

Perbedaan Hitung Jumlah Leukosit Menggunakan Antikoagulan EDTA dan Filtrat Daun Ketepeng (*Cassia alata* L)

Difference in Leukocyte Count Using EDTA Anticoagulant and Ketepeng Leaf Filtrates (Cassia alata L)

Aliyah Diva Permatasari, Ragil Saptaningtyas, Gela Setya Ayu Putri, Budi Santosa

Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang

Corresponding author : aliyahdiva7@gmail.com

Abstrak

Leukosit berperan penting dalam sistem imun manusia dan pemeriksaan jumlah leukosit sering dilakukan untuk menilai kondisi kesehatan. Antikoagulan EDTA umum digunakan untuk mencegah pembekuan darah dalam pemeriksaan hematologi. Namun, penggunaan EDTA memiliki kelemahan, seperti menyebabkan nilai leukosit yang lebih rendah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk membandingkan hasil hitung jumlah leukosit menggunakan antikoagulan EDTA dengan filtrat daun ketepeng (*Cassia alata* L) diketahui memiliki kandungan alkaloid dan flavonoid yang berpotensi sebagai antikoagulan alami. Penelitian eksperimental ini menggunakan tiga perlakuan: EDTA, filtrat ketepeng 400 μL , dan 500 μL , masing-masing dengan 9 sampel darah. Penghitungan leukosit dilakukan secara manual menggunakan bilik hitung lalu dianalisis dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD. Hasil menunjukkan rata-rata jumlah leukosit tertinggi pada kelompok EDTA (7916,67 sel/ mm^3), kemudian filtrat 400 μL (6000 sel/ mm^3), dan terendah filtrat 500 μL (4261,11 sel/ mm^3). Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara ketiga kelompok. Berdasarkan hasil penelitian, filtrat daun ketepeng tidak dapat digunakan sebagai pengganti antikoagulan EDTA dalam pemeriksaan hitung jumlah leukosit karena menyebabkan penurunan jumlah leukosit yang signifikan.

Kata Kunci : leukosit, antikoagulan, EDTA, filtrat daun ketepeng, *Cassia alata* L

Abstract

Leukocytes play an important role in the human immune system and leukocyte counts are often performed to assess health conditions. EDTA anticoagulant is commonly used to prevent blood clotting in hematology tests. However, the use of EDTA has disadvantages, such as causing lower leukocyte values. Therefore, this study aims to compare the results of leukocyte counts using EDTA anticoagulant with ketepeng leaf filtrate (*Cassia alata* L) which is known to contain alkaloids and flavonoids that have the potential as natural anticoagulants. This experimental study used three treatments: EDTA, 400 μL ketepeng filtrate, and 500 μL , each with 9 blood samples. Leukocyte counting was carried out manually using a counting chamber and then analyzed using ANOVA and Post Hoc LSD tests. The results showed the highest average number of leukocytes in the EDTA group (7916.67 cells/ mm^3), then 400 μL filtrate (6000 cells/ mm^3), and the lowest 500 μL filtrate (4261.11 cells/ mm^3). There was a significant difference ($p < 0.05$) between the three groups. Based on the results of the study, ketepeng leaf filtrate cannot be used as a substitute for EDTA anticoagulant in leukocyte count examination because it causes a significant decrease in leukocyte count.

Keywords : *leukocytes, anticoagulant, EDTA, ketepeng leaf filtrate, Cassia alata L.*

PENDAHULUAN

Leukosit merupakan salah satu sel yang memiliki peranan utama terhadap sistem pertahanan tubuh atau sistem imun (Subaiyah, 2018). Jumlah leukosit normal bagi orang dewasa berkisar antara 4.000-11.000 sel/mm³ darah (Muti, 2021). Peningkatan jumlah leukosit biasanya dihubungkan dengan adanya infeksi atau inflamasi sehingga keadaan tersebut perlu untuk diperhatikan dengan melakukan pemeriksaan hitung jumlah leukosit (Salman et al., 2021).

Sampel yang biasa digunakan pada pemeriksaan leukosit adalah darah vena. Darah yang diperiksa tersebut mudah membeku jika berada di luar tubuh, sedangkan darah yang membeku tidak bisa digunakan untuk pemeriksaan, maka dari itu diperlukan antikoagulan. Antikoagulan yang paling umum digunakan adalah EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*). Antikoagulan EDTA mencegah trombositis menggumpal karena mengikat kalsium yang diperlukan untuk proses koagulasi (Mentari et al., 2020).

EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) memang sering digunakan pada pemeriksaan laboratorium hematologi, tetapi antikoagulan tersebut memiliki kekurangan dalam pemeriksaan leukosit, yaitu antikoagulan yang cair akan menyebabkan nilai leukosit rendah (Mentari et al., 2019). Kekurangan EDTA tersebut menunjukkan perlunya bahan alami yang dapat digunakan sebagai pengganti antikoagulan EDTA tanpa menimbulkan efek berbahaya. Bahan alami tersebut salah satunya adalah menggunakan filtrat daun ketepeng.

Tumbuhan Ketepeng mengandung alkaloid, saponin, tannin, steroid, antrakuinon, dan flavonoid (Egra et al., 2022). Penelitian Mirna Lumbessay dkk (2013) dipaparkan bahwa daun ketepeng memiliki kadar flavonoid total sebesar 26,86 mg/ml, sedangkan kadar alkaloid pada daun ketepeng belum dilaporkan penelitiannya. Mekanisme alkaloid sebagai antikoagulan adalah dengan menghambat jalur koagulasi dengan cara mengurangi produksi FXa, thrombin dan menginduksi PAI-1 untuk menghambat TNF- α (Rohmah et al., 2019), sedangkan flavonoid menghambat agregasi platelet (Rizalallah, 2020).

Penelitian sebelumnya yang mendukung penelitian ini adalah penelitian Ningsih (2024) menggunakan filtrat daun seledri, yang diketahui mengandung flavonoid dan alkaloid. Dalam penelitian tersebut 100 μ L filtrat daun seledri dicampur dengan 1 mL darah menunjukkan potensi sebagai antikoagulan, selain itu penelitian oleh Kusnadi dkk (2017) melaporkan bahwa kandungan total flavonoid pada daun seledri mencapai 24,71. Penulis belum menemukan adanya penelitian alternatif pengganti EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) menggunakan filtrat daun ketepeng sehingga penulis tertarik untuk meneliti. Penulis juga telah melakukan penelitian pra-laboratorium untuk menentukan volume filtrat daun ketepeng yang efektif dalam mencegah pembekuan darah. Berdasarkan hasil penelitian pra-laboratorium

diketahui bahwa volume 400 μL dan 500 μL terbukti efektif dalam mencegah pembekuan darah dalam 24 jam.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui perbedaan jumlah leukosit berdasarkan jenis antikoagulan yang digunakan. Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2025 di Laboratorium Hematologi Universitas Muhammadiyah Semarang. Objek penelitian ini adalah sampel darah vena manusia yang diperoleh dari responden yang dapat digunakan untuk uji perbandingan antara filtrat daun ketepeng dan EDTA sebagai antikoagulan. Total sampel sebanyak 27 yang dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok dengan antikoagulan EDTA, kelompok dengan filtrat daun ketepeng 400 μL , dan kelompok dengan filtrat daun ketepeng 500 μL . Masing-masing kelompok terdiri dari sembilan sampel.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi blender, kain saring, beaker glass, tabung reaksi, mikropipet dan tip, pipet thoma leukosit, kamar hitung (Improved Neubauer), deck glass, mikroskop, kapas alkohol, dan alat venipungsi. Bahan yang digunakan antara lain darah vena, larutan Turk sebagai pengencer, antikoagulan EDTA 10%, serta filtrat daun ketepeng yang diperoleh dengan cara menghaluskan daun ketepeng segar menggunakan blender dan menyaringnya hingga diperoleh filtrat berkonsentrasi 100%.

Teknik pengumpulan data dilakukan melalui pemeriksaan jumlah leukosit secara manual dengan metode kamar hitung. Darah sebanyak 1 mL dari tiap kelompok perlakuan dicampur dengan antikoagulan yang sesuai, kemudian diencerkan menggunakan larutan Turk dan dihitung jumlah leukositnya menggunakan mikroskop pada empat kotak besar pada kamar hitung. Data hasil pemeriksaan kemudian dicatat dan dianalisis.

Data yang diperoleh merupakan data primer berdasarkan hasil perbedaan jumlah leukosit menggunakan antikoagulan EDTA, filtrat daun ketepeng 400 μL , dan filtrat daun ketepeng 500 μL lalu diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Jika data berdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Apabila hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan uji lanjut menggunakan *Post Hoc LSD* untuk mengetahui letak perbedaan tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil data jumlah leukosit berdasarkan penggunaan jenis antikoagulan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Analisis data hitung jumlah leukosit berdasarkan antikoagulan yang digunakan

Kelompok	N	Jumlah Leukosit (sel/mm ³)			Standar Deviasi
		Rata-Rata	Minimum	Maksimum	
EDTA + 1 mL darah	9	7.916	4.650	9.700	1498,33
Filtrat Daun Ketepeng 400 µL + 1 mL darah	9	6.000	3.500	7.200	1238,19
Filtrat Daun Ketepeng 500 µL + 1 mL darah	9	4.261	2.950	5.050	659,91

Berdasarkan tabel di atas hasil hitung jumlah leukosit dari 9 sampel antikoagulan EDTA lebih tinggi dari sampel filtrat daun ketepeng. Hasil rata-rata hitung jumlah leukosit sampel antikoagulan EDTA adalah 7.917 mm³ dan sampel filtrat daun ketepeng terendah pada volume 500 µL yaitu 4.261 mm³.

Tabel 2. Analisis Uji Normalitas

	Shapiro-Wilk
	Sig
Jumlah leukosit dengan EDTA	0,207
Jumlah leukosit dengan filtrat daun ketepeng 400 µL	0,116
Jumlah leukosit dengan filtrat daun ketepeng 500 µL	0,594

Tabel 2 menunjukkan nilai signifikansi hasil penelitian hitung jumlah leukosit dengan EDTA, filtrat daun ketepeng 400 µL, dan filtrat daun ketepeng 500 µL lebih dari 0,05 yang berarti berdistribusi normal. Data tersebut dilanjutkan dengan uji one way ANOVA dan Uji Post Hoc LSD (*Least Significant Difference*) pada tabel 3.

Tabel 3. Analisis Uji One Way ANOVA dan Post Hoc LSD

No	Nama Uji	Variabel	Sig.	Keterangan
1.	ANOVA		0,000	Ada perbedaan signifikan
2.	Post Hoc LSD	EDTA - Filtrat Daun Ketepeng 400 µL	0,002	Ada perbedaan signifikan
		EDTA - Filtrat Daun Ketepeng 500 µL	0,000	Ada perbedaan signifikan

Berdasarkan tabel 3 nilai signifikansi uji ANOVA dan *Post Hoc LSD* kurang dari 0,05 yang berarti terdapat perbedaan secara signifikan.

Penurunan jumlah leukosit yang signifikan pada kelompok filtrat daun ketepeng menunjukkan bahwa filtrat tersebut belum mampu mempertahankan kestabilan leukosit sebagaimana yang dilakukan oleh EDTA. EDTA bekerja dengan cara mengikat ion kalsium, sehingga mencegah proses pembekuan darah tanpa memengaruhi jumlah maupun morfologi leukosit. Antikoagulan yang baik seharusnya tidak menyebabkan lisis (kerusakan) sel darah merah, tidak merusak komponen darah

lainnya seperti sel darah putih dan trombosit, serta tidak mengubah morfologi sel darah. Hal tersebut sesuai dengan karakteristik EDTA yang telah terbukti efektif dalam mempertahankan integritas dan kestabilan seluruh komponen darah (Rizka & Nugraha, 2023), oleh karena itu jumlah leukosit pada kelompok EDTA tetap tinggi dan dapat dianggap lebih akurat dalam merepresentasikan kondisi darah yang sebenarnya.

Faktor yang memengaruhi penurunan jumlah leukosit kemungkinan disebabkan oleh kandungan antrakuinon dan saponin yang terbawa dalam filtrat daun ketepeng. Selain mengandung flavonoid dan alkaloid, daun ketepeng juga memiliki senyawa aktif lainnya seperti terpenoid, steroid, saponin, fenol, tanin, dan antrakuinon (Asmah *et al.*, 2020). Senyawa antrakuinon diketahui dapat menginduksi apoptosis melalui mekanisme stres oksidatif, yang menyebabkan kerusakan pada sel leukosit, terutama pada membran sel. Kerusakan ini ditandai dengan penurunan potensial membran mitokondria yang menyebabkan terbukanya pori-pori transmembran, pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma, dan akhirnya menginisiasi jalur apoptosis (Chiang *et al.*, 2011). Temuan ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ghorab *et al.* (2015), yang menunjukkan bahwa senyawa antrakuinon dapat menyebabkan penurunan signifikan pada jumlah sel darah putih (WBC).

Volume filtrat yang digunakan dalam penelitian ini cukup besar yaitu 400 dan 500 μL , dibandingkan dengan volume EDTA yang hanya sekitar 10 μL . Volume filtrat yang tinggi dapat menyebabkan pengenceran darah dan menciptakan lingkungan hipotonis. Dalam kondisi ini, leukosit dapat menyerap air secara osmotik, mengalami pembengkakan, dan akhirnya pecah, yang berdampak pada penurunan jumlah leukosit yang dihitung (Yolanda, 2022).

Uji statistik *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan ($p < 0,05$) dan hasil *Post Hoc LSD* mengonfirmasi bahwa filtrat daun ketepeng tidak dapat menggantikan EDTA sebagai antikoagulan dalam perhitungan jumlah leukosit. Dengan demikian, meskipun daun ketepeng memiliki sifat antikoagulan, efektivitasnya dalam mempertahankan leukosit tidak sebaik EDTA.

Penggunaan filtrat daun ketepeng selain kandungan antrakuinon dan saponin serta membuat encer darah ternyata juga membuat latar belakang mikroskopis bilik hitung terlihat kotor dibanding dengan EDTA sehingga sedikit sulit membaca sel leukosit. Filtrat biasanya hanya cairan yang melewati kertas saring sehingga kandungan senyawa aktifnya rendah dibandingkan ekstrak yang menggunakan pelarut untuk melarutkan senyawa yang diinginkan (Ares *et al.*, 2018). Metode filtrasi juga tidak selektif secara kimiawi sehingga dapat membawa kontaminan atau komponen yang tidak diinginkan (Tubaon *et al.*, 2017), jadi metode filtrasi tidak direkomendasikan sebagai teknik preparasi untuk memperoleh senyawa aktif dari daun ketepeng.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan ada perbedaan secara signifikan antara 3 perlakuan yang dianalisis. Nilai Signifikansi pada uji *one way ANOVA* adalah $p < 0,05$ dan nilai perbedaan antar perlakuan pada uji *Post Hoc LSD* adalah $p < 0,05$. Filtrat daun ketepeng tidak dapat digunakan sebagai pengganti antikoagulan untuk menghitung jumlah leukosit.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ares, G., Cataudella, S., & Pires, S. 2018. Comparison of the Extraction Methods for the Isolation of Bioactive Compounds from Plants: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3. 125-134.
- [2] Asmah, N., Halimatussakdiah, & Amna, U., 2020. Analisa Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) dari Bireum Bayeun, Aceh Timur. *Quimica: Jurnal Kimia Sains dan Terapan*, 2, 2. 7-10.
- [3] Chiang, Y. C., Lin, T. Y., Hsu, F. L., & Chang, F. R., 2011. Mechanism of Antrakuinon-Induced Apoptosis in Human Leukemic Cells. *Journal of Cancer Research and Therapy*, 27, 5. 417-426.
- [4] Egra, S., Mardiana, Kurnia, A., Kartina, Murtalaksono, A., & Kuspradini, H., 2019. Uji Potensi Ekstrak Daun Tanaman Ketepeng (*Cassia alata* L) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia solanacearum* dan *Streptococcus sobrinus*. *Ulin-J Hut Trop*, 3, 1. 25-31.
- [5] Ghorab M.A., El-Hossary E.M., Abo-Ghaleia A., Badawi A. A. 2015. Anti-Inflammatory and Antiarthritic Activity of Anthraquinone Derivatives in Rodents. *International Journal of Inflammation*, 1-7.
- [6] Lumbessy, M., Abidjulu, J., & Paendong, J. J., 2013. Uji Total Flavonoid Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional Di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA Unsrat online*, 2, 1. 50-55.
- [7] Mentari, I. N., Ariza, D., & Halid, I., 2020. Pemanfaatan Ekstrak Daun Seledri (*Apium Graveolens*) Sebagai Antikoagulan Pengganti EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) pada Pemeriksaan Jumlah Trombosit. *Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah Kesehatan*.
- [8] Muti, K. A. (2021). Perbedaan Penggunaan Antikoagulan Na₂EDTA, K₂EDTA dan K₃EDTA Terhadap Profil Leukosit yang Diperiksakan dengan Hematology Analyzer. *Poltekkes Kemenkes Yogyakarta*.
- [9] Ningsih, T. K. 2024. Perbandingan Penggunaan Antikoagulan Alternatif Filtrat Daun Seledri (*Apium Graveolens*) dan Antikoagulan EDTA Terhadap Hitung Jumlah Sel Leukosit. Tesis. Fakultas Ilmu Kesehatan dan Sains Teknologi Universitas Borneo Lestari, Banjarbaru.
- [10] Rizalallah, A. A.-M. 2020. Uji Aaktivitas Antikoagulan Ekstrak Etanol 96% Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Secara In Vitro. Skripsi. STIKES Rumah

Sakit Anwar Medika, Sidoarjo.

- [11] Rizka, F. A., & Nugraha, G. 2023. Natrium Sitrat 3,2% Sebagai Antikoagulan Alternatif Pemeriksaan Hemoglobin pada Spesimen Darah Av-Shunt Pasien Hemodialisa. *Jurnal Prosiding*, 147-157.
- [12] Rohmah, M. K., Fickri, D. Z., Damasari, K. P., Azis, R., & Wahyuni, K. I., 2019. Uji Aktivitas Antikoagulan Ekstrak Alkaloid Total Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) Secara In Vitro. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*.
- [13] Salman, Y., Nadia, N., & Wahidah, R., 2021. Perbedaan Hasil Hitung Jumlah Leukosit dengan Modifikasi Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) dan Asam Cuka sebagai Pengganti Komposisi Larutan Turk. *Jurnal Kesehatan Indonesia*.
- [14] Subaiyah. 2018. Perbandingan Larutan Turk Dengan Modifikasi Larutan Turk Perasan Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia Swingle*) Terhadap Jumlah Leukosit. Skripsi. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah, Semarang.
- [15] Yolanda, F. 2022. Literatur Review : Pengaruh Stabilitas Penyimpanan Sampel Darah K2EDTA dan K3EDTA Terhadap Jumlah Leukosit Metode Hematology Analyzer. Tesis. Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas 'Aisyiyah, Yogyakarta.
- [16] Tubaon, R.M., Haddad, P.R., & Quirino, J.P., 2017. Sample Clean-Up Strategies for Efficacious Analysis of Plant Natural Product. *Analytical Chemistry*, 75-86.