

PERBEDAAN MORFOLOGI NEUTROFIL DAN LIMFOSIT PADA APUSAN DARAH TEPI METODE GIEMSA MENGGUNAKAN BUFFER FOSFAT, AQUADEST DAN NaCl FISIOLOGIS

Arjun Mustafa^{1*}, Tri Dyah Astuti², Aji Bagus Widyantara³

Teknologi Laboratorium Medis, Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta^{1,2,3}

*Corresponding Author : arjunmust08@gmail.com

ABSTRAK

Pewarna giemsa untuk sediaan darah menggunakan pengencer larutan buffer fosfat. Buffer fosfat dapat diganti dengan larutan pengencer lain asalkan memiliki sifat buffer dan pH yang sesuai dengan larutan penyangga. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan morfologi neutrofil dan limfosit pada apusan darah tepi dengan giemsa yang diencerkan buffer fosfat, aquadest dan NaCl fisiologis. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuantitatif. Besar sampel yang di gunakan untuk penelitian ini adalah 1 sampel dengan 9 kali pengulangan dan 3 perlakuan yang berbeda. Analisis data dilakukan dengan uji statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* karna sampel kurang dari 50 dan didapatkan hasil terdistribusi tidak normal sehingga dilanjutkan dengan uji *kruskal wallis* menggunakan SPSS. Variabel terikat penelitian yaitu neutrofil dan limfosit hasil pewarnaan. Variabel bebas penelitian yaitu larutan buffer fosfat, aquadest dan NaCl fisiologis. Hasil pengamatan morfologi neutrofil dan limfosit dengan giemsa yang diencerkan buffer fosfat ditemukan semua morfologi dalam kategori baik (100%). Giemsa yang diencerkan aquadest ditemukan morfologi neutrofil 78% dan 100% limfosit kategori baik. Giemsa yang diencerkan NaCl fisiologis ditemukan morfologi neutrofil 22% dan 44% limfosit kategori baik. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terdapat perbedaan hasil morfologi neutrofil dan limfosit pada apusan darah tepi dengan giemsa yang diencerkan buffer fosfat, aquadest dan NaCl fisiologis dengan nilai sig (*p-value*) sebesar 0,000 (<0,05).

Kata kunci : limfosit, neutrofil, pengencer giemsa

ABSTRACT

This study aims to investigate the morphological differences between neutrophils and lymphocytes in peripheral blood smears stained with Giemsa diluted in phosphate buffer, distilled water, and physiological NaCl. This study employed descriptive method and used quantitative data. The sample size for this study was one, with nine repetitions and three different treatments. Data analysis was conducted using the Shapiro-Wilk normality test, as the sample size was less than 50. The results indicated that the data were not normally distributed, which led to further analysis using the Kruskal-Wallis test with SPSS. The dependent variables in this study were the morphology of neutrophils and lymphocytes post-staining, while the independent variables were the phosphate buffer, distilled water, and physiological NaCl solutions. The morphological observation of neutrophils and lymphocytes stained with Giemsa diluted in phosphate buffer showed that all cells were classified as having good morphology (100%). When Giemsa was diluted with distilled water, 78% of neutrophils and 100% of lymphocytes were categorized as having good morphology. In the case of Giemsa diluted with physiological NaCl, only 22% of neutrophils and 44% of lymphocytes were classified as having good morphology. Based on this study, there are significant differences in the morphology of neutrophils and lymphocytes in peripheral blood smears stained with Giemsa diluted in phosphate buffer, distilled water, and physiological NaCl, with a p-value of 0.000 (<0.05).

Keywords : giemsa diluent, lymphocytes, neutrophils

PENDAHULUAN

Pemeriksaan jumlah leukosit adalah salah satu tes darah yang dilakukan secara rutin. Tes ini dilakukan dengan menggunakan Sediaan Apus Darah Tepi (SADT). SADT disiapkan

dengan meneteskan darah segar atau darah yang telah dicampur dengan antikoagulan EDTA pada slide. Melalui apus darah tepi, berbagai elemen sel darah dapat dievaluasi, termasuk morfologi sel-sel leukosit seperti neutrofil dan limfosit. Setelah SADT selesai dibuat, slide tersebut diwarnai dengan pewarna khusus untuk mempermudah observasi dan penilaian morfologi sel-sel tersebut (Anwar *et al.*, 2023).

Pewarnaan yang umum diterapkan pada preparat apusan darah tepi adalah teknik pewarnaan Romanowsky. Pewarnaan ini juga dikenal sebagai pewarna polikromatik karena melibatkan penggunaan tiga warna utama: merah, biru, dan ungu. Prinsip dasar dari metode pewarnaan ini bergantung pada interaksi kimia di dalam sel, di mana pewarna yang bersifat asam berinteraksi dengan komponen sel yang bersifat basa, dan sebaliknya (Kiswari, 2014). Pewarnaan giemsa merupakan salah satu pewarnaan Romanowsky yang direkomendasikan *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) (Rinny & Sherly Rosalinda, 2018).

Penggunaan pewarna giemsa harus diencerkan terlebih dahulu sebelum dipakai mewarnai apusan darah tepi. Larutan pengencer cat giemsa yang digunakan mempunyai pengaruh besar terhadap hasil pewarnaan. Pewarna cat giemsa untuk sediaan darah biasanya menggunakan pengencer larutan buffer fosfat. Pengencer giemsa harus memenuhi tiga kriteria untuk dapat digunakan yaitu harus isotonis, mempunyai sifat buffer dan mempunyai pH antara 6,8 dan 7,0 (Diarti *et al.*, 2016). Di lapangan, beberapa laboratorium klinik di daerah mengalami kesulitan dalam memperoleh larutan buffer fosfat. Kesulitan ini disebabkan oleh harga buffer fosfat yang tinggi dan sering terjadinya keterlambatan dalam pengadaan. Akibatnya, sebagian analis terpaksa mencari alternatif lain untuk mengencerkan cat giemsa (Sanyi, 2020). Larutan buffer fosfat dapat digantikan dengan larutan pengencer lain, asalkan larutan tersebut memiliki pH yang sesuai dengan larutan penyangga yang diperlukan (Nugraha & Badrawi, 2018).

Menurut penelitian Sanyi (2020), tidak ditemukan perbedaan dalam gambaran morfologi Plasmodium sp saat menggunakan pewarnaan giemsa dengan berbagai pengencer, yaitu larutan NaCl 0,9%, air mineral, dan larutan buffer fosfat dengan pH 7,2. Sebaliknya, penelitian oleh Primasari (2018) mengenai penggunaan pengencer alternatif untuk pewarnaan giemsa dengan aquadest menunjukkan bahwa morfologi sel eosinofil dan limfosit lebih jelas dibandingkan dengan penggunaan NaCl. Temuan dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada pewarnaan giemsa dengan pengencer NaCl fisiologis, 54,5% morfologi sel eosinofil berada dalam kondisi baik, sedangkan 45,5% tidak baik; dan untuk sel limfosit, 63,6% menunjukkan morfologi yang baik, sementara 36,4% tidak baik. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sanyi (2020), tidak ada perbedaan signifikan dalam gambaran morfologi Plasmodium sp ketika menggunakan pewarnaan giemsa dengan berbagai jenis pengencer, yaitu larutan NaCl 0,9%, air mineral, dan larutan buffer fosfat dengan pH 7,2. Sebaliknya, penelitian oleh Primasari (2018) yang menilai efektivitas pengencer alternatif dalam pewarnaan giemsa menunjukkan bahwa penggunaan aquadest menghasilkan gambaran morfologi sel eosinofil dan limfosit yang lebih baik dibandingkan dengan NaCl. Dalam studi tersebut, ditemukan bahwa 54,5% dari morfologi sel eosinofil adalah baik dan 45,5% tidak baik, sedangkan 63,6% morfologi sel limfosit tergolong baik dan 36,4% tidak baik ketika menggunakan pengencer NaCl fisiologis dalam pewarnaan giemsa.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan morfologi neutrofil dan limfosit pada apusan darah tepi dengan giemsa yang diencerkan buffer fosfat, aquadest dan NaCl fisiologis.

METODE

Rancangan penelitian ini mengadopsi pendekatan deskriptif, dengan data yang digunakan berupa data kuantitatif. Penelitian ini melibatkan satu sampel yang diuji sebanyak sembilan kali dengan tiga perlakuan berbeda. Untuk analisis data, digunakan uji statistik yang dimulai dengan

uji normalitas *Shapiro-Wilk*, mengingat ukuran sampel kurang dari 50. Hasilnya menunjukkan distribusi yang tidak normal, sehingga analisis dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* yang diolah menggunakan SPSS. Penelitian ini telah memperoleh sertifikat etika dari komite etika. Observasi dilakukan oleh ATLM yang telah memiliki sertifikat pelatihan dalam mikroskopi pewarnaan malaria.

HASIL

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Neutrofil dengan Giemsa yang Diencerkan Buffer Fosfat, Aquadest dan NaCl Fisiologis

Pengencer giemsa	Morfologi Neutrofil				Jumlah
	Baik		Tidak baik		
	f	%	f	%	
Buffer fosfat	9	100	0	0	9
Aquadest	7	77,8	2	22,2	9
NaCl fisiologis	2	22,2	7	77,8	9

Tabel 1 menunjukkan hasil pengamatan morfologi neutrofil terhadap 9 preparat yang diwarnai giemsa dengan pengencer buffer fosfat morfologi neutrofil yang baik sebanyak 9 (100%) dan tidak ditemukan morfologi neutrofil yang tidak baik. Pengencer aquadest ditemukan sebanyak 7 (77,8%) morfologi neutrofil yang baik dan ditemukan sebanyak 2 (22,2%) morfologi neutrofil yang tidak baik. Pengencer NaCl fisiologis ditemukan 2 (22,2%) morfologi neutrofil yang baik dan ditemukan 77,8% morfologi neutrofil yang tidak baik.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi Limfosit dengan Giemsa yang Diencerkan Buffer Fosfat, Aquadest dan NaCl Fisiologis

Pengencer giemsa	Morfologi limfosit				Jumlah
	Baik		Tidak baik		
	f	%	f	%	
Buffer fosfat	9	100	0	0	9
Aquadest	9	100	0	0	9
NaCl fisiologis	4	44,4	5	55,6	9

Tabel 2 menunjukkan hasil pengamatan morfologi limfosit terhadap 9 preparat yang diwarnai giemsa dengan pengencer buffer fosfat morfologi yang baik 9 (100%) dan tidak ditemukan morfologi limfosit yang tidak baik. Pengencer aquadest ditemukan morfologi limfosit 9 (100%) dan tidak ditemukan morfologi limfosit yang tidak baik. Pengencer NaCl fisiologis ditemukan 4 (44,4%) morfologi limfosit yang baik dan ditemukan 5 (55,6%) morfologi limfosit yang tidak baik.

Tabel 3. Analisis Bivariat Larutan Pengencer Buffer Fosfat, Aquadest dan NaCl Fisiologis terhadap Morfologi Neutrofil dan Limfosit

Pengencer giemsa	Neutrofil				Limfosit				P value
	Baik		Tidak baik		Baik		Tidak baik		
	f	%	f	%	f	%	f	%	
Buffer fosfat	9	100	0	0	9	100	0	0	0,000
Aquadest	7	77,8	2	22,2	9	100	0	0	
NaCl fisiologis	2	22,2	7	77,8	4	44,4	5	55,6	

PEMBAHASAN

Pewarnaan apusan darah sering dilakukan menggunakan giemsa, yang memerlukan pencampuran dengan larutan buffer fosfat sebelum aplikasi. Meskipun efektif, buffer fosfat memiliki beberapa kekurangan, termasuk biaya yang tinggi dan potensi dampak negatif pada ekosistem perairan. Kandungan fosfat dalam buffer ini yang melebihi 2 mg/L dapat mengganggu keseimbangan lingkungan dan menimbulkan risiko pencemaran jika digunakan secara terus-menerus (Museyarah, 2024). Berbagai faktor dapat mempengaruhi ketidaksesuaian hasil pewarnaan giemsa dengan warna standar atau menurunkan kualitas hasil pewarnaan. Faktor-faktor ini meliputi penggunaan larutan pengencer giemsa yang tidak sesuai, yang mungkin tidak bersifat buffer atau memiliki pH yang terlalu asam atau basa, waktu pewarnaan yang tidak memadai, fiksasi yang tidak optimal, serta sampel yang tidak segera difiksasi (Wahyudi & Salnus, 2020). Selain itu, kondisi lingkungan seperti suhu dan kelembaban juga dapat memengaruhi pemeriksaan cairan tubuh, termasuk sediaan apusan darah tepi (Kiswari R, 2014).

Hasil pada tabel 1. dan 2. “penggunaan larutan buffer fosfat ditemukan semua morfologi neutrofil dan limfosit dalam kategori baik 9 (100%) dengan inti sel yang berwarna ungu, sitoplasma yang berwarna merah muda dan granula berwarna ungu.” Penelitian ini sejalan dengan penelitian Anwar *et al.*, (2023) yaitu “Pengamatan terhadap preparat apusan darah yang dilakukan dengan pewarnaan giemsa dan buffer fosfat menunjukkan bahwa 70% dari granula neutrofil menunjukkan warna yang sesuai dengan standar pewarnaan giemsa, sementara warna sitoplasma limfosit sesuai dengan standar dan kombinasi warna mencapai 100%. Hal ini disebabkan oleh sifat buffer fosfat yang bersifat isotonis, dengan pH 6,8, yang dapat menstabilkan pH meskipun larutan mengalami pengenceran, menjadikannya sebagai larutan penyangga atau dapar” (Sherwood, 2016).

Hasil pada tabel 1 dan 2 penggunaan larutan aquadest ditemukan morfologi neutrofil baik 7 (77,8%), limfosit baik 9 (100%) dengan inti sel yang berwarna ungu, sitoplasma yang berwarna merah muda dan granula ungu. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Primasari (2018) pewarnaan giemsa dengan pengencer aquadest ditemukan morfologi sel limfosit yang baik 100%. Hal ini terjadi karena pH aquadest yang digunakan adalah 6,8 sehingga neutrofil dan limfosit dapat menyerap zat warna giemsa dengan baik. Aquadest juga memberikan kontrol pH yang hampir sama seperti buffer fosfat sehingga pewarnaan efektif (Diarti *et al.*, 2016).

Hasil pada tabel 1 penggunaan larutan aquadest juga terdapat morfologi neutrofil yang tidak baik sebanyak 2 (22,2%) dengan hasil pengamatan granula terlihat samar. Hal ini dapat disebabkan dari keterampilan peneliti pada saat proses pembuatan sediaan apus dan proses pewarnaan. Salah satu penyebab granula terlihat samar dapat terjadi karena penggunaan larutan fiksasi yang tidak merata dalam proses fiksasi. Menurut Emy (2018) “fiksasi berfungsi untuk menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah keadaan yang sebenarnya, fiksasi juga berfungsi untuk merekatkan sediaan apus darah tepi dan membantu penyerapan warna dengan sempurna.”

Hasil pada tabel 1 dan 2 penggunaan larutan pengencer NaCl fisiologis ditemukan morfologi neutrofil baik 2 (22,2%), limfosit baik 4 (44,4%) menunjukkan morfologi memenuhi kriteria baik yaitu inti sel utuh, jelas dan yang paling penting morfologi neutrofil dan limfosit dapat diamati. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Widyaningrum (2019) yaitu hasil pada pewarnaan giemsa menggunakan pengenceran NaCl 0,9% didapatkan warna granula baik sebanyak 6 sel (15%), tidak baik 35 sel (85%). Hal ini terjadi karena larutan NaCl fisiologis memiliki sifat seperti buffer fosfat yaitu isotonis. Menurut Sherwood (2016) “cairan isotonis adalah cairan yang berada dalam sel darah manusia yang berarti keseimbangan kepekatan larutan yang masuk sama dengan kepekatan cairan darah sehingga tidak merusak atau merubah bentuk sel.”

Hasil pada tabel 1 dan 2 penggunaan larutan pengencer NaCl fisiologis ada morfologi neutrofil 7 (77,8%) dan limfosit 5 (55,6)% yang tidak baik. Hal ini terjadi karena pH NaCl fisiologis yang digunakan adalah 6,1 yang berarti larutan memiliki pH yang asam sehingga penyerapan catnya tidak baik atau tidak memenuhi kriteria pewarnaan giemsa. Menurut Subakir & Dzikra (2020) “pH asam dari larutan pengencer dapat mendegradasi membran sel leukosit, sehingga leukosit menjadi rusak dan tidak terwarnai.”

NaCl fisiologis memiliki sifat isotonis seperti buffer akan tetapi NaCl bukan larutan penyangga asam dan basa. Larutan penyangga harus memenuhi komponen berupa asam/basa lemah sedangkan NaCl adalah larutan garam dari basa kuat (NaOH) dan asam kuat (HCl). Maka berdasarkan identifikasi tersebut NaCl bukan merupakan larutan penyangga. Menurut Diarti (2016) “syarat pengencer giemsa yang ideal yaitu isotonis, memiliki kemampuan menyangga dengan baik dan mempunyai pH 6,8 – 7,0 agar tidak berpengaruh pada pewarnaan morfologi sel.”

Berdasarkan tabel 3 “hasil uji *kruskal wallis* didapatkan nilai sig (*p-value*) sebesar 0,000 (<0,05) sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan hasil mikroskopis pada morfologi neutrofil dan limfosit pada apusan darah tepi metode giemsa yang diencerkan buffer fosfat, aquadest dan NaCl fisiologis. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Rahmah *et al.*, (2019) yaitu terdapat perbedaan signifikan kualitas pewarnaan sediaan darah metode wright menggunakan air PDAM, aquadest dan buffer dengan nilai *asympt. sig* sebesar $0,002 < 0,05$.”

KESIMPULAN

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya perbedaan signifikan dalam morfologi neutrofil dan limfosit pada apusan darah tepi metode giemsa menggunakan buffer fosfat, aquadest dan NaCl fisiologis. Hasil analisis menunjukkan nilai signifikansi (*p-value*) sebesar 0,000 yang berada di bawah ambang batas 0,05.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada Universitas ‘Aisyiyah Yogyakarta serta kepada para dosen pembimbing yang dengan tulus memberikan saran dan arahan yang berharga. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada rekan-rekan yang telah memberikan dukungan signifikan selama proses penelitian ini. Harapan peneliti adalah agar hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat dan kontribusi ilmu yang berguna.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, I.N.A.U., Hartini, S. & Prihandono, D.S., 2023. Gambaran pewarnaan Giemsa, Wright dan Wright-Giemsa pada slide apusan darah tepi. *E Journal Analis Poltekkes Kaltim*, 1(1), Halaman 1-10.
- Ardina, R. & Rosalinda, S., 2018. Morfologi eosinofil pada apusan darah tepi menggunakan pewarnaan Giemsa, Wright, dan kombinasi Wright-Giemsa. *Jurnal Surya Medika*, 3(2), Halaman 5-12.
- Arif, Mansyur. 2015. *Penuntun Praktikum Hematologi*. Universitas Hasanudin Makassar. https://www.academia.edu/32288303/PENUNTUN_PRAKTIKUM_HEMATOLOGI.
- Diarti, M.W., Tatontos, E.Y. & Turmuji, A., 2016. Larutan pengencer alternatif NaCl 0,9% dalam pengecatan Giemsa pada pemeriksaan morfologi spermatozoa. *Jurnal Kesehatan Prima*, 10(2), Halaman 1709-1716.

- Emy, Fatimah. 2018. *Pengaruh Konsentrasi Larutan Fiksasi Terhadap Hasil Makroskopis Dan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi*. Skripsi: Semarang. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Kiswari R, 2014. *Hematologi dan Tranfusi*. Erlangga, Jakarta.
- Muhammad Ardi Afriansyah, 2016. *Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan Preparat Apusan Darah Tepi Terhadap Hasil Makroskopis dan Mikroskopis Sel Darah Merah*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang.
- Museyaroh, M., Nabilah, M. H., & Endarini, L. H. (2024). Perbedaan morfologi sel darah pada pemeriksaan hapusan darah tepi dengan pewarnaan Giemsa menggunakan larutan pengencer buffer fosfat dan larutan pengencer aquabidest. *Jurnal Ilmiah Obsgin*, 16(2), Halaman 513-523.
- Nugraha, G., & Badrawi, I. 2018. *Pedoman Teknik Pemeriksaan Laboratorium Klinik Untuk Mahasiswa Teknologi Laboratorium Medik*. Jakarta: Trans Info Media.
- Primasari, N. 2018. *Gambaran Morfologi Sel Eosinophil dan Limfosit pada Sediaan Apus Darah Tipis dalam Pewarnaan Giemsa yang Diencerkan Menggunakan NaCl Fisiologis dan Aquadest*. Karya Tulis Ilmiah. Poltekkes Kemenkes Kendari.
- Rahmah, S, Ahmad Muhlisin, & Muhammad Arsyad. (2019). Perbedaan kualitas hasil pewarnaan sediaan darah metode Wright menggunakan air PDAM, aquadest, dan buffer pH standar 6,8. *Akademi Kesehatan Borneo Lestari*,1(1), Halaman 15-21.
- Salnus, S. & Arwie, D., 2020. Ekstrak antosianin dari ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.) sebagai pewarna alami pada sediaan apusan darah tepi. *Jurnal Media Analisis Kesehatan*, 11(2), Halaman 96-103.
- Sanyi, Leberina. 2020. *Gambaran Morfologi Plasmodium sp Pada Pewarnaan Giemsa dengan Pengenceran Menggunakan Larutan NaCl 0,9% dan Air Mineral*. Skripsi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung.
- Sherwood L. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Ed 8. Jakarta: EGC; 2016: 182-3.
- Wahyud, N.I., Salnus, S. & Fitriani, 2020. Gambaran eritrosit pada apusan darah tepi menggunakan pewarna alami ubi ungu (*Ipomoea batatas* L.). *Jurnal TLM Blood Smear*, 1(1), Halaman 12-17.
- Widyaningrum, N. L. 2019. *Gambaran warna granula dan ukuran sel eosinofil pada pewarnaan giemsa pengenceran menggunakan NaCl 0,9% dan buffer fospat*. Karya Tulis Ilmiah. Politeknik Kesehatan Kemenkes Semarang. Semarang.