

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gambaran Darah

2.1.1 Pengertian Darah

Darah merupakan jaringan tubuh yang berbeda dari jaringan tubuh lain, dengan konsistensi cair, beredar dalam sistem tertutup yang disebut pembuluh darah (Yuni NE., 2015). Volume darah kira-kira sepertiga belas dari berat tubuh kita. Pada orang dewasa normalnya 5 liter (D'Hiru, 2013).

2.1.2 Fungsi Darah

Didalam tubuh darah memiliki peranan sebagai berikut: sebagai pengangkut air, pengangkut oksigen, pengangkut sari makanan yang akan diedarkan keseluruh tubuh, pengangkut hasil oksidasi untuk dibuang melalui saluran ekskresi, alat pengangkut getah hormon yang berasal dari kelenjar buntu, menjaga temperatur tubuh, mencegah infeksi yang merupakan peran sel darah putih, antibodi dan sel darah beku, mengatur keseimbangan asam basa, sebagai transport metabolit, dan lain sebagainya (Yuni NE., 2015).

2.1.3 Komposisi Darah

Darah terdiri atas 55% plasma dan sel 45% (Judha, Erwanto dan Retnaningsih, 2012). Setetes darah diletakkan di atas kaca objek yang bersih dan kering dan dibuat hapusan dan diwarnai dengan pewarnaan *May Griinwald-Giemsa* (MGG), secara garis besar akan tampak sel-sel yang dibagi dalam 3 kelompok besar yaitu: sel darah merah, sel darah putih dan keping darah (Yuni NE., 2015).

1. Sel darah merah (eritrosit)

Cairan bikonkaf, diameter 7 mikron. Warnanya kuning kemerahan, karena didalamnya mengandung hemoglobin. Eritrosit tidak memiliki inti sel, mitokondria dan ribosom, serta tidak dapat bergerak (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008). Eritrosit dengan pewarnaan Giemsa yang baik akan berwarna merah muda keabuan (Sucipto, 2015). Eritrosit memiliki akromia yang merupakan bagian pucat sentral eritrosit dengan luas $1/3-1/2$ kali diameter eritrosit (Arif M., 2015).



Gambar 2.1 Eritrosit (Arif M., 2015)

2. Sel darah putih (leukosit)

Bentuk dapat berubah-ubah, dapat bergerak dengan perantaraan kaki palsu (pseudopodia), inti sel bermacam-macam sehingga dapat dibedakan berdasarkan intinya, warnanya bening (tidak berwarna) (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008). Sel darah putih dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu granulosit dan agranulosit (Yuni NE., 2015).

Golongan bergranula (granulosit)

a. Basofil

Granula berwarna biru dengan pewarnaan basa, ukuran lebih kecil dari eosinofil dengan bentuk inti yang teratur, terdapat granula-granula besar disitoplasma (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008). Granula dapat menutupi inti (Arif M., 2015).



Gambar 2.2 Basofil (Arif M., 2015)

b. Eosinofil

Granula berwarna merah dengan pewarnaan asam, ukuran dan bentuk hampir sama dengan neutrofil (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008). Sitoplasma dipenuhi granula besar, bulat, sama besar berwarna kemerahan (Arif M., 2015).



Gambar 2.3 Eosinofil (Arif M., 2015)

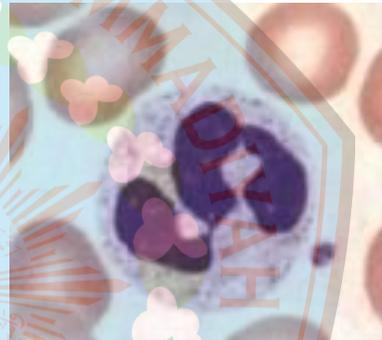
c. Neutrofil

Granula tidak berwarna, inti sel yang terangkai, kadang seperti terpisah-pisah, protoplasma banyak bergranula (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008). Ukuran 12-15 um, bentuk bulat tegas (WHO., 2011). Inti berwarna ungu. Berbentuk batang jika lekukan inti melebihi setengah diameter inti, berbentuk segmen jika inti menjadi beberapa bagian yang dihubungkan dengan kromatin. Sitoplasma agak kemerahan terdapat granula berwarna keunguan (Arif M., 2015).



Gambar 2.4 Neutrofil Batang

(Arif M., 2015)



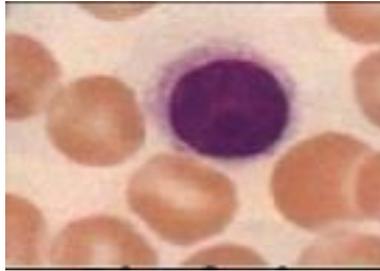
Gambar 2.5 Neutrofil Segmen

(Arif M., 2015)

Golongan yang tidak bergranula (agranulosit)

a. Limfosit

Limfosit terbagi menjadi dua macam yaitu limfosit kecil dan limfosit besar. Limfosit kecil berukuran 8-10 ul, limfosit besar berukuran 12 – 16 ul (Arif M., 2015). Inti limfosit besar bulat, berwarna ungu tua, dengan sitoplasma lebar, berwarna biru jernih berisi beberapa *granule* berwarna keunguan. Limfosit kecil sitoplasma sedikit, inti berwarna biru tua sampai kehitaman (Sucipto, 2015).



Gambar 2.6 Limfosit (Arif M., 2015)

b. Monosit

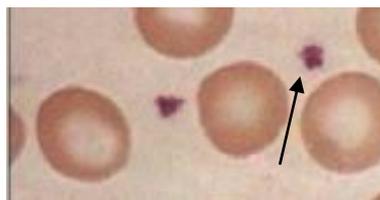
Ukuran lebih besar dari limfosit, protoplasmanya besar, warna biru sedikit abu-abu, mempunyai bintik-bintik sedikit kemerahan. Inti sel berbentuk bulat atau panjang (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008) berwarna biru ungu. Sitoplasma terkadang bervakuol (Arif M., 2015).



Gambar 2.7 Monosit (Arif M., 2015)

3. **Keping Darah (Trombosit)**

Bentuk cakram bulat, oval, bikonveks, tidak berinti dan hidup sekitar 10 hari (Handayani W. dan Hariwibowo AS., 2008), berwarna merah (Sucipto, 2015). Berjumlah 100.000/ ul darah (Sucipto, 2015).



Gambar 2.8 b. Trombosit (Arif M., 2015)

2.2 Sediaan Apus Darah Tepi (SADT)

2.2.1 Pengertian SADT

Sediaan apus darah tepi secara mikroskopis untuk mengamati sel darah (Nugraha G., 2015), menentukan fraksi jumlah dan jenis leukosit, mengetahui eritrosit yang abnormal, mencari parasit darah, mengestimasi jumlah trombosit (WHO., 2011). Sediaan apus darah tepi yang umum digunakan di laboratorium di Indonesia adalah apusan darah tipis (Tarwoto, 2008).

Bahan yang digunakan darah kapiler segar atau darah EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) yang tidak mempengaruhi morfologi eritrosit dan leukosit serta mencegah penggumpalan trombosit (Arif M., 2015). Pembuatan apusan dengan darah vena tidak boleh melebihi 1 jam sejak darah ditampung dan penyimpanan pada suhu (18-25)⁰C. Pencampuran yang sempurna darah dengan antikoagulan sangat diperlukan dalam membuat apusan darah tepi yang baik (Kiswari R., 2011).

2.2.2 Kriteria SADT yang Baik

Pembuatan apusan yang jelek akan menyebabkan kekeliruan hasil pemeriksaan fraksi jumlah jenis leukosit dan tidak mungkin bisa melakukan pelaporan morfologi eritrosit (WHO.,2011).

Perlu diperhatikan kriteria darah apus yang baik meliputi: lebar dan panjangnya tidak memenuhi kaca benda, penebalannya gradual paling tebal daerah kepala dan semakin menipis ke arah ekor, tidak berlubang-lubang, tidak terputus-putus, tidak terlalu tebal dan mempunyai pengecatan yang baik. Morfologi preparat darah hapus terdiri dari tiga bagian yaitu, kepala, badan dan

ekor. Bagian badan dibagi menjadi enam zona (daerah baca) yaitu zona I dekat dengan kepala sampai zona VI dekat dengan ekor (Santoso B., 2010). Panjang sediaan apus sekitar $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ kaca objek. Bagian yang tipis eritrosit terpisah-pisah dan saling berdekatan. Leukosit menyebar secara merata dan tidak bergerombol di salah satu tempat (Tarwoto, 2008). Diperlukan latihan terus menerus agar hasil apusan darah tepi baik. Berapa besar tetesan, sudut apusan kecepatan geseran dan lain sebagainya akan diketahui dengan sendirinya apabila sudah terampil (Kiswari R., 2011).

Berikut sebab akibat apusan darah tepi tidak layak untuk diperiksa:

Tabel 2.1 Sebab Akibat Apusan Darah Tepi Tidak Layak Diperiksa (Kiswari R., 2011).

Sebab	Akibat
Penundaan pemeriksaan setelah sampel dapat diambil	Distorsi/kerusakan sel darah
Setelah darah ditetaskan pada kaca benda terlambat melakukan hapusan	Terjadinya dispersi sel-sel yang berukuran besar pada "feather edge"
Kotornya kaca benda	Terdapat bintik-bintik pada apusan
Tetesan darah terlalu banyak	Apusan terlalu tebal dan panjang
Tetesan darah terlalu sedikit	Apusan terlalu tipis dan pendek
Sudut geseran terlalu besar atau kecil	Apusan terlalu tebal jika sudut geseran terlalu besar jika terlalu kecil apusan menjadi terlalu tipis
Geseran terlalu lambat	Persebaran sel tidak baik
Tekanan pada sprider terlalu kuat atau lemah	Apusan terlalu tipis jika tekanan kuat
Kelembapan ruangan	Kelembapan yang tinggi menyebabkan pengeringan apusan lebih lama dan menjadikan eritrosit rusak

2.2.3 Pewarnaan SADT

Mempermudah pengamatan sel-sel darah maka dilakukan teknik pewarnaan (Nugraha G., 2015). Romanowsky dan Malachowski (1891) pertama kali menggunakan campuran *methylen blue* dan eosin untuk melakukan pengecatan sediaan apus darah (Kiswari R., 2011). Prinsip pewarnaan didasarkan

pada sifat kimiawi dalam sel. Zat warna yang bersifat asam akan bereaksi dengan komponen sel yang bersifat basa demikian sebaliknya. Pewarnaan dengan prinsip Romanowsky yaitu menggunakan zat warna Azure B (trimethylthionin) yang bersifat basa dan Eosin Y (tetrabromoflourescein) yang bersifat asam seperti yang dianjurkan oleh *The International Council for Standardization in Hematology*, dan pewarnaan yang dianjurkan adalah Wright-Giemsa dan *May Grunwald-Giemsa* (MGG) (Arif M., 2015).

Penjabaran prinsip pewarnaan *Romanowsky*:

- a. Asam nukleat, nukleoprotein dan protein plasma merupakan komponen sel yang bersifat asam akan bereaksi dengan komponen zat warna yang bersifat basa yaitu *methylen blue* dan Azur, sehingga berwarna biru. Komponen tersebut dinamakan basofilik (Alawiyah S., 2016).
- b. Hemoglobin dan beberapa konstituen sitoplastik leukosit merupakan komponen sel yang bersifat basa akan bereaksi dengan komponen zat warna yang bersifat asam yaitu eosin, sehingga berwarna merah-jingga. Komponen tersebut dinamakan asidofilik atau eosinofilik (Alawiyah S., 2016).
- c. Beberapa organela seluler yang bersifat netral bereaksi dengan zat warna basa maupun asam menghasilkan warna ungu yaitu campuran warna biru dan merah. Komponen tersebut adalah neutrofil (Alawiyah S., 2016).

Pewarna Romanowsky yang sering digunakan:

- a. Pewarna Leisman, dipakai sebagai pewarna tunggal.
- b. Pewarna May-Gruwald, dipakai bersama-sama pewarna giemsa.

- c. Pewarna Giemsa, dipakai sebagai pewarna tunggal atau dengan pewarna May-Gruwald atau Jenner.
- d. Pewarna Field A dan B, yang merupakan larutan dalam air, tidak seperti pewarna yang lain yang menggunakan methanol. Pewarna Field digunakan sebagai pewarna sediaan tipis atau tebal (WHO., 2011).

2.3 Pewarna Giemsa

2.3.1 Pengertian Giemsa

Giemsa merupakan pewarna dengan prinsip Romanowsky yang terdiri dari Azure B (produk oksidasi *methylen blue*) yang memiliki warna biru dan eosin (eosin B atau Y) yang berwarna merah, kombinasi kedua zat warna tersebut bersifat polikromatik sehingga dapat memberikan beberapa warna terhadap sediaan apus darah (Nugraha G.,2015). Azur B (trimetil tionin) bersifat basa dan eosin Y (tetrabromfluorecein) bersifat asam. Azur B mewarnai komponen sel yang bersifat asam dan eosin Y mewarnai komponen yang bersifat basa seperti granula eosinofil, ikatan antara eosin Y dengan azur B dapat menghasilkan warna ungu (Arianda D., 2015). Pewarna Giemsa digunakan untuk membedakan inti sel dan morfologi sitoplasma sel darah merah, sel darah putih, trombosit serta parasit darah (Nugraha G.,2015).

2.3.2 Pedoman Pembuatan Giemsa

Cara pembuatan Giemsa stok dari Giemsa bubuk 8 gram ditambah 500 ml methanol absolut dan 500 ml gliserin murni. Giemsa stok harus berkualitas dengan memiliki eosin, methylen blue dan metil azur yang aktif (Rahmad A. dan Purnomo, 2011). Elemen-elemen zat warna Giemsa akan larut 40-90 menit

dengan aquadest atau buffer. Kemudian elemen-elemen zat warna tersebut akan mengendap dan sebagian lagi kembali ke permukaan membentuk lapisan tipis seperti minyak dengan demikian stok Giemsa tidak boleh tercemar air. Giemsa yang mutunya kurang baik tidak akan mengeluarkan warna ungu atau merah atau keduanya sehingga mutu Giemsa perlu diuji (Depkes RI., 2006).

Pengujian mutu Giemsa dilakukan dengan dua cara yaitu:

- a. Dilakukan pewarnaan pada sel darah kemudian dilakukan pemeriksaan mikroskopis. Hasil sesuai kriteria berarti Giemsa dan pengencerannya masih baik.
- b. Tes menggunakan kertas saring dan methanol
Diletakkan kertas saring di atas gelas. Diteteskan 1-2 tetes Giemsa di atas kertas saring tunggu sampai meresap dan melebar kemudian ditetaskan methanol absolut di tengah Giemsa dengan jarak waktu beberapa detik, sampai diameter giemsa (5-7) cm. Bulatan yang terbentuk membentuk bulatan biru (methylen blue) berada di tengah, lingkaran cincin ungu (metil azur) diluar serta lingkaran tipis berwarna merah (eosin) dipinggir (Depkes RI., 2006).

2.3.3 Teknik Pewarnaan Giemsa

Teknik pewarnaan yang benar dapat menunjang pembacaan hasil sediaan apus darah tepi. Pengeringan apusan harus dilakukan dengan benar agar hasil pewarnaan baik. Didiamkan agar apusan mengering sendiri (WHO., 2011). Fiksasi dilakukan dengan methanol absolut (Rachmawati, D., 2016). Fiksasi dilakukan selama 2-3 menit (WHO., 2011). Fiksasi yang tidak dilakukan dengan

baik dapat menyebabkan perubahan morfologi dan warna sediaan. Sediaan apus yang sudah kering tidak dilakukan fiksasi segera, dapat menyebabkan perubahan morfologi leukosit (Arif, M., 2015).

Terdapat 3 teknik pengenceran Giemsa yaitu 1 bagian Giemsa : 4 bagian buffer dengan waktu pengecatan 10-15 menit, 1 bagian Giemsa : 9 bagian buffer dengan waktu pengecatan 20-25 menit, 1 bagian Giemsa : 19 bagian buffer dengan waktu pengecatan 30 menit (Depkes RI., 2007). Giemsa yang sudah diencerkan tidak tahan lebih dari satu hari sehingga dibuat secukupnya (Gandasoebrata, 2007). Menurut Malaya Adiyanto (2013) pembuatan pengenceran Giemsa lebih baik menggunakan buffer pH 6,8.

2.3.4 Pengenceran Giemsa dan Waktu Pengecatan

Menurut Dian Rachmawati (2016) terdapat hal-hal yang dapat mempengaruhi mutu pewarnaan diantaranya pengenceran Giemsa dan waktu pengecatan. Pengenceran diperlukan agar mendapatkan pewarnaan yang optimal, karena Giemsa termasuk pewarna yang lambat (Gandasoebrata, 2007).

Prinsip pewarnaan Giemsa didasarkan pada prinsip *Romanowsky*, dengan prinsip kimiawi dari sel (Arif M., 2015). Prinsip kimiawi yang digunakan reaksi asam basa antara sel dengan komponen zat warna.

Laju reaksi merupakan kecepatan reaksi yang menyatakan banyaknya reaksi kimia per satuan waktu (Anonim, 2016). Faktor faktor yang mempengaruhi laju reaksi diantaranya konsentrasi pereaksi (Kamaludin, 2010). Konsentrasi naik, maka kecepatan reaksi akan naik (Anonim, 2016), sehingga dapat diterapkan pada pewarnaan Giemsa. Semakin besar konsentrasi Giemsa

(semakin rendah pengenceran) maka semakin cepat reaksi asam basa antara sel darah dan komponen zat warna pada Giemsa.

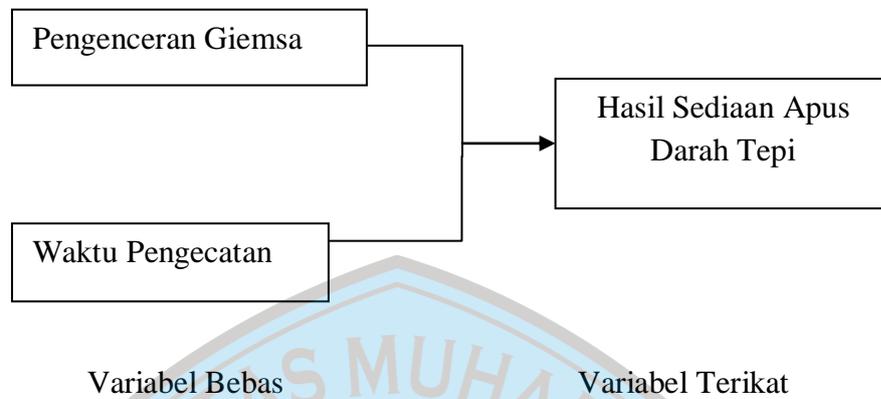
Sesuai dengan pernyataan Safar (2009) bahwa waktu pengecatan disesuaikan dengan konsentrasi Giemsa. Semakin lama pengecatan maka intensitasnya menjadi semakin tua, karena daya serap jaringan berbeda (Maskoeri, 2008). Waktu pengecatan tidak tepat warna yang dihasilkan tidak baik memungkinkan morfologi sel tidak jelas, karena proses penyerapan cat tidak merata atau sel terlalu banyak menyerap zat warna (Sahabudin, 2015). Zat warna yang berlebihan menyebabkan bagian-bagian sel darah terlalu tebal, sehingga susah diamati (Maskoeri, 2008).

2.4 Kerangka Teori



Bagan 2.1 Kerangka Teori

2.5 Kerangka Konsep



Bagan 2.2 Kerangka Konsep

2.6 Hipotesis

Ada hubungan antara pengenceran Giemsa dengan waktu pengecatan terhadap hasil sediaan apus darah tepi.