

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Leukosit

Sel darah putih, yang dikenal sebagai leukosit, melindungi tubuh dari infeksi dan berpartisipasi dalam respons imun. Dalam keadaan normal, terdapat lima jenis leukosit dalam darah. Tiga diantaranya disebut granulosit, karena sitoplasmanya mengandung granul; berdasarkan warna granul pada pewarnaan sediaan apus darah tepi, sel-sel ini dapat dibagi menjadi neutrofil (granul ungu kecil), eosinofil (granul jingga besar) dan basofil (granul ungu tua besar). Ketiganya memiliki inti berlobus atau polimorfik sehingga dikenal dengan sebagai leukosit polimorfonuklear atau 'polimorf'. Granulosit terutama berfugsi di jaringan daripada di dalam aliran darah. Sel-sel ini dapat mencapai jaringan dengan migrasi menembus endotel kapiler (Bain, 2010).

a. Jenis-Jenis Leukosit

Leukosit terdiri dari 2 kategori yaitu granulosit dan agranulosit.

- 1) Granulosit, yaitu sel darah putih yang di dalam sitoplasmanya terdapat granula granula. Granula-granula ini mempunyai perbedaan kemampuan mengikat warna misalnya pada eosinofil

mempunyai granula berwarna merah terang, basofil berwarna biru dan neutrofil berwarna ungu pucat.

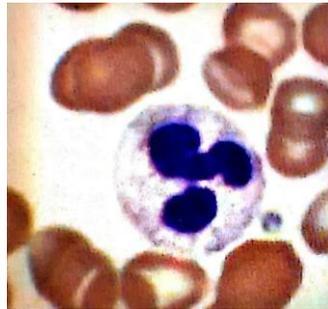
- 2) Agranulosit, merupakan bagian dari sel darah putih dimana mempunyai inti sel satu lobus dan sitoplasmanya tidak bergranula. Leukosit yang termasuk agranulosit adalah limfosit, dan monosit (Tarwoto, 2007).

Dalam keadaan normal leukosit yang dapat dijumpai menurut ukuran yang telah dibakukan adalah basofil, eosinofil, neutrofil, limfosit dan monosit (Mansyur, 2015).

1) Neutrofil

Neutrofil hanya berada dalam sirkulasi sekitar 7 jam. Neutrofil adalah sel fagosit yang berespons terhadap rangsangan kemotaksis dengan bermigrasi ke lokasi-lokasi infeksi, inflamasi atau kematian sel. Prosesnya adalah menggelinding sepanjang endotel, melekat ke reseptor endotel spesifik, berjalan menembus dinding kapiler (diapedesis) dan bermigrasi melewati jaringan sebagai respons terhadap zat kemotaksin. Neutrofil menelan bakteri dan material asing lain di jaringan dengan proses yang disebut fagositosis. Proses ini melibatkan jala-jala pseudopodia di sekitar partikel yang diikuti oleh penyatuan sehingga bakteri atau partikel asing terperangkap di dalam vakuola fagositik di dalam sitoplasma. Granula neutrofil (yang mengandung enzim proteolitik dan mieloperoksidase) akan dilepaskan ke vakuola fagosit, tempat

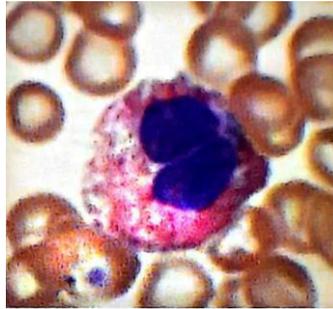
pembentukan H_2O_2 dan oksigen reaktif lainnya. Hasil akhirnya adalah mikroba terbunuh dan terjadi proteolisis fagosom. Neutrofil menghabiskan waktu sekitar 30 jam di jaringan (Bain, 2010).



Gambar 1. Neutrofil
Sumber: Bain, 2010.

2) Eosinofil

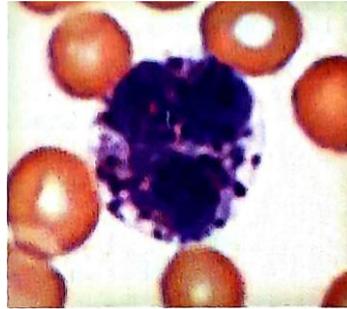
Sel-sel ini mirip dengan neutrofil, kecuali granula sitoplasmanya lebih kasar dan lebih merah dan jarang terdapat lebih dari tiga lobus inti. Mielosit eosinofil dapat dikenali tetapi stadium yang lebih dini tidak dapat dibedakan dengan prekursor neutrofil. Masa singgah eosinofil dalam darah lebih panjang dibanding neutrofil. Sel-sel ini memasuki eksudat radang dan mempunyai peran khusus dalam respon alergi, pertahanan terhadap parasit dan pembuangan fibrin yang terbentuk selama peradangan (Hoffbrand dan Moss, 2011).



Gambar 2. Eosinofil
Sumber: Bain, 2010.

3) Basofil

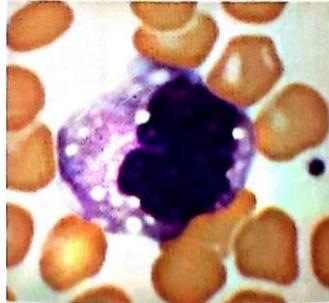
Sel ini hanya kadang-kadang ditemukan dalam darah tepi normal. Basofil mempunyai banyak granula sitoplasma yang gelap yang menutupi inti dan mengandung heparin dan histamin. Dalam jaringan basofil menjadi sel mast. Basofil mempunyai lokasi pengikatan imunoglobulin E (IgE) DNA degranulasinya disertai dengan pelepasan histamin. Sebelum pindah ke dalam jaringan tempat mereka melaksanakan fungsi fagositnya. Dalam aliran darah terdapat dua kumpulan yang biasanya hampir sama besar: kumpulan yang bersirkulasi ("*circulating pool*", termasuk dalam hitung sel darah) dan kumpulan yang menepi ("*marginating pool*", tidak termasuk dalam hitung sel darah). Sel-sel ini bertahan sekitar 4-5 hari dalam jaringan sebelum dihancurkan selama tindakan pertahanan atau sebagai akibat penuaan (Hoffbrand dan Moss, 2011).



Gambar 3. Basofil
Sumber: Bain, 2010.

4) Monosit

Sel ini biasanya lebih besar daripada leukosit darah tepi lainnya dan mempunyai inti sentral yang besar dan berbentuk lonjong atau melekuk dengan kromatin yang menggumpal. Sitoplasmanya yang banyak tepulas biru dan mengandung banyak vakuol halus, memberikan gambaran kaca yang diasah. Granula sitoplasma sering kali juga ada. Prekursor monosit dalam sumsum tulang (monoblas dan promonosit) sulit dibedakan dengan mieloblas dan monosit. Monosit hanya menghabiskan waktu yang singkat dalam sumsum tulang dan setelah bersirkulasi selama 20-40 jam, meninggalkan darah untuk memasuki jaringan tempat mereka mengalami pematangan dan menjalankan fungsi utamanya. Jangka hidup ekstravaskular monosit setelah transformasinya menjadi makrofag (histiosit) dapat mencapai beberapa bulan atau bahkan tahunan. Sel ini dapat mempunyai fungsi spesifik di jaringan yang berbeda (misal kulit, usus, hati). Salah satu galur yang sangat penting adalah sel dendritik yang terlibat dalam presentasi antigen kepada sel T (Hoffbrand dan Moss, 2011).



Gambar 4. Monosit
Sumber: Bain, 2010.

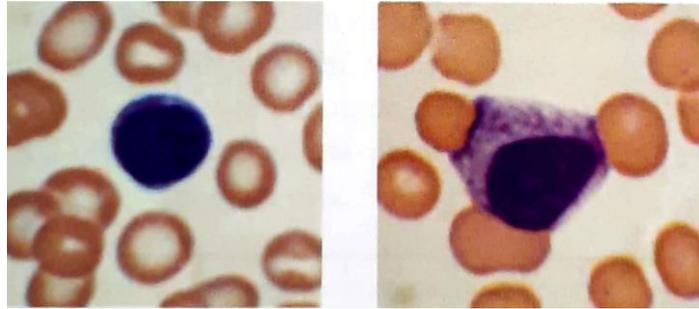
5) Limfosit

Limfosit sel yang lebih kecil daripada granulosit dan memiliki nukleus bulat. Sebagian kecil diantaranya memiliki sedikit granula sitoplasma. Limfosit dalam sirkulasi kelihatan sangat mirip satu sama lain, tetapi terdiri dari tiga galur, yaitu sel B, sel T dan sel pembunuh alamiah (*natural killer/NK*). Sel B berasal dari sumsum tulang. Sel ini bermigrasi dari aliran darah ke kelenjar limfe atau jaringan limfoid lain, tempat mereka terpajan terhadap antigen yang disodorkan kepadanya oleh sel dendritik (sel penyaji antigen/ *antigen-presenting cells*). Limfosit keluar dari aliran darah melalui vena berendotel tinggi di kelenjar limfe dan vena pasca-kapiler di jaringan limfoid lain. Pajanan terhadap antigen menyebabkan mutasi somatik sehingga bertahan terus dan dimatangkan limfosit yang sangat mampu mengenali antigen menjadi sel B memori dan sel plasma yang menyekresi antibodi, yang penting dalam imunitas humoral.

Sel T juga berasal dari sumsum tulang, tetapi mengalami pematangan di timus. Setelah pematangan di timus, limfosit ini

bermigrasi ke kelenjar limfe dan ke jaringan limfoid lain. Terdapat bermacam-macam sel T. Beberapa berfungsi pada respons imun yang dimediasi oleh sel, dengan mengikat dan merusak sel-sel atau mikroorganisme yang diselaputi antibodi (sel T sitotoksik). Sel T juga mengatur fungsi sel B, dengan berperan sebagai sel pembantu atau sel penekan; mengaktifkan makrofag; serta menarik dan mengaktifkan neutrofil. Beberapa sel menyerupai sel NK yang mempunyai efek sitotoksik tanpa perlu mengenali antigen. Ada juga turunan sel T yang memiliki fungsi pengaturan, termasuk menjaga toleransi imun.

Sel NK merupakan bagian dari respons imun alamiah tubuh, yang mampu melawan sel kanker dan sel asing, meskipun sel-sel tersebut tidak terbungkus oleh antibodi. Limfosit yang mengandung granula adalah sel NK atau sel T sitotoksik. Dengan kata lain, tidak mungkin dapat dibedakan sel T dari sel B, dari gambaran di sediaan apus darah tepi. Limfosit menjalani sirkulasi ulang antara sistem limfatik dan aliran darah. Sel darah putih ini memerlukan waktu yang berbeda-beda selama periode sirkulasi tersebut. Ketahanan hidup limfosit sangat bervariasi tetapi, pada beberapa kasus, limfosit dapat bertahan bertahun-tahun (Bain, 2010).



(a) Limfosit Kecil

(b) Limfosit Granular Besar

Gambar 5. (a) Limfosit Kecil;

(b) Limfosit Granular Besar

Sumber: Bain, 2010.

b. Hemopoiesis Leukosit

1) Seri granulosit

a) Mieloblast

Mieloblast adalah sel termuda pada seri granulosit. Sel ini memiliki inti bulat berwarna biru kemerah-merahan, dengan satu atau lebih anak inti, kromatin inti halus dan tidak menggumpal. Sitoplasma berwarna biru dan sekitar inti berwarna lebih muda.. Mieloblast berukuran lebih kecil daripada rubriblast dan sitoplasmanya berwarna lebih muda dibandingkan rubriblast. Jumlah normal dalam sumsum tulang adalah <math><1\%</math> dari jumlah sel berinti.

b) Promielosit

Promielosit memiliki granula berwarna biru tua / biru kemerah-merahan, bentuk bulat dan tidak teratur. Granula sering tampak menutupi inti. Granula ini terdiri dari lisozom yang mengandung mieloperoksidase, fosfatase asam, protease dan lisozim. Inti promielosit biasanya bulat dan besar dengan

struktur kromatin kasar. Anak inti masih ada tetapi biasanya tidak jelas. Jumlah sel ini dalam sumsum tulang normal adalah 1-5 %.

c) Mielosit

Mielosit granula sudah menunjukkan diferensiasi yaitu telah mengandung laktoferin, lisozim peroksidase dan fosfatase lindi. Inti sel mungkin bulat atau lonjong atau mendatar pada satu sisi, tidak tampak anak inti, sedangkan kromatin menebal. Sitoplasma sel lebih banyak dibandingkan dengan promielosit. Jumlahnya dalam keadaan normal adalah 2-10 %.

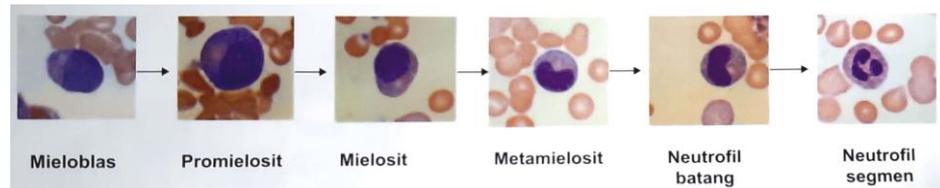
d) Metamielosit

Metamielosit memiliki inti sel membentuk lekukan sehingga sel berbentuk seperti kacang merah, kromatin menggumpal walaupun tidak terlalu padat. Sitoplasma mengandung granula kecil berwarna kemerah-merahan. Sel ini dalam keadaan normal tetap berada dalam sumsum tulang dengan jumlah 5-15 %.

e) Neutrofil Batang dan Segmen

Metamielosit menjadi batang apabila lekukan pada inti melebihi setengah ukuran inti yang bulat sehingga berbentuk seperti batang yang lengkung. Inti menunjukkan proses degeneratif, kadang-kadang tampak piknotik pada kedua ujung inti. Sitoplasma mengandung granula halus berwarna kemerah

merahan. Dalam darah tepi ditemukan hanya 2-6% dari sel-sel leukosit normal. Selanjutnya sel ini menjadi neutrofil segmen. Dalam sumsum tulang normal sel ini merupakan 10-40% dari sel berinti.



Gambar 6. Tahapan Pematangan Granulosit Menjadi Sel Matang
Sumber: Bain, 2010.

2) Seri Limfosit

a) Limfoblast dan Prolimfosit

Limfoblast memiliki inti bulat berukuran besar dengan satu atau beberapa anak inti, kromatin inti tipis rata dan tidak menggumpal. Sitoplasma sedikit dan berwarna biru. Prolimfosit menunjukkan kromatin lebih kasar tetapi belum menggumpal seperti limfosit. Kadang-kadang sulit membedakan limfoblast dari limfosit dan pada keadaan ragu-ragu dianjurkan untuk menganggap sel itu sebagai limfosit.

b) Limfosit

Ada yang besar (limfosit besar), ada yang sedang (limfosit sedang), ada yang kecil (limfosit kecil). Inti sel, letaknya dalam sel eksentrik, bentuk inti oval / bulat dan relatif besar, warna inti biru gelap, kromatin kompak memadat, membran inti kurang jelas terlihat, butir inti (*nucleoli*) tidak ada,

sitoplasma, luasnya/lebarnya relatif sempit, warna sitoplasma *oxyphil*, *perinuklear zone* umumnya tidak ada, granula dalam sitoplasma tidak ada. Jika terdapat granula maka disebut granula *azurophil*.

3) Seri Monosit

a) Monoblast dan Promonosit

Monoblast dan promonosit dalam keadaan normal sulit dikenal atau dibedakan dari mieloblast dalam sumsum tulang, tetapi pada keadaan abnormal misalnya pada proliferasi berlebihan sel seri ini, monoblast dan promonosit dapat dikenali dari intinya yang memperlihatkan lekukan terlipat atau menyerupai gambaran otak dan sitoplasma dengan pseudopodia.

b) Monosit

Inti sel letaknya dalam sel eksentrik. Bentuk inti menyerupai otak (*brain like form*), warna inti kemerah-merahan/keunguan, kromatin tersusun lebih kasar, butir inti (*nucleoli*) tidak ada, sitoplasma, luasnya/lebarnya relatif lebih besar kadang kadang ada pseudopodia, warna sitoplasma biru pucat, *perinuklear zone* tidak ada, terkadang terdapat granula *azurophil* dalam sitoplasma.

4) Seri Plasmosit

Sel Plasma (Plasmosit) mempunyai hubungan erat dengan limfosit. Sel pelopor plasmosit maupun limfosit terdapat dalam jaringan limfoid dan keduanya merupakan unsur penting dalam sistem imun tubuh. Akibat stimulasi antigen, sel limfosit B mengalami transformasi blast dan membentuk sel plasma yang memproduksi immunoglobulin. Plasmosit dijumpai dengan jumlah sekitar 1 % dari sel berinti dalam sumsum tulang. Dalam keadaan normal plasmablast dan proplasmosit tidak dapat dijumpai dalam sumsum tulang tetapi tampak pada keadaan-keadaan tertentu yang disertai proliferasi berlebih dan juga peningkatan produksi immunoglobulin. Ukuran, bentuk dan struktur plasmablast sulit dibedakan dari blast yang lain, tetapi hanya satu cara yang dapat dipakai untuk membedakan plasmosit dari seri blast yang lain, yaitu bentuk inti yang eksentrik dan adanya bagian zona jernih melingkar (halo) disekitar inti (Sanjaya, 2013).

2. Antikoagulan

a. Pengertian antikoagulan

Antikoagulan adalah zat yang dapat mencegah pembekuan darah dengan cara mengikat (khelasi) atau mengendapkan (presipitasi) kalsium, atau dengan cara menghambat pembentukan trombin yang

diperlukan untuk mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin dalam proses pembekuan (Riswanto, 2013).

b. Antikoagulan EDTA

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) adalah antikoagulan terkenal sejak awal 1950-an dan memiliki keunggulan tertentu dibandingkan antikoagulan lainnya (Gordan dan Larson, 1955). Antikoagulan EDTA biasanya tersedia dalam bentuk garam sodium (natrium) atau potassium (kalium), mencegah koagulasi dengan cara mengikat atau mengkhelasi kalsium (Ca^{2+}) dalam darah (Riswanto, 2013).

Antikoagulan EDTA memiliki keunggulan dibanding dengan antikoagulan yang lain, yaitu tidak mempengaruhi sel-sel darah, sehingga ideal untuk kebanyakan pengujian hematologi, seperti penentuan kadar hemoglobin, penentuan hematokrit, hitung sel darah (leukosit, eritrosit, trombosit, retikulosit, eosinofil), penentuan KED (Kecepatan Enap Darah), pembuatan hapusan darah dan penentuan golongan darah (Riswanto, 2013).

Antikoagulan EDTA yang digunakan dalam praktik laboratorium ada 3 macam, yaitu

1) *Disodium Ethylenediaminetetraacetic acid* (Na_2EDTA)

Antikoagulan Na_2EDTA memiliki bentuk serbuk dan masih banyak digunakan dengan dibuat larutan 10% (Narayan, 2000). Takaran Na_2EDTA yang direkomendasikan adalah 1,4-2,0 mg/ml

darah (CLSI-H1-A5, 2003). Na₂EDTA bila tercampur darah akan menunjukkan pH $5,0 \pm 1,0$. Jenis antikoagulan ini biasa disebut dengan EDTA konvensional karena tidak tersedia dalam bentuk komersial atau tabung vacutainer. Ketepatan takaran dan volume Na₂EDTA bergantung pada keterampilan, ketelitian dan pengalaman petugas laboratorium (Wirawan, 2002). Penggunaan konsentrasi Na₂EDTA yang berlebihan pada preparasi spesimen darah menyebabkan perubahan profil leukosit sesuai peningkatan konsentrasinya (Sukorini, dkk., 2007).

2) *Dipotassium Ethylenediaminetetraacetic acid* (K₂EDTA)

Antikoagulan K₂EDTA biasanya digunakan dalam bentuk kering. Dari ketiga jenis EDTA tersebut, K₂EDTA adalah yang paling baik dan dianjurkan oleh ICSH (*International Council for Standardization in Hematology*) dan CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (Riswanto, 2013). K₂EDTA konsentrasi 1,5-2,2 mg / ml darah menunjukkan efek *chelating* kalsium yang maksimal (CLSI-H1-A5, 2003). Meskipun K₂EDTA, K₃EDTA dan Na₂EDTA adalah antikoagulan yang kuat dan diperbolehkan oleh WHO, namun Na₂EDTA kurang larut dengan darah. Sedangkan K₃EDTA menyebabkan sedikit pengenceran pada sampel darah (Gupta, dkk., 2014). Pemakaian antikoagulan ini sebesar 1 mg K₂EDTA untuk 1 ml darah (Riswanto, 2013).

K₂EDTA bila tercampur darah akan menunjukkan pH $4,8 \pm 1,0$ (Wirawan, 2002).

3) *Tripotassium Ethylenediaminetetraacetic acid* (K₃EDTA).

Antikoagulan K₃EDTA biasanya digunakan dalam bentuk cair. K₃EDTA dalam bentuk cair menyebabkan pengenceran sampel sekitar 1-2% dari darah (Alan, 2006). Sehingga dapat mempengaruhi nilai hemoglobin, hitung eritrosit, leukosit, trombosit dan nilai hematokrit (Kiswari, 2014). Sedangkan *The United States by the Clinical and Laboratory Standards Institute (the National Committee for Clinical Laboratory Standards, or NCCLS)* merekomendasikan jenis antikoagulan K₃EDTA yang sudah didispensikan dalam bentuk cairan (Lewis, 2006 dalam Tahono, dkk., 2012). Konsentrasi K₃EDTA dengan konsentrasi 1,5-2,2 mg / ml darah dalam bentuk cair dapat meningkatkan aktivitas antikoagulan (CLSI-H1-A5, 2003). K₃EDTA bila tercampur darah akan menunjukkan pH $7,5 \pm 1,0$ (Wirawan, 2002). K₃EDTA memiliki stabilitas lebih baik karena pH-nya mendekati pH darah (Wirawan, 2004). Kelebihan K₃EDTA menyebabkan kerusakan membran sel leukosit dan penurunan tajam jumlah leukosit (kurang dari 50% dari nilai asli, 24 jam setelah pengumpulan material) (Lewis dan Stoddart, 1971; Goossens, dkk., 1991).

Apabila jumlah EDTA kurang dari ukuran yang dibutuhkan, darah dapat mengalami pembekuan. Sebaliknya, apabila EDTA berlebihan, eritrosit mengalami krenasi, trombosit membesar dan mengalami disintegrasi. Darah EDTA harus segera dicampur setelah pengambilan untuk menghindari pengelompokan trombosit dan pembentukan bekuan. Percampuran dilakukan dengan membolak-balikkan tabung 8-10 kali dan dilakukan dengan lembut untuk mencegah hemolisis. Tabung EDTA tersedia dalam bentuk tabung hampa udara (*vacutainer tube*) dengan tutup lavender (*purple*) (Riswanto, 2013).

Pemeriksaan darah EDTA sebaiknya dilakukan segera, apabila terpaksa dilakukan penundaan dapat disimpan dalam lemari es (4°C) selama 24 jam. Hasil pemeriksaan tidak ada penyimpangan bermakna, kecuali untuk jumlah trombosit dan nilai hematokrit (Gandasoebrata, 2010).

3. Hitung Jumlah Leukosit

Hitung leukosit menyatakan jumlah leukosit per liter darah (System International Units = SI Units) atau per milimeterkubik atau mikroliter (Unit konvensional). Leukosit atau sel darah putih adalah sel yang berinti dengan ukuran 9-20 μm ; jumlahnya sekitar 4,0-11,0 ribu/ mm^3 darah. Tempat pembentukannya di sumsum tulang dan jaringan limfatik. Leukosit berasal dari satu sel bakal (*stem cell*) dan kemudian mengalami diferensiasi (mengalami pematangan). Leukosit diangkut oleh darah ke

berbagai jaringan tubuh tempat sel-sel tersebut melakukan fungsi fisiologiknya.

Presentasi dari sel-sel ini dapat memberikan informasi mengenai berbagai keadaan penyakit. Jumlah absolut dari berbagai jenis sel-sel ini dapat memberikan petunjuk apakah terdapat penyakit sumsum tulang primer, atau apakah kelainan merupakan suatu reaksi terhadap proses penyakit sekunder.

Tabel 1. Nilai Rujukan Hitung Jumlah Leukosit

No	Usia	Nilai Rujukan (sel/ μ l)
1.	Dewasa	4.000 – 11.000/ μ l
2.	Neonatus (bayi baru lahir)	10.000 – 26.000/ μ l
3.	Anak usia 1 tahun	6.000 – 18.000/ μ l
4.	Anak usia 4-7 tahun	5.000 – 15.000/ μ l
5.	Anak usia 8-12 tahun	4.500 – 13.500/ μ l

Sumber: Riswanto, 2013.

Kenaikan jumlah leukosit (leukositosis) dapat dijumpai misalnya pada infeksi, reaksi leukemoid, nekrosis jaringan (infark miokardial, sirosis hati, luka bakar, kanker organ, emfisema, ulkus peptikum), penyakit kolagen, penyakit parasitik, stress (pembedahan, demam, kekacauan emosional yang berlangsung lama), keadaan fisiologik (misal latihan jasmani berat, akhir kehamilan, waktu partus, neonatus) dll. Pengaruh obat: aspirin, heparin, digitali, epinefrin, litium, histamine, antibiotik (ampisilin, eritromisin, kanamisin, metisilin, tetrasiklin, vankomisin, streptomisin), senyawa emas, prokainamid (Pronestyl), triamteren (Dyrenium), alopurinol, kalium iodide, derivative hidantoin, sulfonamide (aksi lama).

Penurunan jumlah leukosit (leukopenia) dapat dijumpai misalnya pada penyakit hematopoietik (anemia aplastik, anemia pernisiiosa, hipersplenisme, penyakit Gaucher), infeksi virus, malaria, agranulositosis, alkoholisme, systemic lupus erythematosus (SLE), demam tifoid, iradiasi, malnutrisi. Pengaruh obat: penisilin, sefalotin, kloranfenikol, asetaminofen (Tylenol), sulfonamide, propiltiourasil, barbiturate, obat anti kanker, diazepam (Valium), diuretik (furosemid [Lasix], asam etakrinat [Edecrin]), klordiazepoksid (Librium), agens hipoglikemik oral, indometasin (Indocin), metildopa (Aldomet), rifampin, fenotiazin (Riswanto, 2013).

Bila pemakaian antikoagulan EDTA berlebihan baik Na_2EDTA maupun K_3EDTA menyebabkan perubahan pada morfologi neutrofil, seperti pembengkakan, hilangnya lobus neutrofil dan sel akan mengalami disintegrasi yang dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit (Wirawan, 2004; Narayan, 2000; England, dkk., 1993).

4. Hitung Diferensial Leukosit

Hitung diferensial leukosit menentukan jumlah relatif atau presentase dari berbagai populasi leukosit yang ada dalam darah yang dapat memberikan informasi mengenai berbagai keadaan penyakit. hitung diferensial leukosit ini seringkali diabaikan bila jumlah leukosit dalam darah adalah normal dan tidak ada kelainan hematologik, baik klinik maupun laboratoris. Namun demikian, banyak kelainan seperti keganasan, inflamasi dan kelainan imunologik dapat menyebabkan perubahan presentase ini, walaupun jumlah leukosit masih dalam batas normal.

Tabel 2. Nilai Rujukan Hitung Diferensial Leukosit

No	Jenis Leukosit	Nilai Rujukan (%)
1.	Neutrofil	32,50-77,70%
2.	Eosinofil	0,00-4,40%
3.	Basofil	0,00-1,00%
4.	Limfosit	7,00-52,70%
5.	Monosit	4,00-12,30%

Sumber: Beckman Coulter DxH 500, 2021.

Peningkatan jumlah neutrofil (disebut neutrofilia) dapat terjadi karena respon fisiologik terhadap stress, misalnya karena olahraga, pajanan ke panas atau dingin yang ekstrem, setelah perdarahan atau hemolisis akut, stress emosi akut, atau melahirkan. Keadaan patologis yang menyebabkan neutrofilia antara lain infeksi akut (lokal dan sistemik), radang atau inflamasi (reumatoid arthritis, demam rematik akut, gout, vaskulitis dan miositis dari berbagai jenis, reaksi hipersensitivitas terhadap obat, pneumonia), kerusakan jaringan (infark miokard akut, luka bakar, cedera tabrakan, pembedahan), gangguan metabolik (uremia, ketoasidosis diabetes, eklampsia, tyroid storm), penyakit Hodgkin, leukemia mielositik, hemolytic disease of newborn (HDN), kolesistitis akut, apendisitis, pankreatitis akut,. Pengaruh obat: epinefrin, digitalis, histamine, heparin, sulfonamide, litium, kortison, ACTH, toksin, bisa dan logam berat.

Penurunan jumlah neutrofil (disebut neutropenia) dijumpai pada penyakit virus (hepatitis, influenza, campak, gondongan, rubella, mononucleosis infeksiosa), hipersplenisme (penyakit hati, penyakit penimbunan), leukemia (limfositik dan monositik), agranulositosis, anemia (defisiensi besi, asam folat, aplastik). Pengaruh obat-obatan golongan antibiotika dan agen immunosupresif.

Peningkatan jumlah eosinofil (disebut eosinofilia) dapat dijumpai pada penyakit alergi (asma, hay fever, reaksi obat, vaskulitis alergika, serum sickness), penyakit parasitik (trikinososis, ekinokokus, cacing kait, skistosomiasis, amoebiasis), penyakit kulit (beberapa psoriasis, beberapa ekzema, pemfigus, dermatitis hipertiformis), kanker (tulang, ovarium, testis, otak), flebitis, tromboflebitis, leukemia mielositik kronik (*chronic myelocytic leukemia*, CML), emfisema, penyakit ginjal (gagal ginjal, sindrom nefrotik).

Penurunan jumlah eosinofil dapat dijumpai pada stress, pemberian steroid per oral atau injeksi, luka bakar, syok, hiperfungsi adrenokortikal.

Peningkatan jumlah basofil (basofilia) dapat dijumpai pada proses inflamasi, leukemia mielositik kronik (*chronic myelocytic leukemia*, CML), tahap penyembuhan infeksi atau inflamasi, anemia hemolitik didapat. Sedangkan penurunan jumlah dapat dijumpai pada stress, reaksi hipersensitivitas, kehamilan, hipertiroidisme.

Jumlah limfosit meningkat (disebut limfositosis) terjadi pada infeksi kronis dan virus. Limfositosis berat umumnya disebabkan karena leukemia limfositik kronik. Limfosit mengalami penurunan jumlah (disebut leukopenia) selama terjadi sekresi hormon adenokortikal atau pemberian terapi steroid yang berlebihan.

Peningkatan jumlah monosit (monositosis) dapat dijumpai pada: penyakit infeksi (mononukleosis infeksiosa, parotitis, herpes zoster, endokarditis bakterial subakut, rickettsia, sifilis), penyakit parasitik

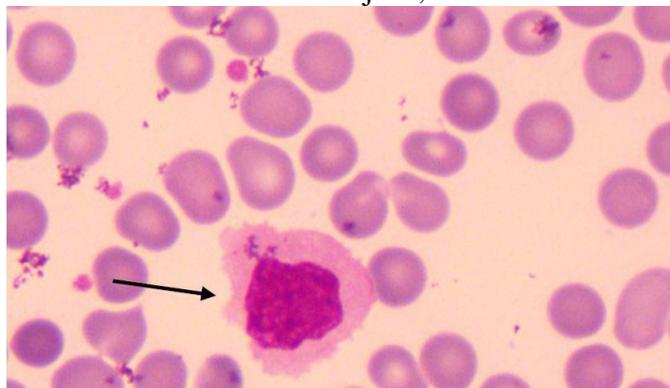
(demam bintik Rocky Mountain, toksoplasmosis, bruselosis), leukemia monositik, kanker, anemia (sel sabit, hemolitik), SLE, arthritis rheumatoid, kolitis ulseratif, sarkoid, enteritis regional. Sedangkan penurunan jumlah monosit dapat dijumpai pada leukemia limfositik, anemia aplastik (Riswanto, 2013).

Apabila dikaitkan dengan lama penundaan preparasi spesimen darah, morfologi leukosit dapat dipengaruhi oleh sifat EDTA yang mengikat kalsium pada leukosit. Apabila penyimpanan darah dengan EDTA diperpanjang, maka menyebabkan penurunan kalsium pada leukosit. Hal ini disebabkan karena sifat EDTA sebagai agen pengikat kalsium (*chelating agent*). Menurunnya kalsium pada sel mempengaruhi penurunan *adenosine triphosphate* (ATP) yang juga dapat menyebabkan penurunan sintesis fosfolipid yang merupakan salah satu komposisi membran sel. Kehilangan fosfolipid dapat menyebabkan kerusakan membran. Apabila membran rusak, maka cairan ekstrasel akan masuk dan tertimbun di dalam sel. Hal ini menyebabkan timbulnya vakuol-vakuol jernih dalam sitoplasma yang disebut dengan vakuolisasi sitoplasma (Shagana, 2014).

Hal lainnya yang dapat mempengaruhi hasil penelitian ini adalah pemakaian EDTA yang berlebihan. Pemakaian EDTA termasuk dalam salah satu prosedur penyimpan spesimen darah. Pemakaian EDTA sebagai antikoagulan yang berlebihan dapat mempengaruhi morfologi leukosit dalam spesimen darah yang akan diperiksa (Sukorini, dkk., 2007).



Gambar 7. Vakuolisasi Sitoplasma Leukosit
Sumber: Mahajana, 2016.



Gambar 8. Irreguler Margin
Sumber: Mahajana, 2016.



Gambar 9. Leukosit Pecah
Sumber: Mahajana, 2016.

5. Metode Pemeriksaan Profil Leukosit

a. Manual (Mikroskopis)

Pemeriksaan hitung jumlah leukosit secara manual menggunakan bilik hitung yang dibaca secara mikroskopis. Pembuatan sediaan dengan cara mengencerkan sampel darah pada larutan Turk yang mengandung asam lemah (asam asetat glasial) menyebabkan eritrosit hemolisis dan leukosit menjadi lebih mudah dihitung. Pengenceran yang digunakan biasanya 10x atau 20x menggunakan pipet leukosit atau tabung (Gandasoebrata, 2013).

Pemeriksaan hitung diferensial secara manual menggunakan sediaan apusan darah yang diwarnai dengan pewarnaan tertentu kemudian dibaca di bawah mikroskop perbesaran 100x. Apusan darah dapat dibuat secara manual dengan tangan atau menggunakan mesin otomatis. Spesimen berupa darah EDTA atau darah tanpa antikoagulan (Riswanto, 2013).

b. Otomatis (*Hematology Analyzer*)

Hematology Analyzer adalah perangkat yang digunakan untuk melakukan pengukuran komponen-komponen yang ada di dalam darah. Alat ini merupakan instrumen utama yang digunakan di laboratorium klinik.

Prinsip dan teknologi pengukuran yang digunakan dalam *hematology analyzer* dapat berbeda-beda dari satu alat dengan alat

lainnya. Salah satu yang biasa digunakan yaitu Teknologi *Impedance flowcyrometry*.

Flowcymetry didefinisikan sebagai pengukuran simultan beberapa karakteristik fisik dari sebuah sel tunggal yang tersuspensi dan dialirkan melalui suatu celah yang disebut aperture. Cara pengukuran sel yang dapat digunakan pada *impedance flowcytometry* adalah dengan mengukur impedansi listrik dari sel.

Pada waktu sel darah melewati aperture yang memiliki elektroda beraliran listrik konstan pada kedua sisinya, akan terjadi perubahan tahanan listrik di antara kedua elektroda tersebut. Hal ini mengakibatkan timbulnya pulsa listrik. Jumlah pulsa listrik yang terukur per satuan waktu (frekuensi pulsa) dideteksi sebagai jumlah sel yang melalui celah tersebut. Sedangkan besarnya perubahan tegangan listrik (amplitudo) yang terjadi, merupakan ukuran volume dari masing-masing sel darah.

Berdasarkan parameter yang mampu diperiksa, *Hematology Analyzer* terbagi dalam beberapa tipe. Tipe alat yang paling sederhana dapat mengukur delapan parameter pemeriksaan, sedangkan tipe alat yang lebih canggih dapat mengukur 16, 21, hingga 31 parameter dengan kombinasi yang berbeda-beda.

Parameter pemeriksaan yang dapat diukur oleh *Hematology Analyzer* merek Beckman Coulter DxH 500 adalah:

- 1) Kadar Hemoglobin (gr/dL)
- 2) Jumlah leukosit ($10^3/\text{mm}^3$)
- 3) Jumlah eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$)
- 4) Jumlah trombosit ($10^3/\text{mm}^3$)
- 5) Hematokrit atau volume relatif eritrosit terhadap volume total darah lengkap (%)
- 6) Indeks eritrosit
 - a) MCV (*Mean Corpuscular Volume*) atau VER (Volume Eritrosit Rata-rata) dalam femetoliter (fL.)
 - b) MCH (*Mean Corpuscular Hemoglobin*) atau HER (Hemoglobin Eritrosit Rata-rata) dalam pikogram (pg).
 - c) MCHC (*Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*) atau KHER (Konsentrasi Hemoglobin Eritrosit Rata-rata) dalam gr/dL.
- 7) Hitung lima jenis leukosit
 - a) Jumlah ($10^3/\text{mm}^3$) dan presentase (%) limfosit
 - b) Jumlah ($10^3/\text{mm}^3$) dan presentase (%) neutrofil segmen
 - c) Jumlah ($10^3/\text{mm}^3$) dan presentase (%) monosit
 - d) Jumlah ($10^3/\text{mm}^3$) dan presentase (%) basofil
 - e) Jumlah ($10^3/\text{mm}^3$) dan presentase (%) eosinofil
- 8) RDW (*Red blood cell Distribution Width*) atau distribusi lebar sel darah merah
- 9) MPV (*Mean Platelet Volume*) atau rata-rata volume trombosit

Untuk menjamin akurasi dan presisi pengukuran, alat harus selalu dikalibrasi dan dikontrol secara berkala. Kalibrasi dilakukan dengan menggunakan suatu bahan yang menyerupai darah namun dengan nilai-nilai yang sudah diketahui. Kalibrasi dilakukan ketika alat baru pertama kali dioperasikan atau dalam kondisi tertentu. Dalam perjalanan pengoperasiannya, alat juga perlu dikontrol secara berkala menggunakan bahan yang juga menyerupai darah dengan nilai target yang sudah diketahui dalam rentang (deviasi) tertentu. Apabila hasil pengukuran alat sesuai dengan rentang yang ditentukan, berarti alat masih dalam kondisi baik. Namun, apabila hasil pengukuran keluar dari rentang yang ditentukan, maka perlu dilakukan tindakan pada alat tersebut.

Semakin mendekati nilai target pengukuran, berarti akurasi alat semakin baik. Dalam melakukan kalibrasi secara berulang, semakin sempit rentang atau selisih pada tiap pengukuran, berarti presisi alat semakin baik (Mengko, 2013).

Penyebab kesalahan pada hasil alat hematology analyzer merupakan faktor pengganggu pada penelitian ini. Penyebab terjadinya kesalahan pada hasil alat *Hematology Analyzer* antara lain :

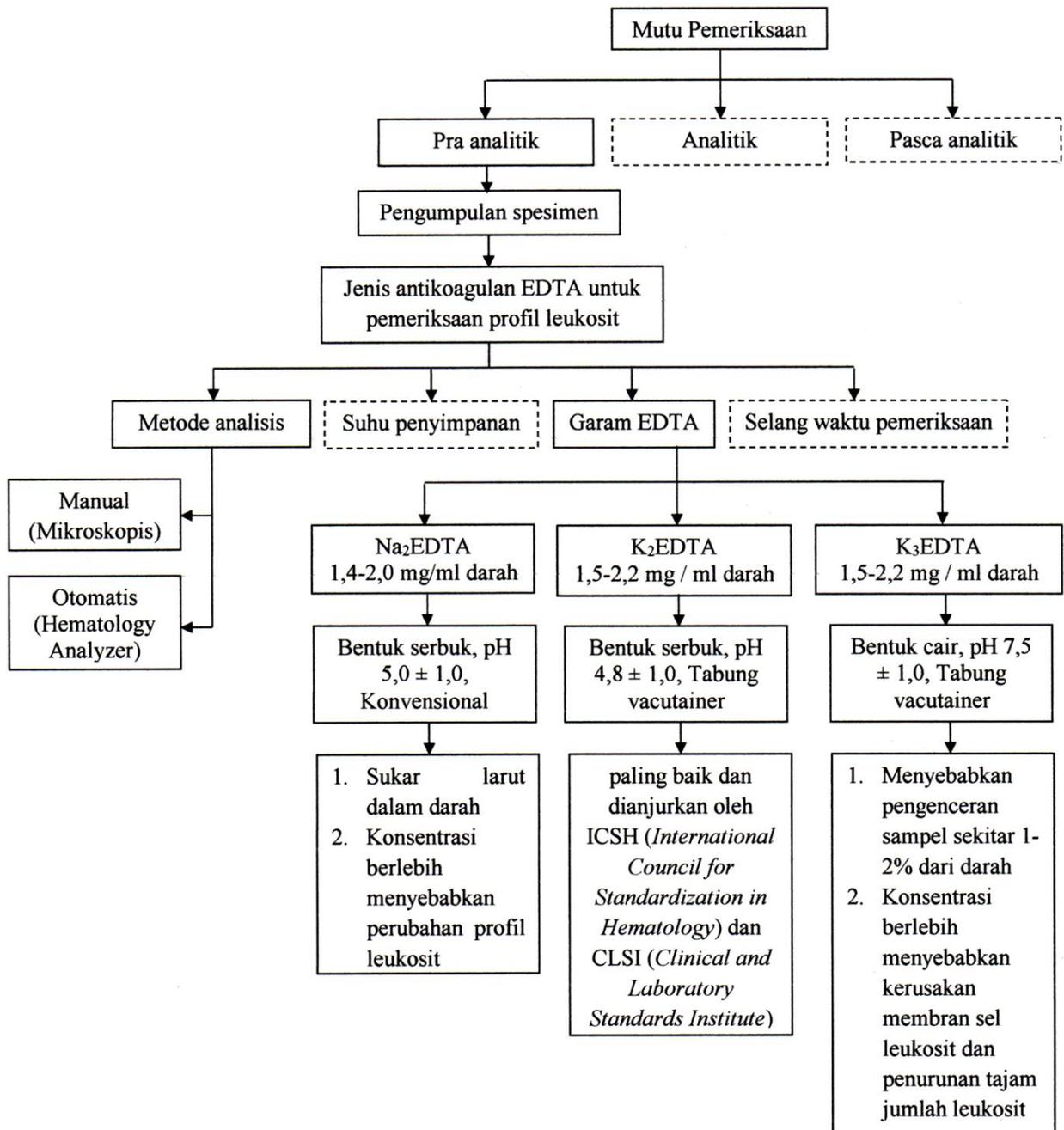
- 1) Salah cara sampling dan pemilihan spesimen
- 2) Salah penyimpanan spesimen dan waktu pemeriksaan ditunda terlalu lama sehingga terjadi perubahan morfologi sel darah.

- 3) Kesalahan tidak mengocok sampel secara homogen, terutama bila tidak memiliki alat pengocok otomatis (nutator) maka dikhawatirkan tidak sehomogen saat sampel darah diambil dari tubuh pasien. Inilah kesalahan fatal yang sering terjadi pada pemeriksaan ini
- 4) Kehabisan Reagent Lyse sehingga seluruh sel tidak dihancurkan saat pengukuran sel tertentu.
- 5) Kalibrasi dan kontrol tidak benar. Tidak melakukan kalibrasi secara berkala dan darah kontrol yang digunakan sudah mengalami expired date tapi tetap dipakai karena menghemat biaya operasional.
- 6) *Carry over*, homogenisasi, volume kurang. Untuk alat jenis *open tube* maka, penyebabnya salah saat pada memasukkan sampel pada jarum sampling alat, misal jarum tidak masuk penuh ujungnya pada darah atau darah terlalu sedikit dalam tabung atau botol lebar sehingga saat dimasukkan jarum tidak terendam seluruhnya. Untuk jenis *close tube* kesalahan hampir sama juga, yaitu tidak memenuhi volume minimum yang diminta oleh alat. Untuk tipe *close tube* menggunakan cara predilute, perlu dikocok dahulu saat pengenceran darah dengan diluent.
- 7) Alat atau reagen rusak. Alat dapat saja rusak bila suhu yang tidak sesuai (*Warning: Temperature Ambient Abnormal*) dan kondisi

meja yang tidak baik. Reagensia yang digunakan jelek dan mungkin terkontaminasi oleh udara luar karena packing yang jelek.

- 8) Hasil tidak normal tanpa ada peringatan (NO FLAGS) pada alat, biasanya ada catatan khusus berupa warning, misal platelets flag.
- 9) Hasil tidak normal dan kurang sesuai dengan sebelumnya atau klinis yang sedang terjadi, sehingga dapat menyebabkan terjadinya diagnosis yang sesat
- 10) Diluar batas linier alat. Artinya bahwa hasil yang diukur tidak mampu dicapai oleh alat, misalnya kadar leukosit yang sangat tinggi pada leukemia.
- 11) Memang sampel tersebut ada kelainan khusus. Faktor-faktor yang berpotensi mengganggu pemeriksaan diantaranya sampel patologis dan hemolisis. Sampel hemolisis dapat dikenali dengan tampilan berwarna, sedangkan faktor lain (misalnya obat) dideteksi hanya dengan informasi tambahan dan / atau analisis langsung (Gandasoebrata, 2010).

B. Kerangka Teori



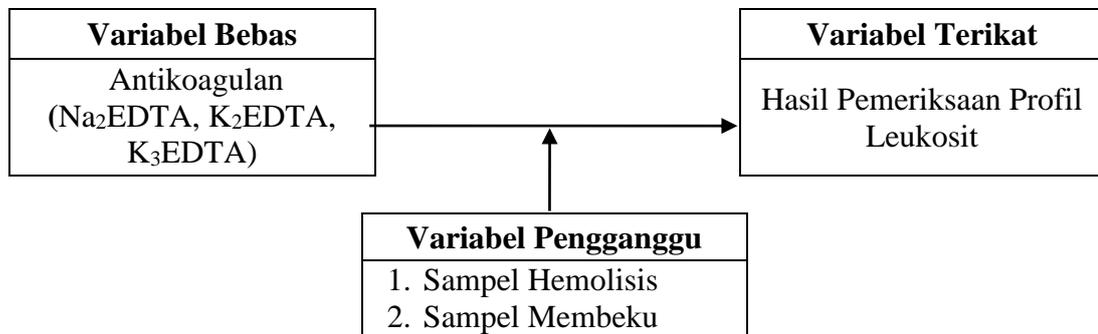
Gambar 10. Kerangka Teori
Sumber: CLSI-H1-A5, 2003.

Keterangan :

→ Diteliti

→ Tidak diteliti

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 11. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

Adanya perbedaan hasil pemeriksaan profil leukosit menggunakan antikoagulan Na₂EDTA, K₂EDTA dan K₃EDTA yang diperiksa dengan *Hematology Analyzer*.