

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Leukosit

Leukosit merupakan sel darah putih yang diproduksi oleh jaringan hemopoetik untuk jenis bergranula (polimorfonuklear) dan jaringan limpatik untuk jenis tak bergranula (mononuklear), berfungsi dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi (Sutedjo, 2006).

Leukosit paling sedikit dalam tubuh jumlahnya sekitar 4.000-11.000/mm³. Berfungsi untuk melindungi tubuh dari infeksi. Karena itu, jumlah leukosit tersebut berubah-ubah dari waktu ke waktu, sesuai dengan jumlah benda asing yang dihadapi dalam batas-batas yang masih dapat ditoleransi tubuh tanpa menimbulkan gangguan fungsi (Sadikin, 2002). Meskipun leukosit merupakan sel darah, tapi fungsi leukosit lebih banyak dilakukan di dalam jaringan. Leukosit hanya bersifat sementara mengikuti aliran darah ke seluruh tubuh. Apabila terjadi peradangan pada jaringan tubuh leukosit akan pindah menuju jaringan yang mengalami radang dengan cara menembus dinding kapiler (Kiswari, 2014).

2.1.1. Jenis-Jenis Leukosit

Leukosit terdiri dari 2 kategori yaitu granulosit dan agranulosit.

- a. Granulosit, yaitu sel darah putih yang di dalam sitoplasmanya terdapat granula-granula. Granula-granula ini mempunyai perbedaan kemampuan mengikat warna misalnya pada eosinofil mempunyai granula berwarna merah terang, basofil berwarna biru dan neutrofil berwarna ungu pucat.
- b. Agranulosit, merupakan bagian dari sel darah putih dimana mempunyai inti sel satu lobus dan sitoplasmanya tidak bergranula. Leukosit yang termasuk

agranulosit adalah limfosit, dan monosit. Limfosit terdiri dari limfosit B yang membentuk imunitas humoral dan limfosit T yang membentuk imunitas selular. Limfosit B memproduksi antibodi jika terdapat antigen, sedangkan limfosit T langsung berhubungan dengan benda asing untuk difagosit (Tarwoto, 2007).

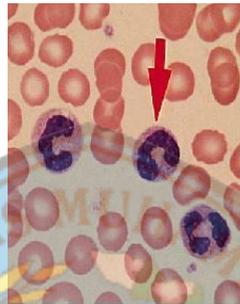
Ada tidaknya granula dalam leukosit serta sifat dan reaksinya terhadap zat warna, merupakan ciri khas dari jenis leukosit. Selain bentuk dan ukuran, granula menjadi bagian penting dalam menentukan jenis leukosit (Nugraha, 2015). Dalam keadaan normal leukosit yang dapat dijumpai menurut ukuran yang telah dibakukan adalah basofil, eosinofil, neutrofil batang, neutrofil segmen, limfosit dan monosit. Keenam jenis sel tersebut berbeda dalam ukuran, bentuk, inti, warna sitoplasma serta granula didalamnya (Mansyur, 2015).

1. Neutrofil

Neutrofil berukuran sekitar 14 μm , granulanya berbentuk butiran halus tipis dengan sifat netral sehingga terjadi percampuran warna asam (eosin) dan warna basa (metilen biru), sedang pada granula menghasilkan warna ungu atau merah muda yang samar (Nugraha 2015). Neutrofil berfungsi sebagai garis pertahanan tubuh terhadap zat asing terutama terhadap bakteri. Bersifat fagosit dan dapat masuk ke dalam jaringan yang terinfeksi. Sirkulasi neutrofil dalam darah yaitu sekitar 10 jam dan dapat hidup selama 1-4 hari pada saat berada dalam jaringan ekstrasvaskuler (Kiswari,2014).

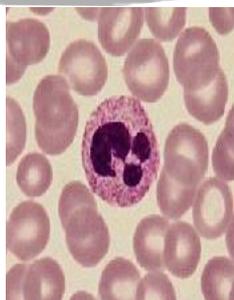
Neutrofil adalah jenis sel leukosit yang paling banyak yaitu sekitar 50-70% diantara sel leukosit yang lain. Ada dua macam netrofil yaitu neutrofil batang (stab) dan neutrofil segmen (polimorfonuklear) (Kiswari,2014). Perbedaan dari keduanya

yaitu neutrofil batang merupakan bentuk muda dari neutrofil segmen sering disebut sebagai neutrofil tapal kuda karena mempunyai inti berbentuk seperti tapal kuda. Seiring dengan proses pematangan, bentuk intinya akan bersegmen dan akan menjadi neutrofil segmen. Sel neutrofil mempunyai sitoplasma luas berwarna pink pucat dan granula halus berwarna ungu (Riswanto,2013).



Gambar 2.1 Neutrofil Batang Pewarnaan Giemsa Pembesaran 1000 x
(Sumber: Adianto, 2013).

Neutrofil segmen mempunyai granula sitoplasma yang tampak tipis (pucat), sering juga disebut neutrofil polimorfonuklear karena inti selnya terdiri atas 2-5 segmen (lobus) yang bentuknya bermacam-macam dan dihubungkan dengan benang kromatin. Jumlah neutrofil segmen yaitu sebanyak 3-6, dan bila lebih dari 6 jumlahnya maka disebut dengan neutrofil hipersegmen (Kiswari,2014).



Gambar 2.2 Neutrofil Segmen Pewarnaan Giemsa Pembesaran 1000 x
(Sumber: Adianto, 2013).

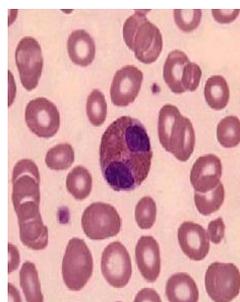
Peningkatan jumlah neutrofil disebut netrofilia. Neutrofilia dapat terjadi karena respon fisiologik terhadap stres, misalnya karena olah raga, cuaca yang

ekstrim, perdarahan atau hemolisis akut, melahirkan, dan stres emosi akut. Keadaan patologis yang menyebabkan neutrofilia diantaranya infeksi akut, radang atau inflamasi, kerusakan jaringan, gangguan metabolik, apendisitis dan leukemia mielositik. Sedangkan penurunan jumlah neutrofil disebut dengan neutropenia, neutropenia ditemukan pada penyakit virus, *hipersplenisme*, leukemia, granulositosis, anemia, pengaruh obat-obatan (Riswanto, 2013).

2. Eosinofil

Eosinofil dalam tubuh yaitu sekitar 1-6%, berukuran 16 μm . Berfungsi sebagai fagositosis dan menghasilkan antibodi terhadap antigen yang dikeluarkan oleh parasit. Masa hidup eosinofil lebih lama dari neutrofil yaitu sekitar 8-12 jam (Kiswari, 2014).

Eosinofil hampir sama dengan neutrofil tapi pada eosinofil, granula sitoplasma lebih kasar dan berwarna merah *orange*. Warna kemerahan disebabkan adanya senyawa protein kation (yang bersifat basa) mengikat zat warna golongan anilin asam seperti eosin, yang terdapat pada pewarnaan Giemsa. Granulanya sama besar dan teratur seperti gelembung dan jarang ditemukan lebih dari 3 lobus inti. Eosinofil lebih lama dalam darah dibandingkan neutrofil (Hoffbrand, dkk. 2012).

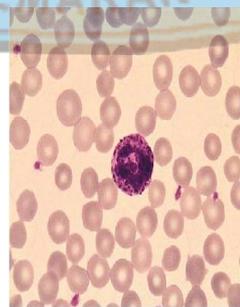


Gambar 2.3 Eosinofil Pewarnaan Giemsa Pembesaran 1000 x
(Sumber: Adianto, 2013).

Eosinofil akan meningkat jumlahnya ketika ditemukan penyakit alergi, penyakit parasitik, penyakit kulit, kanker, flebitis, tromboflebitis, leukemia mielositik kronik (CML), emfisema dan penyakit ginjal. Sedangkan pada orang stres, pemberian steroid per oral atau injeksi, luka bakar, syok dan hipperfungsiadrenokortikal akan ditemukan jumlah eosinofil yang menurun (Riswanto, 2013).

3. Basofil

Basofil adalah jenis leukosit yang paling sedikit jumlahnya yaitu kira-kira kurang dari 2% dari jumlah keseluruhan leukosit. Sel ini memiliki ukuran sekitar 14 μm , granula memiliki ukuran bervariasi dengan susunan tidak teratur hingga menutupi nukleus dan bersifat azrofilik sehingga berwarna gelap jika dilakukan pewarnaan Giemsa. Basofil memiliki granula kasar berwarna ungu atau biru tua dan seringkali menutupi inti sel, dan bersegmen. Warna kebiruan disebabkan karena banyaknya granula yang berisi histamin, yaitu suatu senyawa amina biogenik yang merupakan metabolit dari asam amino histidin.



Gambar 2.4 Basofil Pewarnaan Giemsa Pembesaran 1000 x
(Sumber: Adianto, 2013).

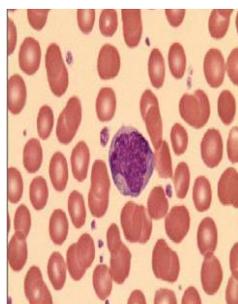
Basofil jarang ditemukan dalam darah normal. Selama proses peradangan akan menghasilkan senyawa kimia berupa heparin, histamin, beradikinin dan

serotonin. Basofil berperan dalam reaksi hipersensitifitas yang berhubungan dengan imunoglobulin E (IgE) (Kiswari,2014).

4. Monosit

Jumlah monosit kira-kira 3-8% dari total jumlah leukosit. Monosit memiliki dua fungsi yaitu sebagai fagosit mikroorganisme (khususnya jamur dan bakteri) serta berperan dalam reaksi imun (Kiswari,2014).

Monosit merupakan sel leukosit yang memiliki ukuran paling besar yaitu sekitar 18 μm , berinti padat dan melekuk seperti ginjal atau biji kacang, sitoplasma tidak mengandung granula dengan masa hidup 20-40 jam dalam sirkulasi. Inti biasanya eksentris, adanya lekukan yang dalam berbentuk tapal kuda. Granula azurofil, merupakan lisosom primer, lebih banyak tapi lebih kecil. Ditemui retikulum endoplasma sedikit. Juga ribosom, pliribosom sedikit, banyak mitokondria. Aparatus Golgi berkembang dengan baik, ditemukan mikrofilamen dan mikrotubulus pada daerah identasi inti. Monosit terdapat dalam darah, jaringan ikat dan rongga tubuh. Monosit tergolong fagositik mononuclear (system retikuloendotel) dan mempunyai tempat-tempat reseptor pada permukaan membrannya (Effendi, 2003).



Gambar 2.5 Monosit Pewarnaan Giemsa Pembesaran 1000 x
(Sumber: Adianto, 2013).

5. Limfosit

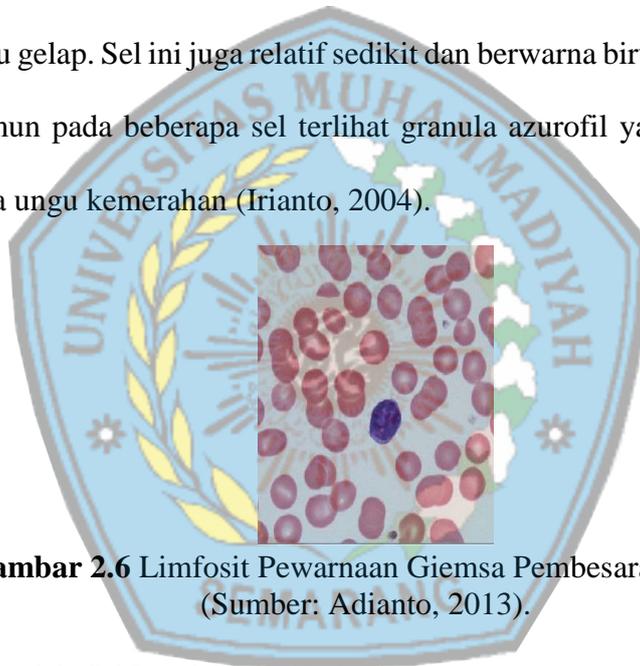
Limfosit adalah jenis leukosit kedua paling banyak setelah neutrofil (20-40% dari total leukosit). Jumlah limfosit pada anak-anak relatif lebih banyak dibandingkan jumlah orang dewasa, dan jumlah limfosit ini akan meningkat bila terjadi infeksi virus. Berdasarkan fungsinya limfosit dibagi atas limfosit B dan limfosit T. Limfosit B matang pada sumsum tulang sedangkan limfosit T matang dalam timus. Keduanya tidak dapat dibedakan dalam pewarnaan Giemsa karena memiliki morfologi yang sama dengan bentuk bulat dengan ukuran 12 μm . Sitoplasma sedikit karena semua bagian sel hampir ditutupi nukleus padat dan tidak bergranula (Nugraha, 2015). Limfosit B berasal dari sel stem di dalam sumsum tulang dan tumbuh menjadi sel plasma, yang menghasilkan antibodi. Limfosit T terbentuk jika sel stem dari sumsum tulang pindah ke kelenjar thymus yang akan mengalami pembelahan dan pematangan. Di dalam kelenjar thymus, limfosit T belajar membedakan mana benda asing dan mana bukan benda asing. Limfosit T dewasa meninggalkan kelenjar thymus dan masuk ke dalam pembuluh getah bening dan berfungsi sebagai bagian dari sistem pengawasan kekebalan (Farieh, 2008).

Berdasarkan ukuranya limfosit dibedakan menjadi beberapa jenis :

- a. *Resting lymphocyte* : biasanya berukuran kecil (7-10 μm), inti selnya berbentuk bulat atau oval.
- b. *Reactive ("activical") lymphocyte* : berukuran paling besar bila terjadi infeksi misalnya mono nukleosis.

- c. *Large granula lymphocyte* : berukuran sedang mengandung granula kasar azurofilik, berperan sebagai sel *natural killer* (NK) imunologi (Kiswari, 2015).

Ukuran sel limfosit beragam, ada yang seperti eritrosit dan ada yang sebesar netrofil. Limfosit dengan garis tengah 6-8 mikrometer dikenal sebagai limfosit kecil. Sitoplasma limfosit bersifat basa lemah dan berwarna biru muda pada sediaan yang terpulas. Sitoplasma ini mengandung granul azurofilik. Inti selnya kebanyakan bulat atau terkadang mirip ginjal. Kromatin inti amat padat dan berwarna biru gelap. Sel ini juga relatif sedikit dan berwarna biru langit tanpa granula spesifik, namun pada beberapa sel terlihat granula azurofil yang jika pulasannya baik berwarna ungu kemerahan (Irianto, 2004).



Gambar 2.6 Limfosit Pewarnaan Giemsa Pembesaran 1000 x (Sumber: Adianto, 2013).

2.1.2. Hemopoisis Sel Darah Putih / Lekosit

a. Seri granulosit

1. Mieloblast

Mieloblast adalah sel termuda diantara seri granulosit. Sel ini memiliki inti bulat yang berwarna biru kemerah-merahan, dengan satu atau lebih anak inti, kromatin inti halus dan tidak menggumpal. Sitoplasma berwarna biru dan sekitar inti menunjukkan warna yang lebih muda. Mieloblast biasanya lebih kecil

daripada rubriblast dan sitoplasmanya kurang biru dibandingkan rubriblast. Jumlahnya dalam sumsum tulang normal adalah $< 1\%$ dari jumlah sel berinti.

2. Promielosit

Dalam fase ini sitoplasma seri granulosit telah memperlihatkan granula berwarna biru tua / biru kemerah-merahan. Berbentuk bulat dan tidak teratur. Granula sering tampak menutupi inti. Granula ini terdiri dari lisozom yang mengandung mieloperoksidase, fosfatase asam, protease dan lisozim. Inti promielosit biasanya bulat dan besar dengan struktur kromatin kasar. Anak inti masih ada tetapi biasanya tidak jelas. Jumlah sel ini dalam sumsum tulang normal adalah 1-5 %.

3. Mielosit

Pada mielosit granula sudah menunjukkan diferensiasi yaitu telah mengandung laktoferin, lisozim peroksidase dan fosfatase lindi. Inti sel mungkin bulat atau lonjong atau mendatar pada satu sisi, tidak tampak anak inti, sedangkan kromatin menebal. Sitoplasma sel lebih banyak dibandingkan dengan promielosit. Jumlahnya dalam keadaan normal adalah 2-10 %.

4. Metamielosit

Dalam proses pematangan, inti sel membentuk lekukan sehingga sel berbentuk seperti kacang merah, kromatin menggumpal walaupun tidak terlalu padat. Sitoplasma mengandung granula kecil berwarna kemerah-merahan. Sel ini dalam keadaan normal tetap berada dalam sumsum tulang dengan jumlah 5-15 %.

5. Neutrofil Batang dan Segmen

Metamielosit menjadi batang apabila lekukan pada inti melebihi setengah ukuran inti yang bulat sehingga berbentuk seperti batang yang lengkung. Inti

menunjukkan proses degeneratif, kadang-kadang tampak piknotik pada kedua ujung inti. Sitoplasma mengandung granula halus berwarna kemerah merahan. Dalam darah tepi ditemukan hanya 2-6% dari sel-sel leukosit normal. Selanjutnya sel ini menjadi neutrofil segmen. Dalam sumsum tulang normal sel ini merupakan 10-40 % dari sel berinti.

b. Seri Limfosit

1. Limfoblast dan Prolimfosit

Limfoblast memiliki inti bulat berukuran besar dengan satu atau beberapa anak inti, kromatin inti tipis rata dan tidak menggumpal. Sitoplasma sedikit dan berwarna biru. Prolimfosit menunjukkan kromatin lebih kasar tetapi belum menggumpal seperti limfosit. Kadang-kadang sulit membedakan limfoblast dari limfosit dan pada keadaan ragu-ragu dianjurkan untuk menganggap sel itu sebagai limfosit.

2. Limfosit

Ada yang besar (limfosit besar), ada yang sedang (limfosit sedang), ada yang kecil (limfosit kecil). Inti sel, letaknya dalam sel eksentrik, Bentuk inti Oval / bulat dan relatif besar, Warna inti Biru gelap, Kromatin kompak memadat, Membran inti kurang jelas terlihat, Butir inti(nucleoli) tidak ada, sitoplasma, luasnya/lebarnya relatif sempit, Warna sitoplasma Oxyphil, Perinuklear Zone umumnya tidak ada, Granula dalam sitoplasma tidak ada. Kalau ada granula disebut granula Azurophil.

c. Seri Monosit

1. Monoblast dan Promonosit

Monoblast dan promonosit dalam keadaan normal sulit dikenal atau dibedakan dari mieloblast dalam sumsum tulang, tetapi pada keadaan abnormal misalnya pada

proliferasi berlebihan sel seri ini, monoblast dan promonosit dapat dikenali dari intinya yang memperlihatkan lekukan terlipat atau menyerupai gambaran otak dan sitoplasma dengan pseudopodia.

2. Monosit

Inti sel letaknya dalam sel eksentrik. Bentuk inti menyerupai otak (brain like form), Warna inti kemerah-merahan/keunguan, Kromatin tersusun lebih kasar, butir inti (nucleoli) tidak ada, Sitoplasma, Luasnya/lebarnya relatif lebih besar kadang-kadang ada pseudopodia, Warna sitoplasma biru pucat, Perinuklear Zone tidak ada, Granula dalam sitoplasma kadang-kadang ada granula Azurophil.

d. Seri Plasmosit

Sel Plasma (Plasmosit) mempunyai hubungan erat dengan limfosit. Sel pelopor plasmosit maupun limfosit terdapat dalam jaringan limfoid dan keduanya merupakan unsur penting dalam sistem imun tubuh. Akibat stimulasi antigen, sel limfosit B mengalami transformasi blast dan membentuk sel plasma yang memproduksi immunoglobulin. Plasmosit dijumpai dengan jumlah sekitar 1 % dari sel berinti dalam sumsum tulang. Dalam keadaan normal plasmablast dan proplasmosit tidak dapat dijumpai dalam sumsum tulang tetapi tampak pada keadaan-keadaan tertentu yang disertai proliferasi berlebih dan juga peningkatan produksi immunoglobulin. Ukuran, bentuk dan struktur plasmablast sulit dibedakan dari blast yang lain, tetapi hanya satu cara yang dapat dipakai untuk membedakan plasmosit dari seri blast yang lain, yaitu bentuk inti yang eksentrik dan adanya bagian zona jernih melingkar (halo) disekitar inti (Sanjaya, 2012).

2.1.3. Kelainan Morfologi Leukosit

Kelainan morfologi leukosit ada 2 macam, diantaranya:

a. Kelainan sitoplasma

1. Granulasi toksik (infeksi akut, luka bakar dan intoksikasi)
 2. Granulasi polimorfonuklear (leukemia dan sindrom mielodisplasia)
 3. Badan dohle (keracunan, luka bakar dan infeksi berat)
 4. Batang aurer (leukemia myeloid akut)
 5. Limpositik plasma biru (infeksi virus dan mononucleosis infeksiosa)
- Smudge sel (leukemia limfosit kronik) Vakuolisasi (keracunan dan infeksi berat).

b. Kelainan inti sel

1. Hipersegmentasi (anemia megaloblastik, infeksi, uremia dan GGK)
2. Intipiknotik (sepsis dan leukemia)
3. Anomaly pelgerhuet (leukemia kronik mielodisplastik) (Adianto, 2013).

2.2. Pewarnaan Sel – Sel Darah

Untuk mempermudah pengamatan sel darah secara tepat, perlu dilakukan teknik pewarnaan. Teknik pewarnaan pertama kali dikenalkan oleh Romanowsky dan Malachowski pada tahun 1891, menggunakan *methylen blue* dan *eosin*. Kemudian dimodifikasi oleh Leishman, May Grunwald, Wright dan Giemsa dengan tujuan menghasilkan pewarnaan yang lebih baik dan mudah diamati (Nugraha, 2015). Prinsip pewarnaan didasarkan pada sifat kimiawi dalam sel. Zat warna yang bersifat asam akan bereaksi dengan komponen sel yang bersifat basa

dan komponen zat warna yang bersifat basa akan bereaksi dengan komponen sel yang bersifat asam.

Prinsip pewarnaan Romanwosky dijabarkan sebagai berikut:

- a. Komponen sel yang bersifat asam, seperti asam nukleat, nukleoprotein dan protein plasma akan bereaksi dengan zat warna basa yaitu *methylen blue* dan Azur, sehingga berwarna biru. Dan komponen tersebut dinamakan basofilik.
- b. Komponen sel yang bersifat basa, seperti hemoglobin dan beberapa konstituen sitoplastik leukosit beraksi dengan zat warna asam eosin sehingga memberi warna merah-orange. Komponen tersebut dinamakan asidofilik atau eosinofilik. Komponen sel yang bersifat netral, seperti beberapa organela seluler akan bereaksi dengan zat warna basa maupun asam dan akan menimbulkan warna *purple* (campuran antara warna biru dan merah). Komponen tersebut adalah neutrofil (Alawiyah, 2016).

2.2.1. Pewarnaan Giemsa

Pewarnaan Giemsa (*Giemsa Stain*) adalah teknik pewarnaan untuk pemeriksaan mikroskopis yang namanya diambil dari seorang peneliti malaria yaitu Gustav Giemsa. Pewarnaan ini digunakan untuk pemeriksaan sitogenetik dan untuk diagnosis histopatologis parasit malaria dan juga parasit jenis lainnya.

Giemsa adalah zat warna yang terdiri dari eosin dan metil azur, yang memberi warna merah muda pada sitoplasma dan *methylen blue* pada inti leukosit. Ketiga zat warna tersebut dilarutkan dengan metil alkohol dan gliserin. Larutan ini dikemas dalam botol coklat berukuran 100 ml – 200 ml dan dikenal sebagai Giemsa stok pH 7.

Giemsa stok harus diencerkan lebih dahulu sebelum dipakai mewarnai sel darah. Elmen-elmen zat warna Giemsa larut selama 40-90 menit dengan aquadest atau buffer. Setelah itu semua elmen zat warna akan mengendap dan sebagian lagi balik kepermukaan membentuk lapisan tipis seperti minyak. Karena itu, stok Giemsa tidak boleh tercemar air (Depkes, 2006).

Faktor yang harus diperhatikan untuk mencapai pewarnaan yang baik :

1. Standar mutu kualitas dari stok Giemsa yang digunakan
 - a. Stok 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 apus darah

Faktor penyebab sediaan apus darah tepi tidak layak digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Sampel darah terlalu lama disimpan (> 1 jam) menyebabkan perubahan bentuk atau kerusakan sel.
- b. Lambat melakukan apusan pada kaca objek menyebabkan penyebaran sel tidak merata.
- c. Kaca objek kotor (berlemak) menyebabkan apusan berlubang-lubang.
- d. Kelembapan ruang tinggi menyebabkan apusan lama mengering dan eritrosit akan rusak (Nugraha, 2015).

4. Fiksasi

Dalam proses pewarnaan, methanol berfungsi untuk melisiskan dinding sel sehingga zat warna bisa masuk ke dalam sel darah. Sediaan apus yang telah dikeringkan di udara, langsung difiksasi dengan methanol selama 5 menit. Sebaiknya fiksasi dilakukan < 1 jam setelah kering angin. Jika tidak, maka akan didapatkan latar belakang dari plasma yang mengering berwarna kebiruan. Fiksasi yang tidak baik juga menyebabkan perubahan morfologi dan warna sediaan (Houwen, Berend 2000).

5. Melakukan pewarnaan

Faktor yang menentukan mutu pewarnaan Giemsa antara lain:

- a. Kualitas Giemsa baik dan tidak tercemar air
- b. Pengencer Giemsa dengan perbandingan tepat
- c. Waktu pewarnaan
- d. Ketebalan pewarnaan
- e. Kebersihan sediaan

Kriteria pembuatan dan pewarnaan sediaan darah yang baik, yaitu apabila:

- a. Inti leukosit berwarna ungu (tanda umum).
- b. Trombosit berwarna ungu muda dan merah muda.
- c. Sisa – sisa eritrosit muda berwarna biru atau biru muda.
- d. Sitoplasma limfosit kelihatan biru pucat.
- e. Sitoplasma monosit berwarna biru.
- f. Granula eosinofil berwarna orange.
- g. Latar belakang sediaan bersih dan kelihatan biru pucat (Onggowaluyo, 2001).

2.2.2. Pengencer Giemsa (Buffer)

Larutan Penyangga buffer adalah suatu larutan yang dapat mempertahankan nilai pH yang besar ketika ion – ion hidrogen ditambahkan atau ketika larutan itu diencerkan disebut larutan penyangga atau larutan dapar (Underwood, 2001).

Larutan buffer adalah larutan yang memiliki kemampuan untuk mempertahankan nilai pH pada penambahan asam atau basa. pH yang rendah atau kurang dari 6,8 mengakibatkan sel darah merah banyak mengambil pewarna asam atau eosin, sehingga sel darah merah menjadi lebih merah muda. Leukosit juga akan memperlihatkan bagian – bagian inti yang kurang jelas (Har, 2002).

Buffer posfat memiliki pH antara 5,3-8,0. Buffer posfat terdiri dari campuran Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 di mana molekul-molekul tersebut mampu menyerap air. Buffer posfat berfungsi untuk mengatur pH larutan agar tetap konstan di area yang mendekati nilai 7. Besarnya nilai pH pada larutan tersebut bergantung pada komposisi pencampuran Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 tersebut. Berikut disajikan tabel pembuatan buffer pH 5,3-8,0 untuk buffer Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 dengan volume 100 mL (Mulyono, 2006).

Tabel 2.1 Buffer Na_2HPO_4 dan NaH_2PO_4 pH 5,3 – 8,0

pH	Volume Na_2HPO_4 (mL)	Volume NaH_2PO_4 (mL)	pH	Volume Na_2HPO_4 (mL)	Volume NaH_2PO_4 (mL)
5,3	2,6	97,4	6,7	43,3	56,7
5,4	3,2	96,8	6,8	49,1	50,9
5,5	4,0	96,0	6,9	55,1	44,9
5,6	5,1	94,9	7,0	61,1	38,9
5,7	6,4	93,6	7,1	66,6	33,4
5,8	8,0	92,0	7,2	72,0	28,0
5,9	9,9	90,1	7,3	76,8	23,2
6,0	12,3	87,7	7,4	80,8	19,2
6,1	15,1	84,9	7,5	84,1	15,9
6,2	18,6	81,4	7,6	87,0	13,0
6,3	22,5	77,5	7,7	89,4	10,6
6,4	26,7	73,3	7,8	91,5	8,5
6,5	31,7	68,3	7,9	93,2	6,8
6,6	37,5	62,5	8,0	94,7	5,3

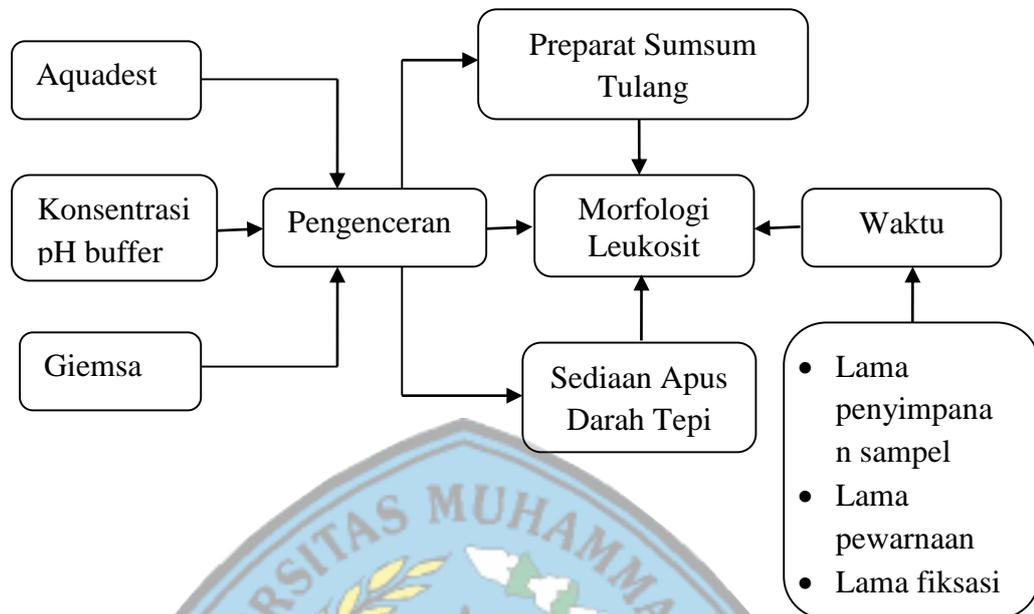
Pembuatan larutan buffer Na_2HPO_4 0,1 M dilakukan dengan cara melarutkan 17,799 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas kimia dengan aquadest 250 mL, homogenkan. Kemudian masukan ke dalam labu ukur 1000 mL, tambahkan aquadest sampai tanda batas dan homogenkan kembali. Untuk mendapatkan larutan NaH_2PO_4 0,1 M dengan cara melarutkan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

15,601 gram ke dalam gelas kimia dengan aquadest 250 mL homogenkan, kemudian masukan kedalam labu ukur 1000 mL dengan menambahkan aquadest sampai tanda batas dan homogenkan kembali (Mulyono, 2006).

2.2.3. pH Buffer pada Pembuatan Preparat

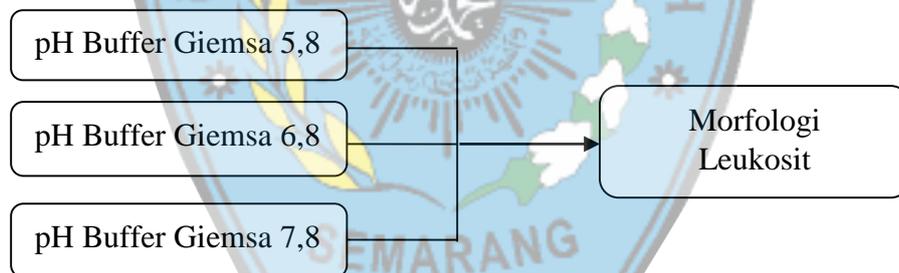
Pengencer buffer dengan pH 6,8 atau netral mempunyai konsentrasi asam basa yang tidak terlalu asam dan tidak terlalu basa sehingga akan lebih optimal dengan menghasilkan keseimbangan warna untuk membedakan granula leukosit. Pengencer buffer dengan pH yang rendah atau kurang dari 6,8 mengakibatkan leukosit tidak sempurna menyerap pewarna Giemsa dikarenakan terlalu asam sehingga kromatin inti yang seharusnya berwarna ungu hanya terbentuk sebagian di tengah inti, dan sebagian berwarna merah, leukosit juga akan menampilkan bagian-bagian yang kurang jelas. Sebaliknya pada pengencer buffer dengan pH tinggi atau lebih dari 6,8 dengan basa yang kuat mengakibatkan leukosit terlalu banyak menyerap *methylen blue* sehingga sitoplasma semakin pekat dan granula semakin gelap (Adianto, 2013).

2.3. Kerangka Teori



Gambar 2.7 Kerangka Teori

2.4. Kerangka Konsep



Gambar 2.8 Kerangka Konsep

2.5. Hipotesis

Ada perbedaan yang signifikan antara pengaruh konsentrasi pH buffer Giemsa terhadap morfologi leukosit pada preparat sumsum tulang.

