

The Effect of *Whole Blood* Storage Time with K₃EDTA and Na₂EDTA Anticoagulants on *Differential Leukocyte Count* Results Using Manual and Automatic Methods

[Pengaruh Waktu Penyimpanan *Whole Blood* dengan Antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA Terhadap Hasil *Differential Leukocyte Count* Menggunakan Metode Manual dan Otomatis]

Maya Dwi Indrianti¹⁾, Andika Alivameita^{1)*}

¹⁾Program Studi DIV Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

*Email Penulis Korespondensi: alivameita@umsida.ac.id

Abstract. . The DLC test is one of the hematological tests influenced by preanalytical factors, such as delays in testing and the type of anticoagulant used. This study aimed to determine the effect of storing whole blood with K₃EDTA and Na₂EDTA anticoagulants on DLC results using manual and automated methods. A cross-sectional laboratory experimental study was conducted in April 2026 using 6 participants, all of whom were D4 TLM students at Muhammadiyah University of Sidoarjo. Samples were tested at 0 hours and after storage periods of 36 hours and 72 hours using two anticoagulants (Na₂EDTA and K₃EDTA) via automated (Hematology Analyzer) and manual (peripheral blood smear) methods at a refrigerated temperature of 2–8°C. DLC consists of three types of leukocyte groups: lymphocytes, MID-Cells (eosinophils, basophils, and monocytes), and granulocytes. The results showed that storage time and anticoagulant type did not significantly affect lymphocytes, MID-Cells, and granulocytes ($p > 0.05$), whereas the examination method significantly affected the MID-cells ($p < 0.05$). It was concluded that storing samples with either of the two anticoagulants at cold temperatures still preserves DLC results for up to 72 hours, although changes in leukocyte morphology still occur during storage.

Keywords - Differential Leukocyte Count (DLC), EDTA, Automated Method, Manual Method, Whole Blood

Abstrak. Pemeriksaan DLC merupakan salah satu pemeriksaan hematologi yang dipengaruhi oleh faktor pra-analitik, seperti penundaan pemeriksaan dan jenis antikoagulan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penyimpanan whole blood dengan antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA terhadap hasil DLC menggunakan metode manual dan otomatis. Penelitian eksperimental laboratorium cross-sectional dilakukan pada bulan April 2026 menggunakan 6 responden dan melibatkan mahasiswa D4 TLM Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. Sampel dilakukan pemeriksaan (0 jam), dan waktu penyimpanan (36 jam, dan 72 jam) pada dua antikoagulan (Na₂EDTA dan K₃EDTA) dengan metode otomatis (Hematology Analyzer) dan manual (Hapusan Darah Tepi) terhadap suhu dingin (2-8°C). DLC didalamnya terdapat 3 kelompok jenis sel leukosit yaitu sel limfosit, MID-Cells (eosinofil, basofil, dan monosit), dan granulosit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu penyimpanan dan jenis antikoagulan tidak berpengaruh signifikan terhadap sel limfosit, MID-Cells, dan granulosit ($p > 0,05$), sedangkan metode pemeriksaan berpengaruh signifikan terhadap parameter MID-Cells ($p < 0,05$). Disimpulkan bahwa waktu penyimpanan sampel terhadap dua antikoagulan pada suhu dingin masih mempertahankan hasil DLC hingga 72 jam, meskipun perubahan morfologi leukosit tetap terjadi selama penyimpanan.

Kata Kunci – Differential Leukocyte Count (DLC), EDTA, Metode Otomatis, Metode Manual, Darah Utuh

I. PENDAHULUAN

Laboratorium klinis adalah fasilitas kesehatan yang menyediakan layanan pemeriksaan dalam bidang hematologi, kimia klinik, mikrobiologi klinik, dan bidang lain yang berkaitan dengan kesehatan individu untuk membantu dalam diagnosis penyakit, pengobatan, dan pemulihan [1]. Pemeriksaan hematologi yang sering dilakukan di laboratorium kesehatan mempunyai fungsi untuk memeriksa komponen-komponen darah [2]. Salah satu contoh dari pemeriksaan hematologi yaitu profil leukosit seperti *Differential Leukocyte Count (DLC)* [3]. DLC dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu secara otomatis dengan *Hematology Analyzer* yang berbasis impedansi dan manual dengan hapusan darah tepi untuk mengidentifikasi jenis leukosit normal dan abnormal [4].

Copyright © Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. This preprint is protected by copyright held by Universitas Muhammadiyah Sidoarjo and is distributed under the Creative Commons Attribution License (CC BY). Users may share, distribute, or reproduce the work as long as the original author(s) and copyright holder are credited, and the preprint server is cited per academic standards.

Authors retain the right to publish their work in academic journals where copyright remains with them. Any use, distribution, or reproduction that does not comply with these terms is not permitted.

Pemeriksaan laboratorium terdiri dari tiga tahap yaitu pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik. Beberapa studi menunjukkan bahwa sebagian besar kesalahan terjadi pada tahap pra-analitik mencapai 50-75% dari kesalahan yang ada di laboratorium. Penyimpanan sampel yang tidak tepat adalah contoh kesalahan pra-analitik, penyimpanan sampel dilakukan apabila adanya penundaan pemeriksaan karena kondisi sampel akan dirujuk ke laboratorium lain, atau sampel disimpan agar pasien tidak perlu disampling ulang apabila ada tambahan atau pengulangan pemeriksaan [5].

Penyimpanan sampel darah EDTA harus memperhatikan batasnya sebab dapat memengaruhi hasil pemeriksaan hematologi, menurunkan akurasi, dan hasil tidak valid. Setelah beberapa waktu penyimpanan sampel, sel eritrosit menyusut dan trombosit berubah bentuk dari diskoidal menjadi bulat. Leukosit mengalami perubahan signifikan, dengan beberapa neutrofil mengalami pembengkakan nukleus yang terkait dengan perubahan kromatin, hilangnya bentuk lobular, vakuolisasi, dan hilangnya granula. Monosit dan limfosit mengalami vakuolisasi dan lobulasi nukleus yang tidak merata [6]. Dalam pengujian sampel, dilakukan saat sampel masih stabil dalam 2 jam setelah dilakukan pengambilan sampel [7].

Stabilitas sampel dilihat dari kemampuan sampel untuk mempertahankan nilai pengukuran awalnya secara kuantitatif seiring waktu dalam kondisi penyimpanan yang telah ditentukan [5]. Selain itu, antikoagulan yang dicampurkan dengan darah juga berperan penting dalam stabilitas sampel. Sampel darah yang telah dikumpulkan dan akan dianalisis harus segera dicampur dengan antikoagulan yang sesuai dengan jenis pemeriksaan untuk mencegah pembekuan [5]. Antikoagulan yang sering digunakan adalah EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) yang menghambat pembekuan darah dengan mengikat kalsium (Ca) dalam darah. EDTA terdapat dalam tiga bentuk: disodium (Na_2EDTA), dipotassium (K_2EDTA), dan tripotassium (K_3EDTA) [8].

Pemeriksaan profil leukosit terutama DLC dengan alat *Hematology Analyzer* apabila terjadi penundaan harus disimpan pada suhu ruang laboratorium berkisar dari 20-25° C harus diperiksa dalam waktu kurang dari dua jam karena akan mempengaruhi perubahan jumlah leukosit [1]. Berdasarkan *International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) menyarankan dalam pemeriksaan *Whole Blood* maksimum penyimpanan stabil pada suhu 4°C (suhu dingin) dengan waktu penyimpanan 24 jam sampai 72 jam [9]. Beberapa penelitian menyarankan bahwa waktu optimal untuk pemeriksaan hapusan darah tepi adalah antara 2-8 jam di dalam ruangan (18-22°C) dan suhu dingin (4-8°C) dalam periode 12-24 jam pada metode manual hitung jumlah leukosit dan hitung jenis leukosit [10].

Penelitian pada Rahmnetarini, dkk. pada tahun 2019 menunjukkan bahwa bentuk leukosit pada hapusan darah mengalami perubahan yang signifikan selama penyimpanan sampel darah dengan antikoagulan K_2EDTA . Pada suhu ruangan (18-24°C), perubahan morfologi leukosit mulai terlihat setelah 8 jam. Sementara itu, pada suhu dingin (2-8°C), perubahan morfologi leukosit berkembang setelah 48 jam penyimpanan, meskipun prosesnya lebih lambat dibandingkan pada suhu ruangan [10]. Menurut penelitian Riba pada tahun 2020 bahwa kondisi penyimpanan dan suhu mempengaruhi hasil penghitungan DLC, terutama parameter neutrofil mengalami peningkatan pada suhu ruang dengan Antikoagulan K_2EDTA setelah 4 jam, sementara pada suhu dingin sel neutrofil, limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil tidak menunjukkan perbedaan yang statistik yang signifikan atau tetap stabil dengan antikoagulan K_3EDTA selama periode yang sama [11].

Penelitian sebelumnya Nugraha, dkk. pada tahun 2021 bahwa penundaan pemeriksaan hematologi rutin menggunakan *Hematology Analyzer* CELL-DYN Ruby dengan antikoagulan EDTA pada suhu ruang memiliki dampak yang signifikan terhadap hasil tes, terutama pada jenis leukosit yang mengalami penundaan selama 6 jam yaitu sel neutrofil dan IG (*immature granulocytes*) [6]. Menurut penelitian oleh Mehmood dan Rubaida tahun 2017, terdapat perubahan yang signifikan pada beberapa parameter tertentu antara antikoagulan K_2EDTA dan K_3EDTA yang dilakukan pengujian segera (<15 menit) dan penundaan 4 jam. Neutrofil (NEU) dan volume platelet rata-rata (MPV) menunjukkan variasi yang signifikan dalam pengujian segera (< 15 menit). Monosit (MO), volume sel darah merah rata-rata (MCV), volume platelet rata-rata (MPV), lebar distribusi sel darah merah (RDW), dan plateletcrit (PCT) semuanya menunjukkan perubahan yang signifikan selama penyimpanan empat jam [12].

Akurasi hasil pemeriksaan hematologi sangat penting, terutama pada hitung jenis leukosit atau DLC, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan *Whole Blood* dengan antikoagulan K_3EDTA dan Na_2EDTA terhadap hasil DLC menggunakan metode manual dan otomatis.

II. METODE

Penelitian ini telah memperoleh sertifikat etik dengan nomor 0393/HRECC.FODM/IV/2026 dari Komisi Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. Desain penelitian ini merupakan kuantitatif menggunakan metode eksperimental laboratorik *cross-sectional*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik DIV-Teknologi Laboratorim Medis, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo pada bulan April 2026. Penelitian yang dilakukan terdiri dari 6 responden dari Mahasiswa Prodi Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo berjenis kelamin laki-laki dan berusia 17-25 tahun. Teknik pengambilan sampel yang digunakan yaitu *purposive sampling* dengan mengisi persetujuan dan mendatangi

informed consent. Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: tourniquet, holder, rak tabung, vacutainer plain, mikropipet 5-50 μ l, pipet maat 10ml, *Hematology Analyzer (Medonic M-32)*, pipet tetes, jembatan pewarnaan, obyek glass, bulb, mikroskop (*Olympus CX33*). Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu: *Whole Blood*, antikoagulan konvensional Na_2EDTA , tabung vacutainer K_3EDTA , needle, alkohol 96 %, larutan Giemsa induk, larutan Buffer Phosphat pH 7, kapas alkohol 70%, yellow tipe, oil imersi.

Penelitian ini menggunakan sampel darah vena yang diambil dari setiap responden sebanyak 12 mL. Sampel darah yang diperoleh kemudian didistribusikan ke dalam enam tabung, yaitu tiga tabung vacutainer K_3EDTA masing-masing 2 cc dan tiga tabung konvensional Na_2EDTA masing-masing 2 cc. Pemeriksaan dilakukan segera setelah pengambilan sampel (0 jam) sebagai kontrol, serta waktu penyimpanan 36 jam dan 72 jam pada suhu dingin ($2-8^\circ\text{C}$).

Seluruh sampel dianalisis menggunakan metode otomatis dengan (*Hematology Analyzer*) dan metode manual menggunakan pemeriksaan Hapusan Darah Tepi (HDT). Data hasil penelitian diolah menggunakan SPSS versi 25. Analisis diawali dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene's Test*. Data yang memenuhi asumsi terdistribusi normal dan homogen dianalisis menggunakan uji parametrik *One-Way ANOVA*, sedangkan data yang tidak memenuhi asumsi tersebut dianalisis menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Data

Perhitungan rerata dan standar deviasi ditunjukkan pada Tabel 1 dan Tabel 2 seluruh perlakuan, baik antikoagulan (K_3EDTA dan Na_2EDTA), waktu pemeriksaan segera (0 jam) dan waktu penyimpanan (36 jam, 72 jam), serta kedua metode (otomatis dan manual).

Tabel 1. Rerata DLC pada Tabung Na_2EDTA dengan Waktu Penyimpanan (0 Jam, 36 Jam, dan 72 Jam) Menggunakan Metode Otomatis dan Manual pada Suhu Dingin ($2-8^\circ\text{C}$)

Variabel	Waktu Penyimpanan	Rerata DLC (%) $\pm$ Standar Deviasi	
		Otomatis	Manual
Sel Limfosit	0 Jam	35,300 $\pm$ 7,6663	37,500 $\pm$ 8,7350
	36 Jam	34,817 $\pm$ 7,6196	36,000 $\pm$ 7,3212
	72 Jam	37,600 $\pm$ 8,9364	36,833 $\pm$ 8,0850
MID-Cells	0 Jam	7,750 $\pm$ 0,7556	6,333 $\pm$ 0,5164
	36 Jam	6,300 $\pm$ 0,8438	5,833 $\pm$ 1,3292
	72 Jam	7,067 $\pm$ 0,7474	6,500 $\pm$ 1,2247
Sel Granulosit	0 Jam	56,950 $\pm$ 8,2803	56,167 $\pm$ 9,0646
	36 Jam	58,883 $\pm$ 8,3999	58,167 $\pm$ 8,2321
	72 Jam	55,333 $\pm$ 9,1598	56,667 $\pm$ 8,0416

Tabel 2. Rerata DLC pada Tabung K_3EDTA dengan Waktu Penyimpanan (0 Jam, 36 Jam, dan 72 Jam) Menggunakan Metode Otomatis dan Manual pada Suhu Dingin ($2-8^\circ\text{C}$)

Variabel	Waktu Penyimpanan	Rerata DLC (%) $\pm$ Standar Deviasi	
		Otomatis	Manual
Sel Limfosit	0 Jam	35,417 $\pm$ 7,5959	36,000 $\pm$ 8,1179
	36 Jam	34,683 $\pm$ 6,9376	35,833 $\pm$ 7,8592
	72 Jam	38,517 $\pm$ 10,4897	39,000 $\pm$ 10,4307
MID-Cells	0 Jam	7,200 $\pm$ 0,8922	6,667 $\pm$ 2,4221
	36 Jam	6,933 $\pm$ 0,9688	5,833 $\pm$ 1,4720
	72 Jam	7,400 $\pm$ 1,0392	6,833 $\pm$ 1,6021
Sel Granulosit	0 Jam	57,383 $\pm$ 8,4072	56,667 $\pm$ 8,2138
	36 Jam	58,883 $\pm$ 8,3999	58,167 $\pm$ 7,3869
	72 Jam	54,083 $\pm$ 11,4965	54,333 $\pm$ 10,7455

Tabel 1 dan 2, rerata DLC pada sampel darah yang disimpan dalam tabung Na_2EDTA maupun K_3EDTA menunjukkan adanya perubahan pada setiap waktu penyimpanan baik menggunakan metode otomatis maupun manual yang sama. Sel limfosit dan MID-Cells menunjukkan kecenderungan menurun pada waktu penyimpanan 36 jam dan kembali meningkat pada 72 jam. Sementara itu, sel granulosit mengalami peningkatan pada penyimpanan 36 jam yang kemudian diikuti penurunan pada penyimpanan 72 jam. Nilai standar deviasi pada setiap parameter mencerminkan tingkat penyebaran data terhadap nilai rerata. Standar deviasi yang relatif rendah menunjukkan bahwa data antarresponden cenderung homogen, sehingga hasil pemeriksaan memiliki tingkat keseragaman yang baik.

Sebaliknya, standar deviasi yang relatif tinggi menunjukkan bahwa data antarresponden cenderung kurang homogen, sehingga penyebaran hasil pemeriksaan menjadi lebih besar.

Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Berdasarkan Waktu Penyimpanan, Metode, dan Jenis Antikoagulan

Faktor	Uji Normalitas (<i>Shapiro Wilk</i>)		
	Sel Limfosit	MID-Cells (eosinofil, basofil, monosit)	Sel Granulosit (Neutrofil)
Waktu Penyimpanan:			
0 Jam	0,399*	0,915*	0,327*
36 Jam	0,022	0,199*	0,014
72 Jam	0,279*	0,091*	0,475*
Metode:			
Otomatis	0,264*	0,023	0,354*
Manual	0,143*	0,017	0,121*
Jenis Antikoagulan:			
Na ₂ EDTA	0,016	0,012	0,041
K ₃ EDTA	0,339*	0,226*	0,290*

*: Data terdistribusi normal

Tabel 3. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa distribusi data bervariasi tergantung pada faktor penelitian. faktor waktu penyimpanan 0 jam, 36 jam, 72 jam terhadap parameter MID-Cells dan sel Limfosit, Sel Granulosit terhadap waktu penyimpanan 0 jam dan 72 jam menunjukkan data terdistribusi normal, akan tetapi beberapa parameter sel Limfosit dan sel Granulosit pada waktu penyimpanan 36 jam tidak sesuai dengan asumsi tersebut. Parameter limfosit dan granulosit menunjukkan distribusi normal pada faktor metode, sedangkan MID-Cells tidak terdistribusi normal. Berdasarkan jenis antikoagulan sel Limfosit, MID-Cells, dan sel Granulosit pada tabung K₃EDTA menunjukkan terdistribusi normal, sedangkan tabung Na₂EDTA pada semua parameter tidak terdistribusi normal. Nilai signifikansi *Shapiro-Wilk* dengan nilai >0,05 yang artinya data terdistribusi normal sedangkan nilai < 0,05 atau data tidak terdistribusi normal.

Tabel 4. Hasil Uji Homogenitas Berdasarkan Waktu Penyimpanan, Metode, dan Jenis Antikoagulan

Faktor	Uji Homogenitas (<i>Leven's Test</i>)		
	Sel Limfosit	MID-Cells (eosinofil, basofil, monosit)	Sel Granulosit (Neutrofil)
Waktu Penyimpanan	0,446*	0,796 *	0,353*
Metode	0,950*	0,007	0,898 *
Jenis Antikoagulan	0,376*	0,081 *	0,459*

*: Data Homogen

Tabel 4. Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa faktor waktu penyimpanan, metode pemeriksaan, dan jenis antikoagulan terhadap beberapa parameter menunjukkan data bersifat homogen kecuali MID-Cells berdasarkan faktor metode pemeriksaan ($p=0,007$) yang tidak memenuhi asumsi homogenitas. Pada hasil tersebut menunjukkan bahwa sebagian besar data memenuhi salah satu asumsi untuk analisis parametrik, sedangkan data yang tidak homogen memerlukan penggunaan uji statistik nonparametrik.

Tabel 5. Hasil Uji *Kruskal Wallis* Terhadap DLC

Parameter	Faktor	<i>Uji Kruskal Wallis</i> Signifikan (p-value)
Sel Limfosit	Waktu Penyimpanan	0,543
	Antikoagulan	0,593
MID-Cells	Metode	0,006*
	Antikoagulan	0,591
Sel Granulosit	Waktu Penyimpanan	0,306
	Antikoagulan	0,558

*: Signifikan ($p<0,05$)

Tabel 5. Hasil Uji *Kruskal Wallis* terhadap DLC. Pada sel limfosit, menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan berdasarkan faktor penundaan ($p=0,543$), dan antikoagulan ($p=0,593$). Hasil MID-Cells juga menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap faktor antikoagulan ($p=0,591$), akan tetapi pada faktor metode ($p=0,006$) atau terdapat perbedaan yang signifikan. Pada sel granulosit menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap faktor penundaan ($p=0,306$), dan antikoagulan ($p=0,558$).

Tabel 6. Hasil Uji *One Way Anova* Terhadap DLC di Suhu Dingin

Parameter	Faktor	Uji <i>One Way Anova</i>
		Signifikan (p-value)
Sel Limfosit	Metode	0,633
MID-Cells	Waktu Penyimpanan	0,066
Sel Granulosit	Metode	0,942

*: Signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 6. Hasil Uji Statistik Parametrik *One Way Anova* terhadap Terhdap DLC. Pada sel limfosit menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan berdasarkan faktor metode ($p=0,633$). MID-Cells berdasarkan penundaan (0,066) atau tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hal tersebut pada sel granulosit berdasarkan faktor metode ($p=0,942$) atau tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Uji statistika parametrik *One Way Anova* terhadap DLC di suhu dingin ($2-8^{\circ}\text{C}$), semua memiliki hasil $< 0,05$, dimana hasil tersebut tidak terdapat perbedaan yang signifikan berdasarkan faktor penundaan, dan metode terhadap hasil hitung jenis sel limfosit, MID-Cells, sel granulosit.

B. Pembahasan

Penelitian ini menganalisis pengaruh dari waktu penyimpanan (0 jam, 36 jam, 72 jam), kedua antikoagulan yaitu K_3EDTA dan Na_2EDTA , serta metode pengujian (otomatis dan manual) terhadap hasil DLC. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, waktu penyimpanan terhadap DLC yang terdiri dari sel limfosit, MID-Cells, dan sel granulosit pada suhu dingin ($2-8^{\circ}\text{C}$) tidak terdapat pengaruh yang signifikan dalam hasil pemeriksaan.

Sampel darah EDTA yang tidak segera dilakukan pemeriksaan, harus memperhatikan batas waktu penyimpanan sebab dapat memengaruhi hasil pemeriksaan, menurunkan akurasi, dan hasil tidak valid [7]. Salah satu yang direkomendasikan dalam proses penundaan pemeriksaan yaitu sampel disimpan pada suhu dingin ($2-8^{\circ}\text{C}$). Hal tersebut karena suhu dingin dapat memperlambat degenerasi dan proses aktivasi sel leukosit, sehingga menjaga kestabilan hasil pemeriksaan lebih baik dibandingkan dengan suhu ruang [13]. Sejalan dengan penelitian Jaya, dkk. tahun 2022 menyatakan bahwa selama penyimpanan 24 jam, sel granulosit ($p=0,96$) dan limfosit ($p=0,96$) tidak ada pengaruh yang signifikan. Hal tersebut menunjukkan penyimpanan dalam lemari es $2-8^{\circ}\text{C}$ menunjukkan stabilitas yang lebih baik [14].

Penggunaan antikoagulan EDTA sangat baik digunakan untuk pemeriksaan hematologi karena EDTA memiliki keunggulan dari antikoagulan yang lainnya, yaitu tidak mempengaruhi sel-sel darah. Antikoagulan konvensional (Na_2EDTA) memiliki pH $5,0 \pm 1,0$ dan umumnya masih banyak digunakan dalam laboratorium, dimana bentuknya serbuk yang diencerkan dengan aquades menjadi larutan 10% [15]. Penggunaan antikoagulan konvensional harus dilakukan dengan benar dengan perbandingan antikoagulan dan sampel harus tepat, karena terlalu sedikit antikoagulan akan menyebabkan sampel membeku, dan terlalu banyak akan menyebabkan platelet mengalami pembesaran dan disintegrasi serta eritrosit mengalami krenasi [16]. Sedangkan antikoagulan *vacutainer* (K_3EDTA) sudah berbentuk cair di dalam tabung dan digunakan karena memiliki stabilitas tinggi dibandingkan dengan garam EDTA yang lain. Hal ini karena pH K_3EDTA yang mendekati pH darah yakni sekitar 6,4. Pada penelitian yang dilakukan, tidak terdapat pengaruh terhadap 2 jenis antikoagulan yang digunakan, yaitu K_3EDTA dan Na_2EDTA terhadap DLC yang terdiri dari sel limfosit, MID-Cells dan sel granulosit. Antikoagulan Na_2EDTA maupun K_3EDTA bekerja melalui mekanisme yang sama, yaitu mengikat ion kalsium (Ca^{2+}) sehingga menghambat proses koagulasi dan mempertahankan komponen seluler darah. Oleh karena itu, selama konsentrasi antikoagulan tepat dan prosedur penyimpanan dilakukan sesuai, kedua antikoagulan masih mampu mempertahankan kualitas spesimen sehingga tidak menimbulkan perbedaan yang bermakna terhadap hasil pemeriksaan [17]. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya tahun 2024 menyatakan bahwa penyimpanan sampel darah K_3EDTA pada suhu dingin $2-4^{\circ}\text{C}$ dapat menjaga stabilitas DLC sehingga tidak berubah secara signifikan pada suhu dingin hingga 72 jam ($p > 0,05$) [18].

Sedangkan hasil penelitian ini terdapat pengaruh yang signifikan ($p=0,006$) terhadap metode otomatis dan manual pada MID-Cells tetapi pada sel limfosit dan sel granulosit tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap metode otomatis dan manual. Hasil uji *Kruskal Wallis* pada MID-Cells, metode otomatis memiliki jumlah rata-rata (Ranks) cenderung lebih tinggi yang artinya lebih berpengaruh tinggi dibandingkan metode manual, hal tersebut dapat dipengaruhi oleh perbedaan prinsip kerja antara metode otomatis dan manual. Metode otomatis menggunakan prinsip impedansi listrik (*Coulter principle/DC detection*), dimana prinsip ini mendeteksi perubahan hambatan listrik yang

terjadi ketika sel leukosit masuk, besar hambatan yang terbentuk sebanding dengan ukuran sel. Berdasarkan ukuran sel tersebut, leukosit dikelompokkan menjadi tiga, yaitu sel limfosit sebagai kelompok sel berukuran kecil, MID-Cells yang terdiri dari eosinofil, basofil, dan monosit sebagai kelompok sel berukuran sedang, serta sel granulosit sebagai kelompok sel berukuran besar. Jika adanya perubahan morfologi maupun pembengkakan leukosit akibat proses degenerasi dan penundaan pemeriksaan dapat menyebabkan kesalahan dalam pembacaan sel leukosit. MID-Cells memiliki presentase jumlah yang relatif sedikit dibandingkan sel limfosit dan granulosit, hal tersebut dapat mempengaruhi pembacaan di alat yang disebabkan adanya perubahan morfologi selama penyimpanan. Hal tersebut didukung oleh penelitian Annika Åstrand tahun 2024, menyatakan bahwa eosinofil (bagian dari MID-Cells), terdapat perbedaan dalam mengenali dan menghitung sel tersebut. Perbedaan ini berkaitan dengan tingkat aktivasi eosinofil serta perubahan morfologi seperti ukuran sel dan kandungan granula yang dapat menyebabkan terjadinya pergeseran distribusi volume sel kedalam kelompok lain [19]. Menurut penelitian lain tahun 2024, hasil metode otomatis dapat dipengaruhi oleh perubahan ukuran dan morfologi leukosit selama penyimpanan. Adanya sel berukuran sedang dalam jumlah yang sangat sedikit pada histogram leukosit yang direpresentasikan oleh parameter MID-Cells. Hal ini membuat perbedaan sekecil apa pun hasil jumlah sel neutrofil atau sel limfosit dapat berdampak signifikan terhadap parameter MID-Cells. Perubahan tersebut menggeser batas (*gating*) antar kelompok leukosit sehingga sebagian sel yang berada di daerah perbatasan dapat terhitung sebagai MID-Cells [20].

Hasil rerata DLC menunjukkan adanya penurunan dan peningkatan terhadap sel limfosit, MID-Cells dan sel granulosit di beberapa waktu penyimpanan pada kedua jenis antikoagulan (Na_2EDTA dan K_3EDTA) dengan metode otomatis dan manual. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase sel neutrofil mengalami perubahan selama penyimpanan sampel darah. Pada awal masa penyimpanan jumlah sel neutrofil cenderung mengalami peningkatan, sedangkan pada waktu penyimpanan yang lebih lama terjadi penurunan yang lebih besar. Perubahan tersebut menunjukkan bahwa sel neutrofil merupakan salah satu jenis leukosit yang rentan terhadap proses penuaan dan degenerasi selama penyimpanan. Seiring bertambahnya waktu, perubahan morfologi dan penurunan viabilitas neutrofil dapat memengaruhi kemampuan alat *Hematology Analyzer* dalam mengidentifikasi sel. Temuan ini sejalan dengan Elemchukwu Queen (2014) yang menyatakan bahwa neutrofil merupakan jenis leukosit yang paling dipengaruhi oleh penyimpanan darah dalam waktu yang lama [21].

Pada penelitian ini juga menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan jumlah sel limfosit dan MID-Cells pada akhir periode penyimpanan. Peningkatan tersebut diperkirakan merupakan akibat perubahan morfologi leukosit selama penyimpanan. Degenerasi yang terjadi pada sel neutrofil atau jenis leukosit lainnya dapat menyebabkan sebagian sel diklasifikasikan sebagai sel limfosit atau sel monosit oleh *Hematology Analyzer*, sehingga persentase kedua parameter tersebut tampak meningkat [21]. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Kurniasih tahun 2024, menyatakan hasil hitung jumlah leukosit yang tinggi pada alat *Hematology Analyzer* bisa dikarenakan adanya sel normoblas yang memiliki kemiripan morfologis dengan sel leukosit yaitu adanya inti sel sehingga alat sering dikenali sebagai sel leukosit. Hapusan darah tepi dapat digunakan untuk memvalidasi sampel secara manual jika alat tersebut menunjukkan jumlah sel leukosit tinggi [22].

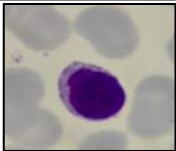
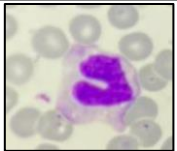
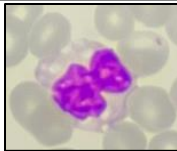
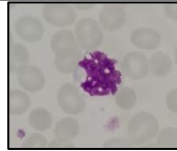
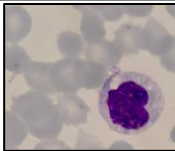
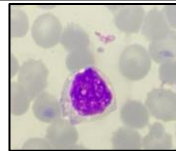
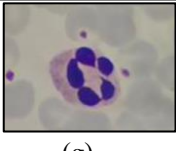
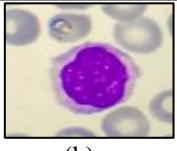
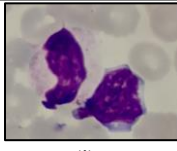
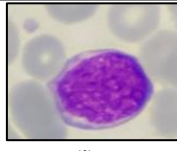
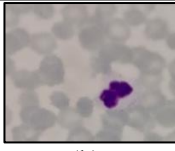
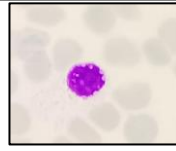
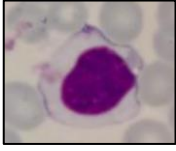
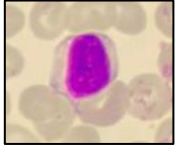
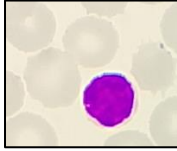
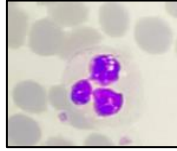
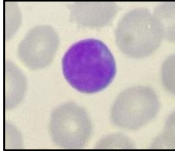
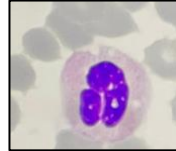
Metode manual pada pemeriksaan DLC dilakukan penghitungan jenis leukosit secara mikroskopis pada preparat hapusan darah tepi. Metode ini digunakan sebagai evaluasi terhadap hasil pemeriksaan otomatis, terutama apabila ditemukan *flagging* pada (*Hematology Analyzer*). Keunggulan metode manual dapat melihat morfologi sel secara langsung. Terlepas dari keunggulannya, adapun beberapa keterbatasan pada saat melakukan pemeriksaan yaitu keberadaan partikel sisa (*debris*), eritrosit berinti (*nucleated red blood cells*), maupun agregat trombosit dapat teridentifikasi secara keliru sebagai leukosit, sehingga berpotensi memengaruhi akurasi hasil pemeriksaan [23]. Pada proses pembuatan preparate hapusan darah tepi tidak selalu homogen, hal tersebut dapat mengakibatkan sel seperti sel granulosit, sel monosit, dan sel blast dapat berkumpul pada ujung tepi hapusan darah atau di daerah *feathered edge* [23]. Adanya peningkatan dan penurunan terhadap hasil rerata DLC dapat terjadi karena adanya perubahan morfologis dan kerusakan sel secara perlahan selama proses penyimpanan perubahan morfologis serta kerusakan sel secara perlahan. Meskipun tidak terjadi pengaruh terhadap waktu penyimpanan dalam pada suhu dingin ($2-8^\circ\text{C}$), stabilitas hasil DLC tidak berarti bahwa setiap leukosit masih dalam keadaan utuh. Penelitian tahun 2024, menyatakan darah EDTA stabil pada suhu dingin dan pada suhu ruang stabil dalam waktu kurang dari 1 jam. Apabila lebih dari satu jam akan terjadi perubahan sel maupun kerusakan morfologi sel pada suhu ruang. Hal tersebut dapat mempengaruhi jumlah leukosit, semakin lama penundaan pemeriksaan maka jumlah sel leukosit terhitung makin berkurang sel-sel darah mengalami kerusakan morfologis yang disebabkan oleh perubahan imunologis, biomekanis, dan metabolik [24]. Hal ini dikuatkan dengan temuan pada waktu pemeriksaan segera (0 jam) di kedua antikoagulan (Na_2EDTA dan K_3EDTA) seperti *Lymphocyte Cell*, *Neutrophil Cell*, *Monocyte Cell* dimana sel leukosit tidak mengalami perubahan morfologi (Tabel 7).

Waktu penyimpanan 36 jam suhu $2-8^\circ\text{C}$ pada Tabel 7 ditemukan perubahan morfologi seperti *Vacuolated Monocyte*, *Vacuolated Neutrophile*, *Smudge Cell*, dan *Abnormal Homogeneous Chromatine*. Munculnya vakuolisasi pada sel monosit dan sel neutrofil menunjukkan adanya proses degenerasi awal akibat aktivitas metabolisme sel yang

masih berlangsung selama penyimpanan. Penurunan cadangan ATP menyebabkan peningkatan permeabilitas membran sehingga terbentuk vakuola pada sitoplasma. Selain itu, ditemukan *Abnormal Homogeneous Chromatine* yang ditandai dengan kromatin inti tampak lebih padat dan homogen akibat kondensasi kromatin sebagai respons terhadap penurunan aktivitas metabolik [10]. Pada waktu penyimpanan ini juga ditemukan *Smudge Cell*, yaitu leukosit yang mengalami kerusakan membran sehingga mudah pecah selama proses pembuatan preparat hapusan darah tepi [25]. Temuan tersebut menunjukkan bahwa pada 36 jam penyimpanan telah terjadi perubahan degeneratif awal, meskipun struktur leukosit secara umum masih dapat dikenali.

Hal tersebut juga ditemukan perubahan morfologi yang terdapat pada Tabel 7 waktu penyimpanan 72 jam seperti *Vacuolated Neutrophile*, *Hypogranular Neutrophile*, *Vacuolated Monocyte*, dan *Abnormal Homogeneous Chromatine*. Vakuolisasi pada sel monosit dan sel neutrofil ditemukan menunjukkan bahwa proses degenerasi sel terus berlangsung selama penyimpanan. Pada waktu ini juga muncul *Hypogranulocyte neutrophile*, yang ditandai dengan berkurangnya granula sitoplasma sehingga sitoplasma tampak lebih pucat. Perubahan tersebut mengindikasikan degenerasi sitoplasma yang lebih lanjut akibat kerusakan organel dan hilangnya granula selama penyimpanan [10]. Selain itu, *Abnormal Homogeneous Chromatine* ditemukan menunjukkan bahwa perubahan pada inti sel terus berlanjut seiring bertambahnya waktu penyimpanan. Perubahan morfologi pada penyimpanan 72 jam menunjukkan proses degenerasi leukosit yang lebih lanjut dibandingkan pada penyimpanan 36 jam, meskipun hasil pemeriksaan DLC secara statistik masih relatif stabil.

Tabel 7. Morfologi DLC Waktu Penyimpanan (0 Jam, 36 Jam, 72 Jam), Terhadap Antikoagulan Na₂EDTA dan K₃EDTA

Pemeriksaan segera (0 jam)		Waktu penyimpanan (36 jam)		Waktu penyimpanan (72 jam)	
Na ₂ EDTA	K ₃ EDTA	Na ₂ EDTA	K ₃ EDTA	Na ₂ EDTA	K ₃ EDTA
					
(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
					
(g)	(h)	(i)	(j)	(k)	(l)
					
(m)	(n)	(o)	(p)	(q)	(r)

Keterangan: Morfologi DLC waktu penyimpanan (0 jam, 36 jam, 72 jam), terhadap antikoagulan Na₂EDTA dan K₃EDTA (a) *Lymphocyte cell*, (b) *Neutrophile Stab Cell*, (c,d) *Vacuolated Monocyte* pada waktu penyimpanan 36 jam, (e, f) *Vacuolated Monocyte* pada waktu penyimpanan 72 jam, (g) *Neutrophile cell*, (h) *Lymphocyte cell*, (i) *Smudge Cell*, (j) *Vacuolated Lymphocyte*, (k) *Hypogranulocyte Neutrophile*, (l) *Vacuolated Lymphocyte*, (m,n) *Monocyte cell*, (o) *Abnormal Homogeneous Chromatine*, (p) *Vacuolated Neutrophile*, (q) *Abnormal Homogeneous Chromatine*, (r) *Vacuolated Neutrophile*.

IV. SIMPULAN

Faktor waktu penyimpanan dan jenis antikoagulan tidak memiliki pengaruh yang signifikan ($p > 0,05$) terhadap parameter sel limfosit, *middle-cell*, sel granulosit. Pada faktor metode pemeriksaan tidak memiliki pengaruh yang signifikan ($p > 0,05$) terhadap sel limfosit, dan sel granulosit. Akan tetapi pada MID-Cells terdapat pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap faktor metode pemeriksaan, dimana metode otomatis memiliki jumlah rata-rata cenderung lebih tinggi dari metode manual. Meskipun tidak ada pengaruh yang signifikan terhadap waktu penyimpanan pada suhu dingin (2-8°C), proses penyimpanan sampel tetap dapat menyebabkan perubahan morfologis dan kerusakan sel secara perlahan. Untuk penelitian selanjutnya disarankan *Hematology Analyzer 5-part (5-diff)* agar

analisis setiap jenis leukosit dapat dilakukan secara lebih spesifik dan akurat serta penambahan parameter pemeriksaan seperti jumlah leukosit untuk memperoleh hasil yang lebih komprehensif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada institusi penelitian, dan semua pihak yang telah membantu dalam proses penelitian dan penyusunan artikel. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada orang tua dan keluarga besar atas dukungan dalam proses penyusunan artikel ini.

REFERENSI

- [1] Aristoteles and N. Puspitasari, "Perbedaan Hitung Jumlah Leukosit Segera dan Disimpan Selama 6 Jam," *J. Heal. Appl. Sci. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 16–20, 2023, doi: 10.52523/jhast.v1i1.4.
- [2] D. Y. Wiratma and A. Situmorang, "Tingkat Kualitas Pemantapan Mutu Internal Pra Analitik Pemeriksaan Hematologi," *J. Anal. Lab. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. 24–31, 2016.
- [3] U. Sukorini, T. Ratnaningsih, and D. Ikarumi, "The Effect of Excessive Disodium Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Na_2EDTA) Anticoagulant Concentration on Leukocytes Profile in Peripheral Blood Examination," *Med. J. Indones.*, vol. 16, no. 3, pp. 168–175, 2007, doi: 10.13181/mji.v16i3.271.
- [4] A. Anggreyani, "Perbandingan Differential Count Jumlah Sel Granulosit dengan Metode Impedansi dan Cara Manual - Repository Universitas Muhammadiyah Semarang." Accessed: Sep. 21, 2025. [Online]. Available: <http://repository.unimus.ac.id/2261/>
- [5] A. Alivameita, S. Dilla, Y. Wahyudhi, and F. P. Purwanti, "Stabilitas Sampel Darah Terhadap Profil Hematologi dengan Metode Otomatis," vol. 1, no. 5, pp. 1–7, 2022.
- [6] G. Nugraha, N. A. Ningsih, T. Sulifah, and S. Fitria, "Stabilitas Pemeriksaan Hematologi Rutin pada Sampel Darah yang Didiamkan pada Suhu Ruang Menggunakan Cell-Dyn Ruby," *J. Muhammadiyah Med. Lab. Technol.*, vol. 4, no. 1, p. 21, 2021, doi: 10.30651/jmlt.v4i1.8255.
- [7] G. Bournier *et al.*, "ICSH Guidelines for The Verification and Performance of Automated Cell Counters for Body Fluids," *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 36, no. 6, pp. 598–612, 2014, doi: 10.1111/ijlh.12196.
- [8] A. F. Lestari, S. Hartini, and D. S. Prihandono, "Gambaran Jumlah Trombosit pada Penggunaan Antikoagulan Na_2EDTA dan K_2EDTA ," *J. Kesehat. Tanbusai*, vol. 4, no. 3, pp. 3101–3108, 2023.
- [9] N. D. K. Sari, G. Nugraha, B. T. Dibiasi, and M. A. Prayoga, "Perbedaan Hasil Pemeriksaan Hematologi yang Segera Dilakukan Pemeriksaan dan yang Ditunda pada Suhu Ruangan dan Refrigerator menggunakan Sysmex XP-300," *Borneo J. Med. Lab. Technol.*, vol. 4, no. 2, pp. 279–291, 2022.
- [10] A. Rahmনারিনি, Y. Hernaningsih, and Y. N. Indrasari, "The Stability of Sample Storage for Complete Blood Count (CBC) Toward The Blood Cell Morphology," *Bali Med. J.*, vol. 8, no. 2, pp. 391–395, 2019, doi: 10.15562/bmj.v8i2.1369.
- [11] V. C. J. Riba *et al.*, "Interference of Blood Storage Containing K_2EDTA and K_3EDTA Anticoagulants in The Automated Analysis of The Hemogram," *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 56, Jan. 2020, doi: 10.5935/1676-2444.20200037.
- [12] R. Mehmood, R. Khushi, M. Sajjid, and H. Anika, "Evaluation of Di-Potassium and Tri-Potassium EDTA Evacuated Tubes for Routine Haematological Testing," *J. Clin. Lab. Anal.*, no. August 2016, pp. 2–5, 2018, doi: 10.1002/jcla.22188.
- [13] N. S. Alam, Nur. I Gusti Putu Agus Ferry Sutrisna, "Pengaruh Waktu Penyimpanan Sampel Darah EDTA pada Suhu Ruangan Terhadap Nilai Trombosit dan Leukosit," *J. MediLab Mandala Waluya*, vol. 9, no. 1, 2025.
- [14] M. Jaya, Anu. Kakkar, Naveen. John, "Effect of Room Temperature and Refrigerated Storage on Automated Complete Blood Count : A Longitudinal Study," pp. 57–61, 2022, doi: 10.4103/cjhr.cjhr.
- [15] H. Y. Hariyanto. Hermawati, Andyanita Hanif. Prastama, "Perbedaan EDTA Konvensional dan EDTA Vacutainer pada Pemeriksaan Kadar Hemoglobin," *Borneo J. Med. Lab. Technol.*, pp. 614–620, 2023.
- [16] A. P. Alivameita, *Pemeriksaan Hematologi Rutin*. Sidoarjo: UMSIDA PRESS, 2024.
- [17] A. Alivameita, P. Puspitasari, W. I. Amilya, and I. El Savitra, "Optimization of Whole Blood Specimen Handling for Complete Blood Count (CBC) Results and Blood Cell Morphology," *J. Kesehat.*, vol. 16, no. 2, pp. 285–296, 2025.
- [18] C. Kangwende, F. Ajeneye, E. Nkansah, M. Adelusi, N. Tanwair, and S. Baines, "Evaluating Blood Sample Storage Conditions and How it Can Affect Haematology Interpretation at The PAH," *J. Community Med. Public Heal.*, vol. 5, no. 08, pp. 1–7, 2024.
- [19] A. Astrand *et al.*, "A Comparative Study of Blood Cell Count in Four Automated Hematology Analyzers: An

Copyright © Universitas Muhammadiyah Sidoarjo. This preprint is protected by copyright held by Universitas Muhammadiyah Sidoarjo and is distributed under the Creative Commons Attribution License (CC BY). Users may share, distribute, or reproduce the work as long as the original author(s) and copyright holder are credited, and the preprint server is cited per academic standards.

Authors retain the right to publish their work in academic journals where copyright remains with them. Any use, distribution, or reproduction that does not comply with these terms is not permitted.

- Evaluation of The Impact of Preanalytical Factors,” *PLoS One*, pp. 1–19, 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0301845.
- [20] C. Coutaz, A. Mamin, and K. Mintzas, “Evaluation of the Sysmex XQ- 320 Three-Part Differential Haematology Analyser and its Flagging Capabilities,” *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, no. January, pp. 1–12, 2024, doi: 10.1002/jcla.25017.
- [21] E. Queen, O. E. Ifeanyi, and O. Kingsley, “The Effect of Storage on Full Blood Count in Different Anticoagulant,” *IOSR J. Dent. Med. Sci.*, vol. 13, no. 9, pp. 128–131, 2014.
- [22] E. T. D. A. Kurniasih, “Perbandingan Hasil Hitung Jumlah Sel Darah Spesimen Darah Vena EDTA Menggunakan Metode Manual dan Otomatis,” *Borneo J. Med. Lab. Technol.*, pp. 495–501, 2024.
- [23] A. Adewoyin and B. Nwogoh, “Peripheral Blood Film - A Review,” *Ann. Ibadan Postgrad. Med.*, vol. 12, no. 2, pp. 71–79, 2014.
- [24] S. M. Wijaya, F. P. Anggraeni, S. Prabandari, and A. N. Sari, “Perbedaan Hasil Pemeriksaan Darah Rutin yang disimpan pada Suhu 4-8 Derajat C ditunda 1 Jam dan 3 Jam,” *Pros. Semin. Inf. Kesehat. Nas.*, pp. 131–139, 2024.
- [25] A. Irthing, F. Landgren, and E. Aardal, “Dependent EDTA Effect on Leukocyte Differential Count and Morphology Compared to Blood Smear Made by Direct Finger Prick,” *Int. J. Lab. Hematol.*, pp. 826–831, 2025, doi: 10.1111/ijlh.14498.

Conflict of Interest Statement:

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.