

MANUAL KETERAMPILAN
PENGAMBILAN DARAH TEPI, MEMBUAT APUSAN, PEWARNAAN GIEMSA DAN PEMERIKSAAN
MIKROSKOPIK APUSAN DARAH TEPI

Sitti Wahyuni, MD, PhD

Bagian Parasitologi Universitas Hasanuddin, sitiwahyunim@gmail.com

TINGKAT KOMPETENSI

- Penyakit infeksi tropis dengan gejala demam harus bisa didiagnosis oleh dokter umum melalui pemeriksaan laboratorium sederhana

AREA KOMPETENSI

- Keterampilan prosedur klinik
- Komunikasi efektif
- Profesionalisme

INDIKASI KLINIS

- Demam suspek malaria
- Demam suspek demam berdarah
- Malaise, lesu dan tinggal atau pernah tinggal didaerah endemik filaria/malaria

TUJUAN

Utama: Setelah selesai melaksanakan kegiatan ini, mahasiswa menjadi terampil dalam melakukan pengambilan darah tepi, membuat apusan, membuat pewarnaan Giemsa, melakukan pemeriksaan apusan darah menggunakan mikroskop, menentukan parasitemia

Tambahan: Setelah melakukan latihan ini, mahasiswa akan terampil dalam :

1. Mempersiapkan bahan dan alat.
2. Melakukan komunikasi efektif: Inform consent (memberi penjelasan), meminta persetujuan, menghormati hak, empati, memberikan edukasi.
3. Bersikap profesional: Melakukan kegiatan dengan mengikuti prosedur standar (good clinical/laboratory practice), termasuk bertindak aseptis.

DESKRIPSI KEGIATAN

Kegiatan	Waktu	Deskripsi
Pendahuluan	10 mnt	Instruktur menjelaskan tujuan dari kegiatan ini
Demonstrasi	20 mnt	<ol style="list-style-type: none"> 1. Seorang mahasiswa bertindak sebagai pasien 2. Instruktur memperlihatkan cara melakukan komunikasi dan bersikap profesional. 3. Instruktur memperlihatkan alat dan bahan beserta fungsinya 4. Instruktur memperlihatkan cara melakukan pengambilan darah tepi 5. Instruktur memperlihatkan cara membuat apusan darah tebal dan tipis 6. Instruktur memperlihatkan cara membuat pewarnaan giemsa 7. Instruktur memperlihatkan cara menggunakan mikroskop untuk identifikasi parasit dan menghitung intensitas infeksi 8. Mahasiswa diminta untuk menanyakan hal hal yang belum jelas sehubungan dengan kegiatan keterampilan ini
Praktek bermain peran dengan umpan Balik	70 mnt	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mahasiswa melakukan kegiatan seperti yang didemonstrasikan oleh instruktur 2. Instruktur berkeliling diantara mahasiswa dan melakukan supervisi dan mengoreksi hal hal yang belum sempurna

ALAT DAN BAHAN

- Umum
 - Meja kerja
 - Tempat sampah *biohazard*
 - Tempat sampah biasa
 - Sabun cuci tangan
 - Wastafel
 - Sarung tangan
 - Marker/spidol/stiker nama

- **Pengambilan darah**
 - Kapas alkohol
 - Lancet
 - Objek gelas 2 buah
- **Membuat pewarnaan giemsa**
 - Rak pencuci objek gelas
 - Air dalam botol
 - Giemsa 3% dalam larutan fosfat buffer saline
 - Larutan metanol
 - Pinset
 - Pipet
- **Pemeriksaan mikroskop**
 - Mikroskop
 - Minyak emersi
 - Pembersih lensa mikroskop
 - Alat hitung
 - Pulpen dan kertas

KEGIATAN

A. Persiapan pasien dan cara mengambil sampel darah tepi

Cara kerja:

1. Siapkan semua alat dan bahan
2. Jelaskan tujuan dan prosedur pemeriksaan, berikan jaminan kerahasiaan, minta persetujuan, dan beritahu hak untuk menolak.
3. Bersikap empati dan profesional
4. Dengan spidol tulis identitas pasien pada objek gelas
5. Pasang sarung tangan
6. Bersihkan jari manis atau jari tengah dengan kapas alkohol, biarkan mengering.
7. Tusuk jari yang telah bersih tersebut dengan lancet steril.
8. Tekan jari tersebut dengan lembut sampai keluar darah
9. Pada objek gelas yang sudah diberi identitas, teteskan darah pertama seukuran 5 mm, kira kira 1 cm dari identitas pasien. Teteskan lagi darah yang kedua kira kira 2 cm dari darah pertama
10. Tekan jari yang luka menggunakan kapas alkohol, jika diperlukan tutup dengan plester

B. Membuat apusan darah tipis dan darah tebal pada sampel darah tepi

1. Letakkan objek gelas berisi darah dengan posisi mendatar diatas meja/permukaan yang datar, tegak lurus terhadap badan pemeriksa.
2. Letakkan ujung jari telunjuk kiri diatas tanda identitas pasien untuk memfiksasi objek gelas diatas meja
3. Dengan tangan kanan, letakkan objek gelas pendorong diatas tetesan darah kedua, Buat sudut 45 derajat antara objek gelas yang berisi tetesan darah dan objek gelas pendorong.
4. Biarkan darah menyebar keseluruh ujung gelas pendorong
5. Tarik gelas pendorong ke arah pemeriksa kira kira 5 mm, kemudian dorong kearah depan dengan tetap mempertahankan sudut 45 derajat dan tidak pernah terlepas dari objek gelas yang berisi tetesan darah
6. Apusan yang baik adalah apusan berbentuk lidah, rata dan makin mengecil diujung
7. Biarkan apusan ini mengering dalam suhu kamar.
8. Apusan darah tipis dapat digunakan untuk:
 - Identifikasi plasmodium dan menentukan spesies
 - Melihat sel dan morfologi sel yang terdapat dalam darah misalnya untuk melihat anemia mikrositik hipokrom akibat infestasi cacing tambang.
 - Menghitung jumlah trombosit pada pasien DHF
9. Untuk apusan darah tebal, gunakan salah satu ujung gelas pendorong untuk menyebarkan darah
10. Ukuran apusan darah tebal kira kira 1.5-2 cm.
11. Apusan darah tebal dapat digunakan untuk:
 - Identifikasi plasmodium
 - Menghitung derajat parasitemia/ML darah
 - Identifikasi cacing filaria

C. Membuat pewarnaan giemsa

1. Letakkan objek gelas berisi apusan darah yang sudah mengering diatas rak objek gelas.
2. Celup apusan darah tipis kedalam larutan metanol untuk memfiksasi eritrosit, hati hati jangan sampai apusan darah tebal ikut terfiksasi. Biarkan mengering.
3. Teteskan air keatas apusan darah tebal untuk hemolisis eritrosit, biarkan selama 15 menit.
4. Tetesi kedua objek gelas dengan larutan giemsa 3% dan biarkan selama 30 menit.
5. Siram dengan air mengalir sampai bersih.
6. Setelah bersih letakkan dalam keadaan miring dan biarkan mengering.

D. Identifikasi parasit dengan mikroskop

- Lihat kaca objek dengan lensa objektif 10 kali.

- Jika sudah fokus, tetes preparat dengan satu tetes minyak emersi
- Ganti lensa dengan lensa objektif 100 kali dan putarlah mikrometer sampai fokus dimana akan nampak tampak latar belakang yang bersih dan
- Lakukan pemeriksaan pada 100 lapangan pandang dan catatlah apa yang ditemukan
- Untuk mencegah pemeriksaan dilakukan pada 2x pada lapangan pandang yang sama, lakukan pemeriksaa dengan metode zig zag.
- Untuk menyatakan negatif, pemeriksaan apusan darah dilakukan sebanyak 3 dengan rentang waktu minimal 6 jam

- **Identitas Plasmodium pada apusan darah tipis**
 - Eritrosit normal berwarna abu-abu pucat agak ungu
 - Neutrophil berwarna sama tapi engan inti ungu tua dan mempunyai granula pada sitoplasmanya.
 - Plasmodium terletak didalam erithrocyt.
 - Plasmodium akan tampak dengan chromatin berwarna merah dan sitoplasma berwarna ungu pucat kebiruan.
 - Eritrocyt yang mengandung plasmodium akan berbeda bentuk dan ukurannya dengan eritrosit normal.
 - Chromatin dari Plasmodium berwarna ungu kemerahan dengan sitoplasma ungu-biru.
 - Bintik Schiiffner's terlihat pada erythrocytes yang mengandung *P. vivax* atau *P. Ovale*
 - Bintik Maurer terlihat pada erythrocytes yang mengandung cincin besar *P. falciparum*.
 - Bintik Schuffner's ditemukan pada *P.vivax* dan *P.ovale*.
 - Lakukan pemeriksaan pada 100 lapangan pandang dan catatlah apa yang ditemukan

- **Identitas Plasmodium pada apusan darah tebal**
(Eritrosit sudah lisis sehingga sel darah merah tidak tampak lagi)
 - Plasmodium akan tampak dengan chromatin berwarna merah dan sitoplasma berwarna ungu pucat kebiruan.
 - Bedakan dengan lekosit (netrofil, basofil, monosit, eosinofil)
 - Lakukan pemeriksaan pada 100 lapangan pandang dan catatlah apa yang ditemukan
 - Catatan: Cacing filarial tampak memanjang, dengan bintik bintik berwarna biru tua (nuclear column) didalamnya. Tampak salah satu ujung filarial yang diliputi sarung (sheat).

E. Menghitung intensitas infeksi (parasitemia)

Dilakukan hanya jika dalam darah ditemukan Plasmodium

Tujuan:

1. Menentukan derajat infeksi
 2. Menentukan kemajuan pengobatan
 3. Menentukan resistensi obat
- **Metode 1: Dibandingkan dengan jumlah leukosit**
 - Menggunakan apusan darah tebal
 - Dihitung dengan cara menghitung Plasmodium/ 200 leukosit
 - Dalam satu lapangan pandang hitung jumlah jumlah leukosit, lalu hitung jumlah Plasmodium lalu catat
 - Pindah ke lapangan pandang berikutnya berikutnya hingga total leukosit mencapai 200
 - Jumlah Plasmodium kemudian dibagi 200 lalu dikali 8000 (Catatan: jumlah leukosit dalam 1 ml darah adalah 6000-10000, rata rata 8000)Nilai yang didapatkan adalah jumlah Plasmodium/ml darah

Lapangan pandang	Jumlah Plasmodium	Jumlah leukosit
1	0	12
2	2	23
3	0	21
4	0	11
5	0	16
6	1	21
7	0	14
8	2	19
9	1	18
10	0	22
11	0	12
12	0	11
Total	6	200

- Jika ditemukan 6 Plasmodium dalam 200 leukosit, maka intensitas infeksi adalah $6/200 \times 8000 = 240$ Plasmodium /ml darah
- **Metode 2: Perhitungan intensitas infeksi secara semi kuantitatif**
 - Menggunakan apusan darah tebal atau tipis

- +++++ = >10 Plasmodium/ lapangan pandang
- ++++ = < 10 Plasmodium/ lapangan pandang
- +++ = 1-10 Plasmodium/10 lapangan pandang
- ++ = <1 Plasmodium/10 lapangan pandang
- **Metode 3: Dibandingkan dengan jumlah eritrosit**
 - Menggunakan apusan darah tipis
 - Jika menemukan area dimana terdapat eritrosit yang terinfeksi Plasmodium, identifikasi area tersebut.
 - Hitunglah jumlah eritrosit di area tersebut (yang terinfeksi dan yang sehat) sehingga jumlahnya menjadi 1000.
 - Diantara 1000 eritrosit tersebut, hitung jumlah eritrosit yang terinfeksi
 - Parasitemia dinyatakan dalam bentuk jumlah eritrosit yang terinfeksi/1000 eritrosit x 100%.
 - Contoh: Jika ada 1 eritrosit yang terinfeksi dalam 1000 eritrosit maka hasilnya dinyatakan sebagai $1/1000 \times 100\% = 0.1\%$
 - Interpretasi
 - < 0.2% = parasitemia ringan
 - 0.2-2 % = parasitemia sedang
 - 2% = hiperparasitemia/parasitemia berat
- **Metode 4: Menghitung secara kuantitatif**
 - Menggunakan apusan darah tebal
 - Ambillah sejumlah 1 ul darah menggunakan tabung kapiler
 - Teteskan darah kapiler diatas objek gelas dan buat apusan darah tebal dengan pewarnaan Giemsa
 - Dalam 1 ul darah periksa 100 lapangan pandang (0.25 ul).
 - Jika dalam 100 lapangan pandang ditemukan 10 Plasmodium, maka derajat parasitemianya adalah $10 \times 4 = 40$ Plasmodium / 1 ul darah
 - Interpretasi
 - < 10.000 = Infeksi ringan
 - 10.000-100.000 = infeksi sedang
 - >100.000 = infeksi berat (hiperparasitemia)

Kepustakaan

- WHO. Basic laboratory methods in medical parasitology.
http://whqlibdoc.who.int/publications/9241544104_%28part2%29.pdf