

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Darah

2.1.1 Pengertian Darah

Darah merupakan komponen esensial makhluk hidup, mulai dari binatang primitif sampai manusia. Dalam keadaan fisiologik, darah selalu berada dalam pembuluh darah sehingga dapat menjalankan fungsinya. Dalam system sirkulasi darah merupakan bagian penting yaitu dalam transport oksigen. Darah terdiri dari bagian cair dan padat, bagian cair yaitu berupa plasma darah dan serum. Bagian padatnya yaitu sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit), dan trombosit (Rukman, 2010).

Darah pada tubuh manusia mengandung 55% plasma darah (cairan darah) dan 45% sel-sel darah (darah padat). Jumlah darah yang ada pada tubuh kita yaitu sekitar 1/13 berat tubuh orang dewasa atau sekitar 4 atau 5 liter. Darah merupakan suatu cairan yang sangat penting bagi manusia karena berfungsi sebagai alat transportasi serta memiliki banyak kegunaan lainnya untuk menunjang kehidupan. Tanpa darah yang cukup seseorang dapat mengalami gangguan kesehatan dan bahkan dapat mengakibatkan kematian (Rukman, 2010).

2.1.2 Fungsi Darah

Secara umum fungsi darah ialah sebagai berikut:

1. Sebagai Alat pengangkut yaitu :
 - a. Mengambil O^2 atau zat pembakaran dari paru-paru untuk diedarkan ke seluruh tubuh.

- b. Mengangkat CO² dari jaringan untuk dikeluarkan melalui paru-paru.
 - c. Mengambil zat makanan dari usus halus untuk diedarkan dan dibagikan keseluruh jaringan atau alat tubuh.
 - d. Mengangkat atau mengeluarkan zat-zat yang tidak berguna bagi tubuh untuk dikeluarkan melalui kulit dan ginjal.
2. Mempertahankan keseimbangan dinamis dalam tubuh termasuk didalamnya ialah mempertahankan suhu tubuh, mengatur keseimbangan asam-basa, sehingga pH dan cairan tubuh tetap dalam keadaan yang seharusnya.
 3. Mempertahankan tubuh dari agregasi benda atau senyawa asing yang umumnya selalu dianggap punya potensi menimbulkan ancaman.
 4. Alat pengangkut getah hormon dari kelenjar buntu (Guyton, 2011).

2.1.3 Komponen Darah

1. Plasma darah

Plasma darah sebagian besar terdiri dari air yaitu sekitar 91% yang berperan sebagai medium transport, zat padat (7-9%) yang terdiri atas protein 8% (albumin, globulin, protrombin dan fibrinogen), mineral 0,9% (natrium, klorida, natrium bikarbonat, garam dari kalsium, fosfor, magnesium, besi dan yodium). Sisanya diisi oleh bahan organik yaitu Glukosa, lemak, urea, kreatinin , kolesterol, asam amino dan berisi gas (oksigen dan karbondoksida), hormon – hormon, enzim dan antigen (Guyton, 2011).

Plasma darah dapat dipisahkan di dalam sebuah tuba berisi darah segar yang telah dibubuhi zat anti-koagulan yang kemudian diputar sentrifugal sampai sel darah merah jatuh ke dasar tuba, sel darah putih akan

berada di atasnya dan membentuk lapisan *buffycoat*, plasma darah berada di atas lapisan tersebut, dengan kepadatan sekitar 1025 kg/m^3 , or 1.025 kg/l . Serum darah adalah plasma tanpa fibrinogen, sel dan faktor koagulasi lainnya. Fibrinogen menempati 4% alokasi protein dalam plasma dan merupakan faktor penting dalam proses pembekuan darah (Pradana, 2013).

2. Sel - sel darah

Sel-sel darah terdiri dari : eritrosit, leukosit, trombosit. Ketiga elemen seluler tersebut mempunyai fungsi yang berbeda-beda. Begitupun jangka waktu hidupnya tidak sama. Sel-sel yang telah mencapai umurnya atau yang telah mati akan digantikan dengan sel-sel yang baru. Dalam keadaan fisiologis destruksi sel senantiasa diimbangi dengan produksi sel yang baru oleh alat-alat pembentukan darah (Guyton, 2011).

a. Sel Darah Merah

Ciri-ciri sel darah merah, antara lain bentuknya melingkar, pipih, dan cakram bikonkaf, sel yang telah matang tidak mempunyai nucleus, berdiameter kurang dari $0,01 \text{ mm}$ dan elastis. Warnanya kuning kemerah-merahan, karena didalamnya mengandung zat yang disebut hemoglobin, warna ini akan bertambah merah jika didalamnya banyak mengandung O_2 . Fungsinya mengikat O_2 dari paru-paru untuk diedarkan keseluruh jaringan tubuh dan mengikat CO_2 dari jaringan tubuh untuk dikeluarkan melalui paru-paru (Syarifuddin, 2010)



Gambar 2.1 Sel darah merah

b. Sel Darah Putih

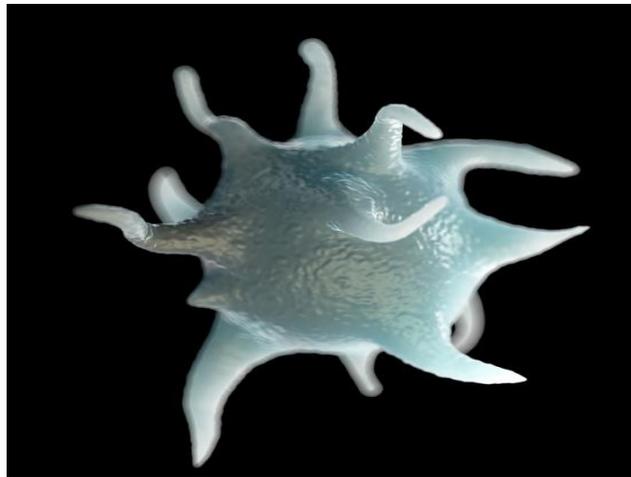
Sel darah putih (leukosit) rupanya bening dan tidak berwarna, bentuknya lebih besardari sel darah merah, tetapi jumlah sel darah putih lebih sedikit. Diameter leukosit sekitar $10 \mu\text{m}$. Batas normal jumlah leukosit berkisar $4.000 - 10.000 / \text{mm}^3$ darah. Leukosit di dalam tubuh berfungsi untuk mempertahankan tubuh terhadap benda –benda asing (foreignagents) termasuk kuman – kuman penyebab penyakit infeksi. Leukosit yang berperan adalah monosit, netrofil, limfosit. Leukosit juga memperbaiki kerusakan vaskuler. Leukosit yang memegang peranan adalah eosinofil sedangkan basofil belum di ketahui pasti(Depkes,2012).



Gambar 2.2 Sel darah putih

c. Trombosit

Trombosit tidak dapat dipandang sebagai sel utuh karena berasal dari sel raksasa yang berada di sumsum tulang, yang dinamakan megakariosit. Dalam pematangannya, megakariosit ini pecah menjadi 3000 sampai 4000 serpihan sel, yang dinamai sebagai trombosit atau keping sel (platelet). Trombosit mempunyai bentuk bicembung dengan garis 0,75-2,25 μ m. Dengan sendirinya trombosit ini tidak mempunyai inti. Akan tetapi keping sel ini masih dapat melakukan sintesis protein. Selain itu, trombosit masih mempunyai mitokondria, butir glikogen yang mungkin berfungsi sebagai cadangan energi dan 2 jenis granula, yaitu granula dan granula yang lebih padat. Trombosit berfungsi penting dalam usaha tubuh untuk mempertahankan keutuhan jaringan bila terluka, sehingga tubuh tidak mengalami kehilangan darah dan terlindung dari penyusupan benda atau sel asing dan untuk melakukan agregasi (Syarifuddin, 2010).



Gambar 2.3 Trombosit

2.2 Tinjauan Tentang Trombosit

2.2.1 Asal Trombosit

Trombosit dihasilkan di dalam sumsum tulang dengan cara melepaskan diri (fragmentasi) dari perifer sitoplasma sel induknya (megakariosit) melalui rangsangan trombopoetin. Megakariosit berasal dari megakarioblas yang timbul dari proses diferensiasi sel asal hemapoetik precursor mieloid paling awal yang membentuk megakariosit. Megakariosit matang, dengan proses replikasi endomitotik inti secara sinkron, volume sitoplasmanya bertambah besar jumlah inti bertambah dua kali lipat. Biasanya pada keadaan 8 inti, replikasi inti lebih lanjut dan pertumbuhan sel berhenti, sitoplasma menjadi granular dan selanjutnya trombosit dibebaskan. Setiap megakariosit menghasilkan sekitar 4000 trombosit. Pada manusia interval waktu dari diferensiasi sel asal sampai dihasilkan trombosit kurang lebih 10 hari (Hoffbrand, 2005).

2.2.2 Morfologi Trombosit

Umur trombosit normal 7 – 10 hari, diameter trombosit rata-rata. 1 - 2 μm dan volume sel rerata 5,8 fl. Hitung trombosit normal sekitar 150 – 400 x 10³/ μl (Hoffbrand, , 2005). Dengan mikroskop elektron, trombosit dapat dibagi menjadi 4 zone dengan masing-masing zonemempunyai fungsi khusus. Keempat zone adalah zone perifer yang berguna untuk adhesi dan agregasi, zone sol gel menunjang struktur dan mekanisme kontraksi, zone organel yang berperan dalam pengeluaran isi trombosit serta zone membran yang keluar dari isi granula saat pelepasan (Uswatun H, 2012) .

2.2.3 Fungsi trombosit

Trombosit berperan penting dalam usaha tubuh untuk mempertahankan jaringan bila terjadi luka. Trombosit ikut serta dalam menutup luka, sehingga tubuh tidak mengalami kehilangan darah dan terlindungi dari penyusupan benda dan sel asing (Syamsul, 2011).

Pada waktu bersinggungan dengan permukaan pembuluh yang rusak, maka sifat-sifat trombosit segera berubah secara drastis yaitu trombosit mulai membengkak, bentuknya menjadi irregular dengan tonjolan-tonjolan yang mencuat dari permukaannya; protein kontraktilnya berkontraksi dengan kuat dan menyebabkan pelepasan granula yang mengandung berbagai faktor aktif; trombosit menjadi lengket sehingga melekat pada serat kolagen; mensekresi sejumlah besar ADP; dan enzim-enzimnya membentuk tromboksan A₂, yang juga disekresikan ke dalam darah. ADP dan tromboksan kemudian mengaktifkan trombosit yang berdekatan, dan karena sifat lengket dari trombosit tambahan ini maka akan menyebabkan melekat pada trombosit semula yang sudah aktif sehingga membentuk sumbat trombosit. Sumbat ini mulanya longgar, namun biasanya dapat berhasil menghalangi hilangnya darah bila luka di pembuluh darah yang berukuran kecil. Setelah itu, selama proses pembekuan darah, benang-benang fibrin terbentuk dan melekat pada trombosit, sehingga terbentuklah sumbat yang rapat dan kuat (Guyton, 2011).

2.3 Trombositopenia

Trombositopenia atau defisiensi trombosit, merupakan keadaan dimana trombosit dalam sirkulasi jumlahnya di bawah normal (150.000-350.000/ μ L darah). Penderita trombositopenia cenderung mengalami pendarahan yang

biasanya berasal dari vena-vena atau kapiler-kapiler kecil. Akibatnya, timbul bintik-bintik perdarahan di jaringan tubuh. Pada kulit penderita menampilkan bercak-bercak kecil berwarna ungu, sehingga disebut dengan trombositopenia purpura (Nicholas, 2014).

2.4 Hitung Jumlah Trombosit

Trombosit sukar dihitung karena ukurannya kecil, mudah pecah dan sulit dibedakan dengan kotoran. Trombosit juga mudah melekat pada benda asing (adesif) dan cenderung saling menempel satu sama lain (agregasi). Pemeriksaan harus dilakukan sesegera mungkin dan dianjurkan memakai peralatan yang dilapisi silikon atau peralatan plastik (Uswatun H, 2012). Hitung jumlah trombosit ada beberapa macam yaitu secara manual dan secara otomatis. Secara manual yaitu menggunakan kamar hitung dan sediaan apus darah tepi, sedangkan secara otomatis yaitu menggunakan hematologi analyzer. Dalam penelitian kali ini teknik yang digunakan yaitu cara manual menggunakan sediaan apus darah tepi dan teknik otomatis.

2.4.1 Hitung Jumlah Trombosit Menggunakan Alat Otomatis

Autoanalyser adalah alat yang pada prinsipnya diciptakan manusia untuk memudahkan pekerjaan manusia. Autoanalyser didesign untuk bekerja dengan ketelitian tinggi dan dengan waktu yang cepat serta dapat menangani banyak sampel sekaligus. Untuk pemeriksaan hematologi dikenal dengan sebutan hematology analyser yaitu, alat yang digunakan untuk memeriksa darah lengkap dengan cara menghitung dan mengukur sel sel darah secara otomatis berdasarkan variasi impedensi aliran listrik atau berkas cahaya terhadap sel-sel yang dilewatkan Alat ini bekerja secara flow cytometer. Flow citometri adalah metode

pengukuran [=metri] jumlah dan sifat sel [=cyto] yang dibungkus oleh aliran cairan [=flow] melalui celah-celah sempit. Ribuan sel dialirkan melalui celah tersebut sehingga sel dapat lewat satu-persatu. Lalu dilakukan perhitungan jumlah sel dan ukurannya. Alat ini juga dapat memberikan informasi intraselular, sel termasuk inti sel.

Pada penelitian ini hematologi analyser yang digunakan yaitu sysmex XN-1000. *Hematology Analyzer* Sysmex XN-1000 merupakan alat pemeriksaan darah lengkap otomatis di laboratorium klinik yang menghitung beberapa parameter penting dalam pemeriksaan darah lengkap menggunakan prinsip *flow cytometry*. Sysmex XN-1000 memiliki dimensi 25.4” w (*width/lebar*) x 33.7” h (*height/tinggi*) x 29.7” d (*depth/kedalaman*). Alat ini dapat melakukan *throughput* sebanyak maksimal 100 sampel/jam untuk sampel *whole blood* dan 40 sampel/jam untuk sample *body fluids* (cairan tubuh). Volume sample yang diperlukan untuk sample *whole blood* dan *body fluids* (cairan tubuh) sebanyak 88 µL. Alat ini juga memiliki beberapa mode analisis pemeriksaan yang dapat disesuaikan.

Adanya alat yang telah terautomatisasi harus didukung dengan adanya pemahaman tenaga laboratorium klinik terhadap otomatisasi laboratorium klinik yang berkaitan dengan alat. Dalam hal ini ada beberapa hal yang perlu diperhatikan diantaranya mengenai *quality control*, kalibrasi, *maintenance*, serta *troubleshooting* pada alat.

Pada *Hematology Analyzer* Sysmex XN-1000, terdapat 2 jenis reagen untuk pelaksanaan *quality control*, yakni XN *Check* dan XN *Check* BF. Selain melakukan *quality control*, kalibrasi menggunakan XN CAL dan XN CAL PF

pada alat yang bersangkutan juga harus dilakukan secara berkala. Di samping itu yang tak kalah penting, yakni perlu adanya *maintenance* untuk menghindari masalah-masalah yang dapat terjadi pada alat sehingga perlu pula adanya pemahaman mengenai *troubleshooting* pada alat tersebut.

Teknik hitung trombosit dengan metode otomatis masih terdapat kelemahan apabila ada trombosit yang bergerombol, trombosit besar (*giant*) serta adanya kotoran, pecahan eritrosit, pecahan leukosit tidak dapat terdeteksi atau tidak dapat dibedakan. Teknik ini pada keadaan tertentu dapat memberikan hasil rendah palsu atau tinggi palsu. Hal – hal yang menyebabkan hasil rendah palsu antara lain : *platelet cold agglutinin*, protein plasma pada paraproteinemia, kontak trombosit pada permukaan benda asing, *giant trombocyte*, lipemia, *platelet satellitism*, dan *clumping trombocyte*. Hal – hal yang menyebabkan tinggi palsu adalah mikrosferosit fragmen sel leukimia dan badan – badan Pappenheimer (Nicholas, 2014).

Dengan menggunakan alat hematologi analyser lebih banyak trombosit yang dapat dihitung. Namun teknik ini dapat menimbulkan kesalahan jika jumlah leukosit melebihi $100.000 / \text{mm}^3$, bila ada fragmentasi eritrosit berat, larutan pengencer tidak bebas partikel, sampel plasma dibiarkan terlalu lama sebelum dilakukan pemeriksaan atau karena trombosit melekat satu dengan yang lain (Sacher, A , 2012)

2.4.2 Hitung Jumlah Trombosit Menggunakan Sediaan Apus Darah Tepi

Sediaan apus darah tepi merupakan slide untuk mikroskop yang pada salah satu sisinya dilapisi dengan lapisan tipis darah vena yang diwarnai dengan pewarnaan (wright/giems) dan diperiksa di bawah mikroskop. Sediaan apus yang

baik adalah yang ketebalannya cukup dan bergradasi dari kepala (awal) sampai ke ekor (akhir). Sediaan apus darah tepi yang dibuat dan dipulas dengan baik merupakan syarat mutlak untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang baik (Soetopo, 2010).

Ciri sediaan apus yang baik meliputi:

- a) Sediaan tidak melebar sampai tepi kaca objek, panjang $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ panjang kaca.
- b) Mempunyai bagian yang cukup tipis untuk diperiksa, pada bagian itu eritrosit tersebar merata berdekatan dan tidak saling menumpuk.
- c) Pinggir sediaan rata, tidak berlubang dan tidak bergaris-garis.
- d) Penyebaran leukosit yang baik tidak berkumpul pada pinggir atau ujung sedimen.

Kegunaan dari pemeriksaan apusan darah tepi yaitu untuk mengevaluasi morfologi dari sel darah tepi (trombosit, eritrosit, leukosit), memperkirakan jumlah leukosit dan trombosit, identifikasi parasit. Persyaratan pembuatan apusan darah yaitu objek glass harus bersih, kering, bebas lemak. Teknik yang digunakan menggunakan teknik dorong (pushslide) yang pertama kali diperkenalkan oleh maxwellwintrobe dan menjadi standar untuk apus darah tepi. Perbedaan mencolok antara hitung trombosit secara langsung dan estimasi dapat disebabkan oleh 3 faktor antara lain meliputi ;

1. Faktor praanalitik

Sampel tertukar, cara samplig yang tidak benar, kesalahan mencantumkan identitas,dll.

2. Faktor analitik

Cara pembuatan sediaan apus darah tepi (SADT) yang tidak memenuhi syarat, kesalahan alat hitung yang dipakai, dll.

3. Faktor post analitik

Biasanya terjadi saat penulisan hasil.

2.4.2.1 Teknik Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi

Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) ada dua metode yaitu *cover glass* atau metode gelas penutup dan metode *slide* atau metode objek glass. Penggunaan kaca objek yang dibersihkan dengan sempurna sangat penting. Penyimpanan kaca objek harus bebas debu (Soetopo, 2010).

Pada saat pembuatan sediaan apus darah tepi perlu diperhatikan bahwa hanya $\frac{1}{2}$ sampai $\frac{3}{4}$ bagian kaca objek yang digunakan untuk hapusan darah. Penghapus dapat dilakukan dengan menggunakan kaca penutup maupun kaca objek yang oinggirnya rata. Ketebalah lapisan sediaan pada sepertiga bagian trakhir harus sedikit mungkin, sehingga sebagian eritrosit –eritrosit yang berdampingan dapat terpisan. Sediaan apus darah tepi dengan lapisan terlalu tebal pada dasarnya akan diwarnai secara berlebih sehingga tidak memungkinkan untuk analisis struktur seluler yang halus, karena masing-masing elemen sel tidak cukup tersebar (Syamsul,2011).

Sediaan apus darah tepi yang berkualitas baik adalah pangkal agak tebal kemudian makin menipis keujungnya, melekat rata tanpa ada lubang-lubang tidak berbentuk garis-garis tajam pada ujungnya. Gerakan tersendat-sendat menyebabkan apusan tidak rata. Kecepatan mendorong dan besarnya tekanan penghapus harus diatur sedemikian rupa agar sediaan tidak terlalu tipis atau tidak

terlalu tebal. Gerakan dorong dengan sudut lebih besar duapuluh lima derajat, menghasilkan sediaan lebih tebal, demikian pula sebaliknya.

2.4.2.2 Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi

Macam-macam pewarnaan pada sediaan apus darah menurut Romanowsky ada empat macam pewarnaan yaitu pewarnaan wright's stain, pewarnaan Lieshman, pewarnaan may grunwald dan pewarnaan giemsa (Imam, 2013). Pewarnaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pewarnaan giemsa. Giemsa adalah zat warna yang terdiri dari eosin dan metilen azur memberi warna merah muda pada sitoplasma dan metilen biru pada inti leukosit. ketiga jenis zat warna ini dilarutkan dengan metal alcohol dan liserin. larutan ini dikemas dalam botol coklat (100-500-1000cc) dan dikenal sebagai giemsa stock yang ph 7 (Imam, 2013).

Faktor yang harus diperhatikan untuk mencapai pewarnaan yang baik :

- 1) Kualitas dari stock giemsa yang digunakan standar mutu
 - a) Stock giemsa yang belum tercemar air.
 - b) Zat warna pada giemsa masih aktif.
- 2) Kualitas dari air pengencer giemsa
 - a) Air pengencer harus jernih
 - b) Derajat keasaman pengencer hendaknya berada 6,8 sampai 7,2 perubahan ph pada larutan berpengaruh pada pewarnaan sel-sel darah
- 3) Kualitas pembuatan sediaan darah

Ketebalan sel darah yang akan diwarnai mempengaruhi hasil pewarnaan, semakin berat fiksasi akan semakin sukar bagi larutan giemsa menerobos plasma darah untuk mencapai sel darah merah untuk melakukan proses hemolisa.

4) Kebersihan sediaan darah

Zat warna yang mengendap dipermukaan pada akhir pewarnaan tertinggal pada sel darah dan mengotorinya. Oleh karena itu pada akhir pewarnaan larutan giemsa harus dibilas dengan air yang mengalir.

5) Lakukan pewarnaan

Giemsa stock harus diencerkan lebih dulu sebelum dipakai mewarnai sel darah. Elemen -elemen zat warna giemsa melarut selama 40-90 menit dengan air atau aquadest atau air buffer. Setelah itu semua elemen zat warna akan mengendap dan sebagian lagi balik ke permukaan membentuk lapisan tipis seperti minyak sebab itu giemsa tidak boleh tercemar air (Imam, 2013) .

2.5 Estimasi Jumlah Trombosit

Hitung trombosit harus dilakukan secara hati-hati terutama jika jumlahnya sedikit. Berbagai metode telah dikembangkan dari mulai manual dengan mikroskop fase kontras sampai alat otomatis, meski kecenderungan terjadi kesalahan.

Pada prinsipnya semua hasil hitung trombosit baik normal maupun abnormal yang diperiksa dengan alat otomatis maupun manual harus dilakukan *crosscheck* pada SADT. Hasil hitung trombosit yang rendah harus dikonfirmasi dengan sediaan apus darah tepi, mengingat trombositopenia dapat beresiko perdarahan sehingga penetapannya harus dilakukan dengan hati-hati. *Crosscheck* pada SADT bertujuan mengetahui ada tidaknya perbedaan antara hasil hitung trombosit dengan jumlah trombosit secara estimasi (Uswatun H, 2012). SADT untuk estimasi jumlah trombosit harus dibuat sebaik mungkin, sehingga terbentuk daerah baca yang baik. Trombosit harus terdistribusi rata dan tidak

menggerombol. Apabila trombosit cenderung bergerombol harus dibuat SADT baru.

Secara umum, pada orang normal didapatkan 8-20 trombosit setiap pembesaran 100x, namun ada pendapat lain menurut Barbara Brown untuk mencari estimasi jumlah trombosit terlebih dahulu di tentukan jumlah trombosit sebanyak 5-10 lapang pandang, rerata yang di dapatkan dikalikan dengan $20.00/\text{mm}^3$. Hasil perkalian tersebut merupakan jumlah trombosit secara estimasi, tetapi tidak dijelaskan alat hitung yang dipakai.

Faktor estimasi ditentukan berdasarkan rasio antara jumlah trombosit menurut alat yang dipakai dan rerata trombosit perlapang panadang. Faktor estimasi adalah jumlah total rasio yang diperoleh dibagi besar sampel (Uswatun H, 2012).