

PENENTUAN WAKTU PROSES PEWARNAAN APUSAN DARAH IKAN MENGUNAKAN PEWARNA GIEMSA UNTUK MENUNJANG PRAKTIKUM DI LABORATORIUM PENYAKIT DAN KESEHATAN IKAN

Titin Yuniastutik

Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya,
ti2nyunias@gmail.com

ABSTRAK

Permasalahan yang sering terjadi di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit Dan Kesehatan Ikan adalah praktikum hematologi darah terutama uji differensial leukosit menggunakan pewarna giemsa tentang durasi pewarnaan masih menggunakan waktu perkiraan. Hal tersebut menyebabkan hasil pemeriksaan menjadi tidak akurat, tidak optimal dan kurang dapat dipercaya untuk menjawab pertanyaan riset dan mempersulit didalam menegakkan diagnosa suatu penyakit ikan. Penggunaan prosedur baku tidak menjamin akan diperolehnya hasil yang baik, sehingga diperlukan pemilihan terhadap durasi yang tepat pada proses pewarnaan menggunakan pewarna giemsa. Ketelitian dan ketepatan sangat diperlukan dalam setiap tahap pembuatan sediaan preparat apusan darah. Penelitian ini bertujuan unruk menentukan durasi yang tepat pada proses pewarnaan sel darah ikan menggunakan pewarna giemsa dalam metode differensial leukosit. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, dengan menerapkan variasi waktu pada proses pewarnaan, kemudian dilakukan proses pengamatan sel darah ikan dan masing masing hasil pengamatan dibandingkan untuk mengetahui hasil yang terbaik. Pengambilan data dilakukan dengan cara observasi dan dokumentasi dari pekerjaan rutin penulis di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit Dan Kesehatan Ikan. Berdasarkan hasil dari penelitian yang divisualisasikan melalui pengamatan mikroskop, maka dapat disimpulkan bahwa durasi pewarnaan darah ikan dengan pewarna giemsa dalam metode differensial leukosit yang terbaik adalah 20 menit dan secara signifikan berpengaruh terhadap kualitas gambaran sel darah ikan. Hal tersebut sangat bermanfaat untuk menunjang bahan pengajaran dan praktikum mahasiswa, membantu para peneliti untuk menjawab permasalahan yang timbul serta sangat diperlukan dalam menunjang diagnosa ikan.

Kata kunci: *differensial leukosit, waktu pewarnaan, penyakit dan kesehatan ikan*

PENDAHULUAN

Hematologi darah pada ikan terdiri dari 5 uji yaitu uji hematokrit, uji total eritrosit, uji total leukosit, Hb dengan sahlimeter dan uji differensial leukosit. Praktikum yang menggunakan metode uji differensial leukosit adalah praktikum parasit dan penyakit ikan, praktikum fisiologi hewan air. Pada uji differensial leukosit terdapat beberapa tahapan mulai dari proses membuat apusan darah, proses fiksasi dengan methanol dan proses pewarnaan dengan pewarna giemsa. Pada proses pewarnaan dengan pewarna giemsa selama ini digunakan waktu yang kurang tepat sehingga apusan darah yang diperoleh kurang bagus. Sehingga akan mempengaruhi pada proses pengamatan sel darah ikan dengan menggunakan mikroskop. Penentuan waktu yang tepat dalam proses pewarnaan apusan darah ikan dengan metode differensial leukosit sangat penting untuk mendapatkan apusan darah yang berkualitas sehingga dapat membantu mahasiswa dan dosen sebagai praktikan maupun peneliti untuk mendapatkan data yang akurat.

Permasalahan tersebut menyebabkan hasil pemeriksaan menjadi tidak akurat, tidak optimal dan kurang dapat dipercaya untuk menjawab pertanyaan riset dan mempersulit didalam menegakkan diagnosa suatu penyakit ikan, sehingga perlu dilakukan eksperimen untuk menentukan waktu yang tepat dalam proses pewarnaan darah ikan menggunakan pewarna giemsa pada uji differensial leukosit. Lamanya proses fiksasi dan proses pewarnaan dengan giemsa sangat berpengaruh terhadap kualitas sel darah ikan. Menurut Houwen (2000), fiksasi sebaiknya dilakukan <1 jam setelah kering angin karena apabila tidak dilakukan fiksasi maka

akan memberikan latar belakang biru. Fiksasi berfungsi agar apusan darah melekat pada obyek glass sehingga yakin bahwa sel-sel di dalamnya strukturnya tetap normal dan mampu menyerap cat dengan sempurna. Fiksasi yang tidak baik menyebabkan perubahan morfologi dan warna sediaan. Oleh sebab itu lamanya waktu pewarnaan giemsa juga sangat penting terhadap kualitas apusan darah ikan.

Apusan darah ikan yang bagus akan mempermudah dalam pengamatan sel sel darah ikan. Metode pewarnaan ini banyak dipakai untuk mempelajari morfologi darah, sel-sel sumsum dan juga untuk identifikasi parasit-parasit darah.

Pembuatan makalah Penentuan waktu proses pewarnaan apusan darah ikan menggunakan pewarna giemsa untuk menunjang praktikum di laboratorium penyakit dan kesehatan ikan ini diharapkan dapat menjadi wahana untuk menambah ilmu dan pengetahuan juga pemahaman tentang pentingnya waktu yang optimal dalam pewarnaan apusan darah ikan, mendapatkan apusan darah yang berkualitas, mengetahui faktor apa saja yang dapat mempengaruhi mutu/kualitas apusan darah. Selain itu, juga dapat digunakan sebagai bahan evaluasi khususnya di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya sehingga dapat mempertahankan bahkan meningkatkan kualitas serta mutu dalam pemeriksaan darah ikan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 1 Desember 2016 sampai dengan 15 Desember 2016 di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Materi Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nampal, jarum spuit 1 cc, eppendorf, obyek glass, cover glass, beker glass 250 mL dan mikroskop yang digunakan untuk mengamati hasil apusan darah ikan. Ikan lele sehat sebanyak 1 ekor dengan panjang kurang lebih 15 cm berumur 2-3 bulan sebagai sampel yang akan diambil darahnya. Bahan untuk proses pengambilan darah yaitu minyak cengkeh dan Na-sitrat 3.8 % sebagai anti koagulan. Bahan untuk membuat apusan darah yaitu, alkohol 70%, methanol pa sebagai bahan untuk fiksasi, pewarna giemsa 10%, aquades, dan minyak imersi.

Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, dengan menerapkan variasi waktu pada proses pewarnaan, kemudian dilakukan proses pengamatan sel darah ikan dan masing masing hasil pengamatan dibandingkan untuk mengetahui hasil yang terbaik. Pengambilan data dilakukan dengan cara observasi dan dokumentasi dari pekerjaan rutin penulis di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit Dan Kesehatan Ikan.

Prosedur Kerja

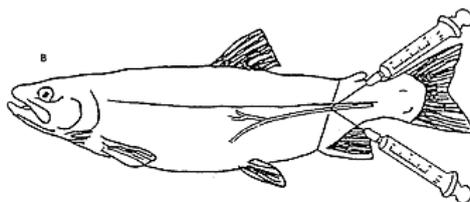
Persiapan Peralatan dan Bahan

Peralatan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu yaitu spuit 1 cc diisi dengan Na-sitrat 3.8 % (anti koagulan), ikan lele direndam terlebih dahulu dengan minyak cengkeh sampai ikan lele pingsan. Obyek glass dibersihkan terlebih dahulu dari lemak yang menempel dengan menggunakan alkohol 70%.

Proses Pengambilan Darah Ikan

Pengambilan darah dilakukan dengan perbandingan anti koagulan (Na-sitrat 3,8%) dan darah yaitu 1: 9, hal ini dilakukan untuk memperoleh kualitas darah yang bagus. Darah yang diperoleh dimasukkan ke dalam eppendorf dan siap dilakukan untuk uji apusan darah.

Teknik pengambilan darah menggunakan teknik *puncturing the caudal vessel* (pembuluh darah bagian caudal). Teknik ini biasa dipakai untuk pengambilan sampel darah ikan berukuran besar (> 10 cm). Teknik ini mempunyai kelebihan yaitu bisa dipergunakan berulang pada satu ikan, dengan menggunakan teknik ini dari seekor ikan dengan berat 200 gr dapat diperoleh darah sebanyak 0,5 -1 ml dalam setiap minggunya tanpa mengakibatkan kelemahan dan kematian pada ikan. Pengambilan darah dengan cara tusukkan jarum spuit pada garis tengah tubuh ikan di belakang sirip anal, masukkan jarum kedalam musculus sampai mencapai tulang belakang (*columna spinalis*). Pastikan tidak ada gelembung air yang masuk dalam spuit, kemudian tarik perlahan-lahan sampai darah masuk kedalam spuit. Ilustrasinya ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Gambar teknik *puncturing the caudal vessel*

Proses Pembuatan Apusan Darah Ikan

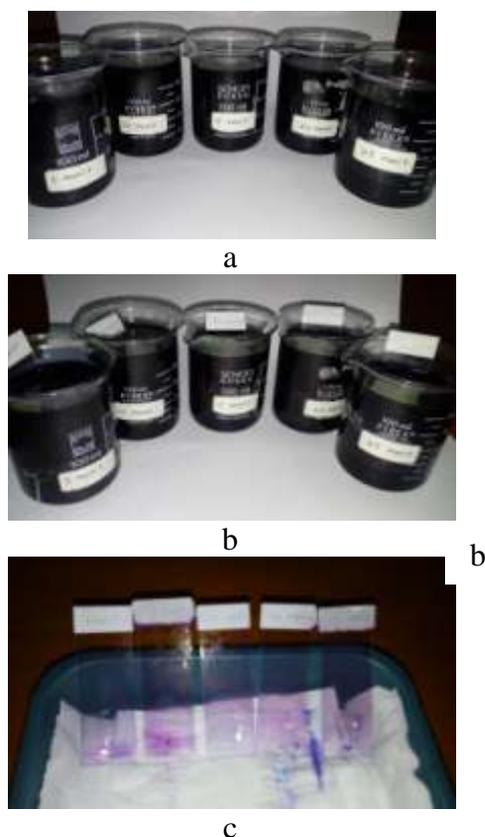
Tempatkan darah didalam eppendorf, selanjutnya dilakukan proses membuat apusan darah. Pembuatan sediaan apus darah biasanya digunakan dua buah kaca sediaan yang sangat bersih terutama harus bebas lemak. Satu buah kaca sediaan bertindak sebagai tempat tetes darah yang hendak diperiksa dan yang lain bertindak sebagai alat untuk meratakan tetes darah agar didapatkan lapisan tipis darah (kaca perata). Darah dapat diperoleh dari tusukan jarum pada ujung jari. Sebaiknya tetesan darah pertama dibersihkan agar diperoleh hasil yang memuaskan. Tetesan yang kedua diletakan pada daerah ujung kaca sediaan yang bersih. Salah satu ujung sisi pendek kaca perata diletakan miring dengan sudut kira- kira 45° tepat didepan tetes darah menyebar sepanjang sisi pendek kaca perata, maka dengan mempertahankan sudutnya, kaca perata digerakan secara cepat sehingga terbentuklah selapis tipis darah diatas kaca sediaan. Kemudian sediaan darah dikeringkan pada suhu kamar barulah dilakukan pewarnaan sesudah difiksasi menurut metode yang dipilih, yaitu metode Giemsa dan Wright yang merupakan modifikasi metode Romanosky. Ilustrasi membuat apusan darah ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Gambar membuat apusan darah

Proses fiksasi dilakukan setelah apusan darah kering, menggunakan methanol pa (absolute) yaitu dengan cara meneteskan methanol ke seluruh apusan darah, selanjutnya apusan darah dibiarkan sampai kering pada suhu ruang.

Setelah kering, apusan darah diwarnai dengan pewarna giemsa 10% dengan kombinasi waktu perendaman 5 menit, 10 menit, 15 menit dan 20 menit. Digunakan konsentrasi giemsa 10 % ini berdasarkan penelitian Suryanta (Pengaruh variasi konsentrasi giemsa terhadap apusan darah) dan dari hasil penelitian tersebut menjelaskan bahwa konsentrasi giemsa tidak berpengaruh terhadap apusan darah. Pewarnaan dengan pewarna giemsa 10% dilakukan dengan berbagai macam waktu pewarnaan untuk mencapai waktu yang optimal dan terbaik. Ilustrasi proses lamanya pewarnaan ditunjukkan pada gambar 3. Tujuan pewarnaan pada pembuatan apusan darah adalah untuk mempertajam atau memperjelas berbagai elemen sel, terutama sel-selnya sehingga dapat dibedakan dan ditelaah dengan mikroskop.

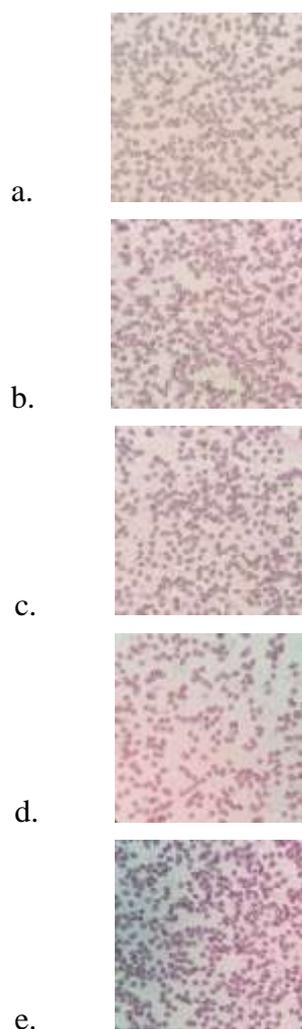


Gambar 3. Gbr a persiapan larutan giemsa 10%, gbr b perendaman didalam pewarna giemsa, gbr c apusan darah siap diamati

Apusan darah kemudian dibilas dengan aquades mengalir dan dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya apusan darah siap untuk dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran sesuai yang diinginkan. Untuk pengamatan dengan perbesaran 1000 x menggunakan minyak imersi. Kemudian dilakukan pengamatan dengan cara membandingkan semua preparat apusan darah dengan macam variasi waktu. Pengamatan tersebut dilakukan dengan melihat bentuk sel darah ikan, warna sel darah ikan dan kemudian dipilih preparat apusan darah yang terbaik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari pengamatan sel darah ikan dibawah mikroskop perbesaran 400x dan 1000x yaitu diperoleh bahwa apusan darah dengan waktu perendaman 20 menit didalam pewarna giemsa 10% adalah yang terbaik. Dari hasil pengamatan mikroskop didapatkan waktu pewarnaan yang terbaik adalah 20 menit. Ilustrasi hasil pengamatan dibawah mikroskop perbesaran 400x ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Gambar sel darah hasil pewarnaan giemsa 10%, a = 5 menit, b = 10 menit, c = 15 menit, d = 20 menit, e = 25 menit

Hasil pewarnaan dengan Giemsa pada darah akan memperlihatkan eritrosit berwarna merah muda, nukleolus leukosit berwarna ungu kebiru-biruan, sitoplasma leukosit berwarna sangat ungu muda, granula dari leukosit eosinofil berwarna ungu tua, granula dari leukosit netrofil dan leukosit basofil berwarna ungu.

Pewarna giemsa merupakan campuran methylen blue dan eosin dalam perbandingan tertentu memberi warna ungu inti leukosit. Pewarnaan ini disebabkan karena oksidasi methylen blue dan pembentukan senyawa baru dalam campuran yang dinamakan azure. Setelah pemberian campuran jenis Romanosky, diferensiasi sel-sel dapat dilakukan Berdasarkan 4 sifat pewarnaan yang menyatakan afinitas struktur sel oleh masing-masing zat warna dari campuran, yaitu: afinitas untuk methylen blue, afinitas untuk azure dikenal sebagai azurefilik (ungu), afinitas untuk eosin (suatu zat warna asam) dikenal sebagai asidofilik atau eosinofilia (merah muda kekuningan), afinitas untuk komplek zat warna yang terdapat dalam campuran secara tidak tepat dianggap netral dan dikenal sebagai neutrofilia (salmon pink smplilac).

Hitung jenis leukosit digunakan untuk mengetahui jumlah berbagai jenis leukosit. Terdapat lima jenis leukosit, yang masing-masing memiliki fungsi yang khusus dalam melawan patogen. Sel-sel itu adalah neutrofil, limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil. Hasil hitung jenis leukosit memberikan informasi yang lebih spesifik mengenai infeksi dan proses penyakit. Hitung jenis leukosit hanya menunjukkan jumlah relatif dari masing-masing jenis

sel. Untuk mendapatkan jumlah absolut dari masing-masing jenis sel maka nilai relatif (%) dikalikan jumlah leukosit total (sel/ μ l).

Menurut Maskoeri (2008), adapun faktor yang mempengaruhi ketidakberhasilan dalam pembuatan apusan darah yaitu: Darah yang cepat menggumpal ataupun cepat mengering saat diteteskan ke kaca benda, kurangnya pengalaman dan kurangnya kesabaran.

Banyak sekali faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuatan preparat, terutama pada pembuatan preparat apus yaitu pertama pada saat pengambilan sampel, sampel yang diambil adalah darah yang masih segar karena darah merupakan jaringan hidup yang dapat melakukan proses pembekuan saat terjadi luka dan pendarahan. Kedua pemrosesan, pemrosesan juga sangat mempengaruhi keberhasilan pembuatan preparat terutama dalam proses perlakuan penggeseran darah pada kaca benda, karena hal ini berpengaruh terhadap sel-sel darah. Ketiga adalah pewarnaan, pemberian zat warna yang berlebihan akan mengakibatkan bagian-bagian sel darah yang amat terlalu tebal, sehingga sulit diamati. Lamanya pemberian zat warna juga berpengaruh karena adanya daya serap jaringan juga berbeda. Sehingga dalam hal ini diperlukan keterampilan dan pengamatan yang cukup.

Menurut Sandjaja (2007), ciri-ciri sediaan darah yang baik adalah sediaan 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 arloji. Bila jarum arloji masih dapat dilihat samar-samar hal itu menunjukkan ketebalan yang tepat dalam proses membuat apusan darah.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian yang divisualisasikan melalui pengamatan mikroskop, maka dapat disimpulkan bahwa waktu lamanya pewarnaan darah ikan dengan pewarna giemsa 10 % dalam metode differensial leukosit yang terbaik adalah 20 menit dan secara signifikan berpengaruh terhadap kualitas gambaran sel darah ikan. Hal tersebut sangat bermanfaat untuk menunjang bahan pengajaran dan praktikum mahasiswa, membantu para peneliti untuk menjawab permasalahan yang timbul serta sangat diperlukan dalam menunjang diagnosa ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bijanti, R. 2005. *Hematologi Ikan (Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan)*. Buku Ajar Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Handari, S Suntoro, 2003. *Metode Pewarnaan*. Jakarta: Bhatara Karya Aksara.
- Houwen, Berend. 2000. *Blood Film Preparation and Staining Procedures*. California.
- Maskoeri, 2008. *Penuntun Praktikum Anatomi dan Fisiologi Manusia*. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta.
- Suryanta. *Jurnal. Pengaruh Variasi Konsentrasi Giemsa Terhadap Hasil Pewarnaan Sediaan Apus Darah Tipis Pada Pemeriksaan Plasmodium sp. Dosen Jurusan Analis Kesehatan*. Poltekkes Yogyakarta.
- Tjokronegoro, Arjatmo dan Hendra Utama, 1996. *Pemeriksaan Hematologi Sederhana*. FKUI: Jakarta.