

Morfologi Eritrosit Pada Sediaan Apus Darah Tepi (SADT) Sampel Dengan Hasil Pemeriksaan *One Tube Osmotic Fragility Test (Otoft) Positif*

Muhammad Chalid G. D.*, Christine Sugiarto**, Lisawati Sadeli***

*Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung

**Bagian Patologi Klinis Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung

*** Bagian Patologi Klinis Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung

Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha
Jl. Prof. Drg. Suria Sumantri No. 65, Bandung

ABSTRAK

Latar belakang Membran plasma eritrosit bersifat *permeable* terhadap molekul air (H₂O). Sel darah merah yang dimasukkan dalam larutan hipertonis akan mengalami krenasi (pengerutan), sedangkan apabila eritrosit berada dalam lingkungan yang hipotonis, maka osmosis akan terjadi dari luar ke dalam sel yang akan menyebabkan sel akan mengembang hingga *cell burst*. Tes fragilitas osmotik menilai kejadian lisis eritrosit akibat adanya *osmotic stress*. Akibat adanya gangguan struktural dan biokimia dari eritrosit yang mengalami keadaan-keadaan patologis, hampir dapat dipastikan bahwa terdapat perubahan morfologi sel, yang dapat ditinjau lebih lanjut menggunakan pemeriksaan sediaan apus darah tepi (SADT). Seberapa erat hubungan antara perubahan fragilitas eritrosit dengan gambaran eritrosit pada SADT masih sangat layak untuk diteliti.

Tujuan penelitian Mengetahui morfologi eritrosit pada SADT (Sediaan Apus Darah Tepi) sampel darah yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan OTOFT (One Tube Osmotic Fragility Test).

Metode Penelitian Bersifat kualitatif, deskriptif. Penelitian dilakukan pada 40 orang normal yang diambil darahnya, dilakukan pemeriksaan One Tube Osmotic Fragility Test (OTOFT) dan pembuatan sediaan apus darah tepi. SADT dibaca oleh dua pembaca kompeten.

Hasil Dari pembaca pertama, sampel dengan OTOFT (+) memiliki gambaran *cigar-shape* (18,1%), sel target (9,1%), *burr cell* (9,1%) serta gambaran lainnya (fragmentosit dan ovalosit). Dari pembaca kedua, sampel dengan OTOFT (+) memiliki gambaran *cigar-shape* (27,3%), sel target (18,1%), *burr cell* (9,1%) serta gambaran lainnya (normokrom anisositosis).

Simpulan Morfologi eritrosit abnormal yang paling sering ditemukan pada sampel darah yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan One Tube Osmotic Fragility Test (OTOFT) positif adalah *cigar-shape cell*, sel target, dan *burr cell*.

Kata kunci : OTOFT, fragilitas eritrosit, SADT

ABSTRACT

Background Erythrocyte plasma membrane is water-permeable. Erythrocyte which is submerged in a hypertonic solution will be crenated, whereas in a hypotonic solution water molecules move into the erythrocyte, causing the cell to inflate or even burst. Osmotic fragility test evaluates red cell lysis due to osmotic stress. Due to structural and biochemical disruption of erythrocyte with pathological conditions, the erythrocyte fragility and the cell morphology are likely to change, which can further be investigated by using peripheral blood smear. Therefore, the correlation between the erythrocyte fragility change and its related peripheral blood smear is still a topic worth further investigation.

Objective To find out the erythrocyte morphology in the peripheral blood smear from the samples which give positive results in One Tube Osmotic Fragility Test.

Methods Qualitative, descriptive. The blood samples were collected from 40 volunteers of normal condition. One Tube Osmotic Fragility Test was carried out and peripheral blood smear was made from each blood sample. The peripheral blood smear slides were then read by two competent readers.

Results From the first reader, samples with OTOFT (+) showed cigar-shape (18.1%), target cell (9.1%), burr cell (9.1%) and other morphology (fragmentocyte and ovalocyte). From the second reader, it was found that the samples with OTOFT (+) showed cigar-shape (27.3%), target cell (18.1%), burr cell (9.1%) and other morphology (normochrome anisocytosis).

Conclusion The abnormal erythrocyte morphology most abundantly found in samples which give positive result in One Tube Osmotic Fragility Test (OTOFT) is cigar-shape cell, target cell, and burr cell.

Keyword: OTOFT, erythrocyte fragility, peripheral blood smear

PENDAHULUAN

Eritrosit merupakan suatu komponen utama darah setelah leukosit, trombosit dan plasma (1). Sel darah tersebut dihasilkan melalui proses hematopoiesis dalam sumsum tulang. Retikulosit, yang merupakan bentuk prematur dari eritrosit, akan mengalami maturasi dan membentuk sel darah merah berdiameter 8 μm yang berbentuk diskus bikonkaf dengan usia sel 120 hari (2).

Membran plasma eritrosit bersifat *permeable* terhadap molekul air (H_2O). Hal ini oleh sebab adanya *transport protein* AQP1. Sel darah merah yang dimasukkan dalam larutan hipertonis akan mengalami krenasi (pengerutan) sel karena lebih banyak air yang keluar sel daripada yang masuk. Demikian sebaliknya, apabila eritrosit berada dalam lingkungan yang hipotonis, maka osmosis akan terjadi dari luar ke dalam sel yang akan menyebabkan sel akan menggebang. Apabila membran plasma tidak dapat menahan tekanan tinggi intrasel tersebut oleh sebab tercapainya *critical volume*, maka sel akan pecah dan hemoglobin akan dilepaskan (3). Tes fragilitas osmotik menilai kejadian lisis eritrosit akibat adanya *osmotic stress*. Tingkat fragilitas osmotik eritrosit dipengaruhi oleh perbandingan luas permukaan sel terhadap volume sel. Peningkatan fragilitas osmotik dapat ditemukan pada sferositosis. Pada keadaan ini sel

mengalami penurunan perbandingan luas permukaan terhadap volume sel. Hal ini menyebabkan sel sferosit tidak dapat mengembang seefektif eritrosit diskoid normal dan menjadi lebih rentan terhadap tekanan osmotik. Peningkatan fragilitas osmotik juga dapat ditemukan pada anemia hemolitik autoimun (3), pasca transfusi (inkompatibilitas ABO dan Rhesus), toksisitas obat atau zat kimia, leukemia limfositik kronis, dan luka bakar. Pada keadaan thalasemia (mayor dan minor), anemia (defisiensi besi, asam folat, B6), polisitemia vera, post splenektomi, nekrosis hati akut dan subakut, dan ikterik obstruktif, fragilitas eritrosit menurun. Tes skrining yang paling sering digunakan untuk penilaian penurunan fragilitas eritrosit, seperti pada thalasemia, adalah tes fragilitas (4), contohnya *One Tube Osmotic Fragility Test* (OTOFT).

Akibat adanya gangguan struktural dan biokimia dari eritrosit yang mengalami keadaan-keadaan patologis di atas, hampir dapat dipastikan bahwa terdapat perubahan morfologi sel, yang dapat ditinjau lebih lanjut menggunakan pemeriksaan sediaan apus darah tepi (SADT). Seberapa erat hubungan antara perubahan fragilitas eritrosit dengan SADT eritrosit masih sangat layak untuk diteliti dengan tujuan untuk melihat apakah terdapat korelasi antara keduanya.

Untuk itu, Karya Tulis Ilmiah yang dibuat ini akan memperlihatkan dan menjelaskan morfologi eritrosit pada sediaan apus darah tepi (SADT) dengan hasil pemeriksaan *One Tube Osmotic Fragility Test* (OTOFT) positif.

TUJUAN PENELITIAN

Mengetahui morfologi eritrosit pada SADT (Sediaan Apus Darah Tepi) sampel darah yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan OTOFT (*One Tube Osmotic Fragility Test*).

BAHAN/SUBJEK DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah suatu penelitian deskriptif kualitatif untuk gambaran morfologi eritrosit pada sampel dengan pemeriksaan *One Tube Osmotic Fragility Test* (OTOFT) positif.

Alat:

- Pipet
- Tabung reaksi
- Larutan salin 0,36%
- Vacuette dengan EDTA
- Gelas objek
- Rak memulas
- Methanol
- Larutan pewarna Giemsa
- Air suling
- Mikroskop cahaya

Bahan:

- Darah yang diambil sesaat sebelum tes OTOFT dan pembuatan SADT.

Subjek Penelitian:

Subjek penelitian adalah 40 orang mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha yang telah menandatangani *informed consent* secara sukarela.

Prosedur Penelitian

Pemeriksaan *One Tube Osmotic Fragility Test* (OTOFT)

- Dengan menggunakan pipet, 0.02 ml “whole blood” dicampurkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0.36% larutan salin.
- Pipet dicuci 2-3 kali dengan larutan dari dalam tabung percobaan
- Setelah 5 menit, isi tabung percobaan dikocok hingga tercampur dengan baik dan hasil dievaluasi sebagai negatif, “suspicious”, dan positif. Dikatakan negative apabila larutan terlihat merah jernih yang menandakan hemolisis lengkap dari sel darah merah. Dikatakan positif apabila larutan terlihat kabur atau “smoky” yang menandakan hemolisis tidak lengkap dari sel darah merah. “Suspicious” apabila terlihat jernih dengan sedikit buram (5).

Pembuatan Sediaan Apus Darah Tepi (SADT)

- Darah vena diambil dan dicampurkan dengan EDTA, lalu diteteskan 1 tetes darah dengan

menggunakan pipet (garis tengah tetesan tidak lebih dari 2 mm) pada gelas objek. Gelas objek tersebut diletakkan di atas meja dengan tetes darah di sebelah kanan.

- Kaca penghapus dipersiapkan, dipilih yang bertepi benar-benar rata.
- Kaca penghapus diletakkan di sebelah kiri tetesan darah dengan tangan kanan, kaca disentuh pada tetesan darah dan dibiarkan hingga darah menyebar ke seluruh sisi kaca tersebut. Menunggu sampai darah mengenai titik $\frac{1}{2}$ cm dari sudut kaca.
- Sudut kaca penghapus diatur antara 30° - 40° dan segera menggerakkan kaca ke arah kiri sambil memegangnya dengan sudut. Jangan menekan kaca pembesar itu ke bawah. Darah diusahakan telah habis sebelum kaca penghapus mencapai ujung lain dari gelas objek. Hapusan darah tidak boleh terlalu tipis atau terlalu tebal. Ketebalan dapat diatur dengan mengubah sudut antara kedua kaca objek dan kecepatan menggeser. Makin besar sudut atau makin cepat menggeser, makin tipis hapusan darah yang dihasilkan. Sediaan dibiarkan kering di udara.
- Sediaan yang akan dipulas diletakkan di atas rak

pewarnaan dengan lapisan darah ke atas.

- Methanol diteteskan ke atas sediaan itu sehingga bagian yang terlapis darah tertutup seluruhnya. Dibiarkan selama 5 menit atau lebih lama.
- Kelebihan methanol dari kaca dibuang.
- Sediaan diliputi dengan Giemsa yang telah diencerkan dengan larutan penyanggah dan dibiarkan selama 20 menit, kemudian dibilas dengan air suling.
- Sediaan dibiarkan dalam sikap vertikal dan dibiarkan mengering pada udara (6).
- Sediaan diobservasi dengan pembesaran lemah (lensa objektif 10x dan lensa okuler 10x) untuk mendapat gambaran menyeluruh.
- Fokus diarahkan ke lapang pandang dengan penyebaran sel-sel darah yang telah cukup merata.
- Selanjutnya melihat dengan lensa objektif 40x dengan pembesaran ini diberikan penilaian terhadap eritrosit.
- Bila diperlukan diteliti lebih lanjut pada sediaan apus dengan menggunakan lensa objektif 100x menggunakan minyak emersi dengan menyingkirkan kaca penutup terlebih dahulu. Satu tetes minyak emersi diteteskan pada sediaan apus, menggunakan objektif yang sesuai.

- Penilaian dilakukan terhadap ukuran, bentuk, warna eritrosit. Penilaian dilakukan pada daerah pandangan dimana eritrosit terletak saling berdekatan tetapi tidak saling menumpuk, jangan menilai pada tempat dimana eritrositnya jarang-jarang.
- Penilaian dilakukan oleh dua orang pembaca yang kompeten di bidang patologi klinik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 4.1 Hasil Pemeriksaan *One Tube Osmotic Fragility Test* dan Pembacaan Sediaan Apus Darah Tepi oleh Ahli Pertama

No	OTOFT	SADT
1	<i>positif</i>	NN
2	negatif	NN
3	negatif	NAP (burr cell)
4	negatif	NN
5	negatif	NAP (cigar-shape, burr cell, fragmentosit)
6	negatif	NN
7	negatif	NN
8	<i>positif</i>	NN
9	<i>positif</i>	NN
10	<i>positif</i>	NAP (cigar-shape)
11	negatif	NN
12	negatif	NAP (ovalosit)
13	negatif	NAP (cigar-shape, burr cell)
14	negatif	NN
15	negatif	NN
16	<i>positif</i>	NN
17	negatif	NN
18	<i>positif</i>	NN
19	<i>positif</i>	NN
20	<i>positif</i>	NAP (cigar-shape, burr cell, pencil cell, fragmentosit, tear drop)
21	negatif	NN
22	negatif	NN
23	negatif	NN
24	<i>positif</i>	NN
25	negatif	NAP (covalent)
26	negatif	NN
27	negatif	NN
28	negatif	NN
29	negatif	NAP (cigar-shape, burr cell)
30	negatif	NN
31	<i>positif</i>	NAP (target cell)
32	negatif	NN

33	negatif	NAP (target cell, ovalosit, beberapa fragmentosit)
34	negatif	NAP (burr cell, ovalosit, cigar-shape)
35	negatif	NAP (cigar-shape)
36	negatif	NAP (target cell, ovalosit)
37	<i>positif</i>	<i>NAP (ovalosit)</i>
38	negatif	NN
39	negatif	NN
40	negatif	NN

Tabel 4.2 Hasil Pemeriksaan *One Tube Osmotic Fragility Test* dan Pembacaan Sediaan Apus Darah Tepi oleh Ahli Kedua

No	OTOFT	SADT
1	<i>positif</i>	<i>NN</i>
2	negatif	NN
3	negatif	NA
4	negatif	NN
5	negatif	NN
6	negatif	NN
7	negatif	NA
8	<i>positif</i>	<i>NAP (target cell, cigar-shape)</i>
9	<i>positif</i>	<i>NA</i>
10	<i>positif</i>	<i>NAP (cigar-shape)</i>
11	negatif	NN
12	negatif	NAP (cigar-shape)
13	negatif	NAP (cigar-shape)
14	negatif	NN
15	negatif	NN
16	<i>positif</i>	<i>NA</i>
17	negatif	NN
18	<i>positif</i>	<i>NA</i>
19	<i>positif</i>	<i>NN</i>
20	<i>positif</i>	<i>NA</i>
21	negatif	NA
22	negatif	NN
23	negatif	NA
24	<i>positif</i>	<i>NAP (Burr cell, cigar-shape)</i>
25	negatif	NA

26	negatif	NA
27	negatif	NAP (acanthocyt)
28	negatif	NAP (acanthocyt)
29	negatif	NAP (acanthocyt)
30	negatif	NAP (acanthocyt)
31	positif	NAP (target cell)
32	negatif	A(NH)AP (target cell)
33	negatif	NAP (target cell)
34	negatif	HAP (mikrosit, target cell)
35	negatif	A(NH)AP (cigar-shape, beberapa mikrosit)
36	negatif	NAP (target cell)
37	positif	A(NH)A
38	negatif	A(NH)AP (target cell, cigar-shape)
39	negatif	NAP (target cell)
40	negatif	A(NH)AP (target cell)

Keterangan

NN : Normokrom Normositer
 NAP : Normokrom Anisopoikilositosis
 NA : Normokrom Anisositosis
 A(NH)AP : Anisokrom (Normokrom Hipokrom) Anisopoikilositosis
 HAP : Hipokrom Anisopoikilositosis
 A(NH)A : Anisokrom (Normokrom Hipokrom) Anisositosis

Pembaca kompeten pertama

Dari 11 sampel OTOFT positif, pembaca mendapatkan 7 sampel dengan gambaran normokrom normositer. 4 sampel lainnya menunjukkan gambaran *cigar-shape* (18,1%), sel target (9,1%), *burr cell* (9,1%), dan gambaran lainnya (fragmentosit, ovalosit).

Pembaca kompeten kedua

Dari 11 sampel OTOFT positif, pembaca mendapatkan 2 sampel dengan gambaran normokrom normositer. 9 sampel lainnya menunjukkan gambaran *cigar-shape* (27,3%), sel target (18,1%), *burr cell* (9,1%) dan gambaran lainnya (normokrom anisositosis).

DISKUSI

Fragilitas osmotik eritrosit menunjukkan kemampuan sel darah merah dalam menampung sejumlah air sebelum lisis. Kemampuan ini ditentukan oleh perbandingan volume-luas permukaan. Kemampuan sel darah merah bertahan dalam larutan hipotonis disebabkan oleh bentuknya yang bikonkaf sehingga sel dapat mengembang hingga 70% sebelum membran sel teregang melebihi kemampuannya dan lisis terjadi (7).

Hemolisis sel darah merah normal mulai terjadi pada larutan garam 0,39% hingga 0,45%. Lisis sempurna sel darah merah pula terjadi pada larutan garam 0,30% hingga 0,33% (9).

Sferosit merupakan eritrosit dengan permukaan yang rata dan tanpa pucat di tengah, biasanya ukurannya lebih kecil dan bundar. Sel mengalami peningkatan perbandingan volume-luas permukaan sehingga kemampuannya untuk menampung air sebelum membran permukaan teregang maksimal lebih terbatas dibandingkan sel normal. Hal ini menyebabkan sferosit lebih rentan terhadap lisis osmotik. Peningkatan fragilitas osmotik merupakan ciri khas sel berbentuk sferoid tanpa dipengaruhi faktor penyebab sferositosis itu sendiri (7).

Penurunan fragilitas eritrosit menandakan kelainan berupa leptosit (*flattened red cells*). Pada

sel darah merah leptosit terjadi peningkatan perbandingan volume-luas permukaan. Perubahan seperti ini dapat ditemukan seperti pada kasus anemia defisiensi zat besi dan thalasemia. Sel darah merah pada kasus-kasus tersebut memiliki nilai MCH (*mean cell haemoglobin*) dan MCV (*mean cell volume*) yang lebih rendah dibandingkan nilai normal dan lebih resisten terhadap lisis osmotik (7).

One Tube Osmotic Fragility Test (OTOFT) merupakan suatu pemeriksaan terhadap fragilitas osmotik sel darah merah pada satu konsentrasi spesifik larutan garam dengan buffer (larutan garam NaCl 0.36% pada satu tabung), diperiksa dengan penglihatan mata tanpa penggunaan spektrofotometer (8).

Pada penelitian ini, sampel dengan hasil OTOFT positif didominasi oleh gambaran *cigar-shape* dan sel target. Gambaran *cigar-shape* banyak ditemukan pada pasien dengan eliptositosis herediter dan anemia defisiensi Fe. Pada eliptositosis herediter, terjadi defek pada spektrin horizontal yang merupakan komponen dari *reticular protein network* yang merupakan sebuah struktur pemberi bentuk dan ketahanan terhadap membran lipid eritrosit. Pada anemia defisiensi Fe terjadi penurunan kuantitas hemoglobin eritrosit. pada kedua kasus di atas, terjadi peningkatan perbandingan luas permukaan terhadap volume yang mengakibatkan penurunan

fragilitas osmotik eritrosit dan memberikan hasil pemeriksaan OTOFT positif.

Gambaran sel target sering ditemukan pada apus darah tepi pasien-pasien dengan penyakit liver, asplenia, thalasemia, dan anemia defisiensi Fe berat. Sel yang berbentuk target memiliki membran sel yang relatif berlebih dibandingkan kandungan sel tersebut. Hal ini menyebabkan terjadinya peningkatan perbandingan luas permukaan terhadap volume sel yang mengakibatkan terjadinya penurunan fragilitas osmotik eritrosit dan memberikan hasil pemeriksaan OTOFT positif.

SIMPULAN

Morfologi eritrosit abnormal yang paling sering ditemukan pada sampel darah yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan One Tube Osmotic Fragility Test (OTOFT) positif adalah *cigar-shape cell*, sel target, dan *burr cell*.

SARAN

Metode uji skrining karier thalasemia dengan menggunakan pemeriksaan OTOFT harus dikonfirmasi lagi dengan pemeriksaan-pemeriksaan lainnya seperti status besi (seperti *Fe serum*, TIBC, feritin), hitung retikulosit, indeks eritrosit, elektroforesis hemoglobin dan analisis mutasi DNA oleh karena cukup rendahnya nilai prediktif positif dari pemeriksaan OTOFT.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Oliveira, Sofia de, Saldanha, Carlota.** An Overview about Erythrocyte Membrane 2009 *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 44 (2010) 63-74 63
2. **Pasini, Kirkegaard, Mortensen, Lutz, Thomas, Mann.** *Blood* 2006
3. **Paleari, Renata, Mosca, Andrea.** 2008 *Controversies on the Osmotic Fragility Test* Milan University of Milano
4. **Wiwanitkit, Viroj.** Resistance to fragility test of red blood cell in thalassemia and reduction of osmotic force at cell surface 2009 *Journal of Medical Hypotheses and Idea*
5. **Kattamis, Efremov, Pootrakul.** Effectiveness of one tube osmotic fragility screening 1981 *Journal of Medical Genetics* 266-270
6. **Rachmawati, Lidiana, Kusfebriani, Rahmahdini, Annisa.** Kusfebriani 2011 *Sediaan Apus Darah* Jakarta FMIPA Universitas Negeri Jakarta

7. **Lewis, Mitchell, Bain, Barbara, Bates, Imelda.**
(2006). *Practical Haematology*. Germany: Churchill Livingstone Elsevier.
8. **Mehta, B. C.** (2002). NESTROFT: A screening test for beta thalassemia trait. *Indian J Med Sci* , 56:537-44.
9. **Mosby's Medical Dictionary.** (2009). Elsevier.