

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Darah

Darah merupakan jaringan cair yang terdiri dari dua bagian. Bahan intraseluler adalah cairan yang disebut plasma dan di dalamnya terdapat unsur-unsur padat yaitu sel darah merah. Volume darah secara keseluruhan kira-kira satu per dua belas berat badan atau kira-kira 5 liter. Sekitar 55% adalah cairan dan 45% sisanya terdiri atas sel darah. Angka ini dinyatakan dalam nilai hematokrit (Pearce, 2016).

Darah adalah cairan yang terdapat pada manusia sebagai alat transportasi berfungsi untuk mengirimkan zat-zat dan oksigen yang diperlukan oleh jaringan tubuh, mengangkut bahan-bahan kimia hasil metabolisme dan juga sebagai pertahanan tubuh terhadap virus dan bakteri. Warna merah dari darah dapat berubah, tergantung pada banyaknya oksigen dan karbon dioksida di dalamnya. Adanya oksigen dalam darah diambil dengan jalan bernapas dan zat ini sangat berguna pada peristiwa pembakaran atau metabolisme di dalam tubuh. Darah berfungsi untuk mengangkut O₂ dari paru ke jaringan dan CO₂ dari jaringan ke paru. (Yayuningsih, dkk., 2017). Darah terdiri dari 50-60% cairan darah berupa plasma atau serum dan sisanya sel-sel darah (Kiswari, 2014).

2. Sel-Sel Darah

a. Eritrosit

Sel darah merah atau eritrosit merupakan sel darah yang berbentuk seperti cakram bikonkaf, tidak berinti, berwarna kuning kemerah-merahan, berukuran 0,007 mm, berjumlah 4,5-5 juta/mm³, bersifat kenyal sehingga dapat berubah bentuk sesuai dengan pembuluh darah yang dilalui. Sel darah merah dibentuk di sumsum tulang. Sel darah merah berada di dalam sistem peredaran selama 105-120 hari, kemudian eritrosit dihancurkan di organ limpa (Syarifuddin, 2016). Eritrosit berbentuk bulat dan terwarnai merah muda kebiruan atau abu-abu pada pewarnaan giemsa dan dibagian tengahnya terwarnai merah muda pucat atau tidak terwarnai, sehingga terlihat lebih pucat (Riswanto, 2013). Eritrosit berjumlah paling banyak dibandingkan sel-sel darah lainnya. Eritrosit yang membuat darah berwarna merah (Kiswari, 2014).

b. Leukosit

Sel darah putih atau leukosit merupakan sel yang memiliki inti berbentuk bulat seperti ginjal tetapi tidak memiliki bentuk sel yang tetap dan tidak berwarna. Leukosit umumnya dibagi menjadi granulosit (mempunyai granula khas) dan agranulosit (tidak mempunyai granula khas). Granulosit terdiri dari neutrophil, eosinofil dan basofil sedangkan agranulosit terdiri dari limfosit dan monosit. Selama berada di dalam darah, leukosit hanya bersifat

sementara mengikuti aliran darah ke tubuh. Apabila jaringan tubuh mengalami peradangan, leukosit akan melakukan migrasi menuju jaringan yang mengalami radang dengan cara menembus dinding pembuluh darah seperti kapiler (Kiswari, 2014).

Sel darah putih dibuat dalam sumsum tulang. Dalam setiap 1 mm³ darah terdapat 4000-10.000 sel darah putih. Leukosit terdiri dalam beberapa komposisi bentuk sel antara lain *limfosit*, *monosit*, *basofil*, *eosinofil* dan *netrofil*. Dari kelima sel tersebut netrofil memiliki proporsi yang paling banyak dalam sel darah putih. Netrofil akan berwarna ungu dengan pengecatan netral (campuran asam-basa) asam akan berwarna merah dan pada basa akan berwarna biru, sedangkan dengan pewarnaan asam (eosin) akan terlihat berwarna merah. Sementara sel basofil menyerap pewarna basa sehingga berwarna biru (D'Hiru, 2013).

1) Netrofil

Netrofil merupakan sel yang paling banyak dalam sirkulasi sel darah putih (45-74%) dibandingkan leukosit lain. Netrofil segmen (netrofil matur) merupakan jenis netrofil yang paling banyak dalam sediaan apus darah tepi, sedangkan netrofil batang atau stab yang merupakan netrofil imatur dapat bermultiplikasi cepat selama infeksi akut (Riswanto, 2013).

2) Eosinofil

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., 2017).

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

3) Basofil

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., 2017).

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 berwarna 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).

5) Limfosit

Limfosit merupakan salah satu leukosit yang berperan dalam proses kekebalan dan pembentukan antibodi pada tubuh. 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., 2017).

c. Trombosit

Keping darah atau trombosit merupakan sel darah yang memiliki peran penting dalam proses pembekuan darah. Trombosit memiliki sitoplasma berwarna biru dengan granula ungu kemerahan, tidak memiliki inti sel dan berukuran 1-4 mikron. Jumlah trombosit dalam darah sebanyak 150.000- 350.000/mL darah (Kiswari, 2014).

Trombosit merupakan partikel-partikel kecil yang dibentuk dari adanya perpecahan sitoplasma megakariosit di sumsum tulang. Trombosit berfungsi dalam merespons hemostatis primer dengan

membentuk sumbatan trombosit pada lokasi luka kecil di pembuluh darah. Trombosit hidup sekitar 10 hari didalam sirkulasi (Bain, 2014).

3. Sediaan Apus Darah Tepi

Apusan darah atau sediaan apus darah (SAD) merupakan teknik pemeriksaan untuk mengamati morfologi sel darah dan juga komponen lain yang terdapat dalam darah secara mikroskopik. Selain morfologi sel darah beberapa infeksi dari parasit dapat juga diamati melalui teknik ini, seperti infeksi malaria, mikrofilaria dan lain sebagainya. Sediaan apus darah (sediaan apus darah tepi/ preparat darah) merupakan salah satu teknik pemaparan sel-sel darah pada preparat gelas sehingga menghasilkan sel-sel terpisah untuk digunakan dalam pengamatan mikroskop (Maulidiyanti,dkk., 2024).

Sediaan apus darah digunakan dengan tujuan untuk mempermudah pengamatan morfologi darah dan komponen lain dalam darah dibawah mikroskop. Dengan teknik apusan darah ini, masing-masing sel darah dapat dibedakan secara jelas, abnormalitas bentuk dan ukuran dapat teramati secara jelas sehingga buffer dilaporkan kondisi masing-masing sel darah (Maulidiyanti, dkk., 2024).

Saat pembuatan sediaan perlu diperhatikan sudut kemiringan kaca penggeser dengan kaca objek dan kecepatan penggerakan kaca pengapus sebab dapat mempengaruhi ketebalan sediaan yang dibuat, semakin kecil sudut penggeseran dan semakin lama menggeser maka

semakin tipis apusan. Penyebaran leukosit pada sediaan yang dibuat dengan cara seperti ini tidak merata, leukosit kecil-kecil selalu lebih banyak terdapat ditengah-tengah, sedangkan yang besar-besar lebih banyak di pinggiran (Riswanto, 2013).

Morfologi sediaan apusan darah tepi pada dasarnya dibedakan menjadi 3 bagian, yaitu kepala bagian tempat darah diteteskan sebelum melakukan apusan, ekor bagian ujung preparat atau akhir apusan dan badan bagian yang berada di antara kepala dengan ekor. Pada bagian yang tipis ini sel-sel eritrosit terletak berdekatan dan tidak bertumpuk-tumpuk atau membentuk gumpalan (Riswanto, 2013). Apusan harus menutupi 2/3 panjang preparat dan harus memiliki ujung berbulu oval (Adewoyin dan Nwogoh, 2014).

Faktor pengeringan seperti kelembaban dan suhu dapat mempengaruhi suatu pemeriksaan yang berhubungan dengan cairan tubuh, demikian juga pada sediaan apusan darah tepi. Faktor kelembaban dan suhu dapat menyebabkan lambatnya proses pengeringan pada sediaan sehingga dapat menyebabkan perubahan morfologi pada eritrosit (Rahma, dkk., 2024).

Faktor penilaian sediaan apus yang benar diperlukan preparat sediaan yang memenuhi kriteria yang baik seperti lebar, panjang tidak memenuhi seluruh kaca objek, ketebalannya gradual, tidak berlubang, tidak terputus-putus dan memiliki pengecatan yang baik (Rahma, dkk., 2024). Kebersihan preparat dari endapan tergantung pada saat pencucian

tahap akhir. Terdapat endapan cat kemungkinan karena saat mengalir sediaan dengan air masih terdapat sisa zat warna yang menempel (Beatrix, dkk., 2023).

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 kira-kira 3% dari seluruh badan preparat.

b. Zona II (*Thin Zone*)

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

c. Zona III (*Thick Zone*)

Distribusi eritrosit saling bergerombol lebih rapat dibandingkan zona II, bertumpukan dan berdesakan. Zona ini merupakan daerah paling luas kira-kira 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 kira-kira 18%.

e. Zona V (*Even Zone/ Regular 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 kira-kira 9%.

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).

4. Fiksasi

Pada proses pewarnaan Giemsa, apusan darah secara manual difiksasi dengan methanol 96%. Fiksasi adalah sesuatu yang perlu dilakukan sesegera mungkin setelah persiapan dibiarkan mengering karena jika tidak dilakukan, akan berakhir dengan latar belakang biru. Fiksasi dengan methanol absolut selama 5 menit efektif untuk membuka dinding sel eritrosit. Jika methanol terpapar dengan udara dengan waktu yang lama, maka akan methanol akan menguap dan jenuh dengan air. Akibatnya, struktur eritrosit akan berubah. Fungsi fiksasi methanol mutlak adalah untuk apusan darah dapat menyerap cat dengan baik, serta

merekatkan apusan darah pada objek glass sedemikian rupa sehingga apusan darah tidak mengelupas dan mampu menghentikan proses metabolisme tanpa mempengaruhi kondisi (struktur) secara nyata (Warsita, dkk., 2019).

Apusan yang akan difiksasi diletakkan pada rak preparat dan digenangi dengan larutan metil alkohol (methanol) dan biarkan selama 2-3 menit (Kiswari, 2014). Larutan fiksasi yang telah menguap akan membuat volume larutan menurun sehingga bersifat hipertonis (Ghofur, dkk., 2022).

5. Pewarnaan Sediaan Apus Tepi

Pewarnaan bertujuan untuk mempertajam dan memperjelas berbagai bagian jaringan, terutama sel-selnya sehingga saat diperiksa dengan mikroskop dapat dibedakan (Maulidiyanti, dkk., 2024).

Giemsa adalah zat warna yang terdiri dari eosin, *Azure B* yang memberi warna merah muda pada sitoplasma dan *methylene blue* yang memberi warna biru pada inti sel leukosit. Ketiga zat warna tersebut dilarutkan dengan metil alkohol dan gliserin. Larutan ini dikemas di dalam botol cokelat yang dikenal sebagai larutan Giemsa stok dengan pH 7. Giemsa stok ini harus diencerkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk mewarnai sel darah (Maulidiyanti, dkk., 2024). Pada pewarnaan Giemsa sel akan tampak berwarna ungu, basa akan menghasilkan warna merah dan asam akan berwarna biru (Mufliah *et al.*, 2022). Pewarnaan sediaan dapat dilakukan setelah sediaan benar-

benar kering dan untuk sediaan darah tipis harus difikasi dengan methanol agar tidak terhemolisa (Mukh, dkk., 2018).

Fungsi larutan *buffer* adalah untuk mempertahankan kondisi pH saat sejumlah kecil basa atau asam ditambahkan ke dalam larutan. Giemsa dapat diencerkan dengan *buffer* dan aquadest yang dibuat dengan derajat keasaman 6,8 (Maulidiyanti, dkk., 2024). Giemsa yang mutunya jelak atau sudah rusak tidak akan mengeluarkan warna ungu atau merah atau keduanya (Hormalia, dkk., 2018).

6. 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 sekitar 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.



Gambar 1. *Chamber Stain*

Sumber : Polkesyo Jurusan Teknologi Laboratorium Medis

Diharapkan dengan menggunakan *chamber stain* ini, dapat mengefisiensikan diukur dengan volume pewarnaan yang akan digunakan sehingga tidak ada lagi zat pewarna yang terbuang karena penggunaan giemsa secara berulang serta menghasilkan pewarnaan lebih baik. Untuk segi efektivitas penggunaan ini, dinilai dari melihat kualitas pewarnaan dengan teknik *chamber stain* ini sebanding dengan metode konvensional. Dengan menggunakan *chamber stain*, volume pewarna yang digunakan lebih hemat dan proses pewarnaan lebih praktis dan singkat. Selain itu, *chamber stain* juga membantu menghasilkan pewarnaan yang lebih merata yang membantu pemeriksaan lebih akurat.

Metode konvensional digunakan sebagai uji kontrol karena sebagai standar operasional prosedur (SOP) dalam proses pewarnaan apusan darah tepi. Dengan menggunakan metode ini, peneliti dapat membandingkan teknik baru dengan metode yang sudah terbukti efektif dan digunakan secara luas. Selain itu, menggunakan metode konvensional sebagai kontrol memastikan bahwa peneliti dapat dengan tepat menilai apakah teknik baru dapat mengidentifikasi jenis sel yang sama dengan keakuratan yang sama.

7. Efisiensi dan Efektivitas

Efisiensi dan efektivitas merupakan dua aspek penting untuk meningkatkan produktivitas dan memastikan kualitas hasil pemeriksaan. Efisiensi pada penelitian ini berkaitan dengan optimalisasi

waktu, tenaga, dan sumber daya yang digunakan. Penggunaan *chamber stain* dinilai efisien dari daya tahan pewarna yang digunakan berkali-kali tanpa mengurangi kualitas hasil pewarnaan.

Efektivitas merujuk pada pencapaian hasil yang sesuai dengan tujuan seperti menghasilkan kualitas pewarnaan yang kontras, konsisten dan tidak ada endapan pewarnaan. Dengan demikian, untuk mendapatkan hasil yang optimal maka digunakan alat pewarnaan yaitu *chamber stain*.

Dalam penelitian ini, perbandingan antara metode konvensional dan teknik *chamber stain* dilakukan untuk menilai efisiensi penggunaan Giemsa dalam pewarnaan preparat. Berdasarkan perhitungan estimasi :

a. Metode Konvensional

- 1) Volume Giemsa untuk satu preparat : 3 ml
- 2) Jumlah preparat per pengulangan : 40 preparat
- 3) Total volume Giemsa yang digunakan untuk 40 preparat:

$$40 \text{ preparat} \times 3 \text{ ml/preparat} = 120 \text{ ml}$$

- 4) Jumlah pengulangan dengan 400 ml:

$$\frac{400 \text{ ml}}{120 \text{ ml/pengulangan}} = 3 \text{ kali pengulangan}$$

b. Teknik Chamber Stain

- 1) Volume Giemsa untuk satu preparat : 1 ml
- 2) Jumlah preparat per pengulangan : 40 preparat
- 3) Total volume Giemsa yang digunakan untuk 40 preparat :

$$40 \text{ preparat} \times 1 \text{ ml/preparat} = 40 \text{ ml}$$

4) Jumlah pengulangan dengan 400 ml :

$$\frac{400 \text{ ml}}{40 \text{ ml/pengulangan}} = 10 \text{ pengulangan}$$

Tabel 1. Perbandingan Penggunaan Giemsa (Simulasi)

Metode	Volume Giemsa/preparat	Volume Giemsa/ 40 preparat	Jumlah Pengulangan (dengan 400 ml)
Konvensional	3 ml	120 ml	3 pengulangan
Chamber Stain	1 ml	40 ml	10 pengulangan

Teknik chamber stain memiliki keunggulan dalam efisiensi penggunaan giemsa karena memerlukan lebih sedikit larutan per preparat sehingga memungkinkan lebih banyak pengulangan dengan jumlah larutan yang sama. Sebaliknya, metode konvensional membutuhkan volume giemsa yang lebih banyak banyak untuk jumlah preparat yang sama, namun waktu yang dibutuhkan per pengulangan cenderung lebih lama karena setiap preparat membutuhkan volume larutan yang lebih besar.

8. Sumber Kesalahan Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi

Menurut Yayuningsih, dkk (2017) terdapat beberapa sumber kesalahan saat pewarnaan sediaan sebagai berikut :

- a. Kesalahan dalam persiapan penderita, pengambilan dan penyimpanan bahan pemeriksaan, hal ini dapat menyebabkan

perubahan hasil dari nilai yang sebenarnya (sampel tidak representatif).

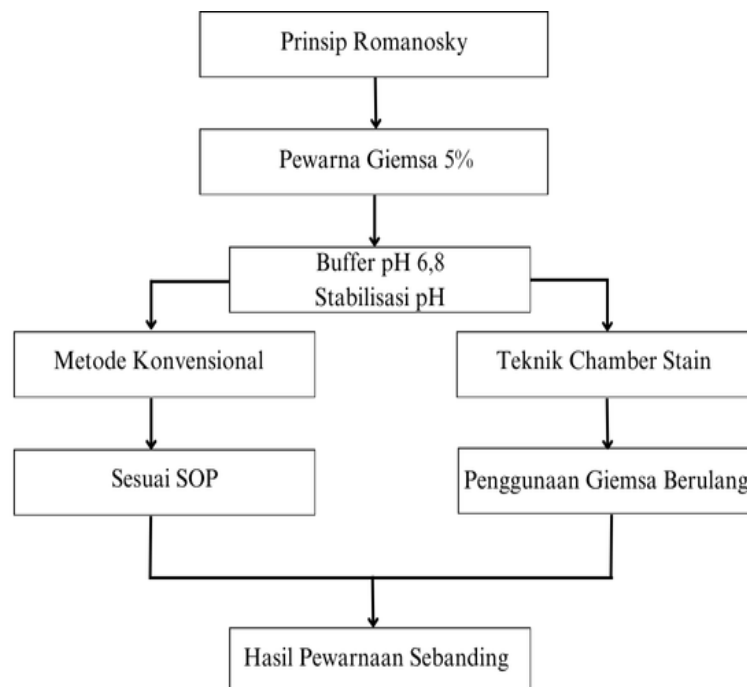
- b. Sediaan apus terlalu biru memungkinkan disebabkan oleh apusan yang terlampau tebal, pewarnaan terlalu lama, pencucian kurang bersih, zat warna atau larutan buffer yang alkalis.
- c. Sediaan apus terlalu merah mungkin disebabkan oleh sisa warna sediaan atau larutan buffer yang asam. Larutan buffer yang terlalu asam dapat menyebabkan leukosit hancur.
- d. Bercak-bercak zat warna pada sediaan apus dapat disebabkan oleh zat warna tidak disaring sebelum digunakan atau pewarnaan terlalu lama sehingga zat warna mongering pada sediaan.
- e. Morfologi sel yang terbaik adalah jika menggunakan darah tepi langsung tanpa antikoagulan. Bila menggunakan antikoagulan sediaan apus harus dibuat segera, tidak lebih dari satu jam setelah pengambilan darah. Penggunaan antikoagulan heparin akan menyebabkan latar belakang berwarna biru dan leukosit menggumpal.
- f. Sediaan hapus yang tidak rata dapat disebabkan oleh kaca penghapus yang tidak bersih dan pinggirannya tidak rata atau oleh kaca objek yang berdebu, berlemak atau bersidik 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 tidak baik.

- h. Fiksasi yang tidak dilakukan segera setelah sediaan apus kering dapat mengakibatkan perubahan morfologi leukosit.

B. Kerangka Teori

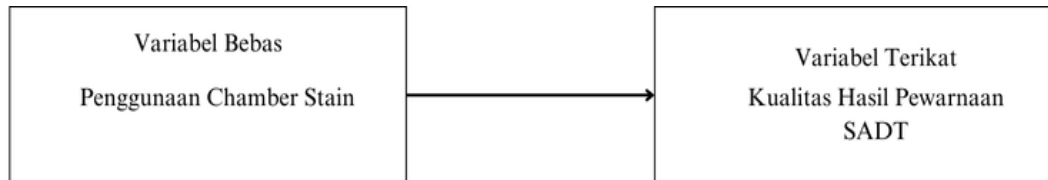
Kerangka teori penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel

Hubungan antar variable penelitian ini ditunjukkan oleh Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

Penggunaan teknik chamber stain dengan pewarnaan Giemsa secara berulang dapat menghasilkan kualitas pewarnaan sediaan apusan darah tepi yang setara dengan metode konvensional.