

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian yang berjudul “Pemakaian Giemsa 15% Secara Berulang pada Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) Menggunakan *Chamber stain*” telah selesai dilakukan di Laboratorium Poltekkes Kemenkes Yogyakarta lalu dilakukan penilaian oleh Ahli Teknologi Laboratorium Medis pada bulan Maret 2025. Penelitian ini menggunakan sampel darah vena yang diperoleh dari mahasiswa Poltekkes Kemenkes Yogyakarta Prodi D3 Teknologi Laboratorium Medis Semester 6 yang berjumlah 5 orang. Sampel kemudian dilakukan dua perlakuan pengecatan Giemsa 15%, yaitu menggunakan metode konvensional (kelompok kontrol) dan metode *Chamber stain* (kelompok eksperimen).

Penelitian ini diawali dengan melakukan uji kualitas pada cat Giemsa, methanol 96%, minyak imersi dan buffer 6,8, dari hasil uji tersebut didapatkan kualitas yang baik dan memenuhi syarat sehingga penelitian ini dapat dilanjutkan ke tahap selanjutnya. Pada penelitian ini terdapat kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Kelompok kontrol merupakan pewarnaan sediaan apus darah tepi menggunakan Giemsa dengan cara ditetes dan berjumlah 5 slide. Kelompok eksperimen merupakan pewarnaan sediaan apus darah tepi menggunakan Giemsa dengan cara dimasukkan ke dalam *Chamber stain* dan berjumlah 100 slide. Penilaian mikroskopis untuk kelompok eksperimen, diambil 5 slide perwakilan. Penilaian slide dilakukan

oleh Ahli Teknologi Laboratorium Medis dari Rumah Sakit Sardjito. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta dengan DP.04.03/e-KEPK.1/075/2025.

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi sejauh mana larutan Giemsa 15% dapat digunakan secara berulang pada metode pewarnaan sediaan apus darah tepi (SADT) menggunakan teknik *Chamber stain* tanpa mengurangi kualitas hasil pewarnaan.

1. Analisis Deskriptif

a. Kualitas Hasil Pewarnaan

Skoring dilakukan dengan memberikan poin “0 dan 1” pada gambar yang diamati menggunakan mikroskop. Skor 0 ditujukan pada hasil pewarnaan sel darah (eritrosit, leukosit dan trombosit) yang tidak nampak atau tidak ada warna dan tidak dapat diidentifikasi. Skor 1 ditujukan pada hasil pewarnaan sel darah (eritrosit, leukosit dan trombosit) yang sesuai dan dapat diidentifikasi. Hasil skor yang diperoleh untuk SADT yang diwarnai dengan metode konvensional (kontrol) dan *Chamber stain* (eksperimen) oleh penilai 1 dan penilai 2 adalah skor 1.

Tabel 5. Skor Kriteria Kualitas Hasil Pengecatan SADT

Kriteria	Baik	Cukup	Kurang
Skor	0,8-1	0,4-0,7	0-0,3

Penilaian dibagi menjadi tiga kategori, yaitu "Baik" untuk skor antara 0,8 hingga 1, "Cukup" untuk skor antara 0,4 hingga 0,7 dan "Kurang" untuk skor antara 0 hingga 0,3. Kategori ini digunakan sebagai acuan dalam mengevaluasi sejauh mana hasil pengecatan memenuhi standar kualitas yang diharapkan.

Tabel 6. Hasil Skor Kualitas Hasil Pengecatan SADT

Ha ri	Perlaku an	Eri tro sit	Leukosit			Trom bosit	Rata - rata	Kate gori
			Sito plasma	Gran ula	Inti			
1	Kontrol	1	1	1	1	1	1	Baik
	Eksperi men	1	1	1	1	1	1	Baik
2	Kontrol	1	1	1	1	1	1	Baik
	Eksperi men	1	1	1	1	1	1	Baik
3	Kontrol	1	1	1	1	1	1	Baik
	Eksperi men	1	0,9	0,9	1	0,9	0,94	Baik
4	Kontrol	1	1	1	1	1	1	Baik
	Eksperi men	1	0,85	0,75	1	0,85	0,89	Baik
5	Kontrol	1	1	1	1	1	1	Baik
	Eksperi men	1	0,7	0,45	1	0,5	0,73	Cukup

Data tersebut didapatkan dari rata-rata jumlah seluruh kelompok eksperimen yaitu 100 preparat yang dilakukan selama 5 hari untuk mendapatkan skor hasil kriteria kualitas sediaan. Berdasarkan data tabel tersebut didapatkan hasil “Baik” pada hari ke-1 hingga ke-4 dan didapatkan hasil “Cukup” pada hari ke-5, karena didapati penurunan kualitas hasil pengecatan pada morfologi sel.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemakaian ulang Giemsa 15% dalam *Chamber stain* masih menghasilkan pewarnaan yang baik hingga pemakaian ke-5. Tampilan morfologi sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit) dan trombosit pada hari ke-1 sampai dengan ke-3 masih terlihat jelas dan tajam. Eritrosit terlihat berwarna ungu keabuan dengan area sentral yang lebih terang (*central pallor*), leukosit memperlihatkan inti berwarna ungu kebiruan dengan batas yang tegas dan granula pada neutrophil, eosinophil serta basophil masih terlihat cukup jelas. Morfologi eritrosit, leukosit dan trombosit terlihat lebih pudar pada hari ke-4 sampai dengan hari ke-5, namun masih bisa diidentifikasi. Hal ini mengindikasikan bahwa larutan Giemsa masih memiliki efektivitas pewarnaan yang memadai setelah digunakan berulang.

b. Efisiensi dan Efektivitas Metode *Chamber stain*

Penggunaan *Chamber stain* sebagai media pewarnaan alternatif bertujuan untuk menyederhanakan prosedur dan mengurangi penggunaan reagen. Dalam penelitian ini, dilakukan perhitungan sistematis untuk mengevaluasi seberapa besar efisiensi oleh *Chamber stain* dibandingkan dengan metode konvensional. Berdasarkan perhitungan :

1) Metode konvensional

- a) Volume Giemsa untuk satu preparate = 3 ml
- b) Jumlah preparate per pengulangan = 20 preparat

- c) Total volume Giemsa yang digunakan untuk 20 preparat

$$20 \text{ preparat} \times 3 \text{ ml} = 60 \text{ ml}$$

- d) Jumlah pengulangan dengan 400 ml

$$\frac{400 \text{ ml}}{60 \text{ ml/pengulangan}} = 6 \text{ kali pengulangan}$$

2) Metode *Chamber stain*

- a) Volume Giemsa untuk satu preparate = 1 ml

- b) Jumlah preparate perpengulangan = 20 preparat

- c) Total volume Giemsa yang digunakan untuk 20 preparat

$$20 \text{ preparat} \times 1 \text{ ml} = 20 \text{ ml}$$

- d) Jumlah pengulangan dengan 400 ml

$$\frac{400 \text{ ml}}{20 \text{ ml/pengulangan}} = 20 \text{ kali pengulangan}$$

Tabel 7. Penilaian Efisiensi Penggunaan *Chamber stain*

Aspek Penilaian	Metode Konvensional	<i>Chamber stain</i>	Efisiensi
Volume Giemsa per Preparat	3 ml	1 ml	Dapat menghemat hingga 67%
Volume Giemsa untuk 20 preparat	60 ml	20 ml	Hemat 40 ml
Jumlah pengulangan (400 ml)	6 kali	20 kali	Pengulangan 3x lipat lebih banyak
Volume terpakai dalam 5 hari (100 preparat)	300 ml	35 ml	88,33% lebih hemat
Kualitas Hasil Pewarnaan	Risiko pengendapan pewarna	Pewarnaan merata dan tanpa pengendapan	Konsistensi hasil lebih baik

Keterangan :

$$\begin{aligned}
 \text{Presentase Penghematan} &= \left(\frac{\text{Selisih Volume}}{\text{Volume Konvensional}} \right) \times 100\% \\
 &= \left(\frac{2 \text{ ml}}{3 \text{ ml}} \right) \times 100\% \\
 &= 66,67\%
 \end{aligned}$$

Presentase penghematan berdasarkan penggunaan selama 5 hari :

Volume yang dihemat (selisih) = (300 ml – 35 ml) = 265 ml

$$\begin{aligned}
 \text{Presentase} &= \left(\frac{\text{Volume yang dihemat}}{\text{Volume 5 hari metode konvensional}} \right) \times 100\% \\
 &= \left(\frac{265 \text{ ml}}{300 \text{ ml}} \right) \times 100\% \\
 &= 88,33\%
 \end{aligned}$$

Metode *Chamber stain* terbukti memberikan keuntungan dari sisi efisiensi penggunaan larutan pewarna. Dalam metode konvensional, setiap sediaan apus darah biasanya menggunakan pewarna secara individual. Dengan *Chamber stain*, beberapa sediaan dapat diwarnai sekaligus dalam satu ruang tertutup yang diisi larutan Giemsa, sehingga meminimalkan jumlah reagen yang digunakan.

Penggunaan *Chamber stain* dalam penelitian ini menghasilkan hasil yang sesuai dengan tujuan, yaitu sediaan apus darah tepi dapat terwarnai dengan baik dan dapat diinterpretasikan sama dengan halnya jika menggunakan teknik konvensional atau

sesuai standar operasional (SOP). Posisi preparate yang dicat secara vertikal memungkinkan tidak adanya pengendapan cat Giemsa pada preparate SADT, berbeda halnya dengan teknik konvensional yang dicat dengan posisi horizontal.

B. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan hasil pewarnaan Giemsa 15% pada morfologi sediaan apus darah tepi antara metode konvensional dan metode *Chamber stain*. Tujuan khusus penelitian ini, yaitu mengetahui efektivitas dan efisiensi penggunaan *Chamber stain* dalam pewarnaan sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan metode konvensional serta untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan kualitas hasil mikroskopis pewarnaan eritrosit, leukosit dan trombosit pada sediaan apus darah tepi menggunakan metode konvensional dibandingkan dengan metode *Chamber stain*.

Chamber stain memiliki kapasitas larutan hingga 400 mL dan dilengkapi dengan rak pengecatan yang dapat menampung sebanyak 46 slide secara bersamaan. Dalam penggunaannya, larutan yang digunakan yaitu methanol 96% dan pewarna Giemsa 10% sebanyak 400 mL dimanfaatkan secara berulang selama 5 hari berturut-turut. Setiap harinya dilakukan proses pewarnaan terhadap 20 slide SADT, sehingga total 100 slide telah diwarnai selama penelitian.

Hasil penelitian menunjukkan metode ini terbukti efisien dalam proses pewarnaan SADT. Efisiensi tersebut terlihat dari kemampuan

penggunaan ulang larutan pewarna yang mengurangi pemborosan bahan, serta kapasitas *Chamber stain* yang memungkinkan pewarnaan hingga 46 slide sekaligus. Hal ini memberikan keuntungan signifikan dibandingkan metode konvensional, yang mengharuskan pewarnaan dilakukan satu per satu secara horizontal dengan volume larutan yang tidak terukur secara pasti, memerlukan waktu lebih lama dan potensi penggunaan zat warna yang berlebih. Penggunaan *Chamber stain* dalam proses pengecatan Giemsa memiliki keunggulan dalam kemudahan teknis Dimana merujuk pada keefektivitasan. Pengecatan *Chamber stain* dilakukan dengan merendam banyak slide ke dalam larutan secara bersamaan, tanpa perlu meneteskan larutan larutan Giemsa secara individual pada setiap sediaan.

Kualitas pewarnaan merujuk pada seberapa baik dan tepat pengecatan dalam mewarnai suatu preparat, sehingga menghasilkan kontras yang jelas dan memudahkan pengamatan di bawah mikroskop. Oleh karena itu, digunakan sistem penilaian untuk menentukan kriteria pewarnaan dalam analisis morfologi Sediaan Apus Darah Tepi (SADT). Pewarnaan yang baik ditandai dengan inti sel berwarna ungu, sitoplasma berwarna biru hingga ungu keabuan, serta granula yang tampak merah atau ungu (Kiswari, 2014).

Penilaian kualitas hasil pewarnaan pada penelitian ini didasarkan pada rata-rata skor dari 100 slide preparat, yang dibuat selama 5 hari berturut-turut. Dari hasil pengamatan, diperoleh data bahwa kualitas hasil pengecatan menunjukkan kategori "Baik" pada hari ke-1 hingga hari ke-4, dan menurun menjadi "Cukup" pada hari ke-5. Hari ke-1 hingga ke-3,

pewarnaan morfologi eritrosit, leukosit dan trombosit masih sangat optimal. Eritrosit tampak berwarna ungu keabuan dengan *central pallor* yang jelas, menunjukkan pewarnaan yang stabil. Leukosit terlihat memiliki inti berwarna ungu kebiruan dengan batas yang tegas dan granula masih dapat diidentifikasi dengan baik. Trombosit terlihat cukup jelas tersebar di antara sel-sel lainnya. Namun, mulai hari ke-4 hingga hari ke-5, kualitas hasil mulai menurun. Warna pada eritrosit tampak memudar dan batas morfologi pada leukosit tidak setegas hari-hari sebelumnya. Granula pada beberapa jenis leukosit juga tampak kurang kontras. Meskipun demikian, semua komponen sel darah masih dapat diidentifikasi, sehingga pewarnaan tetap dapat dikatakan layak, meskipun berada dalam kategori "Cukup".

Pewarna Giemsa merupakan campuran dari zat pewarna bersifat asam dan basa, yaitu eosin (bersifat asam) dan azure B serta methylene blue (bersifat basa). Komponen asam seperti eosin memiliki afinitas terhadap bagian sel yang bersifat basa (seperti protein dalam sitoplasma), sehingga menghasilkan warna merah muda. Sebaliknya, komponen basa seperti azure B dan methylene blue berikatan dengan bagian sel yang bersifat asam, seperti asam nukleat (DNA dan RNA) dalam inti sel, menghasilkan warna biru keunguan (Kiswari, 2014).

Pewarnaan Giemsa biasanya dilakukan dengan pH sekitar 6,8, yang merupakan pH optimal untuk mendapatkan kontras warna yang jelas antara inti dan sitoplasma sel. Dalam prosedur pewarnaan sediaan darah tepi menggunakan Giemsa Romanowsky, larutan penyangga (buffer) digunakan

dengan pH standar antara 6,4 hingga 6,8. Larutan buffer dengan pH rendah (kurang dari 6,8) menyebabkan leukosit tidak sepenuhnya menyerap pewarna Giemsa karena terlalu asam, sehingga kromatin inti yang seharusnya berwarna ungu hanya tampak pada bagian tengah inti, sementara sebagian lainnya berwarna merah, leukosit juga akan tampak memiliki bagian-bagian yang kurang jelas. Sebaliknya, larutan buffer dengan pH tinggi (lebih dari 6,8) yang bersifat basa kuat menyebabkan leukosit menyerap terlalu banyak methylene blue, sehingga sitoplasma tampak lebih pekat dan granula menjadi lebih gelap (Indriani, 2017). Selain karena kualitas pewarna giemsa, hasil pembacaan sediaan darah tepi secara mikroskopis dapat dipengaruhi oleh variasi konsentrasi dan lama pewarnaan (Suryanta, 2012).

Pengamatan menunjukkan bahwa penggunaan kembali larutan Giemsa 15% dalam *Chamber stain* tetap memberikan hasil pewarnaan yang memuaskan. Namun, pada pemakaian ke-4 dan ke-5, mulai terlihat penurunan kualitas. Inti sel tampak lebih pucat dan kurang tegas, kontras antara inti dan sitoplasma menurun dan trombosit tampak tidak lagi teridentifikasi secara optimal. Penurunan kualitas ini kemungkinan besar berkaitan dengan menurunnya konsentrasi bahan aktif dalam larutan Giemsa akibat pemakaian berulang. Karena menurut Kemenkes (2017) saat pewarnaan, penting untuk memperhatikan umur simpan larutan Giemsa yang digunakan untuk pewarnaan. Campuran Giemsa yang telah disiapkan

harus segera digunakan dan tidak boleh disimpan atau digunakan lebih dari 1 jam.

Beberapa komponen Giemsa terdiri dari Azur B (*Trimethyl thionine*) berperan dalam mewarnai komponen sel yang bersifat asam dan eosin memiliki peran dalam mewarnai komponen yang bersifat basa, seperti inti sel, granula leukosit serta kombinasi dari eosin dan Azur B memberikan warna ungu pada sel (Muflihah, dkk., 2022). Setiap siklus pemakaian dapat menyebabkan sebagian zat pewarna mengalami degradasi, sehingga efektivitas pewarnaan berkurang. Komponen aktif dalam Giemsa, seperti eosin Y dan azure B, dapat mengalami degradasi seiring waktu dan pemakaian, apalagi jika disimpan dalam kondisi tidak optimal (WHO, 2016). Selain itu, larutan yang terbuka berulang kali dan terpapar udara dapat mengalami oksidasi, yang menyebabkan perubahan pH larutan. Perubahan pH ini sangat berpengaruh terhadap kualitas Giemsa, karena stabilitas dan kemampuan ikat warnanya sangat bergantung pada kondisi pH yang optimal. Pewarnaan Giemsa sangat dipengaruhi oleh pH. Kondisi pH yang rendah (asam) menyebabkan eritrosit tampak berwarna merah, sedangkan pada pH yang lebih tinggi (basa), warnanya berubah menjadi biru, abu-abu, hingga ungu tua. Ketika pH bersifat lebih asam, warna pada inti sel menjadi lebih pekat, sementara pewarnaan sitoplasma menjadi lebih pudar. Sebaliknya, jika pH bersifat lebih basa, warna pada inti sel tampak lebih pudar, namun pewarnaan sitoplasma menjadi lebih pekat (Asmawati, 2023).

Perubahan pH juga dapat terjadi karena sebagian zat aktif, seperti azure B (yang bersifat basa) dan eosin Y (yang bersifat asam), telah bereaksi atau terpakai selama proses pewarnaan. Akibatnya, keseimbangan asam-basa dalam larutan terganggu, sehingga pH larutan dapat berubah. Jika ditemukan perubahan pH, larutan dapat dinetralkan dengan penambahan tetesan NaOH atau HCl, tergantung arah perubahan pH (Budiwati, 2019).

Faktor material dari chamber itu sendiri juga dapat berkontribusi terhadap penurunan efektivitas larutan. Jika chamber terbuat dari bahan plastik, maka ada kemungkinan terjadi interaksi kimia antara bahan pewarna (seperti Giemsa), larutan buffer atau methanol dengan permukaan plastik tersebut. Methanol 96% yang digunakan untuk merekatkan apusan darah pada kaca objek agar tidak terkelupas dan menghentikan proses metabolisme sel tanpa merusak struktur sel itu sendiri dalam pengecatan Giemsa, juga dikenal sebagai pelarut efektif untuk bahan plastik (National Center for Biotechnology Information, 2025). Reaksi ini dapat menyebabkan terjadinya adsorpsi zat aktif ke permukaan chamber atau bahkan degradasi zat kimia, sehingga mengurangi efektivitasnya dalam proses pewarnaan sel.

Berdasarkan konsep dan prinsip pewarnaan Giemsa 15% yang digunakan berulang pada metode *chamber stain*, terdapat beberapa kelebihan. Dari segi efektivitas, *chamber stain* mampu menghasilkan kualitas pewarnaan yang setara dengan metode konvensional, sehingga morfologi sel darah tetap dapat dikenali dengan baik. Secara efisiensi,

metode ini sangat menguntungkan karena mampu menghemat penggunaan larutan Giemsa hingga 67%, memungkinkan lebih banyak pengulangan pewarnaan dengan volume pewarna yang sama. Selain itu, berdasarkan evaluasi pemakaian larutan dalam 5 hari, metode konvensional menghabiskan sekitar 300 ml dari 400 ml larutan (75%), sedangkan metode *Chamber stain* hanya menghabiskan 35 ml (8,75%). Dengan demikian, *Chamber stain* memberikan penghematan volume larutan sebesar 88,33% dibandingkan metode konvensional.

Efisiensi ini sangat bermanfaat tidak hanya di bidang pemeriksaan morfologi darah tepi, tapi juga untuk pemeriksaan deteksi parasit malaria di mana jumlah sampel yang diperiksa sangat banyak jika di daerah endemik malaria. Kualitas hasil pemeriksaan mikroskopis membutuhkan pewarnaan yang berkualitas untuk hapusan darah yang baik (Triyani & Izzati, 2023). Hasil pewarnaan juga lebih konsisten, merata dan bebas dari pengendapan zat warna, berkat posisi vertikal preparat saat proses pewarnaan. Selain itu, penggunaan *chamber stain* membuat proses kerja lebih praktis dan mempercepat alur pewarnaan di laboratorium.

Namun demikian, ada beberapa kekurangan yang perlu diperhatikan. Salah satunya adalah bahan *chamber stain* yang terbuat dari plastik hasil *3D printing*, yang belum sepenuhnya diuji ketahanannya terhadap paparan zat kimia seperti Giemsa, buffer atau methanol 96% dalam jangka panjang. Potensi interaksi kimia ini dapat berpengaruh terhadap kualitas pewarnaan apabila penggunaan dilakukan dalam waktu lama.

Selain itu, dalam penelitian ini, penggunaan larutan Giemsa secara berulang dengan metode *chamber stain* merupakan inovasi baru, sehingga penelitian terdahulu yang menjadi pembandingan atau acuan standar masih terbatas.