

# Pengaruh Variasi Waktu Fiksasi Sediaan Apusan Darah Tepi pada Pewarnaan Giemsa terhadap Morfologi Sel Darah Merah

Puput Triyani  
Arfa Izzati

Politeknik Piksi Ganesha  
Politeknik Piksi Ganesha

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) merupakan slide yang salah satu permukaannya dilapisi lapisan darah tipis, difiksasi menggunakan methanol (methyl alcohol) dan diwarnai dengan pengecatan giemsa atau wright. Methanol yang baik digunakan untuk fiksasi memiliki kandungan air kurang dari 3% dengan konsentrasi larutan 96%. Methanol yang dibiarkan terlalu lama terbuka akan menguap dan mengalami penurunan konsentrasi. Penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya pengaruh dari variasi waktu fiksasi SADT pada pewarnaan giemsa terhadap morfologi sel darah merah. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen dengan jumlah sampel 24 dalam bentuk sediaan apusan darah tepi dibagi 4 berdasarkan variasi waktu fiksasi yaitu 3 menit, 5 menit, 10 menit, dan 15 menit. Waktu fiksasi 3 menit menunjukkan morfologi sel darah merah pada preparat dalam kondisi baik 100%, pada waktu 5 menit hasil krenasi sedang menjadi 16,7%, pada waktu 10 menit hasil krenasi sedang menjadi 50,0%, pada waktu 15 menit hasil krenasi sedang menjadi 83,3%. Hasil penelitian menunjukkan waktu yang tepat untuk fiksasi pada waktu 3 menit. Hasil uji statistik Chi Square didapatkan nilai signifikan (P value) 0,015 ( $<0,05$ ) sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat pengaruh yang jelas terhadap hasil mikroskopis bentuk sel darah merah dengan variasi waktu pada proses fiksasi sediaan apusan darah tepi.

## PENDAHULUAN

Pemeriksaan hematologi merupakan salah satu pemeriksaan yang dapat digunakan untuk penunjang diagnosis yang berhubungan dengan terapi dan prognosis. Pemeriksaan hematologi terdiri dari hematologi rutin dan hematologi khusus. Salah satu prosedur pemeriksaan hematologi rutin adalah sediaan apusan darah tepi (SADT).

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) menjadi salah satu pemeriksaan hematologi yang bertujuan untuk pemeriksaan mikroskopis untuk mengamati morfologi sel darah, seperti gambaran darah tepi, jumlah eritrosit, indeks eritrosit, jumlah retikulosit dan trombosit. Pemeriksaan sediaan apus darah tepi meliputi 2 bagian pemeriksaan yaitu pemeriksaan hitung jumlah leukosit (termasuk pemeriksaan rutin) dan gambaran sel darah serta unsur-unsur lain seperti parasit, sel-sel ganas dan melihat serta menilai morfologi sel darah bahkan komponen lain yang dapat memberikan informasi tentang keadaan hematologi seseorang. Pada sediaan perlu dilakukan pewarnaan agar mempermudah proses pemeriksaan sel-sel darah. Sediaan apus yang dibuat dan dipulas dengan baik merupakan syarat mutlak untuk mendapatkan hasil makroskopis maupun mikroskopis yang baik.

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) merupakan slide yang salah satu permukaannya dilapisi lapisan darah tipis dan diwarnai dengan pengecatan giemsa atau wright. Sebelum pengecatan, preparat terlebih dahulu difiksasi menggunakan methanol (methyl alcohol). Proses fiksasi bertujuan untuk merekatkan apusan darah tepi supaya tidak terkelupas dari preparat dan menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah struktur sel. Larutan fiksasi yang tidak baik karena terjadi

penguapan atau penurunan konsentrasi akan mempengaruhi perubahan morfologi sel dan perlekatan apusan darah.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dian Rachmawati pada tahun 2016 menunjukkan bahwa penguapan yang dilakukan kepada larutan fiksasi terlebih dahulu dapat menurunkan konsentrasi larutan sehingga dapat berpengaruh terhadap hasil makroskopik maupun mikroskopik pada SADT. Adapun penelitian lain yang dilakukan oleh Fatima Sholekha pada tahun 2018 menunjukkan perbedaan bermakna bahwa konsentrasi larutan fiksasi yang berbeda dapat mempengaruhi terhadap hasil dari mikroskopik SADT.

Menurut Romanowsky terdapat 4 macam pengecatan yaitu pengecatan Liesman, pengecatan Wright, pengecatan Grundwald, dan pengecatan Giemsa. Pewarnaan giemsa termasuk salah satu pewarna sintesis. Prinsip dari pewarnaan giemsa adalah adanya presipitasi hitam yang terbentuk dari penambahan larutan metilen blue dan eosin yang dilarutkan dalam methanol. Pewarnaan giemsa adalah pulasan yang terdiri dari eosin, metilen azur dan metilen blue yang berguna untuk mewarnai darah melalui fiksasi dengan metil alkohol. Pewarnaan dilakukan setelah tersedia dilakukan tahap fiksasi. Menurut Kiswari apusan darah difiksasi dengan methanol selama 2-3 menit. (7) Menurut Barbara J setelah dikeringkan udaranya, film darah difiksasi dengan Methanol absolute selama 10-20 menit.

Proses fiksasi dengan methanol absolute selama lima menit berfungsi untuk membuka dinding sel eritrosit agar cat giemsa dapat masuk sehingga dapat mewarnai sel eritrosit. Methanol yang baik digunakan untuk proses fiksasi memiliki kandungan air kurang dari 3%, methanol yang memiliki kandungan air lebih dari 3% dapat menyebabkan pengaruh terhadap morfologi sel eritrosit. Methanol yang dibiarkan terlalu lama terbuka akan menguap dan mengalami penurunan konsentrasi sehingga meninggalkan air pada proses fiksasinya dan mempengaruhi morfologi eritrosit. Larutan fiksasi yang tidak baik dapat menyebabkan perubahan morfologi, warna dan perlekatan sel yang tidak baik. Ini mungkin dapat terjadi apabila larutan fiksasi yang digunakan tidak absolute, methanol mengandung air > 3%, karena telah menguap dan dapat mengubah konsentrasi dari methanol tersebut yang dapat menyebabkan fiksasi tidak sempurna. Sel darah merah yang dimasukkan ke dalam larutan hipertonis, maka tekanan osmosis akan terjadi dari dalam sel keluar sel yang akan menyebabkan sel mengalami krenasi (pengerutan), sedangkan apabila eritrosit berada dalam lingkungan yang hipotonis, maka tekanan osmosis akan terjadi dari luar ke dalam sel yang akan menyebabkan sel mengembang hingga sel berr. Proses fiksasi bekepanjangan harus dihindari karena reagen mempengaruhi pengecatan selanjutnya dan menyebabkan beberapa penghambatan enzim intraseluler.

Pemeriksaan laboratorium dengan banyaknya sampel memungkinkan terjadinya keterlambatan atau membiarkan terlalu lama pada saat fiksasi sehingga terjadi penguapan dan penurunan konsentrasi methanol absolute. Lamanya waktu fiksasi ini akan berdampak pada morfologi sel darah merah dan dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan SADT. Hal ini melatar belakangi penulis untuk melakukan penelitian tentang "Pengaruh Variasi Waktu Fiksasi Sediaan Apusan Darah Tepi pada Pewarnaan Giemsa Terhadap Morfologi Sel Darah Merah".

## **METODE**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen, yaitu memberikan perlakuan variasi waktu fiksasi terhadap preparat sediaan apusan darah tepi sebagai subjek penelitian. Pada penelitian ini peneliti memberikan perlakuan waktu fiksasi berbeda untuk mengetahui pengaruhnya terhadap morfologi sel darah merah. Populasi dari penelitian ini adalah mahasiswa DIII Analisis Kesehatan Fakultas Kesehatan Politeknik Piki Ganesha Bandung. Penelitian ini bersifat homogen, dengan menggunakan teknik Sederhana Random Sampling. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah EDTA. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 6 sampel dengan 4 perlakuan (total 24 preparat) untuk masing-masing perlakuan sebanyak 6 sampel dengan variasi waktu fiksasi segera (waktu normal), 5 menit, 10 menit, dan 15 menit. Penelitian dilakukan di

Laboratorium Dinas Kesehatan Kota Bandung. Hasil penelitiandiuji dengan menggunakan uji SPSS Chi Square untuk melihat adanyapengaruh dari variasi waktu fiksasi terhadap morfologi sel darahmerah.

Darah diambil sebanyak 1-3 ml kemudian dimasukan kedalam tabungvacuntainer berisi EDTA dan diberi label. Sampel darah yang telahdiambil dibuat sediaan sebanyak 24 preparat (masing-masing 6 sampeluntuk 4 perlakuan) kemudian dilakukan fiksasi dengan konsentrasi larutan96% dan variasi waktu fiksasi yang berbeda yaitu 3 menit (waktunormal), 5 menit, 10 menit, dan 15 menit dihitung menggunakan stopwatch.Setelah sediaan mengering kemudian dilakukan pengecatan giemsa denganpengenceran giemsa 1:9 atau 1 ml giemsa diencerkan dengan 9 ml aquadest.Dengan perbandingan pengenceran giemsa 1:9 maka pengecatan dilakukanselama 25 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringudarakan dalam posisi vertikal. Setelah sediaan mengering dilakukanpembacaan menggunakan mikroskop pembesaran 1000x dengan menambahkanminyak imersi. Pemeriksaan dilakukan dengan melihat adanya sel krenasi(pengerutan sel) dengan kriteria sebagai berikut : Baik (tidakmenunjukkan sel krenasi), sedang (menunjukkan sel krenasi < 3 perlapang pandang), buruk (menunjukkan sel krenasi > 3 per lapangpandang).

## HASIL

Sampel diambil dari mahasiswa Analis Kesehatan Fakultas KesehatanPoliteknik Piksi Ganesha Bandung menggunakan teknik Sempel RandomSampling yang berjumlah enam orang. Darah diambil sebanyak 1-3 mlkemudian dimasukan kedalam tabung vacuntainer yang berisi EDTA dandiberi label. Sampel tersebut dibuat apusan darah kemudian dikeringkandengan cara di angin-anginkan. Setelah kering dilakukan fiksasi denganvariasi waktu berbeda yaitu 3 menit (waktu normal), 5 menit, 10 menitdan 15 menit lalu dilakukan pengecatan menggunakan pewarna giemsa selama25 menit lalu di amati dibawah mikroskop. Penilaian dengan melihatmikroskopis morfologi sel darah merah.

Setelah didapatkan hasil penelitian kemudian dilakukan pengolahandata dengan menggunakan uji SPSS Chi Square. Berikut adalah tabel hasiluji statistik dan gambar mikroskopis morfologi sel darah merah :

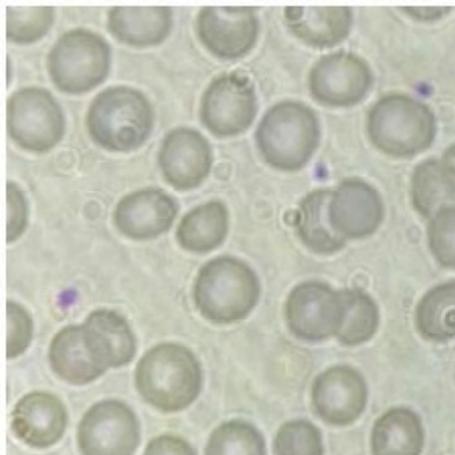
Waktu	Krenasi	Total	%					
	Buruk	%	Sedang	%	Baik	%		
3 menit (normal)	0	0,0	0	0,0	6	100	6	100
	0	0,0	1	16,7	5	83,3	6	100
5 menit	0	0,0	3	50,0	3	50,0	6	100
	0	0,0	5	83,3	1	16,7	6	100
10 menit	0	0,0	5	83,3	1	16,7	6	100
15 menit	0	0,0	5	83,3	1	16,7	6	100
Jumlah	0	0,0	9	37,5	15	62,5	24	100

**Table 1.** Tabel Hasil Mikroskopis Morfologi Sel Darah Merah

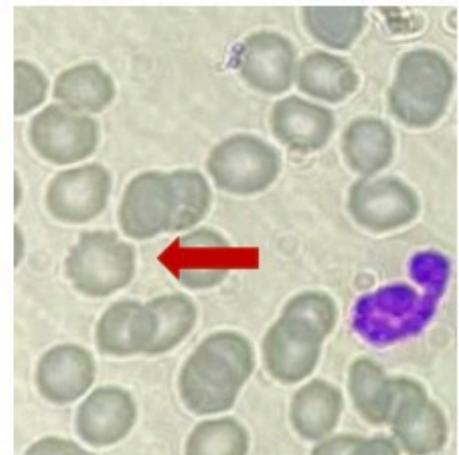
Berdasarkan tabel hasil mikroskopis bentuk krenasi pada enam sampeldidapatkan hasil bahwa preparat sediaan apusan darah tepi dengan lamawaktu fiksasi 3 menit (waktu normal) ditemukan 6 preparat (100%)memiliki hasil mikroskopis dengan bentuk sel darah merah yang baik.Pengamatan pada preparat sediaan apusan darah tepi dengan variasi waktufiksasi 5 menit ditemukan 5 preparat (83,3%) memiliki hasil mikroskopis bentuk sel darah merah yang baik dan 1 (16,7%) preparat memiliki hasilmikroskopis sel darah yang sedang. Pengamatan pada preparat sediaanapusan darah tepi dengan variasi waktu fiksasi 10 menit ditemukan 3preparat (50,0%) memiliki hasil mikroskopis bentuk sel darah merah yangbaik dan 3 preparat (50,0%) memiliki hasil mikroskopis sel darah

merahyang sedang. Pengamatan pada preparat sediaan apusan darah tepi dengan variasi waktu fiksasi 15 menit ditemukan 1 preparat (16,7%) memiliki hasil mikroskopis bentuk sel darah merah yang baik dan 5 preparat (83,3%) memiliki hasil mikroskopis sel darah merah yang sedang.

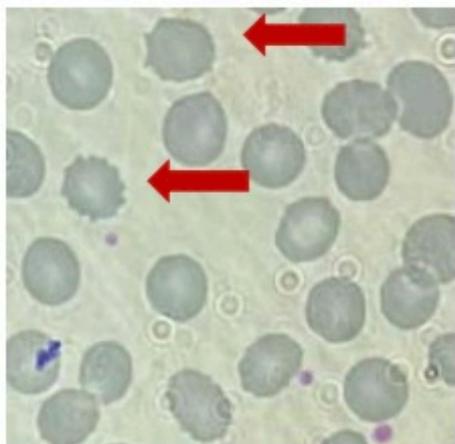
Hasil krenasi sediaan apusan darah tepi engan variasi waktu fiksasi segera (waktu normal), 5 menit, 10 menit, dan 15 menit dapat dilihat pada gambar berikut :



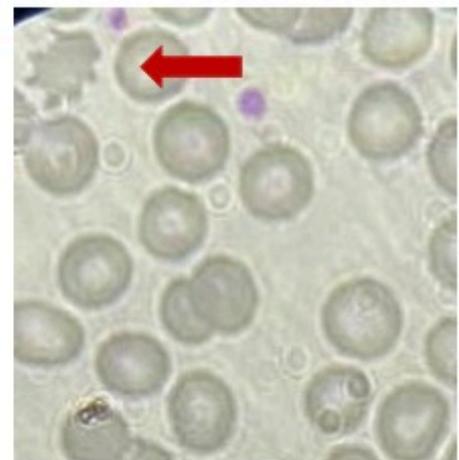
**Segera**



**5 menit**



**10 menit**



**15 menit**

**Figure 1.** *Gambar Mikroskopis Morfologi Sel Darah Merah Berdasarkan Variasi Waktu Fiksasi*

Berdasarkan gambar hasil mikroskopis bentuk sel darah merah dengan waktu fiksasi segera (waktu normal) tidak menunjukkan kelainan bentuk, sedangkan pada variasi waktu fiksasi 5 menit, 10 menit, dan 15 menit menunjukkan adanya perubahan bentuk sel darah merah (ditunjukkan tandapanah merah) akibat pengaruh dari variasi waktu fiksasi yang mengakibatkan penguapan pada larutan fiksasi (methanol absolute 96%).

Data yang didapat dari penelitian merupakan data yang memiliki skala ordinal dan skala nominal sehingga pengujian yang digunakan menggunakan analisis Uji Chi Square untuk menguji ada tidaknya pengaruh dari 4 kelompok perlakuan. Pengujian Chi Square dapat dilakukan pada hasil mikroskopis bentuk sel darah merah. Pengamatan dalam penelitianditemukan hasil krenasi

pada mikroskopis bentuk sel darah merah sebanyak 15 preparat (62,5%) memiliki mikroskopis bentuk sel darah merah yang baik dan 9 preparat (37,5%) memiliki mikroskopis bentuk sel darah merah yang sedang.

Hasil Uji Chi Square mikroskopis bentuk sel darah merah pada variasi waktu fiksasi 3 menit (waktu normal), 5 menit, 10 menit, dan 15 menit didapatkan nilai p sebesar 0,015 ( $<0,05$ ) sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat pengaruh yang jelas terhadap hasil mikroskopis bentuk sel darah merah dengan variasi waktu pada proses fiksasi sediaan apus darah tepi.

## PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian sediaan apusan darah tepi secara mikroskopis didapatkan hasil terbaik tahap fiksasi pada waktu 3 menit. Hal ini berkaitan dengan teori menurut Kiswari yaitu apusan darah diiksasi dengan methanol selama 2-3 menit. Pada waktu fiksasi 3 menit tidak ditemukan sel krenasi pada hasil SADT, morfologi sel darah merah baik dengan bentuk cakram bikonkaf, tidak berinti, tidak bergerak, memiliki diameter sekitar 7,5 mikron dan tebal 2,0 mikron dan central pallor 1/3 bagian sel darah merah. Sel krenasi ditemukan pada waktu fiksasi 5 menit, 10 menit dan 15 menit. Pengamatan dalam penelitian dengan total sampel sebanyak 24 preparat ditemukan hasil krenasi pada mikroskopis bentuk sel darah merah sebanyak 15 preparat (62,5%) memiliki mikroskopis bentuk sel darah merah yang baik dan 9 preparat (37,5%) memiliki mikroskopis bentuk sel darah merah yang sedang. Fiksasi dengan waktu 3 menit semua hasil morfologi sel darah merah pada sediaan apus darah tepi dalam kondisi baik 100%, pada variasi waktu fiksasi 5 menit hasil krenasi sedang menjadi 16,7%, pada waktu fiksasi 10 menit hasil krenasi sedang menjadi 50,0%, pada waktu fiksasi 15 menit hasil krenasi menjadi 83,3%.

Hasil uji Chi Square didapatkan nilai sig (p value) sebesar 0,015 ( $<0,05$ ) sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat pengaruh antara waktu fiksasi terhadap hasil mikroskopis pada morfologi sel darah merah pada sediaan apusan darah tepi. Hal ini terjadi karena larutan methanol mengalami penguapan dan larutan menjadi larutan hipertonis maka tekanan osmosis akan terjadi dari dalam sel keluar sel yang akan menyebabkan sel mengalami krenasi (pengerutan), sedangkan apabila eritrosit berada dalam lingkungan yang hipotonis, maka osmosis yang terjadi dari luar ke dalam sel yang akan menyebabkan sel menggelembung sehingga menjadi sel burr.

Sel Krenasi adalah kelainan bentuk eritrosit (poikilositosis) yang berbentuk seperti artefak. Suhu yang panas bisa mengakibatkan membran sel eritrosit pecah sebagai akibatnya sel mengalami pengerutan yang disebut krenasi akibat cairan yang berada di dalam sel keluar melalui membran. (5) Morfologi krenasi bisa disebabkan oleh beberapa faktor, seperti terjadinya kesalahan dalam prosedur pemeriksaan praanalitik.

Tahap fiksasi pada pembuatan preparat sediaan apusan darah tepi bertujuan untuk pelekatan sel pada objek glass serta menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah keadaan atau struktur sebenarnya sehingga membuat struktur sel-sel tetap normal dan mampu menyerap cat Giemsa dengan sempurna. Proses fiksasi yang tidak baik dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sediaan. Hal ini mungkin terjadi apabila fiksasi dilakukan menggunakan methanol yang tidak absolute karena telah menyerap air akibat penyimpanan yang tidak baik. Terlalu lama disimpan dalam keadaan terbuka akan menyebabkan methanol menguap dan memiliki kandungan air  $> 3\%$  di dalamnya yang dapat menyebabkan larutan menjadi hipertonis dan morfologi sel darah merah mengalami krenasi.

## SIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan tentang Pengaruh Variasi Waktu Fiksasi Sediaan Apusan Darah Tepi Pada Pewarnaan Giemsa Terhadap Morfologi Sel Darah Merah dapat disimpulkan :

1. Dari 6 sampel dan 4 kelompok perlakuan (24 preparat) didapatkan sebanyak 15 preparat (62,5%) memiliki mikroskopis bentuk sel darah merah dalam kategori baik dan 9 preparat (37,5%) memiliki mikroskopis bentuk sel darah merah dalam kategori sedang.
2. Hasil penelitian menunjukkan waktu yang tepat untuk tahap fiksasi pada waktu 3 menit. Hasil krenasi pada preparat sediaan apusan darah tepi ditemukan pada variasi waktu fiksasi 5 menit dalam kategori sedang menjadi 16,7%, pada waktu 10 menit dalam kategori sedang menjadi 50,0%, dan pada waktu 15 menit dalam kategori sedang sebanyak 83,3%.
3. Hasil uji SPSS Chi Square menunjukkan terdapat pengaruh dari variasi waktu fiksasi terhadap hasil krenasi mikroskopis morfologi sel darah merah pada sediaan apusan darah tepi.

## SARAN

1. Bagi petugas kesehatan yang bertugas di laboratorium lebih memperhatikan penyimpanan reagen larutan fiksasi dan ketelitian waktu pada saat melakukan proses fiksasi agar tidak terjadi kesalahan dalam pemeriksaan dan pengeluaran hasil.
2. Bagi peneliti selanjutnya diharapkan dapat melanjutkan penelitian dengan memperhatikan variasi konsentrasi larutan fiksasi dan karakteristik pada sampel yang akan digunakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bain B. Blood Cells : A Practical Guide. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd; 2014
- Budiwiyono I, et al., 2002. Pemantapan Mutu Laboratorium, Pemeriksaan Hematologi dan Imunologi, Semarang.
- Dekayana A, 2019. Hitung Laju Endap Darah (Led). Ponorogo : Uwais Inspirasi Indonesia.
- Herper Ta. 1974. The Peripheral Blood Film. London; Butterworths & Co. Ltd.
- Houwen B., 2002 Blood Film Preparation And Staining Procedures. Lab Hematol.
- Kiswari R., 2014 HEMATOLOGI & TRANSFUSI. Carolina S, Astikawati R, editors. Jakarta: Erlangga.
- Nugraha, Gilang., 2015 Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar. Cetakan 1. Jakarta : CV. Media Trans Info.
- Masters. 2002. Farmakologi Dasar Dan Klinik Katzing: Alkohol. Jakarta: Salemba Medika
- Mescher dan Anthony, L. 2012. Histologi Dasar JUNQUIERA. Jakarta: Penerbit Bukiu Kedokteran EGC.
- Mukh Syaifudin, Indah Irma, Dwi Ramadhani., 2018. Optimalisasi Pewarnaan Giemsa Pada Apusan Darah Tipis Terinfeksi Plasmodium berghei Untuk Mendukung Pengembangan Vaksin Malaria Iradiasi.
- Nugraha, Gilang., 2015 Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar. Cetakan 1. Jakarta : CV. Media Trans Info.
- Pamungkas Kp., 2014 Gambaran Morfologi Eritrosit Dengan Perbandingan Lama Fiksasi. J Food Syst Res. UNIMUS, Semarang. 14(2):70-5.
- Pasini, EM, Kirkeguard, M, Motensen, P, Hens U, Lutz, Thomas, AW dan Mann, M. 2006. Blood. The American Society of Hematology. Washington DC.



Rachmawati D., 2016 Pengaruh Lama Penguapan Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Makroskopis dan Mikroskopis Sediaan Apusan Darah Tepi. Universitas Muhammadiyah Semarang.

Sholekha Fe., 2018 Pengaruh Konsentrasi Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Mikroskopis dan Makroskopis Sediaan Apus Darah Tepi. Universitas Muhammadiyah Semarang.

Wirawan R. 2011. Pemeriksaan Laboratorium Hematologi. Jakarta: Dept. Patologi Klinik- FKUI