

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Darah

Darah adalah suatu jaringan tubuh yang ada di dalam pembuluh darah yang warnanya merah. Darah selamanya beredar di dalam tubuh oleh karena kerja atau pompa jantung, selama darah berada dalam pembuluh darah maka akan tetap cair tetapi kalau keluar dari pembuluhnya maka bisa menjadi beku (Apriliani T, 2016).

Darah terdiri dari dua komponen plasma dan sel darah, plasma merupakan komponen intraseluler yang berbentuk cair dan berjumlah sekitar 55% dari volume darah, sedangkan sel darah merupakan komponen padat yang terdapat di dalam plasma dengan jumlah 45% dari volume darah (Fitriani D, 2014).
Komponen padat ini terdiri dari :

2.1.1. Sel darah merah atau eritrosit (99%)

Eritrosit mengandung hemoglobin dan berperan mengedarkan oksigen.

2.1.2. Keping darah atau trombosit (0,6-1,0%)

Trombosit bertanggung jawab dalam proses pembekuan darah.

2.1.3. Sel darah putih atau leukosit (0,2%)

Lekosit berperan penting dalam sistem imun dan mempunyai tugas untuk memusnahkan benda asing yang dianggap berbahaya (Fitriani D, 2014).

2.2. Trombosit

Trombosit disebut juga platelet atau keping darah sel dengan ukuran

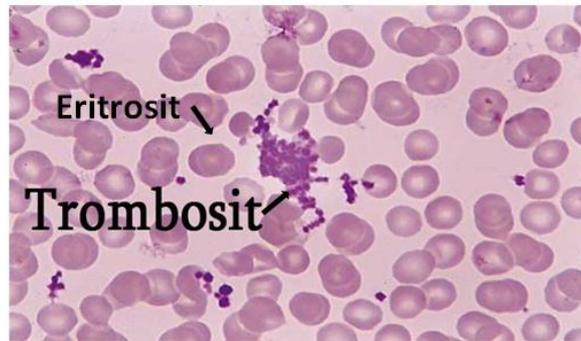
kecil, trombosit dibentuk dalam sumsum tulang melalui proses fragmentasi sitoplasma megakariosit. Bentuk trombosit tidak berinti diameternya sekitar 2-3 μm dan konsentrasinya sebesar 150.000-400.000 sel/ mm^3 di seluruh darah. Trombosit mempunyai peranannya yang sangat penting dalam penggumpalan darah (Tarwato, 2008).

Sel megakariosit yang pecah menjadi 3000-4000 serpihan sel yang dinamakan trombosit. Trombosit berbentuk seperti cakram bikonveks (dalam keadaan inaktif) dengan diameter 2-3 μm dan volume 8-10 fl (Nurracmat H, 2005).

Trombosit mempunyai masa hidup 7-10 hari. Sepertiga dari trombosit yang terbentuk di sumsum tulang akan tertangkap di dalam limpa normal. Permukaan trombosit diliputi oleh glikoprotein yang penting untuk reaksi adhesi dan agregasi yang akan membentuk sumbat trombosit pada proses hemostasis (Wirawan R, 2006).

2.2.1. Morfologi Trombosit

Morfologi trombosit dalam keadaan inaktif trombosit bentuknya seperti cakram bikonveks dengan diameter 2-3 μm . Menggunakan mikroskop elektron trombosit dapat dibagi menjadi 4 zone dengan masing-masing zone mempunyai fungsi khusus. Keempat zone adalah zone perifer yang berguna untuk adhesi dan agregasi, zone solgel menunjang struktur dan mekanisme kontraksi, zone organel yang berperan dalam pengeluaran isi trombosit serta zone membran yang keluar dari isi granola saat pelepasan (Apriliani T, 2016).



Gambar 1. Trombosit

(Atlas Of Blood Cells, 1998)

2.2.2. Struktur Trombosit

Struktur trombosit terdiri dari tiga komponen yaitu membran trombosit, sitoskeleton dan organel. Membran trombosit mengandung glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor. Melalui reseptor tersebut trombosit berinteraksi dengan zat-zat yang menyebabkan agregasi, zat yang inhibitor, faktor koagulasi seperti fibrinogen, faktor von willebrand dan trombin serta dengan dinding pembuluh darah dan dengan trombosit lainnya (Kosasih, 20018). Struktur trombosit terdapat kalsium, nukleotida terutama Adenosin Difosfat (ADP), Adenosin Trifosfat (ATP), dan seretonin yang terkandung dalam granula pada elekton. Granula spesifik (lebih sering dijumpai) mengandung antagonis heparin, faktor pertumbuhan yang berasal dari trombosit (*Platelat Derivat Growth Faktor, PDGF*) / β -tromboglobulin fibrinogen, von willebrand (WF), dan factor pembekuan lain granula padat lebih sedikit jumlahnya dan mengandung ADP, ATP, 5-hidroksitriptamin (5-HT). Organel spesifik lain meliputi lisosom

yang mengandung katalase. Selama reaksi pelepasan isi granula dikeluarkan ke dalam sistem kanalikular (Hoffbrand dkk, 2010).

2.2.3. Fungsi Trombosit

Trombosit berperan penting dalam pembentukan bekuan darah. Trombosit dalam keadaan normal bersirkulasi ke seluruh tubuh melalui sirkulasi darah. Trombosit melekat ke permukaan yang rusak dan mengeluarkan beberapa zat (serotin dan histamine) yang menyebabkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh. Fungsi lain dari trombosit yaitu untuk mengubah bentuk dan kualitas setelah berikatan dengan pembuluh yang cedera. Trombosit akan menjadi lengket dan menggumpal bersama membentuk sumbat trombosit yang secara efektif di daerah yang luka (Handayani dkk, 2008).

Peran trombosit *invivo* dalam hemostasis adalah membentuk sumbatan trombosit yang melalui 3 proses yaitu adhesi, aktivasi, trombosit dan agregasi. Pelekatan trombosit dengan pembuluh darah yang melibatkan receptor GP1b dan factor von willbrand disebut proses adhesi. Aktivasi trombosit terjadi setelah itu menimbulkan perubahan pada trombosit menyebabkan terjadinya pelepasan isi granula dan dense granules seperti ADP, serotonin katekolatnin serta ekspresi dan receptor GPIIb-IIIa. Tahap terakhir proses pembentukan sumbat trombosit adalah terjadinya agregasi trombosit yang melibatkan fibrinogen/ factor von willbrand (Wirawan Riadi, 2006).

2.2.4. Sifat Trombosit

Trombosit mempunyai sifat-sifat sebagai berikut : Mudah pecah, Adhesi yaitu melekat di permukaan asing. Agregasi yaitu melekat antara satu trombosit

ke trombosit yang lain. Aglutinasi yaitu menggumpal dan desintregasi yaitu mudah pecah (Apriliani T, 2016).

2.2.5. Hal yang mempengaruhi pemeriksaan trombosit

Pemberian antikoagulan yang kurang akan menyebabkan terjadinya gumpalan sehingga terjadi penurunan pada trombosit yang terhitung (Wirawan R, 2006).

- a. Antikoagulan dengan darah tidak segera dilakukan sehingga terjadi gumpalan trombosit dan pembentukan bekuan mikro (Nugraha, 2015).
- b. Terdapat platelet aggregation PLT Clums, Giant platelet *pseudotrombocytopenia* yang menyebabkan trombosit rendah palsu (Sysmex, 2013).
- c. Homogenisasi darah dengan antikoagulan yang tidak sempurna atau keterlambatan homogenisasi menyebabkan terbentuknya bekuan darah (Praptomo, 2018).
- d. Metode perhitungan trombosit cara tidak langsung mempunyai kekurangan pada reagen sebagai pengencer darah, proses pencampuran dan kebersihan bilik hitung (Gandasoebrata, 2010).
- e. Waktu pemeriksaan

Pemeriksaan jumlah trombosit yang ditunda lebih dari 1 jam menurunkan jumlah trombosit. Disebabkan oleh jumlah trombosit yang mudah sekali pecah, proses agregasi trombosit dan proses adesi menyebabkan trombosit saling bergabung sehingga terlihat seperti sel lain atau kotoran jika dibaca pada alat klimatologi analyzer (Gandasoebrata, 2010).

2.2.6. Pemeriksaan Jumlah Trombosit

Trombosit sulit dihitung karena mudah sekali pecah dan sulit dibedakan dengan kotoran, selain itu karena sifatnya yang mudah sekali melekat pada permukaan asing dan membentuk gumpalan (Gandasoebrata, 2010). Cara yang sering dipakai untuk menghitung jumlah trombosit adalah : cara langsung, cara tak langsung dan cara Automatik

a. Cara langsung

1. Metode rees Ecker

Darah diencerkan dengan larutan *Ress Ecker* di dalam pipet eritrosit, lalu dimasukkan ke dalam bilik hitung/ hemositometer. Pembacaan menggunakan mikroskop, trombosit tampak refraktif dan mengkilat berwarna biru muda / bila lebih kecil dari eritrosit, serta berbentuk bulat, lonjong atau koma tersebar atau bergerombol. Keuntungan dari metode ini adalah cepat, trombosit akan tersebar merata dan trombosit terlihat kontras dengan latar belakang sehingga mudah dihitung (Gandasoebrata R, 2010).

2. Metode Brecker-konkite

Darah diencerkan dengan Ammonium oksalate 1% yang berfungsi untuk melisiskan eritrosit, jumlah trombosit dihitung dengan bilik hitung dibawah mikroskop (Fitriani D, 2014).

b. Cara tak-langsung (Fonio)

Cara yang dilakukan dengan membuat sediaan apus darah yang kemudian diwarnai dengan pewarna wright atau giemsa jumlah trombosit dihitung per 1000 eritrosit (Gandasoebrata R, 2010).

c. Cara Automatik

Cara pemeriksaan trombosit dengan menggunakan alat analyzer, pemeriksaan trombosit secara otomatis menggunakan alat analisis sel darah automatic (Apriliani T, 2016).

Prinsip alat hematology analyzer adalah *impedance flowcytometri* yaitu dengan mengukur *impedance* listrik dari sel. Pengukuran dan penyerapan sinar akibat interaksi sinar yang mempunyai panjang gelombang tertentu dengan larutan atau sampel yang dilewatinya. Alat bekerja berdasarkan prinsip *flow cytometer*. Flow cytometri adalah metode pengukuran (metri) jumlah dan sifat-sifat sel (cyto) yang dibungkus oleh aliran cairan (=flow) melalui celah sempit. Ribuan sel dialirkan melalui celah tersebut sedemikian rupa sehingga sel dapat lewat satu per satu, kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel dan ukurannya. Alat juga dapat memberikan informasi intraseluler termasuk inti sel.

Prinsip impedansi listrik berdasarkan pada variasi impedansi yang dihasilkan oleh sel-sel darah di dalam *mikroaperture* (celah chamber mikro) yang mana sampel darah yang diencerkan dengan *elktrolit diluents* atau *sys DII* akan melalui *mikroaperture* yang dipasang dua elektroda pada dua sisinya (sisi sekum dan konstan) yang pada masing masing arus

listrik berjalan secara kontinu maka akan terjadi peningkatan resistensi listrik (impedansi) pada kedua elektroda sesuai dengan volume sel (ukuran sel) yang melewati impuls atau voltage yang dihasilkan oleh amplifier circuit ditingkatkan dan dianalisa oleh elektronik system lalu hemoglobin diukur dengan melisiskan *Red Blood Cells* (REC) dengan sys. LYSE membentuk methemoglobin, cyanmethemoglobin dan diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 550 nm pada chamber. Hasil yang didapat diprint out pada printer berupa nilai lain grafik sel.

Prinsip *light scattering* adalah metode dimana sel dalam suatu aliran melewati celah dimana berkas cahaya difokuskan ke situ (sensing area). Apabila cahaya tersebut mengenai sel, diletakkan pada sudut-sudut tertentu akan menangkap berkas-berkas sinar sesudah melewati sel itu. Alat yang memakai prinsip ini lazim disebut flowcytometri (Mengko R, 2013).

2.3. Tabung Vacutainer

Vacutainer adalah tabung reaksi hampa udara yang terbuat dari kaca atau plastik, apabila dilekatkan pada jarum, darah akan mengalir masuk ke dalam tabung dan berhenti mengalir ketika sejumlah volume tertentu telah tercapai (Anonim, 2009). Warna tutup tabung vacutainer digunakan untuk membedakan jenis antikoagulan dan kegunaanya dalam pemeriksaan laboratorium.

2.3.1. Tabung tutup merah (*serum tube*), dibuat dari dua jenis bahan yaitu dari plastik dan kaca. Jenis yang berbahan kaca mengandung zat aditif

silicone coated sedangkan yang berbahan plastik berisi *clot activator* dan silicone coated. Kegunaannya untuk pemeriksaan yang menggunakan serum, umumnya digunakan untuk pemeriksaan kimia darah, imunologi, serologi, dan bank darah (*crossmeting test*).

2.3.2. Tabung tutup kuning (*SST / Gel separator tube*) berisi *Clot Activator* dan gel pemisah serum, yang fungsinya memisahkan serum dengan sel darah. Umumnya digunakan untuk pemeriksaan kimia darah imunologi dan serologi.

2.3.3. Tabung tutup hijau terang/ *PST (plasma separator tube)* berisi lithium heparin, gel pemisah plasma dan umumnya digunakan untuk pemeriksaan kimia darah.

2.3.4. Tabung tutup hijau tua / heparin tube, berisi natrium heparin dan lithium heparin dan umumnya digunakan untuk pemeriksaan kimia darah.

2.3.5. Tabung tutup ungu/ *EDTA tube* berisi cairan K_3EDTA dan spray coated K_2EDTA serta umumnya digunakan untuk pemeriksaan hematologi bisa juga untuk imunologi dan pemeriksaan screening bank darah (*crossmatch*).

2.3.6. Tabung tutup biru/ *Citrat tube* berisi natrium citrate. Umumnya digunakan untuk pemeriksaan koagulasi.

2.3.7. Tabung tutup abu-abu terang / *fluoride glucose tube*, berisi natrium fluoride / Na_2EDTA dan kalium oksalat, digunakan untuk pemeriksaan glukosa (BD, 2016).

Keuntungan menggunakan tabung vacutainer antara lain akan mengurangi

resiko penularan penyakit yang ditularkan melalui darah, mengurangi resiko darah tumpah, dan tabung vacutainer direkomendasikan oleh OSHA (*The United State Safety and Health Administration*) (Anonim, 2004).

2.4. Antikoagulan

Antikoagulan merupakan zat yang ditambahkan ke dalam darah dengan tujuan menghambat atau mencegah proses pembekuan dengan cara mengikat ion kalsium dan menghambat pembentukan trombin dari protombin (Nugraha, 2015). Jenis-jenis anti koagulan :

2.4.1. Heparin

Heparin adalah asam *mucopolysaccaride* atau *Glycosaminoglycans* (GAGs) yang terdiri dari residu asam glukoronat dan glucosamine yang diesterifikasi dengan asam sulfat yang digunakan sebagai antikoagulan. Mekanisme kerja heparin dengan meningkatkan pelepasan protein spesifik, seperti *tissue plasminogen, activator* dan *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) ke dalam darah untuk menghambat pembekuan darah (Jevuska, 2012).

2.4.2. Trinatrium citrat

Trinatrium citrate adalah antikoagulan tidak beracun biasanya digunakan dalam tranfusi darah serta hematologi untuk evaluasi gangguan koagulasi.

2.4.3. Natrium atau Kalium EDTA

Tersedia dalam bentuk garam Sodium atau Potasium, mencegah koagulasi dengan cara mengikat kalsium. Garam-garam tersebut rnengubah ion kalsium

dari darah menjadi bentukan bukan ion sehingga pembekuan darah dapat dicegah. EDTA tidak mempengaruhi terhadap besar dan bentuk dari eritrosit dan lekosit. EDTA juga dapat mencegah penggumpalan trombosit, sehingga baik sekali untuk pemeriksaan hematologi seperti hemoglobin, hematokrit, lekosit, trombosit dan sebagainya. Antikoagulan EDTA ada 3 macam yaitu Na_2EDTA , K_2EDTA dan K_3EDTA :

- a. Na_2EDTA (Natrium EDTA) merupakan salah satu jenis antikoagulan dalam bentuk serbuk, yang ditambahkan secara konvensional. Antikoagulan ini masih banyak digunakan di laboratorium, untuk memudahkan pengukuran biasanya dibuat menjadi larutan 10 % (Wijaya K, 2006).
- b. K_2EDTA (*Dipotassium EDTA*) merupakan salah satu jenis antikoagulan EDTA dengan dalam bentuk serbuk kering yang disemprotkan pada permukaan interior tabung plastik. Tabung plastik lebih aman dibandingkan tabung kaca karena tahan pecah dan tahan bakar. Tabung ini sebagai *Best Practice Formulary* karena memenuhi persyaratan dan pedoman klinis saat ini (BD, 2016). Antikoagulan K_2EDTA dianjurkan oleh ICSH (*International Council for Standardization in Hematology*) dan CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) karena bila dibandingkan dengan K_3EDTA , K_2EDTA tidak mengalami penyusutan eritrosit lebih besar pada EDTA dengan konsentrasi tinggi (penyusutan 11% dengan 78,5 mg/ml darah). K_2EDTA tidak menghasilkan peningkatan yang lebih besar dalam volume sel (1,6%

kenaikan setelah 4 jam). K₂EDTA karena bentuknya serbuk kering sehingga tidak aditif (Arzoumania L, 2002).

- c. K₃EDTA (Tripotasium EDTA) merupakan salah satu jenis antikoagulan EDTA yang berbentuk cair. K₃EDTA walaupun dalam bentuk cairan yang menyebabkan pengenceran yang tidak berarti dan sangat bagus untuk melihat morfologi sel (Paten N, 2000). K₃EDTA mempunyai stabilitas yang lebih baik daripada garam EDTA yang lain karena mempunyai pH yang mendekati pH darah (Narayanan S, 2000).

2.5 Hematologi analyzer

Hematologi Analyzer merupakan automatic cel counter yang bekerja dengan metode flow cytometri yang prinsip dasarnya adalah impedansi elektrik (electric impedance) dan pendar cahaya (ligh scattering).

2.5.1. Impedance Elecktrik

Prinsip yang digunakan adalah sebelum pemeriksaan, sampel diencerkan dengan larutan yang mempunyai konduktivitas tertentu dan merupakan konduktor listrik yang kurang baik, kemudian sel darah dialirkan melalui lubang kecil yang disebut orifice yang mempunyai ukuran tertentu. Pada saat yang sama, suatu arus listrik dialirkan melalui elektroda yang dipasang pada sisi luar dan sisi dalam orifice, karena sel darah adalah penghantar listrik yang buruk, maka jika sel darah masuk melaui orifice tad, arus listrik yang mengalir juga akan terganggu. Gangguan ini menimbulkan pulsa-elektrik. Jumlah pulsa listrik yang terukur persatuan waktu (frekuensi pulsa) dideteksi sebagai sel yang melalui celah tersebut. Sedangkan besarnya

perubahan tegangan listrik (amplitude) 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 pulsupun akan kecil, dengan demikian dapat mengenali jenis-jenis sel menurut ukuran dan menghitung jumlahnya (Mengko R, 2013).

2.5.2. Pendar Cahaya

Prinsip yang digunakan adalah pendaran cahaya yang terjadi ketika sel mengalir melewati celah dan berkas cahaya yang difokuskan ke sensing area yang ada pada aperture tersebut. Apabila cahaya mengenai sel, maka cahaya akan dihamburkan, dipantulkan atau dibiaskan ke semua arah. Kemudian hamburan cahaya mengenai sel, akan ditangkap oleh detektor yang ada pada sudut-sudut tertentu sehingga menimbulkan pulsa. Pulsa cahaya yang berasal dari hamburan cahaya, intensitas warna, fluoresensi, akan diubah menjadi pulsa listrik. Pulsa ini akan dipakai untuk menghitung jumlah, ukuran, maupun inti sel yang merupakan ciri dari masing-masing sel. Hamburan cahaya dengan arah lurus (forward scattered light) mendeteksi volume dan ukuran sel. Sedangkan cahaya yang dihamburkan dengan sudut 90° menunjukkan informasi dari isi granula sitoplasma. Pada metode ini juga dapat dilakukan pewarnaan dengan cara menambahkan pewarna pada reagen. Sel yang telah diberi pewarna akan memberikan pendaran cahaya yang berbeda-beda, sehingga akan lebih banyak informasi untuk mendeteksi atau mendeteksi jenis sel (Mengko R, 2013). Volume darah yang diperlukan sebanyak 1 ml dan

volume darah yang dihisap oleh alat sebanyak 25 μ l (Anonim, 2009).

Prinsip kerja alat ini dalam menghitung jumlah trombosit adalah sampel didilusi dengan larutan konduktivitas tertentu. Sel dialirkan melalui lubang dengan ukuran tertentu –orifice, pada saat yang sama, arus listrik dialirkan melalui elektroda yang dipasang pada sisi luar (*eksternal elektroda*) dan sisi dalam (*internal electrode*) dari orifice. Sel darah adalah penghantar listrik yang buruk sehingga setiap sel darah yang masuk melalui orifice akan menimbulkan gangguan pada orifice. Gangguan tersebut akan menimbulkan pulsa dimana besarnya pulsa sebanding dengan ukuran sel darah yang melewatinya. Setiap pulsa listrik yang terjadi sesuai dengan satu trombosit yang melalui aperture sehingga jumlah pulsa sama dengan jumlah trombosit dan tingginya pulsa menunjukkan ukuran trombosit (Anonim, 2009).

2.5.3. Homogenisasi

Homogenisasi darah dengan antikoagulan yang tidak sempurna atau keterlambatan homogenisasi menyebabkan terbentuknya bekuan darah (Praptomo, 2018). Homogenisasi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu:

a. Manual

Homogenisasi sampel secara manual dilakukan menggunakan antikoagulan dengan cara memutar-mutar tabung 4-5 kali atau membolak-balikkan tabung 5-10 kali dengan lembut (Krisma, 2014).

b. Alat Roller

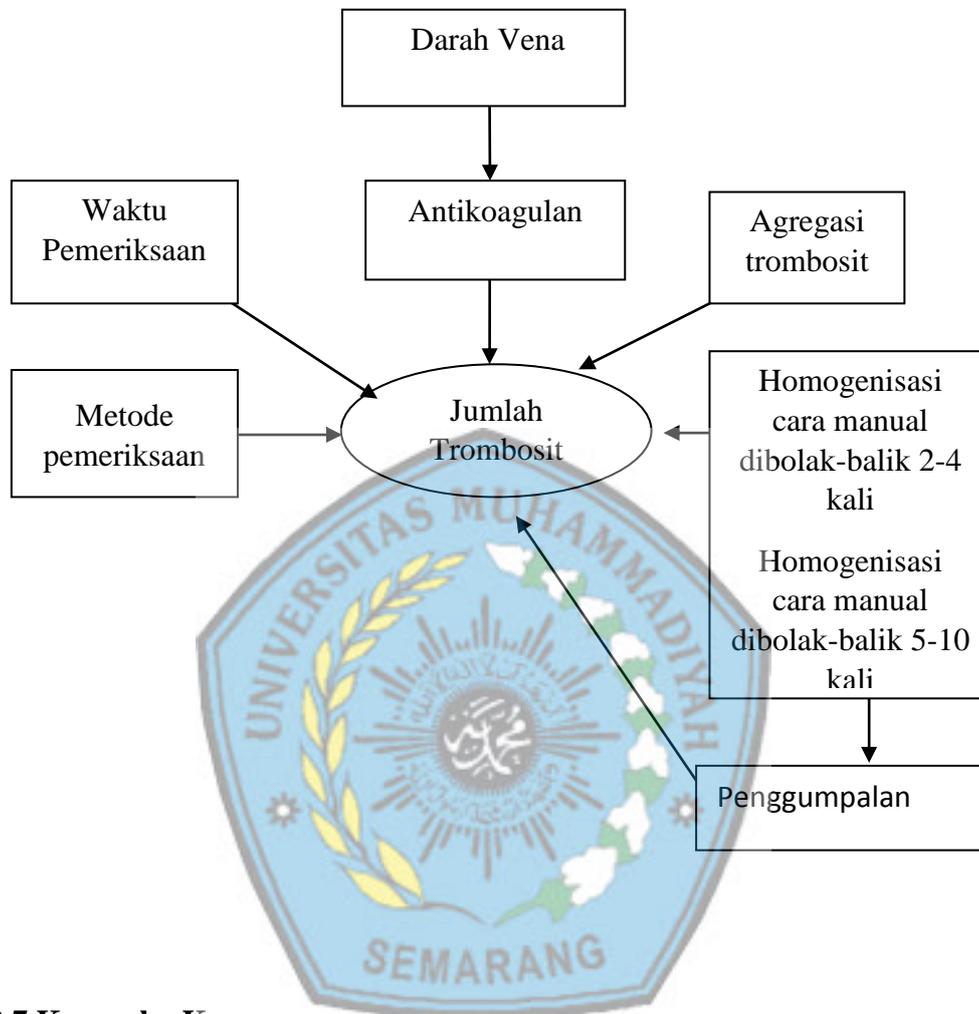
Blood roller mixer merupakan alat pengocok darah dengan gulungan atau rol yang berputar secara horisontal. Alat ini berfungsi untuk

menghomogenkan darah atau mengocok sampel darah dalam sebuah venoject (tabung hampa udara steril) sebelum diproses oleh alat *Hematology Analyzer*.

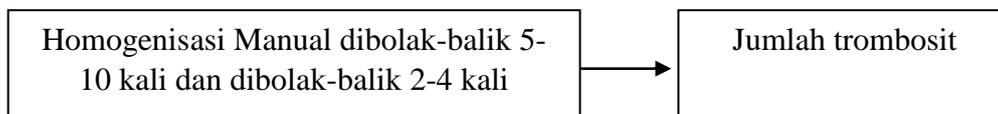


Gambar 2. Homogenisasi Manual

2.6 Kerangka Teori



2.7 Kerangka Konsep



2.8 Hipotesis

Terdapat perbedaan jumlah trombosit dengan homogenisasi cara manual dibolak-balik 5-10 kali dengan dibolak-balik 2-4 kali.

