

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Spesimen darah

a. Pengertian darah

Darah adalah jaringan cair pada tubuh manusia yang terdiri atas dua bagian yaitu plasma darah (bagian cair darah) sebesar 55% dan korpuskuler / sel darah (bagian padat darah) sebesar 45%. Bagian padat darah berupa sel-sel darah yang terdiri dari sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) dan keping darah (trombosit). Volume total darah orang dewasa diperkirakan sekitar 5-6 liter atau 7% - 8% dari berat tubuh seseorang (Maharani dan Noviar, 2018).

Kebanyakan pemeriksaan hematologi menggunakan darah utuh (*whole blood*), yaitu darah yang sama bentuk/kondisinya seperti ketika beredar dalam aliran darah. Untuk keperluan ini, darah harus ditambah dengan antikoagulan, yaitu zat yang dapat menghambat pembekuan. Jenis antikoagulan yang digunakan disesuaikan dengan jenis pemeriksaan yang akan dilakukan. Spesimen harus dihomogenkan minimal 2 menit karena sel sel darah dapat mengendap jika spesimen didiamkan beberapa saat (Riswanto, 2013).

b. Sifat fisikokimia darah

Darah merupakan cairan tubuh yang kental dan berwarna merah. Kekentalan darah disebabkan oleh banyaknya senyawa dengan berbagai macam berat molekul (dari yang kecil sampai yang besar seperti protein) yang terlarut didalam darah (Sadikin, 2002). Warna darah (merah tua hingga merah muda) ditentukan oleh kadar oksigen dan kadar karbondioksida didalamnya (D'Hiru, 2013).

Massa jenis dan kekentalan (viskositas) darah lebih besar dari pada air. Masa jenis darah biasanya antara 1,054-1,060. Viskositas darah, atau tepatnya viskositas plasma, tergantung pada suhu cairan dan konsentrasi bahan yang terkandung didalamnya. Pada suhu 37°C, viskositas plasma 1,16-1,32 mPa/s (rata-rata 1,24). Sedangkan pada suhu 25°C sebesar 1,50-1,72 mPa/s (rata-rata 1,60) (Sadikin, 2002).

Adanya zat-zat terlarut juga memberikan tekanan osmotik pada darah yang cukup besar yaitu sekitar 7-8 atm pada suhu tubuh. Nilai ini sama dengan tekanan osmotik larutan NaCl 0,9 gr/dL, sehingga larutan ini isotonik dengan darah. Derajat keasaman atau pH darah berbeda dengan pH air yaitu 7,4 dan tidak mudah berubah (Sadikin, 2002).

c. Fungsi darah

Darah beredar dalam suatu sistem pembuluh dan membawa nutrisi, hasil sisa metabolisme, hormon, protein, ion oksigen, karbondioksida dan unsur lain yang terbentuk. Darah juga mengatur suhu tubuh dan membantu dalam pengaturan osmotik dan

keseimbangan asam basa (Gartner, dkk., 2011). Secara garis besar, tiga fungsi utama darah adalah sebagai berikut (Maharani dan Noviar, 2018):

- 1) Sebagai transportasi substansi berikut :
 - a) Transportasi O₂ dan CO₂ dengan jalur melalui paru-paru dan seluruh tubuh
 - b) Transportasi nutrisi hasil pencernaan ke seluruh tubuh
 - c) Transportasi hasil pembuangan tubuh untuk didetoksifikasi atau dibuang oleh hati dan ginjal
 - d) Transportasi hormon dari kelenjar menuju target sel
 - e) Membantu mengatur suhu tubuh
- 2) Sebagai proteksi, darah banyak berperan dalam proses inflamasi :
 - a) Leukosit berfungsi menghancurkan mikroorganisme patogen dan sel kanker
 - b) Antibodi dan protein lainnya menghancurkan / mengeliminasi substansi patogen
 - c) Trombosit menginisiasi faktor pembekuan darah untuk meminimalisir kehilangan darah.
- 3) Sebagai regulator, darah berperan dalam meregulasi (mengatur) :
 - a) pH oleh interaksi asam dan basa
 - b) Keseimbangan air dalam tubuh menjaga pertukaran air dari luar jaringan atau sebaliknya

2. Trombosit

a. Pengertian trombosit

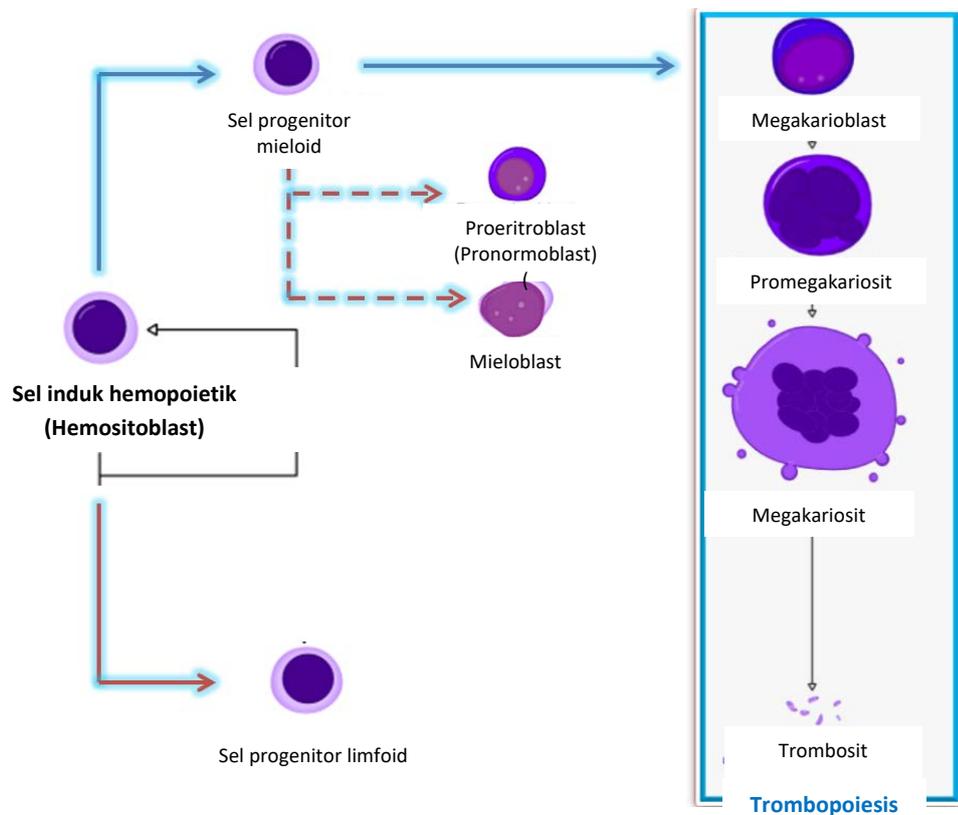
Trombosit adalah salah satu sel darah yang fungsinya untuk proses pembekuan darah. Nama lain dari trombosit adalah platelet. Jumlah trombosit normal dalam tubuh orang dewasa normal adalah 150.000 – 400.000 trombosit per mikro-liter darah. Masa hidup trombosit hanya berlangsung sekitar 5 – 9 hari di dalam darah. Trombosit yang tua dan rusak akan dikeluarkan dari aliran darah oleh organ limpa, kemudian digantikan oleh trombosit baru (Durachim dan Astuti, 2018).

Trombosit berasal dari fragmentasi sitoplasma megakariosit. Megakariosit merupakan suatu sel muda besar yang berada dalam sumsum tulang. Megakariosit matang menyebabkan banyak invaginasi dari membran plasma yang membelah-belah seluruh sitoplasma, membentuk membran dermakasi yang memberi sekat pada tiap tempat. Sistem ini membatasi daerah sitoplasma megakariosit dan beberapa bagian dari sitoplasma yang bergranula itu kemudian melepaskan diri dan membentuk trombosit (Durachim dan Astuti, 2018). Setiap megakariosit mampu menghasilkan 3000-4000 trombosit, waktu dari diferensiasi *stem cell* sampai dihasilkan trombosit memerlukan waktu sekitar 10 hari (Kiswari, 2014).

b. Proses pembentukan trombosit

Trombopoiesis merupakan proses pembentukan trombosit yang berlangsung di sumsum tulang. Proses ini dipengaruhi oleh hormon trombopoietin. Hormon trombopoietin mempengaruhi sel mieloid untuk berkembang menjadi *Colony Forming Unit-Megakaryocyte* (CFU-MK) yang kemudian akan berkembang lebih lanjut menjadi sel-sel prekursor trombopoiesis yaitu megakarioblast. Selanjutnya, megakarioblast berkembang lagi menjadi megakariosit, suatu sel besar yang tersusun atas 2000 – 3000 fragmen. Tiap fragmen akan ditutupi oleh membran plasma dan membentuk trombosit atau platelet. Trombosit yang lepas dari megakariosit di sumsum tulang selanjutnya masuk ke dalam sirkulasi darah (Tortora dan Derrickson, 2014).

Rata-rata produksi trombosit orang dewasa adalah 10^{11} trombosit/hari dan produksi dapat meningkat hingga 20 kali lipat pada saat kebutuhan trombosit meningkat (Tortora dan Derrickson, 2014). Jika kebutuhan trombosit meningkat, seperti terjadi proses perdarahan, maka ginjal akan memproduksi hormone trombopoietin lebih banyak.. Produksi trombopoietin biasanya ditemukan pada penderita dengan jumlah trombosit yang kurang dari normal atau dikenal dengan istilah trombositopenia (Durachim dan Astuti, 2018).



Gambar 1. Proses Pembentukan Trombosit
Sumber : Tortora dan Derrickson, 2014.

c. Morfologi trombosit

Trombosit adalah sel darah yang tidak berinti, berbentuk cakram dengan diameter 1-4 mikrometer dan memiliki volume 7-8 fl (Kiswari, 2014). Bentuk trombosit bulat atau kadang-kadang oval tergantung kondisi pada saat melakukan fungsinya (Durachim dan Astuti, 2018). Gambaran mikroskopik trombosit dengan pewarnaan Wright-Giemsa tampak sebagai sel kecil, tidak berinti, bulat dengan sitoplasma berwarna biru-keabu-abuan pucat yang berisi granula merah-ungu yang tersebar merata (Riswanto, 2013).

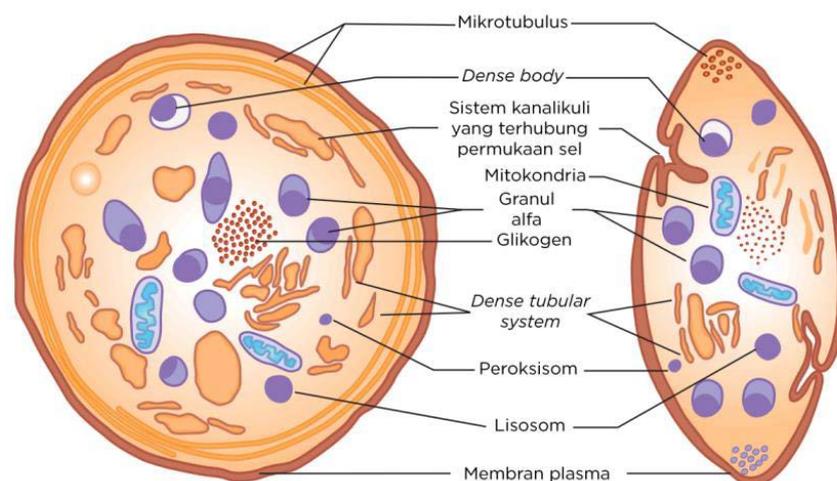
Trombosit memiliki sistem membran tiga lapis (trilaminar) dan

sistem membran yang memiliki ruang (kanalikuli) (Durachim dan Astuti, 2018). Permukaan luar trombosit kaya akan glikoprotein. Glikoprotein berfungsi sebagai reseptor berbagai ligan penempelan pada permukaan trombosit. Glikoprotein yang paling banyak jumlahnya adalah kompleks GPIIb-IIIa, yang ketika teraktivasi berfungsi sebagai reseptor fibrinogen. Glikoprotein GPIb α berfungsi sebagai reseptor vWF (Miller dan Rao, 2016). Pada bagian tengah terdapat membran trombosit yang kaya akan fosfolipid berupa fosfatidylinositol, fosfatidylcholine, fosfatidylserine (PS), dan fosfatidylethanolamine yang akan membantu dalam proses pembekuan darah (Durachim dan Astuti, 2018).

Pada bagian dalam atau sub membran trombosit terdapat komponen mikrofilamen yang disebut trombastin. Komponen ini memiliki fungsi seperti aktomiosin yang berperan dalam kontraksi otot (Durachim dan Astuti, 2018). Tepat di bawah membran trombosit, terdapat mikrotubulus yang berfungsi memberikan dukungan struktural. Selain itu, juga terdapat mikrofilamen kontraktile dan sistem tubular yang berfungsi sebagai tempat metabolisme asam arakidonat (Miller dan Rao, 2016).

Di dalam sitoplasma trombosit terdapat berbagai organel sel dan struktur penting lainnya, antara lain adalah mitokondria, glikogen, lisosom, peroksisom dan berbagai granula (granula α yang berwarna lebih muda dan granula "bull's-eye" yang padat). Protein granula α berasal dari

uptake secara endositosis maupun sintesis de novo oleh megakariosit. Isi dari granul ini antara lain fibrinogen, platelet-derived growth factor (PDGF), von Willebrand factor (vWF), protein multimerin, β -trombhoglobin (β TG), dan heparin neutralizing platelet factor (PF)⁴. Sedangkan isi dari granul padat berupa adenosine diphosphate (ADP) dan adenosine triphosphate (ATP), 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin), kalsium, dan inorganic polyphosphate (polyP) (Miller dan Rao, 2016).



Gambar 2. Komponen Trombosit
Sumber : Smyth, 2013.

d. Fungsi trombosit

Fungsi utama trombosit adalah membentuk sumbat mekanik dalam respon hemostasis normal terhadap cedera vaskular. Sumbat ini berfungsi untuk menghentikan kebocoran darah yang terjadi melalui pembuluh darah yang mengalami cedera (Tortora dan Derrickson, 2014). Selama proses ini, trombosit akan mengalami adhesi (perlekatan

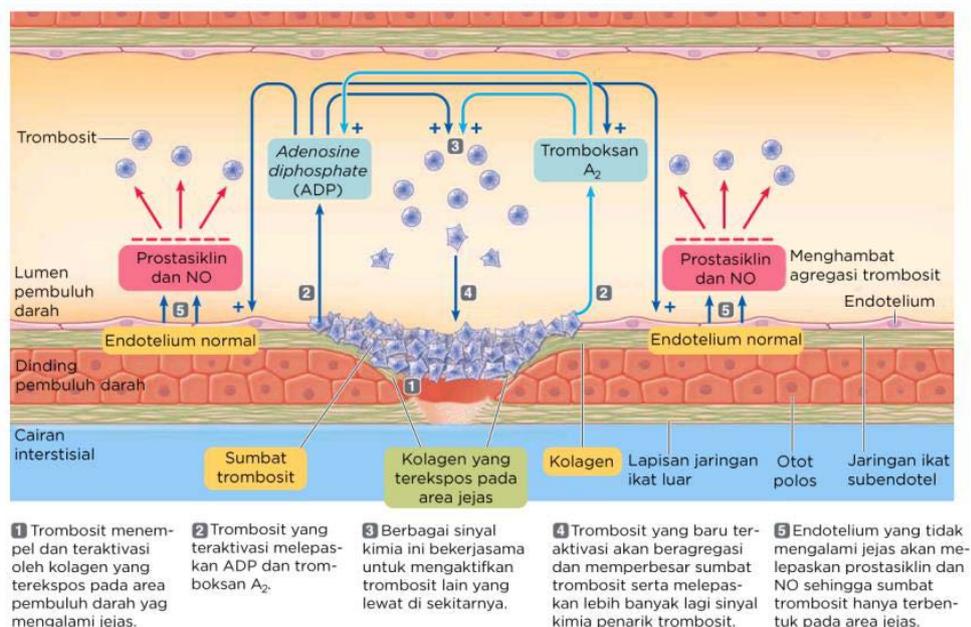
trombosit pada jaringan sub-endotel pada pembuluh darah yang luka), pelepasan isi vesikel, dan agregasi (perlekatan antar sel trombosit) hingga terbentuk sumbat primer (Riswanto, 2013).

Hemostasis adalah penghentian pendarahan dari pembuluh darah yang rusak. Hemostasis terdiri dari 3 langkah utama, yaitu spasme vaskular (konstriksi), pembentukan sumbat trombosit, dan koagulasi darah. Pembuluh darah yang mengalami kerusakan akan segera mengalami konstriksi atau spasme vaskular untuk mengurangi aliran darah. Selanjutnya, trombosit disekitar tempat kerusakan akan terpajan oleh kolagen dan mengalami penempelan serta aktivasi. Trombosit yang telah teraktivasi akan membentuk tonjolan-tonjolan sehingga bisa menempel pada kolagen atau biasa disebut dengan fungsi adhesi (Sherwood, 2014).

Trombosit yang menempel akan menjadi trombosit yang aktif dan berubah bentuk serta mengeluarkan isi-isi granula yang ada (*release reaction*) (Durachim dan Astuti, 2018). Trombosit melepaskan ADP yang akan mengaktivasi trombosit lain dan membuat permukannya lengket sehingga dapat menempel pada agregat trombosit yang sebelumnya telah terbentuk atau biasa disebut dengan istilah agregasi. Trombosit juga akan melepaskan mediator lain berupa thromboksan A₂ yang berfungsi dalam meningkatkan agregasi trombosit dan meningkatkan pelepasan ADP. Proses ini terus berlangsung hingga membentuk sumbat mekanik yang menghentikan pendarahan

(Sherwood, 2014). Melalui proses hemostasis dan dengan bantuan faktor pembekuan, maka luka akan diikat kuat dengan benang benang fibrin sehingga bekuan menjadi padat membentuk *hemostatic plug* (Durachim dan Astuti, 2018).

Pada saat kita mengalami luka, permukaan luka tersebut akan menjadi kasar. Jika trombosit menyentuh permukaan luka tersebut, maka trombosit akan pecah. Pecahnya trombosit ini akan menyebabkan keluarnya enzim trombokinase yang terkandung didalamnya. Enzim trombokinase dengan bantuan kalsium (Ca) dan vitamin K yang terdapat dalam tubuh, akan mengubah protrombin menjadi trombin. Selanjutnya trombin merangsang fibrinogen untuk membuat fibrin segera membentuk anyaman untuk menutup luka sehingga darah tidak keluar lagi (Maharani dan Noviar, 2018).



Gambar 3. Pembentukan Sumbat Trombosit
Sumber: Sherwood, 2014.

e. Kelainan trombosit

Kelainan trombosit meliputi kuantitas dan kualitas trombosit. Jumlah trombosit mungkin berkurang/menurun (trombositopenia) atau bertambah/meningkat (trombositosis atau trombositemia) karena berbagai sebab (Riswanto, 2013).

- 1) Trombositopenia adalah berkurangnya jumlah trombosit dibawah normal yaitu kurang dari $150 \times 10^9/L$ (Kiswari, 2014). Penyebab utama trombositopenia dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu kegagalan sumsum tulang untuk menghasilkan trombosit dalam jumlah yang memadai dan peningkatan destruksi perifer atau sekuestrasi trombosit (Riswanto, 2013).
- 2) Trombositosis adalah meningkatnya jumlah trombosit diatas normal pada peredaran darah yaitu lebih dari $400 \times 10^9/L$ (Kiswari, 2014). Peningkatan jumlah trombosit sering terjadi pada pasien rawat inap dengan gangguan peradangan, infeksi, keganasan dan setelah perdarahan akut. Trombosit mungkin meningkat sebagai bagian dari respon fase akut peradangan atau infeksi (Riswanto, 2013).
- 3) Trombositemia adalah peningkatan jumlah trombosit oleh proses yang ganas dan jumlah trombosit dapat melebihi $1000 \times 10^9/L$, misalnya pada leukemia mielositik kronis (Kiswari, 2014).
- 4) Trombositopati adalah keadaan yang menggambarkan kelainan trombosit terutama yang melibatkan “platelet faktor 3” dan selanjutnya pembentukan tromboplastin plasma. Hal ini dapat

disebabkan oleh kelainan bawaan atau kelainan didapat (Kiswari, 2014).

- f. Faktor yang mempengaruhi hasil pemeriksaan jumlah trombosit
- 1) Perbandingan volume darah dengan antikoagulan yang tidak sesuai dapat menyebabkan kesalahan pada hasil. Konsentrasi masing-masing antikoagulan yang tepat adalah Na_2EDTA 1.4-2.0 mg/ml darah, K_2EDTA 1.5-2.2 mg/ml darah dan K_3EDTA 1.5-2.2 mg/ml darah (CLSI, 2003).
 - a) Volume darah yang kurang dapat menyebabkan sel-sel eritrosit mengalami krenasi, sedangkan trombosit membesar dan mengalami disintegrasi sehingga jumlah trombosit akan menurun (Child, 2010).
 - b) Volume darah yang berlebihan dapat menyebabkan terbentuknya jendalan yang berakibat menurunnya jumlah trombosit (Child, 2010).
 - 2) Penundaan pemeriksaan hitung jumlah trombosit lebih dari 1 jam dapat menyebabkan penurunan jumlah trombosit. Hal ini disebabkan oleh trombosit yang mudah pecah, proses agregrasi dan adhesi trombosit menyebabkan trombosit saling melekat sehingga terbaca oleh alat sebagai sel lain atau kotoran (Gandasoebrata, 2010).
 - 3) Pengambilan sampel darah yang terlalu lama, pencampuran darah dengan antikoagulan yang tidak segera dilakukan dan pengocokan yang berlebihan dapat menyebabkan perlekatan trombosit

(agregasi) sehingga dihasilkan jumlah trombosit yang rendah palsu (Riswanto, 2013).

- 4) Adanya *non platelet particles* seperti debu, pecahan eritrosit dan pecahan leukosit dapat dihitung sebagai trombosit, sehingga hasilnya menjadi tinggi palsu (Kiswari, 2014).
- 5) Sumber-sumber kesalahan pada pengambilan spesimen darah :
 - a) Pemasangan *tourniquet* terlalu lama
 - b) Pengambilan darah terlalu lama (tidak sekali tusuk kena) dapat menyebabkan trombosit menurun
 - c) Pengambilan darah pada jalur infus dapat menyebabkan eritrosit, leukosit dan trombosit menurun
 - d) Homogenisasi darah dengan antikoagulan yang tidak sempurna atau keterlambatan homogenisasi menyebabkan terbentuknya bekuan darah (Riswanto, 2010).

3. Antikoagulan

a. Pengertian antikoagulan

Antikoagulan adalah senyawa yang dapat menghambat penggumpalan darah. Senyawa-senyawa ini bekerja pada tahap 1 atau tahap 2 dari proses penggumpalan darah. Cara kerja antikoagulan ada tiga cara yaitu mengganggu pematangan protein faktor penggumpalan seperti trombin, faktor V dan faktor VII, bekerja dengan cara mengikat Ca^{2+} dan bekerja dengan mengaktifkan antitrombin (Sadikin, 2002).

Senyawa yang bekerja menghambat penggumpalan darah

dengan cara mengganggu pematangan protein faktor penggumpalan darah adalah antagonis vitamin K seperti dikumoral. Jika vitamin K tidak tersedia, maka asam glutamat didalam ketiga faktor penggumpalan darah tersebut tidak dapat diubah menjadi asam γ -karboksiglutamat. Trombin, faktor V dan faktor VII yang dihasilkan tidak matang sehingga tidak dapat berfungsi sebagaimana mestinya (Sadikin, 2002).

Ion Ca^{2+} sangat penting dalam proses penggumpalan darah. Bila ion ini diikat sehingga tidak lagi bermuatan maka penggumpalan darah akan terhenti. Senyawa yang mampu mengikat Ca^{2+} sehingga tidak lagi terionisasi adalah ion fluorida, oksalat dan sitrat. Selain itu, ada pula senyawa yang bersifat sebagai penchel kation bivalen (chelating agent) yaitu EDTA (Sadikin, 2002).

Antikoagulan yang bekerja dengan cara mengaktifkan antitrombin adalah heparin. Pengaktifan antitrombin ini akan menghambat kerja trombin yang sudah aktif dalam mengkatalisis proses penggumpalan darah (Sadikin, 2002).

Antikoagulan digunakan untuk menghambat penggumpalan darah baik secara *in vivo* (pada makhluk hidup) maupun secara *in vitro* (didalam tabung reaksi atau diluar tubuh). Penggunaan antikoagulan secara *in vivo* dimaksudkan untuk tujuan pengobatan, yaitu mencegah terjadinya trombosis pada keadaan tertentu. Penggunaan antikoagulan secara *in vitro* dimaksudkan untuk memperoleh plasma untuk tujuan

analisis komponen tertentu dalam darah dan transfusi (Sadikin, 2002).

b. Macam-macam antikoagulan

1) *Ethylene Diamine Tetra-Acetat* (EDTA)

Antikoagulan EDTA umumnya tersedia dalam bentuk garam sodium (natrium) atau potassium (kalium). Garam EDTA mencegah koagulasi dengan cara mengikat atau mengkhelasi kalsium dan ion divalen lainnya yang dapat bertindak sebagai kofaktor enzim. Oleh karena itu, garam EDTA tidak cocok untuk kalsium, magnesium, besi, alkali fosfatase, kreatinin kinase, dan leusin aminopeptidase, atau enzim apapun yang bergantung pada ion logam (CLSI, 2003).

Garam EDTA biasanya digunakan untuk antikoagulan spesimen darah. Garam ini dapat mengawetkan komponen seluler darah sehingga diperlukan di laboratorium hematologi. EDTA memiliki keunggulan dibanding dengan antikoagulan yang lain, yaitu tidak mempengaruhi sel sel darah sehingga ideal untuk kebanyakan pengujian hematologi seperti penentuan kadar hemoglobin, hematokrit, hitung sel darah (leukosit, trombosit, eritrosit, retikulosit, eosinofil), penentuan LED, pembuatan apusan darah dan penentuan golongan darah (Riswanto, 2013).

EDTA dan garam alkalinnnya adalah salah satu kelas asam aminopolikarboksilat, yang bertindak sebagai agen sekuester (agen pengkelat). EDTA membentuk kompleks larut dengan ion logam dan menghilangkan ion ini dari reaksi lebih lanjut. EDTA merupakan

senyawa bermuatan negatif. EDTA dan berbagai garamnya secara efektif mengikat kalsium dalam darah yang diperlukan dalam proses koagulasi. Pengikatan kalsium atau pemindahan dari tempat reaksi tersebut menghambat faktor intrinsik dan ekstrinsik yang dapat menyebabkan pembekuan darah. Selain itu, EDTA juga menghambat konversi protrombin menjadi trombin dan aksi trombin pada fibrinogen untuk membentuk fibrin (CLSI, 2003).

2) Heparin

Heparin adalah asam mukopolisakarida yang normal terdapat dalam tubuh. Heparin bekerja dengan cara menghambat pembentukan trombin dari protrombin sehingga menghentikan pembentukan fibrin dari fibrinogen. Heparin dapat digunakan pada pengujian resistensi eritrosit / *osmotic fragility test* (OFT) dan hematokrit karena zat ini tidak mempunyai pengaruh osmotis terhadap sel sel darah. Darah heparin tidak baik digunakan untuk pemeriksaan hapusan darah karena dapat mengganggu proses pewarnaan, yaitu menyebabkan latar belakang biru kehitam-hitaman pada preparat (Riswanto, 2013).

Ada tiga macam heparin yaitu ammonium heparin, lithium heparin dan sodium heparin. Konsentrasi dalam penggunaan heparin adalah 0,1 mL larutan atau 1 mg (dalam bentuk kering) untuk setiap 1 mL darah. Heparin sedikit toksik dan harganya relatif mahal (Kiswari, 2014). Secara komersial tabung heparin dapat

dijumpai dalam bentuk tabung hampa udara (vakum) dengan tutup berwarna hijau (Riswanto, 2013).

3) Natrium sitrat

Natrium sitrat digunakan dalam bentuk larutan pada konsentrasi 3,2%. Antikoagulan ini dapat menyebabkan pengenceran darah karena pemakaian yang cukup besar sehingga tidak digunakan untuk pemeriksaan hitung sel. Natrium sitrat direkomendasikan oleh *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) dan *International Society for Thrombosis and Haematology* sebagai antikoagulan untuk tes koagulasi. Cara kerja antikoagulan ini adalah dengan mengendapkan ion kalsium, sehingga menjadi bentuk yang tidak aktif (Kiswari, 2014).

Natrium sitrat 3,2% dapat digunakan untuk pemeriksaan sistem pembekuan darah (1 bagian natrium sitrat + 9 bagian darah), pemeriksaan LED (1 bagian natrium sitrat + 4 bagian darah), penentuan golongan darah dan transfusi darah. Tabung sitrat dapat dijumpai dalam bentuk tabung hampa udara (vakum) dengan tutup berwarna biru terang (Riswanto, 2013).

4) Oksalat

Oksalat mencegah koagulasi dengan cara mengendapkan kalsium dalam darah. Kelebihan oksalat dapat menyebabkan hemolisis dan pelepasan hemoglobin kedalam plasma. Antikoagulan ini paling banyak digunakan dalam bentuk kalium

oksalat (Kiswari, 2014). Kalium oksalat ($K_2C_2O_4$) digunakan bersama-sama dengan natrium fluoride (NaF) untuk penentuan kadar glukosa darah, dimana fungsinya sebagai antiglikolisis yang mencegah metabolisme glukosa oleh sel. Secara komersial tabung oksalat dapat dijumpai dalam bentuk tabung hampa udara (vakum) dengan tutup berwarna abu-abu (Riswanto, 2013).

c. Tinjauan tentang antikoagulan Na_2EDTA , K_2EDTA dan K_3EDTA

EDTA tersedia sebagai asam bebas, garam disodium (Na_2EDTA), dipotasium (K_2EDTA) dan tripotasium (K_3EDTA). EDTA dalam bentuk asam bebas tidak digunakan karena kurangnya kelarutan asam bebas dalam media berair. Garam lebih disukai untuk digunakan karena memiliki kelarutan tinggi. EDTA dalam bentuk asam bebas hanya dijelaskan untuk tujuan referensi teknis dan digunakan untuk membuat garam EDTA (CLSI, 2003).

Dari ketiga jenis garam EDTA yang digunakan, garam kalium adalah yang paling mudah larut (ICSH, 1993). Kelarutan Na_2EDTA sekitar 100 g/L pada 20 °C, sedangkan kelarutan K_2EDTA dan K_3EDTA sekitar 1650 g/L pada 22 °C (CLSI, 2003).

Tingkat reaktivitas EDTA dalam darah dapat bervariasi tergantung pada jenis garam dan penyimpanannya. Reaktivitas ini tergantung pada penggunaan dalam bentuk liofilisat, kering atau larutan. Terlepas dari bentuk atau jenis garam EDTA yang digunakan, semua tabung harus dihomogenkan (8-10 kali) untuk memastikan

pencampuran yang menyeluruh (CLSI, 2003). K_2EDTA dan Na_2EDTA biasanya digunakan dalam bentuk kering, sedangkan K_3EDTA biasanya digunakan dalam bentuk cair (Riswanto, 2013).

K_3EDTA dalam bentuk cair menyebabkan sedikit pengenceran pada spesimen. Garam ini juga mempengaruhi ukuran sel darah merah pada konsentrasi yang berlebih dan pada penyimpanan yang terlalu lama dari pada K_2EDTA . Oleh karena itu, pada tahun 1993, *International Council for Standardization in Haematology* merekomendasikan K_2EDTA digunakan sebagai antikoagulan pilihan dalam pengambilan spesimen untuk menghitung jumlah dan ukuran sel darah (ICSH, 1993). Selain itu, CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) juga menganjurkan penggunaan K_2EDTA sebagai antikoagulan untuk pemeriksaan hematologi terutama hitung sel darah (Riswanto, 2013).

Penggunaan antikoagulan Na_2EDTA dan K_3EDTA yang kurang dapat menyebabkan hitung jumlah trombosit menurun karena terjadi mikrotrombi didalam penampung yang dapat menyumbat alat. Sedangkan penggunaan yang berlebihan dapat menyebabkan sel membengkak kemudian mengalami disintegrasi, membentuk fragmen dalam ukuran yang sama dengan trombosit sehingga terhitung oleh alat penghitung elektronik. Hal ini mengakibatkan peningkatan palsu hitung jumlah trombosit. Bila disintegrasi membentuk fragmen dalam ukuran yang berbeda dengan ukuran trombosit akan menyebabkan penurunan

palsu hitung jumlah trombosit (Nurrachmat, 2005).

Antikoagulan Na₂EDTA dan K₂EDTA mempunyai pH yang lebih asam dari pada K₃EDTA. Na₂EDTA dalam 1% larutan mempunyai pH sekitar 5.0 ± 1.0 , sedangkan K₂EDTA dalam 1% larutan mempunyai pH sekitar 4.8 ± 1.0 (CLSI, 2003). Darah dengan antikoagulan K₃EDTA menunjukkan stabilitas yang lebih baik daripada garam EDTA yang lain karena mempunyai pH mendekati pH darah yaitu sekitar $7,5 \pm 1.0$ (Wirawan, 2011).

Konsentrasi masing-masing antikoagulan yang digunakan adalah Na₂EDTA 1.4-2.0 mg/ml darah, K₂EDTA 1.5-2.2 mg/ml darah dan K₃EDTA 1.5-2.2 mg/ml darah (CLSI, 2003). Pemakaian dalam bentuk cair dapat dilakukan dengan membuat larutan 10% (EDTA 10 gr/100 mL = 10.000 mg/100 mL), dimana 0,01 mL EDTA 10% digunakan untuk mencegah pembekuan 1 mL darah. Perbandingannya harus tepat karena jika jumlah EDTA kurang, darah dapat mengalami pembekuan. Sebaliknya, jika EDTA berlebihan, eritrosit mengalami krenasi, trombosit membesar dan mengalami disintegrasi (Riswanto, 2013).

4. Hematology Analyzer

a. 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 peng analisis hematologi multi parameter untuk pemeriksaan kuantitatif yang meliputi WBC (White Blood Cell atau leukosit), limfosit, monosit, neutrofil, eosinofil, basofil, persentase limfosit, persentase monosit, persentase neutrofil, persentase eosinofil, persentase basofil, RBC (Red Blood Cell), 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 180µL (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 melisis 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).

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 (14°F sampai 122°F). *Hematology Analyzer DxH 500 Beckman Coulter* menggunakan metode impedansi untuk pemeriksaan jumlah trombosit (Beckman Coulter, 2018).

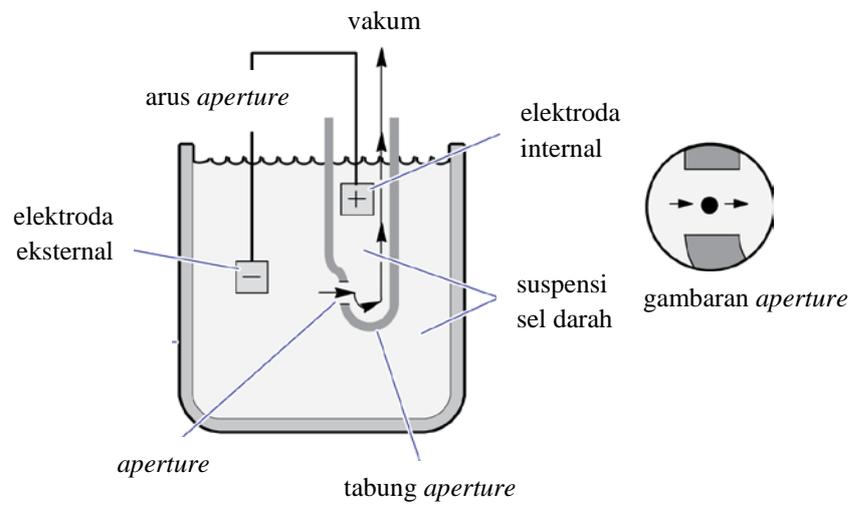
b. Metode impedansi

Metode impedansi merupakan salah satu metode yang digunakan dalam menghitung jumlah dan mengukur sel darah. Prinsip impedansi adalah mendeteksi dan mengukur perubahan dalam hambatan listrik ketika partikel (seperti sel darah) dalam cairan konduktif melewati partikel kecil *aperture* (Beckman Coulter, 2018).

Sebelum pemeriksaan dilakukan, sampel diencerkan dengan

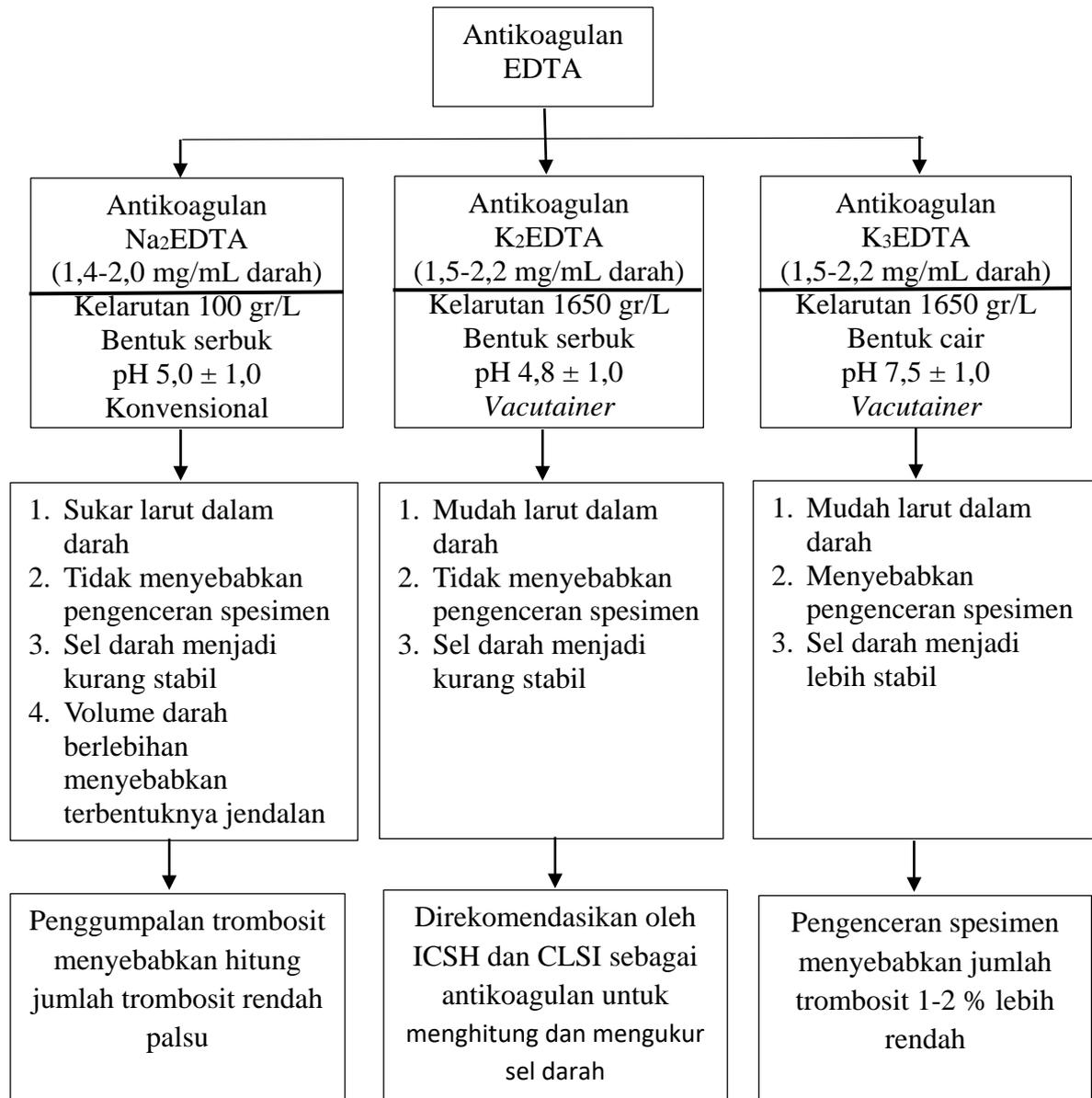
menggunakan larutan yang mempunyai konduktivitas tertentu dan merupakan konduktor listrik yang kurang baik, kemudian sel darah dialirkan melalui partikel kecil *aperture*. Pada saat yang sama, suatu arus listrik dialirkan melalui elektroda internal dan elektroda eksternal yang dipasang pada sisi dalam dan sisi luar *aperture* (Mengko, 2013).

Setiap sel yang tersuspensi dalam cairan konduktif (pengencer) bertindak sebagai isolator (penghantar listrik yang buruk), sehingga jika sel darah masuk melalui *aperture* maka akan meningkatkan hambatan jalur listrik antara kedua elektroda tersebut. Gangguan ini menimbulkan suatu pulsa listrik. Jumlah pulsa listrik yang terukur per satuan waktu (frekuensi pulsa) dideteksi sebagai jumlah sel yang melalui celah tersebut. Sedangkan besarnya perubahan tegangan listrik (amplitudo) yang terjadi, merupakan ukuran volume dari masing-masing sel darah. Besarnya pulsa akan sesuai dengan besarnya jumlah dan besarnya sel darah yang lewat. Jika sel darah besar, maka pulsa yang ditimbulkan besar, sebaliknya jika sel darah kecil maka pulsa pun kecil. Dengan demikian dapat mengenali jenis-jenis sel menurut ukuran dan menghitung jumlahnya (Mengko, 2013).



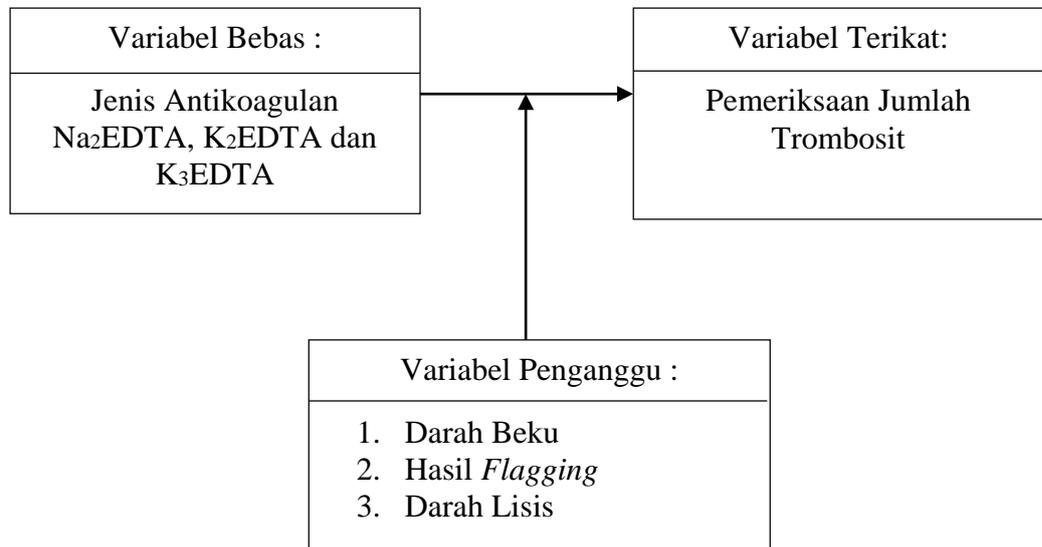
Gambar 4. Prinsip Impedansi
 Sumber : Beckman Coulter, 2018.

B. Kerangka Teori



Gambar 5. Kerangka Teori
Sumber : CLSI, 2003.

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 6. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

Ada perbedaan jumlah trombosit pada darah vena yang ditambah antikoagulan Na₂EDTA, K₂EDTA dan K₃EDTA yang langsung diperiksa dengan metode otomatis.