

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 Hemoglobin

2.1.1.1 Pengertian Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin merupakan suatu protein yang kompleks, yang tersusun dari protein globin dan suatu senyawa bukan protein yang dinamai heme (Mohammad Sadikin, 2001). Hemoglobin normal pada orang dewasa terdiri dari Hemoglobin A (96-98%), hemoglobin F (0,5-0,8%) dan hemoglobin A₂ (1,5-3,2%) (Norsiah, 2015).

Hemoglobin adalah indikator yang digunakan secara luas untuk menetapkan prevalensi anemia. Hemoglobin merupakan senyawa pembawa oksigen pada sel darah merah. Hemoglobin dapat diukur secara kimia dan jumlah Hb/100 ml darah dapat digunakan sebagai indeks kapasitas pembawa oksigen pada darah. Kandungan hemoglobin yang rendah dengan demikian mengindikasikan anemia (I Dewa Nyoman Supariasa dkk, 2001).

2.1.1.2 Fungsi Hemoglobin

Dalam sel darah merah hemoglobin berfungsi untuk mengikat oksigen (O₂). Dengan banyaknya oksigen yang dapat diikat dan dibawa oleh darah, dengan adanya Hb dalam sel darah merah, pasokan oksigen ke berbagai tempat di seluruh tubuh, bahkan yang paling terpencil dan terisolasi sekalipun akan tercapai (Mohammad Sadikin, 2001).

2.1.1.3 Pembentukan Hemoglobin

Menurut Arthur C. Guyton dan John E. Hall (1997), sintesis hemoglobin dimulai dalam proeritoblas dan kemudian dilanjutkan sampai tingkat retikulosit, karena ketika retikulosit meninggalkan sumsum tulang dan masuk ke dalam aliran darah, maka retikulosit tetap membentuk hemoglobin selama beberapa hari berikutnya. Tahap dasar kimiawi pembentukan hemoglobin adalah yang pertama, suksinil-KoA, yang dibentuk dalam siklus krebs berikatan dengan klisin untuk membentuk molekul pirol. Selanjutnya, empat senyawa pirol bersatu membentuk senyawa protoporfirin, yang kemudian berikatan dengan besi membentuk molekul hem. Akhirnya empat molekul hem berikatan dengan satu molekul globin, suatu globulin yang disintesis dalam ribosom retikulum endoplasma, membentuk hemoglobin. Sintesis hemoglobin dimulai dalam proeritoblast yang dilanjutkan sampai retikulosit. Retikulosit ini tetap membentuk hemoglobin meski retikulosit sudah meninggalkan susmsun tulang dan berada pada aliran darah (Kristyan, 2011).

Afinitas ikatan hemoglobin terhadap oksigen ditentukan oleh sifat rantai hemoglobin. Abnormalitas rantai ini dapat mengubah sifat-sifat fisik molekul 3 hemoglobin. Contohnya, pada anemia sel sabit, asam amino valin akan digantikan oleh asam glutamat pada satu tempat dalam setiap dua rantai beta, jika tipe hemoglobin ini terpapar dengan oksigen berkadar rendah, maka terbentuklah kristal panjang di dalam sel-sel darah merah yang panjangnya kadang-kadang sampai 15 mikrometer. Hal ini membuat sel-sel tersebut hampir tidak mungkin melewati kapiler-kapiler kecil, dan ujung berduri dari kristal tersebut cenderung merobek membran sel, sehingga terjadi anemia sel sabit.

2.1.1.4 Klasifikasi Kadar Hemoglobin

Nilai normal yang paling sering dinyatakan adalah untuk pria 14-18 gm/100 ml dan untuk wanita 12-16 gm/100 ml (gram/100ml sering disingkat dengan gm% atau gr/dl). Beberapa literatur lain menunjukkan nilai yang lebih rendah, terutama pada wanita, sehingga mungkin pasien sering tidak dianggap menderita anemia sampai Hb kurang dari 13gr/100 ml pada pria dan 11gr/100 ml untuk wanita (I Dewa Nyoman Supariasa dkk, 2001).

2.1.2 Pemeriksaan Hemoglobin

2.1.2.1 Pengertian pemeriksaan hemoglobin

Pemeriksaan hemoglobin merupakan salah satu dari pemeriksaan darah rutin yang sering dilakukan di laboratorium puskesmas, klinik ataupun rumah sakit. Pemeriksaan hemoglobin dilakukan dengan beberapa metode seperti metode sahli, sianmethemoglobin yang dapat dilakukan dengan cara manual maupun cara otomatis (Norsiah, 2015).

Pentingnya hemoglobin ini menyebabkan pemeriksaan hemoglobin dalam darah mempunyai peranan penting dalam diagnosis suatu penyakit. Kegunaan dari pemeriksaan kadar hemoglobin adalah menilai tingkat anemia, respon terhadap terapi anemia atau perkembangan penyakit yang berhubungan dengan anemia dan polisitemia (Norsiah, 2015).

Internasional Committee for Standardization in Haematology (ICSH) telah menetapkan bahwa gold standart dari pemeriksaan hemoglobin saat ini menggunakan metode sianmethemoglobin (Silva, 2012).

2.1.2.2 Metode pemeriksaan hemoglobin

Beberapa cara pemeriksaan hemoglobin yang dilakukan adalah:

- a. Cara tallquist yaitu: membandingkan warna merah yang terdapat di darah dengan menggunakan kertas tallquist yang memiliki standart warna (Prastika, 2011).
- b. Kolorimetris yaitu visual metode sahli yaitu dengan proses pembentukan asam hematin dan fotoelektris yaitu pembentukan *sianmetoxyhemoglobin* (Prastika, 2011)..
- c. Cara cupri sulfat berdasarkan berat jenis darah yang dilihat dari tetesan darah tenggelam, melayang atau mengapung (Prastika, 2011).
- d. Cara kimia yaitu dengan menentukan kadar Fe yang diikat oleh sejumlah gas tertentu (Prastika, 2011).
- e. Cara gasometrik berdasarkan pada suhu dan tekanan udara tertentu dimana hemoglobin dapat mengikat sejumlah gas yang tertentu pula (Prastika, 2011).
- f. Cara non-sianmethemoglobin (*automated hematology analyser*), yaitu menggunakan reagen SLS (*Sodium Laury Sulfat*) yang relatif lebih aman dibandingkan dengan reagen yang digunakan pada metode sianmethemoglobin yang pada umumnya diterapkan pada alat hitung otomatis (Chakravarthy *et al*, 2012).
- g. Metode amperometri (stik Hb), yaitu deteksi dengan menggunakan pengukuran arus yang yang dihasilkan pada sebuah reaksi elektrokimia (Kadri, 2012).

2.1.2.3 Kadar hemoglobin dalam darah

Menurut Greer *et al* (2009) Nilai kadar hemoglobin adalah:

Tabel 2. Nilai Tabel Normal Kadar Hemoglobin

Usia	Kadar Hemoglobin
Laki laki Dewasa	14,0 – 18,0 g/dl
Perempuan Dewasa	12,0 – 16,0 g/dl
Anak anak 2-6 Tahun	11,0 – 14 g/dl
Anak anak 6-12 Tahun	12,0 – 16,0 g/dl
Bayi	10,0 – 15,0 g/dl
Bayi baru lahir	16,0 – 25 g/dl

2.1.2.4 Faktor faktor yang mempengaruhi hasil pemeriksaan hemoglobin

a. Suhu Penyimpanan

Sampel pemeriksaan yang menggunakan darah EDTA sebaiknya segera dilakukan, bila terpaksa ditunda, dapat disimpan dalam lemari es ($4^0 - 6^0$ C). Pada umumnya darah EDTA dapat disimpan dalam 24 jam dalam lemari es (Gandasoebrata, 2007).

b. Lama penyimpanan

Penyimpanan darah EDTA pada suhu kamar yang terlalu lama dapat menyebabkan terjadinya perubahan pada eritrosit seperti pecahnya membran eritrosit (hemolisis) sehingga hemoglobin keluar ke medium sekelilingnya (plasma) yang menyebabkan terjadinya kenaikan kadar hemoglobin (Hilmi 2009).

c. Kontaminasi bakteri

Kontaminasi bakteri terjadi bila pada waktu proses penyadapan darah dilakukan tidak secara aseptis. Kontak antara kulit yang tidak atau kurang steril pada waktu penusukan akan terjadi kontaminasi. Pemakaian alat yang tidak steril

dan penanganan darah yang tidak tepat oleh petugas juga dapat mengakibatkan kontaminasi. Kontaminasi ini dapat berakibat darah menjadi rusak (Suciyati, 2010).

d. Pengaruh cahaya matahari

Paparan sinar UV terhadap eritrosit menyebabkan terjadinya hemolisis pada sel tersebut. Hemolisis inilah yang mengindikasikan rusaknya membran sel. Salah satu faktor perusak membran sel adalah radikal hidroksil. Radikal hidroksil yang terbentuk akibat adanya pajanan sinar UV menyebabkan membran sel pecah dan terjadi hemolisis (Amrullah, 2009).

2.1.3 *Automated hematology analyzer*

a. Pengertian

Automated hematology analyzer adalah alat untuk mengukur sampel berupa darah. Alat ini biasa digunakan dalam bidang kesehatan. *Automated hematology analyzer* digunakan untuk memeriksa darah lengkap dengan cara menghitung dan mengukur sel darah secara otomatis berdasarkan impedansi aliran listrik atau berkas cahaya terhadap sel – sel yang dilewatkan.

b. Prinsip kerja

Metode deteksi dengan menggunakan SLS yang merupakan reagen bebas sianida yaitu reagen melisiskan sel darah merah dan sel darah putih dalam sampel kemudian reaksi kimia dimulai dengan mengubah globin dan mengoksidasi kelompok heme. Sehingga kelompok hidrofilik SLS dapat berikatan dengan heme membentuk kompleks yang stabil dan berwarna yang disebut SLS-HGB yang dianalisis dengan metode fotometri. LED mengirim keluar cahaya monokromatik dan bergerak melalui bauran cahaya yang diabsorpsi oleh kompleks SLS-HGB.

Absorbansi yang terukur oleh sensor foto setara dengan kadar hemoglobin yang terdapat pada sampel. Absorbansi metode fotometri pada umumnya dipengaruhi oleh kekentalan sampel. Kekentalan pada sampel darah dapat disebabkan karena lipemia atau leukositosis. Penggunaan metode SLS-HGB dapat membantu meminimalisir keadaan tersebut karena reagen yang efektif (Sysmex, 2017).



Gambar 1. *Automated Hematology Analyzer* (Sysmex, 2014).

c. Keuntungan dari Hematologi Analyzer

1. Efisiensi Waktu

Lebih cepat dalam pemeriksaan hanya membutuhkan waktu sekitar 2-3 menit dibandingkan dilakukan secara manual dan lebih tanggap dalam melayani pasien.

2. Sampel

Pemeriksaan hematologi rutin secara manual misalnya, sampel yang dibutuhkan lebih banyak membutuhkan sampel darah (Whole Blood). Manual

prosedur yang dilakukan dalam pemeriksaan leukosit membutuhkan sampel darah 10 mikro, juga belum pemeriksaan lainnya. Namun pemeriksaan *automated hematology analyzer* ini hanya menggunakan sedikit sampel.

3. Ketepatan Hasil

Hasil yang dikeluarkan oleh alat *automated hematology analyzer* ini biasanya sudah melalui *quality control* yang dilakukan oleh intern laboratorium tersebut, baik di institusi Rumah Sakit ataupun Laboratorium Klinik.

d. Kerugian *automated hematology analyzer*

Tidak dapat menghitung sel abnormal. Pemeriksaan oleh hematologi *autoanalyzer* ini tidak selamanya mulus namun pada kenyataannya alat ini juga memiliki beberapa kekurangan seperti dalam hal menghitung sel-sel abnormal. Seperti dalam pemeriksaan hitung jumlah sel, bisa saja nilai dari hasil hitung leukosit atau trombosit bisa saja rendah karena ada beberapa sel yang tidak terhitung dikarenakan sel tersebut memiliki bentuk yang abnormal.

2.1.4 Stik (Hb meter)

Prinsip metode menggunakan stik (Hb meter) yaitu analisis elektrokimia dimana pendeteksian menggunakan pengukuran arus listrik yang dihasilkan pada sebuah reaksi elektrokimia. Reaksi elektrokimia ini didasari dari reaksi redoks (reaksi reduksi-oksidasi) yang terjadi pada senyawa yang terkandung pada logam elektroda (strip) maka elektron yang terbentuk akan ditransfer dari analit (zat yang akan diketahui) ke logam elektroda atau dari logam elektroda ke analit. Reaksi redoks adalah reaksi pengikatan maupun pelepasan elektron, unsur oksigen maupun bilangan oksidasi, arah elektron ditentukan oleh sifat dari analit dan dikontrol oleh

potensial listrik pada elektroda (Wang, 2008). Perubahan elektrokimia pada elektroda menyebabkan magnet elektron memancarkan sinyal dan ditampilkan ke monitor dimana hasil setara dengan kadar analit (zat yang ingin diketahui) (Belluzo, 2008).

Metode yang menggunakan strip kering ini mengandung campuran yang terdiri dari surfaktan (untuk melisiskan sel darah merah dan mengeluarkan hemoglobin). Potensial listrik pada alat yang diterapkan yaitu 0.45 V – 0.50 V. Metode ini berdasarkan mendeteksi arus listrik yang dihasilkan oleh reaksi dari hemoglobin dan mediator elektron dalam spesimen di bawah kondisi yang stabil (Cai *et al*, 2013).

Dalam strip kering terdapat 2 lapisan utama yang memiliki peran penting, lapisan pertama mengandung reagent yang sensitif dengan hemoglobin seperti kalium ferrisianida dan lapisan kedua mengandung dengan kandungan referensi elektroda seperti Ag (perak) untuk mengoptimalkan reaksi (Manohar *et al*, 2010).



Gambar 2. Alat Stik (Hb Meter) (alkeskendari.com)

Mekanisme kerja alat stik (Hb meter) adalah dengan meneteskan sampel darah pada strip khusus sesuai pemeriksaan, sehingga terjadi reaksi antara bahan kimia yang ada di dalam darah dengan reagen yang ada di dalam strip. Reaksi ini akan dapat menghasilkan arus listrik yang besarnya setara dengan kadar bahan kimia yang ada dalam darah. Kandungan yang ada dalam elektroda biasanya logam platinum atau emas. Elektroda ini memiliki sistem amperometri (Belluzo, 2008).

Elektroda kerja berperan juga sebagai katoda yang merupakan tempat terjadinya reduksi oksigen (Wardah, 2012).

Pemeriksaan metode ini biasa diaplikasikan pada alat Hb meter yang menggunakan teknologi biosensor. Muatan listrik pada teknologi biosensor ini terjadi karena reaksi dari interaksi kimia antara zat tertentu dalam darah dan zat kimia pada reagen kering (strip) akan diukur lalu dikonversikan menjadi angka yang dihasilkan setara dengan kadar yang diukur (Kepmenkes RI no 1792/MENKES/SK/XII/2010).

a. Komponen

- 1) Alat analiser (otomatis atau visual)
- 2) Reagen stik (umumnya berupa reagen kering)
- 3) Bahan kontrol
- 4) Kalibrator (berupa angka yang dimasukan secara manual atau otomatis berupa kode pada stik khusus (Kepmenkes RI no 1792/MENKES/SK/XII/2010).

b. Faktor faktor yang mempengaruhi alat :

- 1) Peningkatan aktivitas enzim pada sampel akan membuat arus semakin kuat dan meningkat.
- 2) Kosentrasi sampel, sampel yang terlalu sedikit dapat menimbulkan hasil rendah palsu. Sampel yang terlalu banyak akan mengotori sekitar strip pemeriksaan
- 3) Permeabilitas membran

Permeabilitas membran berhubungan dengan porositas/ukuran pori. Immobilisasi diinginkan porositas yang optimal yaitu tidak terlalu kecil yang dapat menghalangi tranfer elektron, namun tidak terlalu besar yang dapat menyebabkan berkurangnya aktivitas dan stabilitas enzim. Semakin besar porositas, maka enzim akan semakin mudah merembes keluar (Nur *et al*, 2011).

- 4) Jenis kosentrasi mediator

Mediator yang dianjurkan adalah mediator yang terbuat dari emas dan tembaga karena logam ini adalah yang paling baik sebagai mediator (wa).

2.1.5 Pra analitik, Analitik, Pasca analitik pemeriksaan Hemoglobin

Tahap Pra analitik, Analitik dan Post analitik dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan kadar hemoglobin sebagai berikut :

2.1.5.1 Tahap Pra analitik

- 1) Terlalu lama memasang tourniquet pada pengambilan darah vena sehingga menyebabkan pemekatan sel sel darah merah. Pemasangan torniquet yang baik yaitu 30-60 detik (Serdar, 2008).

- 2) Terbentuknya bekuan kecil pada sampel darah vena (dengan K₂EDTA) karena pencampuran yang kurang sempurna setelah pengambilan sampel (Chairlan, 2011).
- 3) Kelebihan penambahan antikoagulan akan mengganggu analisis dan analisis harus segera dilakukan setelah sampel diambil .

2.1.5.2 Tahap analitik

Proses analitik adalah tahap pengerjaan sampel sehingga diperoleh hasil pemeriksaan (Depkes RI, 1999).

- 1) Bahan pemeriksaan jumlah hemoglobin dapat menggunakan darah vena maupun darah kapiler.

Pemeriksaan dengan darah kapiler memberikan hasil lebih rendah dibandingkan darah vena. Pemeriksaan jumlah hemoglobin dengan darah kapiler menggunakan alat otomatis diperlukan darah kapiler sebanyak 20 ul (Mindray, 2010).

- 2) Pemeliharaan dan kalibrasi alat

Alat pemeriksaan bila tidak dilakukan perawatan secara rutin maupun kalibrasi maka akan mempengaruhi hasil pemeriksaan jumlah hemoglobin menjadi lebih tinggi atau menjadi rendah. Upaya untuk mengkoreksi alat *automated hematology analyzer* merupakan sebuah upaya yang baik karena kita tahu bahwa tidak semua alat luput dari kesalahan dan ketidakteelitian. Perlu adanya pemahaman untuk menilai dan memilah kesalahan yang mungkin terjadi saat pengerjaan dengan metode *automated hematology analyzer*. Setiap laboratorium mengklaim bahwa hasilnya lebih akurat bahkan pakai darah kontrol dibandingkan laboratorium lain.

Alasan ini dapat dipatahkan bila pra analitiknya buruk, misal darah tidak segera dicampur dengan antikoagulan, kelebihan antikoagulan, tidak segera diperiksa (dalam waktu 1 jam akan memberikan hasil yang lebih baik), tidak dikocok sebelum diperiksa dan botol yang digunakan dari plastik/polietilen. Pemeriksaan darah lengkap umumnya telah menggunakan mesin penghitung otomatis (*hematology analyzer*). Pemeriksaan dengan mesin penghitung otomatis dapat memberikan hasil yang cepat. Namun, alat hitung otomatis/analyser memiliki keterbatasan ketika terdapat sel yang abnormal, misalnya banyak dijumpainya sel-sel yang belum matang pada leukemia, infeksi bakterial, sepsis, dan sebagainya. Dalam kasus jumlah sel yang sangat tinggi dimana alat tidak mampu menghitungnya, maka pemeriksaan manual menjadi pilihan untuk dilakukan (Sainssyah, 2010).

Penyebab kesalahan pada hasil alat hitung otomatis (*hematology analyzer*):

- a. Salah cara sampling
- b. Salah penyimpanan spesimen dan waktu pemeriksaan ditunda terlalu lama sehingga terjadi perubahan morfologi sel darah.
- c. Kesalahan tidak mengocok sampel secara homogen, terutama bila tidak memiliki alat pengocok otomatis (rotator) maka dikhawatirkan tidak sehomogen saat sampel darah yang diambil dari tubuh pasien. Ini merupakan kesalahan fatal yang sering terjadi pada saat pemeriksaan.
- d. Kehabisan reagent lyse sehingga seluruh sel tidak dihancurkan saat pengukuran sel tertentu.

- e. Kalibrasi dan kontrol tidak benar. Tidak melakukan kalibrasi secara berkala dan darah kontrol yang digunakan sudah mengalami expired date tapi tetap dipakai karena menghemat biaya operasional.
- f. *Carry over*, homogenisasi, volume kurang. Untuk alat jenis open tube maka, penyebabnya salah saat memasukkan sampel pada jarum sampling alat, misal jarum tidak masuk penuh ujungnya pada darah atau darah terlalu sedikit dalam tabung atau botol lebar sehingga saat dimasukkan jarum tidak terendam seluruhnya. Untuk jenis *close tube* kesalahan hampir sama juga, yaitu tidak memenuhi volume minimum yang diminta oleh alat. Untuk tipe close tube menggunakan cara predilute, perlu dikocok dahulu saat pengenceran darah dengan diluent.
- g. Alat atau reagen rusak. Alat dapat saja rusak bila suhu yang tidak sesuai (*warning: temperature ambient abnormal*) dan kondisi meja yang tidak baik. Reagensia yang digunakan jelek dan mungkin terkontaminasi oleh udara luar karena packing yang jelek (Sainssyiah, 2010). Perawatan alat secara rutin perlu dilakukan dengan melakukan perawatan harian yaitu *EZ cleanser* yaitu untuk menghancurkan sisa bekuan atau sisa pembuangan darah yang tidak sempurna dan melakukan kalibrasi dengan menggunakan kalibrator komersial atau sampel darah segar. Kalibrasi diperiksa secara teratur dengan menggunakan program pemantapan mutu yang biasa dilakukan setiap laboratorium, sesuai dengan persyaratan laboratorium yang baik, verifikasi yang mencakup *quality control* harian pada setiap *shift* dan juga pada setiap perubahan nomor lot reagen. Alat yang

digunakan untuk penelitian ini sudah dilakukan pemeliharaan alat secara rutin dan kalibrasi. Kualitas reagen (*diluent, lyse, rinse*) harus diperlakukan sesuai aturan yang diberikan pabrik pembuatnya termasuk cara penyimpanan, penggunaan dan *expired* nya. Pemakaian reagen yang sudah rusak oleh karena sudah *expired* maupun salah dalam suhu penyimpanan akan menyebabkan penurunan jumlah eritrosit, leukosit dan trombosit. Hal ini dapat diatasi dengan pemakain reagen yang tidak *expired* dan penyimpanan reagen pada suhu yang sudah ditentukan pabrik pembuatnya yaitu pada suhu 15-300 C (Cell-Dyn, 2007).

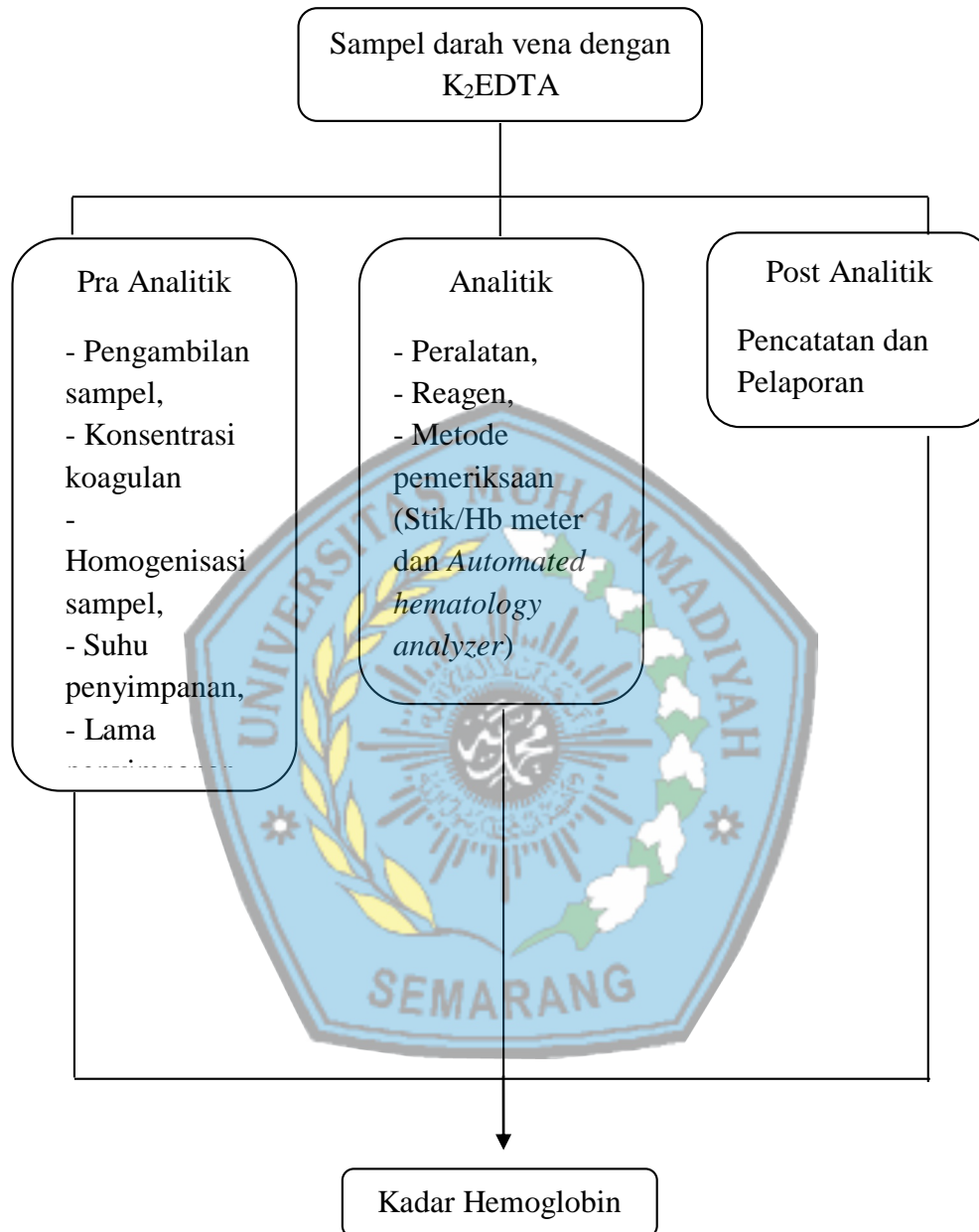
3) Faktor pemeriksaan

Faktor ini berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan jumlah eritrosit, leukosit dan trombosit, bila sampel tidak dicampur/dikocok dengan benar sebelum sampel diperiksa atau pada saat sampel dihisap oleh penghisap sampel tidak sampai dasar tabung sampel atau hanya pada permukaan tabung sampel, maka hasil pemeriksaan jumlah trombosit menjadi 28 rendah. Hal ini memerlukan pemeriksa yang berpengalaman dan terlatih (Cell-Dyn, 2007).

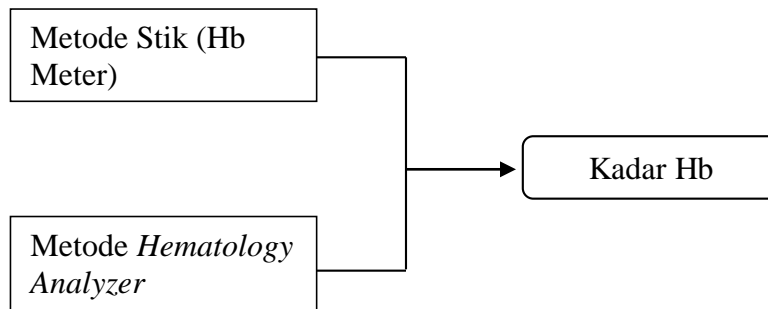
2.1.5.2 Tahap Post analitik

Faktor administrasi berupa pencatatan hasil yang kurang tepat dan teliti (Chairlan, 2011).

2.2 Kerangka teori



2.3 Kerangka konsep



2.4 Hipotesis penelitian

Terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil pemeriksaan hemoglobin metode Stik (Hb meter) dengan *automated hematology analyzer*.

