

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Darah

Darah adalah cairan tubuh yang sangat penting bagi kehidupan manusia, mengalir melalui jantung dan pembuluh darah. Darah berfungsi sebagai mengangkut oksigen dan nutrisi ke seluruh sel tubuh serta mengangkut hasil metabolisme sel. Darah beredar dalam pembuluh darah arteri dan vena, serta merupakan bagian dari sistem organ tubuh manusia (Firani, 2018)

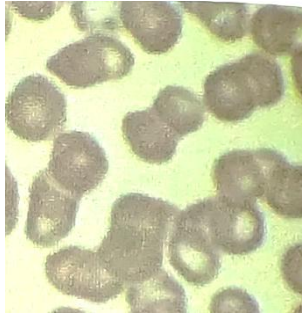
Keberadaan darah sangat penting untuk menjaga keseimbangan fisiologis tubuh manusia. Fungsi utamanya adalah mendistribusikan berbagai zat yang diperlukan oleh sel-sel tubuh, seperti oksigen, produk metabolisme, nutrisi (seperti glukosa, protein, lemak, dan vitamin), serta elektrolit. Selain itu, darah juga berperan dalam menyampaikan sinyal melalui hormon ke organ target tertentu (Firani, 2018)

2. Komponen Sel Darah

a. Eritrosit

Eritrosit atau sel darah merah merupakan sel yang berbentuk cakram bionkaf, tidak berinti, tidak bergerak, berwarna merah karena mengandung hemoglobin. Eritrosit memiliki ukuran 7,5 μm dan tebal 2,0 μm . Jumlah eritrosit pada tubuh manusia mencapai 4,5-5 juta/ mm^3 (Nugraha, 2021). Eritrosit berfungsi untuk mengangkut

zat pernapasan berupa oksigen (O_2) dari paru-paru ke jaringan dan Karbon dioksida (CO_2) dari jaringan ke paru-paru. Eritrosit didalam arteri akan berwarna merah cerah karena mengandung O_2 dan eritrosit pada pembuluh darah vena berwarna merah gelap karenamengandung CO_2 (Yayuningsih, dkk., 2018).



Gambar 1. Sel Eritrosit.

Sumber: Bain, 2014.

b. Leukosit

Leukosit atau sel darah putih, memiliki karakteristik yang beragam tergantung pada jenisnya. Secara umum, leukosit berukuran lebih besar dibandingkan eritrosit, tidak memiliki warna, dan mampu bergerak dengan bantuan kaki semu (pseudopodia). Masa hidup leukosit berkisar antara 14 hingga 20 hari, dengan jumlah dalam tubuh manusia sekitar $4.000\text{--}11.000/\text{mm}^3$ (Nugraha, 2021).

Leukosit memiliki lima jenis yaitu: Neutrofil, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit. Sitoplasma leukosit terdapat butiran yang berasal dari lisosom disebut granula. Sel yang bergranula

disebut granulosit. Granulosit mencakup neutrofil, eosinofil dan basofil. Sedangkan, leukosit yang tidak bergranula disebut agranulosit mencakup monosit dan limfosit. Ada tidaknya granula dalam leukosit dan reaksinya terhadap zat warna, granula menjadi bagian penting dalam menentukan jenis leukosit selain bentuk dan ukurannya (Nugraha, 2021).

1) Neutrofil

Sel neutrofil pada tubuh manusia merupakan sel paling banyak yaitu sekitar 50-70% dibandingkan leukosit yang lain. Neutrofil memiliki ukuran 14 μm , inti padat berbentuk batang dan segmen. Granula neutrofil berbentuk butiran halus tipis dengan sifat netral sehingga terjadi pencampuran warna asam (eosin) dan warna basa (biru metilen) pada granula yang menghasilkan warna ungu atau merah muda yang samar. Terdapat dua macam neutrofil yaitu neutrofil batang dan neutrofil segmen.

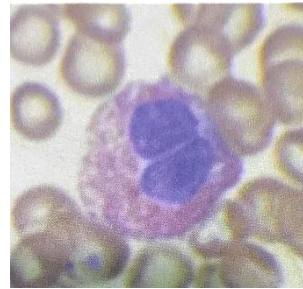


Gambar 2. Neutrofil.

Sumber: Bain, 2014.

Perbedaan kedua neutrofil dapat dilihat pada bentuk intinya. Neutrofil batang memiliki bentuk inti seperti tapal kuda sedangkan neutrofil segmen memiliki bentuk inti seperti lobus dan sitoplasma yang pucat (Nugraha, 2021).

2) Eosinofil



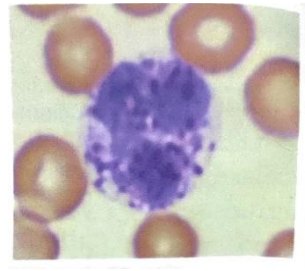
Gambar 3. Eosinofil.

Sumber: Bain, 2014.

Eosinofil merupakan salah satu jenis leukosit yang terlibat dalam alergi dan infeksi terutama parasit didalam tubuh. Eosinofil akan terus meningkat selama alergi atau infeksi parasit masih ada didalam tubuh (Yayuningsih, dkk., 2018).

Jumlah eosinofil didalam tubuh manusia sekitar 1-3%, eosinofil memiliki ukuran 16 μm dengan granula sitoplasma bersifat eosinofilik sehingga pada pengecatan warna giemsa akan berwarna merah karena mengikat zat warna eosin, memiliki ukuran granula sama besar atau teratur (Nugraha, 2021).

3) Basofil



Gambar 4.Basofil.

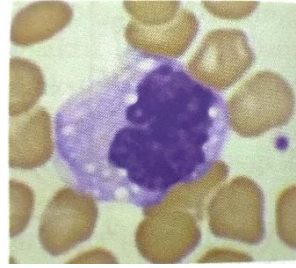
Sumber: Bain, 2014.

Basofil merupakan salah satu jenis leukosit yang terlibat dalam alergi jangka panjang seperti: asma, alergi kulit dan lain-lain. Hitung basofil akan meningkat jika masih dalam masa proses penyembuhan (Yayuningsih, dkk., 2018).

Sel basofil memiliki ukuran sekitar 14 μm , memiliki granula berukuran variasi dengan susunan tidak teratur hingga menutupi nukleus. Granula bersifat basofilik sehingga pada pewarnaan giemsa akan bewarna gelap (Nugraha, 2021).

4) Monosit

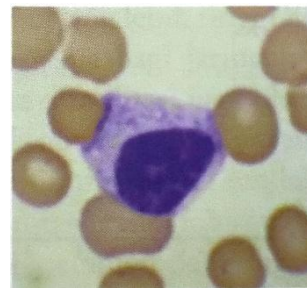
Monosit merupakan pertahanan baris kedua terhadap infeksi bakteri, sel leukosit yang memiliki ukuran paling besar yaitu 18 μm , memiliki inti padat dan melekuk seperti ginjal atau bulat seperti telur dan sitoplasma tidak mengandung granula (Nugraha, 2021).



Gambar 5. Monosit.

Sumber: Bain, 2014.

5) Limfosit



Gambar 6. Limfosit

Sumber: Bain, 2014.

Limfosit merupakan salah satu leukosit yang berperan dalam proses kekebalan dan pembentukan antibodi pada tubuh. Peningkatan jumlah limfosit jika terjadi infeksi kronis dan virus yang disebabkan oleh leukemia limfositik kronis (Yayuningsih, dkk, 2018).

Limfosit memiliki ukuran 12 μm , nukelus padat hampir menutupi semua bagian sel, tidak bergranula, sitoplasma merah muda kebiruan, nukleus bewarna biru tua keunguan, sitoplasma dan inti sel tampak rapuh atau tidak padat (Yayuningsih, dkk., 2018).

c. Trombosit

Trombosit atau keping darah merupakan potongan-potongan kecil dari sitoplasma megakariosit. Jumlah trombosit didalam tubuh orang dewasa antara 150.000-400.000 keping/mm³. Trombosit merupakan komponen penting dalam proses hemostasis. Trombosit memiliki ukuran sangat kecil yaitu 2-4 μ m dengan bentuk bulat atau lonjong. Trombosit dapat bergerak aktif karena mengandung protein yang dapat menunjang perpindahan trombosit secara cepat dan tenang jika terjadi kerusakan pembuluh darah. Trombosit berfungsi membentuk sumbatan terhadap cidera vaskuler dengan pelekatan terhadap dinding pembuluh darah yang rusak (adhesi), melakukan pelekatan trombosit dengan trombosit (agregasi) sehingga terjadi pengumpulan trombosit dan reaksi pelepasan (sekresi) (Nugraha, 2021).

d. Plasma

Plasma merupakan komponen cairan yang mengandung berbagai nutrisi atau substansi lainnya yang diperlukan oleh tubuh manusia, meliputi: protein, albumin, globulin, faktor-faktor pembekuan darah dan berbagai macam elektrolit. Plasma berfungsi sebagai sistem penyangga tubuh untuk mempertahankan keadaan asam-basa (Firani, 2018).

3. Pemeriksaan Hematologi

Pemeriksaan hematologi merupakan pemeriksaan yang berhubungan dengan sel-sel darah dan biokimia darah. Pemeriksaan hematologi bertujuan untuk menerapkan diagnosis penyakit yang berhubungan dengan sel-sel darah atau mengonfirmasi dugaan klinis, sebagai skrining suatu penyakit yang berhubungan dengan darah dan memberikan gambaran status kesehatan (Maulidiyanti, dkk., 2024)

Pemeriksaan hematologi mencakup pemeriksaan hitung darah lengkap yang meliputi: Laju Endap Darah (LED) Hemoglobin (Hb), hitung jumlah sel darah merah (eritrosit), hitung jumlah sel darah putih (leukosit), hitung jumlah trombosit, hematokrit dan pemeriksaan Sediaan Apusan Darah (SADT) (Mehta dan Hoffbrand, 2014).

4. Sediaan Apusan Darah Tepi

Sediaan Apusan Darah Tepi (SADT) merupakan pemeriksaan untuk mengamati morfologi sel darah dan komponen-komponen lainnya secara mikroskopik yang bertujuan untuk memberikan informasi terkait kondisi hematologi seseorang (Maulidiyanti, dkk., 2024). Terdapat dua jenis sediaan apus darah tepi yaitu sediaan apus tebal dan sediaan apus tipis. Sediaan apusan darah tepi yang sudah dibuat diberi pewarna untuk mempermudah dalam pengamatan mikroskopik. Pewarna yang digunakan yaitu dengan menggunakan prinsip romanowsky.

Menurut Kiswari (2014), terdapat pembagian zona apusan darah tepi berdasarkan populasi (distribusi) eritrosit sebagai berikut :

a. Zona I (*Irregular Zone*)

Distribusi eritrosit yang tidak teratur, ada yang bergerombol sedikit atau banyak (tidak selalu sama pada masing-masing preparat). Zona ini sekitar 3% dari seluruh badan preparat.

b. Zona II (*Thin Zone*)

Distribusi eritrosit tidak teratur, saling bertumpukan (overlap) atau berdesakan. Zona ini meliputi sekitar 14%.

c. Zona III (*Thick Zone*)

Distribusi eritrosit saling bergerombol lebih rapat dibandingkan zona II, bertumpukan dan berdesakan. Zona ini merupakan daerah paling luas sekitar 45% dari seluruh badan preparat.

d. Zona IV (*Thin Zone*)

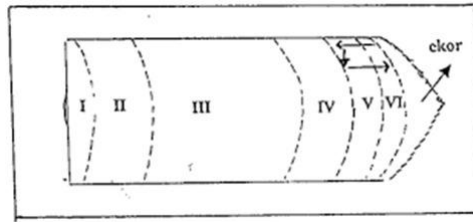
Keadaanya sama dengan zona II. Distribusi eritrosit tidak teratur, saling bertumpukan (overlap) dan berdesakan. Zona ini meliputi sekitar 18%.

e. Zona V (*Even Zone/ Reguler Zone*)

Distribusi eritrosit tersebar merata tidak saling bertumpukan atau berdesakan, sehingga bentuknya masih utuh. Zona ini meliputi 11%.

f. Zona VI (*Very Thin Zone*)

Merupakan daerah yang terletak di ujung preparat bersebelahan dengan daerah ekor. Distribusi eritrosit agak longgar dibandingkan populasi pada zona II atau IV. Zona ini meliputi sekitar 9%.

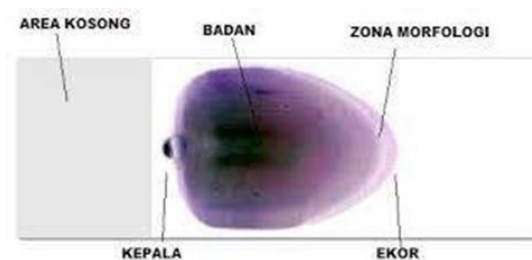


Gambar 7. Zona Sediaan Apus Darah Tepi.

Sumber: Budiwiyono, 1995.

Pembacaan morfologi sel pada preparat apusan darah dapat dilakukan pada zona V yang dekat dengan bagian ekor dimana sel tersebar merata, tidak bertumpukan atau berdesakkan sehingga sel berbentuk masih utuh (Kiswari, 2014).

5. Kriteria Apusan Darah

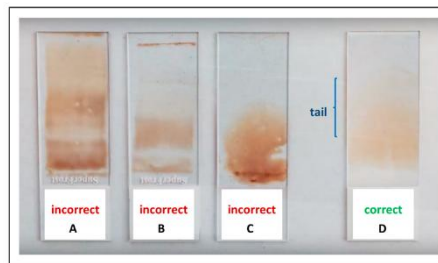


Gambar 8. Kriteria Sediaan Apus Darah Tepi yang Baik.

Sumber: Arif, 2015.

Apusan darah tepi yang baik harus memenuhi kriteria yang baik secara visual atau mikrokopis, diantaranya:

- a. Ketebalannya, bagian tebal terdapat dibagian kepala dan menipis ke arah ekor.
- b. Apusan tidak menyentuh pinggir objek.
- c. Tidak berlubang-lubang.
- d. Bagian ekor tidak membentuk bendera robek.
- e. Panjang apusan $2/3$ dari panjang kaca objek (Kiswari, 2014).



Gambar 9. Kriteria SADT Baik dan Tidak Baik.

Sumber: Zaninetti dan Greinacher, 2020.

Salah satu contoh sediaan apus yang baik dan tidak baik dapat dilihat pada gambar 9. Preparat *incorecct* menandakan bahwa preparat SADT tersebut tidak sesuai kriteria atau tidak baik. Preparat *correct* menandakan bahwa preparat SADT sesuai dengan kriteria yang baik. Oleh karena itu, peneliti harus memiliki batasan-batasan yang memenuhi kriteria dalam pembuatan SADT yang baik atau sesuai.

6. Fiksasi

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) adalah slide yang permukaannya dilapisi dengan lapisan tipis darah, kemudian diwarnai dengan

pewarnaan Giemsa. Sebelum proses pewarnaan, preparat terlebih dahulu difiksasi menggunakan metanol. Fiksasi berfungsi untuk menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah keadaan yang sebenarnya, fiksasi juga berfungsi untuk merekatkan sediaan apus darah tepi dan membantu penyerapan warna dengan sempurna. Fiksasi yang umum digunakan di laboratorium hematologi ini menggunakan metanol absolut (Mustafa, dkk., 2024).

Fiksasi metanol absolut berfungsi agar apusan darah dapat menyerap cat dengan sempurna, dapat melekatkan apusan darah pada obyek glass sehingga apusan darah tidak mengelupas dan menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah keadaan (struktur) sebenarnya (Warsita dkk., 2019). Jika larutan fiksasi tidak efektif karena penguapan atau penurunan konsentrasi, hal ini dapat menyebabkan perubahan morfologi sel dan perlekatan yang buruk pada preparat yang mempengaruhi kualitas hasil pemeriksaan (Ghofur, dkk., 2022).

7. Pewarnaan Giemsa

Pewarnaan Giemsa dilakukan dengan prinsip romanowsky. Prinsip romanowsky yaitu mengandung zat warna yang terdiri dari Azure B (*trimethylthionin*) bersifat basa mengikat anion sehingga memberikan hasil warna biru pada asam nukleat, granula basofil dan granula eosinofil dan zat warna eosin Y (*tetrabromoflourescein*) bersifat asam mengikat kation sehingga memberikan hasil warna merah-oranye terhadap hemoglobin dan granula eosinofil (Kiswari, 2014). Prinsip

romanowsky sudah dianjurkan oleh *The International Council For Standardization In Hematology* (ICSH) dan salah satu pewarnaan yang direkomendasikan adalah pewarnaan Giemsa (Yayuningsih, dkk., 2018).

Pewarnaan giemsa adalah zat warna yang terdiri eosin dan metilen azur memberikan hasil warna merah muda pada sitoplasma dan *metilin blue* memberi hasil warna biru pada inti sel leukosit. Zat-zat warna tersebut dilarutkan dengan metil alkohol dan gliserin (Maulidiyanti dkk, 2024). Pengencer giemsa idealnya mempunyai pH sesuai tubuh manusia yaitu 6,4-7,2 agar tidak berpengaruh pada pewarnaan morfologi sel darah. Jika terlalu asam atau basa akan menimbulkan masalah dalam pewarnaan. Larutan buffer pada pewarnaan giemsa berfungsi untuk mempertahankan keadaan pH saat basa atau asam yang ditambahkan kedalam larutan (Maulidiyanti, dkk., 2024). Penggunaan larutan buffer dengan pH diatas 6,8 menyebabkan tingginya penyerapan azure B sehingga granula dan inti sel neutrofil berwarna gelap. Pada sel eritrosit, penggunaan pH buffer yang tinggi menyebabkan tingginya penyerapan azure B sehingga eritrosit berwarna biru gelap (Oktyani, dkk., 2022). Pada sel leukosit, salah satunya sel eosinofil, penggunaan buffer pH yang tinggi menyebabkan meningkatnya penyerapan azure B pada sel tersebut sehingga granula dan inti berwarna biru gelap (Bain, 2021).

Pemakaian pewarnaan giemsa 10% pada penelitian ini yaitu menggunakan pengenceran buffer pH 6,8 bertujuan menstabilisasikan pH kemudian pewarnaan giemsa 10% digunakan secara berulang untuk pewarnaan SADT, hal ini bertujuan untuk mengevaluasi apakah pewarnaan giemsa yang dipakai secara berulang dapat menjaga stabilitas pH pewarnaan atau masih efektif jika digunakan berulang kali sebanding dengan pewarnaan teknik konvensional yang dilakukan sesuai Standar Operasional (SOP). Pada penelitian ini pewarnaan giemsa akan digunakan secara berulang selama 5 hari yang di simpan pada *chamber stain* dengan suhu ruang.

8. Sumber Kesalahan Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi

Menurut Yayuningsih dkk. 2018, mecantumkan kesalahan berikut ini yang dapat mempengaruhi hasil pada sediaan apusan darah tepi :

- a. Kesalahan dalam persiapan pasien, pengambilan dan penyimpanan bahan pemeriksaan, hal ini akan menyebabkan perubahan hasil dari nilai yang sebenarnya (sampel yang tidak representatif).
- b. Sediaan apus terlalu biru memungkinkan disebabkan oleh apusan yang terlampau tebal, pewarnaan terlalu lama, kurang pencucian, zat warna atau larutan dapar yang alkalis.
- c. Sediaan apus terlalu merah mungkin disebabkan oleh zat warna sediaan atau larutan dapar yang asam. Larutan dapar yang terlalu asam dapat menyebabkan leukosit hancur.

- d. Bercak-bercak zat warna pada sediaan apus darah tepi dapat disebabkan oleh zat warna yang tidak disaring sebelum dipakai atau pewarnaan terlalu lama sehingga zat warna mongering pada sediaan.
- e. Morfologi sel yang terbaik adalah bila menggunakan darah tepi langsung tanpa antikoagulan. Bila menggunakan antikoagulan sediaan apus harus dibuat segera, tidak lebih dari 1 jam setelah pengambilan darah. Penggunaan antikoagulan heparin akan menyebabkan latar belakang berwarna biru dan leukosit menggumpal.
- f. Sediaan apus yang tidak rata dapat disebabkan oleh kaca apusan yang tidak bersih atau piggirannya tidak rata atau oleh kaca objek yang berdebu, berlemak dan terdapat sidik jari.
- g. Fiksasi yang tidak baik menyebabkan perubahan morfologi dan warna sediaan. Ini mungkin terjadi apabila fiksasi dilakukan menggunakan methanol yang tidak absolut karena telah menyerap uap air akibat penyimpanan yang kurang baik.
- h. Fiksasi yang tidak dilakukan segera setelah sediaan apus kering dapat mengakibatkan perubahan morfologi leukosit (Yayuningsih, dkk., 2018).

9. Efisiensi dan Efektivitas

Efisiensi dan efektivitas adalah dua aspek penting untuk meningkatkan produktivitas dan memastikan kualitas hasil

pemeriksaan. Efisiensi pada penelitian ini berkaitan dengan optimalisasi waktu, tenaga, biaya dan sumber daya yang digunakan, sedangkan efektivitas merujuk pada pencapaian hasil yang sesuai dengan tujuan, seperti menghasilkan sediaan apus yang terwarnai dengan baik dan dapat diinterpretasi secara akurat. Oleh karena itu, untuk mendapatkan hasil yang optimal maka digunakan alat pewarnaan yaitu *chamber stain*.

Tabel 1. Kriteria Penilaian Efektivitas.

Presentase	Kriteria
>100%	Sangat Efektif
90-100%	Efektif
80-90%	Cukup Efektif
60-80%	Kurang Efektif
<60%	Tidak Efektif

Sumber: Kemendagri 1996 dalam Nabilah dan Setiawan ,2022.

10. *Chamber stain*

Staining jar adalah wadah khusus yang digunakan dalam proses pewarnaan (*staining*) preparat mikroskopis, seperti jaringan dan darah untuk mempermudah pencelupan preparat ke dalam larutan pewarna. *Staining jar* biasanya terbuat dari kaca, plastik, atau logam tahan bahan kimia yang dirancang untuk menampung pewarna atau reagen serta menjaga preparat tetap terendam selama waktu pewarnaan yang diperlukan. Wadah ini sering digunakan dalam laboratorium sitohistologi, mikrobiologi dan hematologi.



Gambar 10. *Staining Jar* Bahan Kaca.

Sumber: (Suvarna, dkk., 2018).

Staining jar ini sering digunakan saat melakukan praktikum di Poltekkes Kemenkes Yogyakarta Jurusan Teknologi Laboratorium Medis. *Staining jar* digunakan saat di laboratorium hematologi, sitohistologi dan mikrobiologi. *Staining jar* yang digunakan juga memiliki bahan yang berbeda, di laboratorium sitohistologi menggunakan *staining jar* yang terbuat dari kaca dapat menampung 10 preparat dengan cara mencelupkan preparat di *staining jar* (Suvarna dkk, 2018), di laboratorium mikrobiologi dan hematologi menggunakan *staining jar* berupa bak pengecatan yang terbuat dari *plexiglas* (plastik akrilik) yang digunakan dengan cara meneteskan pewarnaan diatas sediaan preparat.



Gambar 11. Bak Pengecatan Bahan Plexiglas.

Sumber: (Kiswari, 2014).

Pemeriksaan laboratorium dengan banyaknya sampel yang digunakan pada saat praktikum di laboratorium membuat kurang efisien waktu dalam melakukan pewarnaan, contohnya seperti melakukan pewarnaan SADT di laboratorium hematologi yang dilakukan dengan cara meneteskan pewarnaan secara satu persatu, hal itu membuat kurang praktis dan hasil pewarnaan yang tidak konsisten saat melakukan pewarnaan. Oleh karena itu, terdapat produk atau alat yang digunakan sebagai solusi dan inovasi serta diharapkan dapat meningkatkan efisien dan efektif saat melakukan pewarnaan yaitu alat *chamber stain*.

Chamber stain adalah alat bantu yang digunakan untuk mempermudah proses pewarnaan preparat sediaan apus darah tepi. Alat ini terbuat dari plastik *3D printing* dengan ukuran 10,5x10,5x 8 cm yang dapat menampung volume pewarna 400 ml dengan slot pewarnaan 46 preparat dalam sekali pewarnaan. Bak pengecatan ini terdiri dari bagian atas sebagai penutup, bagian dalam atau tengah terdapat rak pengecatan atau slot pewarnaan dan bagian paling luar sebagai penampung pewarna. Dengan menggunakan *chamber stain*, volume pewarna yang digunakan lebih efisien dan proses pewarnaan lebih praktis dan singkat.



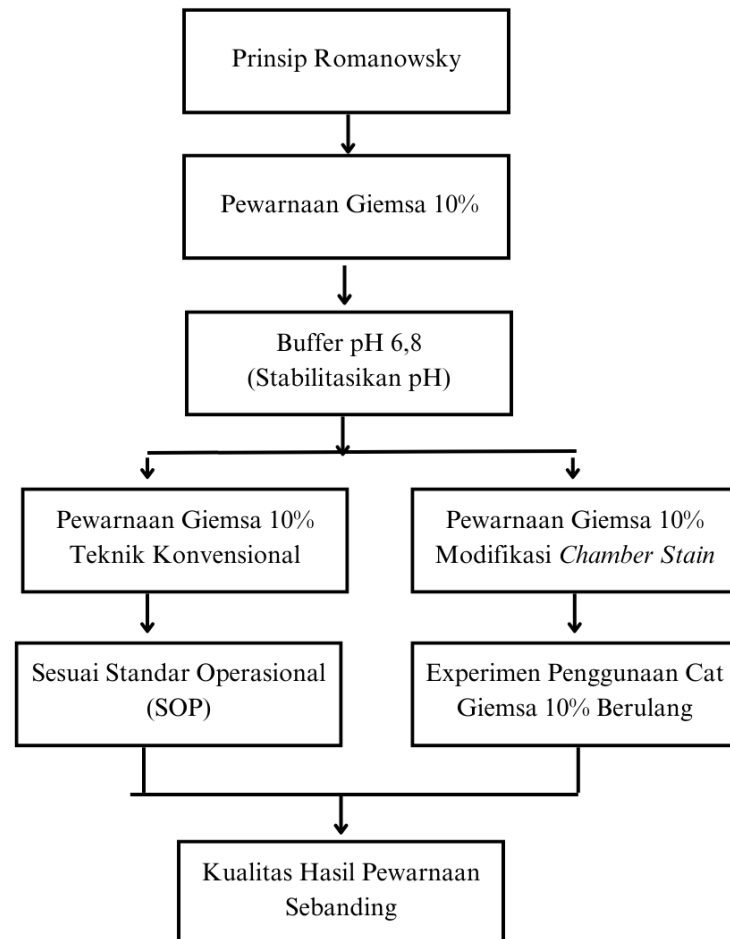
Gambar 12. *Chamber Stain*.

Sumber: Poltekkes Kemenkes Yogyakarta Jurusan Teknologi
Laboratorium Medis, 2024.

Keunggulan penggunaan *chamber stain* adalah kemampuan untuk mengurangi pemborosan pewarnaan, posisi preparat vertikal sehingga tidak ada endapan pewarna giemsa dan dapat mempersingkat waktu karena *chamber stain* dapat menampung 46 preparat sehingga hasil pewarnaan yang lebih merata atau konsisten dan membantu pemeriksaan lebih akurat, dibandingkan dengan teknik konvensional saat pewarnaan yaitu dengan cara meneteskan beberapa larutan ke sediaan preparat secara horizontal yang memungkinkan adanya endapan dari cat pewarnaan sehingga menghasilkan pewarnaan tidak konsisten.

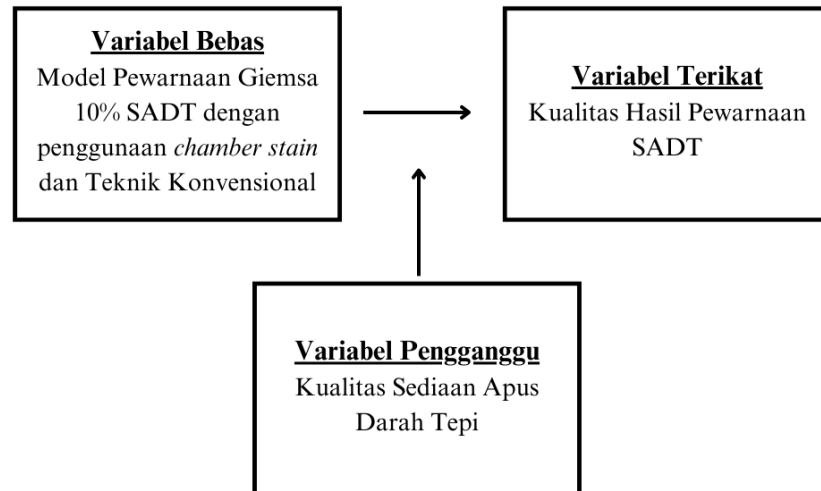
B. Kerangka Teori

Kerangka teori penelitian ini ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar 13. Kerangka Teori.

C. Hubungan antar Variabel



Gambar 14. Hubungan antar Variabel.

D. Hipotesis

Pemakaian pewarnaan giemsa 10% secara berulang yang disimpan dalam *chamber stain* tidak mengurangi kualitas hasil pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi (SADT).