

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Darah

Darah merupakan salah satu sistem kardiovaskuler yang berasal dari peredaran darah dengan jaringan ikat khusus mengandung sel-sel dan berada dalam matriks dengan bentuk larutan terdiri dari dua bagian yaitu plasma darah sekitar 55% dan sisanya sel darah (eritrosit, leukosit dan trombosit) 45% (Miarsyah, 2011). Volume darah dalam tubuh secara keseluruhan yaitu satu per dua belas dari berat badan atau sekitar lima liter, memiliki karakteristik suhu antara 37°C sampai 38°C dan memiliki pH dengan rata-rata 7,4 (7,35-7,45) (Evelyn, 2006). Kadaan jumlah darah pada setiap manusia dapat mengalami naik-turun bergantung dari berbagai faktor, diantaranya: usia, jenis kelamin, ketinggian tempat hidup dan kondisi kesehatan jantung atau pembuluh darah seseorang (Handayani & Haribowo, 2008).

Peranan darah berfungsi sebagai pertahanan tubuh dari infeksi berbagai penyakit, mengangkut zat makanan dan oksigen ke seluruh tubuh, mengangkut sisa-sisa metabolisme ke alat-alat ekskresi, mengedarkan hormon-hormon ke bagian tubuh tertentu, menjaga stabilitas suhu tubuh dan menjaga keseimbangan asam basa secara efektif tanpa meninggalkan fungsinya masing-masing didalam jaringan tubuh (Miarsyah, 2011).

Manusia memiliki sistem peredaran darah tertutup sehingga darah dipompa oleh jantung menuju paru-paru (*pulmo*) untuk melepaskan sisa-sisa metabolisme tubuh, hemoglobin mampu mempengaruhi kadar oksigen (O^2) dan kadar

karbondioksida (CO^2). Warna darah sangat bervariasi, oleh karena itu darah yang kaya akan oksigen dapat berwarna merah terang, tetapi sebaliknya jika berwarna merah pucat disebabkan karena kekurangan oksigen dalam darah (Evelyn, 2006).

2.2 Sel darah merah (eritrosit)

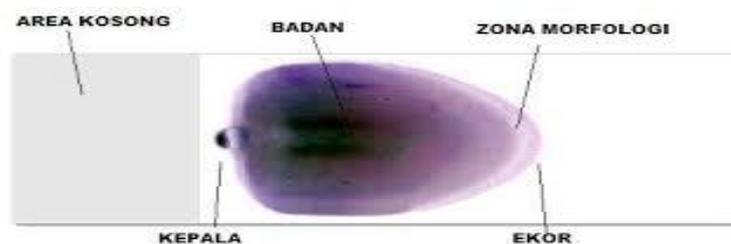
Eritrosit merupakan salah satu komponen sel darah terbanyak pada pembuluh darah tepi (perifer) dihasilkan melalui proses hematopoiesis dengan berbagai tahap yang dinamakan eritropoiesis dan dirangsang oleh hormon eritropoietin didalam sumsum tulang (Miarsyah, 2011). Eritrosit umumnya tidak memiliki inti sel tetapi mengandung beberapa organel sel yang terdapat pada sitoplasma, namun sebagian besar sitoplasma eritrosit berisi hemoglobin yang mengandung zat besi (Fe) berfungsi untuk mengikat oksigen dari paru-paru ke jaringan tubuh dan melepaskan karbondioksida. Setiap eritrosit mengandung sekitar 300 juta molekul hemoglobin, sejenis pigmen pernapasan yang mengikat oksigen. Volume hemoglobin mencapai sepertiga volume sel tersebut (Ethel, 2004).

Eritrosit adalah sel yang kompleks tersusun dalam membran sel dengan permeabilitas tinggi terdiri dari lipid dan protein. Bagian dalam sel ini secara mekanisme berfungsi untuk mempertahankan eritrosit selama 120 hari dalam masa hidupnya serta menjaga fungsi hemoglobin selama masa hidup eritrosit (William, 2007). Bentuk normal eritrosit yaitu *diskus bikonkaf* bersifat fleksibel untuk mempercepat pertukaran gas antara sel dan plasma darah, sehingga dapat melewati dinding pembuluh darah yang sangat kecil dan pada bagian tengah sel tampak lebih pucat (*central pallor*), sel ini memiliki diameter 6-8 μm dengan ketebalan 1-2 μm serta berjumlah kira-kira 4,5-6,5 juta sel/ mm^3 (Hoffbrand, 2005).

2.3 Pemeriksaan sediaan apus darah tepi

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi adalah pemeriksaan hematologi rutin dan khusus yang berfungsi untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi morfologi sel dari komponen darah tepi dalam menunjang diagnosis penyakit secara hematologis maupun non-hematologis, memantau efek terapi, dan untuk mengetahui ada atau tidaknya efek samping dari terapi atau pengobatan. Informasi yang didapat mengenai pemeriksaan ini tergantung pada kualitas pembuatan apusan, pewarnaan apusan, dan pembacaan yang sistematis (Dalimoenthe, 2002).

Prinsip pemeriksaan ini yaitu meneteskan darah pada salah satu ujung *objek glass* dipaparkan membentuk apusan darah dengan *deck glass* dan melakukan pengecatan menggunakan pewarnaan giemsa, wright, ataupun pewarnaan lainnya kemudian dilakukan identifikasi pada mikroskop. Ada beberapa persyaratan yang dapat dipenuhi untuk membuat sediaan apus darah tepi secara makroskopis, diantaranya: ketebalannya gradual, paling tebal terletak pada bagian kepala kemudian semakin menipis ke arah bagian ekor dengan panjang satu per dua sampai dua per tiga dari panjang *objek glass*, tidak melampaui atau menyentuh pinggir *objek glass*, tidak berlubang atau bergaris-garis, bagian ekor tidak membentuk seperti bendera robek dan memiliki bagian cukup tipis untuk mengidentifikasi eritrosit tanpa bertumpukan atau menyusun distribusi *rouleaux* (Kiswari, 2014).



Gambar 1. Sediaan apus darah tepi (Arif, 2015)

Apusan darah tepi dibagi menjadi enam zona berdasarkan distribusi eritrosit. Zona I disebut sebagai zona *irreguller* (tidak teratur, berdesakan, 3%), zona II (tipis tidak rata, berdesakan, 14%), zona III (tebal, bergerombol, 45%), zona IV (sama seperti zona II, tipis, 18%), zona V (even zona, tidak berdesakan, tidak bertumpukan, regular, rata, bentuk utuh, 11%) dan zona VI (sangat tipis, lebih longgar dan populasi jarang, 9%). Pembacaan sistematis yaitu memilih preparat dengan kriteria baik, memilih bagian yang akan dilakukan identifikasi (zona morfologi dimana eritrosit tersebar merata). Pembacaan sediaan apus darah tepi dilakukan mulai dari pinggir atas ke bawah dan dapat dilakukan pula pada salah satu bagian yaitu mulai dari atas atau bawah pada zona IV sampai VI, karena kedua bagian tersebut memiliki sebaran sel eritrosit yang hampir sama (Santosa, 2010).

Tabel 2. Sebab-akibat apusan darah tepi tidak layak diidentifikasi (Kiswari, 2014)

| Sebab | Akibat |
|--|---|
| Pemeriksaan ditunda setelah sampel berhasil diambil | Distorsi atau kerusakan sel-sel darah. |
| Lambat melakukan apusan setelah darah diteteskan pada kaca objek | Terjadi disproporsi sel-sel yang berukuran besar seperti monosit dan neutrofil. |
| Kaca objek kotor | Bintik-bintik pada preparat. |
| Tetesan terlalu banyak atau terlalu sedikit | Apusan terlalu tebal dan panjang atau terlalu tipis dan pendek. |
| Sudut geseran terlalu besar atau terlalu kecil | Bila sudut terlalu besar, maka apusan menjadi terlalu besar; dan bila sudut terlalu kecil, maka apusan menjadi terlalu panjang. |
| Penggeseran terlalu lambat | Penyebaran sel menjadi tidak baik. |
| Tekanan <i>spreader</i> pada kaca objek tidak akurat | Tekanan yang terlalu kuat menyebabkan preparat terlalu tipis. |
| Kelembapan ruang | Kelembapan yang tinggi menyebabkan preparat lama menjadi kering. Pengeringan yang lama mengakibatkan eritrosit rusak. |

Identifikasi pada mikroskop dengan perbesaran lemah (lensa objektif 10X), maka terdapat pembagian menjadi enam zona berdasarkan sebaran eritrosit untuk melihat adanya formasi *rouleaux*, parasit, dan sel mieloid yang memiliki ukuran besar. Bagian kepala terdapat sel-sel bertumpukan terutama eritrosit, sehingga bagian tersebut tidak dapat digunakan untuk identifikasi morfologi sel. Zona V atau bagian belakang merupakan zona morfologi yang baik untuk melakukan identifikasi karena eritrosit dapat terpisah satu sama lain dan umumnya tidak saling bertumpukan ataupun berdesakan, maka distribusi eritrosit agak longgar dibandingkan pada zona II sampai dengan zona IV (Kiswari, 2014).

Identifikasi dilanjutkan dengan perbesaran sedang (lensa objektif 40X) untuk mengamati adanya kelainan morfologi sel eritrosit dan taksiran hitung jenis leukosit. Perbesaran kuat (lensa objektif 100X) dapat dilakukan dengan membutuhkan penambahan minyak imersi di atas lapisan permukaan sediaan berfungsi untuk mempertegas hasil temuan dari perbesaran 40X lensa objektif dan menilai kualitas pewarnaan sediaan apus darah tepi (Kurniasari, 2010).

Sediaan darah apus tepi yang baik atau memenuhi syarat, memerlukan latihan secara terus-menerus. Prosedur pembuatannya yaitu menggunakan slide atau *objek glass* sebanyak 1 buah dan *cover glass* 1 buah sebagai alat penggeser dengan kriteria terbebas dari lemak, steril, dan kering. Besar-kecil tetesan yaitu hanya meneteskan darah vena sekitar 10 μ l dengan pipet mikro ataupun pipet tetes pada *objek glass* kira-kira 2 cm dari salah satu ujungnya, membuat sudut apusan dengan menerapkan penggeser membentuk sudut 30-45 derajat pada *objek glass* dan kecepatan penggeseran menggunakan tekanan yang cukup cepat. Sudut kemiringan

tersebut dapat berpengaruh terhadap tebal-tipisnya apusan darah yang dihasilkan. Semakin kecil sudutnya maka semakin tipis sediaan dan semakin lambat menggesernya maka semakin tipis juga zona morfologi yang dapat dilakukan identifikasi pada sel darah tepi terutama morfologi eritrosit (Gandasoebrata, 2009).

2.4 Morfologi eritrosit

Pengamatan morfologi eritrosit dalam pemeriksaan sediaan apus darah tepi yang dilakukan identifikasi pada mikroskop tidak selalu menghasilkan interpretasi baik atau normal, namun dapat terjadi kerusakan membran sel pada eritrosit. Kelainan morfologi eritrosit terjadi secara mikroskopis dapat berupa kelainan bentuk (*poikilositosis*), kelainan warna (*staining characteristics*), kelainan ukuran (*anisositosis*), kelainan adanya benda inklusi, dan kelainan pada distribusi eritrosit.

2.4.1 Kelainan bentuk

Achantosit (kelainan eritrosit berbentuk tonjolan seperti duri lancip tidak beraturan), anulosit (kelainan eritrosit terjadi warna yang lebih dominan pucat pada central palor), eliptosit (kelainan eritrosit berbentuk oval dan lonjong memanjang seperti sosis), fragmentosit (kelainan eritrosit berbentuk pecahan tidak beraturan dengan berbagai bentuk), ovalosit (kelainan eritrosit berbentuk oval memendek seperti piringan atau lempengan), sferosit (kelainan eritrosit berbentuk lebih bulat gelap, lebih kecil dan tebal), stomatosit (kelainan eritrosit berbentuk batang cerutu pucat pada bagian tengah sel), triangulosit (kelainan eritrosit yang menyerupai bentuk segitiga pucat ditengah sel).

Burr cell (kelainan eritrosit berbentuk tonjolan tumpul pendek secara tidak beraturan), blister cell (kelainan eritrosit berbentuk lepuhan satu atau lebih yang

mengandung vakuola), cigar cell (kelainan eritrosit berbentuk oval memanjang seperti batang cerutu), crenasi cell (kelainan eritrosit berbentuk tonjolan tumpul panjang secara tidak beraturan), pear shaped cell (kelainan eritrosit berbentuk seperti buah pear mirip dengan tear drop cell), sickle cell (kelainan eritrosit berbentuk lengkung dan dua katup runcing di bagian ujung), target cell (kelainan eritrosit bentuk seperti adanya sasaran pada daerah tengah inti sel), dan tear drop cell (kelainan bentuk eritrosit yang memperlihatkan bentuknya seperti tetesan air).

2.4.2 Kelainan warna

Hipokrom (kelainan eritrosit berwarna lebih pucat pada bagian tengah sel), hiperkrom (kelainan eritrosit berwarna lebih gelap pada seluruh bagian sel), dan polikrom (kelainan eritrosit berwarna gelap tidak merata dan sel lebih besar).

2.4.3 Kelainan ukuran

Mikrosit (kelainan eritrosit berukuran lebih kecil dari normal dengan diameter $<7 \mu\text{m}$), makrosit (kelainan eritrosit berukuran lebih besar dari normal dengan diameter $>9 \mu\text{m}$), dan megalosit (kelainan eritrosit berukuran sangat besar dari makrosit dan diameter $>12 \mu\text{m}$).

2.4.4 Benda inklusi

Basofilik stippling (benda inklusi berbentuk bulat yang tampak sebagai granula kecil dan berwarna biru gelap, umumnya berupa butiran kasar), cabot ring (benda inklusi berbentuk cincin dengan struktur berwarna kemerahan atau ungu merah dan tidak memiliki struktur internal), heinz body (benda inklusi yang telah mengalami denaturasi dan berasal dari polimerasi dan presipitasi molekul hemoglobin), howell-jolly body (benda inklusi berbentuk bulat berisi fragmen

kromatin, padat berwarna gelap-biru, tidak memiliki inti sel dan terlihat dalam sitoplasma eritrosit), dan pappenheimer body (benda inklusi yang berisi granula sangat halus berwarna gelap terjadi secara terpisah atau tersambung dalam sitoplasma eritrosit).

2.4.5 Distribusi eritrosit

Aglutinası (kelainan susunan eritrosit yang disebabkan oleh adanya reaksi antibodi dengan antigen pada eritrosit membentuk gumpalan-gumpalan) dan *rouleaux* (kelainan susunan eritrosit dalam kelompok-kelompok mirip dengan tumpukan koin umumnya terdapat pada bagian tebal sediaan apus darah tepi yang normal zona II dan III).

2.5 Faktor-faktor yang mempengaruhi morfologi eritrosit

2.5.1 Penundaan penyimpanan sampel

Penundaan penyimpanan sampel perlu memperhatikan dalam hal stabilitas pada sampel darah, apabila terpaksa dilakukan penundaan pemeriksaan dapat memperhatikan batas waktu penyimpanan untuk masing-masing pemeriksaan hematologi. Pemeriksaan sediaan apus darah tepi yang menggunakan darah antikoagulan EDTA masih diperbolehkan dengan disimpan paling lama 2 jam dalam almari pendingin pada suhu 4°C (Gandasoebrata, 2009) dan disimpan paling lama 1 jam pada suhu ruang (25°C) (Nurrachmat, 2005). Faktor lingkungan seperti suhu dan kelembaban dapat mempengaruhi suatu pemeriksaan yang berhubungan dengan cairan tubuh salah satunya morfologi eritrosit dalam pemeriksaan sediaan apus darah tepi (Kiswari, 2014).

2.5.2 Penggunaan antikoagulan

Penggunaan antikoagulan bertujuan supaya komponen sel darah tepi tidak terjadi penjendalan atau mencegah koagulasi hasil dari pembekuan stoikiometri kalsium. Darah yang mengandung antikoagulan dapat disimpan dalam selang waktu tertentu, oleh karena itu dapat dilakukan pemeriksaan ulang ataupun pemeriksaan tambahan lainnya (Kiswari, 2014). Garam natrium (Na_2EDTA) dan atau kalium ($\text{K}_2\text{EDTA}/\text{K}_3\text{EDTA}$) yang terkandung pada antikoagulan EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Asetate*) mampu mengubah ion kalsium didalam darah menjadi bentuk yang bukan ion sehingga dapat mencegah pembekuan darah lebih efektif daripada antikoagulan lainnya untuk pemeriksaan hematologi (Gandasoebrata, 2009).

Antikoagulan yang berisi K_3EDTA (*Tri-Kalium Ethylene Diamine Tetra Asetate*) lebih disarankan oleh CLSI atau disebut sebagai NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) untuk pemeriksaan hematologi digunakan dalam bentuk cair, karena memiliki stabilitas penyimpanan sampel darah yang lebih baik dibanding EDTA lainnya dan memiliki pH yang mendekati pH darah (Patel, 2009).

2.5.3 Tabung *vacutainer*

Tabung *vacutainer* tersedia dalam berbagai ukuran dan volume yang memiliki rata-rata 1,8-15 ml. Darah dapat terisi secara otomatis karena dipengaruhi oleh adanya tekanan negatif didalam tabung. Tabung tersebut dapat mengalami kegagalan dalam penampungan sampel darah, apabila kehilangan semua atau sebagian dari tekanan negatifnya (Kiswari, 2014).

Penggunaan tabung *vacutainer* lebih menguntungkan karena tidak perlu membagi sampel darah ke dalam beberapa tabung, namun penusukkan hanya dilakukan sekali dan dapat digunakan secara bergantian yaitu sesuai dengan jenis pemeriksaan laboratorium. Tabung *vacutainer* yang mengandung antikoagulan K_3EDTA setelah melakukan penampungan sampel darah segera dilakukan inversi atau membolak-balikan beberapa kali (8-10) untuk memastikan pencampuran antara antikoagulan dengan darah dapat terjadi secara menyeluruh dan sempurna. Tabung ini berisi cairan tersebut dapat mengencerkan sekitar 1,5 sampai 2,5 % dengan konsentrasi yaitu 1,8 mg/ml darah (Patel, 2009).

2.5.4 Fiksasi sediaan apus darah tepi

Fiksasi terhadap sediaan apus darah tepi bertujuan supaya morfologi sel darah tetap utuh terjaga dan melekat pada *objek glass*. Fiksasi dilakukan segera setelah apusan darah mengering. Sebelum melakukan fiksasi, hendaknya perlu memperhatikan apusan darah untuk dapat menghindari kontak langsung dengan air. Sediaan apus darah tepi yang akan dilakukan fiksasi diletakkan pada rak pewarnaan dengan lapisan darah menghadap keatas dan digenangi menggunakan larutan metil alkohol (*methanol*) kemudian dibiarkan selama 2-3 menit (Kiswari, 2014).

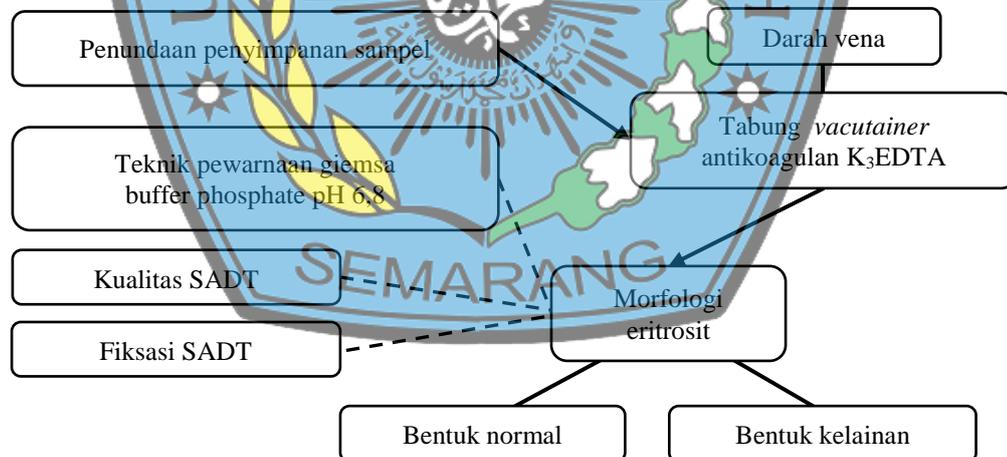
2.5.5 Pewarnaan giemsa

Prinsip pengecatan pada pemeriksaan sediaan apus darah tepi yaitu umumnya menggunakan prinsip romanowski dengan jenis pewarnaan giemsa atau wright. Kualitas giemsa dapat mempengaruhi hasil pewarnaan pada sediaan apus darah tepi yaitu dikatakan baik apabila giemsa dibuat baru dan dikatakan kurang baik apabila giemsa yang sudah disimpan lebih dari 24 jam (Cahyani, 2015). Derajat keasaman

atau pH larutan pengencer giemsa hendaknya berada antara 6,8 sampai 7,0. Perubahan pH dalam larutan tersebut dapat pula berpengaruh pada sel-sel darah tepi salah satunya adalah morfologi eritrosit (Adianto, 2013).

Pewarnaan giemsa umumnya diperjualbelikan dalam bentuk cair dan jika ingin digunakan untuk melakukan pengecatan maka dapat diencerkan dengan perbandingan 1:9 (1 bagian giemsa : 9 bagian buffer phosphate pH 6,8) menjadi giemsa 10% dan dilakukan selama 20-25 menit (Depkes RI, 2006). Penilaian hasil pewarnaan giemsa dikatakan baik terhadap morfologi eritrosit apabila kriteria warna normokrom, ukuran normositer dan bentuk normal. Buruk memiliki kriteria warna hipokrom dan hiperkrom, ukuran mikrositer dan makrositer dengan bentuk abnormal atau kelainan (Vegas, 2012).

2.6 Kerangka teori



2.7 Kerangka konsep



2.8 Hipotesis

Ada pengaruh penundaan penyimpanan sampel darah tabung *vacutainer* K₃EDTA pada suhu 25°C terhadap morfologi eritrosit.