

Perbandingan Akurasi Berbagai Metode Kalibrasi Skala Pengukuran dalam Morfometri Eritrosit Elang Ular Bido (*Spilornis cheela*)

*(ACCURACY COMPARISON OF SEVERAL SCALE CALIBRATION METHODS ON
ERYTHROCYTES MORPHOMETRIC MEASUREMENT OF CRESTED SERPENT EAGLE
(SPILORNIS CHEELA)*

**Andreas Bandang Hardian¹, Dorothea Vera Megarani², Warih Pulung Nugrahani³,
Irhamna Putri Rahmawati³**

¹Laboratorium Patologi Anatomi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya,
Jl. Puncak Dieng, Kunci, Kalisongo, Dau, Malang, Jawa Timur, Indonesia 65151

²Departemen Patologi Klinik,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl Fauna No 2, Kampus UGM, Yogyakarta 55281

³*Wildlife Rescue Centre* Jogja,
Yayasan Konservasi Alam Yogyakarta
Jalan Pengasih-Nanggulan, Paingan, Sendangsari, Pengasih, Kulonprogo, D.I.Yogyakarta 55652
e-mail: andreasbandangh@ub.ac.id

ABSTRAK

Morfometri sel berguna untuk mendeteksi abnormalitas seluler berdasar pengukuran sel secara kuantitatif. Metode ini telah diterapkan pada berbagai pemeriksaan klinis yang melibatkan inspeksi morfologi sel seperti pemeriksaan sitologi, histopatologi, dan patologi digital. Kalibrator skala yang umum digunakan adalah mikrometer kalibrasi (*calibration slide*). Terbatasnya ketersediaan mikrometer kalibrasi di laboratorium sering menjadi hambatan dalam melakukan morfometri sel sehingga diperlukan alat alternatif yang terbukti memiliki akurasi yang sama. Tujuan penelitian ini adalah membandingkan parameter morfometri eritrosit elang ular bido (*Spilornis cheela*) menggunakan tiga kalibrator berbeda: mikrometer kalibrasi, kamar hitung Neubauer, dan batang skala digital pada kamera mikroskop. Sebanyak 58 eritrosit elang ular bido dipilih dari preparat apus darah yang diwarnai dengan pewarna Giemsa dan difoto menggunakan kamera mikroskop. Seluruh sel diukur menggunakan aplikasi ImageJ. Kalibrasi pengukuran dilakukan dalam lima metode dengan kalibrator yang telah disebutkan. Analisis perbandingan secara statistika dilakukan dengan membandingkan rata-rata panjang sel, lebar sel, panjang nukleus, dan lebar nukleus melalui uji *analysis of variance* (ANOVA) dan uji lanjutan *Tukey's Honestly Significant Difference* (HSD). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada rata-rata parameter morfometri eritrosit berdasar lima metode kalibrasi. Hasil uji lanjutan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antara hasil pengukuran menggunakan kalibrasi dengan mikrometer kalibrasi (*calibration slide*) dan kamar hitung Neubauer. Simpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini bahwa kamar hitung Neubauer dapat digunakan untuk menggantikan mikrometer kalibrasi (*calibration slide*) jika belum tersedia di fasilitas klinik maupun laboratorium.

Kata-kata kunci: morfometri sel; kalibrasi skala; eritrosit elang ular bido; kamar hitung Neubauer

ABSTRACT

Cell morphometry can quantitatively detect some cellular abnormalities according to the cell size. This method has been performed in various clinical examinations involving cellular morphology inspection such as cytologic, histopathologic, and digital pathologic examinations. Calibration slide is the commonly used scale calibrator, nonetheless not all laboratories has that. Therefore, there needs to be an alternative tool which can provide similar accuracy as a calibration slide in the field. The purpose of this research is to compare the morphometry parameters of crested serpent eagle (*Spilornis cheela*)'s erythrocytes using three different calibrators: calibration slide, Neubauer counting chamber, and digital scale bar on the microscope camera. A total of 58 crested serpent eagle's erythrocytes were selected from a Giemsa stained blood smear which was then captured by microscope camera. All cells were measured using ImageJ software. Scale calibrations were done in five methods using the mentioned calibrators. Statistical comparative analysis was done by comparing the average of cell length, cell width, nucleus length, and nucleus width through the *analysis of variance test* (ANOVA) and continued with a Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post hoc test. The ANOVA test showed that there were significant differences among the average of morphometry parameters in five different calibration methods. The post hoc test revealed that there was no difference between morphometry results calibrated by calibration slide and Neubauer counting chamber. We conclude that Neubauer counting chamber could be an alternative for the standard calibration slide.

Keywords: cell morphometry; scale calibration; crested serpent eagle erythrocyte, Neubauer counting chamber

PENDAHULUAN

Morfometri sel dalam pemeriksaan sitologi menjadi salah satu metode untuk mengetahui abnormalitas seluler (Simeonov, 2012). Morfometri identik dengan pemeriksaan kuantitatif yang tergantung pada ketersediaan alat dan kemampuan operator dalam melakukan kalibrasi skala pengukuran. Metode morfometri sel dilakukan di bawah mikroskop menggunakan penggaris mikroskopik atau skala kalibrasi (Mandarim-de-Lacerda dan Del Sol, 2017; Mandal *et al.*, 2019). Alat kalibrasi yang sering digunakan saat ini adalah mikrometer kalibrasi (*calibration slide*). Analisis morfometri menggunakan mikrometer kalibrasi membutuhkan mikroskop berkamera untuk mengukur sel atau benda mikroskopik lainnya. Pengukuran objek menggunakan foto preparat yang diolah menggunakan aplikasi dengan membandingkan jumlah *pixel* dan skala yang diketahui ukurannya pada mikrometer kalibrasi (Mandarim-de-Lacerda *et al.*, 2010). Metode morfometri lain adalah pengamatan langsung pada mikroskop menggunakan mikrometer okuler yang dikombinasikan dengan mikrometer objektif (Kuchai *et al.*, 2012).

Morfometri sel sebagai bagian dari pemeriksaan rutin dan penelitian masih sering dilakukan pada serangkaian prosedur pemeriksaan kesehatan satwa liar, terutama pada pemeriksaan darah elang (Salakij *et al.*, 2015a; Salakij *et al.*, 2015b; Valkiunas dan Iezhova, 2018). Terbatasnya informasi fisiologi satwa liar menjadikan data-data sekunder pemeriksaan

seperti morfometri sel darah, telur cacing, ookista koksidia, dan arsitektur histologi sangat berharga untuk mengetahui status kesehatan satwa maupun referensi anatomi. Namun demikian, morfometri sel dengan mikroskop berkamera tidak selalu dapat diterapkan di fasilitas klinik dan laboratorium lembaga konservasi satwa liar karena keterbatasan fasilitas. Untuk itu, alat alternatif yang berfungsi sebagai kalibrator skala dengan akurasi yang sama dengan mikrometer kalibrasi sangat dibutuhkan.

Pada dasarnya, setiap alat ukur yang memiliki skala ketelitian hingga satuan mikrometer dapat digunakan sebagai kalibrator pada morfometri mikroskopik. Salah satu alat yang memiliki pengukur hingga satuan mikrometer adalah kamar hitung hemositometer. Alat ini umum digunakan untuk menghitung total eritrosit dan leukosit serta memiliki skala dengan satuan terkecil 50 μm . Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan akurasi pengukuran sel menggunakan kamar hitung hemositometer, mikrometer kalibrasi standar, dan skala digital otomatis dari mikroskop berkamera sehingga dapat mengetahui kalibrator alternatif untuk skala pengukuran.

METODE PENELITIAN

Perizinan dan Kelaikan Etik

Pengambilan sampel dalam penelitian ini dilakukan berdasar Keputusan Direktur Jenderal Konservasi Sumber Daya Alam dan Ekosistem Nomor: SK.353/KSDAE/SET/KSA.2/8/2019 tentang Izin Akses Sumber Daya Genetik Satwa Liar untuk Kepentingan Penelitian kepada Yayasan Konservasi Alam Yogyakarta. Keterangan Kelaikan Etik (*Ethical Clearance*) dalam pengambilan sampel dilakukan berdasar izin Nomor: 0124/EC-FKH/Eks./2019 yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Pengambilan Sampel dan Pembuatan Preparat Apus Darah

Sampel yang digunakan merupakan darah segar tanpa antikoagulan dari satu ekor elang ular bido (*Spilornis cheela*) yang direhabilitasi di *Wildlife Rescue Centre* (WRC) Jogja. Darah diambil dari vena brachialis kemudian diteteskan ke atas kaca objek dan diulas sesuai dengan prosedur pembuatan ulas darah menurut Adewoyin (2014). Preparat apus darah difiksasi dengan methanol absolut lalu dikeringkan dan diwarnai dengan larutan pewarna Giemsa (*Giemsa's azur eosin methylene blue solution*, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 10% (Giemsa : akuades = 1 : 9). Preparat apus darah diinkubasi pada suhu ruang selama 10-

15 menit kemudian dibilas di bawah air mengalir. Preparat dikeringkan pada suhu ruang sebelum diamati di bawah mikroskop cahaya.

Pengambilan Foto dan Kalibrasi Skala pada ImageJ

Preparat apus darah ditetesi minyak imersi kemudian difoto menggunakan mikroskop berkamera (Olympus DP20, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) dengan perbesaran 100 kali dan menghasilkan gambar dengan resolusi 2048 x 1536 *pixel*. Batang skala 10 μm sebagai skala pembanding dibuat pada foto preparat. Kamar hitung hemositometer Neubauer difoto dengan perbesaran yang sama pada kotak terkecil (50 x 50 μm) di dalam kamar hitung eritrosit. Mikrometer kalibrasi (*calibration slide* DIV 0.01 Optilab Advance, PT Miconos, Yogyakarta, Indonesia) juga difoto dengan cara yang sama pada skala terkecil 10 μm .

Perangkat lunak ImageJ merupakan aplikasi yang dapat digunakan untuk mengukur objek dengan membandingkan jumlah *pixel* dengan batang skala yang sudah diketahui panjangnya. Pengukuran jumlah *pixel* pada batang skala yang diketahui panjangnya dilakukan dengan menarik garis dengan panjang tertentu pada kala menggunakan *Straight Line Tool*. Kalibrasi pengukuran ditetapkan dengan memasukkan panjang skala diketahui pada kotak dialog *Set Scale* pada menu *Analyze* (Ferreira dan Rasband, 2012).

Sel eritrosit elang ular bido diukur menggunakan lima metode kalibrasi yang berbeda. Kalibrasi pertama (Metode A) dilakukan dengan mengukur jumlah *pixel* pada batang skala otomatis dari mikroskop berkamera dari ujung terluar (A1) ke ujung terluar lainnya (A2) (Gambar 1a). Kalibrasi kedua (Metode B) dilakukan dengan mengukur jumlah *pixel* pada batang skala otomatis dari mikroskop berkamera dari sisi luar batang vertikal (B1) menuju ujung dari batang horizontal pada batang vertikal yang lain (B2) (Gambar 1b). Kalibrasi ketiga (Metode C) dilakukan dengan mengukur jumlah *pixel* pada batang skala otomatis dari mikroskop berkamera pada batang horizontal dari ujung ke ujung (C1-C2) (Gambar 1c). Kalibrasi ke empat (Metode D) dilakukan dengan mengukur jumlah *pixel* pada skala terkecil (45,9 *pixel*) mikrometer kalibrasi dengan menarik garis dari dua batang yang berdekatan pada sisi yang sama (D1-D2) (Gambar 1d). Kalibrasi ke empat (Metode E) dilakukan dengan mengukur jumlah *pixel* pada kotak eritrosit terkecil (48,3 *pixel*) kamar hitung dengan menarik garis sudut kotak satu (E1) dengan sudut kotak lain yang terdekat pada sisi yang sama (E2) (Gambar 1e).

Morfometri Eritrosit dan Analisis Statistika

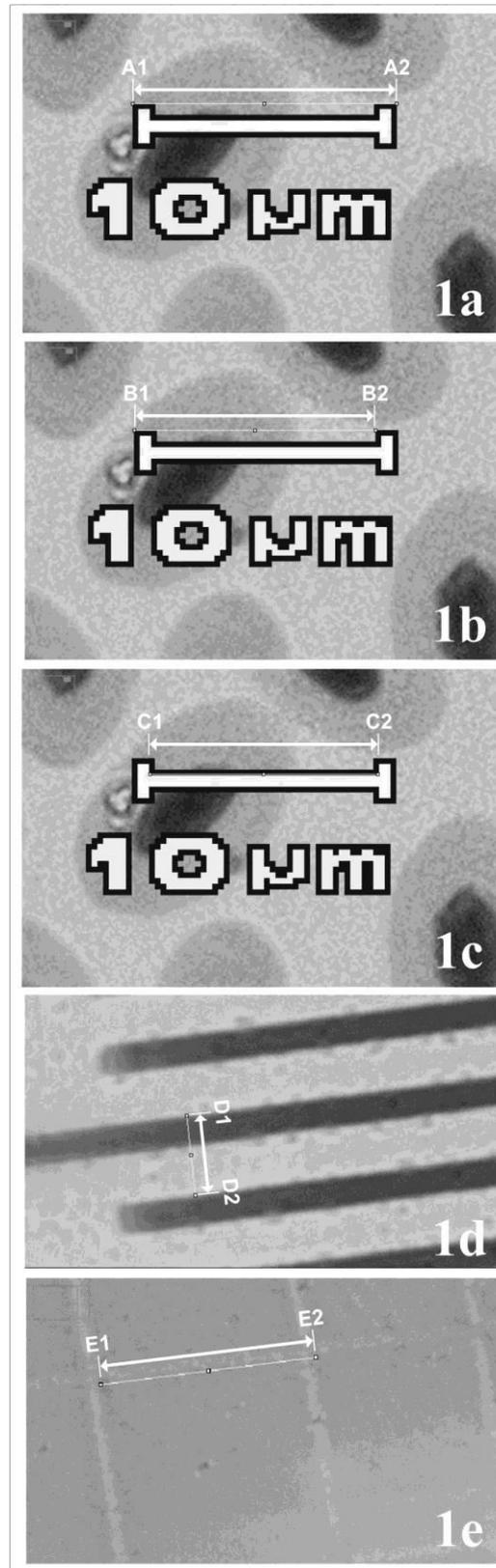
Pada penelitian ini, diambil 58 sel eritrosit elang ular bido yang diukur pada empat parameter: panjang sel (PS), lebar sel (LS), panjang nukleus (PN), lebar nukleus (LN). Sel-sel eritrosit yang utuh dan tidak saling bertumpukan dipilih dan diberi nomor dengan *Multi-point Tool* pada ImageJ. Pengukuran dilakukan dengan menarik garis dengan *Straight Line Tool* sesuai dengan parameter pengukuran (Gambar 2). Hasil pengukuran dimunculkan dengan memilih *Measure* pada menu *Analyze*.

Data-data pengukuran direkapitulasi dan diolah menggunakan aplikasi SPSS 24. Kelompok data pada setiap parameter diuji normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitasnya dengan uji *Levene* ($\alpha=0,05$). Kelompok data menunjukkan distribusi yang normal ($P>0,05$) dan sebaran yang homogen ($P>0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji parametrik. Rata-rata pengukuran dari lima metode kalibrasi diuji pada masing-masing parameter dengan uji *Analysis of Variance* dengan uji lanjutan *Tukey's HSD* (*honestly significant difference*) ($\alpha=0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data pengukuran keempat parameter morfometri eritrosit dengan lima metode kalibrasi yang berbeda divisualisasikan dengan diagram *boxplot* (Gambar 3). Analisis berdasar diagram *boxplot* menunjukkan tidak adanya *outlier* pada setiap kelompok data pengukuran. Terlihat adanya pola kenaikan nilai rata-rata hasil pengukuran pada setiap parameter berturut-turut dari metode A, B, C, dan D. Rata-rata pengukuran pada metode E menunjukkan sedikit penurunan dibandingkan dengan rata-rata pengukuran pada metode D.

Hasil analisis statistika deskriptif dan uji ANOVA menunjukkan bahwa rata-rata pengukuran eritrosit elang ular bido pada setiap parameter berbeda secara signifikan ($P<0,05$). Metode A menunjukkan nilai rata-rata pengukuran terkecil pada keempat parameter dengan nilai kalibrasi terbesar dari kelima metode yang digunakan. Metode D memiliki nilai rata-rata tertinggi dengan nilai kalibrasi yang lebih rendah. Hasil pengukuran memperlihatkan adanya pola kenaikan nilai rata-rata yang berbanding terbalik dengan nilai kalibrasi. Metode D juga memperlihatkan nilai standar deviasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode pengukuran yang lain, kecuali pada parameter panjang sel (PS). Nilai rata-rata hasil pengukuran dan hasil uji ANOVA setiap parameter disajikan pada Tabel 1.



Gambar 1. Metode kalibrasi pengukuran. Dari atas ke bawah: metode A, B, C, D, E. Garis kuning menandakan pengukuran *pixel* dengan *Straight Line Tool* pada *ImageJ*

Tabel 1. Rata-rata hasil pengukuran setiap parameter dan hasil uji anova ($\alpha=0.05$)

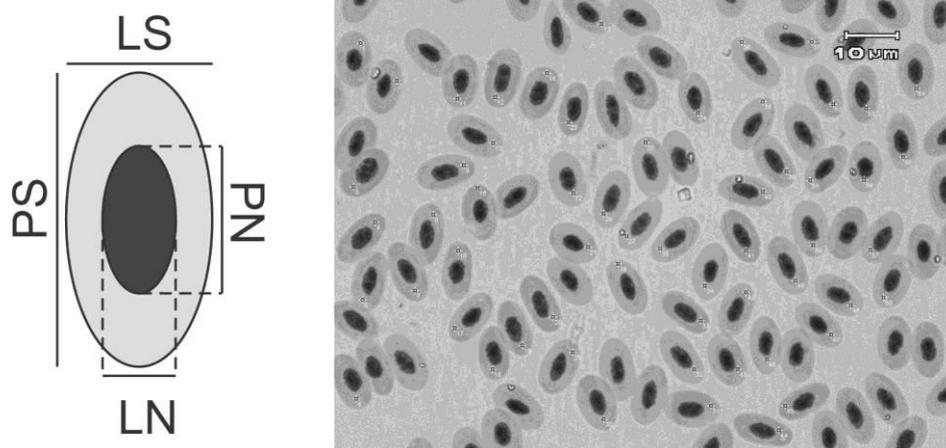
Metode	Kalibrasi (<i>pixel</i> / μm)	PS (μm)	LS (μm)	PN (μm)	LN (μm)
A	18.40	10.40 \pm 0.46	5.96 \pm 0.44	4.83 \pm 0.36	2.74 \pm 0.17
B	16.80	11.39 \pm 0.53	6.54 \pm 0.48	5.23 \pm 0.38	2.98 \pm 0.18
C	16.00	11.94 \pm 0.54	6.89 \pm 0.50	5.55 \pm 0.44	3.15 \pm 0.19
D	14.80	12.99 \pm 0.58	7.46 \pm 0.56	6.00 \pm 0.47	3.39 \pm 0.21
E	14.75	12.99 \pm 0.59	7.45 \pm 0.54	5.94 \pm 0.44	3.37 \pm 0.20
<i>F-value</i>		241.795	91.513	80.102	121.018
<i>P-value</i> ($\alpha=0.05$)		0.000	0.000	0.000	0.000

Karena hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan pada keempat parameter, pengujian dilanjutkan dengan uji Tukey's HSD untuk melihat perbedaan antarkelompok data. Hasil uji Tukey's HSD menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara nilai rata-rata keempat parameter pada metode A, B, dan C ($P<0,05$). Perbedaan nilai rata-rata keempat parameter yang tidak signifikan ditunjukkan pada perbandingan nilai rata-rata antara metode D dan E ($P>0,05$). *P-value* uji Tukey's HSD antarkelompok data hasil pengukuran dengan kelima metode disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. *P-value* hasil uji *tukey's hsd* antarkelompok metode pada setiap parameter

Parameter	A/B	A/C	A/D	A/E	B/C	B/D	B/E	C/D	C/E	D/E
PS	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
LS	.000	.000	.000	.000	.002	.000	.000	.000	.000	1.000
PN	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.950
LN	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.988

*PS=Panjang Sel, LS=Lebar Sel; PN=Panjang Nukleus; LN=Lebar Nukleus
 Baris pertama menunjukkan notasi perbandingan antarmetode ($\alpha=0.05$)



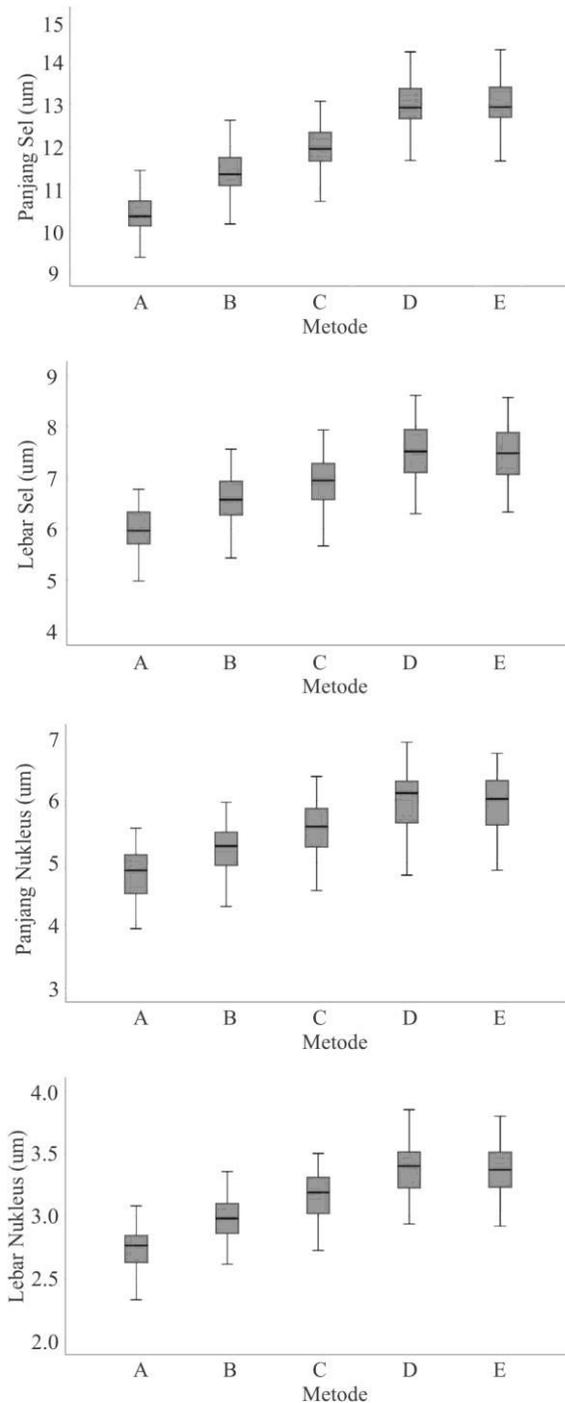
Gambar 2. Parameter morfometri eritrosit (kiri) dan preparat apus darah ular bido pewarnaan Giemsa (kanan)

Berdasarkan hasil uji statistika dari kelompok data yang diukur dengan lima metode kalibrasi berbeda pada keempat parameter morfometri, metode D dan E menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara signifikan. Dengan demikian, kamar hitung hemositomometer dapat digunakan sebagai kalibrator alternatif jika tidak terdapat mikrometer kalibrasi (*calibration slide*). Penelitian morfometri sel darah elang ular bido atau *Crested Serpent Eagle (Spilornis cheela)* juga dilakukan oleh Salakij *et al.* (2015a) yang menyatakan bahwa panjang sel eritrosit elang tersebut adalah $12,7 \pm 0,9 \mu\text{m}$ dan lebarnya $7,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$. Hasil pengukuran dengan metode D dan E memiliki selisih terkecil dengan ukuran sel eritrosit tersebut.

Standardisasi pengukuran pada skala kalibrasi perlu dilakukan untuk menghitung jumlah *pixel*. Standar penggunaan *Straight Line Tool* pada ImageJ untuk membuat garis dari ujung ke ujung harus ditentukan karena setiap garis atau batang skala memiliki lebar. Kami melakukan pengukuran berdasar Leitao (2016) yaitu tarikan garis menggunakan *Straight Line Tool* dilakukan di antara dua batang skala dari sisi yang sama (Gambar 4) pada mikrometer kalibrasi dan kamar hitung Neubauer. Dalam studi ini, batang skala digital yang dimunculkan dari aplikasi kamera mikroskop memiliki dua batang vertikal yang mengapit satu batang horizontal dan garis luar (*outline*) yang masing-masing memiliki tebal. Terdapat kesulitan untuk melakukan penarikan garis menggunakan *Straight Line Tool* yaitu dalam penentuan letak titik awal tarikan hingga titik akhir tarikan. Pada penelitian ini, metode C menunjukkan hasil yang paling mendekati hasil morfometri eritrosit oleh Salakij *et al.* (2015) dan hasil pengukuran berdasar mikrometer kalibrasi (*calibration slide*) serta kamar hitung hemositomometer.

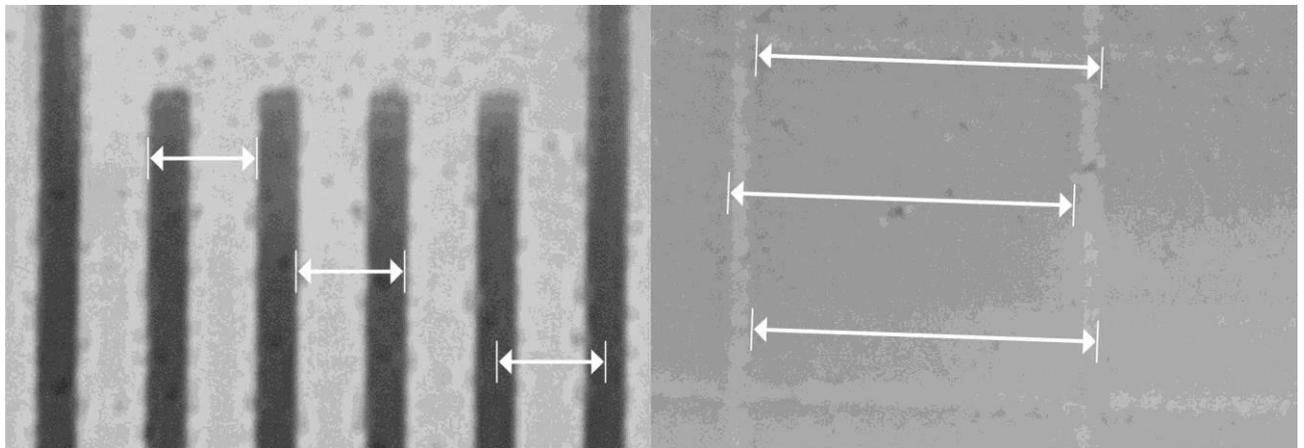
Pada laboratorium klinik yang belum memiliki mikrometer kalibrasi (*calibration slide*), kamar hitung Neubauer dapat digunakan sebagai kalibrator secara langsung di bawah mikroskop atau tidak langsung dengan difoto lalu dilakukan kalibrasi dengan aplikasi ImageJ. Pengambilan gambar untuk pengukuran sel dapat dilakukan dengan berbagai jenis kamera. Kamera yang digunakan untuk mengambil foto skala kalibrator harus sama dengan kamera untuk mengambil foto sel yang diukur dan menghasilkan resolusi gambar yang sama (Mandarim-de-Lacerda dan Del Sol, 2017). Pada Gambar 5 ditunjukkan proses pengukuran eritrosit burung menggunakan hemositomometer sebagai kalibrator dan kamera *smartphone* untuk mengambil gambar preparat apus darah. Kekurangan metode ini adalah sulitnya mengatur fokus pada kamera dan tarikan garis menggunakan *Straight Line Tool* yang bisa jadi berbeda pada setiap operator. Resolusi yang rendah dan pengaturan diafragma mikroskop

juga memengaruhi hasil foto terutama pada ketebalan garis terluar (*outline*) yang terbentuk di sekeliling sel. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan minyak imersi untuk meningkatkan fokus kamera mikroskop.



Gambar 3. Diagram *boxplot* perbandingan rata-rata hasil pengukuran dengan berbagai metode kalibrasi pada keempat parameter morfometri eritrosit

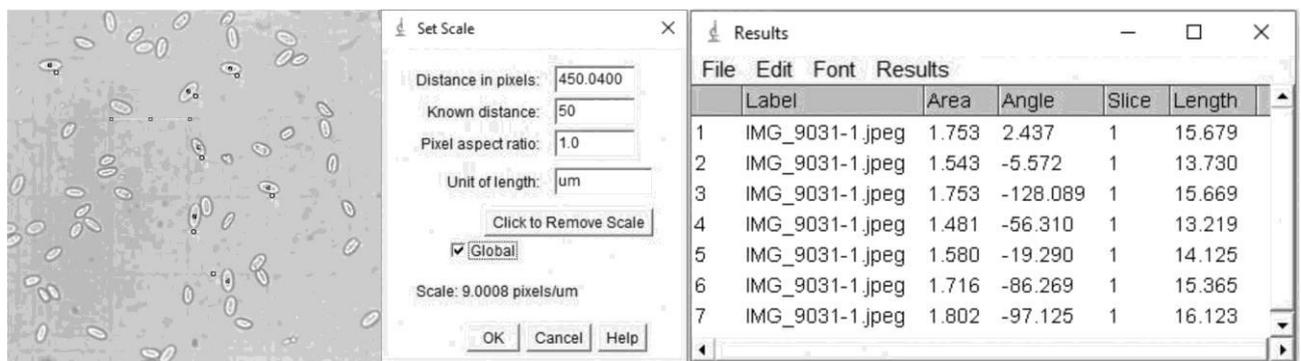
Metode morfometri sel pada gambar dua dimensi dapat dikembangkan untuk memperkirakan volume sel tersebut menggunakan pendekatan matematis. Dal'Bó *et al.* (2015) melaporkan terdapat perbedaan rata-rata volume darah pada empat jenis ikan produksi yang diduga berkaitan erat dengan tingkat aktivitas ikan. Parameter tiga dimensi pada morfometri sel juga dapat merepresentasikan kondisi dan fungsi sel. Berbagai parasit darah telah terbukti menyebabkan alterasi bentuk dan ukuran eritrosit burung pemangsa. Salakij *et al.* (2015b) melaporkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara sel-sel eritrosit elang normal dan sel-sel eritrosit yang terinfestasi *Haemoproteus*. Parasit darah yang sama juga ditemukan pada spesies burung hantu dan menunjukkan perbedaan signifikan secara morfometrik antara eritrosit normal dengan eritrosit yang terinfestasi parasit (Salakij *et al.*, 2018). Selain itu, kondisi-kondisi patologi klinis gambaran darah seperti makrositosis atau mikrositosis juga dapat dibuktikan secara kuantitatif menggunakan metode morfometri terutama untuk hewan-hewan yang memiliki eritrosit berinti. Joseph *et al.* (2017) melaporkan bahwa morfometri oosista dapat dilakukan sebagai bagian dari identifikasi jenis koksidia pada merpati. Selain itu, Tanveer *et al.* (2015) juga melakukan morfometri pada berbagai jenis nematoda dan telurnya dari burung-burung domestik untuk karakterisasi jenis nematoda.



Gambar 4. Pengukuran jumlah *pixel* untuk kalibrasi skala pengukuran

Aplikasi metode pengukuran benda mikroskopik di atas kamar hitung Neubauer masih jarang dilakukan dan diharapkan mampu menyumbang data-data berkaitan dengan fisiologi satwa liar Indonesia yang ada di pusat rehabilitasi dengan keterbatasan sarana yang ada. Penggunaan *smartphone* atau kamera digital untuk mengambil foto benda mikroskopik diharapkan memudahkan dokter hewan atau peneliti di pusat rehabilitasi melakukan rekam data-data kuantitatif dari temuan kasus. Informasi morfometri benda mikroskopik seperti

telur cacing, parasit darah, oosista hingga pengukuran komponen jaringan dalam preparat histopatologi yang terkumpul dari banyak pusat rehabilitasi sangat berguna untuk identifikasi penyakit. Bank data tentang informasi fisiologi dan temuan kasus perlu dibangun untuk menampung data-data seperti informasi morfometri benda mikroskopik pada satwa liar.



Gambar 5. Proses kalibrasi dan hasil pengukuran eritrosit burung menggunakan kamar hitung hemositometer sebagai kalibrator pada panel ImageJ

SIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan signifikan antara nilai rata-rata pengukuran menggunakan metode kalibrasi D dan E pada keempat parameter. Hal ini menunjukkan bahwa kamar hitung hemositometer dapat digunakan sebagai kalibrator jika tidak tersedia mikrometer kalibrasi (*calibration slide*) sebagai kalibrator pada morfometri sel.

SARAN

Kami merekomendasikan untuk tetap menggunakan mikrometer kalibrasi (*calibration slide*) atau kamar hitung hemositometer sebagai kalibrator standar pada setiap analisis morfometri sel. Perbandingan hasil pengukuran dengan berbagai metode kalibrasi diperlukan untuk menilai akurasi pengukuran pada jenis-jenis kalibrator yang ada.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Yayasan Konservasi Alam Yogyakarta (YKAY) selaku yayasan yang menaungi *Wildlife Rescue Centre* (WRC) Jogja dan Departemen Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adewoyin A. 2014. Peripheral blood film-a review. *Ann Ib Postgrad Med.* 12(2): 71-79.
- Dal'Bó GA, Sampaio FG, Losekann ME, Queiroz JFD, Luiz AJB, Wolf VHG, Gonçalves VT, Carra ML. 2015. Hematological and morphometric blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish. *Neotrop Ichthyol* 13(2): 439-446.
- Ferreira T, Rasband W. 2012. ImageJ user guide. *ImageJ/Fiji.* 1:155-161.
- Joseph J, Emmanuel WB, Yafeh VA, Ndimkaoha IO. 2017. Eimeria species oocyst morphology and prevalence of infection in domesticated pigeon (*Columba livia domestica*) in Maiduguri Metropolis Borno State, Nigeria. *Afr J Parasitol Res* 4(8): 244-248.
- Kuchai JA, Ahmad F, Chishti M Z, Tak H, Javid A, Ahmad S, Rasool M. 2012. A study on morphology and morphometry of *Haemonchus contortus*. *Pak J Zool* 44(6): 1737-1741.
- Leitão C. 2016. An alternative stage micrometer for use at light microscope. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia.* 8: 58-61.
- Mandal B, Sarkar S, Manna AK, Sengupta S, Bag M. 2019. Immunohistochemical and Morphometric Study of Urinary Bladder Epithelial Lesions with Special References to Invasiveness and Proliferative Activity. *IJRR.* 6(10): 321-331.
- Mandarim-de-Lacerda, CA, Del Sol M. 2017. Tips for Studies with Quantitative Morphology (Morphometry and Stereology). *Int J Morphol.* 35(4): 1482-1494.
- Mandarim-de-Lacerda, CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. 2010. *Image analysis and quantitative morphology.* In *Histology Protocols, Hewitson TD, Darby IA (Eds.)* New Jersey: Humana Press-Springer. pp: 211-225
- Salakij C, Kasorndorkbua C, Salakij J, Suwannasaeng P, Jakthong P. 2015a. Quantitative and qualitative morphologic, cytochemical and ultrastructural characteristics of blood cells in the Crested Serpent eagle and Shikra. *Jpn J Vet Res.* 63(3): 95-105.
- Salakij C, Kasorndorkbua C, Lertwatcharasarakul P, Salakij J. 2015b. Ultra-structure of blood cells and molecular characteristics of *Haemoproteus sp.* in Blyth's hawk eagle. *Comparative Clinical Pathology.* 24(5): 1293-1299.
- Salakij C, Pornpanom P, Lertwatcharasarakul P, Kasorndorkbua C, and Salakij J. 2018. *Haemoproteus* in barn and collared scops owls from Thailand. *J Vet Sci* 2018. 19(2): 280-289
- Simeonov R. 2012. Nuclear morphometry in cytological specimens of canine ceruminous adenomas and carcinomas. *Vet Comp Oncol.* 10(4): 246-251.
- Tanveer S, Ahad S, Chishti MZ. 2015. Morphological characterization of nematodes of the genera *Capillaria*, *Acuaria*, *Amidostomum*, *Streptocara*, *Heterakis*, and *Ascaridia* isolated from intestine and gizzard of domestic birds from different regions of the temperate Kashmir valley. *J Parasit Dis.* 39(4):745-760.
- Valkiūnas G, Iezhova TA. 2018. Keys to the avian malaria parasites. *Malaria J.* 17(1): 212-219