

G1615  
AFI  
P

9



**PEMERIKSAAN HITUNG JENIS  
MENGUNAKAN SEDIAAN APUS *BUFFY COAT*  
PADA PENDERITA LEUKOPENIA**

Oleh :

**ANNA MARTIANA AFIDA**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I (PPDS I)  
BAGIAN PATOLOGI KLINIK FK UNDIP / RS DR. KARIADI  
SEMARANG  
2005**

**PERBANDINGAN PEMERIKSAAN HITUNG JENIS  
SEDIAAN APUS *BUFFY COAT* DAN METODA OTOMATIS  
PADA PENDERITA LEUKOPENIA**

**Karya Ilmiah Akhir  
Untuk memenuhi persyaratan  
Program Pendidikan Dokter Spesialis I  
Patologi Klinik**

**Pada**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO SEMARANG**

**Oleh**

**ANNA MARTANA AFIDA**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I PATOLOGI KLINIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG**

**2005**

Karya ilmiah akhir ini telah disetujui untuk dipertahankan dihadapan

Tim Penguji PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP

Telah disetujui,

Pembimbing II



Dr. Lisyani Suromo, SpPK(K)

NIP. 130 354 869

Pembimbing I



Dr. Herniah Asti w, SpPK

NIP. 140 225 827

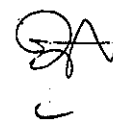
Ketua Bagian patologi Klinik  
FK UNDIP



Dr. Lisyani Suromo, SpPK(K)

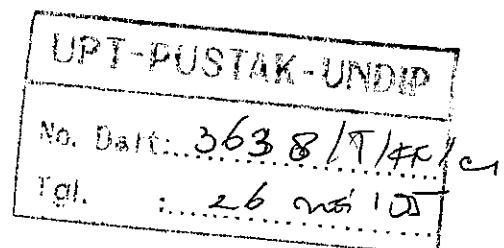
NIP. 130 354 869

Ketua Program Studi Patologi Klinik  
FK UNDIP



Dr. Purwanto AP, SpPK

NIP. 131 252 963



## BLOOD COUNT USING SPECIMEN FROM BUFFY COAT SMEAR IN PATIENTS WITH LEUKOPENIA

### ABSTRACT

**Backgrounds:** Leucopenia is a condition in which the number of leucocyte is less than  $3500/\text{mm}^3$ . The percentage of subgroups of cells with reduced number can be detected by counting on a peripheral blood smear that is a part of a routine examination or by using an Automated Hematology Analyzer device.

There are difficulties if the Automated Hematology Analyzer device is not available meanwhile the leucocyte counts are less than or equal to  $1000/\text{mm}^3$ , because the number leucocyte cells in blood smears are usually less than 100 cells. The cost of examination using an automatic method is relatives expensive and is fact not all laboratories in Indonesia have the devices.

An alternative method can be performed for blood counts in leucopenia where the number of leucocytes are less than or equal to  $1000/\text{mm}^3$  by doing smears from buffy coat specimens and stain them with Giemsa stain. This method is relatively cheap and can be performed in every laboratory especially smalls / simple or Public Health Center laboratories.

**Purpose of Study:** To find out the differences between blood counts using buffy coat smear and automatic method in leucopenia.

**Materials and Methods:** The study was performed on 26 patients with leucopenia that fulfilled inclusion criteria where the clinicians had ordered routine hematologic examination in Clinical Pathology laboratory subdivision of Dr. Kariadi Hospital Semarang. The design of this study was an analytical descriptive and cross sectional approached. The buffy coat and automatic methods were done to leucocyte numbers of less than 100 cells.

**Results:** There were no significant differences in the result of eosinophil count between automatic and buffy coat smear methods with  $p = 0.414$ . There were significant differences in the result of basophil count between automatic method and buffy coat smear methods with  $p = 0.005$ . There were no significant differences in the result of neutrophil count between automatic and buffy coat smear methods with  $p = 0.293$ . There were no significant differences in the result of lymphocyte count between automatic method and buffy coat smear methods with  $p = 0.634$ . There were no significant differences in the result of monocyte count between automatic method and buffy coat smear methods with  $p = 0.071$ .

**Conclusion:** There were no significant differences in the results of eosinophil, neutrophil, lymphocyte and monocyte count between buffy coat and automatic methods. There was a significant difference in the result of basophil count between buffy coat and automatic method.

**Keywords:** Buffy coat, automatic method, leucocyte count.

## PEMERIKSAAN HITUNG JENIS MENGGUNAKAN SEDIAAN APUS *BUFFY COAT* PADA PENDERITA LEUKOPENIA

### ABSTRAK

**Latar Belakang :** Leukopenia adalah jumlah sel darah putih (leukosit) kurang dari normal, yaitu kurang dari  $3500 / \text{mm}^3$ . Persentase jenis-jenis sel yang berkurang jumlahnya tersebut dapat diketahui dengan pemeriksaan hitung jenis sediaan apus darah tepi yang merupakan bagian dari pemeriksaan rutin atau menggunakan alat *Automated Hematology Analyzer*.

Kesulitan timbul apabila tidak memiliki alat *Automated Hematology Analyzer* tersebut sedangkan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ , karena sel leukosit pada pemeriksaan sediaan apus biasanya ditemukan tidak sampai 100 sel. Kenyataannya dengan menggunakan metoda otomatis biaya pemeriksaan relatif mahal dan tidak semua laboratorium di Indonesia dapat mengerjakan / memiliki alat tersebut.

Metode alternatif dapat dilakukan untuk pemeriksaan hitung jenis pada leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$  yaitu dengan sediaan apus *buffy coat* yang dicat dengan pengecatan Giemsa. Cara ini relatif murah dan dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas.

**Tujuan Penelitian :** Menilai perbedaan pemeriksaan hitung jenis antara sediaan apus *buffy coat* dengan pemeriksaan hitung jenis metoda otomatis pada leukopenia.

**Bahan dan metode :** Penelitian dilakukan terhadap 26 penderita leukopenia yang oleh klinisi dimintakan pemeriksaan hematologi rutin pada laboratorium sub divisi Patologi Klinik RS Dr. Kariadi Semarang yang memenuhi kriteria inklusi dengan rancangan penelitian deskriptif analitik dan pendekatan belah lintang. Pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan *buffy coat* dan metoda otomatis (*Automated Hematology Analyzer Cell Dyn 3700*) dilakukan terhadap spesimen dengan hitung jenis tidak mencapai 100 sel.

**Hasil :** Hasil uji beda menunjukkan tidak terdapat perbedaan antara hasil pemeriksaan hitung jenis eosinofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat* dengan  $p = 0,414$ . Terdapat perbedaan antara hasil pemeriksaan hitung jenis basofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat* dengan  $p = 0,005$ . Tidak terdapat perbedaan antara hasil pemeriksaan hitung jenis neutrofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat* dengan  $p = 0,293$ . Tidak terdapat perbedaan antara hasil pemeriksaan hitung jenis limfosit antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat* dengan  $p = 0,634$ . Tidak terdapat perbedaan antara hasil pemeriksaan hitung jenis monosit antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat* dengan  $p = 0,071$ .

**Kesimpulan :** Tidak terdapat perbedaan bermakna pada hitung jenis eosinofil, neutrofil, limfosit dan monosit dengan menggunakan *buffy coat* dan metoda otomatis. Terdapat perbedaan bermakna pada hitung jenis basofil dengan menggunakan *buffy coat* dan metoda otomatis.

**Kata Kunci :** *Buffy coat*, metoda otomatis, pemeriksaan hitung jenis leukosit.

## RIWAYAT HIDUP

Nama : Anna Martiana Afida

Alamat : Jl. Puspanjolo Barat XIII / 13 Semarang.

Tempat dan tanggal lahir : Jakarta, 12 Maret 1969.

Agama : Islam.

Nama orang tua : H. Abd. Rahim Sy.  
Hj. Cherma.

Nama suami : Dr. Oky Susianto, SpAn.

Riwayat Pendidikan : 1. Lulus SD Muhammadiyah III Jakarta 1981  
2. Lulus SMP Muhammadiyah V Jakarta 1984  
3. Lulus SMA N 31 Jakarta 1987  
4. Lulus FK Universitas YARSI Jakarta 1995

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadapan Allah SWT, karena dengan perkenan dan kuasanya kami dapat menyelesaikan tulisan ini sebagai karya akhir dalam rangka menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran UNDIP, RS Dr. Kariadi.

Sehubungan dengan selesainya karya akhir ini, perkenankanlah kami dengan tulus hati menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Dr. Herniah Asti, SpPK** selaku pembimbing, sekaligus guru kami yang dengan gigih telah memberikan bimbingan, pengarahan, semangat dan dorongan demi mencapai cita-cita kami. **Dr. Lisyani Suromo, SpPK (K)** selaku pembimbing, Ketua Bagian Patologi Klinik dan guru kami yang dengan sabar dan bijaksana telah meluangkan waktu untuk membimbing, mendorong dan mengarahkan demi terselesainya program pendidikan ini. Disamping itu rasa terima kasih yang dalam kami sampaikan juga kepada yang terhormat :

1. **Dr. Purwanto AP, SpPK** selaku Ketua PPDS I Patologi Klinik yang telah membimbing dan membantu kami selama pendidikan ini.
2. **Dr. Ml. Tjahjati, SpPK** selaku Manajer Laboratorium dan guru kami yang telah memberikan bimbingan dan kesempatan untuk melakukan kegiatan selama menempuh pendidikan ini.
3. Staf pengajar PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP, para guru kami ; **Dr. AP Pradana, SpPK (K), Dr. Sabardiman, SpPK (K), Dr. Indrawati, SpPK, Dr. Affandi Ichsan, SpPK (K), Dr. Imam Budiwiyono, SpPK, Dr. Banundari RH, SpPK, Dr.**

- Indranila KS, SpPK** yang telah membimbing dan membantu kami selama pendidikan ini.
4. **DR. Dr. Hertanto WS, MS SpGK** yang telah memberi masukan tentang statistik pada karya ilmiah kami.
  5. **Prof. Dr. Kabulrachman, SpKK (K)** Dekan FK UNDIP atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik.
  6. **Dr. H. Gatot Suharto, M Kes.MMR** Direktur RS Dr. Kariadi atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada kami dalam rangka menyelesaikan PPDS I Patologi Klinik.
  7. Segenap **Tim Penguji** PPDS I Patologi Klinik FK UNDIP yang telah memberi kesempatan bagi kami untuk mempertahankan karya akhir ini.
  8. Seluruh **Staf laboratorium sub divisi Patologi Klinik** RS Dr. Kariadi yang telah banyak membantu dan bekerja sama selama kami menempuh program pendidikan ini.
  9. **Suami** tercinta yang banyak berkorban dan dengan penuh kasih dan tulus mendampingi kami dalam menyelesaikan pendidikan ini.
  10. **Ayahanda dan ibunda** tercinta yang dengan tulus dan tidak ada henti-hentinya memanjatkan doa untuk keberhasilan dan kebahagiaan kami. Semoga Allah SWT berkenan memberikan kesehatan kepada keduanya.
  11. **Adik** saya ; Lola dan Desi yang selalu memberikan dorongan dan semangat.
  12. **Bapak dan ibu mertua** yang dengan tulus memberikan bantuan selama menjalani pendidikan ini.
  13. **Kakak dan adik ipar** ; mbak Ely dan Dodik yang selalu membantu kami.



14. Saudara kami seangkatan ; **Dr. Harun Nurrachmat** dan **Dr. Erma Lestari** yang selalu memberi semangat, saran, kritik serta tempat berbagi suka dan duka selama pendidikan ini. Semoga kesuksesan dan kebahagiaan memayungi langkah kita selanjutnya.
15. Teman sejawat **Residen Patologi Klinik** yang telah banyak membantu selama pendidikan.
16. **Pasien leukopenia** yang dengan sukarela ikut berpartisipasi dalam menyelesaikan karya akhir ini.
17. Semua pihak yang tidak bisa kami sebut satu-persatu, yang turut membantu dan mendukung pendidikan kami selama ini.

Akhirnya kami menyadari bahwa karya akhir ini masih banyak kekurangannya, oleh karena itu sumbang saran dan kritik dari para guru serta pembaca lainnya akan kami terima dengan senang hati demi perbaikan dimasa mendatang. Tak lupa kami memohon maaf yang sebesar-besarnya apabila selama menempuh pendidikan maupun dalam pergaulan sehari-hari ada hal-hal yang kurang berkenan. Semoga Allah SWT melimpahkan berkat dan rahmatNya kepada kita semua.

Semarang, Maret 2005

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN .....	ii
ABSTRACT .....	iii
ABSTRAK .....	iv
RIWAYAT HIDUP .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan Penelitian .....	3
1.4. Manfaat Penelitian .....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Leukopenia .....	5
2.2. Sediaan Apus Darah Tepi ( SADT ) .....	10
2.3. Hitung Jenis Leukosit .....	17
2.4. <i>Buffy Coat</i> .....	18
2.5. Hitung Jenis menggunakan metoda otomatis .....	21
2.6. Kerangka Teori .....	27
2.7. Kerangka Konsep .....	28
2.8. Hipotesis .....	28
2.9. Variabel dan Definisi Operasional Variabel .....	28
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1. Rancangan Penelitian .....	29

3.2.	Ruang Lingkup .....	29
3.3.	Populasi .....	29
3.4.	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	30
3.5.	Besar Sampel .....	30
3.6.	Strategi Pemeriksaan .....	31
3.7.	Cara Pemeriksaan .....	32
3.8.	Analisis Data .....	36
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	37
BAB V	SIMPULAN DAN SARAN	
5.1.	Simpulan .....	41
5.2.	Saran .....	43
BAB VI	RINGKASAN .....	44
DAFTAR PUSTAKA	.....	47

## DAFTAR GAMBAR

1. Mekanisme kinetika neutropeni .....	4
2. Zona-zona pada sediaan apus darah tepi .....	10
3. Pembuatan SADT dengan metoda <i>two slides</i> .....	12
4. Pembuatan SADT dengan metoda <i>coverglass</i> .....	13
5. Lapisan darah yang terbentuk setelah sentrifugasi .....	17
6. Pembuatan sediaan apus <i>buffy coat</i> .....	20
7. Bagan / skema alat <i>Automated Hematology Analyzer</i> .....	21
8. Pemisahan Mono nuklear dan Polimorfonuklear .....	22
9. Pemisahan neutrofil dan eosinofil.....	23
10. Pemisahan mononuklear .....	24

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Data penelitian
2. Data deskriptif
3. Uji Normalitas Shapiro-Wilk
4. Uji beda pembaca I dan pembaca II
5. Uji beda *buffy coat* dan otomatis
6. Dokumentasi hasil penelitian

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. LATAR BELAKANG

Leukopenia adalah keadaan dengan jumlah sel darah putih (leukosit) kurang dari normal, yaitu kurang dari  $3500 / \text{mm}^3$ , atau kurang dari  $4000 / \text{mm}^3$  <sup>(1,2,3)</sup> Leukopenia berat atau *severe* leukopenia adalah suatu keadaan dengan jumlah leukosit kurang dari  $2000 / \text{mm}^3$  <sup>(4)</sup> atau ada juga yang mengatakan kurang dari  $1000 / \text{mm}^3$  <sup>(5)</sup>

Menurut jenis sel yang berkurang, leukosit dapat dibedakan menjadi : neutropenia, limfopenia, monositopenia, eosinopenia dan basopenia. Jenis-jenis sel yang berkurang jumlahnya tersebut dapat diketahui dengan pemeriksaan hitung jenis. <sup>6,7</sup>

Pemeriksaan hitung jenis leukosit adalah suatu pemeriksaan rutin yang merupakan bagian dari pemeriksaan apus darah tepi. <sup>8</sup> Kebenaran penghitungan jenis sel dipengaruhi oleh jumlah total sel yang dihitung, yang mengikuti hukum Poisson yang berbunyi makin banyak leukosit yang dihitung, makin kecil kesalahan yang terjadi. <sup>9,10</sup> Penghitungan dilakukan minimal sebanyak 100 sel. <sup>11</sup>

Berdasarkan pengalaman dalam memeriksa hitung jenis leukosit di bagian hematologi laboratorium Patologi Klini RSDK, pada keadaan leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ , banyaknya sel leukosit yang ditemukan pada pemeriksaan hitung jenis tidak mencapai 100 sel. Hal ini tidak menjadi masalah bila kita mempunyai alat *Automated Hematology Analyzer* dengan kemampuan melakukan hitung jenis yang memadai walaupun pada leukopenia. <sup>12,13,14,15</sup> Pemeriksaan dengan metoda ini relatif mahal dan tidak semua laboratorium di Indonesia dapat mengerjakan.

Di Bagian hematologi laboratorium RS Dr. Kariadi Semarang dalam 1 tahun terdapat kurang lebih 105 pasien leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ . Sebelum penggunaan *Automated Hematology Analyzer* pelaporan pemeriksaan hitung jenis pada pasien tersebut hanya ditulis jumlah tiap jenis sel yang ditemukan pada zona baca walaupun tidak mencapai 100 sel, sehingga apabila ada kekurangan pada jenis-jenis sel (neutropenia, limfopenia, monositopenia, eosinopenia atau basopenia) tidak dapat diketahui.

Pada penelitian ini digunakan pasien dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$  karena menurut pengalaman selama bekerja di bagian hematologi laboratorium sub divisi PK RS Dr. Kariadi bila jumlah leukosit lebih dari  $1000 / \text{mm}^3$  pada beberapa kasus masih didapat jumlah sel mencapai 100 pada pemeriksaan hitung jenis.

Pada keadaan leukopenia berat sangat sangat memerlukan hasil yang cepat dan tepat agar dapat menyampaikan informasi kepada klinisi untuk kepentingan terapi.

Metoda alternatif dapat dilakukan untuk pemeriksaan hitung jenis pada leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$  yaitu dengan membuat sediaan apus *buffy coat* (material diambil dari *buffy coat*), dan dicat dengan pengecatan Giemsa.<sup>14,15</sup> Pengecatan Giemsa dipakai dalam penelitian ini karena merupakan pengecatan yang banyak dipakai dipelbagai laboratorium baik besar, menengah, kecil atau Puskesmas di Jawa Tengah.

Metoda alternatif ini relatif murah dan dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas. Sejauh ini belum pernah penulis

baca laporan penelitian yang mengemukakan hasil *buffy coat* yang digunakan untuk pemeriksaan hitung jenis.

## **1.2. PERUMUSAN MASALAH**

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka masalah yang diajukan pada penelitian ini adalah : apakah terdapat perbedaan antara hitung jenis leukosit pada sediaan apus *buffy coat* dengan hitung jenis leukosit metoda otomatis pada leukopenia.

## **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

### **1.3.1. Tujuan umum :**

Mengetahui perbedaan pemeriksaan hitung jenis antara sediaan apus *buffy coat* dengan pemeriksaan hitung jenis metoda otomatis pada leukopenia.

### **1.3.2. Tujuan Khusus :**

- 1.3.2.1. Mendeskripsikan hasil pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan preparat *buffy coat*.
- 1.3.2.2. Mendeskripsikan hasil pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan metoda otomatis.
- 1.3.2.3. Menganalisis perbedaan pemeriksaan hitung jenis menggunakan sediaan apus *buffy coat* dengan pemeriksaan hitung jenis metoda otomatis.



#### 1.4. MANFAAT PENELITIAN

Pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan sediaan apus *buffy coat* diharapkan dapat menjadi alternatif cara untuk pemeriksaan hitung jenis pada leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$  yang relatif murah dan dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas yang tidak mempunyai alat *Automated Hematology Analyzer* (metoda otomatis).

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

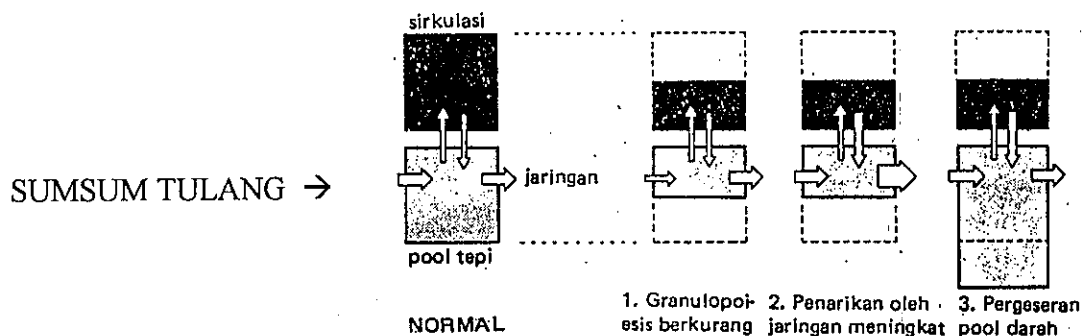
#### 2.1. LEUKOPENIA

Menurut jenis sel yang berkurang leukosit dapat dibedakan menjadi : neutropenia, limfopenia, monositopenia, eosinopenia dan basopenia, di mana neutropenia merupakan hal yang terpenting pada penurunan sel darah putih (leukosit), sedangkan limfopenia peranannya hanya sedikit, sementara monositopenia, eosinopenia dan basopenia secara klinis tidak bermakna<sup>6,7</sup>.

Leukopenia dapat terjadi melalui 3 mekanisme, yaitu<sup>1</sup>:

1. Granulopoiesis yang berkurang sehingga penyimpanan dalam *pool* tepi dan *pool* sirkulasi menurun.
2. Penarikan jaringan meningkat sehingga pengambilan dari *pool* tepi dan *pool* sirkulasi meningkat.
3. Pergeseran *pool* darah dimana *pool* tepi meningkat sedangkan *pool* sirkulasi berkurang.

Untuk lebih jelas lihat gambar dibawah ini :



Gambar 1. Mekanisme kinetika neutropeni. (diambil dari Hoffbrad AV)<sup>1</sup>

Nilai rujukan normal dari leukosit berdasarkan jenis sel nya baik untuk dewasa maupun anak adalah sebagai berikut <sup>1</sup> :

Dewasa	: Leukosit total	: 4000 – 11.000 / mm <sup>3</sup> .
	Neutrofil	: 2500 – 7500 / mm <sup>3</sup> .
	Eosinofil	: 40 – 400 / mm <sup>3</sup> .
	Monosit	: 200 – 800 / mm <sup>3</sup> .
	Basofil	: 10 – 100 / mm <sup>3</sup> .
	Limfosit	: 1500 – 3500 / mm <sup>3</sup> .
Anak-anak	: Leukosit total	: Bayi baru lahir : 10.000 – 25.000 / mm <sup>3</sup> .
		1 tahun : 6000 – 18.000 / mm <sup>3</sup> .
		4 – 7 tahun : 6000 – 15.000 / mm <sup>3</sup> .
		8 – 12 tahun : 4500 – 13.500 / mm <sup>3</sup> .

Hasil hitung jenis dengan menggunakan sediaan apus darah tepi (SADT) dilaporkan dalam bentuk persentase ( % ), dengan nilai rujukan untuk masing-masing sel sebagai berikut <sup>2</sup> :

Eosinofil	: 1 – 3 %
Basofil	: 0 – 1 %.
Batang neutrofil	: 2 – 6 %
Segmen neutrofil	: 50 – 70 %
Limfosit	: 20 – 40 %
Monosit	: 2 – 8 %

### 2.1.1. Neutropenia

Neutropenia merupakan penurunan jumlah sel neutrofil kurang dari normal, ada yang mengatakan kurang dari  $1500 / \text{mm}^3$  <sup>(6,16)</sup>, ada pula yang mengatakan kurang dari  $2500 / \text{mm}^3$  <sup>(1)</sup>. Pada pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan SADT sel neutrofil dibagi menurut tingkat kematangan menjadi neutrofil batang dan neutrofil segmen, penurunan jumlah sel neutrofil batang apabila pada pemeriksaan hitung jenis ditemukan kurang dari 2 % dan penurunan jumlah neutrofil segmen apabila pada pemeriksaan hitung jenis ditemukan kurang dari 50 %.

Menurut berat ringannya neutropenia terhadap resiko terjadinya penyakit, dapat dibagi menjadi :

- Ringan bila jumlah sel  $1000 - 2000 / \text{mm}^3$ .
- Sedang bila jumlah sel  $500 - 1000 / \text{mm}^3$ .
- Berat bila jumlah sel kurang dari  $500 / \text{mm}^3$ .

Penyebab neutropenia antara lain : infeksi (bakteri, virus, rickettsia, protozoa, dll), infeksi yang luas, pasien debil yang rentan sistem imunnya, reaksi zat kimia, fisika dan obat-obatan, faktor hematologi (penurunan fungsi, peningkatan pemakaian atau peningkatan dekstruksi), kaheksia, syok anafilaktik dan penyakit hereditier (neutropenia siklik, neutropenia hipoplastik kronik, *agranulositosis genetic infantile*, neutropenia splenik primer) <sup>6,16,17,18,19</sup>

Patofisiologi terjadinya neutropenia tergantung penyebabnya <sup>11</sup> :

- Penurunan produksi neutrofil, bisa melalui 6 cara :
  - Penurunan produksi sel pada sumsum tulang.

- Kerusakan stem sel dengan metabolisme DNA normal serta terjadi perusakan stroma sumsum tulang dan mikrosirkulasinya.
- Penurunan neutrofil dengan perusakan DNA.
- Aplasia atau hipoplasia sel prekursor secara siklik setiap 15 – 35 hari (neutropenia siklik).
- Invasi keadaan patologis dalam sumsum tulang.
- Mielopoiesis yang tidak efektif (neutrofil terlalu cepat memasuki sirkulasi darah).
- Peningkatan dekstruksi neutrofil, terjadi melalui 6 cara :
  - Sumsum tulang hiperseluler, penurunan umur neutrofil yang beredar tetapi tidak ditemukan hipersplenisme.
  - Hipersplenisme (suatu keadaan dimana terdapat pembesaran limpa dan peningkatan fungsi dan bila dilakukan splenektomi fungsi akan kembali normal).
  - Perusakan darah tepi oleh sel retikuloendotelial (kemoterapi).
  - Peningkatan dekstruksi perifer dan peningkatan penggunaan leukosit yang terjadi pada infeksi virus dan bakteri.
  - Terjadi reaksi antigen antibodi.
  - Terjadi reaksi dengan zat asing / obat yang berlaku sebagai hapten.

### **2.1.2. Limfopenia**

Limfopenia merupakan keadaan jumlah limfosit kurang dari  $1500 / \text{mm}^3$  pada orang dewasa atau kurang dari  $3000 / \text{mm}^3$  pada anak-anak.<sup>20,21,22</sup> Penurunan jumlah sel limfosit pada pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan SADT apabila sel yang ditemukan kurang dari 20 %.<sup>2</sup>

Etiologi limfopenia antara lain : penurunan produksi limfosit (penyakit hereditas imunoglobulin, keganasan, penyakit Hodgkin stadium III – IV, anemia aplastik), peningkatan dekstruksi limfosit (kemoterapi atau radiasi), peningkatan kortikosteroid (stress, sindroma Cushing), peningkatan kehilangan limfe pada saluran pencernaan dan infeksi HIV<sup>20,21,22,23</sup>.

### **2.1.3. Monositopenia**

Monositopenia merupakan penurunan jumlah monosit kurang dari 200 / mm<sup>3</sup>. Penurunan jumlah sel monosit pada pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan SADT apabila sel yang ditemukan kurang dari 2 %.<sup>2</sup>

Selama terapi prednisolon monosit turun pada jam-jam pertama terapi tetapi biasanya kembali normal setelah 12 jam. Selain itu monositopenia juga dapat dijumpai pada leukemia *hairy cell*<sup>21</sup>.

### **2.1.4. Eosinopenia**

Eosinopenia merupakan penurunan jumlah eosinofil dibawah 40 / mm<sup>3</sup>. Penurunan jumlah sel eosinofil pada pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan SADT apabila sel yang ditemukan kurang dari 1 %.<sup>2</sup>

Timbul pada keadaan *stress* akut karena pengeluaran hormon glukokortikoid adrenal dan epinefrin. Juga timbul pada inflamasi akut. Penurunan terjadi karena migrasi ke arah inflamasi, hambatan pengeluaran eosinofil dari sumsum tulang atau hambatan produksi sel eosinofil.<sup>21,24,25</sup>

### 2.1.5. Basopenia

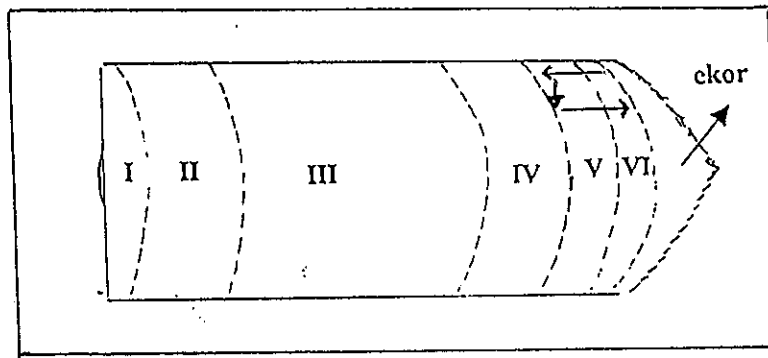
Basopenia merupakan penurunan jumlah basofil dibawah  $10 / \text{mm}^3$ . Karena jumlahnya yang sedikit maka penurunan basofil hanya dapat kita ketahui apabila kita mencari jumlah sel basofil dalam jumlah besar. Pemberian glikokortikoid, infeksi akut, stress dan hipertoroid dapat menyebabkan basopenia<sup>21,26,27,28</sup>

### 2.2. SEDIAAN APUS DARAH TEPI ( SADT )

Pemeriksaan SADT merupakan pemeriksaan hematologi yang sangat penting dan banyak sekali diminta oleh klinisi. Pemeriksaan ini tidak hanya diperlukan untuk menunjang diagnosis penyakit-penyakit hematologis, namun juga diperlukan untuk : menunjang diagnosis penyakit-penyakit non hematologis, memantau efek terapi maupun untuk mengetahui ada tidaknya efek samping terapi. Reabilitas informasi yang didapat dari pemeriksaan SADT sangat tergantung pada kualitas apusan yang dibuat (termasuk pewarnaannya) dan pembacaan yang sistematis<sup>2,28,29</sup>

AP Pradana membagi SADT menjadi 6 zona, berdasarkan susunan populasi sel darah merah, yaitu : zona I, II, III, IV, V dan VI (gambar 2). Zona I disebut zona ireguler. Didaerah tersebut distribusi sel darah merah tidak teratur dan kadang ada yang padat bergerombol. Daerah ini meliputi kira-kira 3 % dari seluruh badan SADT. Zona II disebut juga zona tipis, dimana distribusi sel darah merah tidak teratur, saling berdesakan (*distorsion*) dan bertumpuk (*overlapping*). Zona ini meliputi sekitar 14 %. Zona III disebut juga zona tebal, dimana sel-sel darah merah bergerombol rapat dan padat. Luas zona ini sekitar 45 % atau hampir separuh dari badan SADT. Zona IV disebut dengan

zona tipis, kondisinya sama dengan zona II, hanya lebih tipis. Luasnya sekitar 18 % dari badan SADT. Zona V atau zona reguler, merupakan tempat sel-sel tersebar rata, tidak saling bertumpuk dan bentuk-bentuknya masih asli. Daerah ini meliputi kira-kira 11 % dari badan SADT. Zona VI disebut juga zona tipis, terletak diujung sediaan apus sebelum ekor. Disini sel-sel tersusun lebih longgar, dan umumnya tersusun berderet. Zona ini luasnya sekitar 9 % dari badan SADT<sup>2</sup>.



Gambar 2. Zona-zona pada sediaan apus darah tepi (diambil dari Budiwiyono I)<sup>2</sup>

### 2.2.1. Guna pemeriksaan SADT secara umum<sup>2,9,30,31</sup>

SADT dapat memberi banyak informasi, apabila pemeriksa mempunyai bekal pengetahuan yang cukup. Dengan pemeriksaan SADT hal-hal yang bisa dinilai yaitu :

1. Adanya parasit, sel asing atau sel ganas.
2. Seri eritrosit ; meliputi ukuran, bentuk, warna, benda-benda inklusi dan susunannya.
3. Hitung jenis leukosit, estimasi jumlah dan morfologi seri leukosit.
4. Melakukan estimasi jumlah dan morfologi trombosit.



Keterampilan dalam membuat sediaan yang baik, menjadi syarat penting dalam penilaian sediaan apus tersebut

### 2.2.2 Teknik dan metoda pembuatan SADT <sup>2,9,10,29,30</sup>

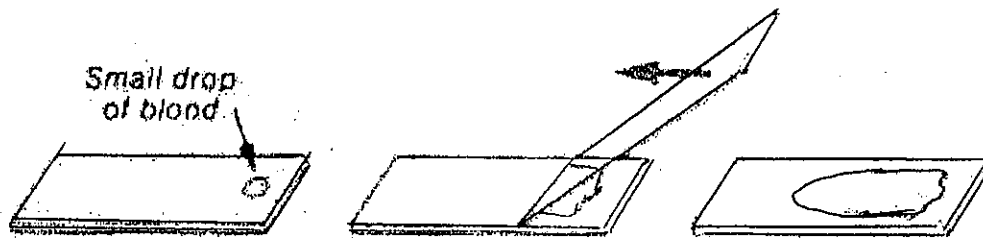
Bahan pemeriksaan untuk pembuatan SADT adalah darah vena yang ditambah dengan anti koagulan EDTA. Peralatan yang dibutuhkan untuk pembuatan adalah :

1. Kaca objek yang bersih, kering, bebas debu dan lemak serta permukaan rata.
2. Penggeser atau *spreader*, dari bahan gelas atau bahan lain dengan tepi yang rata dan lebih sempit dari lebar kaca objek.

Cara atau metode pembuatan SADT ada 3 antara lain :

#### 2.2.2.1. *Two slides / wedge*

Metoda *two slides / wedge* adalah suatu metoda pembuatan SADT dengan menggunakan 2 buah kaca objek. Cara pembuatannya adalah dengan meletakkan 1 tetes kecil darah ( $\pm 5 \mu\text{L}$ ) pada bagian tengah kaca objek, sekitar 1 – 2 cm dari salah satu ujungnya. Kemudian tanpa menunggu, kaca objek yang lain diletakkan (*spreader / penggeser*) membentuk sudut  $45^{\circ}$  dengan kaca objek, dorong kebelakang sehingga menyentuh tetesan darah tadi. Tetesan darah akan menyebar sepanjang kaca penggeser. Pada saat ini, buat apusan dengan cepat namun halus (gerakan rata). Panjang apusan yang baik adalah sekitar 3 – 4 cm. Ketebalan yang baik adalah bila dibagian kepala eritrosit bertumpuk, namun kearah ekor eritrosit hanya bersingungan.



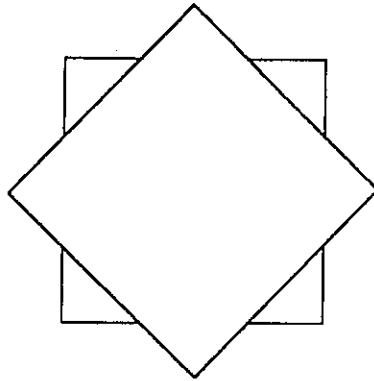
Gambar 3. Pembuatan SADT dengan metoda *two slides* (diambil dari Dalimoenthe NZ)<sup>29</sup>

Keuntungan cara ini adalah : pembuatan apusan darah relatif lebih mudah, kaca objek tidak mudah pecah, pelabelan, pengiriman dan pengecatan lebih mudah, dapat disimpan dan pembacaan preparat lebih mudah karena mempunyai daerah baca, oleh karena itu teknik ini dipilih untuk dilakukan dalam penelitian ini.

#### 2.2.2.2. Coverglass

Metoda *Coverglass* adalah suatu metoda pembuatan SADT dengan menggunakan 2 kaca penutup ukuran 22 x 22 mm, dengan ketebalan 0,13 – 0,17 mm. Cara pembuatannya adalah dengan memegang 1 kaca penutup dengan ibu jari dan jari telunjuk. Satu tetes kecil ( $\pm 5 \mu\text{L}$ ) darah diteteskan pada gelas penutup ini. Dengan tangan yang lain pegang kaca penutup ke 2 juga antara ibu jari dan jari telunjuk. Perlahan-lahan letakkan kaca penutup ke 2 diatas kaca penutup 1, dengan tetesan darah berada diantaranya, dan membentuk *a sixteen-sided figure* (gambar). Segera setelah kedua kaca penutup bersentuhan, darah akan menyebar. Sesaat setelah darah menyebar

secara lengkap, pisahkan kedua kaca penutup, dengan menarik kaca penutup ke 2 (yang sebelah atas) secara horizontal dan lateral.



Gambar 4. Pembuatan SADT dengan metoda *coverglass* (diambil dari Dalimoenthe NZ)<sup>29</sup>

Kekurangan cara ini adalah : pembuatan apusan darah relatif lebih susah, untuk pemberian label, pengiriman dan pengecatan relatif lebih susah karena ukurannya yang kecil dan mudah pecah, tidak baik digunakan untuk estimasi jumlah trombosit karena trombosit menempel pada 2 kaca, tidak ada area baca sehingga sukar untuk melakukan pembacaan SADT.

#### 2.2.2.3. *Spinner method*

Metoda *spinner* adalah suatu metoda pembuatan SADT dengan menggunakan metoda otomatis di mana 1 atau 2 tetes kecil darah ditetaskan pada bagian tengah kaca objek, kemudian dengan alat sentrifus khusus (*hemaspinner*) diputar dengan kecepatan tinggi, sehingga darah akan menyebar pada kaca objek dengan ketebalan 1 lapis sel. Dengan cara ini leukosit dan trombosit akan terdistribusi secara merata dan tidak

mengalami distorsi. Eritrosit cenderung mengalami distorsi, namun hal ini bisa diatasi dengan mencampur darah sebelum diteteskan dengan NaCl fisiologis sama banyak.

### **Pengeringan**

Apusan darah harus segera dikeringkan pada suhu kamar untuk mencegah distorsi eritrosit. Jika sediaan tidak kering dengan sempurna, partikel air akan terlihat setelah pewarnaan yang dapat disalah interpretasikan dengan keadaan hipokrom, selain itu benda inklusi (misalnya Howel-Jolly) atau parasit (malaria) dapat hilang.

### **Fiksasi**

Segera setelah kering, sediaan apus harus segera difiksasi. Bila apusan dibiarkan tanpa difiksasi lebih dari 1 hari, maka plasma akan menyebabkan latar belakang berwarna kebiruan. Pastikan sediaan apus benar-benar kering sebelum memasukkannya kedalam larutan fiksasi. Fiksasi dilakukan dengan merendam sediaan dalam methanol selama 10 – 20 menit.

### **Pewarnaan**

Pewarnaan yang banyak dipakai secara rutin untuk mewarnai SADT adalah pewarnaan dengan prinsip Romanowsky seperti Wright, Giemsa, May Grunwald Giemsa atau Wright Giemsa<sup>15,26</sup>. Penelitian ini menggunakan metoda pengecatan Giemsa karena penelitian ini dilakukan di laboratorium RS Dr. Kariadi yang menggunakan metoda pengecatan tersebut untuk pemeriksaan hitung jenis.

Komponen utama zat warna Romanowsky yang dapat membuat perbedaan warna atas dasar pewarnaan, dan mewarnai granula-granula secara berbeda, tergantung pada 2 komponen, yaitu : Azure B (trimethylthionin) bersifat basa dan Eosin Y

(tetrabromofluorescein) yang bersifat asam. Azur B akan mewarnai komponen sel yang bersifat asam, seperti : kromatin, DNA dan RNA, sedangkan Eosin Y akan mewarnai komponen sel yang bersifat basa, seperti : granula eosinofil dan hemoglobin.

Ikatan Eosin Y pada Azur B yang beragregasi dapat menimbulkan warna ungu, dan keadaan ini disebut efek Romanowsky-Giemsa. Efek ini sangat nyata terjadi pada DNA (terutama dalam inti sel), sehingga terjadi kontras antara inti yang berwarna ungu dengan sitoplasma yang berwarna biru. *International Committee for Standardization in Haematology* menganjurkan penggunaan kedua zat warna ini.

Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil pewarnaan adalah : lamanya pewarnaan, konsentrasi zat warna, rasio Azure B terhadap Eosin Y, dan pH larutan pewarna (buffer pH 6.8 dengan perbandingan 1 : 9 )

### **2.2.3. Kriteria SADT.**

SADT yang baik memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Lebar dan panjangnya tidak memenuhi seluruh kaca objek (  $2/3$  dari panjang kaca objek ).
2. Mempunyai ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal atau tipis).
3. Ujung atau ekornya tidak berbentuk bendera robek.
4. Tidak berlubang-lubang karena kaca objek kurang bersih atau terdapat bekas lemak.
5. Tidak terputus-putus karena gesekan yang ragu-ragu.

### 2.3. HITUNG JENIS LEUKOSIT<sup>2,7,9,10</sup>

Pemeriksaan hitung jenis merupakan salah satu pemeriksaan hematologi rutin yang berguna untuk mengetahui jumlah persentase masing-masing jenis sel.

Sediaan apus untuk pemeriksaan ini dibuat dengan teknik *two slides / wedge*, sediaan apus tidak boleh terlalu tipis dan bagian ekor tidak boleh berbentuk bendera robek. Untuk mendapatkan sediaan apus yang baik dibuat dengan cara menggerakkan penggeser secara cepat dan halus.

Pada sediaan apus yang baik distribusi eritrosit tidak boleh bertumpuk, semakin kearah ekor semakin menipis. Jika sediaan apus terlalu tipis atau menggunakan penggeser yang kasar, hampir 50 % leukosit akan terkumpul di daerah pinggir atau ekor.

Distribusi leukosit pada preparat SADT : neutrofil dan monosit lebih banyak didaerah pinggir dan ekor, sedangkan limfosit berada dibagian tengah sediaan apus.

#### 2.3.1. Metoda penghitungan

Penghitungan sel dilakukan dengan menggunakan pembesaran 40 x objektif, penghitungan dimulai dari ekor preparat, seujung mungkin dengan syarat leukositnya masih baik (utuh dan ciri-cirinya jelas), kemudian lapang pandang digeser kearah badan preparat sampai mencapai zona IV dimana terdapat konsentrasi seri limfosit yang tua.

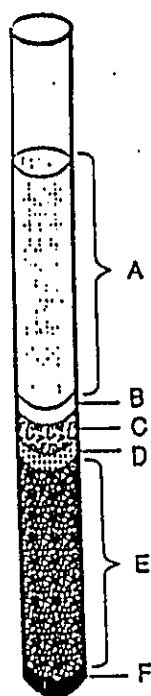
Bila belum mencapai daerah ini (ekor – zona IV) dan sudah terhitung 100 leukosit, maka penghitungan harus diteruskan hingga mencapai zona IV, dan disesuaikan dengan persentase. Sebagai contoh misalnya bila penghitungan hanya sampai zona VI saja karena hasilnya sudah mencapai 100 sel, tentunya hasil yang didapat banyak sel PMN dan monosit, sedangkan limfositnya sedikit.

### 2.3.2. Pelaporan

Hasil pemeriksaan hitung jenis dilaporkan dengan persentase dari masing-masing sel. Bila dalam pembacaan ditemukan eritrosit muda, limfosit plasma biru atau sel-sel lain harus dilaporkan jumlahnya dalam 100 leukosit yang dihitung.

### 2.4. *BUFFY COAT* <sup>31,32,33</sup>

Leukosit dan trombosit akan membentuk lapisan di atas eritrosit pada proses sentrifugasi. Bagian leukosit tersebut dikenal sebagai "*buffy coat*" karena ia berwarna kuning tua. Lapisan paling atas berwarna putih berisi trombosit berada diatas leukosit. *Buffy coat* dapat dipindahkan, dicampur dan digunakan untuk membuat sediaan apus.



Lapisan :

- A. Plasma
- B. Trombosit ( lapisan putih )
- C. Leukosit (lapisan *buffy coat*)
- D. Retikulosit dan eritrosit muda
- E. Eritrosit
- F. Endapan

Gambar 5. Lapisan darah yang terbentuk setelah sentrifugasi (diambil dari Shafer) <sup>33</sup>

Pembuatan sediaan apus *buffy coat* sering dipergunakan sebagai informasi diagnostik dan akan menurunkan harga pemeriksaan. Pembuatan sediaan apus *buffy coat* digunakan untuk :

- Pemeriksaan hitung jenis, bila jumlah leukosit pada saat pemeriksaan hitung jenis dengan sampel darah sel yang terhitung tidak mencapai 100 sel. <sup>34,35</sup>
- Mendeteksi adanya sel abnormal atau imatur (blas atau sel mast) yang biasanya terdapat dalam jumlah sedikit (pansitopenia), eritrosit muda, peningkatan netrofil hipersegmen (anemia megaloblastik), sel plasma yang abnormal, sel tumor yang berada dalam sirkulasi darah.
- Mendiagnosis dini septikemia pada anak, dimana akan terdapat peningkatan jumlah neutrofil. <sup>36</sup>
- Mendeteksi adanya parasit dan tripanosoma <sup>37,38</sup>

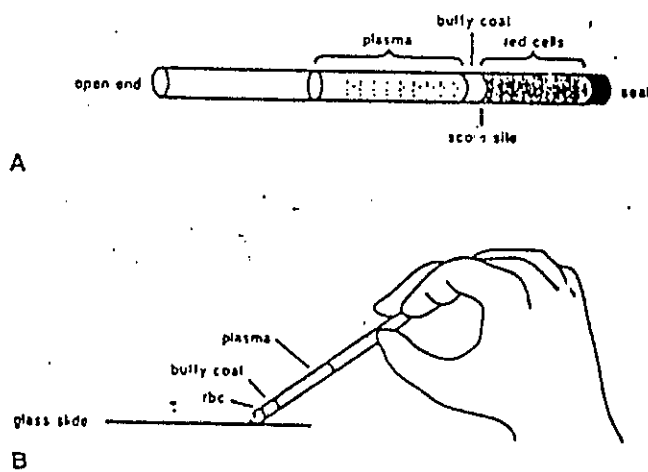
#### 2.4.1. Metoda <sup>33</sup>

##### 2.4.1.1. Teknik Mikrohematokrit

Pembuatan *buffy coat* dengan metoda ini menggunakan tabung mikrohematokrit, antikoagulan yang dipergunakan adalah EDTA.

Cara pembuatan sediaan apus adalah : buat *buffy coat* dengan menggunakan tabung mikrohematokrit, patahkan tabung di bagian bawah lapisan *buffy coat* (sedikit dari bagian eritrosit), teteskan di atas gelas objek, kemudian buat apusan, keringkan, fiksasi dan cat seperti pembuatan SADT. Cara pembacaan sama dengan hitung jenis leukosit dengan menggunakan sampel darah.





Gb.6. Pembuatan sediaan apus *buffy coat*

Untuk penelitian ini teknik mikrohematokrit yang dipilih karena tabung mikrohematokrit mudah didapat dan pembuatannya lebih mudah dibandingkan dengan teknik wintrobe hematokrit.

#### 2.4.1.2. Teknik Wintrobe Hematokrit

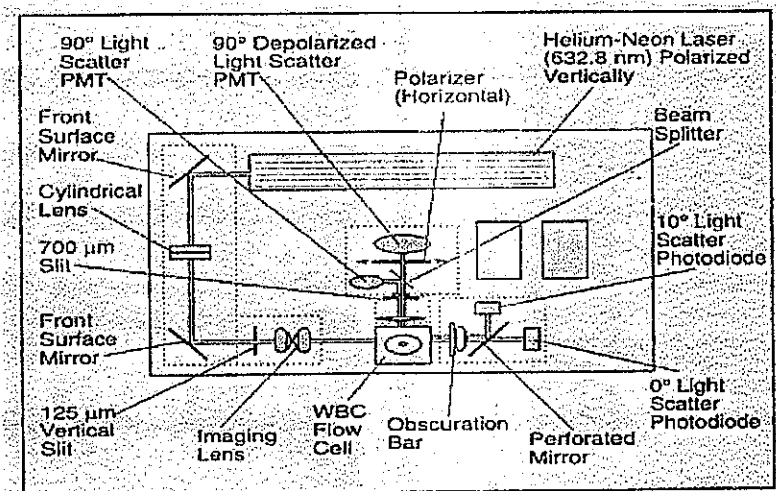
Pembuatan sediaan apus dengan teknik ini menggunakan tabung hematokrit Wintrobe, caranya adalah : Isi tabung hematokrit wintrobe dengan darah yang sudah diberi antikoagulan EDTA, sentrifus selama 6 menit, pindahkan plasma dari tabung, sisakan sedikit, isap sisa plasma, lapisan *buffy coat* dan bagian atas dari lapisan eritrosit kemudian campur hingga rata diatas gelas arloji, ambil satu tetes campuran tersebut dan buat apusan diatas gelas objek, keringkan diudara kamar, fiksasi dan cat. Cara pembacaan sama dengan hitung jenis leukosit dengan menggunakan sampel darah.

## 2.5. HITUNG JENIS MENGGUNAKAN METODA OTOMATIS <sup>3,14,15,39,40</sup>

Alat yang dipakai untuk pemeriksaan hitung jenis adalah *Automated Hematology Analyzer* dengan menggunakan teknologi MAPSS (*Multi Angle Polarized Scatter Separation*) untuk mengklasifikasi sel-sel pada pemeriksaan hitung jenis.

Selama siklus pengukuran, tiap sel masing-masing dikarakterisasi dengan menggunakan 4 sudut hamburan cahaya berikut ini :

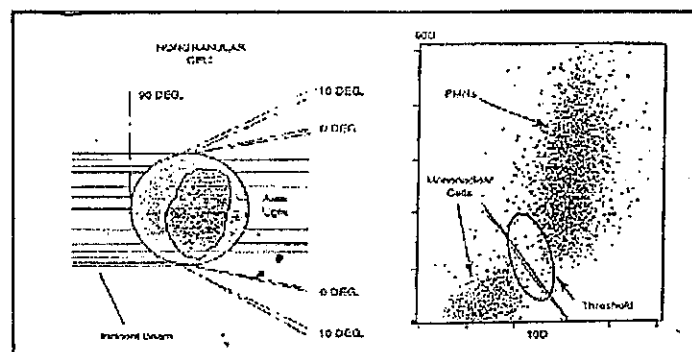
- Hamburan  $0^{\circ}$  menunjukkan ukuran sel.
- Hamburan  $10^{\circ}$  menunjukkan struktur sel bagian internal.
- Hamburan  $90^{\circ}$  menunjukkan lobularitas inti.
- Hamburan  $90^{\circ}$  dan hamburan terpolarisasi  $90^{\circ}$  memisahkan neutrofil dan eosinofil (butiran eosinofil mendepolarisasikan cahaya laser lebih besar dibanding dengan jenis sel lain).



Gb 7. Bagan / skema alat *Automated Hematology Analyzer*

### 2.5.1. Tahap Analisis

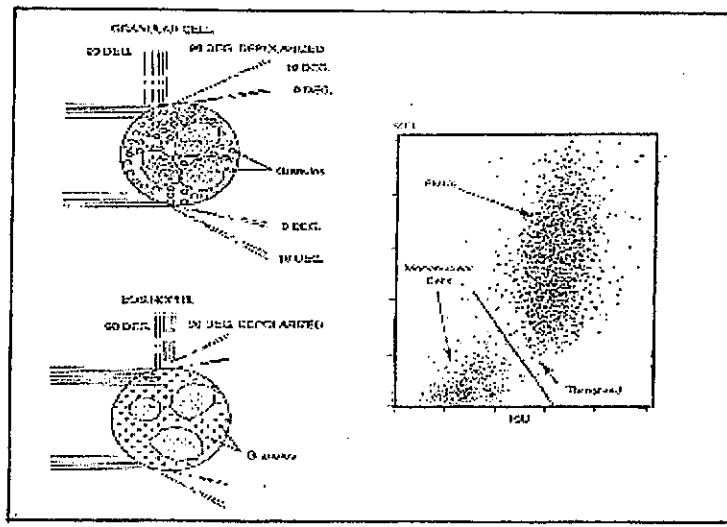
1. Data yang dikumpulkan dari setiap fotodetektor dikumpulkan dalam *List Mode*. *List Mode* adalah suatu tabel untuk mendaftarkan hasil pembacaan tiap sel dan memasukkannya kedalam 4 bagian.
2. Informasi hamburan cahaya disajikan secara grafik dalam bentuk *scatter plot*.
  - Tiap sel yang dianalisis digambarkan oleh satu titik pada *scatter plot*.
  - Titik-titik di plot pada tempat yang ditentukan oleh perpotongan informasi *channel* yang dibuat pada sumbu X dan Y.
  - Informasi dapat diplot dalam berbagai macam kombinasi untuk mendapatkan informasi yang berbeda-beda.
3. Pemisahan mononuklear dan polimorfonuklear menggunakan *scatter plot*  $90^{\circ} / 10^{\circ}$ .
  - Sistem menggunakan ambang batas untuk menentukan pemisahan yang terbaik antara dua populasi tersebut.
  - Setelah setiap sel diidentifikasi, klasifikasi ditetapkan untuk sel tersebut, dimanapun sel berada tampak pada *scatter plot* lainnya.



Gb 8. Pemisahan Mononuklear dan Polimorfomuklear

4. Pemisahan neutrofil dan eosinofil menggunakan plot hamburan terdepolarisasi  $90^0/90^0$ .

- Sel-sel mononuklear telah diidentifikasi terlebih dahulu sehingga tidak akan mengganggu dalam mengklasifikasi sel polimorfonuklear.
- Sistem menggunakan ambang batas untuk menentukan pemisahan yang terbaik antara eosinofil dan neutrofil.
- Eosinofil menghamburkan cahaya terdepolarisasi  $90^0$  lebih besar dibanding sel lainnya karena sifat khas dari granulanya, sifat ini secara jelas membedakannya dari populasi neutrofil.

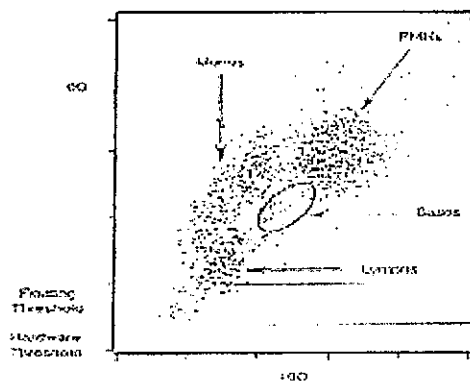


Gb 9. Pemisahan neutrofil dan eosinofil

5. Pemisahan mononuklear menggunakan *scatter* plot  $0^0 / 10^0$ .

- Limfosit, monosit dan basofil dapat dipisahkan (granula basofil bersifat larut dalam reagen sheat). Basofil yang kehilangan bentuk granulanya menjadi sel yang kurang komplek yang masuk kedalam kelompok mononuklear.

- Sistem ini menggunakan ambang batas untuk menentukan pemisahan terbaik antara ketiga populasi ini.
- Area dibawah kelompok limfosit tetapi diatas ambang *hardware* ditentukan dengan ambang batas.
- Ambang *hardware* adalah suatu tingkat tegangan spesifik bersifat tetap yang disetel oleh pabrik, dimana setiap pulsa sel dibandingkan dengannya. Jika suatu pulsa cocok setelah dibandingkan terhadap kriteria tegangan ini, pulsa dimasukkan dalam data untuk dianalisa lebih lanjut oleh stasiun data.



Gb 10. Pemisahan mononuklear

6. *Scatter plot* leukosit dihasilkan dan sel-sel diklasifikasikan kedalam lima sub populasi

dengan perbedaan warna :

- Kuning : neutrofil.
- Biru : limfosit.
- Ungu : monosit.
- Hijau : eosinofil
- Putih : basofil.

7. Algoritma kemudian menetapkan persentasi sel dalam setiap sub populasi.

*Automated Hematology Analyzer* (Cell Dyn 3700) mempunyai kemampuan pemeriksaan hitung jenis dengan akurasi tinggi yaitu dapat melakukan pemeriksaan dengan jumlah leukosit antara 0 – 250.000 dengan sensitivitas sebesar 90 % dan spesifisitas 80 %.<sup>39</sup>

### 2.5.2. *Flagging*

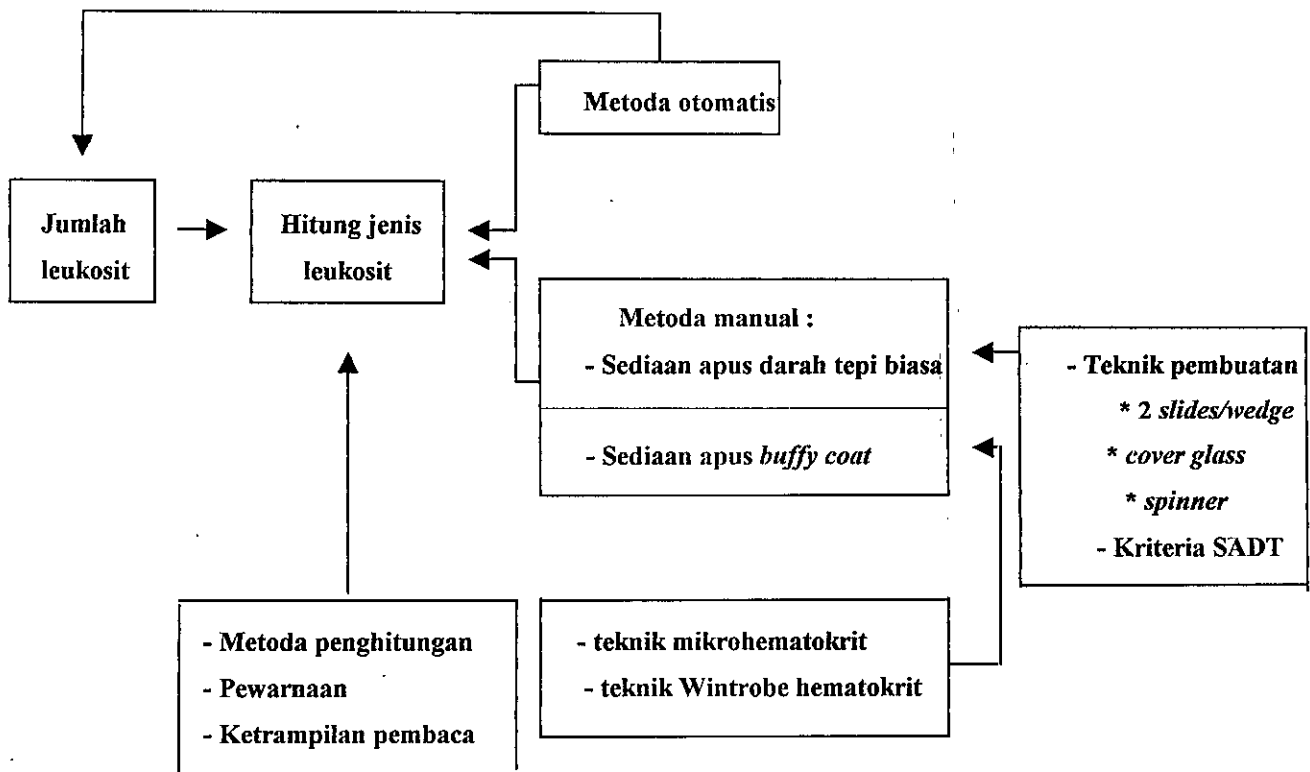
*Flagging* adalah suatu tanda yang tertera / terdapat pada hasil pemeriksaan menggunakan metoda otomatis. *Flagging* terjadi bila data tidak memenuhi kriteria yang ditetapkan. Lebih dari satu *flagging* dapat dihasilkan oleh suatu sampel tunggal.

Macam-macam *flagging* :

- **WBC Flag** ; penyebabnya adalah eritrosit yang resisten atau tidak dapat dikisiskan.
- **DLTA Flag** ; menunjukkan adanya abnormalitas suatu spesimen yang dideteksi.
- **DIFF (NLMEB) Flag** ; terjadi karena adanya kelompok sel yang abnormal yang tidak dapat dibedakan secara mantap oleh instrumen, selain itu dapat juga disebabkan oleh sejumlah kecil sel yang abnormal dalam suatu sub populasi tertentu.
- **IG Flag** ; penyebabnya adalah cacah dalam daerah hamburan (pada plot  $0^0 / 10^0$ ) dimana terdapat granulosit muda sebanyak  $\geq 3$  % dari jumlah cacah leukosit.
- **BAND Flag** ; penyebabnya adalah : cacah dalam daerah hamburan (pada plot  $0^0 / 10^0$ ) dimana terdapat neutrofil batang sebanyak  $\geq 12,5$  % dari jumlah cacah leukosit, jumlah neutrofil batang melebihi neutrofil segmen dan koefisien variasi neutrofil pada sumbu  $0^0$  melampaui kriteria.

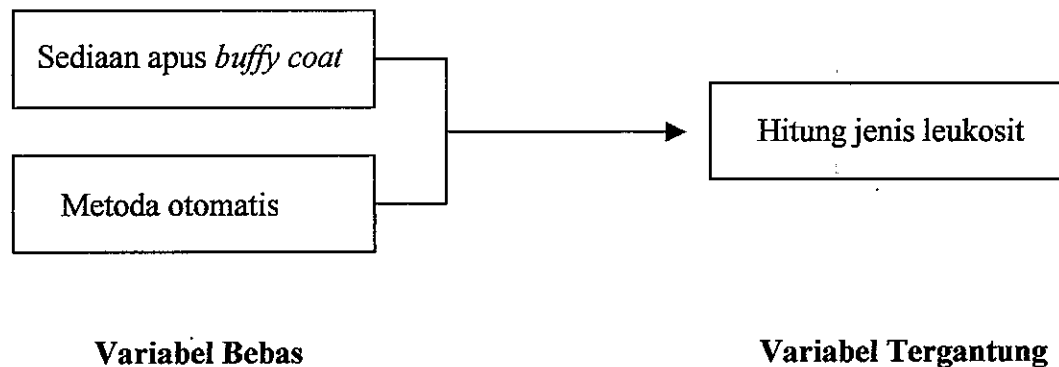
- **VARIANT LYM flag** ; penyebabnya adalah posisi, kepadatan atau koefisien variasi pengelompokkan limfosit pada ukuran / kompleksitas *scatter plot* ( $0^0 / 10^0$ ) melebihi kriteria yang diharapkan.
- **BLAST flag** ; penyebabnya adalah : cacah dalam daerah hamburan (pada plot  $90^0 / 0^0$ ) didapat adanya sel blas  $\geq 20$  % dari jumlah cacah leukosit, persentase monosit  $\geq 20$  % dari cacah total leukosit, persentase monosit  $> 3$  % dari cacah total leukosit dan simpang baku monosit pada sumbu  $0^0$  melampaui kriteria yang diharapkan.

## 2.6. KERANGKA TEORI





## 2.7. KERANGKA KONSEP



## 2.8. HIPOTESIS

Tidak terdapat perbedaan antara pemeriksaan hitung jenis menggunakan sediaan apus *buffy coat* dengan pemeriksaan hitung jenis menggunakan metoda otomatis.

## 2.9. VARIABEL DAN DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

Hitung jenis leukosit menggunakan material *buffy coat* :

Pemeriksaan untuk menghitung jumlah masing-masing sel leukosit menggunakan material *buffy coat*, dengan cara menghitung sel leukosit sampai berjumlah 100 sel, jumlah masing-masing sel dihitung berdasarkan persentasenya.

Hitung jenis leukosit menggunakan metoda otomatis :

Pemeriksaan hitung jenis menggunakan alat *Automated Hematology Analyzer* dengan menggunakan teknologi MAPSS (*Multi Angle Polarized Scatter Separation*) untuk mengklasifikasi sel-sel pada pemeriksaan hitung jenis.

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1. RANCANGAN PENELITIAN**

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif analitik dengan pendekatan belah lintang.

#### **3.2. RUANG LINGKUP PENELITIAN**

##### **3.2.1. Lingkup Wilayah**

Wilayah yang digunakan untuk penelitian ini adalah Bagian Anak dan Bagian Penyakit Dalam RS Dr. Kariadi Semarang, sedangkan pemeriksaan material dilakukan di laboratorium sub divisi Patologi Klinik RS Dr. Kariadi Semarang.

##### **3.2.2. Lingkup Ilmu**

Bidang ilmu yang diteliti adalah ilmu Patologi Klinik dengan titik berat pada cabang ilmu Hematologi.

#### **3.3. POPULASI**

Populasi penelitian ini adalah : subyek rawat inap yang oleh klinisi dimintakan pemeriksaan hematologi rutin pada laboratorium sub divisi Patologi Klinik RS Dr. Kariadi Semarang.

### 3.4. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI

#### Kriteria inklusi :

1. Jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ .
2. Material tidak hemolisis.
3. Material tidak ada bekuan.
4. Semua umur dan jenis kelamin.

Kriteria eksklusi : *Flagging* pada hasil pemeriksaan jumlah leukosit dan hitung jenis dengan *Automated Hematology Analyzer*.

### 3.5. BESAR SAMPEL <sup>41</sup>

Besar sampel dihitung berdasarkan rumus sampel tunggal dengan uji hipotesis yaitu :

$$n = \left[ \frac{(Z\alpha + Z\beta) S}{(Xa - X_0)} \right]^2$$

$Z\alpha$  = 1,960 ( tingkat kemaknaan  $\alpha = 0,05$  )

$Z\beta$  = 0.842 ( power penelitian  $\beta = 80\%$  )

$S$  = 22,67 ( simpang baku, ditetapkan peneliti berdasarkan penelitian pendahuluan )

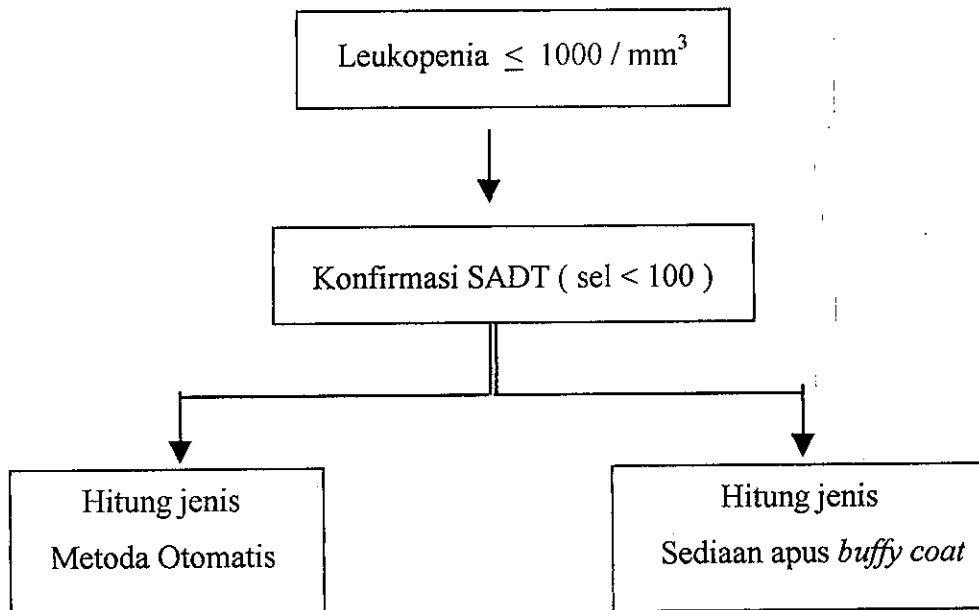
$Xa - X_0$  = 13 ( perbedaan klinis, ditetapkan peneliti, berdasarkan

perbedaan terbesar hitung jenis neutrofil segmen antara pemeriksaan dengan *buffy coat* dan metoda otomatis pada penelitian pendahuluan )

Perhitungan yang diperoleh :

$$\begin{aligned} n &= \left[ \frac{(1,96 + 0,842) \times 22,67}{13} \right]^2 \\ &= (4,88)^2 \\ &= 23,81 \rightarrow \text{dibulatkan menjadi } 24 \end{aligned}$$

### 3.6. STRATEGI PEMERIKSAAN



### 3.7. CARA PEMERIKSAAN

#### 3.7.1. Sampling darah vena

Darah vena diambil sebanyak  $\pm$  3 ml dari vena mediana cubiti yang sudah didesinfeksi dengan alkohol. Darah dimasukkan dalam tabung yang berisi antikoagulan Na<sub>2</sub> EDTA dengan konsentrasi 1,5 mg/ml dan dicampur dengan baik.

#### 3.7.2. Pemeriksaan hitung jenis leukosit dengan SADT

Alat dan bahan <sup>2,9,10,29,30</sup>

- Kaca obyek ukuran 25 x 75 mm. Kaca obyek harus bersih dan kering.
- Penggeser atau *spreader* dari bahan gelas atau bahan lain, dengan syarat tepinya rata dan lebih sempit dari lebar kaca obyek.
- Batang gelas.
- Metanol
- Cat Giemsa

Cara kerja :

- Satu tetes kecil darah ditetaskan dan diaduk dengan menggunakan batang gelas, diletakkan 1 –2 cm dari salah satu ujung kaca obyek.
- Penggeser diletakkan dengan sudut 30-40 derajat terhadap kaca obyek di depan tetesan darah. Penggeser ditarik ke belakang sehingga menyentuh tetes darah, tunggu sampai darah menyebar pada sudut tersebut.

- Penggeser didorong dengan gerak yang mantap sehingga terbentuk apusan sepanjang 3-4 cm pada kaca obyektif, apusan darah dibiarkan mengering di udara, dan diberikan identitas pasien.
- Sediaan diletakkan pada bak tempat pewarnaan dan ditunggu sampai kering, fiksasi dengan metil alkohol selama 5 menit kemudian digenangi dengan larutan Giemsa yang telah diencerkan (1 : 9) selama 20 menit dan bilas dengan air suling mengalir dan dibiarkan mengering dalam rak dengan posisi tegak.

### **3.7.3. Pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan *buffy coat***

#### **3.7.3.1. Cara membuat *buffy coat***

Alat – alat<sup>33</sup> :

- Tabung mikrohematokrit (mengandung heparin).
- Sentrifus.

Cara Kerja :

- Tabung mikrohematokrit diisi dengan darah sebanyak  $\frac{3}{4}$  bagian tabung.
- Salah satu ujung tabung ditutup dan di letakkan pada pemusing mikrohematokrit, putar selama 5 menit dengan kecepatan 2000 – 2500 rpm
- Pada tabung akan terlihat lapisan-lapisan mulai dari atas : plasma, leukosit (*buffy coat*), eritrosit dan endapan.

### 3.7.3.2. Pembuatan sediaan apus dengan sampel *buffy coat*

Alat dan bahan <sup>33</sup> :

- Kaca obyek ukuran 25 x 75 mm. Kaca obyek harus bersih dan kering.
- Penggeser atau *spreader* dari bahan gelas atau bahan lain, dengan syarat tepinya rata dan lebih sempit dari lebar kaca obyek.
- Batang gelas.
- Metanol
- Cat Giemsa

Cara kerja :

- Tabung diberi tanda pada bagian bawah lapisan *buffy coat*.
- Tabung dipatahkan ditempat yang sudah ditandai.
- Bagian tabung yang berisi plasma ditahan, *buffy coat* dan eritrosit diantara ibu jari dan jari tengah dengan jari telunjuk berada diatas tabung untuk mengontrol aliran cairan.
- Ujung tabung disentuh pada gelas objek yang bersih, kemudian eritrosit, *buffy coat* dan sedikit plasma akan keluar keatas gelas objek.
- Satu tetes kecil *buffy coat* ditetaskan dan diaduk dengan menggunakan batang gelas, diletakkan 1 –2 cm dari salah satu ujung kaca obyek.
- Penggeser diletakkan dengan sudut 30-40 derajat terhadap kaca obyek di depan tetesan *buffy coat*. Penggeser ditarik ke belakang sehingga menyentuh tetes *buffy coat*, tunggu sampai darah menyebar pada sudut tersebut.

- Penggeser didorong dengan gerak yang mantap sehingga terbentuk apusan sepanjang 3-4 cm pada kaca obyek, apusan *buffy coat* dibiarkan mengering di udara, dan diberikan identitas pasien.
- Sediaan diletakkan pada bak tempat pewarnaan dan ditunggu sampai kering, fiksasi dengan metil alkohol selama 10 - 20 menit kemudian digenangi dengan larutan Giemsa larutan *stock* yang telah diencerkan (1 : 9) selama 20 menit dan bilas dengan air suling mengalir dan dibiarkan mengering dalam rak dengan posisi tegak.

Pemeriksaan hitung jenis *buffy coat* ini dilakukan oleh 2 orang pemeriksa yang keduanya tidak saling mengetahui hasil pemeriksaan masing-masing. Cara pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop lensa objektif pembesaran 40x. Penghitungan dimulai dari ekor preparat, seujung mungkin dengan bentuk leukosit yang masih baik (utuh dan jelas ciri-cirinya), kemudian lapangan pandang digeser kearah badan preparat sampai mencapai zona IV .

Bila belum mencapai daerah ini (ekor – zona IV) dan sudah terhitung 100 leukosit, maka perhitungan harus diteruskan hingga mencapai zona IV. Hasil pemeriksaan hitung jenis dilaporkan dengan persentase dari masing-masing sel.

#### **3.7.4. Pemeriksaan hitung jenis dengan menggunakan metoda otomatis**

Alat dan bahan<sup>39</sup> :

- Darah yang sudah diberi anti koagulan EDTA.
- Reagen *Cell Dyn 3700*.
- Alat *Automated Hematology Analyzer Cell Dyn 3700*.



Cara kerja :

- Disiapkan alat *Automated Hematology Analyzer Cell Dyn 3700*.
- Tabung berisi bahan darah EDTA didekatkan dengan jarum penghisap sampel, tekan tombol penghisap sampel. Selanjutnya tes berjalan secara otomatis. Hasil tes tampak pada kertas *print out*.

### 3.8. ANALISIS DATA

Data primer yang didapat ditabulasi dan dimasukkan sebagai data komputer. Kemudian dilakukan uji statistik deskriptif menggunakan perangkat lunak SPSS PC versi 10.0 dengan rincian :

1. Untuk menentukan distribusi data normal atau tidak dilakukan uji Shapiro-Wilk.
2. Analisis hasil pemeriksaan hitung jenis *buffy coat* pembaca I dan pembaca II menggunakan uji beda  $t$  berpasangan (bila data normal) atau uji non parametrik dengan uji Signed Rank Test (bila data tidak normal).
3. Analisis hasil pemeriksaan hitung jenis *buffy coat* dan hitung jenis metoda otomatis menggunakan uji beda  $t$  berpasangan (bila data normal) atau uji non parametrik dengan uji Signed Rank Test (bila data tidak normal).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada kurun waktu Desember 2004 sampai dengan Pebruari 2005 didapatkan sampel untuk pemeriksaan hitung jenis sebanyak 26 yang memenuhi kriteria inklusi (jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ , material tidak hemolisis dan tidak ada bekuan, semua umur) serta kriteria eksklusi (tidak ada *flagging* pada pemeriksaan otomatis).

Tabel 1. Data deskripsi pemeriksaan hitung jenis sediaan apus *buffy coat* dan metoda otomatis

	Minimal (%)	Maksimal (%)	Rerata	Simpang Baku
Eosinofil otomatis	0	5	1,269	1,402
Eosinofil <i>buffy coat</i>	0	5	1,346	1,495
Basofil otomatis	0	2	0,962	0,720
Basofil <i>buffy coat</i>	0	2	0,539	0,581
Neutrofil otomatis	12	75	43,462	21,159
Neutrofil <i>buffy coat</i>	14	77	44,000	21,841
Limfosit otomatis	19	83	48,462	22,209
Limfosit <i>buffy coat</i>	17	84	49,539	21,783
Monosit otomatis	1	9	4,846	2,239
Monosit <i>buffy coat</i>	0	8	4,500	2,121

Dari 26 sampel tersebut diteliti dan dianalisis. Pembacaan sediaan apus *buffy coat* diusahakan tidak bersifat subyektif, sehingga dilakukan pembacaan oleh 2 orang sesuai

pembacaac yang benar dan dibandingkan hasilnya. Masing-masing pembaca preparat mempunyai catatan tersendiri tanpa saling mengetahui hasil yang didapatkan.

Hasil pemeriksaan uji beda pada sediaan apus *buffy coat* antara pembaca I dan II tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik untuk eosinofil, basofil, neutrofil, limfosit dan monosit. Sehingga data yang diperoleh dari pembaca I dapat dianalisis lebih lanjut.

Berdasarkan hasil tersebut kemudian dilakukan uji beda antara pemeriksaan hitung jenis sediaan apus *buffy coat* dan hitung jenis meggunakan metoda otomatis yang sebelumnya dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk untuk mengetahui distribusi data apakah data tersebut normal atau tidak.

Tabel 2. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk

	Shapiro-Wilk ( p : > 0,05 )
Eosinofil otomatis	0,010
Eosinofil <i>buffy coat</i>	0,010
Basofil otomatis	0,010
Basofil <i>buffy coat</i>	0,010
Neutrofil otomatis	0,019
Neutrofil <i>buffy coat</i>	0,012
Limfosit otomatis	0,010
Limfosit <i>buffy coat</i>	0,058
Monosit otomatis	0,400
Monosit <i>buffy coat</i>	0,362

Dari tabel diatas terlihat bahwa distribusi data normal terdapat pada limfosit *buffy coat*, monosit *buffy coat* dan monosit otomatis, sedangkan distribusi data yang tidak normal terdapat pada eosinofil *buffy coat*, basofil *buffy coat*, neutrofil *buffy coat*, eosinofil otomatis, basofil otomatis, neutrofil otomatis dan limfosit otomatis. Hasil uji beda tampak pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji beda antara pemeriksaan hitung jenis sediaan apus *buffy coat* dan metoda otomatis.

	Uji Beda
Eosinofil	$Z = -0,816$ ; $p = 0,414$
Basofil	$Z = -2,810$ ; $p = 0,005$
Neutrofil	$Z = -1,052$ ; $p = 0,293$
Limfosit	$Z = -0,475$ ; $p = 0,634$
Monosit	$t = 1,886$ ; $p = 0,071$

Berdasarkan hasil perhitungan statistik pada tabel diatas terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada hitung jenis eosinofil (  $p = 0,414$  ), neutrofil (  $p = 0,293$  ), limfosit (  $p = 0,634$  ) dan monosit (  $p = 0,071$  ) antara metoda otomatis dan *buffy coat*, hal ini sesuai dengan teori Turgeon ML dan DeNunzio J yang menyatakan bahwa *buffy coat* yang dibuat sediaan apus dapat digunakan untuk pemeriksaan hitung jenis, bila jumlah leukosit pada saat pemeriksaan hitung jenis dengan sampel darah sel yang terhitung tidak mencapai 100 sel.<sup>34,35</sup> dimana tampak morfologi dan ukuran sel eosinofil, neutrofil, limfosit dan monosit tidak mengalami perubahan pada saat pembuatan sediaan apus *buffy coat* sehingga pada hasil pemeriksaan tidak terdapat

perbedaan secara statistik dengan metoda otomatis yang menggunakan *scatter plot* dalam melakukan pemeriksaan hitung jenis

Terdapat perbedaan bermakna pada hitung jenis basofil (  $p = 0,005$  ) antara metoda otomatis dan *buffy coat*, hal ini mungkin disebabkan granula basofil akan hilang selama proses pengecatan karena sifatnya yang larut dalam air, hal ini yang menyebabkan pada pemeriksaan hitung jenis sediaan apus *buffy coat* sering kali tidak tampak <sup>42</sup>, sedangkan pada metoda otomatis basofil yang kehilangan bentuk granulanya menjadi sel yang kurang komplek yang masuk kedalam kelompok mononuklear dan dipisahkan dengan sel mononuklear lainnya (limfosit dan monosit) dengan menggunakan *scatter plot*  $0^0 / 10^0$  dan pada *print out* basofil berwarna putih. <sup>39</sup>

## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. SIMPULAN

5.1.1. Hasil pemeriksaan hitung jenis eosinofil menggunakan preparat *buffy coat* didapatkan hasil : minimal 0 %, maksimal 5 %, rerata 1,346 dan simpang baku 1,495.

Hasil pemeriksaan hitung jenis basofil menggunakan preparat *buffy coat* didapatkan hasil : minimal 0 %, maksimal 2 %, rerata 0,539 dan simpang baku 0,581.

Hasil pemeriksaan hitung jenis neutrofil menggunakan preparat *buffy coat* didapatkan hasil : minimal 14 %, maksimal 77 %, rerata 44,000 dan simpang baku 21,841.

Hasil pemeriksaan hitung jenis limfosit menggunakan preparat *buffy coat* didapatkan hasil : minimal 17 %, maksimal 84 %, rerata 49,539 dan simpang baku 21,783.

Hasil pemeriksaan hitung jenis monosit menggunakan preparat *buffy coat* didapatkan hasil : minimal 0 %, maksimal 8 %, rerata 4,500 dan simpang baku 2,121.

5.1.2. Hasil pemeriksaan hitung jenis eosinofil menggunakan metoda otomatis didapatkan hasil : minimal 0 %, maksimal 5 %, rerata 1,269 dan simpang baku 1,402.

Hasil pemeriksaan hitung jenis basofil menggunakan metoda otomatis didapatkan hasil : minimal 0 %, maksimal 2 %, rerata 0,962 dan simpang baku 0,720.

Hasil pemeriksaan hitung jenis neutrofil menggunakan metoda otomatis didapatkan hasil : minimal 12 %, maksimal 75 %, rerata 43,462 dan simpang baku 21,159.

Hasil pemeriksaan hitung jenis limfosit menggunakan metoda otomatis didapatkan hasil : minimal 19 %, maksimal 83 %, rerata 48,462 dan simpang baku 22,209.

Hasil pemeriksaan hitung jenis monosit menggunakan metoda otomatis didapatkan hasil : minimal 1 %, maksimal 9 %, rerata 4,846 dan simpang baku 2,239.

5.1.3. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis eosinofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

Terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis basofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis neutrofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis limfosit antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis monosit antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

## 5.2. SARAN

Sediaan apus dengan material *buffy coat* dapat digunakan dalam pemeriksaan hitung jenis leukosit dengan jumlah yang sedikit (leukopenia) terutama didaerah yang belum mempunyai alat hitung sel darah otomatis.



## BAB VI

### RINGKASAN

Pemeriksaan hitung jenis merupakan salah satu pemeriksaan hematologi rutin yang berguna untuk mengetahui jumlah persentase masing-masing jenis sel yang merupakan bagian dari pemeriksaan apus darah tepi. Pada keadaan leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ , banyaknya sel leukosit yang ditemukan pada pemeriksaan hitung jenis tidak mencapai 100 sel. Pelaporan pemeriksaan hitung jenis pada pasien tersebut hanya ditulis jumlah tiap jenis sel yang ditemukan pada zona baca walaupun tidak mencapai 100 sel, sehingga apabila ada kekurangan pada jenis-jenis sel (neutropenia, limfopenia, monositopenia, eosinopenia atau basopenia) tidak dapat diketahui.

*Buffy coat* adalah suatu lapisan berwarna kuning tua yang berisi leukosit dan trombosit yang terbentuk setelah proses sentrifugasi, dapat dipindahkan, dicampur dan digunakan untuk membuat sediaan apus. Pembuatan sediaan apus *buffy coat* sangat mudah, dan sering dipergunakan sebagai informasi diagnostik antara lain untuk : pemeriksaan hitung jenis, mendeteksi adanya sel abnormal atau imatur, mendiagnosis dini septikemia pada anak, dan mendeteksi adanya parasit.

Pemeriksaan hitung jenis sekarang dapat dilakukan dengan metoda otomatis, alat yang dipakai adalah *Automated Hematology Analyzer* dengan menggunakan teknologi MAPSS (*Multi Angle Polarized Scatter Separation*) untuk mengklasifikasi sel-sel pada pemeriksaan hitung jenis yang dikarakterisasikan dengan menggunakan 4 sudut hamburan cahaya : hamburan  $0^0$  menunjukkan ukuran sel,  $10^0$  menunjukkan struktur sel bagian internal,  $90^0$  menunjukkan lobularitas inti,  $90^0$  dan terpolarisasi  $90^0$  memisahkan

neutrofil dan eosinofil. *Automated Hematology Analyzer* (Cell Dyn 3700) yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kemampuan pemeriksaan hitung jenis dengan akurasi tinggi yaitu dapat melakukan pemeriksaan dengan jumlah leukosit antara 0 – 250.000 dengan sensitivitas sebesar 90 % dan spesifisitas 80 %.

Pemeriksaan dengan metoda otomatis ini relatif mahal dan tidak semua laboratorium di Indonesia dapat mengerjakan. Metoda alternatif dapat dilakukan untuk pemeriksaan hitung jenis pada leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$  ini dengan membuat sediaan apus *buffy coat* (material diambil dari *buffy coat*), dan dicat dengan pengecatan Giemsa. Cara ini relatif murah dan dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan pemeriksaan hitung jenis antara sediaan apus *buffy coat* dengan pemeriksaan hitung jenis metoda otomatis pada leukopenia.

Manfaat penelitian ini adalah dapat menjadi alternatif cara untuk pemeriksaan hitung jenis pada leukopenia dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$  yang relatif murah dan dapat dikerjakan di setiap laboratorium terutama laboratorium menengah, kecil atau Puskesmas yang tidak mempunyai alat *Automated Hematology Analyzer* (metoda otomatis).

Rancangan penelitian ini adalah deskriptif analitik dengan pendekatan belah lintang. Tempat penelitian adalah Bagian Anak dan Bagian Penyakit Dalam RS Dr. Kariadi Semarang, sedangkan pemeriksaan material dilakukan di laboratorium sub divisi Patologi Klinik RS Dr. Kariadi Semarang. Penelitian dilakukan sejak bulan Desember

2004 sampai Pebruari 2005. Subyek adalah yang memenuhi kriteria inklusi : semua umur tanpa membedakan jenis kelamin dengan jumlah leukosit kurang atau sama dengan  $1000 / \text{mm}^3$ , material tidak hemolisis dan tidak ada bekuan serta kriteria eksklusi : bila terdapat *flagging* pada hasil pemeriksaan jumlah leukosit dan hitung jenis dengan *Automated Hematology Analyzer*.

Didapatkan 26 sampel yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Pemeriksaan hitung jenis dilakukan pada masing-masing sampel dengan menggunakan metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

Hasil penelitian ini tidak terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis eosinofil, neutrofil, limfosit dan monosit dan terdapat perbedaan bermakna antara hasil pemeriksaan hitung jenis basofil antara metoda otomatis dan sediaan apus *buffy coat*.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Hoffbrand AV, Petit JE. Sel darah putih. Dalam : Hoffbrand AV, Petit JE eds. Kapita selekta hematology, terjemahan Darmawan I. Jakarta. EGC Penerbit buku kedokteran, 1996 : p 102 – 12.
2. Budiwiyono I. Prinsip pemeriksaan Preparat Apus Darah Tepi. Dalam : Workshop Hematologi III. Semarang. Bagian Patologi Klinik FK UNDIP, 1995 : p 19 – 26.
3. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. *Journal of Clinical Pathology*, 2001 ; 54 : 7 – 19.
4. James JS. AZT : Doubts on new survival paper. *AIDS Treatment News*. Juni 1994.
5. MacFarlane MP, Yang JL, Guleria AS, White RL, Seipp CA, Einhorn JH, White DE, Rosenberg SA. The hematologic toxicity of interleukin 2 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer* 1995 ; vol 91, 456 – 60.
6. Watts RG. Neutropenia. In : Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al eds. *Wintrobe's clinical hematology* 10<sup>th</sup> ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1999 : p 1862 – 80.
7. Reinhardt PH, Kubes P. Differential Leukocyte Recruitment From Whole Blood Via Endothelial Adhesion Molecules Under Shear Conditions. *Blood* ; 1998, Vol. 92, No. 12 : 4691-9.
8. Turgeon ML. *Clinical Hematology- Theory and Procedures*, 2<sup>nd</sup> ed. Boston, Little Brown and Company, 1993 : p 137.
9. Terrell JC. Laboratory Evaluation of Leukocytes. In : Martin AS, Steininger CL, Koepke JA. *Clinical Hematology Principles, Procedures, Correlations*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 1998 : p 335 – 9.

10. Bain BJ, Bates I. Basic Haematological Techniques. In : Lewis SM, Bain BJ, Bates I eds. Dacie and Lewis – Practical Haematology. 9<sup>th</sup> ed. London. Churchill Livingstone, 2001 : p 25 – 7.
11. Skubitz KM. Neutrophilic Leukocytes. In : Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al eds. Wintrobe's clinical hematology 10<sup>th</sup> ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1999 : p 316 – 18.
12. Dotson MA. Multiparameter Hematology Instruments. In : Martin AS, Steininger CL, Koepke JA. Clinical Hematology Principles, Procedures, Correlations, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, 1998 : p 532 – 8.
13. Meer WVD, Dinnissen JWB, Keijzer MHD, Scott CS. Comparative evaluation of automated leukocyte differentials and flagging. Blood 2002, vol 8. 102 – 17.
14. Lantis KL, Harris RJ, Davis G, et al. Elimination of instrument-driven reflex manual differential leukocyte counts. Optimization of manual blood smear review criteria in a high-volume automated hematology laboratory. Am J Clin Pathol, 2003; 119: 656-62.
15. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. Arch Pathol Lab Med, 2002. Mar;126(3):336-42.
16. Lakshman R, Finn A. Neutrophil disorders and their management. Journal of Clinical Pathology, 2001 ; 54 : 7 – 19.
17. Haurie C, Dale DC, Mackey MC. Cyclical Neutropenia and Other Periodic Hematological Disorders: A Review of Mechanisms and Mathematical Models. Blood, 1998. Blood, Vol. 92 No. 8 : 2629 - 40.

18. Dale DC. Neutrophil elastase and neutropenia. *Blood*, 1 Juni 2004, vol 103, No 11, 3993 – 4.
19. Phillips D, Rezvani K, Bain BJ. Exercise induced mobilization of the margined granulocyte pool in the investigation of ethnic neutropenia. *Journal of Clinical Pathology*, 2000 ; 53 : 481 – 83.
20. Friedenberg WR. Disorders of granulocytes : qualitative and quantitative. In : Mazza JJ eds. *Manual of clinical hematology*, 2<sup>nd</sup> ed. Toronto ; Little Brown and co, 2002 : p 155 – 79.
21. Davey FR, Hutchinson RE. Leucocytic disorders. In : Henry JB eds. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 17<sup>th</sup> ed. Philadelphia ; WB Saunders Co, 1996 : p 664 - 76
22. Witte DL, Vanness SA, Angstadt DS, Pannel BJ. Error, mistakes, blunders outliers, or unaccept table result : how many ?. *Clin Chem*, 1997 ; vol 79 : 789 – 92.
23. Newland AC, Evans TGJR. ABC of clinical haematology : Haematological disorders at the extreme of life. *BMJ*, 1997 ; 314 : 1262.
24. Persson T, Andersson P, Bodelsson M, Laurell M, Malm J, Egesten A. Bactericidal Activity of Human Eosinophilic Granulocytes against *Escherichia coli*. *Journal of Infection and Immunity*, Juni 2001, vol 69, 3591 – 6.
25. Kobayashi H, Gleich GJ, Butterfield JH, Kita H. Human eosinophils produce neutrophins and secrete nerve growth factor on immunologic stimuli. *Blood*, 2002 ; vol 99, no. 6 : 2214 – 20.
26. Dvorak AM, MacGlashan DW, Morgan ES, Lichtenstein LM. Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils. *Blood*, 1996 ; vol 88, 4090 – 101.

27. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil : a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*, 2000 ; vol 96, no 13, 4028 – 38.
28. Grattan CE, Dawn G, Gibbs S, Francis DM. Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Journal of Clin Exp Allergy*. 2003 ; 33(3) : 337-41.
29. Dalimoenthe NZ. Penilaian Sediaan Hapus Darah Tepi dan Sumsum Tulang. Dalam : *Kursus Penyegar Pemeriksaan Morfologi Sediaan Hapus Darah Tepi dan Sumsum Tulang*. Bandung. Bagian Patologi Klinik FK UNPAD, 2002.
30. Wirawan R, Silman E. Sediaan Hapus Darah Tepi. Dalam : *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Sederhana*. Jakarta. BP FKUI, 2000 : p 31 – 9.
31. Ford M. Buffy-coat activation fee. Available from : [http://www.aegrc.uq.edu.au/lib/docs/Policy\\_Buffy\\_12\\_02.pdf](http://www.aegrc.uq.edu.au/lib/docs/Policy_Buffy_12_02.pdf)
32. Wardlaw SC, Levine RA. Quantitative buffy coat analysis. A new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count. *JAMA*, 1994.
33. Shafer JA. Preparation of blood films for examination. In : Martin AS, Steininger CL, Koepke JA. *Clinical Hematology Principles, Procedures, Correlations*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : Lippincott, 1998 : p 20 - 9.
34. DeNunzio J. Preparation of Buffy Coat from Blood Samples with Extremely Low White Cell Count. *LabMed* , 1995;4 : 497.
35. Turgeon ML. *Clinical haematology theory and procedurs*. 2<sup>nd</sup> ed. Boston. Little Brown and company. 1993 : p 343 –5.

36. De A, Saraswathi K, Gogate A, Raghavan K. C-reactive protein and buffy coat smear in early diagnosis of childhood septicemia. *Indian J Pathol Microbiol*, 1998 ; 41(1):23-6.
37. Bailey JW, Smith DH. The quantitative buffy coat for the diagnosis of trypanosomes. *Trop Doct*, 1994 ; 24(2) : 54-6.
38. Pinto MJW, Rodrigues SR, Desouza R, Verenkar MP. Usefulness of quantitative buffy coat blood parasite detection system in diagnosis of malaria. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2001 ; 19(4): 219-1.
39. Anonim. Cell Dyn 3500 / 3700 Training Manual. Abbott Diagnostics.
40. Kim M, Kim J, Lim J, Kim Y, Han K, Kang CS. Use of an Automated Hematology Analyzer and Flow Cytometry to Assess Bone Marrow Cellularity and Differential Cell Count. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2004 ; 34:307-313.
41. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto SH. Perkiraan besar sampel. Dalam : Sastroasmoro S, Ismael S ed. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Jakarta. Sagung Seto, 2002 : p 259 – 86.
42. Morris MW, Davey FR. Basic Examination of blood. In : Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 9<sup>th</sup> ed, Philadelphia : WB Saunders Company 1996 : 582 – 84.