

UJI LARUTAN SAFRANIN – PHOSPHATE BUFFERED SALINE SEBAGAI REAGEN ALTERNATIF HITUNG ERITROSIT DAN TROMBOIT

Gilang Nugraha¹⁾, Diyan Wahyu Kurniasari¹⁾, Mita Rahayu¹⁾, Aulia Sabrina¹⁾, Alya Salsabila¹⁾, Muhammad Rizqi Cahyadi¹⁾

¹⁾ Prodi Analisis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya, Surabaya, Indonesia
Alamat Korespondensi: gilang@unusa.ac.id

Artikel info:

Received : 12-06-2024

Revised : 03-11-2024

Accepted : 23-12-2024

Publish : 31-12-2024



Artikel dengan akses terbuka ini di bawah lisensi CC-BY-NC-4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Abstrak

Pemeriksaan RBC dan PLT secara manual dilakukan menggunakan mikroskopik menggunakan reagen yang berbeda yaitu Hayem dan Rees Ecker. Formula larutan pengencer yang terdiri dari PBS dan Safranin digunakan untuk pemeriksaan RBC dan PLT sekaligus. Oleh karena itu kami mencoba menguji formula larutan Safranin – PBS untuk digunakan dalam menentukan RBC dan PLT secara bersamaan. Penelitian melibatkan 10 responden dengan unit pemeriksaan berupa darah. RBC dan PLT diukur menggunakan hematology analyzer (kontrol) dan Safranin – PBS pH 6,8 serta 7,0 (perlakuan). Hasil pengamatan mikroskopik PLT nampak lebih jelas berwarna merah ungu dibandingkan RBC yang berwarna merah muda. RBC metode referen $4,76 \pm 0,62 \times 106/\mu\text{L}$. Safranin – PBS pH 6,8 yaitu $2,74 \pm 0,82 \times 106/\mu\text{L}$ (nilai-p = 0,000), Safranin – PBS pH 7,0 yaitu $3,05 \pm 0,48 \times 106/\mu\text{L}$ (nilai-p = 0,000). Persamaan regresi Safranin – PBS pH 6,8 $Y = -0,0425x + 348,69$ ($r^2 = 0,0041$), Safranin – PBS pH 7,0 $Y = -0,242x + 402,8$ ($r^2 = 0,1084$). Disimpulkan bahwa formula Safranin – PBS belum dapat direkomendasikan karena masih memiliki perbedaan hasil dan belum memiliki kesamaan metode dengan referen.

Kata Kunci: Eritrosit; Trombosit; Safranin; PBS; pH

Abstract

Manual examination of RBC and PLT was carried out using a microscope using different reagents, namely Hayem and Rees Ecker. The diluent solution formula consisting of PBS and Safranin is used for RBC and PLT examination at the same time. Therefore, we tried to test the Safranin – PBS solution formula for use in determining RBC and PLT simultaneously. The research involved 10 respondents with blood testing units. RBC and PLT were measured using a hematology analyzer (control) and Safranin – PBS pH 6.8 and 7.0 (treatment). The results of microscopic observations of PLT appear to be more clearly purple red compared to RBC which is pink. Reference method RBC $4.76 \pm 0.62 \times 106/\mu\text{L}$. Safranin – PBS pH 6.8, namely $2.74 \pm 0.82 \times 106/\mu\text{L}$ ($p\text{-value} = 0.000$), Safranin – PBS pH 7.0, namely $3.05 \pm 0.48 \times 106/\mu\text{L}$ ($p\text{-value} = 0.000$). Regression equation Safranin – PBS pH 6.8 $Y = -0.0425x + 348.69$ ($r^2 = 0.0041$), Safranin – PBS pH 7.0 $Y = -0.242x + 402.8$ ($r^2 = 0.1084$). It was concluded that the Safranin - PBS formula cannot be recommended because it still has different results and does not have the same method as the reference.

Keywords: Erythrocytes; Platelets; Safranin; PBS; pH

PENDAHULUAN

Hitung jumlah eritrosit (*Red Blood Cell Count*, RBC) dan hitung jumlah trombosit (*Platelet Count*, PLT) merupakan salah satu parameter dalam pemeriksaan hematologi rutin (Essawi *et al.*, 2023; Mustafa *et al.*, 2024), pemeriksaan ini sering di minta karena selain diagnosis juga digunakan untuk skrining penyakit (Seo and Lee, 2022; Rivera *et al.*, 2023). Pemeriksaan RBC dan PLT di Indonesia masih banyak dilakukan secara manual, terutama pada pusat kesehatan masyarakat dan laboratorium klinik pratama (Praptomo, 2016; Salman, Nadia and Wahidah, 2021). Berdasarkan data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, terdapat 10.217 Pusat Kesehatan Masyarakat dan 1.487 laboratorium kesehatan yang tersebar di Indonesia (Dirjen Pelayanan Kesehatan Kemenkes RI, 2022). Dengan demikian kebutuhan akan pemeriksaan RBC dan PLT manual juga masih tinggi.

Pemeriksaan RBC dan PLT secara manual dilakukan menggunakan mikroskopik. Sebelum pemeriksaan dibutuhkan reagen pengencer untuk memudahkan pengamatan dan penghitungan. RCB

menggunakan Hayem dan RBC dapat diperiksa karena Hayem bersifat isotonis. Sedangkan PLT menggunakan Rees Ecker dan PLT dapat diperiksa karena larutan bersifat isotonis dan mengandung zat warna (Nugraha and Badrawi, 2018; Nugraha, 2023). Kedua pemeriksaan tersebut menggunakan reagen yang berbeda, padahal pengenceran pemeriksaan dilakukan sama yaitu 100 hingga 200 kali (Nugraha, 2023).

Berdasarkan hal tersebut kami memformulasikan larutan pengencer yang terdiri dari phosphate buffered saline (PBS) dan Safranin untuk pemeriksaan RBC dan PLT sekaligus. Penggunaan PBS digunakan sebagai pengganti larutan isotonis dan Safranin sebagai zat pewarna sel (Zhang *et al.*, 2020; Son *et al.*, 2021). Safranin merupakan salah satu zat warna yang digunakan pada pewarna bakteri (Abdulrahman *et al.*, 2020). Safranin juga dapat digunakan sebagai pewarna sel eukariot karena merupakan pewarna zat basa, sehingga mampu mewarnai bagian asam dari sel seperti granula, DNA dan RNA (Nugraha, 2017). Derajat keasaman PBS yang digunakan yaitu 7,0 sesuai dengan pH Hayem dan Rees Ecker, dan menggunakan pH 6,8 sebagai bahan pembanding karena safranin stabil pada suasana asam. Penggunaan pH yang tepat juga disarankan untuk menjaga stabilitas morfologi sel serta kualitas warna yang digunakan (Hopkins, Sanvictores and Sharma, 2022). Oleh karena itu kami mencoba menguji formula larutan Safranin-PBS kami agar dapat digunakan untuk menentukan RBC dan PLT secara bersamaan.

METODE PENELITIAN

Pernyataan Etik

Penelitian ini melibatkan responden manusia dengan unit percobaan berupa darah dan telah mendapat persetujuan etik dari Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya dengan nomor sertifikat etik 0364/EC/KEPK/UNUSA/2023.

Pengumpulan Sampel

Sebanyak 3 mL darah vena di ambil dari *fossa antecubiti*, di tampung dalam tabung EDTA. Spesimen yang didapat dengan segera dilakukan pemeriksaan. Prosedur pengambilan darah mengikuti cara yang berlaku (Nugraha, 2022).

Pemeriksaan

Tabung berisi darah EDTA diambil dan di periksa menggunakan alat *hematology analyzer* (XP-300, Sysmex, Japan), data RBC dan PLT diambil sebagai hasil pengukuran dari metode referen (kontrol). Kemudian sebanyak 5 μ L darah ditambahkan 995 μ L larutan Safranin – PBS, hasil pengenceran dimasukkan kedalam kamar hitung improved Neubauer. Inkubasi selama 5 menit dalam cawan petri lembab, kemudian pengamatan dilakukan di bawah mikroskop (CX23, Olympus, Jepang) dengan perbesaran objektif 40 kali.

Analisis Statistik

Hasil diolah menggunakan statistik IBM SPSS untuk Windows versi 21.0 (IBM Corp., Armonk, USA). Uji perbedaan dilakukan dengan menggunakan uji Independent Sample T-test. Selain itu juga dilakukan uji regresi linier. Nilai-p < 0,05 ditetapkan untuk menentukan signifikansi statistik.

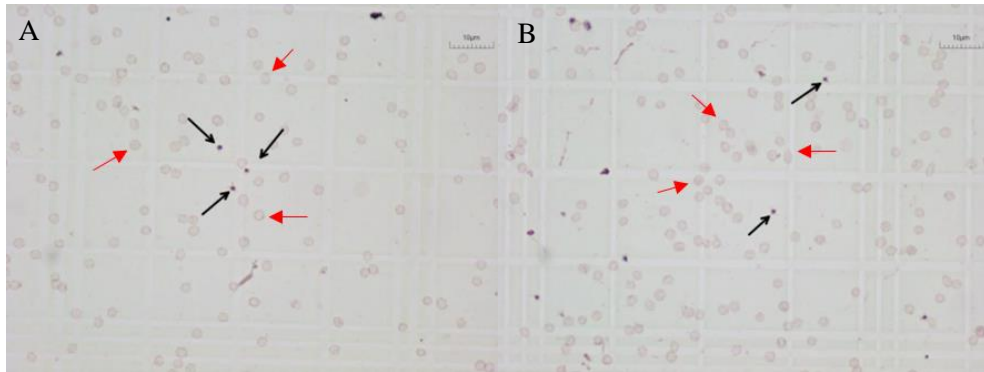
HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara keseluruhan, 10 responden berpartisipasi dalam penelitian ini. Rentang usia 21-22 tahun berpartisipasi dalam penelitian ini. Terdiri dari 7 responden perempuan dan 3 responden laki-laki. Seluruh responden dalam keadaan sehat.

Gambar 1 memperlihatkan pengamatan mikroskopik Safranin-PBS. Gambar latar pada penggunaan PBS pH 6,8 (Gambar 1A) tampak lebih merah dibandingkan PBS pH 7,0 (Gambar 1B). Gambaran sel baik eritrosit maupun trombosit pada kedua jenis pH sama tampak jelas, namun trombosit lebih terwarnai oleh safranin dengan baik. Eritrosit tampak merah pucat (panah merah) sedangkan trombosit tampak merah keunguan (panah hitam).

Safranin merupakan pewarna sederhana dengan muatan positif. Pewarnaan sederhana adalah larutan yang terdiri dari kromogen, yang merupakan molekul pewarna (seringkali merupakan turunan benzena), dan pelarut (biasanya air atau etanol). Sebagian besar sel mamalia dan bermuatan negatif pada membrannya, yang ditarik oleh noda basa bermuatan positif melalui pertukaran ion (Kosker, Aydin and Icoz, 2022).

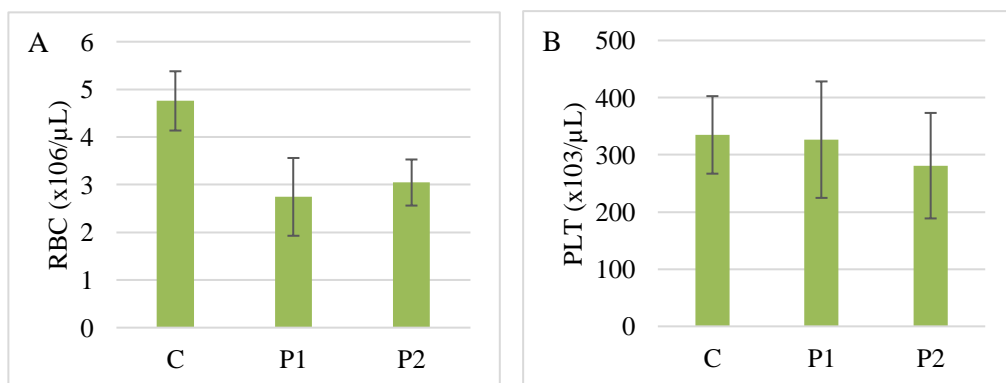
Pembentukan warna trombosit yang lebih jelas dapat disebabkan ultra struktur trombosit yang kompleks. Membran trombosit yang terdiri dari lapisan ganda fosfolipid, mengandung glikoprotein dan mengandung jaringan berbagai invaginasi ke bagian dalam trombosit. Organel sel trombosit tersusun dari berbagai macam granula seperti granula α , granula padat dan lisosom (Rumbaut and Thiagarajan, 2010). Warna trombosit dan tampilan granular pada mikroskop cahaya merupakan hasil dari butiran α , yang bersifat azurofilik dan menyusun sekitar 10% dari total volume trombosit (Williams and Sergent, 2022).



Gambar 1. Hasil pengamatan mikroskopik larutan Safranin-PBS perbesaran 400x. A) PBS pH 6,8. B) PBS pH 7,0. Panah hitam: trombosit, panah merah: eritrosit.

Kami melakukan uji komparasi untuk melihat perbedaan hasil RBC dan PLT terhadap metode referen. Gambar 2A memperlihatkan hasil pemeriksaan RBC menggunakan metode referen didapat $4,76 \pm 0,62 \times 10^6/\mu\text{L}$. Hasil yang RBC yang didapat menggunakan larutan Safranin – PBS pH 6,8 yaitu $2,74 \pm 0,82 \times 10^6/\mu\text{L}$ dan dinyatakan terdapat perbedaan signifikan dengan metode referen (nilai-p = 0,000), sedangkan larutan Safranin – PBS pH 7,0 yaitu $3,05 \pm 0,48 \times 10^6/\mu\text{L}$ dan dinyatakan terdapat perbedaan signifikan dengan metode referen (nilai-p = 0,000).

Gambar 2B memperlihatkan hasil pemeriksaan PLT menggunakan metode referen didapat $335 \pm 68 \times 10^3/\mu\text{L}$. Hasil yang PLT yang didapat menggunakan larutan Safranin – PBS pH 6,8 yaitu $327 \pm 102 \times 10^3/\mu\text{L}$ dan dinyatakan tidak ada perbedaan signifikan dengan metode referen (nilai-p = 0,833), sedangkan larutan Safranin – PBS pH 7,0 yaitu $281 \pm 92 \times 10^3/\mu\text{L}$ dan dinyatakan tidak ada perbedaan signifikan dengan metode referen (nilai-p = 0,156).

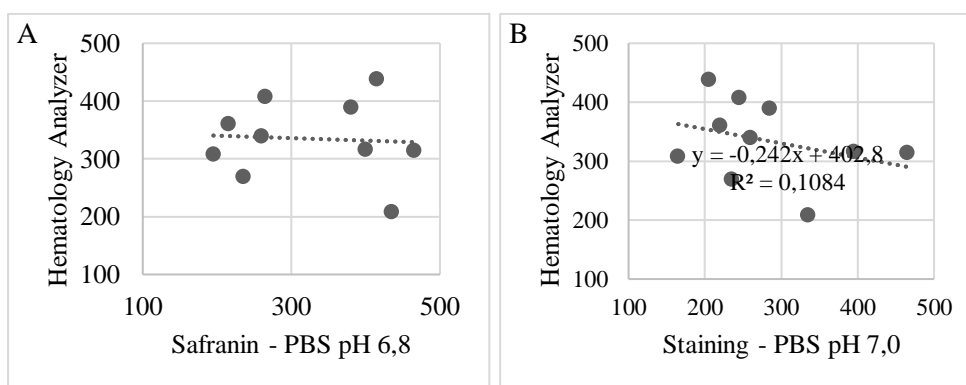


Gambar 2. Perbandingan hasil pemeriksaan hitung jumlah sel pada larutan Safranin – PBS pH 6,8 (P1) dan Safranin PBS pH 7,0 (P2) terhadap metode referen (C). A) Hasil pemeriksaan RBC. B) Hasil pemeriksaan PLT

Penggunaan Safranin – PBS pH 6,8 dan 7,0 mempengaruhi hasil pemeriksaan RBC tetapi tidak pada PLT. Hasil rerata pemeriksaan RBC pada pH 6,8 dan 7,0 dibawah nilai metode referen. Beberapa studi melaporkan bahwa pH mempengaruhi elastisitas membran eritrosit, pH 6,8 memberikan efek tertinggi perubahan elastisitas membran jika dibandingkan pH 7,0 (Yao and Zha, 2007). Kondisi pH

ideal eritrosit yaitu 7,4 sedangkan kondisi pH pada penelitian ini dibawah kondisi ideal pH eritrosit. Kondisi inilah yang menyebabkan eritrosit lisis dan menurunkan jumlah eritrosit pada formula Safranin – PBS (Evans *et al.*, 2013). Berbeda dengan RBC, PLT lebih tahan terhadap perubahan pH bahkan hingga bertahan pada rentang 7,7 hingga 6,5 (Mazda and Sasakawa, 1985; Mokhtar, Hashim and Joshi, 2016). Kondisi ini yang mengakibatkan tidak ada perbedaan jumlah PLT formula kami dengan metode referen.

Kami melakukan uji regresi linier pada pemeriksaan PLT untuk melihat kedekatan hasil pada pewarnaan formula kami dengan metode referen (Gambar 3). Persamaan regresi pada Safranin – PBS pH 6,8 didapat $Y = -0,0425x + 348,69$ dengan $r^2 = 0,0041$, berdasarkan persamaan tersebut dan Gambar 3A menunjukkan bahwa Safranin – PBS pH 6,8 tidak memiliki kemiripan dengan *hematology analyzer*. Persamaan regresi pada Safranin – PBS pH 7,0 didapat $Y = -0,242x + 402,8$ dengan $r^2 = 0,1084$, berdasarkan persamaan tersebut dan Gambar 3A menunjukkan bahwa Safranin – PBS pH 7,0 tidak memiliki kemiripan dengan *hematology analyzer*. Suatu metode dinyatakan mirip ketika persamaan mendekati $Y = 1X + 0$ dengan $r^2 = 1$.



Gambar 3. Hasil uji regresi formula Safranin – PBS terhadap *hematology analyzer*. A) pH 6,8. B) pH 7,0

KESIMPULAN DAN SARAN

Penggunaan Safranin – PBS pH 6,8 dan 7,0 untuk pemeriksaan RBC dan PLT belum bisa direkomendasikan karena adanya perbedaan hasil pada pemeriksaan RBC serta metode yang tidak sama dengan referen. Peningkatan pH dan pengamatan osmolaritas perlu menjadi perhatian agar bisa menjaga integritas sel agar tidak lisis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya atas dana hibah dalam penelitian ini. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada personal laboratorium hematologi Universitas Nahdlatul Ulama Surabaya atas bantuan teknisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulrahman, S. *et al.* (2020) ‘Pengaruh variasi konsentrasi ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) dan daun miana (*Coleus atropurpureus* Senth) sebagai zat pewarna alternatif pengganti safranin pada pewarnaan gram’, *Jurnal MediLab Mandala Waluya*, 4(I), pp. 1–7. Available at: <https://ejournal.umw.ac.id/medilab/article/view/96> (Accessed: 4 January 2024).
- Dirjen Pelayanan Kesehatan Kemenkes RI (2022) *Laporan Kinerja Direktorat Mutu Pelayanan Kesehatan Direktorat Jenderal Pelayanan Kesehatan*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Essawi, K. *et al.* (2023) ‘Comparative Analysis of Red Blood Cells, White Blood Cells, Platelet Count, and Indices in Type 2 Diabetes Mellitus Patients and Normal Controls: Association and Clinical Implications’, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. Dove Press, 16, p. 3123. doi: 10.2147/DMSO.S422373.
- Evans, B. C. *et al.* (2013) ‘Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs’, *Journal*

- of *Visualized Experiments : JoVE*. MyJoVE Corporation, (73), p. 50166. doi: 10.3791/50166.
- Hopkins, E., Sanvictores, T. and Sharma, S. (2022) 'Physiology, Acid Base Balance', *Urolithiasis*. StatPearls Publishing, pp. 19–22. doi: 10.1007/978-1-4899-0873-5_4.
- Kosker, F. B., Aydin, O. and Icoz, K. (2022) 'Simple Staining of Cells on a Chip', *Biosensors*. MDPI, 12(11), p. 1013. doi: 10.3390/BIOS12111013/S1.
- Mazda, T. and Sasakawa, S. (1985) 'The effects of pH and agitation on platelet preservation', *Transfusion*. Transfusion, 25(1), pp. 57–59. doi: 10.1046/J.1537-2995.1985.25185116505.X.
- Mokhtar, M. B., Hashim, H. B. and Joshi, S. R. (2016) 'Assessment of quality of platelets preserved in plasma and platelet additive solution: A Malaysian experience', *Asian Journal of Transfusion Science*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 10(1), p. 84. doi: 10.4103/0973-6247.172177.
- Mustafa, M. I. et al. (2024) 'Reference intervals of complete blood count parameters in the adult western Sudanese population', *BMC Research Notes*. BMC, 17(1). doi: 10.1186/S13104-024-06754-3.
- Nugraha, G. (2017) *Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar*. Ke-2. Jakarta: Trans Info Media.
- Nugraha, G. (2022) *Teknik Pengambilan dan Penanganan Spesimen Darah Vena Manusia untuk Penelitian*. Jakarta: LIPI Press.
- Nugraha, G. (2023) *Medical Laboratory Note*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nugraha, G. and Badrawi, I. (2018) *Pedoman Teknik Pemeriksaan Laboratorium Klinik untuk Mahasiswa Teknologi Laboratorium Medik*. Jakarta: Trans Info Media.
- Prapto, A. J. (2016) 'Perbandingan Hasil Pemeriksaan Hitung Jumlah Trombosit Metode Langsung (Rees Ecker), Metode Tidak Langsung (Fonio), dan Metode Otomatis (Hematologi Analyzer)', *Jurnal Medika : Karya Ilmiah Kesehatan*, 1(1), pp. 1–12. Available at: <https://jurnal.itkeswhs.ac.id/index.php/medika/article/view/34> (Accessed: 11 June 2024).
- Rivera, A. K. B. et al. (2023) 'Using complete blood count parameters in the diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in Filipino women', *Journal of Rural Medicine : JRM*. Japanese Association of Rural Medicine, 18(2), p. 79. doi: 10.2185/JRM.2022-047.
- Rumbaut, R. E. and Thiagarajan, P. (2010) 'General Characteristics of Platelets'. Morgan & Claypool Life Sciences. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53455/> (Accessed: 12 June 2024).
- Salman, Y., Nadia, N. and Wahidah, R. (2021) 'Perbedaan Hasil Hitung Jumlah Leukosit dengan Modifikasi Air Perasan Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia Swingle) dan Asam Cuka sebagai Pengganti Komposisi Larutan Turk', *Jurnal Kesehatan Indonesia*, 12(1), pp. 12–15. Available at: <https://journal.stikeshb.ac.id/index.php/jurkessia/article/view/559> (Accessed: 11 June 2024).
- Seo, I. H. and Lee, Y. J. (2022) 'Usefulness of Complete Blood Count (CBC) to Assess Cardiovascular and Metabolic Diseases in Clinical Settings: A Comprehensive Literature Review', *Biomedicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 10(11). doi: 10.3390/BIOMEDICINES10112697.
- Son, M. et al. (2021) 'Effects of osmolality and solutes on the morphology of red blood cells according to three-dimensional refractive index tomography', *PLoS ONE*. PLOS, 16(12). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0262106.
- Williams, O. and Sergent, S. R. (2022) 'Histology, Platelets', *StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557800/> (Accessed: 12 June 2024).
- Yao, C. C. and Zha, Z. (2007) 'Effects of incubation pH on the membrane deformation of a single living human red blood cell', *Current Applied Physics*. North-Holland, 7(SUPPL.1), pp. e11–e14. doi: 10.1016/J.CAP.2006.11.005.
- Zhang, Z. et al. (2020) 'A possible injectable tissue engineered nucleus pulposus constructed with platelet-rich plasma and ADSCs in vitro', *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. BMC, 15(1). doi: 10.1186/S13018-020-01840-1.