

SKRIPSI
PENGARUHKONDISIPENYIMPANANMETHANOLTERHADAP
KUALITASFIKSASIPADAPEWARNAANSEDIAANAPUSAN
DARAH



OLEH:
GRATIANA CLARITAREKO
2310263530

PROGRAMSTUDISARJANATERAPAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
FAKULTAS ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
PADANG
2025

SKRIPSI
PENGARUHKONDISIPENYIMPANANMETHANOLTERHADAP
KUALITASFIKSASIPADAPEWARNAANSEDIAANAPUSAN
DARAH

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh
gelar Sarjana Terapan Kesehatan

OLEH:
GRATIANA CLARITA REKO
NIM: 2310263530

PROGRAM STUDI SARJANA TERAPAN TEKNOLOGI LABORATORIUM MEDIS
FAKULTAS ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS PERINTIS INDONESIA
PADANG
2025



a).Tempat/Tgl: Waiwerang/13 Agustus 1998;b). Nama Orang Tua: (Ayah) Siprianus Sanga Reko (alm) (Ibu) Maria Ema Serani; c)Program Studi: Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis; d).Fakultas Ilmu Kesehatan; e).NIM:2310263530; f).Tgl lulus: 22 April 2025; g).Predikat Lulus: Pujian; h).IPK: 3,91 i). Lama Studi:1 Tahun; j).Alamat:Lamawolo RT 016 RW 007 Ile Boleng, Flores Timur, Nusa Tenggara Timur

**PENGARUH KONDISI PENYIMPANAN METHANOL TERHADAP
KUALITAS FIKSASI PADA PEWARNAAN SEDIAAN APUSAN
DARAH**

SKRIPSI

Oleh : Gratiana Clarita Reko




Pembimbing : 1. Def Primal, M.Biomed
2. Rita Permatasari, M.Biotek

Abstrak

Metanol adalah bahan fiksatif yang krusial dalam proses pewarnaan preparat apusan darah tepi (SADT) dengan menggunakan metode Giemsa. Studi ini bertujuan untuk menginvestigasi dampak kondisi penyimpanan methanol pada kualitas fiksasi preparat apusan darah, baik dari segi makroskopik maupun mikroskopik. Desain penelitian yang diterapkan adalah eksperimen laboratorium dengan dua perlakuan, yaitu penyimpanan methanol di luar ruangan dan di dalam lemari reagen selama satu bulan. Sampel terdiri atas 30 sediaan darah dari 15 responden yang masing-masing dites dengan dua kondisi penyimpanan. Hasil observasi menampilkan bahwa secara makroskopik kedua kelompok memperlihatkan kualitas yang baik. Namun, secara mikroskopik, hanya metanol yang disimpan dalam lemari reagen yang menjaga morfologi eritrosit dengan baik tanpa sel krenasi. Uji statistik Chi-Square menunjukkan hasil yang signifikan ($p < 0.001$), menandakan bahwa kondisi penyimpanan berpengaruh pada kualitas fiksasi. Dapat disimpulkan bahwa menyimpan methanol di dalam lemari reagen lebih efisien untuk mempertahankan kualitas pewarnaan sediaan apusan darah.

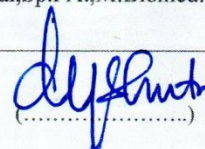
Kata kunci: Metanol, pengikatan, pewarnaan Giemsa, apusan darah perifer, mikroskopis, makroskopis

Skripsi ini telah dipertahankan di depan sidang penguji dan dinyatakan **LULUS** Pada 06 Februari 2025. Abstrak ini telah disetujui oleh penguji :

Tanda Tangan			
Nama	Def Primal, M.Biomed	Rita Permatasari, M.Biotek	dr. Tofrizal, Sp.PA., M.Biomed., Ph.D

Mengetahui,

Ketua Program Studi : Dr. apt. Dewi Yudiana Shinta, M.Si


(.....)



a).Place/Date: Waiwerang/Agustus 13, 1998;b). Name of Parents: (Father) Siprianus Sanga Reko (late) (Mother) Maria Ema Serani; c)Study Program: Applied Bachelor of Medical Laboratory Technology; d).Faculty of Health Sciences; e).NIM:2310263530; f).Date of Graduation: April 22, 2025; g).Graduation Predicate: Cumlaude; h).GPA: 3,91 i). Length of Study :1 Year; j).Address: Lamawolo RT 016 RW 007 Ile Boleng, Flores Timur, Nusa Tenggara Timur

THE EFFECT OF METHANOL STORAGE CONDITIONS ON FIXATION QUALITY IN BLOOD SMEAR STAINING

THESIS

By : Gratiana Clarita Reko



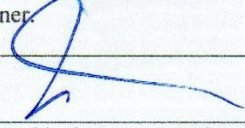
Mentor : 1. Def Primal, M.Biomed
2. Rita Permatasari, M.Biotek

Abstract

Methanol is a crucial fixative agent in the staining process of peripheral blood smear (PBS) preparations using the Giemsa method. This study aims to investigate the impact of methanol storage conditions on the fixation quality of blood smear preparations, both macroscopically and microscopically. The research design applied was a laboratory experiment with two treatments: methanol stored in open space and methanol stored in a reagent cabinet for one month. The samples consisted of 30 blood smears from 15 respondents, each tested under both storage conditions. Observations showed that macroscopically, both groups exhibited good quality. However, microscopically, only methanol stored in the reagent cabinet maintained erythrocyte morphology properly without crenated cells. The Chi-Square statistical test showed a significant result ($p < 0.001$), indicating that storage conditions affect fixation quality. It can be concluded that storing methanol in a reagent cabinet is more effective in preserving the quality of blood smear staining.

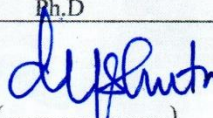
Keywords: Methanol, fixation, Giemsa staining, peripheral blood smear, microscopic, macroscopic

This thesis has been defended in front of the examiner and declared **PASSED** on 06 February 2025. This abstract has been approved by the examiner.

Signature			
Name	Def Primal, M.Biomed	Rita Permatasari, M.Biotek	dr.Tofrizal,Sp.PA.,M.Biomed., Ph.D

Knowing,

Head of Study Program Dr. apt. Dewi Yudiana Shinta, M.Si


(.....)

BABI

PENDAHULUAN

Latar Belakang

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 hematologi seseorang. Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) merupakan *slide* yang salah satu permukaannya dilapisi menggunakan lapisan tipis darah dan diwarnai dengan pewarnaan Giemsa atau Wright.

Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) dikatakan layak untuk diperiksa, jika memenuhi beberapa persyaratan yang telah ditetapkan (Nugraha, G, 2015).

Salah satu persyaratannya ialah sebelum melakukan pewarnaan, preparat terlebih dahulu difiksasi menggunakan *methanol* (metilalkohol) yang bertujuan untuk merekatkan apus darah tepi supaya tidak terlepas dari preparat dan menghentikan proses metabolisme tanpa mengubah struktur sel. Pada prosesnya, larutan fiksasi (*methanol*) yang digunakan dapat mengalami penurunan kualitas apabila terjadi penguapan dan penurunan konsentrasi sehingga dapat mempengaruhi perubahan morfologi sel dan juga perlekatan yang kurang baik (Houwen B, 2002). Penurunan kualitas dan penguapan larutan fiksasi (*methanol*) dapat terjadi ketika *methanol* teroksidasi oleh oksigen dengan bantuan sinar matahari menjadi karbondioksida dan air seperti pada rumus kimia berikut: $2\text{CH}_3\text{OH} + 3 \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$. Larutan fiksasi dalam hal ini (*methanol*) juga dapat menguap pada suhu $64,7^\circ\text{C}$. Pada saat

terpapar sinar matahari dan juga dalam keadaan suhu tertentu, kadar *methanol* dapat berkurang akibat dari terjadinya proses penguapan (Maloney dan James, 2007)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dian Rachmawati tahun 2016 menunjukkan bahwa penguapan larutan fiksasi yang lama dapat menurunkan konsentrasilarutanfiksasisehinggadapatberpengaruhterhadaphasilmakroskopikdan mikroskopik SADT (Rachmawati D, 2018). Penelitian lain yang dilakukan oleh Fatimah EmySholekha pada tahun 2018 juga menunjukan bahwa terdapat perbedaan bermaknakonsentrasilarutanfiksasiterhadaphasilmikroskopikSADT(SholekhaFE, 2018).

MenurutRomanowsky,terdapat4macampewarnaanyaitupewarnaanWright, pewarnaan *Liesman*, pewarnaan *May Grundwald*, dan pewarnaan Giemsa. Menurut Kiswari, apusan darah yang difiksasi dan digenangi *methanol* serta dibiarkan selama 2-3 menit (Wirawan R, 2011). Sedangkan menurut Trevor dalam pewarnaan sediaan apusdarah,SADTharusdirendamdalamfiksatifyangdirekomendasikanuntukteknik iniselama 15 menit (Harper TA,1974). Menurut Barbara J setelahdikering udarakan, preparatdarahdifiksasidengan*methanolabsolute*selama10-20menit(BainBJ,2014). Larutanyangdigunakanuntuk fiksasiharussebisa mungkinbebasdariair (<3%) atau biasanya digunakan larutan *absolute* (Houwen B, 2002).

Didalam pewarnaan Giemsa dilakukan fiksasi terlebih dahulu menggunakan *methanol absolute*, fiksasi tersebut harus dilakukan setelah sediaan kering, supaya tidakmenimbulkanlatarbelakangwarnabiru.Fiksasiinijugaberfungsi supaya apusan darahdapatmenyerapwarnadengansempurna.Larutanfiksasiyangtidakbaikakan

menyebabkan perubahan morfologisel dan perlekatan yang tidak baik. Hal ini terjadi ketika tidak menggunakan larutan fiksasi *methanol absolute* dikarenakan adanya penguapan sehingga dapat mengubah konsentrasi yang dapat menyebabkan fiksasi tidak sempurna (Houwen Berend, 2000). Proses fiksasi dengan *methanol absolute* selamalimamenit berfungsiuntukmembukadindingselekitrosit agarcat Giemsa dapat masuk sehingga dapat mewarnai sel eritrosit. *Methanol* yang dibiarkan terlalu lama diudara terbuka akan menguap (mengalami penurunan konsentrasi) dan mengandung air sehingga akan mempengaruhi morfologieritrosit. (Pamungkas KP, 2014).Melihat di Laboratorium Puskesmas Ile Boleng yang menggunakan *methanol* yang disimpan ditempat terbuka dan terkena cahaya matahari langsung hal ini akan berdampak pada kualitas pewarnaan preparat terutama pewarnaan SADT melalui gambaran morfologi sel darah merah yang diperiksa.

Berdasarkan permasalahan di atas, peneliti bermaksud melakukan penelitian tentang “Pengaruh Kondisi Penyimpanan *Methanol* Terhadap Kualitas Fiksasi Pada Pewarnaan Sediaan Apusan Darah” untuk melihat perbedaan hasil penggunaan *methanol* yang disimpan di tempat tertutup atau lemari penyimpanan reagen dan *methanol* yang dibiarkan ditempat terbuka (meja kerja pewarnaan yang berdekatan dengan jendela laboratorium) dan terkena cahaya matahari langsung selama 1 bulan. Pemeriksaan sampel dilakukan di Puskesmas Ile Boleng.

Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskansuatu permasalahan yaitu apakah ada pengaruh kondisi penyimpanan *methanol* terhadap kualitas fiksasi pada pewarnaan sediaan apusan darah?

Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh penyimpanan *methanol* terhadap kualitas pewarnaan sediaan apusan darah.

Tujuan Khusus

1. Untuk melihat kualitas pewarnaan sediaan apusan darah tepi menggunakan fiksasi *methanol* yang disimpan ditempat terbuka dan terkena cahaya matahari langsung (meja pewarnaan) setelah pemakaian selama satu bulan dan yang disimpan dalam lemari reagen secara makroskopis.
2. Untuk melihat kualitas pewarnaan sediaan apusan darah tepi menggunakan fiksasi *methanol* yang disimpan didalam lemari reagen (tempat tertutup) dan di ruang terbuka secara mikroskopis.
3. Untuk melihat pengaruh penyimpanan *methanol* terhadap kualitas pewarnaan sediaan darah tepi.

Manfaat Penelitian

Bagi Peneliti

Sebagai wadah menerapkan ilmu pengetahuan yang diperoleh selama mengikutipendidikanDIVdiJurusanAnalisisKesehatanUniversitasPerintisIndonesia Padang.

BagiInstitusi

Sebagai bahan referensi baru bagi mahasiswa Jurusan Analisis Kesehatan, atau tenaga analisis kesehatan, atau akademisisesebagairujukanatau bahanacuan baru dalam melihat seberapa penting kualitas zat fiksasi terhadap kondisi lingkungan kerja laboratorium.

BagiInstansiKesehatan

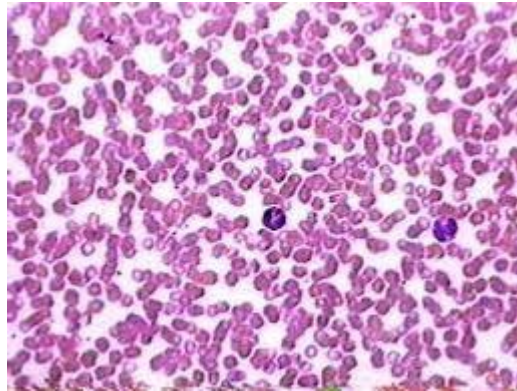
Dapat menjadikan perhatian yang cukup tinggi terhadap proses dan regulasi penyimpanan*methanol*dansebagaisalahsatuagenfiksasidalammenentukankualitas pewarnaan SADT pada pemeriksaan sitopatologiterutama pemeriksaan apusan darah tepi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Sediaan Apus Darah

Sediaan apus darah tepi merupakan pemeriksaan dengan teknik mikroskopik untuk mengamati morfologi darah (Nugraha G, 2015), seperti gambaran darah tepi, jumlah eritrosit, indeks eritrosit, jumlah retikulosit, dan trombosit.



Gambar 2.1 Sediaan Apus Darah Normal (Subawadan Santi, 2016)

Sediaan apus darah tepi ini meliputi 2 bagian pemeriksaan yaitu pemeriksaan hitung jenis sel darah putih (termasuk pemeriksaan rutin) dan gambaran sel darah serta unsur-unsur lain, antara lain parasit, sel ganas dan lain-lain (Budiyo I, 2002). Sediaan apus yang dibuat dan dipulas dengan baik merupakan syarat mutlak untuk mendapatkan hasil yang baik (Mescher, Anthony L, 2012).

Kriteria sediaan yang baik:

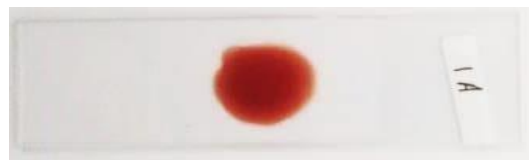
1. Sediaan tidak melebar sampai pinggir kaca objek, panjangnya $\frac{1}{2}$ sampai $\frac{2}{3}$ panjang kaca.

2. Harus ada bagian yang cukup tipis pada sediaan untuk diperiksa, pada bagian itu eritrosit terletak berdekatan tanpa bertumpukan dan tidak menyusun gumpalan atau rouleaux.
3. Pinggir sediaan teratur dan tidak boleh berlobang-lobang atau bergaris-garis.
4. Penyebaran leukosit tidak boleh buruk, leukosit tidak boleh berhimpitan pada pinggir-pinggir atau ujung-ujung sediaan (Subrata G, 2007).

Terdapat beberapa jenis apus darah yang digunakan yaitu apus tebal, apus tetes tipis dan apus khusus (Nugraha G, 2015).

Preparat Darah Apus Tebal

Preparat darah apus tebal dibuat dari tetesan darah pada kaca objek yang diapus secara *spiral* menggunakan ujung kaca objek atau kaca penutup. Preparat darah apus tebal pada umumnya digunakan untuk pemeriksaan parasit malaria, dengan teknik apus darah tebal eritrosit akan lisis dan memudahkan dalam melakukan pemeriksaan malaria (Nugraha G, 2015).



Gambar 2.2 Sediaan Apus Darah Tebal (Nugraha G, 2015).

Sediaan darah tebal biasanya di hemolisis terlebih dulu sebelum pewarnaan, sehingga parasit tidak lagi tampak dalam eritrosit. Kelebihan dari sediaan ini yaitu dapat menemukan parasit lebih cepat karena volume darah yang digunakan lebih banyak. Jumlah parasit lebih banyak dalam satu lapang pandang, sehingga pada infeksi

ringan lebih mudah ditemukan. Sedangkan kelemahan adalah sediaan darah tebal bentuk parasit yang kurang lengkap morfologinya (Safar, 2009).

Sediaan darah yang dibuat harus bersih yaitu sediaan tanpa endapan zat pewarnaan. Sediaan juga tidak terlalu tebal, ukuran ketebalan dapat dinilai dengan meletakkan sediaan darah tebal di atas koran. Bila jarum arloji masih dapat dilihat samar-samar menunjukkan ketebalan yang tepat (Sandjaja, 2007). Selain menggunakan arloji dapat juga dengan cara meletakkan sediaan darah tebal di atas koran, kalau tulisan di bawah koran sediaan masih terbaca, berarti tetesan tadi cukup baik (Sandjaja, 2007).

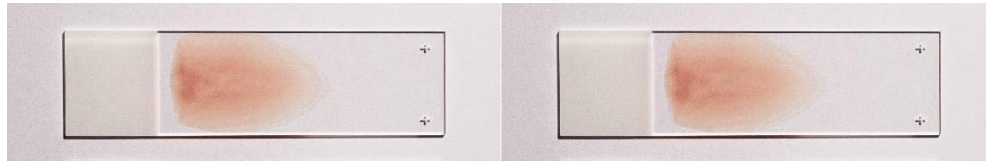
Hasil sediaan darah yang baik ialah inti sel darah putih biru lembayung tua, granula biasanya tidak tampak, hanya granula eosinofil. Trombosit berwarna lembayung muda dan sering berkelompok. Parasit tampak kecil, batas sitoplasma sering tidak nyata (Irianto, 2009).

Preparat Darah Apus Khusus

Apusan darah khusus merupakan apusan yang digunakan untuk pemeriksaan tertentu seperti *buffy coat smear* yang dapat digunakan untuk pemeriksaan sel lupus (Nugraha G, 2015).

Preparat Darah Apus Tipis

Preparat apus darah tipis merupakan apusan yang digunakan dalam laboratorium hematologi. Apus darah tipis terdapat dua teknik pembuatan preparat yaitu menggunakan kaca objek atau kaca penutup (Nugraha G, 2013). Bahan pemeriksaan yang terbaik adalah darah segar yang berasal dari kapiler atau vena dan dapat pula digunakan darah EDTA (Subrata G, 2007).



Gambar 2.3 Sediaan Apus Darah Tepi (Subrata G, 2007).

Sediaan apus darah tepi sering digunakan di laboratorium adalah apus darah teletipis. Hasil sediaan yang baik untuk pemeriksaan dapat dinilai secara visual atau secara makroskopis. Sediaan apus darah tepi yang baik harus tiga bagian yaitu kepala, badan dan ekor dengan ketebalan apus tersebut menggambarkan distribusi sel darah (Nugraha G, 2015).

Kriteria penilaian darah tipis yang baik secara mikroskopik dinilai dari gambaran bentuk sediaan terlihat jernih, gambaran warna sediaan darah kombinasi warna merah, ungu dan biru. Sedangkan secara mikroskopis dinilai dari latar belakang jernih, biru pucat dan pucat kemerah-merahan, sel-sel eritrosit warna kontras yang jelas, sebagian leukosit terlihat jelas dan bersih dari partikel-partikel Giemsa.

Pewarnaan Sediaan Apus Darah

Pewarnaan sediaan darah dapat menggunakan beberapa macam pewarnaan, misalnya dapat menggunakan zat warna menurut Romanowsky yaitu pewarnaan Leishman, Giemsa, Field dan Wright. Zat warna yang sering digunakan adalah Giemsa (Sandjaja, 2007). Di Indonesia, pewarnaan yang umum digunakan ialah pewarnaan Giemsa sebab Giemsa lebih tahan lama dalam iklim tropis (Subrata G, 2007).



Gambar 2.4 Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tepi (Subrata G, 2007).

Menurut Wulandari dkk, (2009) dalam jurnal (Yuniastutik, 2019) pewarnaan Giemsa dilakukan dengan cara memberi beberapa tetes Giemsa diatas apusan darah dan didiamkan lalu dibilas kemudian keringkan. Tujuan pewarnaan pada pembuatan apusan darah adalah untuk mempertajam atau memperjelas berbagai elemen sel, terutama sel-selnya sehingga dapat dibedakan dan ditelaah dengan mikroskop.

Sediaan apus darah dilakukan pewarnaan Giemsa atau Wright sehingga sel terwarnai, agar mudah dibedakan dan dapat terlihat lebih jelas. Pewarnaan Giemsa digunakan untuk membedakan inti sel dan morfologi sitoplasma dari sel darah merah, sel darah putih, trombosit dan parasit yang ada didalam darah. Sel mewarnai komponen-komponennya dengan pewarna netral atau campuran pewarna asam dan basa serta akan tampak ungu. Granula pada sel yang bersifat basa akan menyerap pewarna yang bersifat asam (eosin) dan kelihatan merah. Granula pada sel yang bersifat

asam akan menyerap pewarna yang bersifat basa (azure B) dan akan berwarna biru (Irianto, 2004).

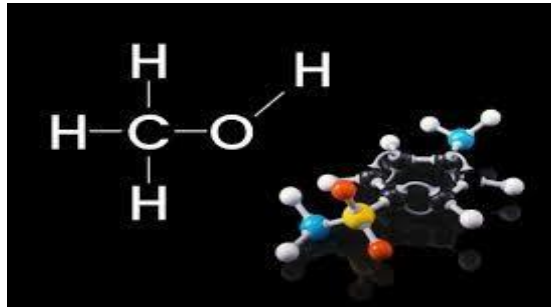
Faktor-faktor yang harus diperhatikan untuk mencapai pewarnaan yang baik:

1. Kualitas dari Giemsa stock yang digunakan sesuai dengan standar mutu:
 - a. Giemsa stock yang belum tercemar air.
 - b. Zat warna pada Giemsa masih aktif.
2. Kualitas dari air pengencer Giemsa
 - a. Air pengencer Giemsa harus jernih, tidak berbau.
 - b. Derajat keasamaan pengencer hendaknya berada pada pH 6,8-7,2. Perubahan pH pada larutan Giemsa berpengaruh pada sel-sel darah.
3. Kualitas dari pembuatan sel darah, ketebalan sel darah yang diwarnai mempengaruhi hasil pewarnaan, semakin berat fiksasi akan semakin sukar bagi larutan Giemsa menerobos plasma darah untuk melakukan proses hemolisa.
4. Kebersihan sediaan darah zat warna yang mengendap dipermukaan pada akhir pewarnaan tertinggal pada sel darah dan mengotorinya. Oleh karena itu pada akhir pewarnaan Giemsa harus dibilas dengan air mengalir (Mega Putri Agnes, 2019)

Methanol

Methanol merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada keadaan atmosfer *methanol* berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol).

Methanol digunakan sebagai bahan pendingin antibeku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan aditif bagi etanol industri (Hermansyah, 2015).



Gambar 2.5 Rumus Struktur *Methanol* (Hermansyah, 2015).

Methanol diproduksi secara alami oleh metabolisme anaerobik oleh bakteri. Hasil proses tersebut adalah uap *methanol* (dalam jumlah kecil) di udara. Setelah beberapa hari, uap *methanol* tersebut akan teroksidasi oleh oksigen dengan bantuan sinar matahari menjadi karbon dioksida dan air. Karena sifatnya yang beracun, *methanol* sering digunakan sebagai bahan *additif* bagi pembuatan alkohol untuk penggunaan industri. Penambahan racun ini akan menghindarkan industri dari pajak yang dapat dikenakan karena etanol merupakan bahan utama untuk minuman keras (minuman beralkohol) (Hermansyah, 2015).

Dahulu *methanol* juga disebut sebagai *wood alcohol* karena merupakan produk samping dari distilasi kayu. Saat ini *methanol* dihasilkan melalui proses multi tahap. Secara singkat, gas alam dan uap air dibakar dalam tungku untuk membentuk gas hidrogen dan karbon monoksida. Kemudian, gas hidrogen dan karbon monoksida ini bereaksi dalam tekanan tinggi dengan bantuan katalis untuk menghasilkan *methanol*.

Tahap pembentukannya adalah endotermik dan tahap sintesisnya adalah eksotermik (Hermansyah, 2015).

Penggunaan *methanol* sering sebagai pelarut dan sebagai antibeku, dan larutan fiksatif. *Methanol* sebagai pelarut karena memiliki kemampuan yang baik dalam menarik berbagai senyawa polar maupun nonpolar (Herlina, 2018). Hal lain yang menjadi alasan dalam penggunaannya sebagai pelarut adalah harganya yang cukup murah dibandingkan dengan pelarut lain seperti etanol atau aseton (Hermansyah, 2015).

Fiksasi

Dalam pembuatan sediaan apus darah tepi harus dilakukan fiksasi, fiksasi merupakan langkah yang penting untuk hasil sediaan yang baik. Fiksasi berfungsi untuk merekatkan sel darah dan mudah untuk diwarnai. Tujuan fiksasi adalah untuk menghentikan proses metabolisme secara cepat, mencegah kerusakan jaringan, mempertahankan keadaan sebenarnya. Fiksasi yang sering dilakukan dalam pembuatan sediaan apus darah yaitu dengan fiksasi basah dengan menggenangi preparat dengan larutan *methanol absolute*. Konsentrasi *methanol* dalam pewarnaan sangat berpengaruh, sebaiknya menggunakan *methanol absolute* dalam proses masuknya zat warna ke dalam sel darah. Penyimpanan *methanol* yang tidak baik akan menyebabkan hasil preparat sediaan apus darah mengalami perbedaan (Rudyatmi, 2011).

Methanol dalam pewarnaan digunakan untuk melisiskan dinding sel sehingga zat warna bisa masuk ke dalam sel darah. Preparat sediaan apus darah setelah kering diinginkan segera dilakukan fiksasi dengan *methanol absolute* selama lima belas

menit. Fiksasi yang tidak segera dilakukan < 1 jam maka akan menyebabkan perubahan morfologi, warna dan perekatan yang tidak baik. Ini mungkin dapat terjadi apabila larutan fiksasi yang digunakan *methanol* yang tidak *absolute*, *methanol* mempunyai kandungan air > 3%, karena telah menguap dan dapat mengubah konsentrasi dari *methanol* tersebut yang dapat menyebabkan fiksasi yang tidak sempurna (Houwen, Berend 2000). Sel darah yang dimasukkan dalam larutan hipertonis, maka tekanan osmosis akan terjadi dari dalam sel keluar sel yang akan menyebabkan sel akan 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 akan menggembung hingga sel berr (Psini dkk, 2006).

Hipotesis

Hipotesis Nol (H₀)

Tidak ada pengaruh yang signifikan dari kondisi penyimpanan *methanol* terhadap kualitas fiksasi pada pewarnaan sediaan apusan darah.

3.8.2. Hipotesis Alternatif (H_a)

Ada pengaruh yang signifikan dari kondisi penyimpanan *methanol* terhadap kualitas fiksasi pada pewarnaan sediaan apusan darah.

BAB III

METODE PENELITIAN

Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium yaitu peneliti memberikan perlakuan tempat penyimpanan larutan fiksasi *methanol* terhadap preparat SADT sebagai subyek penelitian. Peneliti memberikan perlakuan tempat penyimpanan *methanol* yang berbeda dengan menggunakan *methanol absolute* yang disimpan di tempat tertutup (didalam lemari reagen) dan tempat terbuka terkena cahaya matahari langsung (meja pewarnaan) setelah satu bulan pemakaian untuk mengetahui hasil makroskopis dan mikroskopis sediaan apus darah tepi. Hasil penelitian diuji dengan menggunakan uji SPSS *Chi-Square*. Untuk melihat adanya pengaruh dari tempat penyimpanan *methanol* untuk fiksasi sediaan apus darah tepi secara makroskopis dan mikroskopis.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2024-Januari 2025 di Laboratorium Puskesmas Ile Boleng Kabupaten Flores Timur Provinsi Nusa Tenggara Timur.

Populasi dan Sampel

Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah Sediaan Apus darah dari 15 sampel darah EDTA remaja dengan rentang usia 17-23 tahun.

Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan apus darah kapiler dari remaja. Sampel akan dibuat menjadi 30 sediaan apus darah dari 15 orang remaja setiap 1 orang akan mempunyai 2 sediaan apus darah. Setiap sediaan akan difiksasi dengan 2 perlakuan yaitu *methanol* yang disimpan di tempat terbuka dan terkena cahaya matahari langsung (*methanol* yang dibiarkan di atas meja kerja) dan *methanol* yang disimpan di dalam lemari penyimpanan. Fiksasi dilakukan selama 5 menit.

Alat dan Bahan

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Objek *glass*
2. Cover *glass*
3. *Timer*
4. Mikroskop
5. Mikropipet

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

1. Darah EDTA Remaja usia 15-23 tahun
2. Larutan Giemsa
3. *Aquadest*
4. *Methanol*
5. Minyak imersi

Prosedur Penelitian

Pembuatan Slide Sediaan Apus Darah Tepi

Teknik pembuatan slide sediaan apus darah tepi sesuai dengan prosedur menurut (Hormalia, 2018) adalah sebagai berikut:

1. Siapkan objek *glass* yang bersih, kering, dan bebas lemak.
2. Hisap darah sebanyak 10 μ L dengan mikropipet dari tabung EDTA diteteskan pada permukaan objek *glass*.
3. Buat lidah api dengan meletakkan kaca pemulas membentuk sudut 30-40°C kemudian geser kaca pemulas ke belakang.
4. Tetesan akan melebur disepanjang pinggir kaca pemulas kedepan dengan cepat dan tekanan yang cukup.
5. Kemudian keringkan.

Pewarnaan Slide Sediaan Apus Darah Tepi dengan Giemsa

Teknik pewarnaan slide sediaan apus darah sesuai dengan prosedur menurut (Hormalia, 2018) adalah sebagai berikut:

1. Letakkan sediaan apus darah yang akan dipulas di atas rak tempat memulas dengan sediaan darah keatas

2. Genangi dengan 2 jenis perlakuan pada *methanol* yaitu *methanol* yang disimpan ditempat terbuka dan *methanol* yang disimpan dalam lemari penyimpanan pada 2 slide dari 1 sampel proses fiksasi selama 5 menit
3. Buang sisa-sisa *methanol*
4. Genangi slide dengan pewarnaan Giemsa
5. Bilas dengan air mengalir
6. Keringkan
7. Lihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100 kali

Variabel Penelitian

Variabel Independen

Variabel bebas dari penelitian ini adalah lokasi penyimpanan *methanol* untuk fiksasi sediaan apus darah yaitu pada tempat terbuka dan dalam lemari penyimpanan.

Variabel Terikat

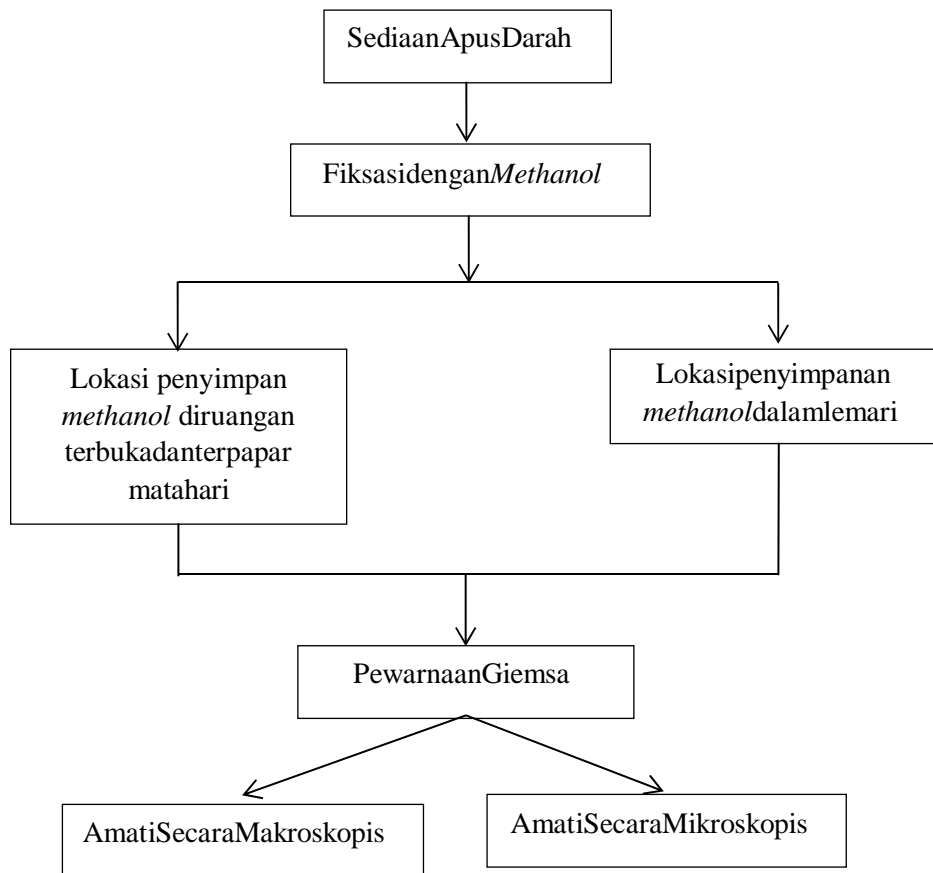
Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil makroskopis dan mikroskopis morfologi sel pada sediaan apus darah.

Defenisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	CaraUkur	Skala
Makroskopis sediaanapusan darah	Evaluasi preparat darah apus dengan melihatperlengketan sel darah pada objek glass dan warna preparat setelah dilakukanpewarnaan Giemsa(Rahmawati, Dian 2016)	Melihat hasil preparat darah apus dan melakukan penilaian preparat. Hasil berdasarkan perlekatan preparat yang baik dan buruk. Preparat yang baik akanmenunjukanperlekatan yang sempurna tidak mengelupas. Preparat yang buruk menunjukan perlekatan yang kurang sempurna atau dapat terkelupas (Rahmawati, 2016)	Nominal
Mikroskopis sediaanapusan darah	Evaluasi preparat darah apus menggunakan mikroskop dengan melihat kelainan morfologi sel darah merah antara lain: warna, ukuran, dan bentuk (krenasi) akibatpengerutansel pada cairan dalam keadaan hipertonis dimana cairan dari seldarahmerahkan keluar dari sel tersebut(Rahmawati, Dian 2016)	Melihat hasilpreparatdarah apus dibawah mikroskop denganperbesaran100kali. Hasil: Baik: sel eritrosit ukuran normositik, warna normokrom, gambar latar belakangbiru,pewarnaaninti leukosit birumembrane inti eritrosit merah dan Buruk: sel eritrosit ukuran mikrositik dan makrositik, dan warna hipokrom/hiperkrom,gambar latar belakang tidak biru, pewarnaan inti leukosit tidak biru, membran inti eritrosit tidak merah (Rahmawati,Dian2016)	Ordinal

KerangkaProsedur



Gambar 3.1 Kerangka Prosedur

Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Data penelitian didapatkan dari hasil pemeriksaan SADT dengan pewarnaan Giemsa menggunakan *methanol* yang disimpan dalam lemari reagen dan *methanol* yang disimpan di meja pewarnaan dan dipakai berulang setelah 1 bulan penyimpanan diperoleh hasil pemeriksaan langsung tentang makroskopis dan mikroskopis dilakukan pemeriksaan sesuai dengan kriteria penilaian pada tabel definisi operasional. Hasil

yang diperoleh dilakukan analisis data. Data-data tersebut diolah, ditabulasi dan dianalisa menggunakan uji Anova dengan aplikasi SPSS.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

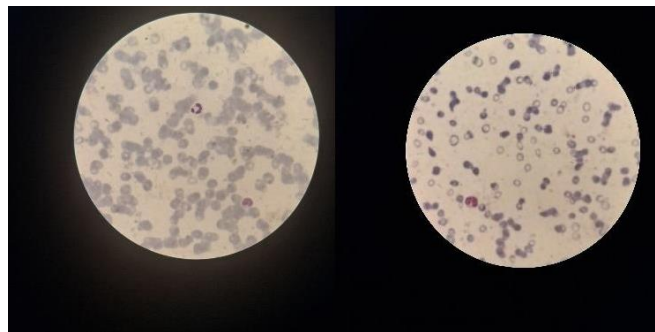
Hasil Penelitian

Karakteristik Umum Responden

Penelitian ini telah dilakukan terhadap 15 sampel dengan 2 perlakuan yang berbeda, diperoleh 30 sediaan apus darah tepi. Setiap sediaan akan difiksasi dengan 2 perlakuan yaitu *methanol* yang disimpan ditempat terbuka dan terkena cahaya matahari langsung (*methanol* yang dibiarkan diatas meja kerja) dan *methanol* yang disimpan didalam lemari penyimpanan. Fiksasi dilakukan selama 5 menit. Pengamatan yang diamati adalah adanya sel krenasi (pengerutan sel) di bawah mikroskop.

Analisis Univariat

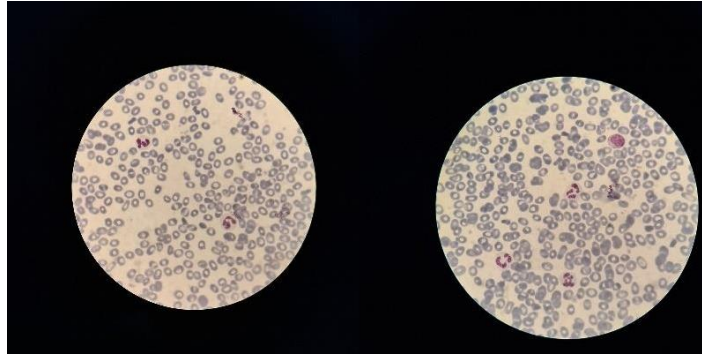
1. Gambaran Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi dengan *methanol* yang disimpan ditempat terbuka.



Gambar 4.1 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi dengan *methanol* (tempat terbuka)

Berdasarkan gambar 4.1 dapat dilihat kualitas sediaan apus darah tepi dengan *methanol* yang disimpan ditempat terbuka terlihat sediaan agak sedikit buram dan adanya sel krenasi (pengerutan sel).

2. Gambaran Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Sediaan Apus Darah Tepi pada *methanol* yang disimpan dalam lemari penyimpanan reagen



Gambar 4.2 Hasil Pemeriksaan Mikroskopis SADT *methanol* (lemari reagen)

Berdasarkan gambar 4.2 dapat dilihat kualitas sediaan apus darah tepi dengan *methanol* yang disimpan dalam lemari penyimpanan reagen terlihat sediaan jelas, warna jelas dan tidak adanya sel krenasi (pengerutan sel).

3. Hasil Kualitas Preparat Sediaan Apusan Darah yang difiksasi dengan *methanol* pada penyimpanan yang berbeda secara mikroskopis dan makroskopis

Tabel 4.1 Hasil Kualitas Preparat

NO	TEMPAT PENYIMPANAN	MAKROSKOPIK	JUMLAH	MIKROSKOPIK	JUMLAH
1	<i>Methanol</i> diruang terbuka	Baik	15	Buruk	15
2	<i>Methanol</i> didalam lemari reagen	Baik	15	Baik	15

Berdasarkan tabel 4.1 menunjukkan hasil kualitas preparat terhadap kondisi *methanol* yang disimpan di dua lokasi berbeda, yaitu di ruang terbuka dan di dalam lemari reagen. Dari 15 sampel *methanol* yang disimpan di ruang terbuka, seluruhnya

menunjukkan kondisi makroskopik yang tetap "Baik," namun secara mikroskopik mengalami penurunan kualitas dengan status "Buruk." Sebaliknya, pada 15 sampel *methanol* yang disimpan di dalam lemari reagen, seluruhnya tetap dalam kondisi "Baik" baik secara makroskopik maupun mikroskopik.

Analisis Bivariat

Untuk menganalisis data di atas menggunakan SPSS, langkah pertama yang perlu dilakukan adalah memasukkan data ke dalam SPSS dengan tiga variabel utama: Tempat Penyimpanan (kategori: "Ruang Terbuka" dan "Lemari Reagen"), Makroskopik (kategori: "Baik"), dan Mikroskopik (kategori: "Baik" atau "Buruk"). Setelah data dimasukkan, analisis dapat dilakukan dengan menggunakan uji *Chi-Square* untuk menguji hubungan serta pengaruh antar tempat penyimpanan *methanol* dengan kondisi mikroskopiknya.

Hasil uji *Chi-Square* akan menunjukkan apakah terdapat hubungan serta pengaruh yang signifikan antara metode penyimpanan dan kualitas mikroskopik *methanol*. Apabila nilai $P\text{-Value} < 0.05$, maka dapat disimpulkan bahwa ada hubungan serta pengaruh yang signifikan, yang berarti penyimpanan *methanol* di ruang terbuka memang berdampak buruk terhadap kondisi mikroskopiknya. Sebaliknya, jika $P\text{-Value} > 0.05$, maka tidak ada hubungan serta pengaruh yang signifikan, sehingga menunjukkan bahwa faktor penyimpanan tidak memengaruhi kualitas mikroskopik *methanol* secara data statistik.

1. Uji *Chi-Square* Kualitas *Methanol* Secara Makroskopik Di Ruang Terbuka dan

Dalam Lemari Reagen

Tabel 4.2 Hasil Uji Chi-Square Kualitas Methanol Secara Makroskopik di Ruang

Terbuka dan di Dalam Lemari Reagen

Chi-Square Tests

	Value
Pearson Chi-Square	. ^a
N of Valid Cases	30

a. No statistics are computed because kualitas makroskopik is a constant.

Berdasarkan output *Chi-Square Tests* dari SPSS, terlihat bahwa tidak ada statistik yang dihitung untuk Pearson *Chi-Square*. Hal ini disebabkan oleh peringatan: "*No statistics are computed because kualitas makroskopik is a constant.*" Artinya, variabel kualitas makroskopik dalam dataset memiliki nilai yang sama untuk semua sampel (konstan). Dari tabel data yang telah dianalisis sebelumnya, memang terlihat bahwa seluruh sampel memiliki nilai "Baik" pada variabel makroskopik, baik pada kelompok *methanol* di ruang terbuka maupun *methanol* di dalam lemari reagen. Karena uji *Chi-Square* membutuhkan adanya variasi dalam kategori data, maka uji ini tidak dapat dijalankan karena tidak ada perbedaan (semua nilainya sama).

2. Uji Chi-Square Kualitas Methanol Secara Mikroskopik Di Ruang Terbuka dan di

Dalam Lemari Reagen

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymptotic Significance (2-sided)
Pearson Chi-Square	30.000 ^a	1	<.001

a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.50.

b. Computed only for a 2x2 table

Berdasarkan hasil uji *Chi-Square* yang dilakukan, diperoleh nilai *Pearson Chi-Square* sebesar 30.000 dengan *P-Value* < 0.001. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan serta pengaruh yang signifikan antara kondisi penyimpanan *methanol* dengan kualitas fiksasi mikroskopik pada pewarnaan sediaan apus darah ($P < 0.05$). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa kondisi penyimpanan *methanol* secara signifikan mempengaruhi kualitas fiksasi mikroskopik, di mana penyimpanan di dalam lemari reagen memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan penyimpanan di ruang terbuka.

BAB V

PEMBAHASAN

Analisis Univariat

Berdasarkan hasil penelitian mikroskopis kualitas sediaan apus darah tepi pada *methanol* yang disimpan ditempat terbuka terlihat sediaan agak sedikit buram dan adanya sel krenasi (pengerutan sel).

Menurut asumsi peneliti *methanol* yang disimpan di tempat terbuka cenderung mengalami penguapan, yang dapat menurunkan konsentrasinya dan meningkatkan kandungan air. *Metanol* dengan kandungan air lebih dari 3% dapat mempengaruhi morfologieritrosit selama proses fiksasi, menyebabkan tampilan sediaan yang buram dan munculnya sel krenasi.

Penelitian sebelumnya mendukung asumsi ini. Misalnya, sebuah studi menyatakan bahwa *methanol* yang dibiarkan terlalu lama terbuka akan menguap dan mengalami penurunan konsentrasi, yang dapat mempengaruhi morfologi eritrosit (Triyani, P. 2023). Selain itu, penelitian lain menunjukkan bahwa *methanol* yang dibiarkan terlalu lama diudara terbuka akan menguap dan mengandung air, sehingga mempengaruhi morfologi eritrosit (Ghofur, A. dkk. 2022).

Berdasarkan hasil penelitian mikroskopis kualitas sediaan apus darah tepi pada *methanol* yang disimpan didalam lemari penyimpanan reagen terlihat sediaan jelas, warna jelas dan tidak adanya sel krenasi (pengerutan sel).

Menurut asumsi peneliti penyimpanan *methanol* dalam lemari reagen yang tertutupapat mencegahpenguapandankontaminasi air. *Methanol* dengankandungan

air kurang dari 3% dan konsentrasi 96% dianggap ideal untuk fiksasi, karena dapat mempertahankan morfologi sel darah merah dengan baik. Penelitian sebelumnya mendukung temuan ini. Studi menunjukkan bahwa *methanol* yang disimpan dengan baik mempertahankan kualitasnya, sehingga fiksasi sediaan apus darah tepi menghasilkan morfologi eritrosit yang optimal tanpa adanya sel krenasi (Ghofur, A. dkk. 2022).

Methanol berperan sebagai agen fiksatif yang mencegah perubahan struktur sel darah, sehingga teknik penyimpanannya menjadi faktor kunci dalam menentukan keberhasilan pewarnaan (Jayadi, G. dkk. 2021). *Methanol* digunakan dalam fiksasi karena mampu menstabilkan struktur sel tanpa menyebabkan perubahan morfologi yang signifikan. *Methanol* bekerja dengan mendehidrasi sel, menggantikan air dalam jaringan dengan molekulnya, sehingga menjaga integritas sel. (Sholekha, F. 2018). Namun, paparan oksigen dan sinar matahari dapat menyebabkan oksidasi *methanol* menjadi formaldehida dan air, yang dapat mengubah efektivitas fiksasi.

Merujuk pada dua kondisi penyimpanan yang diteliti dalam penelitian ini, yaitu: penyimpanan dalam lemari reagen (tertutup) dan penyimpanan di ruang terbuka dengan paparan sinar matahari langsung. Secara makroskopis, hasil pewarnaan pada kedua kondisi penyimpanan menunjukkan kualitas yang tampak baik. Hal ini menunjukkan bahwa secara kasat mata, *methanol* dalam kedua kondisi masih mampu mempertahankan fiksasi yang memadai. Namun, pengamatan secara makroskopis saja tidak cukup untuk menilai kualitas fiksasi yang sebenarnya.

Analisis Bivariat

Dari hasil uji statistik *chi square* diperoleh hasil kualitas *methanol* secara makroskopik di ruang terbuka dan di dalam lemari reagen memiliki nilai yang sama untuk semua sampel (konstan). Sehingga tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Pada pemeriksaan mikroskopis menunjukkan perbedaan yang signifikan antara *methanol* yang disimpan di lemari reagen dan yang disimpan di ruang terbuka. *Methanol* dalam lemari reagen menghasilkan pewarnaan yang lebih jelas dengan morfologi sel yang terjaga, sedangkan *methanol* di ruang terbuka menyebabkan perubahan morfologi sel seperti krenasi (pengerutan sel) dan pewarnaan yang tidak merata.

Analisis data menggunakan uji *Chi-Square* menunjukkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara kondisi penyimpanan *methanol* dengan kualitas fiksasi mikroskopis ($P < 0.001$). Hal ini menegaskan bahwa penyimpanan *methanol* yang tidak tepat dapat menurunkan kualitas fiksasi dan mempengaruhi hasil analisis mikroskopis pada pewarnaan sediaan apusan darah tepi (SADT).

Penelitian ini sejalan dengan studi yang dilakukan oleh Rachmawati (2016) yang menunjukkan bahwa penguapan *methanol* dapat mengurangi efektivitas fiksasi. Sholekha, F (2018) juga menemukan bahwa penurunan konsentrasi *methanol* akibat penyimpanan yang tidak tepat berpengaruh pada hasil pewarnaan sel darah merah.

Hasil penelitian ini memiliki implikasi penting dalam prosedur laboratorium klinis. Penyimpanan *methanol* dalam kondisi tertutup harus menjadi standar untuk memastikan hasil pewarnaan yang optimal. Selain itu, laboratorium perlu memiliki sistem pemantauan kualitas reagen yang baik secara berkala dan konsisten untuk mencegah degradasi pada semua jenis reagen yang digunakan dalam laboratorium.

Selain penguapan, kelembaban dan pH lingkungan juga berkontribusi terhadap degradasi *methanol*. Kelembaban tinggi dapat menyebabkan penyerapan air oleh *methanol*, yang mengurangi efektivitas fiksasi karena adanya kandungan air yang berlebihan. Oleh karena itu, sesuai dengan Lembar Data Keselamatan Bahan (LDKB) tahun 2014 *methanol* sebaiknya disimpan dalam wadah tertutup di lingkungan dengan kontrol kelembaban yang baik. Selain *methanol*, beberapa laboratorium menggunakan etanol atau campuran formalin sebagai fiksasi alternatif (Wardani, Y. 2020). Namun, *methanol* tetap lebih disukai karena menghasilkan fiksasi yang lebih seragam dan minim artefak dibandingkan formalin, yang dapat menyebabkan pengerasan jaringan berlebihan.

Berdasarkan temuan penelitian, laboratorium klinis disarankan untuk menyimpan *methanol* dalam lemari reagen tertutup dan jauh dari sinar matahari. Selain itu, laboratorium perlu melakukan pengecekan berkala terhadap konsentrasi *methanol* dan menggantinya jika terdapat indikasi degradasi atau penurunan konsentrasi.

Selain itu, perlu dilakukan uji spektrofotometri untuk mengukur perubahan komposisi kimia dari larutan *methanol* akibat penyimpanan yang berbeda. Penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi penyimpanan *methanol* memiliki pengaruh signifikan

terhadap kualitas fiksasi pada pewarnaan tersedia di atas meja (SADT). *Methanol* yang disimpan di ruang terbuka mengalami degradasi, yang menyebabkan hasil pewarnaan mikroskopis yang kurang optimal. Oleh karena itu, penyimpanan dalam lemari reagen sangat disarankan untuk menjaga kualitas pewarnaan.