

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Antikoagulan

2.1.1 Pengertian Antikoagulan

Antikoagulan adalah suatu zat yang digunakan untuk mencegah pembekuan darah dengan cara mengikat kalsium atau dengan menghambat pembentukan trombin yang diperlukan untuk mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin dalam proses pembekuan. Spesimen yang berupa darah dan antikoagulan harus dicampur segera setelah pengambilan spesimen untuk mencegah pembentukan gumpalan darah dan dihomogenkan dengan lembut untuk mencegah hemolisis (Kiswari, 2014).

2.1.2 Macam-macam Antikoagulan :

a. *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid* atau EDTA

Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid atau EDTA adalah antikoagulan yang digunakan oleh laboratorium hematologi karena dapat mempertahankan komponen selular dan morfologi sel darah. EDTA bekerja dengan mengubah ion kalsium menjadi bentuk bukan ion (Wirawan, 2004).

EDTA dipakai dalam bentuk garamnya seperti garam natrium atau Na_2EDTA , Kalium atau K_2EDTA dan K_3EDTA . Semua garam EDTA bersifat hiperosmolar yang dapat menyebabkan eritrosit mengerut. pH Na_2EDTA dan K_2EDTA bersifat lebih asam dari K_3EDTA . (Wirawan, 2004).

Saat ini, tersedia tabung *vacutainer* yang sudah berisi antikoagulan diantaranya EDTA dan biasanya berupa K_3EDTA . Darah dengan antikoagulan

K₃EDTA menunjukkan stabilitas yang lebih baik dari garam EDTA lain karena darah dengan antikoagulan K₃EDTA menunjukkan pH yang mendekati pH darah (Wirawan, 2004).

Pada pemeriksaan hematologi penggunaan antikoagulan EDTA perlu diperhatikan batas waktu penyimpanan mengingat perubahan-perubahan yang terjadi *invitro* selama penyimpanan maupun karena pengaruh antikoagulan, maka darah segera diperiksa setelah berhasil ditampung. Bila dipergunakan EDTA maka batas waktu penyimpanan dalam suhu kamar untuk keperluan pemeriksaan hematologi adalah sebagai berikut.

Tabel 2.1: Batas waktu pemeriksaan hematologi dengan menggunakan EDTA

Jenis Pemeriksaan	Batas Waktu Maksimum Pemeriksaan
Kadar Hemoglobin	Relatif Stabil
Jumlah Eritrosit	6 jam
Jumlah Trombosit	1 jam
Jumlah Leukosit	2 jam
Laju Endap Darah	2 jam
Hematokrit	6 jam
Jumlah Retikulosit	6 jam
Preparat Darah Apus	1 jam

Sumber: (Wirawan, 2002).

Bila darah disimpan pada suhu 4°C maka pada umumnya pemeriksaan hematologi dapat dilakukan tidak lebih dari 12-18 jam (Wirawan, 2002).

Dosis EDTA yang digunakan adalah $1,50 \pm 0,25$ mg/ml darah. Cara konvensional yang biasa digunakan adalah 1-1,5 mg Na₂EDTA/ml darah. Untuk pemeriksaan hematologi diperlukan 3 ml darah sehingga Na₂EDTA yang dibutuhkan sebanyak 4,5 mg dalam bentuk serbuk. Untuk memudahkan pengukuran, maka dibuat larutan 10% dengan cara melarutkan 10 gram Na₂EDTA dalam 100 ml aquadest. Untuk darah sebanyak 3 ml dibutuhkan 4,5 mg serbuk EDTA. Sedangkan dalam bentuk larutan 10 % dibutuhkan 45 ul. Pemipetan harus

benar-benar diperhatikan, karena perbandingan jumlah darah dan antikoagulan harus tepat, apabila:

- a) Darah yang ditampung lebih banyak dari volume yang ditetapkan atau volume antikoagulan yang kurang menyebabkan hitung jumlah trombosit menurun.
- b) Darah yang ditampung kurang dari volume yang ditetapkan atau volume antikoagulan berlebihan menyebabkan hitung jumlah eritrosit menurun, hitung jumlah leukosit menurun, dan hitung jumlah trombosit menurun atau meningkat (Wirawan, 2004).

b. Heparin

Heparin mencegah pembekuan darah dengan cara menghambat pembentukan trombin. Trombin adalah enzim yang dibutuhkan untuk mengubah fibrinogen menjadi fibrin. Plasma dengan antikoagulan heparin sering sekali digunakan untuk beberapa tes kimia, misalnya elektrolit. Heparin tidak digunakan untuk membuat apusan darah tepi karena hasil pewarnaan dengan cara "Wright" akan membuat preparat terlalu biru atau gelap. Cara kerja heparin sebagai antitrombin atau penghambat aktivitas trombin, dengan takaran 0,1 mL larutan atau 1 mg dalam bentuk kering untuk setiap 10 ml darah. Heparin sedikit toksik dan harganya relatif mahal. Ada tiga formulasi heparin, yaitu amonium, litium, dan heparin sodium. Heparin litium dapat menyebabkan sedikit gangguan dalam pengujian kimia. Heparin tidak boleh digunakan pada spesimen untuk menguji kadar litium. Heparium sodium juga tidak boleh digunakan untuk spesimen yang digunakan untuk menguji kadar natrium (Kiswari, 2014).

c. *Double Oxalat* atau *Balance Oxalate Mixture*

Campuran antara 6 bagian ammonium oxalat dan 4 bagian kalium oxalat, amonium oxalat menyebabkan eritrosit mengembang dan kalium oxalat menyebabkan eritrosit mengkerut. Untuk menghindari perubahan volume eritrosit ini dibuat campuran kedua garam oxalat tersebut. Antikoagulan ini dipakai dalam keadaan kering dalam botol penampung darah.

Double oxalat digunakan untuk penentuan kadar Hb, PCV, LED. *Double oxalat* tidak dianjurkan untuk pemeriksaan hapusan darah, karena menyebabkan perubahan sel darah seperti krenasi eritrosit serta menyebabkan trombosit menggumpal.

d. Natrium citrate 3,8 %

Antikoagulan ini tidak toksik atau larutan isotonik dengan darah, oleh karena itu digunakan untuk transfusi darah. Antikoagulan ini juga dipakai untuk pemeriksaan LED, golongan darah dan pemeriksaan untuk faal hemostasis dengan perbandingan 9 bagian volume darah dan 1 bagian volume antikoagulan (Gandasoebrata, 2007).

e. Natrium Polianetol Sulfonat atau SPS

SPS mencegah koagulasi dengan mengikat kalsium. Digunakan untuk pengumpulan darah dalam pemeriksaan kultur. Selain sebagai antikoagulan, SPS juga mengurangi aktivitas dari protein yang disebut komplemen, yang menghancurkan bakteri. SPS juga memperlambat fagositosis dan mengurangi aktivitas antibiotik tertentu (Kiswari, 2014).

2.2 Tinjauan Tabung *Vacutainer* K₃EDTA

Tabung *vacutainer* merupakan tabung reaksi hampa udara yang terbuat dari kaca atau plastik. Apabila tabung *vacutainer* ini ditusukkan pada jarum maka darah akan mengalir masuk ke dalam tabung dan berhenti mengalir ketika sejumlah volume tertentu telah tercapai. Penggunaan tabung *vacutainer* ini pada pengambilan darah vena tidak perlu menggunakan spuit dan kondisi vakum mengontrol jumlah darah yang masuk ke dalam tabung sampai volume tertentu sehingga perbandingan antara takaran antikoagulan dengan volume darah dapat dipertanggungjawabkan (Kiswari, 2014).

Tabung ini pertama kali diciptakan oleh Joseph Kleiner pada tahun 1947, kemudian diproduksi secara massal oleh perusahaan Becton Dickinson. Tabung *vacutainer* memiliki beberapa jenis untuk pemeriksaan di laboratorium dengan warna tutup yang berbeda untuk tiap pemeriksaan (Dalimoenthe, 2002).

2.2.1 Kode Warna Tiap Tabung Vakum

Menurut Kiswari (2014) ada beberapa kode warna untuk tiap tabung vakum berisi antikoagulan yang berbeda-beda sesuai dengan jenis pemeriksaan, antara lain:

a. Tutup dan Etiket Merah

Tabung jenis ini telah berisi reagen *Clot Activator* yang akan mempercepat pembekuan darah. Umumnya digunakan untuk Kimia darah, Serologi dan Bank Darah.

b. Tutup dan Etiket Ungu Muda atau Lavender

Berisi antikoagulan K₃EDTA dan umumnya digunakan untuk pemeriksaan Hematologi. Ukuran tersedia antara lain 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 6 ml dan 8 ml.

c. Tutup dan Etiket Ungu atau Violet

Berisi antikoagulan K_2EDTA untuk mencegah pembekuan darah. Umumnya digunakan untuk pemeriksaan Hematologi. Yang membedakan hanyalah isi dari antikoagulannya saja. Tutup tabung berwarna lavender berisi antikoagulan K_3EDTA .

d. Tutup dan Etiket Biru

Berisi Trisodium sitrat 3. Tabung ini didesain khusus untuk tes koagulasi dan agregasi trombosit.

e. Tutup dan Etiket Hijau

Berisi Lithium Heparin dengan gel, baik digunakan sebagai antikoagulan karena tidak mengganggu analisa beberapa macam ion yang ada dalam darah. Direkomendasikan untuk pemeriksaan Kimia Darah, Kreatinin dan BUN, elektrolit dan enzim.

f. Tutup dan Etiket Abu – abu

Berisi Kalium Oxalate yang berfungsi sebagai antikoagulan pengawet sehingga dapat menstabilkan kadar gula darah selama 24 jam pada suhu ruangan dan selama 48 jam jika disimpan pada suhu $4^{\circ}C$.

g. Tutup dan Etiket Kuning

Disebut juga SST II atau *Serum Separator Tube*. Berisi Silica sebagai *Clot Activator* dan *Polymer Gel Inert* sebagai pemisah serum sehingga diperoleh kualitas serum yang bagus dan mengurangi resiko timbulnya fibrin yang bisa menyumbat instrumen. Sebagai pilihan terbaik untuk pemeriksaan kimia darah cito atau segera.

h. Tutup dan Etiket Hitam

Berisi Trisodium sitrat 3,8% untuk pemeriksaan LED atau Laju Endap Darah metode “Westergren”. Ukuran tabung dengan isi 2,4 ml volume cairan.

2.3 Tinjauan Umum Darah

Darah adalah jaringan cair yang terdiri atas dua bagian yaitu plasma darah dan sel darah. Sel darah terdiri dari tiga jenis yaitu eritrosit, leukosit dan trombosit. Volume darah secara keseluruhan adalah satu per dua belas berat badan atau kira-kira lima liter. Sekitar 55% adalah plasma darah, sedang 45% sisanya terdiri dari sel darah.

Manusia memiliki sistem peredaran darah tertutup yang berarti darah mengalir dalam pembuluh darah dan disirkulasikan oleh jantung. Darah dipompa oleh jantung menuju paru-paru untuk melepaskan sisa metabolisme berupa karbon dioksida dan menyerap oksigen melalui pembuluh arteri pulmonalis, lalu dibawa kembali ke jantung melalui vena pulmonalis. Setelah itu darah dikirimkan ke seluruh tubuh oleh saluran pembuluh darah aorta. Darah mengedarkan oksigen ke seluruh tubuh melalui saluran halus darah yang disebut pembuluh kapiler. Darah kemudian kembali ke jantung melalui pembuluh darah vena cava superior dan vena cava inferior. Darah juga mengangkut bahan sisa metabolisme obat-obatan dan bahan kimia asing ke hati untuk diuraikan dan ke ginjal untuk dibuang sebagai air seni (Pearce, 2006).

2.3.1 Komposisi Darah

Darah terdiri dari 2 komponen yaitu plasma darah dan butir-butir darah. Plasma darah adalah bagian cair darah yang sebagian besar terdiri atas air, elektrolit dan protein darah. Butir-butir darah atau *blood corpuscles* terdiri atas 3

elemen yaitu eritrosit atau sel darah merah, leukosit atau sel darah putih, dan trombosit atau butir pembeku (Pearce, 2006).

2.3.2 Sel Darah Merah atau Eritrosit

Eritrosit dibentuk melalui suatu proses pematangan yang terdiri dari beberapa tahap, yaitu pembelahan dan perubahan-perubahan morfologi sel-sel berinti mulai dari proeritroblas sampai ortokromatik eritroblas, kemudian pembentukan eritrosit yang masih memiliki sisa RNA atau disebut retikulosit yang akhirnya menjadi eritrosit (Kiswari, 2014).

Eritrosit berjumlah paling banyak dibandingkan sel-sel darah lainnya. Dalam satu mililiter darah, terdapat kira-kira 4,5-6 juta eritrosit, itu sebabnya darah berwarna merah. Parameter untuk mengukur keadaan eritrosit biasanya dilakukan dengan mengukur kadar hemoglobin di dalam darah dengan satuan gram per desiliter (g/dL), dan menghitung jumlah eritrosit. Untuk mengetahui ukuran eritrosit diperoleh dengan cara menghitung volume rata-rata yaitu *mean corpuscular volume* atau MCV, atau yang merupakan hasil dari hematokrit dibagi dengan jumlah eritrosit satuan femtoliter atau fL dengan nilai normal 80-100 fL. Bila nilai MCV kurang dari 80 fL disebut mikrositik, sebaliknya bila lebih dari 100 fL disebut makrositik. Umur eritrosit kira-kira 120 hari, sehingga setiap hari sekitar 1% dari jumlah eritrosit mati dan digantikan dengan eritrosit yang baru (Kiswari, 2014).

Eritrosit muda yang ada di dalam darah dapat diidentifikasi karena mengandung asam ribonukleat atau RNA dengan menggunakan pewarnaan khusus, seperti *new methylene blue*. Agregasi RNA akan tampak sebagai partikel yang disebut reticulin. Sel eritrosit muda yang mengandung RNA itu disebut

retikulosit, yang jumlahnya mencukupi untuk mengganti eritrosit yang mati. Pada apusan darah tepi, warna retikulosit agak kebiruan dibandingkan dengan eritrosit.

2.3.3 Keping Darah atau Trombosit

Trombosit adalah sel darah yang berperan penting dalam hemostasis. Trombosit melekat pada lapisan endotel pembuluh darah yang robek atau luka dengan membentuk *plug trombosit*. Trombosit tidak mempunyai inti sel, berukuran 1-4 μ , sitoplasmanya berwarna biru dengan granula ungu-kemerahan. Trombosit merupakan derivat dari megakariosit, berasal dari fragmen-fragmen sitoplasma megakariosit. Jumlah trombosit 150.000-350.000/mL darah. Umur trombosit sekitar 10 hari (Kiswari, 2014).

2.3.4 Sel Darah Putih atau Leukosit

Leukosit mempunyai peranan dalam pertahanan seluler dan humoral organisme terhadap zat-zat asing. Leukosit dapat melakukan gerakan *amuboid* dan melalui proses *diapedesis*, leukosit dapat meninggalkan kapiler dengan menerobos antara sel-sel endotel dan menembus ke dalam jaringan untuk mencapai tempat kuman penyakit yang menyerang pertahanan tubuh dan memfagositnya. Jumlah leukosit per mikroliter darah pada orang dewasa normal adalah 4.000-11.000 sel/mm³ darah dan pada waktu lahir 15.000-25.000 sel/mm³ darah (Effendi, 2003).

Beberapa jenis leukosit atau sel darah putih terdapat dalam darah. Leukosit pada umumnya dibagi menjadi granulosit yang mempunyai granula khas, dan agranulosit yang tidak mempunyai granula khas. Granulosit terdiri dari neutrofil, eosinofil, dan basofil. Agranulosit terdiri dari limfosit dan monosit. Meskipun leukosit merupakan sel darah, tetapi fungsinya lebih banyak dilakukan di dalam

jaringan. Selama berada di dalam darah, leukosit hanya bersifat sementara mengikuti aliran darah ke seluruh tubuh. Apabila terjadi peradangan pada jaringan tubuh, leukosit akan bermigrasi menuju jaringan yang mengalami radang dengan cara menembus dinding pembuluh darah atau kapiler (Kiswari, 2014).

2.3.4.1 Jenis-jenis leukosit

Ada beberapa jenis leukosit atau sel darah putih dan masing-masing memiliki fungsi yang berbeda, antara lain:

a. Neutrofil

Neutrofil adalah jenis leukosit yang paling banyak diantara jenis-jenis leukosit. Ada dua macam jenis neutrofil yaitu neutrofil stab atau batang dan neutrofil segmen. Neutrofil segmen sering disebut juga neutrofil polimorfonuklear karena inti selnya terdiri atas beberapa segmen atau lobus yang bentuknya bermacam-macam dan dihubungkan dengan benang kromatin. Jumlah segmen neutrofil adalah sebanyak 3-6, bila lebih dari 6 disebut dengan neutrofil hipersegmen. Granula sitoplasmanya tampak tipis dengan prosedur pewarnaan pada umumnya. Jumlah neutrofil segmen kira-kira 50-70% dari keseluruhan leukosit. Neutrofil batang yang sering disebut neutrofil tapal kuda mempunyai inti berbentuk tapal kuda. Neutrofil batang merupakan bentuk muda dari neutrofil segmen. Seiring dengan proses pematangan, bentuk intinya akan bersegmen dan menjadi neutrofil segmen. Fungsi utama neutrofil adalah sebagai fagositosis, pada umumnya terhadap bakteri. Neutrofil merupakan bentuk pertahanan tubuh yang utama untuk melawan bakteri. Bakteri yang mati karena obat-obatan antimikroba ternyata mengandung granula-granula. Neutrofil bersirkulasi di dalam darah kira-kira 10 jam dapat hidup selama 1-4

hari pada saat berada di dalam jaringan ekstrasvaskular. Sekali bermigrasi menuju jaringan ekstrasvaskular, neutrofil tidak dapat kembali lagi ke dalam darah. Populasi neutrofil di sepanjang permukaan endotel pembuluh darah dapat dengan cepat berubah pada saat terjadi stres atau infeksi.

b. Eosinofil

Eosinofil mengandung granula kasar yang berwarna merah oranye atau eosinofilik yang tampak pada apusan darah tepi. Intinya bersegmen pada umumnya dua lobus. Fungsi eosinofil juga sebagai fagositosis dan menghasilkan antibodi terutama terhadap antigen yang dikeluarkan oleh parasit. Jumlah eosinofil normal adalah 2-4% dan akan meningkat bila terjadi reaksi alergi atau infeksi parasit.

c. Basofil

Basofil mengandung granula kasar berwarna ungu atau biru tua dan seringkali menutupi inti sel. Inti sel bersegmen. Basofil adalah jenis leukosit yang paling sedikit jumlahnya, yaitu kira-kira $< 2\%$ dari jumlah keseluruhan leukosit. Granula pada basofil mengandung heparin yaitu antikoagulan, histamin, dan substansi anafilaksis. Basofil berperan dalam reaksi hipersensitivitas yang berhubungan dengan imunoglobulin E. (Kiswari, 2014).

d. Limfosit

Limfosit adalah jenis leukosit yang jumlahnya kedua paling banyak setelah neutrofil yaitu 20-40% dari total leukosit. Jumlah limfosit pada anak-anak relatif lebih banyak dibandingkan jumlahnya pada orang dewasa, dan jumlah limfosit ini meningkat apabila terjadi infeksi virus. Ada beberapa jenis limfosit berdasarkan ukurannya, yaitu:

- a) *Resting lymphocyte* biasanya berukuran kecil yaitu 7-10 μm , hampir sama dengan ukuran eritrosit, inti sel berbentuk bulat atau oval
- b) *Reactive "atypical" lymphocyte* berukuran paling besar. Jumlahnya meningkat bila terjadi infeksi, misalnya mononukleosis.
- c) *Large granular lymphocyte* berukuran lebih besar daripada limfosit kecil yang mengandung granula kasar azurofilik. Limfosit ini berperan sebagai sel *Natural Killer* atau sel NK dalam imunologi.

Berdasarkan fungsinya, limfosit dibagi atas sel B dan sel T. Sel B terutama berefek pada sistem imun humoral, yang berkembang di dalam sumsum tulang dan dapat ditemukan dalam limfonodus, limpa, dan organ lainnya selain berada dalam darah. Setelah terjadi rangsangan dari antigen, sel B akan berkembang menjadi sel plasma yang dapat memproduksi antibodi.

e. Monosit

Jumlah monosit kira-kira 3-8% dari total jumlah leukosit. Setelah 8-14 jam berada di dalam darah, monosit menuju ke jaringan dan menjadi makrofag yang disebut juga histiosit. Monosit adalah jenis leukosit yang paling besar. Inti selnya mempunyai granula kromatin halus yang menekuk berbentuk menyerupai ginjal atau biji kacang. Monosit mempunyai dua fungsi, yaitu sebagai fagosit mikroorganisme khususnya jamur dan bakteri dan benda asing lainnya, serta berperan dalam reaksi imun (Kiswari, 2014).

Leukositosis yaitu jumlah leukosit yang meningkat melebihi normal misalnya terjadi pada infeksi bakteri, apendisitis, leukemia, dan ulkus. Hitung jumlah leukosit menurun di bawah harga normal disebut leukopenia misalnya terjadi pada penyakit virus seperti campak, demam tifoid, serta infeksi hepatitis.

Radiasi dan terapi obat-obatan atau kemoterapi dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit (Corwin, 2009).

2.3.4.2 Hitung Jumlah Leukosit

Hitung jumlah leukosit bertujuan untuk menghitung jumlah leukosit per satuan volume darah. Ada 2 cara untuk menghitung jumlah leukosit, yaitu:

a. Hitung jumlah leukosit secara manual

Cara langsung hitung jumlah leukosit yaitu darah diencerkan dengan larutan Turk dan dihitung menggunakan kamar hitung *Improved Neubauer*. Prinsip pemeriksaan secara manual dengan kamar hitung *Improved Neubauer* yaitu spesimen yang mengandung elemen selular seperti leukosit dan eritrosit dicampur dengan larutan pengencer pada volume tertentu. Larutan pengencer akan melisis eritrosit sehingga leukosit akan mudah dihitung. Hitung leukosit secara manual sangat bermanfaat pada kasus jumlah leukosit sangat sedikit (Kiswari, 2014).

Selain hitung jumlah leukosit, hitung jenis leukosit juga dapat dilakukan secara manual. Hitung jenis leukosit bertujuan untuk menghitung presentase jenis-jenis leukosit di dalam darah tepi. Leukosit dihitung dari apusan darah tepi sebanyak 100-200 sel. Lima jenis leukosit yang dihitung yaitu neutrofil termasuk neutrofil batang atau stab dan neutrofil segmen, limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil (Kiswari, 2014). Prinsip pemeriksaan sediaan apus ini adalah dengan meneteskan darah lalu dipaparkan di atas objek glass kemudian dilakukan pengecatan dengan berbagai metode seperti pewarnaan Giemsa, pewarnaan *Acid Fast*, maupun pewarnaan Wright, dan diperiksa di bawah mikroskop.

b. Hitung jumlah leukosit secara otomatis

Penghitung sel otomatis mampu mengukur secara langsung hitung leukosit selain hitung eritrosit dan hitung trombosit. Sebagian besar alat menghitung trombosit dan eritrosit bersama-sama, namun keduanya dibedakan berdasarkan ukuran. Partikel yang lebih kecil dihitung sebagai trombosit dan partikel yang lebih besar dihitung sebagai eritrosit.

2.4 Pengaruh Antikoagulan K₃EDTA terhadap Jumlah Leukosit

Apabila pemakaian antikoagulan K₃EDTA maka dapat menyebabkan perubahan pada morfologi neutrofil, seperti pembengkakan, rusaknya struktur lobus neutrofil, vakuolisasi sitoplasma dan inti sel, sehingga sel akan mengalami desintegrasi atau perubahan pada lobus neutrofil yang menyebabkan kerusakan neutrofil. Bila desintegrasi merusak struktur lobus neutrofil, maka sel tersebut tidak terhitung oleh alat penghitung otomatis maupun secara manual sehingga dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit (Wirawan, 2004).

2.5 Hipotesis

Ada perbedaan jumlah leukosit pada volume darah yang berbeda dalam tabung *vacutainer* EDTA.