

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sediaan Apus Darah Tepi

Pemeriksaan sediaan apus darah tepi merupakan bagian yang penting dari rangkaian pemeriksaan hematologi. Tujuan Pemeriksaan sediaan apus darah tepi adalah untuk menilai berbagai unsur sel darah seperti eritrosit, leukosit, serta trombosit dan mencari adanya parasit seperti malaria, mikrofilaria, dan lain sebagainya. Apusan darah tepi memberikan banyak informasi, bukan saja berkaitan dengan morfologi sel darah tetapi juga memberikan petunjuk keadaan hemologik yang semula tidak diduga (Kiswari R, 2014).

Bahan pemeriksaan yang terbaik adalah darah segar yang berasal dari kapiler atau vena yang dihapuskan pada kaca obyektif. Adapun ciri sediaan apus yang baik adalah sebagai berikut :

1. Ketebalan gradual, paling tebal di daerah kepala, makin menipis ke arah ekor
2. Apusan tidak melampaui atau menyentuh pinggir kaca obyektif
3. Tidak bergelombang dan tidak putus-putus
4. Tidak berlubang-lubang
5. Bagian ekor tidak membentuk bendera robek
6. Panjang apusan kira-kira $\frac{2}{3}$ dari panjang kaca obyektif

Ada beberapa sebab yang mengakibatkan apusan darah tepi menjadi tidak layak untuk diperiksa antara lain :

No.	Sebab	Akibat
1.	Pemeriksaan ditunda setelah sampel berhasil diambil	Distorsi atau kerusakan sel
2.	Lambat melakukan apusan setelah darah ditetaskan pada obyek glass	Terjadi disproporsi sel-sel yang berukuran besar seperti monosit dan neutrofil
3.	Kaca obyek kotor	Bintik-bintik pada apusan
4.	Tetesan terlalu banyak/sedikit	Apusan terlalu tebal dan pendek atau terlalu tipis dan panjang
5.	Sudut geseran terlalu besar atau terlalu kecil	Sudut terlalu besar apusan terlalu tebal ; sudut terlalu kecil apusan terlalu panjang
6.	Geseran terlalu lambat	Penyebaran sel tidak baik
7.	Tekanan spreader pada kaca obyek tidak akurat	Tekanan terlalu kuat menyebabkan apusan terlalu tipis
8.	Kelembaban ruang	Kelembaban yang terlalu tinggi menyebabkan apusan lama kering sehingga eritrosit rusak

(Kiswari R,2014)

Preparat darah apus yang baik memiliki tiga bagian yaitu kepala, badan dan ekor. Apabila diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran rendah (lensa obyektif 10X) terdapat pembagian menjadi enam zona berdasarkan distribusi eritrosit yaitu :

1. Zona I (irregular zone) yaitu zona dimana distribusi eritrosit tidak teratur, ada yang bergerombol sedikit atau banyak (tidak selalu sama masing-masing preparat).
2. Zona II (Thin zone), yaitu zona dimana distribusi eritrosit tidak teratur, saling bertumpukan atau berdesakan.
3. Zona III (Thick zone), yaitu zona dimana distribusi eritrosit saling bergerombol lebih rapat dibandingkan zona II, bertumpukan dan berdesakan yang merupakan daerah paling luas.
4. Zona IV (Thin zone), pada zona ini keadaan sama dengan zona II. Distribusi eritrosit tidak teratur, saling bertumpukan dan berdesakan.

5. Zona V (Even zone/regular zone), pada zona ini distribusi eritrosit tersebar merata tidak saling bertumpukan dan berdesakan sehingga masih utuh.
6. Zona VI (Very thin zone), ini merupakan daerah yang terletak di ujung preparat bersebelahan dengan daerah ekor. Distribusi eritrosit agak longgar dibandingkan populasi pada zona II dan IV.

Pembacaan preparat apusan darah dapat dilakukan pada bagian atas dan bawah pada zona IV sampai VI yang dekat dengan bagian ekor. Teknik pembacaan merupakan salah satu faktor penentu dalam keberhasilan penilaian sediaan apus darah (Santoso B, 2010).

2.2. Morfologi Sel Darah Merah (eritrosit)

Sel darah merah (red blood cell) atau eritrosit adalah sel darah tanpa nukleus yang berbentuk bikonkaf disc shaped cell. Sel ini berwarna merah karena mengandung hemoglobin. Fungsi utama eritrosit adalah untuk pertukaran gas. Eritrosit membawa oksigen dari paru menuju ke jaringan tubuh dan membawa karbondioksida (CO_2) dari jaringan tubuh ke paru-paru. Eritrosit tidak memiliki inti sel tetapi mengandung beberapa organel dalam sitoplasmanya. Sebagian besar sitoplasmanya berisi hemoglobin yang mengandung zat besi (Fe) sehingga dapat mengikat oksigen. Eritrosit berbentuk bikonkaf berdiameter 6-8 μ . Bentuk bikonkaf tersebut memungkinkan eritrosit bersifat fleksibel sehingga dapat melewati lumen pembuluh darah yang sangat kecil. Bila dilihat dengan mikroskop, eritrosit tampak bulat berwarna merah dan di bagian tengahnya tampak lebih pucat. Daerah pucat tersebut disebut central pallor yang

diameternya kira-kira sepertiga dari keseluruhan diameter eritrosit (Kiswari R, 2014).

Morfologi normal dan abnormal dari sel darah merah seorang pasien sangat membantu para dokter dalam mendeteksi suatu penyakit. Saat ini, analisis tentang morfologi sel darah merah yang dilakukan oleh para dokter dan pihak laboratorium masih dengan cara konvensional, sehingga tidak selalu sama antara dokter yang satu dengan yang lainnya. Kondisi fisik, pengetahuan, ketelitian dan konsentrasi dokter sangat menentukan hasil analisis, karena dilakukan dengan pengamatan langsung (Warni E, 2009).

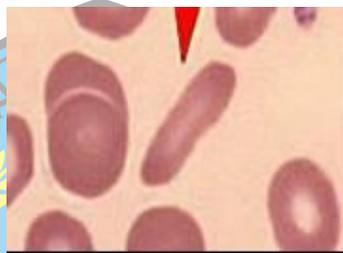
Morfologi eritrosit adalah bagian yang paling penting dalam evaluasi apus darah. Instrumen hematologi otomatis mampu menghitung secara akurat dan teliti jumlah sel darah merah termasuk indeksnya, selain itu informasi mengenai populasi distribusi sel darah merah, ukuran serta kadar hemoglobin dapat dihasilkan dalam waktu kurang dari satu menit setelah sampel diaspirasi. Apabila ditemukan abnormalitas sel darah merah satu atau lebih umumnya instrumen akan memberikan sinyal (flagging) sehingga dapat dilanjutkan konfirmasi dengan mikroskop.

Morfologi sel darah merah terdiri dari bentuk, warna dan ukuran yang dapat diamati menggunakan mikroskop dengan pewarnaan giemsa, wright, atau lainnya. Bentuk, warna, dan ukuran sel darah merah pada keadaan tertentu dalam mengalami abnormalitas. Variasi bentuk sel darah merah disebut poikilositosis. Setiap sel yang berbentuk tidak normal disebut poikilosit. Dapat ditemukan

beberapa bentuk yang bervariasi pada beberapa kasus dengan kelainan antara lain:

1. Eliptosis

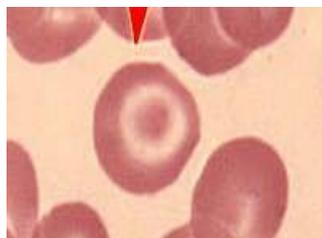
Ini merupakan kondisi dominan yang berhubungan dengan anemia hemolitik. Sel ini berbentuk seperti elips atau oval, juga disebut ovalosit. Eliptosis dapat terlihat pada darah orang normal namun kurang dari 10% dari jumlah total sel



Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

2. Sel target / leptosit

Sel target adalah eritrosit yang lebih tipis dari pada normal dan saat diwarnai menunjukkan lingkaran Hb dipinggir dengan area mengandung Hb dipusat yang berwarna gelap. Hal ini bisa terjadi pada kasus jaundice obstruktif, thalasemia, dan HbC.



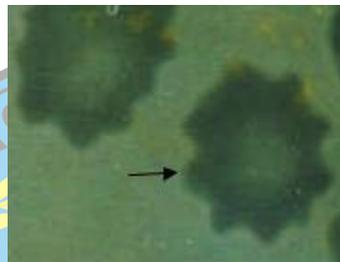
Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

3. Skistosit / sel fragmen

Merupakan hasil fragmentasi eritrosit, bisa berbentuk segitiga, elips, atau sebagai sel dengan permukaan tidak rata. Biasanya ditemukan pada kasus anemia megaloblastik, luka bakar berat, atau anemia hemolitik.

4. Sel burr

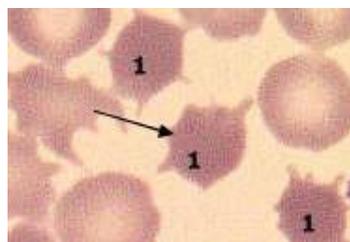
Sel ini menunjukkan tonjolan-tonjolan misalnya terjadi pada uremia dan carcinomatosis.



Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

5. Akantosit

Ditandai dengan adanya proyeksi halus dipermukaan eritrosit, menyerupai duri (kata Yunani : acantha : duri). Kelainan bawaan yang jarang : acanthocytosis, bisa mencapai lebih dari 50 %. Ada hubungan dengan metabolisme fosfolipid.

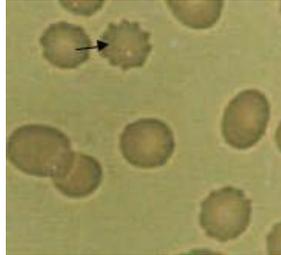


Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

6. Sel Krenasi

Merupakan sel terkontraksi secara irregular yang umumnya sebagai artefak dalam persiapan preparat atau disebabkan oleh hiperosmolaritas.

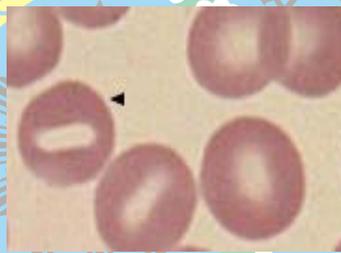
Secara in-vivo dapat berhubungan dengan ATP eritrosit karena berbagai sebab.



Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

7. Stomatosit

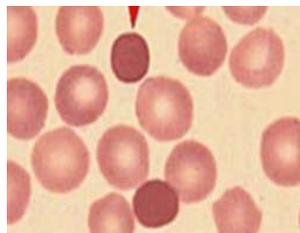
Sel ini berbentuk seperti mangkok, bisa didapat ataupun konginental.



Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

8. Sferosit

Sel ini berbentuk seperti bola. Sferosit terjadi akibat kelainan atau kerusakan membran eritrosit baik konginental maupun di dapat.



Sumber : Koko Putra Pamungkas, 2014

9. Tear Drop Cell

Eritrosit yang berbrntuk seperti buah pear atau tetesan air mata. Diduga berhubungan dengan eritrosit yang mengandung benda inklusi, dimana disaat benda inklusi dikeluarkan dari sel terjadi perubahan bentuk.

Selain bisa mengalami variasi bentuk, eritrosit juga bisa mengalami variasi warna. Kedalaman pewarnaan memberikan petunjuk kasar mengenai jumlah Hb dalam eritrosit. Istilah normokromik, hipokromik dan hiperkromik digunakan untuk menggambarkan karakteristik dari eritrosit. Normokromik mengacu pada intensitas pewarnaan yang normal. Bila kandungan Hb berkurang daerah sentral pallor menjadi lebih besar dan lebih pucat. Hal ini dikenal sebagai hipokromia. Sedangkan hiperkromik adalah kondisi dimana eritrosit lebih besar dan lebih tebal dengan central pallor lebih sedikit.

Eritrosit secara tidak normal dapat berukuran kecil atau mikrositik atau dapat pula berukuran besar atau makrositik. Variasi ukuran pada eritrosit ini disebut anisositosis. Sel mikrositik mempunyai diameter kurang dari 7μ , biasanya disertai dengan warna pucat atau hipokrom. Sedangkan makrositik mempunyai diameter lebih dari 8μ .

2.3. Tahap Pra Analitik

Kemajuan yang pesat dalam bidang laboratorium saat ini belum dapat menghindarkan pemeriksaan laboratorium terhadap berbagai kesalahan. Kesalahan laboratorium didefinisikan sebagai setiap ketidaksesuaian mulai dari permintaan tes laboratorium sampai dengan pelaporan hasil dan interpretasi serta tindakan yang tepat dari hasil tersebut. Jenis kesalahan yang terjadi pada

laboratorium diklasifikasikan sebagai kesalahan pra analitik, analitik dan pasca analitik. Beberapa penelitian melaporkan tingkat kesalahan laboratorium bervariasi, namun rata-rata kesalahan laboratorium terjadi pada tahap pra analitik (Eky Indyanty, 2015).

Tahap pra analitik adalah semua proses yang terjadi sebelum sampel diproses dalam alat baik manual maupun autoanalyzer. Contoh kesalahan pra analitik antara lain permintaan tes yang tidak tepat, tulisan tangan tidak terbaca pada formulir permintaan, kesalahan mempersiapkan pasien, pengambilan sampel yang tidak benar, penundaan transportasi, serta kesalahan penyimpanan sampel. Tahap analitik yaitu tahap mulai kalibrasi peralatan laboratorium, sampai dengan menguji ketelitian dan ketepatan pada uji spesimen. Tahap pasca analitik yaitu tahap dari mulai mencatat hasil pemeriksaan, interpretasi hasil dampak dengan cara pelaporan (Yusida, 2011).

Kesalahan tahap pra analitik memberikan kontribusi paling besar pada kesalahan laboratorium (46-77,1%). Tahap pra analitik menentukan apakah sampel layak diperiksa atau tidak, karena sampel yang buruk akan memberikan hasil yang tidak akurat. Tahap pra analitik yang biasanya juga kurang diperhatikan adalah penyimpanan sampel. Penyimpanan ini bisa dilakukan karena pemeriksaan ditunda, pemeriksaan akan dirujuk maupun untuk menghindari pengambilan sampel kembali kepada pasien apabila ada penambahan pemeriksaan (Zulfikar Ali Hasan, 2017).

Adapun beberapa faktor yang berpengaruh pada tahapan pra analitik antara lain :

1. Persiapan pasien

Persiapan pasien dimulai dari saat seorang dokter merencanakan pemeriksaan laboratorium bagi pasien. Ketaatan pasien terhadap informasi yang diberikan oleh klinisi dapat mempengaruhi akurasi hasil laboratorium. Contoh persiapan pasien yaitu latihan fisik, puasa, diet, obat-obatan, serta gaya hidup seperti merokok atau mengonsumsi minuman beralkohol.

2. Persiapan sampling

Sebelum melakukan sampling petugas harus memeriksa form permintaan laboratorium, identitas pasien, serta keterangan lainnya. Harus dipersiapkan pula peralatan yang akan digunakan untuk sampling, antikoagulan yang diperlukan, dan lokasi pengambilan sampel.

3. Pengambilan sampel

Proses pengambilan sampel juga harus menggunakan teknik yang benar. Sampel yang diambil haruslah tepat dan sesuai dengan jenis pemeriksaannya. Kondisi lingkungan seperti suhu dan kebersihan tentunya mempengaruhi stabilitas dan kualitas sampel sehingga dapat berakibat pada hasil pemeriksaan. Kadang-kadang sampel harus dikumpulkan pada waktu tertentu. Kegagalan untuk mengikuti jadwal pengambilan spesimen dapat menyebabkan hasil yang keliru dan salah tafsir dari kondisi pasien (Kiswari R, 2014).

4. Penyimpanan dan pengawetan darah

Persyaratan penyimpanan bervariasi secara luas. Selama penyimpanan konsentrasi konstituen darah pada spesimen dapat berubah karena berbagai proses, termasuk absorpsi tabungkaca atau plastik, denaturasi protein, penguapan senyawa volatil, pergerakan air ke dalam sel yang menyebabkan hemokonsentrasi, serta aktivitas metabolisme eritrosit dan leukosit (Kiswari R, 2014).

5. Transportasi spesimen

Perlakuan pada saat pengiriman spesimen harus diperhatikan, terutama untuk menghindari terjadinya hemolisis. Spesimen harus dilindungi dari kontak cahaya.

6. Pengolahan spesimen

Pengolahan spesimen ini tergantung dari pemeriksaan yang diminta. Apabila pemeriksaan yang diminta menggunakan sampel darah EDTA maka harus dilakukan homogenisasi dengan benar. Apabila pemeriksaan yang diminta menggunakan serum atau plasma maka harus dilakukan sentrifugasi dengan benar pula.

2.4. Pewarnaan Giemsa Sediaan Apus Darah

Menurut Romanowsky, ada 4 macam pewarnaan untuk apusan darah yaitu wright, liesman, may grundwald, dan giemsa. Pada pengecatan giemsa prinsipnya adalah sediaan apus darah difiksasi dengan methanol selama lima menit dan digenangi dengan cat giemsa yang sudah diencerkan selama 20 menit setelah itu dibilas dengan air dan dibiarkan mengering.

Adapun faktor yang menentukan keberhasilan pewarnaan giemsa antara lain :

1. Kualitas giemsa yang baik dan tidak tercemar air, pengenceran giemsa harus tepat
2. Waktu pewarnaan dan fiksasi harus tepat
3. Ketebalan pewarnaan dan kebersihan sediaan

Pengecatan giemsa merupakan pengecatan yang dilakukan untuk memeriksa morfologi sel darah maupun sel darah putih. Pengecatan giemsa ada yang sudah tersedia berupa larutan ada pula yang berupa serbuk sehingga kita harus membuatnya sendiri. Susunan larutannya adalah sebagai berikut :

1. Azzur II-eosin 3,0 g
2. Azzur II 0,8 g gliserin 250 ml
3. Metil alkohol 250 ml

Sebelum dipakai larutan giemsa ini harus diencerkan 20 kali dengan buffer pH 6,4. Zat pulas giemsa yang telah diencerkan tidak tahan lebih dari satu hari, maka harus dibuat secukupnya sesuai kebutuhan.

2.5. Darah EDTA

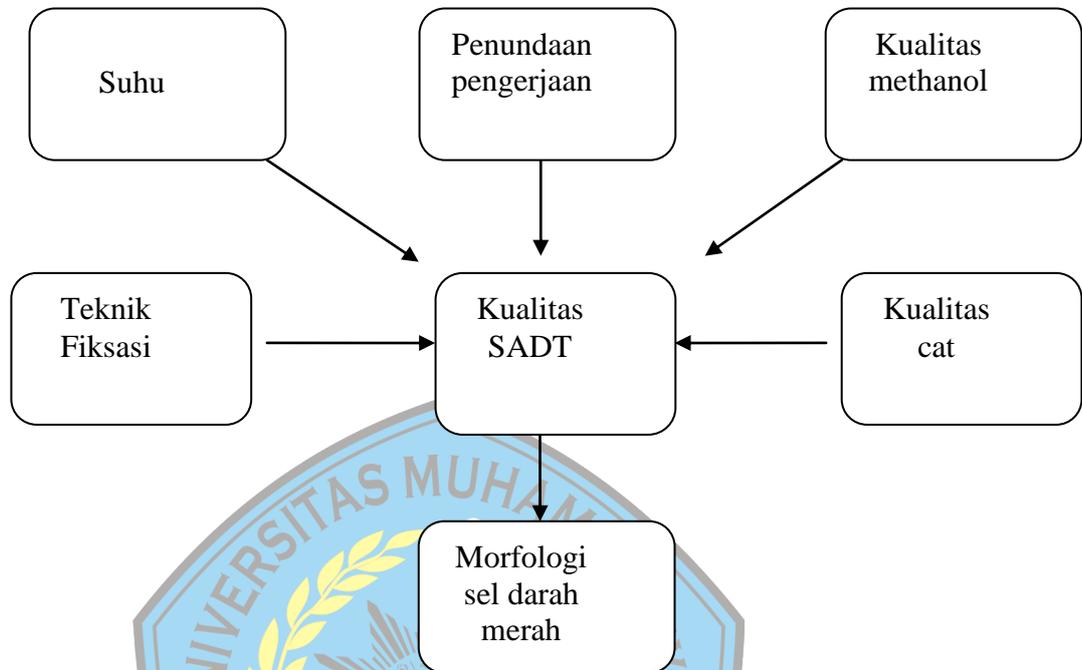
EDTA (ethylenediaminetetraacetic) adalah antikoagulan yang paling sering digunakan untuk pemeriksaan darah hematologi rutin. Darah vena dalam pemeriksaannya ditambahkan anti koagulan EDTA untuk menghindari terjadinya pembekuan (Gandasubrata, 2013). Pemeriksaan hematologi menggunakan anti koagulan EDTA perlu memperhatikan batas waktu penyimpanan. Penyimpanan bahan sebaiknya dihindari, artinya darah lebih baik jika langsung diperiksa.

Perubahan invitro yang terjadi jika darah disimpan lama adalah osmotik meningkat, waktu protrombin panjang dan LED berkurang, leukosit pelan-pelan mengalami autolisis (Astarini EP, 2015).

EDTA digunakan dalam bentuk garam Na_2EDTA atau K_2EDTA . Garam-garam EDTA mengubah kalsium dalam darah menjadi bentuk bukan ion. EDTA tidak berpengaruh terhadap besar dan jumlah eritrosit dan tidak juga terhadap leukosit. Setiap 1mg EDTA mencegah menggumpalnya 1 ml darah (Astarini EP, 2015).

Pemeriksaan dengan memakai darah EDTA sebaiknya dilakukan segera , hanya kalau perlu boleh disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam tetapi memberikan nilai hematokrit yang lebih tinggi. Untuk membuat sediaan apus darah tepi dapat dipakai darah EDTA yang disimpan paling lama 2 jam. Pada umumnya darah EDTA yang disimpan 24 jam didalam alamari es tanpa mendatangkan penyimpangan yang bermakna, kecuali untuk jumlah trombosit dan nilai hematokrit (Gandasoebrata, 2007).

2.6. Kerangka Teori



2.7. Kerangka konsep



2.8. Hipotesis

Ada pengaruh antara penundaan pembuatan preparat apusan darah tepi pada darah EDTA dengan morfologi sel darah merah.