



POLA ABSORBANSI ERITROSIT DALAM DARAH-EDTA PADA PENDERITA LEUKEMIA LIMFOBLASTIK AKUT (LLA) MELALUI KAJIAN SPEKTROSKOPI UV-VIS

Deni Aryati^{1)*}, Iman Santoso²⁾ Ngadikun³⁾

¹Program Ilmu Fisika, MIPA, Universitas Gadjah Mada

²Program Ilmu Fisika, MIPA, Universitas Gadjah Mada

³Program Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

*denia_astida@yahoo.com

Nomor Handphone: 082325082860

Dikirimkan: 12/08/2020.

Diterima: 22/10/2020.

Dipublikasikan: 31/10/2020.

Abstrak

Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) adalah penyakit kanker yang sering ditemukan pada anak. Diagnosis LLA dalam bidang medis dengan metode biopsi diketahui apabila sel blast dalam sumsum tulang dalam jumlah yang besar. Kekurangan deteksi biopsi adalah LLA beresiko pendarahan dan infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui angka eritrosit pada penderita LLA, pengaruh lama terapi terhadap angka eritrosit penderita LLA, dan perbedaan pola absorbansi eritrosit antara kedua kelompok. Pola absorbansi eritrosit dideteksi dengan spektrofotometer UV-VIS 1800, panjang gelombang 560 nm. Pola perubahan absorbansi terekam selama 1206 s dengan interval 6 s. Pengaruh lama terapi terhadap angka eritrosit dengan uji regresi linier, serta pola absorbansi kedua kelompok subjek penelitian dengan pendekatan deterministik dan stokastik. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata angka eritrosit penderita LLA lebih rendah daripada subjek normal. Lama terapi berkorelasi sangat rendah dengan angka eritrosit yang dapat ditunjukkan dengan nilai $R = 0,004$. Perbedaan pola absorbansi eritrosit diuji dengan pendekatan deterministik dan stokastik sehingga diperoleh perbedaan nilai parameter. Perbedaan nilai parameter dengan uji Mann Whitney diperoleh P_{hit} untuk masing-masing parameter dari kedua kelompok adalah 0.004, 0.274, 0.001, 0.111, 0.291, 0.331. Parameter berbeda bermakna adalah d1 dan d3. Sedangkan parameter tidak berbeda bermakna adalah d2, s1, s2, s3.

Kata kunci: Eritrosit, Spektrofotometer, Absorbansi

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (LLA) is a cancer that often found in children. The diagnosis of LLA in the medical field by the biopsy method when large numbers of blast cells in the bone marrow. Lack of biopsy is LLA at risk of bleeding and infection. This research aims to determine the number of erythrocytes, the effect of duration of therapy to number of erythrocytes, and pattern differences of erythrocyte absorbance. Erythrocyte absorbance pattern was detected by UV-VIS 1800 spectrophotometer on wavelength 560 nm. The pattern of absorbance changes during 1206 s at intervals of 6 s. Effect of therapy duration on erythrocyte numbers analyzed linear regression tests, as well as the absorbance patterns analyzed deterministic and stochastic approaches. The results of the average number of erythrocytes in patients with LLA was lower than in normal subjects. The therapy duration correlated very low that indicated by R value = 0.004. Differences in erythrocyte absorbance patterns were tested deterministic and stochastic approaches. The difference of parameter values with the Mann Whitney test obtained P for each parameter is 0.004, 0.274, 0.001, 0.111, 0.291, 0.331. Significantly, different parameters are d1 and d3. While, d2, s1, s2, s3 are not significantly different.

Kata kunci: Erythrocytes, Spectrophotometer, Absorbance

PENDAHULUAN

Studi sistem deteksi biomarker pada penyakit kanker semakin meningkat. Hal ini dilatarbelakangi oleh tiga hal, yaitu peningkatan jumlah penderita penyakit kanker, angka kematian tinggi dan keterlambatan deteksi pasien pengidap kanker [1]. Berdasarkan data statistik WHO (2016), ada 215.000 kasus kanker darah (leukemia dan limfoma) sampai 35% [2]. Di Indonesia, kasus leukemia tertinggi yaitu jenis LLA di Provinsi DIY [3]. Angka kematian tinggi dikarenakan pasien datang ke rumah sakit sudah stadium lanjut sehingga penanganannya sulit dan membutuhkan biaya yang mahal [4]. Metode deteksi yang dikenal sebagai gold standar LLA saat menggunakan biopsi [5]. Kelemahan metode ini tidak dapat mendeteksi LLA pada stadium awal. Hal ini disebabkan oleh kadar biomarker yang berupa protein pada LLA dengan jumlahnya sedikit sehingga sulit dianalisis keberadaannya menggunakan metode tersebut. Pengamatan eritrosit dalam darah-EDTA dengan metode spektrometri dapat mengatasi kesulitan tersebut. Biomarker LLA, terdispersi dalam darah utuh, dapat diketahui secara tidak langsung melalui pengaruhnya terhadap eritrosit yang sebagian besar hidup di darah utuh dengan metode tersebut. Hal ini mengingat komposisi sel darah terbesar adalah eritrosit (hampir 45% dari sel darah) [6]. Eritrosit dalam darah pada subjek normal dan penderita LLA akan digunakan untuk mendeteksi kemunculan kanker. Pengendapan eritrosit dalam darah yang diberi ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) terjadi secara bertahap [7]. Terjadinya perubahan komposisi (jumlah dan jenis) makromolekul dalam medium kontinu berakibat terjadinya perubahan potensial zeta partikel koloid [8]. Contoh makromolekul yang ada di plasma adalah protein plasma. Protein, asam amino, sulfat, fosfat dan ion lainnya yang bermuatan negatif

merupakan anion utama [9]. Sedangkan kation utama di dalam sel (ion bermuatan positif) adalah kalium meskipun juga ada natrium (Na^+). Hal yang membedakan antara orang sehat dengan penderita LLA adalah adanya protein biomarker. Keberadaan protein biomarker dapat mengakibatkan perubahan keseimbangan ion-ion di sekitar eritrosit. Ion-ion di dalam darah juga berinteraksi dengan protein. Kekuatan ionik dan konstanta dielektrik berpengaruh besar terhadap potensial zeta [10]. Perubahan keseimbangan ion-ion di sekitar eritrosit menyebabkan terjadinya perubahan potensial zeta [1]. Hal ini menyebabkan eritrosit cepat mengalami agregasi dikarenakan penurunan potensial zeta dilanjutkan proses sedimentasi.

Perubahan komposisi darah yang menyebabkan perubahan nilai potensial zeta akan memberikan dinamika agregasi yang berbeda. Potensial zeta yang menurun akan menyebabkan eritrosit lebih cepat beragregat. Agregasi akan meningkat pada penderita infeksi, patologi klinik, anemia serta beberapa penyakit lainnya [11]. Pada kondisi gaya tolak menolak antar partikel dalam plasma tidak mampu lagi mengatasi gaya vander waals, maka akan terjadi agregasi yang berlanjut terjadinya endapan [12], [7], [13], [14], [4]. Peristiwa endapan yang disertai dengan interaksi eritrosit yang acak dalam darah-EDTA dapat di analisis dengan pendekatan deterministik dan stokastik [1]. Metode analisis absorbansi eritrosit yang diiringi dengan pengendapan menggunakan metode spektrofotometri. Prinsip metode spektrofotometri adalah adanya serapan maksimum eritrosit pada panjang gelombang tunggal 560 nm [15]. Saat kondisi deoksihemoglobin. Jenis protein yang berbeda antara subjek normal dan penderita LLA dapat memberikan pengaruh ke eritrosit yang berbeda pula sehingga pola absorbansi juga berbeda. Hal ini disebabkan oleh jenis protein dalam plasma darah yang dapat mengakibatkan adanya

perubahan potensial zeta eritrosit [8]. Terjadinya perubahan pada darah-EDTA memberikan perubahan pada spektrofotometer [1]. Dengan demikian, penelitian ini akan mengetahui adakah perbedaan angka eritrosit pada penderita LLA dengan normal, lamanya terapi terhadap eritrosit pada penderita LLA, serta perbedaan absorbansi eritrosit antara kelompok normal dan LLA.

METODE

1. Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan mengamati nilai absorbansi eritrosit dalam darah-EDTA penderita LLA dan subjek normal dengan spektrofotometer. Pengamatan dilakukan setiap 6 sekon selama 30 menit. Penelitian ini dilaksanakan menggunakan fasilitas di beberapa laboratorium. Pengambilan sampel darah vena anak (penderita LLA) di bangsal Tulip (Poli Anak) RSUP Sardjito. Pengujian sampel darah 550 μl dengan spektrofotometer di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran (FK) UGM, serta pengujian darah rutin 1 cc oleh petugas Patologi Klinik (PK) di Laboratorium Patologi Klinik, FK UGM. Adapun rentang waktu penelitian ini mulai bulan Juli 2016 sampai April 2019.

2. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini terdiri dari kelompok subjek penderita LLA (I) dan normal (II) sebagai kontrol. Pemilihan subjek penelitian ini menggunakan kriteria inklusi, eksklusi dan *withdrawal*. Pada penelitian ini dianalisis 28 sampel subjek LLA dan 31 sampel subjek normal. Tujuan dari perencanaan ukuran sampel ini adalah memilih jumlah subjek yang cukup untuk nilai α dan β yang rendah sehingga tidak membuat penelitian sulit [16].

Penentuan jumlah sampel masing-masing kelompok mengacu pada persamaan sebagai berikut [4] [16].

$$n_1 = n_2 = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(m_1 - m_2)^2} \quad (1)$$

dengan:

n_1, n_2 : Jumlah sampel kelompok I dan II

$Z_{1-\alpha/2}$: Koefisien reliabilitas dari

$1 - \alpha/2$ (α : error tipe I, menolak padahal benar)

$Z_{1-\beta}$: Koefisien reliabilitas dari $1 - \beta$ (β : error tipe II, menerima padahal salah)

σ_1^2, σ_2^2 : Varians kelompok I dan II

m_1, m_2 : Mean dari kelompok I dan II

α : nilai p, secara khusus 0,05

β : power 1, secara khusus 0,1-0,2

3. Peralatan Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan pada pengambilan darah vena anak, analisis spektrofotometer dan analisis darah rutin

3.1 Pengambilan darah vena anak

Peralatan yang digunakan dalam pengambilan sampel darah vena anak antara lain Spuit Injeksi Terumo 3 cc, Vacutiner EDTA, *Standing* EDTA, gunting, jas lab, *Ice gel*, Plester, Tisu *swap*, Torniket, masker, isolasi dan stiker.

3.2 Analisis spektrofotometer

Peralatan yang digunakan dalam analisis pola interaksi eritrosit dalam darah utuh adalah *Cuvette* 1,5 cc Merk Brand, Pipet mikro, laptop, spektrofotometer UV VIS 1800, dan *blue tip*.

3.3 Analisis Parameter Darah di Laboratorium Patologi Klinik UGM

Peralatan Sysmex KX-21 yang digunakan untuk menganalisis darah rutin diantaranya WBC, RBC, MCV, MCH, MCHC, PLT, PDW, MPV, P-LCR, RDW-SD, LYM, %MXD, NEUT, dan HGB. Subjek normal dan penderita LLA tercantum pada Tabel 4.4. Ukuran sel-sel darah dapat ditentukan dengan metode deteksi RF/DC. Prinsipnya adalah sampel darah akan terkirim ke

suatu *chamber*. *Chamber* tersebut terdapat dua kompartemen di batasi oleh suatu membran yang terdapat celah kecil. Masing-masing kompartemen terdapat elektroda yaitu eksternal dan internal. Arus DC dan frekuensi dapat masuk dari kompartemen satu ke kompartemen kedua lewat celah kecil, Ketika darah tersuspensi dalam celah, akan terjadi perubahan tahanan pada DC dan perubahan tahanan pada frekuensi.

Pulsa listrik yang dihasilkan oleh perubahan tahanan pada DC merefleksikan ukuran sel, dan pulsa yang dihasilkan oleh perubahan frekuensi merefleksikan densitas sel. Pemeriksaan parameter darah dimulai dengan meletakkan darah-EDTA pada tempat sampel Sysmex KX-21. Kemudian menuliskan nomor sampel dan nama pasien sesuai dengan petunjuk yang nampak di layar monitor. Setelah itu, alat dapat beroperasi setelah menekan "enter". Alat akan mengambil 50 μl sampel dan memprosesnya secara otomatis dan print out akan keluar ± 1 menit.

4. Tahapan pengambilan sampel

Tahap ini meliputi tahap persiapan, tahap pengambilan data dan tahap akhir.

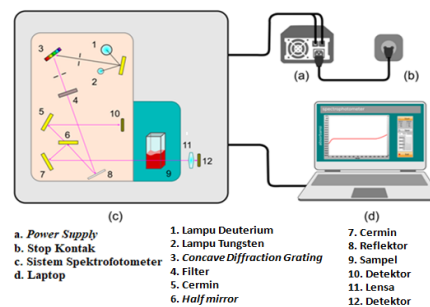
4.1 Tahap Persiapan

Persiapan yang perlu dilakukan diantaranya:

1. Memeriksa kondisi laptop, program UV Solution dan spektrofotometer di bagian biokimia, Fakultas Kedokteran UGM lantai 6.
2. Memeriksa kabel koneksi laptop dengan spektrofotometer.
3. Mempersiapkan blu tips, pipet mikro dalam 550 μl , sarung tangan, plastik, suntikan, *cuvette disposable semi micro*, plester sancoplas, tisu, bolpoin, isolasi transparan, serta gunting.
4. Menyiapkan sampel darah-EDTA yang telah diberi kode, nama dan tanggal (yang masih tersimpan dalam *cooler box*).

4.2 Tahap Pengambilan data

Skema peralatan spektrofotometer yang digunakan dalam penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Skema Peralatan Pengambilan Data

5. Teknik Analisis Data

Nilai absorbansi dari masing-masing kelompok subjek di analisis dengan pendekatan stokastik dan deterministik. Pola absorbansi dianalisis dengan kurva *fitting kuadratik* atau disebut dengan model deterministik. Pendekatan deterministik merupakan model yang sederhana untuk analisis variabel definit dalam kondisi khusus. Selain itu, Proses interaksi eritrosit yang berlanjut terjadi agregasi kemudian sedimentasi terjadi secara acak dan tidak pasti berdasarkan lingkungannya. Oleh karena itu, proses interaksi eritrosit dapat dianalisis dengan pendekatan stokastik [17], [18]. Kedua pendekatan tersebut dapat dianalisis dengan program MATLAB.

5.1 Karakteristik subjek penelitian

Karakteristik dari kelompok subjek normal dan penderita LLA yaitu usia, jenis kelamin (perempuan dan laki-laki), jumlah eritrosit serta lama terapi. Masing-masing dihitung mean, median dan min-max. Khusus persebaran data normal eritrosit akan ditunjukkan dengan mean \pm standar deviasi sedangkan data tidak normal dengan median. Uji normalitas usia dan angka eritrosit kedua kelompok diuji menggunakan *Liliefors test* dengan program SPSS. Tes ini merupakan tes normalitas yang berdasarkan tes

Kolmogorov-Sminov untuk subjek < 100 subjek. Apabila P (taraf signifikansi) > 0.05 maka usia terdistribusi normal. Kemudian usia kedua kelompok tersebut diuji beda dengan Mann Whitney untuk data terdistribusi tidak normal dan uji T untuk data terdistribusi normal. Kedua kelompok akan berbeda bermakna apabila $P < 0.05$ [1], [19], [20]. Hipotesis uji beda (Mann Whitney dan Uji T)

5.2 Hubungan antara lama terapi dengan angka eritrosit

Uji ini menggunakan regresi linier. Hubungan antara angka eritrosit dengan lama terapi ditunjukkan dengan koefisien korelasi [21].

5.3 Analisis Perbedaan Pola Absorbansi dengan Pendekatan Deterministik dan Stokastik

Pendekatan deterministik dan stokastik untuk menganalisis perubahan potensial zeta berkaitan dengan komposisi senyawa dalam plasma darah. Komposisi senyawa dalam plasma darah ini berpengaruh terhadap perubahan potensial zeta dalam darah-EDTA [4], [22], [23], [24].

Analisis pola interaksi eritrosit dalam darah-EDTA dilakukan dengan beberapa tahap dimulai dari 10 sekon data awal absorbansi dipotong untuk semua subjek penelitian. Data absorbansi diambil berdasarkan awal interaksi eritrosit sampai akhir interaksi eritrosit. Setelah itu, data absorbansi interval 6 sekon. Plotting data absorbansi interval 6 sekon dapat dianalisis menggunakan program Matlab. Berdasarkan *fitting curva* dari grafik, program akan mengeluarkan parameter-parameter deterministik (d_1, d_2, d_3) stokastik (s_1, s_2, s_3). nilai autokorelasi serta tampilan grafik. Data ke-enam parameter tersebut dari kedua kelompok subjek dibedakan menggunakan uji T untuk data terdistribusi normal dan uji Mann Whitney untuk data yang tidak terdistribusi normal dengan $P < 0.05$ [1], [19], [20].

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Karakteristik Subjek

Subjek penelitian ini berjumlah 59 anak dengan rentang usia 0-15 tahun. Dari 59 subjek, terdapat 31 subjek normal yang memenuhi kriteria inklusi (kelompok I) serta 28 subjek LLA yang memenuhi kriteria inklusi (kelompok II). Identitas subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dapat dilihat pada tabel dalam Lampiran 6. Subjek normal diberikan kode N1, N2 sampai dengan N31, sedangkan penderita LLA dengan kode L1, L2 sampai dengan L28. Kedua kelompok tersebut di uji beda dengan nilai $p = 0,4441$ (tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$)) antara subjek normal dengan penderita LLA. Oleh karena itu, kedua kelompok tersebut layak untuk dibandingkan. Usia subjek dalam penelitian ini tidak terdistribusi normal dengan hasil uji distribusi normalitas sesuai dengan Lampiran 8. Nilai signifikansi (p) untuk subjek normal adalah 0,080 sedangkan p untuk LLA adalah 0,019. Jenis kelamin juga tidak memiliki pengaruh yang besar terhadap angka eritrosit pada penderita LLA. Hasil uji regresi linier menunjukkan $R^2 = 13,9\%$ untuk subjek normal dan $R^2 = 0,1\%$ hasil uji sebagaimana pada Lampiran 9-10). Angka eritrosit pada subjek LLA lebih rendah daripada subjek normal. Hal ini terjadi melalui dua mekanisme : pertama, sel-sel leukemia (limfoblas) pada LLA meningkat dan menekan produksi sel-sel darah yang lain, terutama eritrosit. Eritrosit menurun karena efek dari terapi yang membunuh sel-sel abnormal dan normal, sehingga selain sel-sel limfoblas mati, sel-sel yang lain juga mati.

2. Parameter Darah

Nilai parameter data yang terdistribusi normal adalah RBC, MCH, PLT, MPV, P-LCR, LYM, MXD dan NEUT pada kelompok subjek normal. Sedangkan RBC, HGB, HCT,

MCV, MCH, MCHC, PLT, MPV, P-LCR, LYM, MXD dan NEUT pada kelompok subjek LLA. Kelompok subjek normal dapat diketahui bahwa semua parameter darah dalam range normal. Sedangkan MCV dan RDW- SD untuk subjek LLA dalam range tidak normal. Perbandingan nilai parameter darah normal dapat diuji dengan uji normalitas. Data parameter darah yang terdistribusi normal (dituliskan dengan mean \bar{x} standar deviasi s) dengan uji Liliefors. Nilai parameter data yang terdistribusi normal adalah RBC, MCH, PLT, MPV, P-LCR, LYM, MXD dan NEUT pada kelompok subjek normal. Sedangkan RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, MPV, P-LCR, LYM, MXD dan NEUT pada kelompok subjek LLA. Data parameter darah yang terdistribusi tidak normal ditulis dengan median dan min-max. Uji beda parameter darah dengan uji Mann Whitney untuk data terdistribusi tidak normal sedangkan uji T untuk data terdistribusi normal. Apabila nilai $p < 0,05$ maka ada perbedaan bermakna. Parameter darah yang berbeda bermakna antara kedua subjek adalah WBC, HGB, MCV, MCHC, MPV, RDW-CV, LYM, MXD dan NEUT dengan nilai p masing-masing 0.000, 0.025, 0.000, 0.000, 0.012, 0.000, 0.005, 0.001, 0.004.

3. Hubungan Lama Terapi Subjek LLA dengan Angka Eritrosit

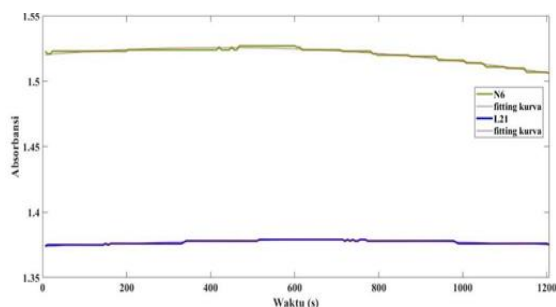
Selain dipengaruhi oleh jenis kelamin dan usia, angka eritrosit juga dipengaruhi oleh lama terapi. Persebaran data lama terapi subjek leukemia tidak normal dengan median adalah 55,64 pekan (rentang waktu minimal 5 pekan dan maksimal 223 pekan). Hasil uji regresi linier antara lama terapi dengan angka eritrosit adalah $R^2 = 0,004$ berarti 0,4 % variasi dari lama terapi mempengaruhi angka eritrosit. Nilai korelasi $R = 0,004$, artinya hubungan antara lama terapi dengan angka eritrosit adalah rendah. *Adjusted R Square* diperoleh nilai 0,034 artinya sekitar 3,4 % variasi yang terjadi pada angka eritrosit dapat

dijelaskan oleh variabel lama terapi dan sisanya dijelaskan oleh variabel lainnya. Hal ini dapat dijelaskan bahwa subjek LLA yang digunakan mempunyai karakteristik yang berbeda – beda (usia, jenis kelamin, kondisi awal ketika terdiagnosis LLA, serta penerimaan subjek terhadap terapi). Pada dasarnya kemoterapi ada yang memberikan luran yang kuat untuk pasien, yaitu menyebabkan menurun hingga habisnya sel leukemia dan meningkatnya sel-sel darah normal. Namun kemoterapi sering kali menyebabkan sel-sel darah normal tidak meningkat bahkan menurun, sehingga jumlahnya rendah, serta terdapat efek samping pada organ-organ lainnya seperti ginjal, hati, jantung dan paru-paru. Pada penelitian ini, luaran yang baik pada terapi LLA adalah 6 pekan pertama (tahap induksi) karena jumlah eritrosit berjumlah $4,2 \times 10^6/\mu l$ atau dalam range normal. Sedangkan angka eritrosit terendah pada pekan ke-218 yaitu $2,8 \times 10^6/\mu l$ (range eritrosit tidak normal). Hal ini dapat disebabkan karena kondisi subjek LLA yang berbeda-beda.

4. Pola Absorbansi Eritrosit

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu [25], dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Apabila radiasi atau cahaya putih dilewatkan melalui larutan berwarna, maka radiasi dengan panjang gelombang tertentu akan diserap (absorpsi) secara selektif dan radiasi lainnya akan diteruskan (transmisi). Absorbansi adalah perbandingan intensitas sinar yang diserap dengan intensitas sinar datang. Nilai absorbansi ini akan bergantung pada kadar zat yang terkandung di dalamnya, semakin tinggi kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel, maka

semakin banyak molekul yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu, sehingga nilai absorbansi semakin besar atau dengan kata lain nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi (Hukum Lambert-Beer) [25]. Gambar 2, menjelaskan absorbansi eritrosit subjek LLA cenderung memiliki serapan yang lebih rendah dibandingkan dengan subjek normal. Hal ini dikarenakan adanya faktor yang mempercepat sedimentasi adalah anemia dan protein plasma [1]. Hal ini terjadi dikarenakan dua mekanisme; pertama, sel-sel leukemia (limfoblas) pada LLA meningkat dan menekan produksi sel-sel darah lainnya, termasuk eritrosit. Mekanisme kedua adalah sel-sel normal menurun sebagai efek dari terapi yang membunuh sel-sel normal dan abnormal, sehingga selain sel limfoblas mati, sel-sel yang lainnya juga mati. Perbedaan angka eritrosit dan komponen lainnya akan mempengaruhi perbedaan interaksi eritrosit yang masih hidup dengan komponen lainnya dalam darah-EDTA.



Gambar 2. Grafik fitting pola absorbansi eritrosit pada subjek N6 dan L21 berdasarkan jumlah eritrosit yang sama yaitu $4,2 \times 10^6$ sel/ μ l

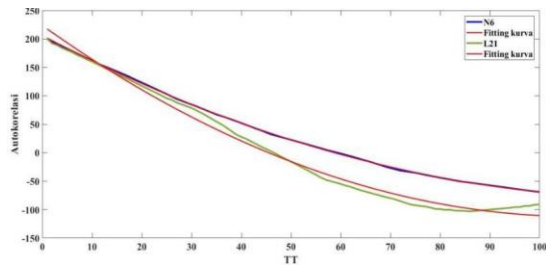
Interaksi eritrosit di dalam darah dapat dianalisis dengan pendekatan stokastik. Pendekatan stokastik telah digunakan untuk mengkaji hubungan antara formasi *rouleaux* eritrosit (makromolekul) selama agregasi saat eritrosit-eritrosit saling mendekat, menjauh dan konstan [4]. Pendekatan stokastik juga dilakukan pada penelitian oleh Mains *et al* yang meneliti mengenai terapi anti-kanker. Pengujian data terhadap seri waktu penting untuk menilai

agresifitas tumor juga untuk mengikuti dan memantau efek perawatan *in vivo* [1] mengkaji mekanisme agregasi eritrosit dalam darah-EDTA penderita kanker kolorektal dan kanker ovarium dengan hukum Coulomb.

Gambaran perubahan potensial zeta dalam darah EDTA dari kelompok normal dan LLA sulit diidentifikasi secara langsung. Oleh karena itu, diperlukan suatu analisis guna menemukan ciri khas yang merupakan karakter dari grafik gambaran perubahan potensial zeta tersebut. Cara yang sederhana untuk menganalisis karakteristik dari proses fisik adalah menggunakan model matematis dalam bentuk fungsi kuadrat sebagai pendekatan deterministik. Cara ini menggambarkan secara garis besar dari suatu proses absorbansi dapat dilihat pada Gambar 2 Pendekatan deterministik dengan cara *fitting* kurva, diperoleh parameter-1 ($d1$), parameter-2 ($d2$) dan parameter-3 ($d3$) yang masing-masing merupakan kecekungan parabola, perkiraan posisi x puncak parabola, dan titik potong fungsi parabola yang dibentuk dengan sumbu pada saat $x = 0$.

Proses yang kompleks, interaksi antar eritrosit terjadi secara acak dan tidak pasti sehingga pendekatan deterministik tidak dapat diterapkan untuk menganalisis proses tersebut. Oleh karena itu, pendekatan yang cocok adalah pendekatan stokastik. Pendekatan stokastik untuk menganalisis suatu proses kompleks tersebut umumnya menggunakan fungsi autokorelasi. Pada penelitian ini, terjadinya interaksi eritrosit dalam darah-EDTA disertai dengan terjadinya endapan darah, sehingga pendekatan yang digunakan adalah kombinasi dari deterministik dan stokastik. Grafik autokorelasi dari Gambar 2 dapat dilihat pada Gambar 3. Perhitungan dengan fungsi autokorelasi menggunakan program Matlab. Gambar 5.2 nampak nilai autokorelasi semakin menurun absolut maksimum terjadi pd TT ke-2 sampai ke 100. TT ini yang

menunjukkan bahwa derajat korelasi tertinggi nilai respon spektrofotometer pada tiap satuan waktu terjadi pada saat TT ke-1 dan terendah pada TT ke-100. Nilai autokorelasi terendah subjek N6 yaitu -69 sedangkan -90,8 dimiliki oleh subjek L2.



Gambar 3 Grafik autokorelasi dari gambaran perubahan potensial zeta dalam darah-EDTA dari subjek N6 dan L21 berdasarkan jumlah eritrosit yang sama yaitu $4,2 \times 10^6$ sel/ μ l

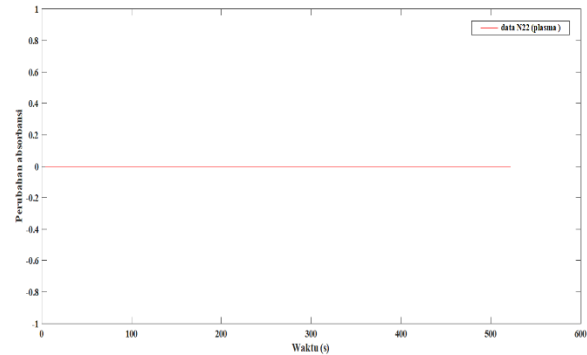
Grafik autokorelasi dari gambaran potensial zeta yang merupakan fungsi kuadrat sehingga pendekatan stokastik dari gambaran perubahan potensial zeta dalam darah-EDTA merupakan fungsi kuadrat. Parameter yang diperoleh adalah parameter-1 (s_1), parameter-2 (s_2), serta parameter-3 (s_3) dalam persamaan kuadrat $y = s_1x^2 + s_2x^2 + s_3$.

Analisis uji beda menunjukkan bahwa nilai parameter deterministik dan stokastik dari gambaran perubahan potensial zeta tiap kelompok berbeda bermakna untuk d1 dan d3 ($p = 0.004$ dan $p = 0.001$). Namun, tidak berbeda secara bermakna untuk d2, s_1 , s_2 dan s_3 ($p = 0.274$, 0.111 , 0.291 serta 0.331).

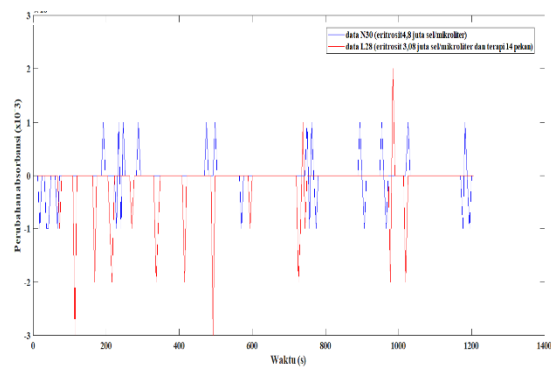
Pemenuhan subjek normal dalam pengumpulan data parameter deterministik dan stokastik memenuhi untuk jumlah subjek normal parameter d3 yaitu minimal 17 sampel subjek penelitian dan belum memenuhi untuk parameter d_1, d_2, s_1, s_2 , dan s_3 . Hal ini berarti kedua model pendekatan ini digunakan pada sistem mati, sehingga tidak tepat untuk menganalisis sistem

hidup. Kedua pendekatan statistik ini digunakan karena belum ada statistik untuk menganalisis sistem hidup.

5. Pola Perubahan Absorbansi Eritrosit



Grafik 4. Grafik perubahan absorbansi plasma subjek N22 yang terekam selama 522 detik.



Gambar 5. Perubahan absorbansi eritrosit setiap waktu pada subjek LLA kode L28 (merah) dengan angka eritrosit $3,08 \times 10^6$ sel/ μ l dan kode N30 dengan angka eritrosit $4,8 \times 10^6$ sel/ μ l (biru).

Gambar 5.3 menggambarkan plasma tidak ada absorbansi pada panjang gelombang 560 nm. Hal ini dikarenakan plasma terdiri dari : air (90 %), protein plasma (80%) dan elektrolit (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}). Sedangkan protein plasma terdiri dari: albumin (54 %), globulin 8 %), fibrinogen (7%), komponen lain (enzim, hormon, faktor pembekuan) 1 % [26]. Berbeda dengan eritrosit yang mempunyai karakteristik unik. Eritrosit yang masuk ke dalam

pembuluh vena banyak miskin O_2 (dalam kondisi deoksihemoglobin) dan warnanya biru keunguan. Hal ini berarti darah vena memantulkan warna tersebut dan menyerap warna komplementernya. Berdasarkan Gambar 3.10 halaman 34. Warna yang diserap eritrosit range kuning sampai hijau dan sesuai dengan panjang gelombang yang digunakan yaitu 560 nm. Gambar 5.4, angka eritrosit kedua subjek berbeda. Luaran terapi yang kurang baik subjek L 23 (14 pekan) menunjukkan eritrosit dalam range tidak normal. Absorbansi eritrosit dapat naik, turun atau konstan. Absorbansi naik disebabkan karena adanya somasi eritrosit-eritrosit yang terdispersi di plasma darah lebih banyak yang disagregat daripada yang beragregat. Sementara itu, absorbansi turun disebabkan karena somasi eritrosit-eritrosit yang terdispersi di plasma darah lebih banyak yang beragregat daripada disagregat. Sedangkan absorbansi konstan saat somasi eritrosit – eritrosit antara disagregat dengan agregat adalah sama. Grafik data N30 cenderung perubahan absorbansi naik dan turun sama daripada data L23 yang cenderung penurunan absorbansi lebih banyak. Hal ini disebabkan karena pasien LLA mempunyai angka limfoblast yang tinggi. Studi menyebutkan bahwa Zn (II) dapat mengaktivasi Human *Lymphoblast Nucleotide* [27]. Studi ini menyebutkan bahwa kation monovalent meningkatkan absolut potensial zeta, sedangkan kation divalen menurunkan potensial zeta. Studi lain menyebutkan protein-protein yang disekresikan sebagai biomarker akan merubah potensial zeta eritrosit dalam darah-EDTA [27], [28] sehingga akan mempengaruhi keseimbangan agregasi eritrosit dan mempercepat sedimentasi. Ion-ion di sekitar akan berinteraksi dengan eritrosit dan protein bermuatan. Interaksi ion-ion dengan eritrosit adalah: pertama, ion-ion positif tarik-menarik dengan muatan negatif pada permukaan eritrosit. Kedua, ion-ion negatif tolak

menolak dengan muatan negatif pada permukaan eritrosit [30]. Muatan negatif pada permukaan protein berinteraksi tolak-menolak dengan ion negatif dan tarik-menarik dengan ion positif [30]. Keseimbangan ion-ion di dalam dan di luar eritrosit bersifat dinamis.

Protein plasma yang mengandung residu asam amino bermuatan negatif dapat menyebabkan perubahan nilai potensial zeta. Sebagian protein dalam plasma yang mengandung asam amino tidak bermuatan listik, tidak memberikan efek pada nilai potensial zeta. namun, protein lain yang mengandung residu asam amino netral jenis lain dapat memberikan efek pada potensial zeta. Hal ini menunjukkan jenis protein dalam medium kontinu berbeda memberikan efek terhadap perubahan potensial zeta yang berbeda pula [22] sehingga mempengaruhi keseimbangan eritrosit.

Eritrosit yang terdispersi dalam darah-EDTA mengalami kerja listrik (berupa interaksi antar eritrosit menjauh dan mendekat). Energi yang dimiliki eritrosit dari waktu ke waktu berkurang sampai terjadi agregasi. Penurunan energi yang dimiliki sama dengan penurunan nilai potensial zeta eritrosit. Pada saat nilai potensial zeta eritrosit mencapai kondisi dibawah ambang, maka eritrosit akan saling mengumpul. Gabungan eritrosit-eritrosit yang membentuk *rouleaux* pada saat nilai potensial zeta di bawah ambang. Berdasar hukum Stokes kumpulan eritrosit akan bergerak ke atas ketika gaya beratnya lebih kecil dari pada gaya apung dan gaya gesek, dan berlaku sebaliknya ketika gaya beratnya lebih besar dari pada gaya apung dan gaya gesek eritrosit akan bergerak turun. Ketika gaya-gaya beratnya sama dengan gaya apung dan gaya gesek kumpulan eritrosit akan diam. Kumpulan eritrosit yang bergerak ke bawah dapat mengalami pemisahan. Bagian yang merupakan kumpulan baru akan tetap bergerak ke bawah ketika gaya beratnya

melebihi gaya apung dan gaya gesek. Bagian yang lainnya akan bergerak keatas ketika gaya beratnya lebih kecil dari gaya apung dan gaya gesek. Hal ini sesuai dengan Hukum Stokes. Bersamaan dengan terbentuknya kumpulan eritrosit, terjadi juga agregasi eritrosit yang lainnya. Proses agregasi eritrosit dalam selang waktu tertentu tidak hanya satu. Kecepatan terbentuknya kumpulan eritrosit satu dengan yang lainnya belum tentu sama sehingga proses sedimentasi belum tentu bersamaan.

PENUTUP

Simpulan

Penelitian ini menunjukkan hasil rata-rata angka eritrosit penderita LLA lebih rendah daripada subjek normal. Lama terapi penderita LLA berkorelasi sangat rendah dengan angka eritrosit. Pola absorbansi eritrosit penderita LLA mempunyai kecenderungan absorbansi turun lebih banyak daripada absorbansi naik sedangkan subjek normal mempunyai kecenderungan pola absorbansi naik sama dengan absorbansi turun. Pola absorbansi eritrosit kedua kelompok subjek penelitian berbeda bermakna untuk parameter d_1 ($p=0,004$) dan d_3 ($p=0,001$), sedangkan parameter tidak berbeda bermakna adalah d_2 ($p=0,274$), s_1 ($p=0,111$), s_2 ($0,291$), s_3 ($p= 0,331$).

Saran

Saran untuk pembaca apabila melakukan penelitian pengembangan dari penelitian ini adalah

1. Dilakukan studi dengan kriteria inklusi pasien yang lebih ketat sehingga perancu seperti lama terapi, usia pasien, jenis LLA spesifik dapat diseragamkan.
2. Dilakukan studi hubungan secara kuantitatif potensial zeta yang berhubungan langsung dengan protein (*biomarker*) LLA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Fisika UGM, RSUP Sardjito sebagai penyedia sampel darah penderita LLA, Fakultas Kedokteran UGM sebagai tempat pengambilan data dan uji patologi klinik, serta LPDP sebagai pemberi dana riset

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Nugroho et al., ", The Mechanism Of Erythrocyte Aggregation In EDTA-Blood Of Ovarian Cancer Patients Viewed By Coulomb Law," *Advanced Science Engineering Information Technology*, vol. 7, 2017.
- [2] Supriyadi et al., "Incidence of Childhood Leukemia in Indonesia," *Pediatric and Cancer*, vol. 57, pp. 588-593, 2011.
- [3] Riset Kesehatan Dasar, Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan RI Tahun 2014. Jakarta, Jakarta: Kementerian Kesehatan , 2013.
- [4] Ngadikun, "Gambaran Pola Potensial Zeta Sel Darah dengan Metode Spektrofotometri Pada Pasien Karsinoma Hepatoseluler dan Tikus," Universitas Padjajaran, Bandung, Disertasi 2006.
- [5] H.M Advani A.S and Lazarus, *Adult Acute Lymphocytic Leukemia*. New York: Humana Press, 2011.
- [6] S Rathore and B Ali, "Effect The Laser Radiation on Electrical Conductivity of Human ," *International Journal of Science, Environmental and Technology*, vol. 3, pp. 286-290, 2014.
- [7] G Barshtein, D Wajnblum, and S Yedgar, "Kinetics of Linier Rouleaux Formation Studied by Visual Monitoring of Red Cell Dynamics Organization," *Biophysics Journal*, vol. 78, pp. 2470-2474, 2000.

- [8] J,L and Dickinson, R,B Prince, "Kinetics and Forces of Adhesion For Pair of Capsular/ Uncapsulated Staphylococcus Mutant Strains," *Langmuir*, vol. 19, pp. 154-159.
- [9] G Pocock and C.D Richard, *Human Physiology (The Basis of Medicine)*. London: Oxford University Press, 2006.
- [10] W Pollack and R,F Reckel, "A Reappraisal of The Forces involved in Hemagglutination, ," *International Arch Alleegy Application Immunology*, vol. 54, pp. 29-42, 1977.
- [11] J., Denault, A.Y., Allard, L., Chayer, B., Perrault, L.P., Cloutier, G, Tripette, "Ultrasound Monitoring of RBC Aggregation as a Real Time Marker of The Inflammatory Responses in a Cardiopulmonary Bypass Swine Model," *Critical Car Medicine*, vol. 41, p. 171178, 2013.
- [12] D Murray, A Arbuzova, G Hangyas-Minalyne, A Gambhir, and N Ben-Tal, "Electrostatics Properties of Membrane Containing Acidic Lipids and Absorbed Basic Peptides (Theory and Experiment)," *Biophysics*, vol. 77, pp. 3176-3178, 1999.
- [13] R,V Venkatachalam, R Venkatesan, G Trygvason, and H.S Fogler, "Low Reynold Number Interaction Between Colloidal Particles Near The Entrance to A Cylindrical Force," *Journal Colloid Interface Science* , vol. 229, pp. 311-322.
- [14] A,J De Kerchove and M Elimelech, "Relevance of Electrokinetics Theory for "Soft" Particles to Bacteria Cell ," *Lungmuir*, vol. 21, pp. 6462-6472, 2005.
- [15] F,E Robles and S, Wax,A Chowdhury, "Assesing Hemoglobin Concentration Using Spectroscopic Optical Cohenrence Tomography for Feasibility of Tissue Diagnostics," *Biomedical Optics Express*, vol. 1, pp. 301-317, 2010.
- [16] F Farrokhyar, D Reddy, R,W Poolman, and M Bhandari, "Why Perform A Priori Sample Size Calculation?," *Cancer Journal Surgery*, vol. 56, pp. 207-213, 2012.
- [17] M Rouzine, A Rodrigo, and M Coffin, "Transisition Between Stochastic Evolution and Deterministics Evolution in Presence of Selection," *Microbiology Molecular*, vol. 65, pp. 151-185, 2001.
- [18] B,H Sader and C,D Sorensen, "Deterministic and Stochastic Dynamic Modelling of Continuos Manufacturing Using Analogies to Electrical System," in *Proceedings of The 2003 Winter Simulation Conference, 2003*, pp. 1-9. W,W Daniel, *Biostatistics (A Foundation for Analysis in The Health Science*. Canada: John Wiley and Sons,Inc, 1991.
- [19] C,F Yang, J Lui, S, Wasse, and M-H Shen, "Inhibition of Abselen on Aflatoxin B1-Induced Hepatocarcinogenesis in Fischer 344 Rats," *Carcinogenesis*, vol. 21, pp. 2237-2243, 2000.
- [20] Sugiyono, *Metode Penelitian Pendekatan Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif dan R &D*. Bandung: Alfabeta, 2007.
- [21] A Nakouzi, P Valadon, J Nosachuk, N Green, and A Casadevall, "Molecular Basis for Immunoglobulin Specificity To Epitopes in Cryptococcus Neformans Polychacaride That Elicit Protective and Nonprotective Antibodies," *Infect Immunology*, vol. 69, pp. 3398-3499, 2011.
- [22] J,P Amsden, *Physical Chemistry for Premedical Students*. New York : New MCGraw-Hill Book Company, 1999.
- [23] H,A Harper, V,W Rodwell, and P,A Mayes, *Review of Physiological*

- Chemistry. California: Lange Medical Publication, 1977.
- [25] T Owen, *Fundamentals of Modern UV-Vis Spectroscopy*. Germany: Agilent Technology, 2000.
- [26] P,E Pack, *Cliffs Quick Review Anatomy and Physiology*. New York: Hungry Minds, 2010.
- [27] S Salgin, "Zeta Potential and Isoelectric Point of Biomolecules," *International Journal of Electrochemistry*, vol. 7, pp. 12404-12414, 2012.
- [28] L Landgraf, C CHrisner, and W Storck, "A pLasma Protein Corona Enhances The Biocompatibility of Au, Fe₃O₄ Janus Particles," vol. 68, pp. 77-88, 2015.
- [29] L,K Muller, J Simon, and S Schottler, "Pre-coating with ProteinFractions Inhibits Nano-Carrier Aggregation in Human Blood Plasma," *RCs Adv*, p. 96495, 2016.
- [30] H,P Fernandes and Castro, M.L.B., Cesar. C.L., "Electrical Properties of Red Blood Cell Membrane and Immunohematological Investigation," *Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia*, vol. 33, pp. 297-301, 2012.
- [31] M Felder, A kapur, J Gonzalez-Bosquet, and J, Albreth,J Haribata, "Tumor Biomarker to Cancer Theraphy ," *Molecular Cancer*, vol. 13, p. 129, 2014.