah kehilangan darah akut, hemolisis, penyakit kronis termasuk infeksi, gangguan kelenjar endokrin, gangguan ginjal, kegagalan fungsi sumsum tulang, dan penyakit-penyakit infiltratif metastatik pada sumsum tulang
- b. Anemia makrositik normokrom, makrositik berarti ukuran eritrosit lebih besar dari normalnya, normokrom karena konsentrasi hemoglobin normal (MCV meningkat; MCHC normal).
- c. Anemia mikrositik hipokrom, mikrositik berarti ukuran eritrosit lebih kecil dari normalnya, sedangkan hipokrom berarti mengandung hemoglobin dalam jumlah yang kurang dari normal (MCV kurang; MCHC kurang) (D'Hiru, 2013).

Klasifikasi anemia menurut etiologi, dua penyebab utamanya adalah:

- a. Peningkatan hilangnya sel-sel darah merah karena pendarahan atau penghancuran sel/hemolisis), pendarahan kronis pada kolon, penyakit-penyakit kanker, hemoroid dan *bleeding* (saat menstruasi).

- b. Gangguan pembentukan sel sehingga terjadi penurunan yaitu keadaan dimana eritrosit itu sendiri terganggu akibat faktor keturunan (D'Hiru, 2013).

## 6. Antikoagulan

### a. Pengertian

Menurut Maqbool (2014) hasil pemeriksaan hematologi pada sampel darah dapat ditentukan oleh antara lain: antikoagulan yang digunakan, metode analisis, suhu penyimpanan, dan selang waktu antara saat sampel diambil dan dianalisis. Antikoagulan adalah zat aditif yang menghambat darah dan/atau plasma dari pembekuan, bertujuan untuk memastikan bahwa konstituen yang akan diukur tidak berubah secara signifikan sebelum proses analisis. Antikoagulasi terjadi dengan mengikat ion kalsium atau dengan menghambat aktivitas trombin (WHO, 2002).

### b. Antikoagulan *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* (EDTA)

*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* disingkat EDTA, dan garam alkalinnya adalah asam poliprotik yang mengandung empat karboksilat gugus asam dan dua gugus amina dengan pasangan bebas elektron yang mengkelat kalsium dan beberapa logam lainnya, berupa serbuk putih tidak berbau, larutan jenuhnya dalam air (20 °C) 200 hingga 300 mg/L. Memiliki rumus molekul  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ . Bobot molekul 292,2. Larutan EDTA jenuh memiliki pH  $2,5 \pm 1,0$  (CLSI, 2003).

Antikoagulan EDTA (*food and pharmaceutical-grade compound*) mengandung tidak kurang dari 98% dan tidak lebih dari 100,5%. Nama lain EDTA adalah *Edetic Acid*, *Versenic Acid*, *Edetate Ethylene dinitrilo (Tetra Acetic Acid)* (Lanigan dan Torill, 2002).

Senyawa ini pertama kali diperkenalkan oleh Ferdinand Munz pada tahun 1935. Sejak tahun 1950 EDTA telah digunakan untuk mencegah pembekuan dalam spesimen darah. EDTA di sintesis dari *ethylenediamine (1,2 diaminoethane)*, formaldehida, dan natrium sianida. Jalur ini menghasilkan garam natrium, yang dapat diubah dalam langkah selanjutnya ke dalam bentuk asam (Mahmoud dan Enaam, 2017).

Antikoagulan EDTA memiliki keunggulan dibanding dengan antikoagulan yang lain, yaitu dapat mengawetkan komponen seluler darah, aktifitas kelasi yang terjadi dengan kalsium dan ion divalen lainnya yang bertindak sebagai kofaktor enzim (CLSI, 2003) serta dapat menghambat agregasi trombosit, sehingga ideal untuk kebanyakan pengujian hematologi, seperti penentuan kadar hemoglobin, penentuan hematokrit, hitung sel darah (leukosit, eritrosit, trombosit, retikulosit, eosinofil), penentuan KED (Kecepatan Enap Darah), pembuatan hapusan darah dan penentuan golongan darah (Riswanto, 2013).

Konsentrasi EDTA yang cukup harus ada untuk mencegah koagulasi, untuk EDTA anhidrat diperlukan sebanyak 1,2 sampai 2,0 mg/mL darah (WHO, 2002). Konsentrasi EDTA berlebih menyebabkan

hipertonisitas plasma yang tinggi. Hipertonisitas yang tinggi akan menyebabkan cairan yang terdapat dalam sel eritrosit akan keluar untuk mempertahankan tekanan osmotik. Akibat cairan yang keluar dari sel menyebabkan sel darah mengalami pengerutan (krenasi), dalam keadaan ini terjadi penyusutan sel, dan penyusutan sel menyebabkan perubahan morfologi eritrosit, pengurangan MCV, dan meningkatkan MCHC. Sebaliknya apabila volume darah berlebih dibandingkan dengan jumlah antikoagulan dalam tabung dapat menyebabkan darah mengalami koagulasi (membeku) karena faktor pembekuan darah tidak seluruhnya dihambat (Tyndall dan Sharon, 2004; Mahmoud dan Enaam, 2017; Riba dkk., 2020).

Antikoagulan EDTA yang direkomendasikan dalam pemeriksaan hematologi yaitu dalam bentuk garam natrium dan kalium. Garam EDTA paling umum digunakan dalam pemeriksaan hematologi yaitu  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{K}_2\text{EDTA}$  dan  $\text{K}_3\text{EDTA}$  (WHO, 2002).

c. Antikoagulan *Disodium Ethylenediamine tetraacetic acid* ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )

*Disodium Ethylene diamine tetra acetic acid* disingkat  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , adalah garam EDTA berupa serbuk kristal putih tidak berbau. Kelarutan Sekitar 100 g/L pada 20 °C. Memiliki rumus molekul  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Bobot molekul 372,2.  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dalam keadaan kering (*the cosmetic grade material*) mengandung lebih dari 100,5%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan 76% sampai 77,5% EDTA. Nama lain  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  yaitu *Disodium Edetate*, *Disodium EDTA*, *Sodium*

*Versenate, Acid Disodium Salt, Sequestrene* (Lanigan dan Torill, 2002). Disodium EDTA dalam larutan 1% (w/v) pH  $5,0 \pm 1,0$ . Kemampuan mengkelasi kalsium adalah : 1gr atau 2,6 mmol EDTA mmol EDTA (garam disodium) mengkelat 2,6 mmol atau 105 mg ion kalsium (CLSI, 2003).

*Vacutainer* komersial *direkomendasikan* sebagai pilihan utama. *Vacutainer* berisi antikoagulan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  belum tersedia di pasaran, oleh karena itu reagen buatan sendiri dipilih bila tidak tersedia reagen jadi/komersial (Kemenkes, 2013). Keuntungan reagen buatan sendiri:

- 1) Dapat dibuat segar sehingga penundaan dan kerusakan baik dalam transportasi maupun dalam penyimpanan dapat dihindari.
- 2) Penggunaan zat pengawet dapat dihindari.
- 3) Bila timbul masalah mengenai reagen dan standar, pemecahannya lebih mudah sebab proses pembuatannya diketahui.
- 4) Bila reagen terkontaminasi atau rusak tidak perlu menunggu pengiriman reagen berikutnya.
- 5) Merupakan penghematan.

Kerugian reagen buatan sendiri, antara lain:

- 1) Sulit distandardisasi.
- 2) Biasanya tidak melalui uji *Quality Control* (QC).
- 3) Tidak dapat ditentukan stabilitasnya (Kemenkes RI, 2013).

d. Antikoagulan *Dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid* ( $K_2EDTA$ )

*Dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid* disingkat  $K_2EDTA$ . adalah garam EDTA berupa serbuk kristal putih tidak berbau, kelarutan Sekitar 1650 g/L pada 22 °C. Memiliki rumus molekul  $K_2EDTA \cdot 2H_2O$ . Bobot Molekul 404,4. Dipotassium EDTA dalam larutan 1% (w/v) pH  $4,8 \pm 1,0$ . Kemampuan mengkelasi kalsium adalah : 1 gr atau 2,4 mmol EDTA (garam dipotasium) mengkelat 2,4 mmol atau 100 mg ion kalsium (CLSI, 2003). Antikoagulan  $K_2EDTA$  berbentuk semprot kering pada dinding tabung sehingga tidak akan mencairkan sampel. Antikoagulan  $K_2EDTA$  menjadi antikoagulan yang direkomendasikan CLSI dan ICSH untuk pemeriksaan hematologi karena kelarutannya yang baik dan hasil hematokrit yang stabil (Banfi dkk., 2007).

e. Antikoagulan *Tripotassium Ethylenediamine tetraacetic acid* ( $K_3EDTA$ )

*Tripotassium Ethylenediamine tetra acetic acid* disingkat  $K_3EDTA$  merupakan garam EDTA. Berupa cairan jernih tidak berbau. Memiliki rumus molekul  $K_3EDTA$ . Bobot Molekul 404,4. Tripotassium EDTA dalam larutan 1% (w/v) pH  $7,5 \pm 1,0$ . Kemampuan mengkelasi kalsium : 1 gr atau 2,4 mmol EDTA mmol EDTA (garam tripotassium) mengkelat 2,4 mmol atau 100 mg ion kalsium (CLSI, 2003).

Antikoagulan  $K_3EDTA$  biasanya digunakan dalam cairan, bentuk cairan lebih meningkatkan aktivitas antikoagulan akan tetapi

menyebabkan pengenceran darah 1 sampai 2%. Stabilitas  $K_3EDTA$  yang lebih baik dari garam EDTA yang lain karena menunjukkan pH yang mendekati pH darah (Wahdaniah, 2018).

Kalium EDTA tersedia di pasaran dalam bentuk *vacutainer* tutup ungu atau lavender. Tabung *vacutainer* merupakan tabung yang direkomendasikan oleh CLSI (2003) untuk pemeriksaan hematologi karena mempunyai ketepatan perbandingan antikoagulan dan darah yang lebih baik dibandingkan cara konvensional, namun demikian memerlukan biaya yang lebih mahal. Dari segi ekonomi harga EDTA *vacutainer* per spesimen 3 kali harga EDTA konvensional per spesimen. Pengambilan darah vena tidak perlu menggunakan *sputit*. Kondisi vakum mengontrol jumlah darah yang masuk ke dalam tabung sampai volume tertentu sehingga perbandingan antara takaran antikoagulan dengan volume darah dapat dipertanggungjawabkan.

f. Studi Literatur

Proses pra analitik pada pemeriksaan laboratorium meliputi : persiapan pasien, pemberian identitas spesimen, pengambilan spesimen, pengolahan spesimen, penyimpanan spesimen, pengiriman spesimen ke laboratorium. Penggunaan antikoagulan termasuk pada tahap pengambilan spesimen. Tahap pengambilan spesimen mencakup peralatan, wadah spesimen, antikoagulan dan pengawet, waktu, lokasi, volume, serta teknik pengambilan spesimen (Yaqin dan Dian, 2015).

Menurut Riswanto (2013) spesimen yang akan diperiksa di laboratorium haruslah memenuhi persyaratan jenis sesuai jenis pemeriksaan, volume mencukupi, kondisi : tidak lisis/tidak kadaluarsa, pemakaian antikoagulan atau pengawet yang tepat, ditampung dalam wadah yang memenuhi syarat, identitas benar sesuai data pasien (Riswanto, 2013).

Hemolisis didefinisikan sebagai pelepasan komponen intraseluler eritrosit dan sel darah lainnya ke dalam ruang ekstraseluler darah . Hemolisis dapat terjadi secara *in-vivo* dan *in-vitro*. Hemolisis disebabkan oleh mekanisme biokimia, imunologi, fisik dan kimiawi. Hemolisis fisik disebabkan oleh kerusakan eritrosit oleh hipotonisitas (misalnya pengenceran darah dengan larutan hipotonik), serta penurunan (vakum) atau peningkatan tekanan. Hemolisis dapat terlihat dengan warna merah serum atau plasma (WHO, 2002). Darah lisis akan menjadi pertikel kecil seukuran trombosit, sehingga menyebabkan hasil pemeriksaan diduga tidak sesuai dengan hasil yang sebenarnya (Faruq, 2018). Hasil laboratorium pada hemolisis akan didapatkan hemoglobin, hematokrit dan jumlah eritrosit yang lebih rendah dari yang sebenarnya. (Kiswari, 2014).

Gumpalan sangat kecil yaitu bekuan fibrin dalam sampel kemungkinan disebabkan oleh pencampuran darah utuh yang kurang baik dan / atau terlambat dan / atau lemah pada sampel darah EDTA. Pembekuan bisa juga terjadi karena EDTA tidak mencukupi, bisa

disebabkan karena pembuatan konsentrasi antikoagulan yang kurang tepat, atau mengisi tabung dengan jumlah berlebih dari takaran seharusnya, atau kelarutan EDTA yang buruk (biasanya  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) (Mahmoud dan Enaam, 2017). Darah yang mengalami pembekuan, bentuk/kondisinya sudah tidak seperti ketika beredar dalam aliran darah sehingga konsentrasi atau aktivitas analit yang diperiksa sudah tidak relevan secara diagnostik dalam cairan tubuh untuk memberikan informasi tentang situasi klinis dari seorang pasien (Riswanto, 2013).

Volume darah yang kurang saat pengambilan sampel darah dapat disebabkan karena sebelum diambil darahnya pasien sering merasa ketakutan (stres), hal ini dapat menyebabkan peningkatan sementara *white blood cell* (WBC), albumin, glukosa dan penurunan sementara *serum iron* (SI) serta abnormalitas hormon kortisol, aldosteron, renin, *thyroid stimulating hormon* (TSH), serta prolaktin. Stres juga dapat menyebabkan hiperventilasi yang membuat ketidakseimbangan asam basa dan peningkatan laktat (Tahono dkk., 2012).

Pemeriksaan hematologi menggunakan darah utuh (*whole blood*), yaitu darah yang diambil dari vena cubiti mediana dengan pemberian antikoagulan untuk menghindari adanya pembekuan (Kiswari, 2014). *Whoole blood* merupakan darah yang sama bentuk/kondisinya seperti ketika beredar dalam aliran darah. Tujuannya adalah untuk menentukan konsentrasi atau aktivitas analit yang relevan

secara diagnostik dalam cairan tubuh untuk memberikan informasi tentang situasi klinis dari seorang pasien. (WHO, 2002).

Salah satu variabel pengamatan dalam pemeriksaan hematologi berdasarkan rekomendasi *International Committee for Clinical Pathology Harmonization* adalah profil eritrosit. Profil eritrosit yang dimaksud meliputi: jumlah eritrosit, hemoglobin, hematokrit, perhitungan *mean corpuscular volume* (MCV), *mean corpuscular hemoglobin* (MCH), dan *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC) (Fitria dkk., 2016).

g. Hasil Penelitian yang Berhubungan

Penelitian Riba dkk. (2020) menyimpulkan bahwa untuk jumlah eritrosit tidak terjadi perbedaan yang signifikan, sedangkan hematokrit baik di pada tabung K<sub>2</sub>EDTA dan K<sub>3</sub>EDTA pada suhu ruang mengalami kenaikan signifikan mulai dari penyimpanan 4 jam. MCH pada tabung K<sub>2</sub>EDTA dan K<sub>3</sub>EDTA ada kenaikan pada penyimpanan 8 jam baik di suhu ruang maupun kulkas (2-8°C). Hemoglobin tidak terjadi perbedaan yang signifikan pada tabung K<sub>2</sub>EDTA dan K<sub>3</sub>EDTA di suhu ruang maupun kulkas (2-8°C). Adanya penurunan MCV pada tabung K<sub>2</sub>EDTA pada suhu kulkas (2-8°C) dengan lama penyimpanan selama 6 jam. MCHC pada kedua tabung K<sub>2</sub>EDTA dan K<sub>3</sub>EDTA di suhu ruang terjadi penurunan pada penyimpanan selama 4 jam, tapi pada tabung K<sub>2</sub>EDTA adanya peningkatan di suhu kulkas pada penyimpanan 4 jam.

Permadi dkk. (2018) dalam hasil penelitiannya menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara nilai hematokrit menggunakan  $K_2EDTA$  dan  $K_3EDTA$ . Hasil penelitian Ratnaningsih dkk. (2006) menyimpulkan bahwa ada perbedaan dalam profil hematologi dan morfologi eritrosit, yaitu terdapat penurunan yang signifikan dari jumlah eritrosit, hemoglobin, hematokrit dan MCHC serta peningkatan yang signifikan dari MCV jika konsentrasi  $Na_2EDTA$  dalam keadaan berlebihan.

Penelitian yang dilakukan oleh Wiwantikit (2011) menunjukkan bahwa  $K_2EDTA$  dapat mempengaruhi MCV. Hasil MCV yang lebih rendah diamati dengan antikoagulan  $K_3EDTA$  (biasanya perbedaan sebesar -0,1 hingga -1,3%). Berbeda dengan Wiwantikit, Wahdaniah (2018) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan pada nilai MCV, sampel darah- $K_2EDTA$  lebih rendah MCV nya dibanding darah- $K_3EDTA$  dan tidak ada perbedaan bermakna nilai MCH dan MCHC dengan antikoagulan  $K_2EDTA$  dan  $K_3EDTA$ .

Goossens dkk. (dalam Wiwantikit, 2011 ; Mosleh dkk., 2018) membandingkan efek yang berbeda konsentrasi antikoagulan  $K_2EDTA$  dan  $K_3EDTA$  mereka mengungkapkan bahwa hematokrit menurun dengan meningkatnya konsentrasi  $K_3EDTA$ , tetapi MCV tidak berpengaruh hingga sepuluh kali  $K_3EDTA$  dan MCV meningkat sedikit dengan  $K_2EDTA$  tinggi. Dilaporkan juga bahwa konsentrasi  $Na_2EDTA$  yang berlebihan menurunkan eritrosit, hemoglobin, hematokrit, dan

MCHC signifikan sedangkan MCV memiliki nilai yang signifikan meningkat. Selain itu diungkapkan juga perbedaan MCV antara K<sub>2</sub>EDTA dan K<sub>3</sub>EDTA itu lebih ditandai di bawah kondisi pH darah rendah. Oleh karena itu, dalam kasus sepsis atau infeksi parah dengan kecenderungan menurunnya pH darah, perbedaan yang signifikan antara MCV antara pengukuran menggunakan K<sub>2</sub>EDTA dan K<sub>3</sub>EDTA mungkin terjadi.

#### **7. Hematology Analyzer (HA) Beckman Coulter DxH 500**

*Hematology Analyzer* adalah perangkat yang digunakan untuk melakukan pengukuran komponen-komponen yang ada di dalam darah. Alat ini bekerja berdasarkan prinsip *flowcytometer*. Salah satu sistem penghitungan yang sering digunakan dalam pengujian hematologi adalah teknologi impedansi listrik. Darah terlebih dahulu diencerkan dan disuspensikan dalam cairan elektrolit (*diluent*). Saat sel melewati celah sempit (*aperture*) dimana pada kedua sisinya terdapat elektroda beraliran konstan, akan terjadi perubahan listrik diantara kedua elektroda. Frekuensi atau tahanan listrik yang terukur per satuan waktu adalah jumlah sel yang melalui celah, sedangkan besarnya tahanan listrik yang terjadi merupakan ukuran volume dari masing-masing sel yang melalui celah tersebut. Besarnya tahanan yang dihasilkan diolah sehingga didapat suatu ukuran untuk dapat memisahkan apakah tahanan tersebut dari suatu sel atau dari suatu debris (pecahan sel) yang kemudian komputer menganalisis sinyal

yang dihasilkan yang digambarkan sebagai grafik-grafik (PDS PatKLIn, 2017 ; Wahid dan Wahyu, 2015).

Eritrosit dihitung pada kamar yang sama dengan trombosit, dibedakan berdasarkan volumenya (PDS PatKLIn, 2017). Hemoglobin diukur secara optik didalam kamar *White Blood Cells* (WBC), dengan melisiskan *Red Blood Cells* (RBC) dengan *Sys LYSE* (bahan pelisis yang mengandung kalium sianida yang bereaksi dengan Hb membentuk *cyanmethemoglobin*). Intensitas warna diukur pada kuvet terpisah secara spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm, hasil pengukuran ditampilkan pada layar (Dameuli, 2018 ; Sukmana, 2018). Beberapa instrumen menggunakan prosedur modifikasi cyanmethemoglobin, dan lainnya menggunakan deteksi kolorimetri bebas cyanida.

Hematokrit merupakan tes yang mengukur volume eritrosit dalam persen. Hematokrit diukur secara langsung (prinsip *hydrodynamic focusing*). Alat otomatis menghitung hematokrit dengan mengalikan jumlah eritrosit dengan MCV (PDS PatKLIn, 2017), dengan mendeteksi tinggi pulsa eritrosit yang merupakan rasio sel darah merah terhadap volume total darah. Kadar hematokrit didapat dari perbandingan antara volume darah keseluruhan dinyatakan dalam % (Himawati, 2016 dalam Permadi dkk., 2018).

Alat *hematology analyzer* menghitung MCV berdasarkan tinggi impuls listrik yang dihasilkan oleh penghambatan berkas sinar atau arus listrik, impuls listrik yang sama digunakan baik untuk menghitung jumlah

sel maupun untuk mengukur besar sel. *Hematology analyzer* menghitung MCH dengan membagi hemoglobin dalam suatu volume darah tertentu dengan jumlah eritrosit dalam volume yang sama. Alat HA menghitung MCHC dengan membagi hemoglobin pada volume darah tertentu dengan proporsi sampel darah berisi eritrosit (Bain, 2010).

Akurasi dan presisi alat *hematology analyzer* harus diperhatikan agar dalam pengoperasiannya diperoleh hasil pengukuran yang dapat dipertanggungjawabkan. Kalibrasi dan kontrol berkala menggunakan suatu bahan yang menyerupai darah dengan nilai-nilai yang sudah diketahui. Kalibrasi dilakukan ketika alat baru pertama kali dioperasikan atau dalam kondisi tertentu. Semakin mendekati nilai target pengukuran, berarti akurasi alat semakin baik. Dalam melakukan kalibrasi secara berulang, semakin sempit rentang atau selisih pada tiap pengukuran, berarti presisi alat semakin baik (Mengko, 2013).

## 8. Nilai Rujukan Profil Eritrosit

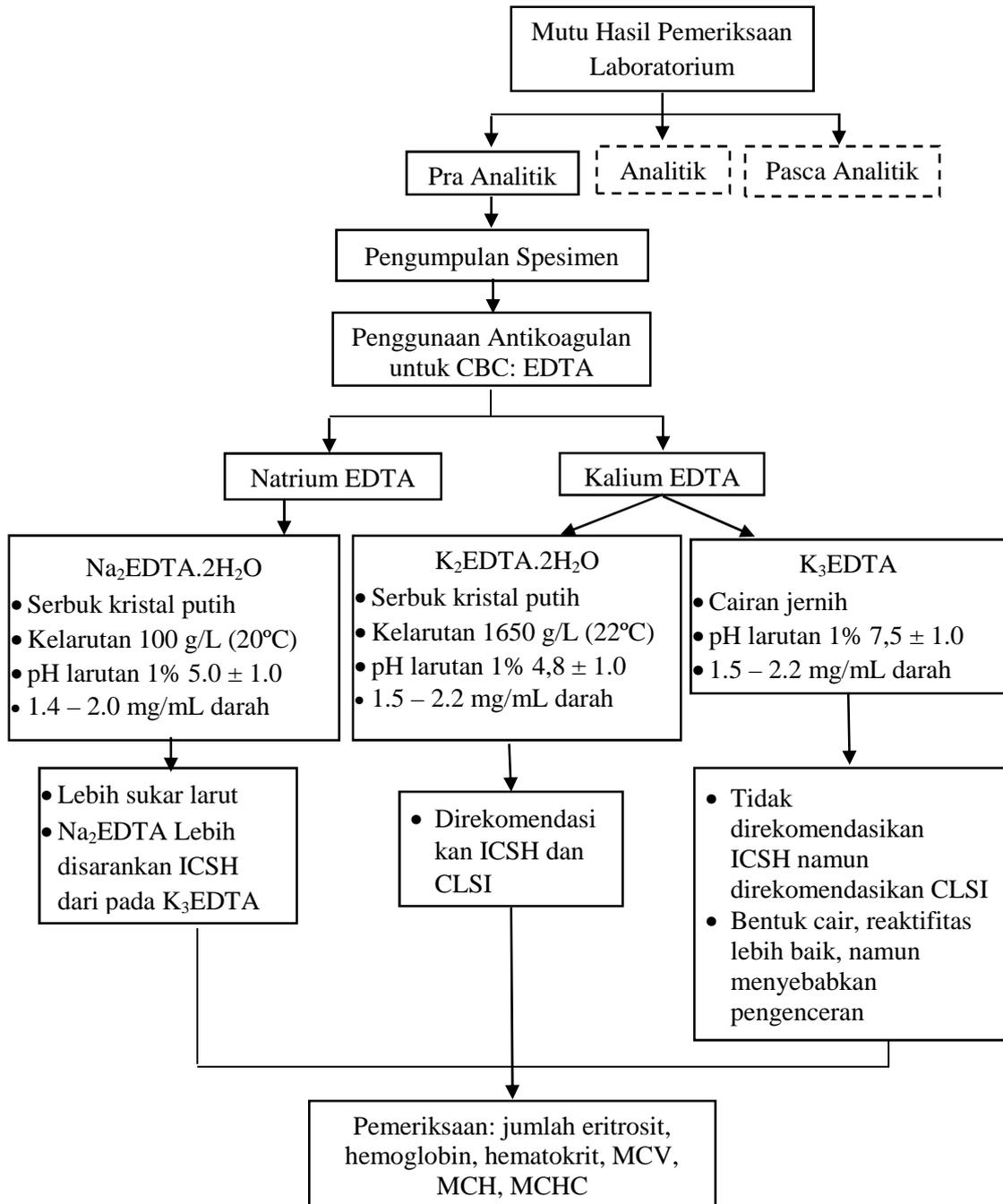
Berikut nilai rujukan darah pada alat Beckman Coulter DxH 500

Tabel 1. Nilai Rujukan Profil Eritrosit orang dewasa

No	Parameter	Nilai Rujukan
1.	Eritrosit	3,7–5,48 juta/ $\mu$ l
2.	Hemoglobin	10,6–15,40 g/dL
3.	Hematokrit	31,4–46,3%
4.	MCV	76,7–93,7 fL
5.	MCH	24,8–31,4 pg
6.	MCHC	31,0–35,6 g/dL

Sumber: Beckman Coulter DxH 500, 2021

## B. Kerangka Teori



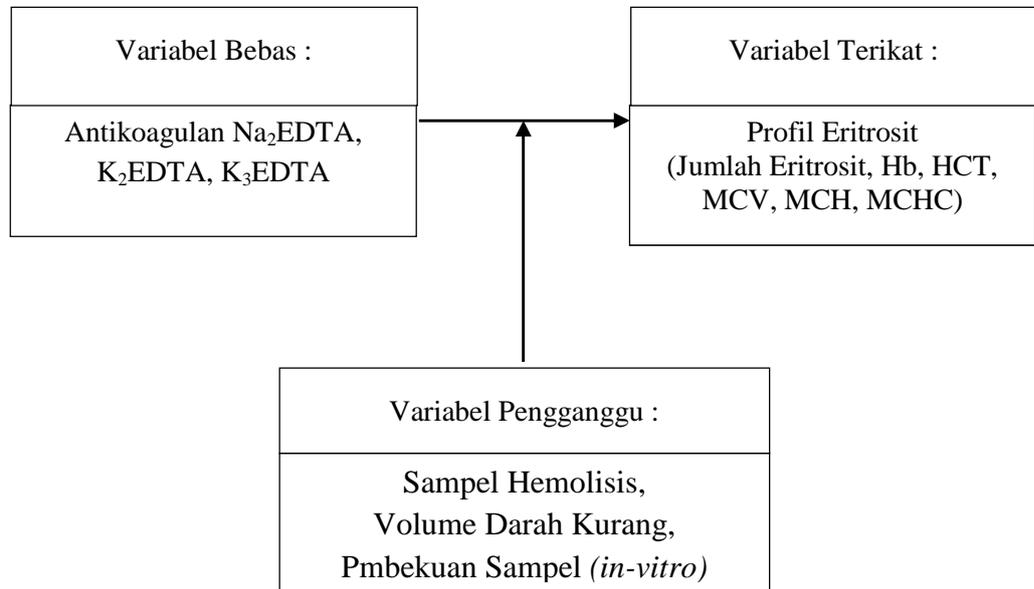
Gambar 4. Kerangka Teori

Keterangan :

- = diteliti  
 ----- = tidak diteliti

## C. Hipotesis dan Hubungan Antar Variabel

### 1. Hubungan antar variabel



Gambar 5. Kerangka Konsep

### 2. Hipotesis

Ada perbedaan penggunaan antikoagulan Na<sub>2</sub>EDTA, K<sub>2</sub>EDTA, dan K<sub>3</sub>EDTA terhadap profil eritrosit yang diperiksa secara *automatic* dengan *hematology analyzer*.