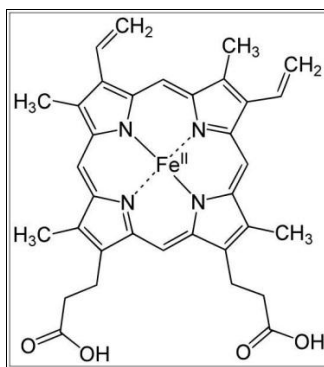


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hemoglobin

Hemoglobin adalah protein yang kaya akan zat besi, memiliki afinitas (daya gabung) terhadap oksigen dengan membentuk oxihemoglobin di dalam sel darah merah, dan melalui fungsi hemoglobin tersebut dibawa dari paru-paru ke jaringan-jaringan (Pearce, 2009). Hemoglobin merupakan senyawa pembawa oksigen pada sel darah merah yang dapat diukur secara kimia dan jumlah hemoglobin/100 mL darah dapat digunakan sebagai indeks kapasitas pembawa oksigen pada darah (Brooker, 2001). Struktur hemoglobin terdiri atas satu golongan *heme* dan *globin* yang merupakan empat rantai polipeptida yaitu asam amino yang terdekat terangkai dengan urutan tertentu. Molekul-molekul hemoglobin terdiri dari dua pasang rantai polipeptida (*globin*) dan empat gugus *heme* identik yang melekat pada 4 rantai *globin* (Riswanto, 2013).



Gambar 1. Struktur Hemoglobin
(Hofbrand, 2013)

Hemoglobin memiliki fungsi mengatur pertukaran oksigen dengan karbondioksida di jaringan tubuh. Hemoglobin mengambil oksigen dari paru-paru kemudian dibawa ke seluruh jaringan tubuh untuk digunakan sebagai bahan bakar. Hemoglobin membawa karbondioksida dari jaringan-jaringan tubuh sebagai hasil metabolisme ke paru-paru untuk dibuang (Riswanto, 2013).

Sintesis hemoglobin dimulai dalam proeritroblas, kemudian dilanjutkan sedikit dalam stadium retikulosit, karena ketika retikulosit meninggalkan sumsum tulang dan masuk ke dalam aliran darah, maka retikulosit tetap membentuk sedikit hemoglobin selama beberapa hari berikutnya. Pembentukan hemoglobin dimulai dari suksinil-KoA, yang dibentuk dalam siklus Krebs berikatan dengan glisin untuk membentuk molekul pirol. Empat pirol bergabung membentuk protoporfirin IX, yang bergabung dengan besi untuk membentuk molekul *heme*. Setiap molekul *heme* bergabung dengan rantai polipeptida panjang disebut *globin*, disintesis ribosom, membentuk suatu subunit hemoglobin yang disebut rantai hemoglobin. Tiap-tiap rantai ini memiliki berat molekul ± 16.000 Dalton, 4 dari molekul ini selanjutnya akan berikatan satu sama lain secara longgar untuk membentuk molekul hemoglobin lengkap (Guyton and Hall, 2008).

Terdapat beberapa variasi kecil dari rantai subunit hemoglobin yang berbeda, bergantung pada susunan asam amino di bagian polipeptida. Tipe - tipe rantai tersebut disebut rantai *alfa*, *beta*, *gamma*, dan *delta*. Bentuk hemoglobin yang paling umum pada orang dewasa yaitu hemoglobin A, merupakan kombinasi antara dua rantai

alfa dan dua rantai *beta*. Setiap rantai memiliki sekelompok prostetik *heme*, maka terdapat 4 atom besi dalam setiap molekul hemoglobin. Setiap atom besi berikatan dengan 1 molekul oksigen sehingga total membentuk 4 molekul oksigen (atau 8 atom oksigen) yang dapat diangkut oleh setiap molekul hemoglobin. Hemoglobin A memiliki berat molekul 64.458 Dalton (Guyton and Hall, 2008).

Sifat rantai hemoglobin menentukan afinitas ikatan hemoglobin terhadap oksigen. Abnormalitas rantai dapat mengubah sifat-sifat fisik molekul hemoglobin. Contoh pada anemia sel sabit, asam amino valin akan digantikan oleh asam glutamat pada suatu tempat dalam setiap dua rantai *beta*. Apabila tipe hemoglobin tersebut terpapar oksigen berkadar rendah, maka terbentuk kristal panjang di dalam sel-sel darah merah dengan panjang mencapai 15 mikrometer. Hal tersebut menyebabkan sel-sel darah merah hampir tidak mungkin melewati kapiler-kapiler kecil dan ujung dengan duri yang berasal dari kristal tersebut cenderung merobek membran sel sehingga terjadi anemia sel sabit (Guyton and Hall, 2008).

2.2 Pengukuran Kadar Hemoglobin

Pengukuran kadar hemoglobin ditentukan oleh faktor bahan pemeriksaan, alat, reagen, metode pemeriksaan dan lingkungan. Bahan pemeriksaan atau spesimen kadar hemoglobin adalah darah utuh (*whole blood*), yaitu darah yang sama bentuk atau kondisinya seperti ketika beredar dalam aliran darah. Spesimen diperoleh dari darah vena atau kapiler, dengan penambahan antikoagulan yang bertujuan untuk mencegah pembekuan darah (Riswanto, 2013). Antikoagulan yang baik dan sering digunakan untuk berbagai macam pemeriksaan hematologi adalah EDTA (*Ethylene*

Diamine Tetra Acetate). EDTA digunakan dalam bentuk garam Na_2EDTA atau K_2EDTA . K_2EDTA lebih banyak digunakan karena daya larut dalam air kira-kira 15 kali lebih besar dari Na_2EDTA . EDTA dalam bentuk kering dengan pemakaian 1-1,5 mg EDTA / mL sedang dalam bentuk larutan EDTA 10 % pemakaiannya 0,1 mL / mL darah. Garam-garam EDTA mengubah ion kalsium dari darah menjadi bentuk yang bukan ion. Setiap 1 mg EDTA menghindarkan pembekuan 1 mL darah (Gandasoebrata, 2013).

EDTA cair (larutan EDTA 10 %) lebih sering digunakan, pada penggunaan EDTA kering. Wadah berisi darah EDTA harus dihomogenkan selama 1-2 menit karena kelarutan EDTA kering lambat. Darah EDTA dibuat dengan cara mengalirkan 2 mL darah vena pada tabung atau botol yang telah berisi 2 mg EDTA kemudian botol / tabung ditutup dan darah segera dicampur selama 60 detik atau lebih. Apabila pemeriksaan tidak dapat dilakukan segera, sebaiknya darah EDTA disimpan dalam lemari es, dan dibiarkan pada suhu kamar lebih dahulu sebelum darah diperiksa (Gandasoebrata, 2013).

Kadar hemoglobin dapat diukur menggunakan beberapa metode antara lain metode fotoelektrik (hemoglobin-sianida, oksihemoglobin), sahli, skala warna, (Tallquist), cupri sulfat dan otomatis (Gandasoebrata, 2013). Metode pemeriksaan secara otomatis dapat dilakukan menggunakan Hb meter dan *hematology analyzer*. Hb Meter merupakan alat meter dengan metode POCT (*Point of Care Testing*) yang dirancang untuk pemeriksaan kadar hemoglobin dengan sampel *whole blood* bukan untuk sampel serum atau plasma (Aziz, 2013). Alat pengukuran metode POCT

menggunakan prinsip *reflectance* (pemantulan) dengan membaca warna yang terbentuk dari sebuah reaksi antara sampel yang mengandung bahan tertentu dengan reagen yang ada pada tes strip. Reagen yang ada pada tes strip akan menghasilkan warna dengan intensitas tertentu yang berbanding lurus dengan kadar bahan yang ada di dalam sampel. Selanjutnya warna yang terbentuk dibaca oleh alat. Kelebihan pemakaian Hb Meter antara lain hasil yang diperoleh lebih cepat, lebih murah, kepuasan dokter sering lebih tinggi karena tidak harus menunggu hasil pemeriksaan laboratorium. Kekurangan Hb Meter kurang presisi dibanding pemeriksaan menggunakan *hematology analyzer* dan hasilnya kadang-kadang harus tetap diverifikasi sehingga menambah biaya. Penyebab ketidakakuratan hasil pemeriksaan dengan Hb Meter antara lain operator tidak kompeten dan tidak berpengalaman, sehingga pengguna tidak mematuhi prosedur penggunaan alat, reagen yang digunakan tidak memiliki bahan kontrol, kurang supervisi dan tidak melakukan kalibrasi alat (Aziz, 2013).

Hal-hal yang perlu diperhatikan pada pemakaian Hb Meter antara lain tes strip dan chip harus memiliki kode yang sama, tes strip yang sudah *expired* tidak akan memberikan hasil pemeriksaan karena pada chip sudah tertanam informasi *expired date*, kadar hemoglobin ditampilkan dalam g/dL atau mmol/L. Rentang pengukuran alat POCT berbeda merk, berbeda juga kemampuan pengukurannya, di luar *range* tersebut POCT tidak dapat membaca. Selain beberapa hal tersebut tes strip mudah rusak dan tidak dapat dipakai apabila tabung atau tempatnya terbuka dalam waktu

lama dan terpapar panas serta cahaya, terdapat strip kontrol yang spesifik untuk *device* POCT yang dilakukan secara berkala. *Device* POCT harus didesinfeksi untuk menghilangkan kontaminasi infeksius setiap habis pakai. Bagian yang harus didesinfeksi yaitu badan meter, penutup jendela pengukur dan jendela pengukur menggunakan kapas dengan alkohol 70%. Pemeriksaan dan kontrol harus dilakukan dalam rentang temperatur 10-40°C. Apabila melewati rentang temperatur hasil tidak akan muncul, apabila muncul hasilnya akan meragukan. Pemeriksaan dilakukan di tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung, perubahan kondisi cahaya terlalu mendadak saat mengoperasikan alat hb meter harus dihindari. Cahaya blitz kamera menyebabkan kesalahan pengukuran serta medan elektromagnetik kuat mengganggu kerja alat (Mission, 2012).

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang dilewatkan akan sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet. Pemeriksaan kadar hemoglobin dengan spektrofotometer menggunakan metode sianmethemoglobin. Prinsip pemeriksaan spektrofotometer adalah hemoglobin akan diubah oleh kalium ferisianida $\{K_3Fe(CN)_6\}$ menjadi methemoglobin yang kemudian diubah menjadi hemoglobin sianida (HCN) oleh kalium sianida (KCN) (Riswanto 2013).

Hematology analyzer adalah alat yang digunakan secara *in vitro* untuk melakukan pemeriksaan hematologi secara otomatis, menggunakan reagen maupun

cleaning sesuai dengan *manual book*. Analisis semua data akan ditampilkan di *IPU* (*Information Processing Unit*), dengan kapasitas analisis 80 spesimen/jam. Pemeriksaan menggunakan *hematology analyzer* termasuk sebagai *gold standart* dalam menegakan diagnosis pemeriksaan hematologi termasuk penetapan kadar hemoglobin. Terdapat beberapa metode pengukuran yang digunakan pada alat *hematology analyzer*, yaitu *electrical impedance*, fotometri, *flowcytometry*, dan histogram. Hemoglobin diukur melalui metode fotometri dan *non cyanide SLS-Hb method*. *Sodium Lauryl Sulfate* (SLS) adalah surfaktan *anionic* yang bersifat hidrofobik dan berikatan sangat kuat dengan protein. Terdapat 4 tahap reaksi *non cyanide SLS-Hb method*, setelah sel darah merah mengalami lisis, absorpsi SLS pada membran sel darah merah menghasilkan perubahan struktur protein. Tahap kedua adalah perubahan konformasi molekul *globin*. Tahap ketiga, perubahan hemoglobin dari Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} yang diinduksi perubahan molekul globin pada tahap sebelumnya. Tahap terakhir adalah terjadinya ikatan antara gugus hidrofil dari SLS dengan Fe^{3+} membentuk kompleks yang stabil (Medonic, 2016).

Alat *hematology analyzer* memiliki beberapa kelebihan, antara lain efisiensi waktu, volume sampel dan ketepatan hasil. Pemeriksaan dengan *hematology analyzer* hanya memerlukan waktu sekitar 3-5 menit. Pemeriksaan dengan alat ini hanya menggunakan sampel sedikit saja. Hasil yang dikeluarkan oleh alat *hematologi analyzer* sudah melalui *quality control* yang dilakukan oleh *intern* laboratorium. Kekurangan *hematology analyzer* antara lain memerlukan perawatan, suhu ruangan,

harus dilakukan kontrol secara berkala (Medonic, 2016). Nilai rujukan kadar hemoglobin pada pria 13-16 g/dL dan wanita 12-14 g/dL (Wirawan, 2011).

2.3 Pengaruh Waktu dan Suhu Penyimpanan Darah EDTA terhadap Kadar Hemoglobin

Hemoglobin relatif stabil pada pemeriksaan dengan sampel darah EDTA, namun pemeriksaan hematologi menggunakan antikoagulan EDTA perlu memperhatikan batas waktu penyimpanan mengingat perubahan yang terjadi secara *in vitro* selama penyimpanan maupun oleh pengaruh antikoagulan. Penyimpanan bahan sedapat mungkin dihindarkan, artinya darah segera diperiksa setelah berhasil ditampung atau diambil. Tes sebaiknya dilakukan kurang dari 2 jam dalam suhu kamar (Nurrachmat, 2005).

Penyimpanan darah EDTA pada suhu kamar yang terlalu lama (15-25°C) menyebabkan terjadinya serangkaian perubahan eritrosit seperti pecahnya membran eritrosit (*hemolisis*) sehingga hemoglobin bebas keluar masuk ke dalam medium sekelilingnya (plasma) (Bontang, 2012). Secara umum pada suhu kamar selama 4 jam tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari metabolit-metabolit, enzim-enzim dan elektrolit-elektrolit. Penyimpanan darah harus dijaga pada suhu 2-8°C dengan tujuan menjaga kemampuan darah dalam menyalurkan oksigen, dan mengurangi pertumbuhan bakteri yang mengkontaminasi darah yang disimpan. Batas penyimpanan 2°C sangat penting, karena eritrosit sangat sensitif terhadap pembekuan. Apabila eritrosit membeku, sifat dinding sel darah akan pecah dan hemoglobin akan keluar (*hemolisis*) (Dinkes, 2002).

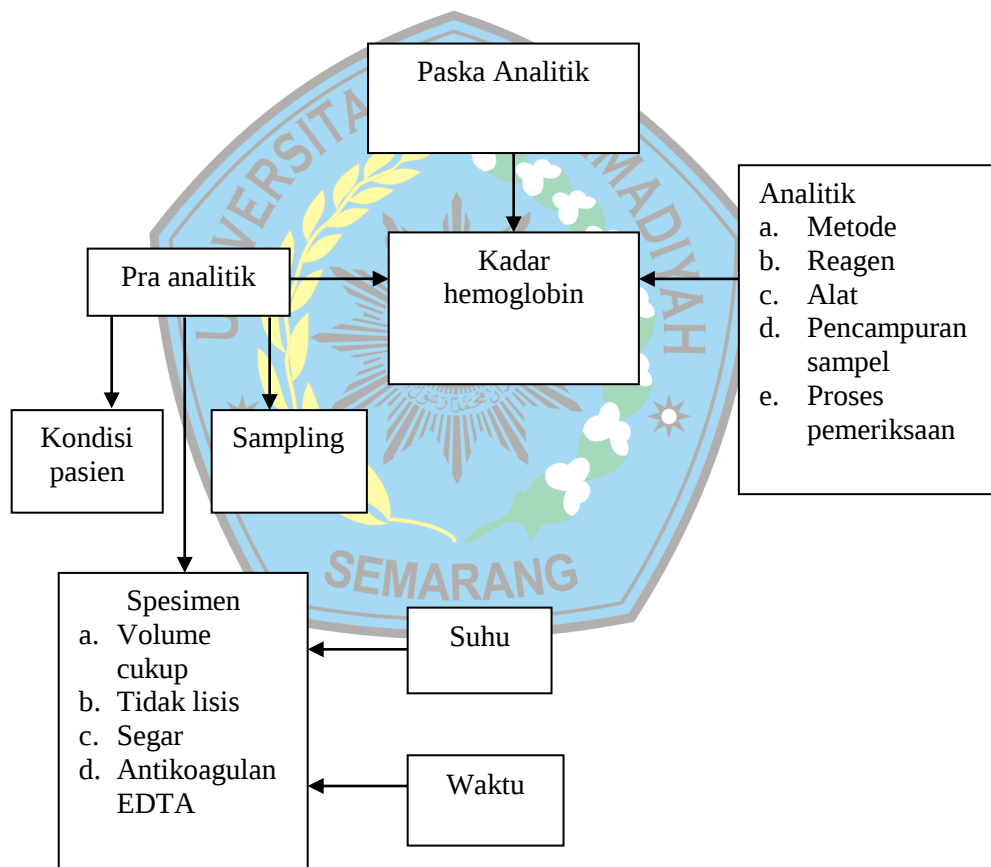
2.4 Kesalahan Pemeriksaan Kadar Hemoglobin

Kesalahan dalam pemeriksaan kadar hemoglobin terbagi dalam tiga tahap, yaitu pra analitik, analitik dan paska analitik. Tahap pra analitik atau tahap persiapan awal, merupakan tahap yang sangat menentukan kualitas sampel yang dihasilkan dan berpengaruh terhadap proses kerja selanjutnya. Tahap pra analitik meliputi kondisi pasien, pengambilan sampel dan spesimen. Sebelum pengambilan spesimen form permintaan laboratorium diperiksa. Identitas pasien harus ditulis dengan benar (nama, umur, jenis kelamin, nomor rekam medis dan sebagainya) disertai diagnosis atau keterangan klinis. Identitas harus ditulis dengan benar sesuai dengan pasien yang akan diambil specimen (Budiwiyono, 2002).

Pengambilan sampel sebaiknya dilakukan waktu pagi hari. Teknik atau cara pengambilan spesimen harus dilakukan dengan benar sesuai *Standard Operating Procedure* (SOP) yang ada. Spesimen yang akan diperiksa memiliki volume cukup, kondisi baik tidak lisis, segar atau tidak kadaluwarsa, tidak berubah warna dan tidak berubah bentuk. Selain itu pemakaian antikoagulan atau pengawet harus tepat, ditampung dalam wadah yang memenuhi syarat dan identitas sesuai dengan data pasien. Tahap analitik merupakan tahap pengerjaan pengujian sampel sehingga diperoleh hasil pemeriksaan. Tahap analitik perlu memperhatikan reagen, alat, metode pemeriksaan, pencampuran sampel dan proses pemeriksaan. Tahap paska analitik atau tahap akhir pemeriksaan yang dikeluarkan untuk meyakinkan bahwa hasil pemeriksaan yang dikeluarkan benar – benar valid atau benar. Kesalahan pada

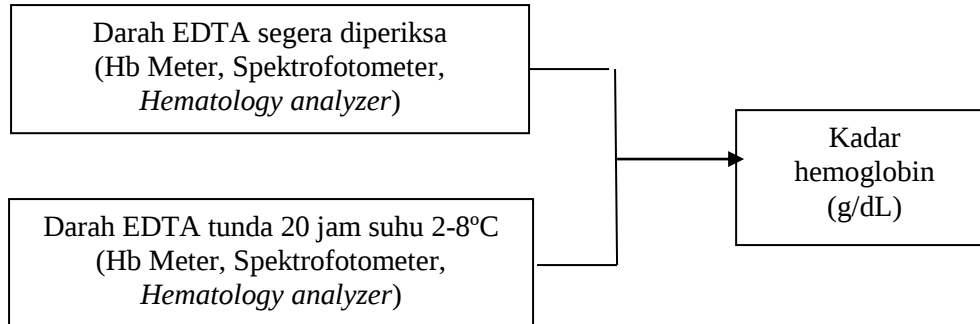
tahap ini antara lain kesalahan pencatatan hasil, dan kesalahan alamat pasien dan dokter yang meminta pemeriksaan (Budiwiyono, 2002).

2.5 Kerangka Teori



Gambar 2. Skema Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 3. Skema Kerangka Konsep

2.7 Hipotesis

Terdapat perbedaan kadar hemoglobin sampel darah EDTA segera diperiksa dengan ditunda 20 jam suhu 2-8°C.

