

Pengaruh Variasi Waktu Fiksasi Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) pada Pengecatan Giemsa terhadap Morfologi Sel Darah Merah

Abdul Ghofur, Tuti Suparyati, Siti Fatimah

Email: tutisuparyati@gmail.com

Akademi Analis Kesehatan Pekalongan, Indonesia

Jl. Ade Irma Suryani No.6 Tirto Kabupaten Pekalongan

Abstrak

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) merupakan slide yang salah satu permukaannya dilapisi menggunakan lapisan tipis dari darah dan diwarnai dengan pengecatan giemsa atau wright. Sebelum pengecatan, preparat difiksasi dengan methanol (methyl alcohol). Fiksasi berkepanjangan harus dihindari karena methanol mempengaruhi pengecatan selanjutnya dan menyebabkan beberapa penghambatan enzim intraseluler. Methanol yang dibiarkan terlalu lama di udara terbuka akan menguap (mengalami penurunan konsentrasi) dan mengandung air sehingga akan mempengaruhi morfologi eritrosit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi waktu fiksasi SADT pada pengecatan giemsa terhadap morfologi sel darah merah. Jenis penelitian ini adalah eksperimen. Sampel berjumlah 30 dalam bentuk sediaan apus darah tepi yang dibagi 3 berdasarkan variasi waktu fiksasi yaitu 3 menit, 5 menit dan 10 menit.. Hasil penelitian pada uji statistic Chi-Square didapatkan nilai signifikansi $0,00 < 0,05$ artinya ada perbedaan bermakna variasi waktu terhadap kualitas morfologi sel. Dan waktu fiksasi yang paling baik dengan waktu fiksasi 3 menit, pada fiksasi waktu 5 menit masih ditemukan beberapa sel krenasi (Pengerutan sel) dengan kriteria sedang (<3) sedangkan fiksasi dengan waktu 10 menit banyak sekali ditemukan sel krenasi (>3).

Kata kunci: SADT; fiksasi; morfologi sel darah merah.

Abstract

The Blood Smear is a slide whose one of the surfaces is coated using a thin layer of blood and stained with painting of giemsa or wright. Before painting, the preparation is fixated with methanol (methyl alcohol). Prolonged fixation should be avoided because methanol affects subsequent painting and causes some inhibition of intracellular enzymes. Methanol that is left too long in the open air will evaporate (decrease in concentration) and contain water so that it will affect erythrocyte morphology. This study aims to find out the effect of variations in sadt fixation time on giemsa painting on the morphology of red blood cells. This type of research is an experiment. The sample numbered 30 in the form of peripheral blood smear preparations divided by 3 based on variations in fixation time of 3 minutes, 5 minutes and 10 minutes. The results of the Chi-Square statistical test obtained a signification value of $0.00 < 0.05$ means that there is a significant difference in time variation in the morphological quality of cells. And the fixation time is best with a fixation time of 3 minutes, at a fixation of 5 minutes still found some crenation cells (cell grinding) with moderate criteria (<3) while fixation with a time of 10 minutes is found a lot of crenation cells (>3).

Keywords: *SADT; fixation; morphology of red blood cells.*

1. Pendahuluan

Pemeriksaan hematologi merupakan salah satu pemeriksaan yang dapat digunakan untuk menunjang diagnosis yang berhubungan dengan terapi dan prognosis.⁽¹⁾ Pemeriksaan hematologi terdiri dari pemeriksaan hematologi rutin dan pemeriksaan hematologi khusus. Salah satu prosedur pemeriksaan hematologi rutin yaitu pemeriksaan Sediaan Apus Darah Tepi (SADT).⁽²⁾

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) adalah pemeriksaan mikroskopis yang digunakan untuk mengamati sel darah beserta komponen lainnya yang dapat memberikan informasi yang berarti tentang kondisi hemtologi seseorang. SADT layak untuk diperiksa, jika memenuhi beberapa syarat yang telah ditetapkan.⁽²⁾⁽³⁾

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) merupakan slide yang salah satu permukaannya dilapisi menggunakan lapisan tipis darah dan diwarnai dengan pengecatan giemsa atau wright. Sebelum pengecatan, preparat terlebih dahulu difiksasi menggunakan methanol (methyl alkohol). 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 mengalami penguapan atau penurunan konsentrasi mempengaruhi perubahan morfologi sel dan perlekatan yang tidak baik.⁽⁴⁾

Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan oleh Dian Rachmawati tahun 2016 menunjukkan bahwa penguapan larutan fiksasi yang lama dapat menurunkan konsentrasi larutan fiksasi sehingga dapat berpengaruh

terhadap hasil makroskopik dan mikroskopik SADT.⁽⁵⁾ Penelitian lain yang dilakukan oleh Fatimah Emy Sholekha pada tahun 2018 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna konsentrasi larutan fiksasi terhadap hasil mikroskopik SADT.⁽⁶⁾

Menurut Romanowsky, terdapat 4 macam pengecatan yaitu pengecatan Wright, pengecatan Liesman, pengecatan May Grunwald, dan pengecatan Giemsa. Menurut Kiswari, apusan darah yang difiksasi dan digenangi methanol dibiarkan selama 2-3 menit.⁽⁷⁾ Sedangkan menurut Trevor dalam pengecatan film darah, film darah harus direndam dalam fiksatif yang direkomendasikan untuk teknik ini selama 15 menit.⁽⁸⁾ Menurut Barbara J setelah dikering udarakan, film darah difiksasi dengan Methanol absolute selama 10-20 menit.⁽⁹⁾ Larutan yang digunakan untuk fiksasi harus sebisa mungkin bebas dari air (<3%) atau biasanya digunakan larutan absolute.⁽⁴⁾

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 di biarkan terlalu lama diudara terbuka akan menguap (mengalami penurunan konsentrasi) dan mengandung air sehingga akan mempengaruhi morfologi eritrosit.⁽¹⁰⁾ Waktu fiksasi optimal tergantung dalam beberapa faktor dan bervariasi tergantung penggunaan jenis agen fiksatif yang digunakan.⁽¹¹⁾ Fiksasi berkepanjangan harus dihindari karena reagen mempengaruhi pengecatan selanjutnya dan menyebabkan beberapa penghambatan enzim intraseluler.⁽⁸⁾

Banyaknya teori tentang lamanya waktu fiksasi memungkinkan terjadinya variasi waktu fiksasi sesuai dengan acuan yang digunakan. Hal ini akan berdampak pada morfologi sel darah merah dan dapat mempengaruhi hasil Pemeriksaan SADT. Berdasarkan permasalahan di atas, peneliti bermaksud melakukan penelitian tentang “Pengaruh Variasi Waktu Fiksasi SADT pada Pengecatan Giemsa Terhadap Morfologi Sel Darah Merah”.

2. Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen yaitu peneliti memberikan perlakuan waktu fiksasi terhadap preparate SADT sebagai Subyek penelitian. Peneliti memberikan perlakuan waktu fiksasi yang berbeda dengan menggunakan *methanol absolute* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap morfologi sel darah merah. Total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 sampel yang dibagi menjadi 3 untuk masing – masing variasi waktu fiksasi yaitu untuk 3 menit, 5 menit dan 10 menit. Pada masing-masing kelompok perlakuan akan dilakukan duplo untuk mendapatkan hasil yang valid dan akurat. Pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Klinik AAK Pekalongan. Hasil penelitian diuji dengan menggunakan uji spss Chi-Square. Untuk melihat adanya pengaruh dari variasi waktu fiksasi terhadap morfologi sel darah merah.

Pemeriksaan Sampel

Sampel darah yang telah diambil dibuat apusan yang kemudian difiksasi dengan beda waktu 3 menit, 5 menit, dan 10 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pengecatan giemsa yang telah diencerkan terlebih dahulu 20 kali dengan larutan buffer : 1 tetes giemsa stok untuk setiap 1 ml penyangga. Pengecatan dilakukan selama 30-45 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikering udarakan dalam posisi vertikal. Setelah sediaan mengering diperiksa dengan mikroskop menggunakan perbesaran kuat dengan penambahan minyak imersi. Pemeriksaan dilakukan dengan melihat adanya Sel Krenasi (Pengerutan sel) dengan kriteria sebagai berikut: Baik (tidak menunjukkan adanya kelainan morfologi sel krenasi), Sedang (menunjukkan terjadinya kelainan morfologi sel krenasi yang jumlahnya <3 sel krenasi), Buruk (menunjukkan terjadinya kelainan morfologi sel (krenasi) yang jumlahnya >3 sel krenasi).

3. Hasil dan Pembahasan

Tabel 3.1 Hasil Pemeriksaan Morfologi Sel Darah Merah pada Sediaan Apus Darah Tepi Berdasarkan Waktu Fiksasi

No. Sampel	Waktu Fiksasi								
	3 Menit			5 Menit			10 Menit		
	Bk	S	Br	Bk	S	Br	Bk	S	Br
A1	✓				✓				✓
A2	✓			✓				✓	
A3	✓			✓				✓	
A4	✓			✓					✓
A5	✓			✓				✓	
A6	✓				✓				✓
A7	✓			✓				✓	
A8	✓			✓				✓	
A9	✓			✓				✓	
A10	✓			✓				✓	
Jumlah	10	-	-	8	2	-	-	7	3

Keterangan :

Bk : Baik (Tidak Terdapat Sel Krenasi)

S : Sedang (Terdapat Sel Krenasi < 3)

Br : Buruk (Terdapat Sel Krenasi > 3)

Sel Krenasi : Kelainan bentuk eritrosit (poikilositosis) yang berbentuk seperti artefak.

Berdasarkan tabel 3.1 dapat dilihat dengan waktu fiksasi 3 menit didapatkan hasil morfologi seluruhnya baik, pada waktu fiksasi 5 menit didapatkan hasil 8 sampel baik dan 2 sampel kriteria sedang

dan pada waktu fiksasi 10 menit didapatkan hasil 7 sampel kriteria sedang dan 3 sampel buruk.

Tabel 3.2. Hasil Persentase Kualitas Morfologi Sel darah Merah pada SADT Berdasarkan Waktu Fiksasi

Waktu Fiksasi	Baik	Sedang	Buruk	Total
3 Menit	100 %	0 %	0 %	100 %
5 Menit	80 %	20 %	0 %	100 %
10 Menit	0%	70%	30%	100 %

Berdasarkan tabel 3.2 di atas, persentase hasil berdasarkan kualitas pada waktu fiksasi 3 menit didapatkan 100% hasil sampel baik, pada waktu fiksasi 5 menit didapatkan 80% sampel memiliki kualitas sedang dan 20% berkualitas sedang dan pada waktu fiksasi 10 menit didapatkan hasil 70% sampel berkualitas sedang dan 30% berkualitas buruk.

Berdasarkan pengamatan sediaan apus darah tepi secara mikroskopis didapat hasil terbaik pada waktu fiksasi 3 menit. Hal ini relevan dengan teori yang ada menurut Kiswari, apusan darah yang difiksasi dan digenangi methanol dibiarkan selama 2-3 menit.⁽³⁾ 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. Pada waktu fiksasi 5 menit di temukan sel krenasi pada 2 preparat. Sedangkan pada waktu fiksasi 10 menit ditemukan lebih banyak sel krenasi. Hampir diseluruh SADT di temukan sel krenasi yang jumlahnya kurang dari 3 bahkan didapati sel krenasi yang jumlahnya lebih dari 3 pada beberapa preparat. Hasil uji Chi-square Test didapatkan nilai Sig. (P Value) sebesar $0,000 < 0,05$ yang berarti terdapat pengaruh variasi waktu fiksasi SADT pada pengecatan giemsa terhadap hasil morfologi sel darah merah. Hal ini terjadi karena larutan fiksasi yang telah menguap membuat volume larutan menurun sehingga bersifat hipertonis. Sel darah yang dimasukkan kedalam larutan hipertonis menyebabkan tekanan osmosis akan terjadi dari

dalam sel keluar sel yang akan mengakibatkan sel mengalami krenasi (pengerutan).⁽¹²⁾

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.⁽¹³⁾ Morfologi krenasi bisa disebabkan oleh beberapa faktor, seperti terjadinya kesalahan dalam prosedur pemeriksaan pra-analitik.⁽²⁾

Fiksasi bertujuan untuk menghentikan proses metabolisme secara cepat, mencegah kerusakan jaringan, dan mempertahankan keadaan sel sebenarnya sehingga struktur sel didalamnya tetap normal dan mampu menyerap cat dengan baik. Fiksasi yang tidak baik dapat menyebabkan perubahan morfologi sel dan warna sediaan. Hal ini dapat terjadi apabila fiksasi dilakukan menggunakan methanol yang tidak absolute dikarenakan telah menguap dan memiliki kandungan air $> 3\%$ sehingga larutan menjadi hipertonis.⁽⁴⁾ Hasil penelitian sejalan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Koko Putro Pamungkas dengan judul “Gambaran Morfologi Eritrosit dengan Perbandingan Lama Fiksasi” dengan waktu 5 menit dan lebih dari 5 menit dengan hasil semakin lama sel krenasi akan semakin banyak. (Pamungkas KP, 2014) Dan penelitian yang dilakukan oleh Dian Rachmawati dengan judul “Pengaruh Lama Penguapan Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Makroskopis Dan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi” dengan waktu fiksasi segera, 10, 20 dan 30 menit hasilnya

semakin lama semakin terjadi sel krenasi. (Rachmawati D, 2018). Hal ini membuktikan bahwa semakin lama waktu fiksasi akan menyebabkan kelainan ukuran sel yang ditandai dengan ditemukannya sel krenasi dalam sediaan apus darah tepi yang difiksasi lebih lama.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian membuktikan bahwa berdasarkan Hasil pengujian Chi Square didapatkan nilai p sebesar 0,000 ($<0,05$) sehingga dapat dinyatakan terdapat pengaruh variasi waktu fiksasi SADT pada pengecatan giemsa secara signifikan terhadap hasil morfologi sel darah merah. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu fiksasi yang paling baik yaitu 3 menit karena tidak ditemukan sel krenasi, pada waktu fiksasi 5 menit masih terdapat beberapa sel krenasi (<3). Sedangkan waktu fiksasi 10 menit terdapat banyak sel krenasi (>3).

5. Daftar Pustaka

- [1] Dekayana A. Hitung Laju Endap Darah (Led). Ponorogo: Uwais Inspirasi Indonesia; 2019.
- [2] G N. Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar. Jakarta: Cv. Trans Info Media; 2015.
- [3] Kiswari R. HEMATOLOGI & TRANSFUSI. Carolina S, Astikawati R, editors. Jakarta: Erlangga; 2014.
- [4] Houwen B. Blood Film Preparation And Staining Procedures [Internet]. Lab Hematol. 2002. p. 1–14. Available from: <http://mmsserver.cjp.com/Gems/Blood/Lh.6.1.Houwen.Pdf>
- [5] Rachmawati D. Pengaruh Lama Penguapan Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Makroskopis Dan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi. Universitas Muhammadiyah Semarang; 2016.
- [6] Sholekha Fe. Pengaruh Konsentrasi Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Makroskopis Dan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi. Universitas Muhammadiyah Semarang; 2018.
- [7] Wirawan R. Pemeriksaan Laboratorium Hematologi. Jakarta: Dept. Patologi Klinik - FKUI; 2011.
- [8] Harper Ta. The Peripheral Blood Film. London: Butterworths & Co. Ltd; 1974.
- [9] Bain Bj. Blood Cells: A Practical Guide. Australia: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd; 2014.
- [10] Pamungkas Kp. Gambaran Morfologi Eritrosit Dengan Perbandingan Lama Fiksasi. J Food Syst Res. 2014;14(2):70–5.
- [11] Musyarifah Z AS. Proses Fiksasi Pada Pemeriksaan Apus Darah. J Kesehatan Andalas. 2018;7(3):443.

- [12] Warsita N, Fikri Z AP. Pengaruh Lama Penundaan Pengecatan Setelah Fiksasi Apusan Darah Tepi Terhadap Morfologi Eritrosit. *J Anal Med Biosains*. 2019;6(2):125.
- [13] Masters. *Farmakologi Dasar Dan Klinik Katzing: Alkohol*. Jakarta: Salemba Medika; 2002.