

Comparison of the Effectiveness of K₃EDTA and Na₂EDTA Anticoagulants on the Stability of *Differential Leukocyte Count (DLC)* Results Using Manual and Automated Methods *Whole Blood Storage*

[Perbandingan Efektivitas Antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA terhadap Stabilitas Pemeriksaan *Differential Leukocyte Count (DLC)* dengan Metode Manual dan Otomatis pada Penyimpanan *Whole Blood*]

Ersa Rahmaneng Azizah¹⁾, Andika Alivameita^{*1)}

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

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

Abstract. *The differential leukocyte count is a hematological test used to determine the percentage of leukocyte types, aiding in clinical diagnosis. Result accuracy is influenced by pre-analytical factors. This study aimed to analyze the effect of storage duration on whole blood samples using K₃EDTA and Na₂EDTA anticoagulants on differential leukocyte count results obtained via manual and automated methods. This laboratory-based experimental study employed a cross-sectional design using venous blood samples from six respondents, analyzed via peripheral blood smears and a hematology analyzer at various storage intervals. Two-way analysis revealed no significant effect ($p > 0.05$) on lymphocyte and granulocyte parameters. Kruskal–Wallis test results indicated that storage duration and testing method significantly influenced mid-cell parameters ($p < 0.05$), whereas the type of anticoagulant did not ($p > 0.05$). It is concluded that storage duration and testing method affect differential leukocyte count results, while the use of K₃EDTA versus Na₂EDTA anticoagulants does not yield a significant difference.*

Keywords - *Differential Leukocyte Count; Types of Antikoagulant; Whole blood; Storage stability; Examination Method*

Abstrak *Pemeriksaan Differential Leukocyte Count merupakan bagian dari pemeriksaan hematologi untuk menentukan persentase jenis leukosit dalam membantu penegakan diagnosis. Akurasi hasil dipengaruhi faktor pra-analitik. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh lama penyimpanan whole blood dengan antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA terhadap hasil pemeriksaan Differential Leukocyte Count metode manual dan otomatis. Penelitian eksperimental laboratorium dengan pendekatan cross-sectional menggunakan sampel darah vena dari 6 responden yang diperiksa melalui apusan darah tepi dan hematology analyzer pada setiap waktu penyimpanan. Hasil uji Two-Way terhadap parameter limfosit dan granulosit ($p > 0,05$). Hasil uji Kruskal–Wallis menunjukkan lama penyimpanan dan metode pemeriksaan berpengaruh signifikan terhadap parameter mid cell ($p < 0,05$), sedangkan jenis antikoagulan tidak berpengaruh signifikan ($p > 0,05$). Disimpulkan bahwa lama penundaan penyimpanan dan metode pemeriksaan memengaruhi hasil differential leukocyte count, sedangkan penggunaan antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA tidak memberikan pengaruh yang bermakna.*

Kata Kunci - *Differential Leukocyte Count; Jenis-Jenis Antikoagulan; Whole Blood; Stabilitas Penyimpanan; Metode Pemeriksaan*

I. PENDAHULUAN

Perkembangan laboratorium modern sangat bergantung pada akurasi hasil pemeriksaan. Teknologi terbaru meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas analisis untuk menghasilkan data akurat yang mendukung keputusan klinis secara optimal. Pemeriksaan darah lengkap atau *Complete Blood Count (CBC)* adalah standar diagnostik laboratorium untuk menilai jumlah dan kualitas komponen darah seperti eritrosit, leukosit, trombosit, hemoglobin, dan hematokrit [1]. Salah satu parameter penting dalam CBC adalah *Differential Leukocyte Count (DLC)*, yaitu pemeriksaan untuk menentukan presentase masing-masing jenis leukosit, seperti neutrophil, monosit, eosinophil, dan basophil. Saat leukosit mengalami leukopenia, jenis sel leukosit yang menurun meliputi eosinopenia, basopenia, neutropenia, limfopenia, serta monositopenia [2].

Seiring kemajuan teknologi laboratorium, pemeriksaan hitung jenis leukosit saat ini umumnya dilakukan dengan alat analisis hematologi otomatis (*Hematology Analyzer*) untuk meningkatkan efisiensi dan akurasi hasil pemeriksaan [3]. Namun, alat ini dapat mengalami kesulitan dalam mengidentifikasi sel-sel abnormal seperti blast (BL) dan granulosit imatur (IG). Dalam situasi tersebut, sistem akan menampilkan pesan "bendera" (flag) untuk mengindikasikan adanya sel abnormal serta memperingatkan pengguna mengenai kemungkinan ketidakakuratan pada hasil penghitungan diferensial, sehingga diperlukan pemeriksaan manual yaitu secara mikroskopis menggunakan hapusan darah untuk memastikan validitas hasilnya [4]. Pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) secara manual menggunakan sediaan apus darah tepi yang diwarnai (misalnya pewarnaan Wright atau Wright-Giemsa) masih memiliki peran penting sebagai metode konfirmasi (confirmatory test). Pemeriksaan manual memungkinkan identifikasi morfologi leukosit secara langsung, termasuk mendeteksi sel-sel abnormal seperti blast, granulosit imatur, limfosit atipik, maupun perubahan degeneratif sel yang belum tentu dapat dikenali secara akurat oleh alat otomatis [5].

Keakuratan hasil pemeriksaan DLC tidak hanya ditentukan oleh metode pemeriksaan, tetapi juga oleh tahap pra-analitik yang secara global sekitar 61% dari total kesalahan di laboratorium [6]. Kesalahan ini dapat mencakup penggunaan antikoagulan yang tidak tepat, penundaan dalam pengujian, atau suhu penyimpanan yang tidak optimal. Akibatnya, hasil pemeriksaan hematologi menjadi tidak valid, sehingga berpotensi menyebabkan kesalahan dalam pengambilan keputusan klinis [7]. Antikoagulan *Ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA), yang tersedia dalam bentuk garam K_2EDTA , K_3EDTA , dan Na_2EDTA , bekerja dengan mengikat ion kalsium (Ca^{2+}) sehingga mencegah pembekuan darah dan mempertahankan morfologi sel [8].

Antikoagulan Na_2EDTA maupun K_3EDTA bekerja melalui mekanisme yang sama, yaitu mengkelat ion kalsium (Ca^{2+}) sehingga membentuk kompleks $Ca-EDTA$ yang stabil. Pengikatan ion kalsium tersebut menghambat aktivasi faktor-faktor koagulasi yang bergantung pada Ca^{2+} sehingga pembekuan darah tidak terjadi dan morfologi sel darah tetap terpelihara. Oleh karena gugus aktif EDTA pada kedua garam tersebut identik, kemampuan mengikat Ca^{2+} secara kimia pada dasarnya tidak berbeda. Perbedaan antara Na_2EDTA dan K_3EDTA lebih berkaitan dengan bentuk sediaan, kelarutan, dan efek osmotik terhadap sel darah [9].

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa stabilitas sel darah dipengaruhi oleh waktu dan suhu penyimpanan. Penyimpanan darah pada suhu ruang dalam waktu yang lama dapat menyebabkan perubahan morfologi leukosit serta perubahan beberapa parameter hematologi, sedangkan penyimpanan pada suhu $2-8^{\circ}C$ mampu mempertahankan stabilitas hasil hingga 24 jam [10] [11]. Hasil penelitian lain juga menunjukkan bahwa hitung jenis leukosit pada sampel darah dengan antikoagulan K_2EDTA dan K_3EDTA relatif stabil selama penyimpanan hingga 8 jam, terutama pada kondisi refrigerasi ($2-8^{\circ}C$) [12]. Namun, penyimpanan yang lebih lama dapat menyebabkan perubahan morfologi leukosit, seperti pyknosis, vakuolisasi, degenerasi inti, hingga sel sulit diidentifikasi, sehingga berpotensi mempengaruhi akurasi hasil pemeriksaan DLC [13].

Berdasarkan hasil telaah putaka yang telah diuraikan, stabilitas hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) dipengaruhi oleh metode pemeriksaan, jenis antikoagulan, serta lama penyimpanan sampel. Namun, penelitian yang membandingkan efektivitas antikoagulan K_3EDTA dan Na_2EDTA terhadap stabilitas hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) secara manual maupun otomatis pada penyimpanan *whole blood* masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan efektivitas antikoagulan K_3EDTA dan Na_2EDTA terhadap stabilitas pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) dengan metode manual dan otomatis pada penyimpanan *whole blood*.

II. METODE

Penelitian ini telah diuji kelayakan etik (*ethical clearance*) di Komisi Kelayakan Etik Penelitian dan Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya dengan nomor: 0553/HRECC.FODM/VI/2026. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan pendekatan cross-sectional yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan *Whole Blood* menggunakan antikoagulan K_3EDTA dan Na_2EDTA terhadap hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) metode manual dan otomatis. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik D-IV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Muhammadiyah Sidoarjo pada bulan April. Sampel penelitian berupa darah vena yang diperoleh dari 6 responden laki-laki sehat berusia 17–25 tahun yang memenuhi kriteria meliputi, responden yang tidak sedang mengalami gejala infeksi (seperti batuk, pilek, atau radang tenggorokan), tidak memiliki penyakit kronis (diabetes, hipertensi, penyakit ginjal, atau penyakit jantung), tidak memiliki riwayat penyakit hematologi (anemia berat, leukemia, atau kelainan hematologi lainnya), tidak sedang mengonsumsi obat, tidak dalam masa pemulihan setelah sakit atau infeksi dalam 1 minggu terakhir, tidak menjalani vaksinasi dalam 7 hari terakhir, serta dalam kondisi sehat dan tidak memiliki keluhan kesehatan saat pengambilan sampel. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*.

Darah vena yang diperoleh kemudian dibagi ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan K_3EDTA dan Na_2EDTA . Masing-masing sampel diperiksa pada tiga waktu pengamatan, yaitu segera setelah pengambilan sampel

(0 jam), setelah penyimpanan selama 12 jam, dan setelah penyimpanan selama 48 jam pada suhu 2–8°C. Pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) dilakukan menggunakan dua metode, yaitu metode otomatis menggunakan alat *hematology analyzer* (Medonic-M32) dan metode manual menggunakan mikroskop (*Olympus CX33*).

Data yang diperoleh dilakukan uji statistik. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro–Wilk. Uji Homogenitas menggunakan uji Levene Test. Data yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan *Two-Way Anova*, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis. Seluruh pengujian statistik dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% dengan nilai signifikansi $p < 0,05$.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Pada pemeriksaan DLC untuk mengetahui nilai tunggal dari data yang didapat dan melihat sebaran data, maka dilakukan perhitungan rerata DLC pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1. Nilai rerata *Differential Leukocyte Count* (DLC) menunjukkan pola fluktuasi selama penyimpanan, yaitu limfosit mengalami penurunan dari 36,179% pada 0 jam menjadi 33,850% pada 12 jam, kemudian meningkat kembali menjadi 35,888% pada 48 jam. Pola serupa juga terlihat pada Mid Cell, yang menurun dari 6,988% menjadi 6,154%, kemudian meningkat menjadi 6,600%, sedangkan granulosit menunjukkan pola sebaliknya, yaitu meningkat dari 56,792% menjadi 60,037%, kemudian menurun menjadi 57,554% pada 48 jam. Fluktuasi tersebut kemungkinan disebabkan oleh sifat DLC yang merupakan hitung jenis leukosit dalam bentuk persentase relatif, sehingga perubahan proporsi satu jenis leukosit akan memengaruhi proporsi jenis leukosit lainnya. Selain itu, penyimpanan sampel masih memungkinkan terjadinya perubahan metabolik dan morfologi ringan pada leukosit yang dapat memengaruhi klasifikasi sel, baik oleh *hematology analyzer* maupun pemeriksaan manual. Kelompok Mid Cell yang terdiri atas monosit, eosinofil, dan basofil lebih mudah mengalami perubahan persentase karena jumlahnya relatif sedikit, sedangkan granulosit lebih rentan mengalami perubahan morfologi selama penyimpanan. Namun, penyimpanan pada suhu 2–8°C mampu memperlambat proses tersebut sehingga fluktuasi yang terjadi masih relatif kecil [11].

Tabel 1. Nilai *Differential Leukocyte Count* (DLC) (%) pada Beberapa Perlakuan

Variabel	Rerata <i>Differential Leukocyte Count</i> (DLC) (%)						
	Waktu Penyimpanan			Metode		Antikoagulan	
	0 Jam	12 Jam	48 Jam	Otomatis	Manual	Na ₂ EDTA	K ₃ EDTA
Limfosit (%)	36,179 ± 7,5543	33,850 ± 6,1193	35,888 ± 7,6385	34,694 ± 6,9968	35,917 ± 7,2757	35,575 ± 6,9172	35,036 ± 7,3934
Mid Cell (%)	6,988 ± 1,3901	6,154 ± 0,9094	6,600 ± 1,0476	6,967 ± 0,8050	6,194 ± 1,3484	6,575 ± 1,0500	6,586 ± 1,2924
Granulosit (%)	56,792 ± 7,9375	60,037 ± 6,2727	57,554 ± 7,8259	58,339 ± 7,4623	57,917 ± 7,4618	57,850 ± 7,0983	58,406 ± 7,8045

Berdasarkan metode pemeriksaan, rerata limfosit pada metode otomatis sebesar $34,694 \pm 6,9968\%$, sedangkan metode manual sebesar $35,917 \pm 7,2757\%$. Pada parameter mid cell diperoleh nilai rerata yaitu $6,967 \pm 0,8050\%$ pada metode otomatis dan $6,194 \pm 1,3484\%$ pada metode manual. Pada parameter granulosit diperoleh rerata $58,339 \pm 7,4623\%$ pada metode otomatis dan $57,917 \pm 7,4618\%$ pada metode manual. Nilai rerata *Differential Leukocyte Count* (DLC) yang diperoleh dengan metode manual dan otomatis menunjukkan hasil yang relatif serupa, meskipun terdapat sedikit perbedaan pada beberapa parameter. Perbedaan tersebut dapat dipengaruhi oleh prinsip kerja kedua metode, di mana *hematology analyzer* mengidentifikasi leukosit secara otomatis berdasarkan karakteristik fisik sel, sedangkan metode manual bergantung pada pengamatan morfologi leukosit pada apus darah tepi oleh pengamat [14].

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa rerata limfosit pada antikoagulan Na₂EDTA sebesar $35,575 \pm 6,9172\%$, sedangkan pada K₃EDTA sebesar $35,036 \pm 7,3934\%$. Pada parameter mid cell diperoleh rerata $6,575 \pm 1,0500\%$ pada Na₂EDTA dan $6,586 \pm 1,2924\%$ pada K₃EDTA. Sedangkan granulosit menunjukkan rerata $57,850 \pm 7,0983\%$ pada Na₂EDTA dan $58,406 \pm 7,8045\%$ pada K₃EDTA. Berdasarkan jenis antikoagulan, nilai rerata *Differential Leukocyte Count* (DLC) pada penggunaan Na₂EDTA dan K₃EDTA menunjukkan perbedaan yang relatif kecil. Rerata limfosit pada Na₂EDTA sedikit lebih tinggi dibandingkan K₃EDTA, sedangkan rerata granulosit sedikit lebih tinggi pada K₃EDTA, sementara parameter Mid Cell menunjukkan nilai yang hampir sama pada kedua antikoagulan. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa Na₂EDTA maupun K₃EDTA memiliki kemampuan yang relatif setara dalam mempertahankan stabilitas leukosit selama penyimpanan, karena keduanya bekerja dengan mekanisme yang sama, yaitu mengikat ion kalsium (Ca²⁺) sehingga mencegah proses koagulasi dan mempertahankan morfologi sel darah [15].

Tabel 2. Hasil Uji Normalitas (Shapiro Wilk) Nilai *Differential Leucocyte Count* (DLC) (%) pada Beberapa Perlakuan

Variabel	Nilai Signifikansi Uji Shapiro Wilk						
	Waktu Penyimpanan			Metode		Antikoagulan	
	0 Jam	12 Jam	48 Jam	Otomatis	Manual	Na ₂ EDTA	K ₃ EDTA
Limfosit(%)	0,399	0,733	0,456	0,388	0,491	0,471	0,358
Mid Cell(%)	0,915	0,505	0,087	0,237	0,016*	0,050	0,272
Granulosit(%)	0,327	0,629	0,551	0,556	0,693	0,318	0,109

Hasil uji normalitas menggunakan metode Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa sebagian besar data penelitian memiliki nilai signifikansi ($p > 0,05$), sehingga data dinyatakan terdistribusi normal. Pada parameter limfosit untuk penundaan diperoleh nilai signifikansi sebesar $p = 0,399$ pada 0 jam, $p = 0,733$ pada 12 jam dan $p = 0,456$ pada 48 jam. Berdasarkan metode pemeriksaan, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,388 pada metode otomatis dan 0,491 pada metode manual. Berdasarkan jenis antikoagulan, nilai signifikansi untuk jenis antikoagulan Na₂EDTA $p = 0,471$ dan K₃EDTA $p = 0,358$. Pada parameter granulosit untuk penundaan diperoleh nilai signifikansi sebesar $p = 0,327$ pada 0 jam, $p = 0,629$ pada 12 jam dan $p = 0,551$ pada 48 jam. Berdasarkan metode pemeriksaan, nilai signifikansi $p = 0,556$ pada metode otomatis dan $p = 0,693$ pada metode manual. Berdasarkan jenis antikoagulan nilai signifikansi untuk jenis antikoagulan Na₂EDTA $p = 0,318$ dan K₃EDTA $p = 0,109$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data limfosit dan granulosit memenuhi asumsi normalitas. Sedangkan pada parameter mid cell diperoleh beberapa nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,5$) terutama pada metode pemeriksaan, sehingga data dinyatakan tidak terdistribusi normal. Kondisi tersebut menunjukkan adanya variasi data yang lebih besar pada parameter mid cell dibanding parameter lainnya. Uji Shapiro-Wilk merupakan salah satu metode yang memiliki sensitivitas baik untuk menilai normalitas data pada jumlah sampel kecil. Uji ini sering digunakan dalam penelitian laboratorium karena mampu mendeteksi penyimpangan distribusi data secara lebih akurat dibanding beberapa uji normalitas lainnya [16].

Tabel 3. Hasil Uji Homogenitas (Levene Test) Nilai *Differential Leucocyte Count* (DLC) (%) pada Beberapa Perlakuan

Nilai Signifikansi Uji Levene Test	
Variabel	Sig.
Limfosit (%)	0,995
Mid Cell (%)	0,000*
Granulosit (%)	0,979

Berdasarkan hasil uji homogenitas menggunakan Levene Test, diperoleh nilai signifikansi pada parameter limfosit sebesar 0,995 dan granulosit sebesar 0,979 ($p > 0,05$), yang menunjukkan bahwa varians data kedua parameter tersebut bersifat homogen. Homogenitas varians mengindikasikan bahwa penyebaran data antar kelompok perlakuan relatif sama, sehingga asumsi kesamaan varians pada analisis parametrik telah terpenuhi. Sebaliknya, parameter Mid Cell memiliki nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), yang menunjukkan bahwa varians data tidak homogen. Kondisi ini mengindikasikan adanya perbedaan penyebaran data antar kelompok yang kemungkinan dipengaruhi oleh variasi nilai Mid Cell yang lebih besar. Kelompok Mid Cell merupakan gabungan monosit, eosinofil, dan basofil yang memiliki proporsi relatif kecil dalam sirkulasi darah, sehingga sedikit perubahan pada salah satu jenis sel dapat menyebabkan variasi yang lebih besar dibandingkan parameter leukosit lainnya. Oleh karena itu, hasil uji homogenitas ini menunjukkan bahwa asumsi homogenitas terpenuhi pada parameter limfosit dan granulosit, tetapi tidak terpenuhi pada parameter Mid Cell sehingga perlu dipertimbangkan dalam pemilihan analisis statistik selanjutnya. Data yang berdistribusi normal dan memiliki varians homogen dapat dianalisis menggunakan uji parametrik Two-Way ANOVA, sedangkan data yang tidak memenuhi salah satu atau kedua asumsi tersebut dianalisis menggunakan uji nonparametric Kruskal-Wallis [17].

Pada Tabel. 4 hasil uji parametrik pada parameter limfosit diperoleh nilai signifikansi penundaan sebesar $p = 0,515$, metode pemeriksaan sebesar $p = 0,497$, dan jenis antikoagulan sebesar $p = 0,764$ ($p > 0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara waktu penyimpanan pemeriksaan, metode pemeriksaan, maupun jenis antikoagulan terhadap stabilitas limfosit. Hal ini menunjukkan bahwa limfosit masih relatif stabil selama penyimpanan pada suhu 2–8°C hingga 48 jam baik menggunakan antikoagulan K₃EDTA maupun Na₂EDTA. Pada

parameter granulosit juga diperoleh nilai signifikansi penyimpanan sebesar $p=0,336$, metode pemeriksaan sebesar $p=0,821$, dan jenis antikoagulan sebesar $p=0,766$ ($p>0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan terhadap jumlah granulosit berdasarkan variasi waktu penundaan, metode pemeriksaan, maupun jenis antikoagulan yang digunakan. Stabilitas granulosit selama penyimpanan menunjukkan bahwa suhu dingin masih mampu mempertahankan integritas sel leukosit sehingga perubahan morfologi dan jumlah sel tidak terjadi secara signifikan.

Tabel 4. Hasil Uji Two-Way ANOVA Nilai Limfosit dan Granulosit pada Beberapa Perlakuan

Uji Two-Way ANOVA		
Variabel	Nilai Sig. Limfosit	Nilai Sig. Granulosit
Penundaan	0,515	0,336
Metode	0,497	0,821
Jenis Antikoagulan	0,764	0,766
Penundaan * Metode	0,956	0,967
Penundaan * Jenis Antikoagulan	0,890	0,912
Metode * Jenis Antikoagulan	0,822	0,835
Penundaan * Metode * Jenis Antikoagulan	0,985	0,965

Berdasarkan hasil uji Kruskal–Wallis pada Tabel 5, diperoleh nilai signifikansi lama penyimpanan sebesar 0,042 ($p<0,05$), metode pemeriksaan sebesar 0,004 ($p<0,05$), dan jenis antikoagulan sebesar 1,000 ($p>0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada hasil pemeriksaan mid cell berdasarkan lama penyimpanan dan metode pemeriksaan, sedangkan jenis antikoagulan tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap hasil mid cell. Pengaruh lama penyimpanan terhadap nilai mid cell diduga berkaitan dengan perubahan morfologi dan stabilitas leukosit selama proses penyimpanan. Meskipun penyimpanan pada suhu dingin dapat mempertahankan integritas sel dalam jangka waktu tertentu, perubahan struktur membran sel dan proses degenerasi yang berlangsung seiring waktu dapat memengaruhi kemampuan alat maupun pengamatan manual dalam mengidentifikasi kelompok mid cell, sehingga menghasilkan perbedaan nilai pada waktu penyimpanan yang berbeda.

Tabel 5. Hasil Uji Kruskal-Wallis Nilai Mid Cell pada Beberapa Perlakuan

Uji Kruskal-Wallis Test	
Variabel	Nilai Sig.
Penundaan	0,042
Metode	0,004
Jenis Antikoagulan	1,000*

Perbedaan yang signifikan berdasarkan metode pemeriksaan menunjukkan bahwa metode manual dan otomatis memiliki karakteristik analisis yang berbeda dalam mengidentifikasi populasi mid cell. Kelompok mid cell terdiri atas monosit, eosinofil, dan basofil yang jumlahnya relatif sedikit dibandingkan limfosit dan granulosit. Pada metode manual, identifikasi sangat bergantung pada kemampuan pengamat dalam membedakan morfologi sel, sehingga variasi subjektivitas dan kelelahan pengamat dapat memengaruhi hasil pemeriksaan. Sebaliknya, metode otomatis menggunakan prinsip pengukuran berbasis impedansi, hamburan cahaya, atau kombinasi parameter fisik sel yang menghasilkan klasifikasi lebih objektif dan konsisten. Perbedaan prinsip pemeriksaan tersebut dapat menjelaskan adanya perbedaan bermakna antara kedua metode. Sementara itu, nilai signifikansi $p=1,000$ pada variabel jenis antikoagulan menunjukkan bahwa penggunaan antikoagulan yang dibandingkan dalam penelitian ini tidak memberikan pengaruh terhadap hasil pemeriksaan mid cell. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua jenis antikoagulan masih mampu mempertahankan karakteristik sel leukosit sehingga tidak menimbulkan perbedaan jumlah kelompok mid cell selama pemeriksaan [18].

Penelitian ini memberikan gambaran yang komprehensif mengenai pengaruh lama penyimpanan, metode pemeriksaan, dan jenis antikoagulan terhadap hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) dalam satu rancangan penelitian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mid cell merupakan parameter yang paling dipengaruhi oleh faktor pra-analitik dan analitik, sedangkan limfosit dan granulosit relatif tetap stabil pada kondisi penelitian. Selain itu, tidak ditemukannya perbedaan yang bermakna antara penggunaan K_3EDTA dan Na_2EDTA menunjukkan

bahwa kedua antikoagulan memiliki kemampuan yang sebanding dalam mempertahankan kualitas spesimen selama periode penyimpanan yang diteliti. Temuan ini memberikan informasi praktis bahwa pengendalian waktu penyimpanan dan konsistensi metode pemeriksaan memiliki peran yang lebih besar dalam menjaga keakuratan hasil DLC, khususnya pada parameter mid cell, dibandingkan pemilihan jenis antikoagulan.

B. Pembahasan

Pada pemeriksaan menggunakan *hematology analyzer* 3-diff, leukosit dikelompokkan berdasarkan ukuran sel menjadi limfosit sebagai kelompok sel berukuran kecil, mid cell (MXD) sebagai kelompok sel berukuran sedang yang terdiri dari monosit, eosinofil, dan basofil, serta granulosit yang merupakan kelompok sel berukuran lebih besar dan didominasi oleh neutrofil. Pengelompokan ini dilakukan berdasarkan ukuran dan karakteristik fisik sel yang terdeteksi oleh alat hematologi otomatis [19]. Menurut penelitian sebelumnya, penundaan pemeriksaan darah selama 6–24 jam dapat menyebabkan perubahan morfologi leukosit, seperti neutrofil hipersegmentasi, vakuolisasi leukosit, hipogranulasi neutrofil, dan smudge cell. Perubahan morfologi tersebut berpotensi memengaruhi proses identifikasi dan pengelompokan leukosit oleh alat hematologi otomatis [20].

Secara keseluruhan hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan *whole blood* menggunakan antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA pada suhu 2–8°C hingga 48 jam tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) baik pada parameter limfosit, mid cell maupun granulosit. Temuan ini menunjukkan bahwa kedua jenis antikoagulan mampu mempertahankan stabilitas leukosit pada penyimpanan suhu 2–8°C. Stabilitas tersebut kemungkinan terjadi karena EDTA mampu mengikat ion kalsium sehingga mencegah proses koagulasi dan mempertahankan integritas membran sel darah selama penyimpanan. Hasil penelitian ini konsisten dengan temuan Kayadibi yang menunjukkan bahwa parameter leukosit, termasuk neutrofil, limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil, masih berada dalam kondisi stabil hingga 240 menit penyimpanan baik pada suhu ruang maupun suhu 4°C. Namun, penyimpanan pada suhu rendah cenderung lebih optimal dalam menjaga kestabilan sel [21].

Temuan penelitian ini juga konsisten dengan penelitian Kangwende yang mengevaluasi pengaruh kondisi penyimpanan sampel darah terhadap stabilitas parameter hematologi. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu refrigerasi (2–4°C) mampu mempertahankan stabilitas berbagai parameter hematologi hingga 72 jam dibandingkan penyimpanan pada suhu ruang. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa suhu dingin dapat memperlambat perubahan biologis sel darah selama penyimpanan, sehingga kualitas spesimen tetap terjaga. Temuan ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan, di mana penyimpanan *whole blood* pada suhu 2–8°C masih mampu mempertahankan stabilitas hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* hingga 48 jam baik pada sampel yang menggunakan antikoagulan K₃EDTA maupun Na₂EDTA [22].

Tidak ditemukannya perbedaan signifikan antara K₃EDTA dan Na₂EDTA pada penelitian ini, menunjukkan bahwa kedua antikoagulan memiliki kemampuan yang relatif setara dalam mempertahankan stabilitas leukosit selama penyimpanan. Temuan ini sejalan dengan penelitian Arshad et al. yang melaporkan bahwa berbagai jenis antikoagulan EDTA mampu mempertahankan struktur morfologi dan stabilitas sel darah selama penyimpanan [8]. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Riba bahwa penggunaan garam EDTA yang berbeda tidak memberikan pengaruh bermakna terhadap parameter hematologi yang diperiksa secara otomatis [12].

Adanya perbedaan signifikan pada parameter mid cell antara metode manual dan otomatis menunjukkan bahwa kelompok leukosit seperti monosit, eosinofil, dan basofil, lebih rentan mengalami variasi hasil identifikasi. Temuan ini sejalan dengan penelitian Bajimaya yang menemukan perbedaan bermakna antara hitung jenis leukosit manual dan otomatis pada beberapa jenis leukosit. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh tingginya ketergantungan metode manual terhadap keterampilan pengamat, sedangkan metode otomatis mampu memberikan hasil dengan tingkat presisi, efisiensi, dan konsistensi hasil yang lebih baik [23].

Dari sudut pandang fase pra-analitik laboratorium, hasil penelitian ini memiliki implikasi praktis yang penting. Pada fasilitas kesehatan yang mengalami keterlambatan pengiriman spesimen atau keterbatasan akses terhadap pemeriksaan segera, penyimpanan darah menggunakan K₃EDTA maupun Na₂EDTA pada suhu 2–8°C masih dapat mempertahankan validitas hasil *Differential Leukocyte Count* hingga 48 jam. Temuan ini konsisten dengan hasil penelitian Kangwende yang menunjukkan bahwa penyimpanan darah pada suhu dingin dapat mempertahankan stabilitas parameter hematologi hingga 72 jam tanpa perubahan klinis yang bermakna [22].

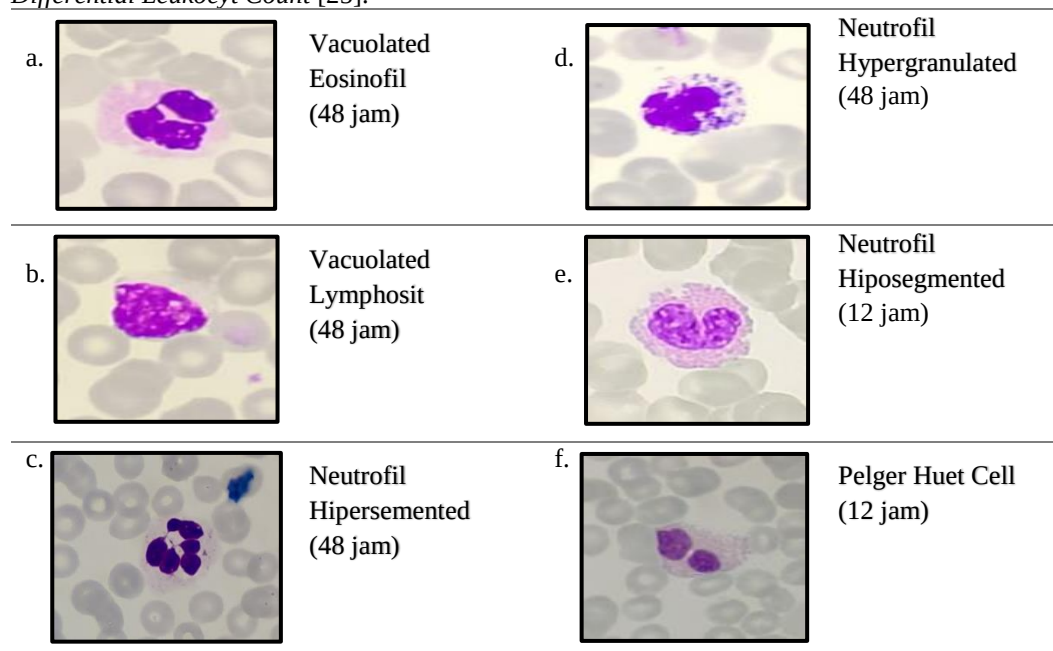
Pada Gambar 1. menunjukkan hasil pengamatan mikroskopis, ditemukan beberapa perubahan morfologi leukosit pada spesimen *whole blood* setelah penyimpanan, meliputi vacuolated eosinophil, vacuolated lymphocyte, neutrofil hipersegmentasi, neutrofil hypergranulated, neutrofil hiposegmentasi, dan Pelger-Huët cell. Munculnya perubahan morfologi tersebut menunjukkan bahwa penyimpanan spesimen dapat memengaruhi stabilitas dan integritas sel leukosit. Akibatnya, perubahan yang terjadi tidak hanya berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan secara kuantitatif, tetapi juga dapat mengurangi ketepatan identifikasi morfologi leukosit pada pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC), sehingga berpotensi memengaruhi interpretasi hasil laboratorium.

Perubahan morfologi ditemukan setelah 12 jam penyimpanan dan semakin jelas di 48 jam. Pada penyimpanan 12 jam ditemukan neutrofil hiposegmented yang ditandai dengan inti neutrofil yang hanya terdiri atas satu atau dua lobus.

dan palger huet cell yang ditandai dengan inti berbentuk bilobus menyerupai kacamata atau dumbbell. Kelainan ini ditandai dengan berkurangnya jumlah lobus inti neutrofil sehingga inti tampak bilobus atau menyerupai kacamata. Perubahan tersebut menunjukkan bahwa proses degenerasi sel dapat memengaruhi bentuk inti neutrofil sehingga menyerupai kelainan morfologi tertentu meskipun tidak mencerminkan kondisi patologis pasien. Perubahan ini menunjukkan bahwa neutrofil merupakan jenis leukosit yang paling sensitif terhadap faktor pra-analitik, khususnya keterlambatan pemeriksaan dan lama penyimpanan spesime. Menurut penelitian sebelumnya, semakin lama waktu penyimpanan, semakin menurun stabilitas sel darah sehingga perubahan morfologi leukosit menjadi lebih mudah ditemukan [6].

Pada penyimpanan selama 48 jam ditemukan beberapa perubahan morfologi leukosit, yaitu vakuolisasi pada eosinofil dan limfosit, serta neutrofil hipergranula dan hipersegmen. Vakuolisasi pada eosinofil ditandai dengan terbentuknya rongga-rongga kecil pada sitoplasma sel. Pada kondisi klinis, vakuolisasi dapat mengindikasikan aktivasi sel atau proses degeneratif akibat infeksi berat, inflamasi, maupun stres seluler. Namun, pada penelitian ini munculnya vakuola disebabkan oleh artefak penyimpanan, yaitu perubahan morfologi yang terjadi setelah darah disimpan dalam waktu tertentu. Semakin lama penyimpanan, metabolisme sel tetap berlangsung meskipun melambat pada suhu dingin sehingga dapat menyebabkan perubahan struktur sitoplasma dan pembentukan vakuola. Munculnya vakuola pada limfosit mengindikasikan terjadinya proses degeneratif sel yang berkaitan dengan kerusakan membran dan penurunan aktivitas metabolik selama penyimpanan. Limfosit yang mengalami vakuolisasi ditandai dengan adanya vakuola sitoplasma yang bervariasi ukurannya. Secara fisiologis, gambaran tersebut dapat ditemukan pada keadaan aktivasi limfosit akibat infeksi virus maupun gangguan imun. Akan tetapi, pada spesimen yang disimpan, vakuolisasi lebih sering mencerminkan proses degeneratif akibat penurunan viabilitas sel. Perubahan ini menunjukkan bahwa integritas membran sel mulai mengalami penurunan sehingga sitoplasma tampak mengalami vakuolisasi [24].

Neutrofil hipersegmentasi ditandai oleh inti yang memiliki lebih dari lima lobus. Semakin lama darah disimpan, perubahan struktur inti dapat menyebabkan lobus inti tampak semakin tersegmentasi sehingga menyerupai neutrofil hipersegmentasi. Neutrofil hypergranulated menunjukkan granula sitoplasma yang tampak lebih kasar dan lebih padat dibandingkan neutrofil normal. Perubahan granula lebih mungkin disebabkan oleh perubahan struktur sitoplasma selama penyimpanan sehingga granula tampak lebih jelas ketika dilakukan pewarnaan apus darah. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, yang melaporkan bahwa penyimpanan *Whole Blood* lebih dari 24 jam dapat meningkatkan kejadian artefak morfologi leukosit yang berpotensi mempengaruhi interpretasi pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* [25].



Gambar 1. Morfologi Sel Leukosit Abnormal

IV. KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa lama waktu penundaan penyimpanan whole blood memengaruhi hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) pada parameter mid cell, namun tidak berpengaruh terhadap parameter limfosit dan granulosit. Perbedaan metode pemeriksaan juga berpengaruh signifikan terhadap hasil mid

cell, sedangkan hasil limfosit dan granulosit relatif konsisten antara metode manual dan otomatis. Sementara itu, penggunaan antikoagulan K₃EDTA dan Na₂EDTA tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil pemeriksaan *Differential Leukocyte Count* (DLC) pada seluruh parameter yang diteliti, sehingga kedua jenis antikoagulan memiliki kemampuan yang relatif sama dalam mempertahankan stabilitas sampel selama waktu penyimpanan yang digunakan dalam penelitian. Berdasarkan hasil tersebut, penelitian selanjutnya disarankan menggunakan jumlah sampel yang lebih banyak dan variasi waktu penyimpanan yang lebih beragam untuk memperoleh hasil yang lebih komprehensif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak terutama kedua orang tua, dosen pembimbing, dan keluarga besar yang telah membantu memberikan dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini.

REFERENSI

- [1] M. Daves *et al.*, "Modern hematology analyzers: beyond the simple blood cells count (with focus on the red blood cells)," *J. Lab. Precis. Med.*, vol. 9, pp. 1–9, 2024, doi: 10.21037/jlpm-23-32.
- [2] N. U. Pratama, "Perbedaan hitung jenis leukosit menggunakan sediaan apus darah tepi dengan sediaan apus buffy coat pada penderita leukopenia demam tifoid," *Repository*, 2018.
- [3] A. Aliviamaita and Puspitasari, *Modul Praktikum Hematologi 4*. 2018.
- [4] D. Park *et al.*, "Development of a Novel Flow Cytometry-Based System for White Blood Cell Differential Counts : 10-color LeukoDiff," *Ann Lab Med*, vol. 39, pp. 141–149, 2019.
- [5] C. Review, O. F. Manual, H. Methods, E. Technologies, and I. N. Hematology, "Comparative Riview Of Manual Hematological Methods And Emerging Technologies In Hematology Diagnostics," *Pakistan J. Med. Caardiological Riview*, vol. 5, no. 2, pp. 1598–1616, 2026.
- [6] P. Puspitasari, A. Aliviamaita, S. D. Y. Wahyudhi, and F. P. Purwanti, "Stabilitas Sampel Darah Terhadap Profil Hematologi Dengan Metode Otomatis," *J. Muhammadiyah Med. Lab. Technol.*, vol. 5, no. 1, p. 1, 2022, doi: 10.30651/jmlt.v5i1.12667.
- [7] P. D. Mankar, K. Hatgaonkar, M. G. Kohale, R. S. Wankhade, and G. R. Bandre, "Enhancing Quality in Hematology Laboratory Testing: A Comprehensive Review of Preanalytical Phase Errors and Prevention Strategies," *J. Appl. Hematol.*, vol. 15, no. 2, pp. 95–101, 2024, doi: 10.4103/joah.joah_3_24.
- [8] A. Arshad, A. Safdar, M. Atif, H. Hussain, M. Waqas, and S. Mahmood, "Effects of Anticoagulants on Blood Cells Morphology and Biochemistry," *Biol. Clin. Sci. Res. J.*, vol. 2024, no. 1, p. 663, 2024, doi: 10.54112/bcsrj.v2024i1.663.
- [9] S. Mannu, "Influence of different methods and anticoagulants on platelet parameter measurement," vol. 44, no. 5, pp. 255–272, 2020, doi: <https://doi.org/10.1515/labmed-2020-0037>.
- [10] A. Rahmnitarini, 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] P. Kadam, N. Patil, and V. P. Mane, "Study of refrigerated storage of blood at 4°C on automated hematological parameters & morphological changes in peripheral blood smear: A prospective study," *Indian J. Pathol. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 9–14, 2023, doi: 10.18231/j.ijpo.2023.003.
- [12] V. C. J. Riba *et al.*, "Interference of blood storage containing K2EDTA and K3EDTA anticoagulants in the automated analysis of the hemogram," *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 56, pp. 1–6, 2020, doi: 10.5935/1676-2444.20200037.
- [13] H. Thabet, N. Ghandour, and M. Bakr, "Determination of Blood Age by Morphological Changes of Different White Blood Cells," *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol.*, vol. 26, no. 2, pp. 113–124, 2018, doi: 10.21608/mjfmct.2018.47197.
- [14] A. Purushothaman, P. Meenatchi, and S. Fathima, "Comparison of Manual Versus Automated Data Collection Method for Haematological Parameters," *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 11372–11376, 2019, doi: 10.26717/bjstr.2019.15.002702.
- [15] G. Onofrio, "Full-Field Hemocytometry . Forty Years of Progress Seen Through Clinical and Laboratory Hematology and the International Journal of Laboratory Hematology," vol. 43, no. March, pp. 7–14, 2021, doi: 10.1111/ijlh.13546.
- [16] C. Avram and M. Marusteri, "Normality assessment , few paradigms and use cases," vol. 30, no. 3, pp. 251–260, 2022, doi: 10.2478/rrlm-2022-0030.
- [17] P. Mishra, C. M. Pandey, and U. Singh, "Descriptive Statistics and Normality Tests for Statistical Data," vol. 22, no. 1, pp. 67–72, 2019, doi: 10.4103/aca.ACA.

- [18] M. Bruegel *et al.*, “Multicenter evaluation of the cobas m 511 integrated hematology analyzer,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 40, pp. 672–682, 2018, doi: 10.1111/ijlh.12903.
- [19] C. Coutaz, A. Mamin, and K. Mintzas, “Evaluation of the Sysmex XQ- 320 three- part differential haematology analyser and its flagging capabilities,” *J. Clin Lab Anal.*, vol. 38, pp. 1–12, 2024, doi: 10.1002/jcla.25017.
- [20] A. Aliviameita, 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,” vol. 16, no. 2, pp. 285–296, 2025.
- [21] H. Kayadibi, I. A. Acar, and S. Cam, “Stability of complete blood count parameters depends on the storage temperature , storage time , transport position and selected stability criterion,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1080/00365513.2020.1783570.
- [22] 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. Reports*, vol. 5, no. 08, pp. 1–7, 2024.
- [23] M. M. Bajimaya *et al.*, “Manual differential count and automated differential leukocyte count in normal individuals: a comparative study,” vol. 2, no. 1, pp. 21–24, 2021, doi: <https://doi.org/10.3126/jpsn.v2i1.42289>.
- [24] E. M. Fenu, T. Naal, and E. Palavecino, “Case Report Storage Artifact Masquerading as Yeast : Presenting a Diagnostic Pitfall,” *Case Rep. Pathol.*, vol. 2022, pp. 3–5, 2022, doi: <https://doi.org/10.1155/2022/3326214>.
- [25] D. V. Swami, A. S. K. Keswani, S. L. Gaikwad, D. S. Jadhav, and A. N. Bagate, “Effect of Blood Sample Storage on Sample Stability for CBC and Blood Cell Morphology Analysis,” *Res. J. Med. Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 349–353, 2025, doi: 10.36478/makrjms.2025.2.349.353.

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.