

## **IMAGE PROCESSING PADA CITRA MIKROSKOPIS ERITROSIT DENGAN HEMOCYTOMETER UNTUK MENGHITUNG JUMLAH ERITROSIT DALAM $1\text{mm}^3$ DARAH IKAN**

**Achmad Noercholis dan Erwien Tjipta Wijaya**

Teknik Informatika

Sekolah Tinggi Manajemen Informatika dan Komputer ASIA Malang

anoercholis@gmail.com dan erwin.cipta@gmail.com

### **ABSTRAK**

Analisa darah bisa diterapkan sebagai *early detection system* untuk mencegah kematian masal dalam pembudidayaan perikanan. Akurasi hasil perhitungan secara manual yang biasa dilakukan sangat tergantung dari keahlian laboran. Proses perhitungan pun memerlukan waktu yang relatif lama dan membutuhkan konsentrasi yang membuat mata cepat lelah. Telah banyak penelitian dilakukan untuk mengotomatisasi perhitungan *eritrosit*, namun hampir semuanya hanya menghitung jumlah *eritrosit* dalam sebuah citra saja, tanpa mengetahui berapa jumlah *eritrosit* dalam  $1\text{ mm}^3$  darah. Dalam penelitian ini dilakukan penghitungan jumlah *eritrosit* dalam  $1\text{ mm}^3$  darah ikan dengan memanfaatkan *haemocytometer*. Larutan darah yang sudah dicampur dengan koagulan diteteskan pada *haemocytometer*, kemudian diamati dan di-*capture* menggunakan mikroskop digital dengan perbesaran 400X. Proses *cropping, modification adjustment, grey scalling, thresholding* dan *morfology* diterapkan pada citra hasil *capture*. *Watershed* dimanfaatkan untuk memisahkan sel yang bertumpuk. *Roundness filtering* diterapkan pada setiap kandidat untuk mengenali sel *eritrosit*. Hasil pengujian terhadap 100 citra *eritrosit* ikan menunjukkan tingkat akurasi sistem yang dibangun mencapai 98,9 %.

Kata kunci: *image processing, haemocytometer, eritrosit ikan, roundness filtering*

### **ABSTRACT**

*Blood analysis can be applied as an early detection system to prevent mass mortality in fish farming. Accuracy of the results of the calculations manually is usually done very dependent on the expertise of the laboratory. Calculation process also requires a relatively long time and requires a concentration that makes the eyes tired. There have been many studies done to automate the calculation of the erythrocyte, but almost all of them only count the number of erythrocytes in an image, without knowing how the number of erythrocytes in  $1\text{ mm}^3$  of blood. In this research, counting the number of erythrocytes in  $1\text{ mm}^3$  of blood fish by using hemocytometer. A solution that has been mixed with the blood coagulant drops on hemocytometer, then observed and captured using a digital microscope with a magnification of 400 times. Modification adjustment, gray scaling, thresholding and morfology applied to the captured image. Watershed is used to separate the overlapping cells. Roundness filtering applied to each candidate to recognize erythrocytes. The test results of 100 fish erythrocytes image shows the level of accuracy of the system reaches 98.9%.*

*Keywords: image processing, haemocytometer, fish eritrosit, roundness filtering*

## I. PENDAHULUAN

Perikanan tangkap dan budidaya berperan penting dalam pencapaian tujuan strategis dari FAO yaitu mengurangi tingkat kelaparan, malnutrisi dan ketidakamanan pangan. Dalam publikasinya dinyatakan bahwa kenaikan permintaan menyebabkan sektor perikanan menjadi lebih produktif, efisien dan berkelanjutan pada sistem produksinya sekaligus berperan dalam mengurangi kemiskinan di pedesaan dan memperkuat ketahanan pangan terhadap kemungkinan terjadi bencana, krisis dan perubahan iklim [5]. Pertumbuhan produksi perikanan secara global terus diupayakan mengejar laju pertumbuhan populasi penduduk. Perikanan budidaya tetap menjadi sektor yang berperan penting dengan menyumbang pertumbuhan tinggi untuk memenuhi permintaan terhadap produk perikanan yang terus meningkat. Protein dari ikan merupakan komponen nutrisi yang penting bagi negara yang memiliki jumlah penduduk tinggi [5].

Salah satu tantangan yang besar dalam budidaya perikanan adalah limbah pabrik yang membuat menurunnya kualitas air. Seperti terjadinya kematian masal ikan di teluk Jakarta pada Mei 2014 yang disebabkan oleh logam berat [8]. Banyak kasus kematian ikan massal di waduk/danau di Indonesia diantaranya: 1) Danau Maninjau-Sumbar dilaporkan 13.000 ton ikan mati pada tahun 2009, 2) Waduk Jatiluhur-Jawa Barat dilaporkan 3.500 ton ikan mati pada bulan Februari 2006, 3) Danau Tondano-Sulawesi Utara dilaporkan 300 ton ikan mati pada bulan November 2010 [2].

Pada budidaya ikan, air dapat menjadi perantara bagi penularan bibit penyakit. Apabila air yang digunakan dalam budidaya telah tercemar atau mempunyai kualitas yang tidak memenuhi persyaratan untuk budidaya, maka ikan budidaya tersebut akan terserang bibit penyakit atau parasit yang hidup pada air tersebut [4]. Pada ikan yang terserang penyakit terjadi perubahan pada nilai hematokrit, kadar hemoglobin, jumlah sel darah merah (*eritrosit*) dan jumlah sel darah putih (*leukosit*) [3]. Pemeriksaan darah (*hematologis*) dapat digunakan sebagai indikator tingkat keparahan suatu penyakit [4]. Studi hematologis merupakan kriteria penting untuk diagnosis dan penentuan kesehatan ikan [9]. Dengan melakukan pemeriksaan *hematologis* secara berkala pada ikan budidaya resiko kematian masal bisa diantisipasi lebih awal.

Salah satu pemeriksaan *hematologis* yang sering dilakukan adalah penghitungan jumlah sel darah merah atau *eritrosit* dalam  $1\text{mm}^3$  darah ikan. Dalam laboratorium jumlah *eritrosit* dihitung menggunakan bantuan *hemocytometer* yang diamati menggunakan mikroskop dan dilakukan penghitungan secara langsung menggunakan *hand tally* [10]. Proses pengamatan langsung melalui mikroskop membutuhkan konsentrasi yang cepat membuat mata lelah karena mengamati objek kecil dalam jumlah yang banyak. Hal ini cukup mempengaruhi keakuratan hasil perhitungan. Metode penghitungan jumlah sel dalam darah terus berkembang hingga saat ini, dan merupakan tantangan bagi para peneliti untuk terus meningkatkan akurasi perhitungannya.

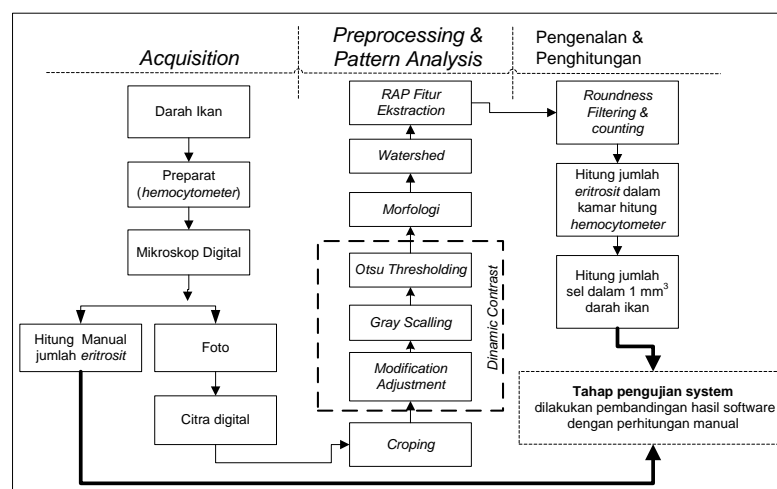
Beberapa penelitian pendahulu telah dilakukan untuk memberikan alternatif penghitungan jumlah sel dalam citra darah secara otomatis menggunakan aplikasi *image processing*. Beberapa diantaranya Chanh Jung, dkk (2010) menggunakan metode *unsupervised bayesian classification* untuk mengatasi masalah sel bertumpuk pada sel

serviks [7], Nasrul Humaimi Mahmood, dkk (2013) melakukan ekstraksi sel darah menggunakan segmentasi berbasis warna International Commission on Illumination  $L^*a^*b^*$  (CIELAB) [11] dan A.Noercholis, dkk (2013) melakukan penghitungan *leukosit* pada darah ikan menggunakan *ekstraksi fitur roundness* [1]. Dari beberapa penelitian tersebut belum ada yang melakukan penghitungan jumlah sel dalam  $1\text{mm}^3$  darah. Mengetahui jumlah sel dalam sebuah citra belum bisa digunakan sebagai bahan diagnosis kondisi pemilik darah. Informasi jumlah sel baru bisa bermanfaat ketika jumlah sel tersebut mencerminkan jumlah sel dalam  $1\text{mm}^3$  darah.

Dalam penelitian ini dilakukan penghitungan jumlah *eritrosit* dalam  $1\text{mm}^3$  darah ikan dengan memanfaatkan *hemocytometer*. Larutan darah yang sudah dicampur dengan koagulan diteteskan pada *hemocytometer*, kemudian diamati dan di-*capture* menggunakan mikroskop digital dengan perbesaran 400x. Proses *cropping*, *modification adjustment*, *grey scalling*, *thresholding* dan *morfology* diterapkan pada citra hasil *capture* untuk memisahkan setiap objek kandidat *eritrosit* dengan background. *Watershed* dimanfaatkan untuk memisahkan objek sel yang bertumpuk. Tingkat kebulatan setiap objek dievaluasi untuk mengenali objek *eritrosit* dan objek bukan *eritrosit*.

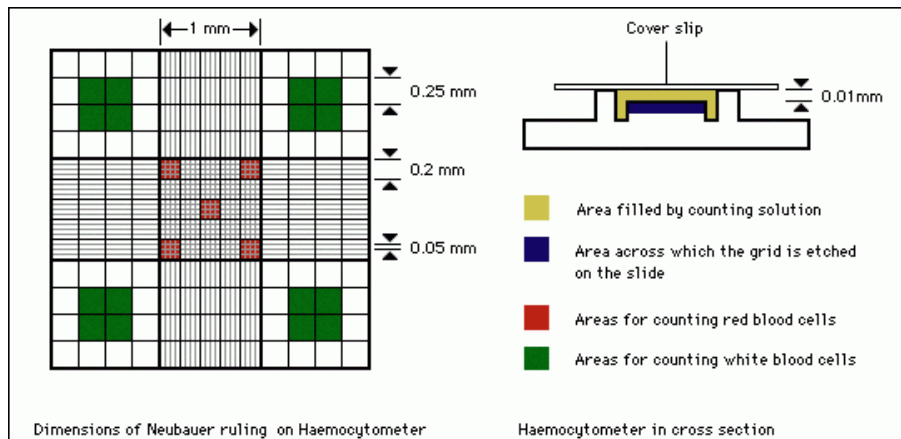
## II. KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN

Penghitungan jumlah *eritrosit* pada manusia bisa dilakukan dengan cara yang jauh lebih mudah, karena sudah menggunakan alat *hematology analyzer*. Namun sayangnya, alat tersebut tidak bisa digunakan untuk melakukan penghitungan jumlah *eritrosit* ikan. Hal ini disebabkan adanya perbedaan ciri antara sel darah manusia dengan sel darah ikan. Pada penelitian ini, pendekatan dan metode baru menggunakan pengolahan citra digunakan untuk menyelesaikan permasalahan tersebut. *Hemocytometer* digunakan sebagai preparat supaya dapat diketahui jumlah *eritrosit* dalam  $1\text{mm}^3$  darah ikan. Ekstraksi fitur sel darah berdasarkan tingkat kebulatan (*roundness*), nilai perimeter dan luas area digunakan sebagai ciri pembeda dalam pengenalan pola sel darah merah dengan objek yang bukan darah untuk meningkatkan akurasi hasil perhitungan. Secara lengkap tahapan penelitian yang dilakukan ditunjukkan dalam gambar 1.



**Gambar 1. Kerangka Operasional Penelitian**

Pada tahap *acquisition* dilakukan pengambilan citra sel darah merah dan sel darah putih. Darah diambil dari 20 ikan mas koi dengan panjang antara 10 – 15 cm. Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian selain ikan antara lain Natrium Sitrat, larutan hayem, larutan turk dan Aqua bides. Peralatan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian adalah *haemocytometer*, mikroskop yang dilengkapi kamera digital, komputer dan alat tulis. Gambar 2 adalah *neubauer haemocytometer* yang saat ini banyak digunakan untuk melakukan perhitungan jumlah sel darah. Area merah pada kotak kecil adalah area untuk menghitung jumlah sel darah merah sedangkan area hijau pada kotak besar adalah area untuk menghitung jumlah sel darah putih.



**Gambar 2. Neubauer Haemocytometer [12].**

Rumus umum untuk menghitung jumlah sel darah per- $\text{mm}^3$  ditunjukkan pada persamaan (1) [12].

$$N = \frac{n}{v} \times \text{Pengenceran} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan :

- n adalah total jumlah sel darah merah dalam seluruh kamar hitung
- N adalah jumlah sel darah merah dalam  $1 \text{ mm}^3$  darah

Jumlah *eritrosit* dihitung dari 5 kotak kecil warna merah yang setiap kotak memiliki volume sebesar  $(0,2 \times 0,2 \times 0,1) \text{ mm}^3$  atau  $0,004 \text{ mm}^3$ . Volume total 25 kotak adalah  $0,1 \text{ mm}^3$  jika n adalah jumlah sel dalam 5 kotak hijau maka jumlah sel darah per- $\text{mm}^3$  bisa dihitung menggunakan persamaan (2.7).

$$N = \frac{5n}{0,1} \times 200 = n \times 10000 \text{ sel}/\text{mm}^3 \dots \dots \dots (2)$$

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

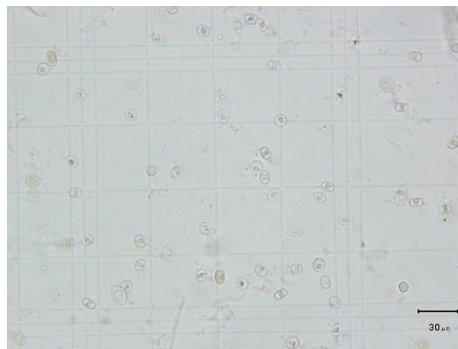
Satu tetes larutan darah dari pipet thoma diteteskan pada kamar hitung (*haemocytometer*) kemudian ditutup menggunakan coverglass. Gambar 3 menunjukkan *haemocytometer* yang digunakan dalam penelitian.



**Gambar 3. Proses penyampuran dan *Haemocytometer***

Untuk mengambil data citra sel darah, *haemocytometer* yang telah berisi larutan darah diletakkan di bawah mikroskop digital Olympus BX-41 kemudian citra diambil dengan perbesaran 400 kali. Gambar 4 menunjukkan salah satu hasil *capture* citra *eritrosit*. Dimensi dari setiap citra yang diperoleh adalah 1600 X 1200 piksel dengan kisaran ukuran antara 1,5 sampai 1,85 MB. Kotak-kotak yang terlihat pada *background* adalah kamar hitung yang ada pada *haemocytometer*.

Dari citra hasil *acquisition* tersebut muncul dua permasalahan yang cukup mempengaruhi hasil pengolahan citra. Yang pertama bisa terlihat bahwa posisi kamar hitung antara citra yang satu dengan citra yang lainnya berbeda. Pada proses pengolahan citra agar sel di luar kamar hitung tidak ikut terhitung, diperlukan teknik pemotongan yang tepat pada area yang dibutuhkan saja. Pada penelitian ini untuk menyelesaikan permasalahan tersebut, digunakan teknik *cropping* dinamis sehingga pengguna bisa memilih kamar hitung dengan tepat. Permasalahan kedua adalah adanya perbedaan intensitas cahaya masing-masing citra, hal ini mengakibatkan nilai yang diterapkan pada teknik *contrast adjustment* untuk satu citra tidak sesuai untuk citra yang lainnya. Pada penelitian ini permasalahan tersebut diselesaikan dengan teknik *contrast adjustment* dinamis, dimana nilai batasnya dimasukkan secara dinamis oleh pengguna menggunakan *slider* yang ada di menu aplikasi.

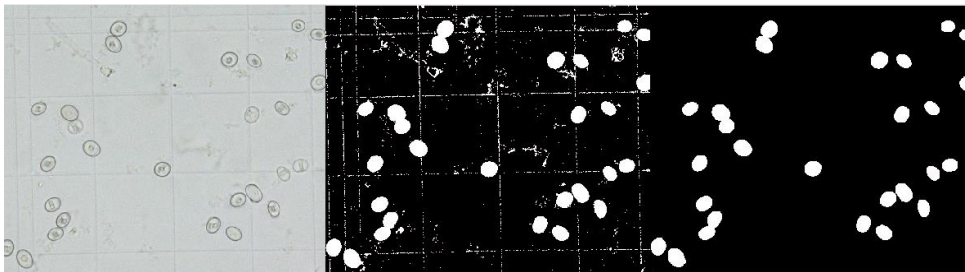


**Gambar 4. Hasil *capture* menggunakan mikroskop digital Olympus BX-41**

Dalam proses penghitungan sel menggunakan pengolahan citra, tantangan yang dihadapi adalah bagaimana mengenali objek sel darah yang ada dalam citra. Citra hasil *acquisition* memiliki format \*.jpg yang terdiri dari komponen warna RGB, dimana *background* dan sel yang akan dihitung masih menjadi satu. Otomatisasi penghitungan citra sulit dilakukan dalam kondisi sumber citra seperti tersebut di atas. Penghitungan

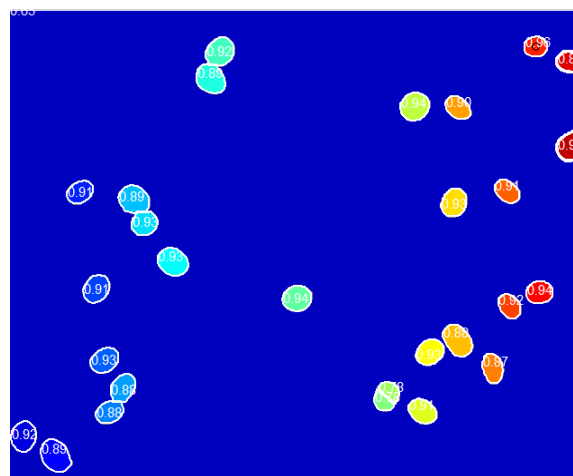
sel bisa dilakukan dengan baik ketika setiap objek sel terpisah dari *background* dan terpisah dari sel yang lainnya. Jenis citra yang cocok untuk proses penghitungan adalah citra hitam putih atau citra biner. Dimana warna putih diwakili dengan logika 1 menggambarkan objek yang akan dihitung, sedangkan warna hitam diwakili dengan logika 0 menggambarkan *background* citra yang berarti kosong. Diperlukan teknik yang tepat, sesuai dengan karakteristik citra sel darah, untuk bisa membuat citra asli menjadi citra biner tanpa mengubah bentuk, ukuran dan jumlah sel yang ada dalam citra. Untuk mencapai tingkatan tersebut metode *preprocessing* yang dilakukan dalam penelitian ini ditunjukkan pada gambar 5.

Teknik *cropping* dibuat interaktif sehingga pengguna bisa memilih area atau kamar hitung yang tepat. *Dinamic contrast* digunakan untuk memisahkan objek kandidat sel dengan *background*. Morfologi digunakan untuk membersihkan noise atau objek-objek kecil yang sudah bisa dipastikan bukan sel. Tampak pada gambar 5.c setiap objek kandidat sel sudah mampu dipisahkan dengan baik, namun masih ada beberapa sel yang masih bertumpuk.



Gambar 5. a) Hasil *cropping* b) Hasil *dinamic contrast* c) Hasil morfologi

Keberadaan sel bertumpuk akan mengakibatkan hasil penghitungan menjadi kurang akurat. Pada penelitian ini *watershed* digunakan untuk mengatasi masalah sel bertumpuk. Gambar 6 menunjukkan hasil proses *watershed*. Tampak pada gambar terbentuk sekat yang memisahkan sel yang bertumpuk. Pada gambar 6 juga menunjukkan hasil evaluasi tingkat *roundness*. Semakin bulat objek nilai *roundness* semakin mendekati 1. Sebuah objek dikatakan sebagai *eritrosit* jika memiliki nilai *roundness* diatas 0,75 [1].



Gambar 6. Hasil Pemisahan Sel Bertumpuk Menggunakan Watershed

Data citra yang digunakan untuk pengujian diambil dari larutan darah 20 ikan mas koi. Setiap ikan diambil 5 citra pada area kamar hitung *haemocytometer*. Pengujian dilakukan dengan cara membandingkan hasil pengujian sistem dengan hasil pengujian teknik pelabelan. Teknik pelabelan dilakukan secara manual dengan cara menandai setiap sel yang telah dihitung. Penghitungan *eritrosit* menggunakan pengolahan citra memiliki tingkat akurasi rata-rata sebesar 98,9%. Hasil pengujian ditunjukkan pada tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Pengujian**

Objek penelitian	Jumlah <i>eritrosit</i> dalam 5 kamar hitung				Jumlah <i>eritrosit</i> per-mm <sup>3</sup> (Berdasarkan hasil aplikasi)
	<i>Pelabelan</i>	<i>Aplikasi</i>	<i>Selisih</i>	<i>Akurasi</i>	
ikan 1	157	153	4	97.4%	1530000
ikan 2	168	166	2	98.8%	1660000
ikan 3	187	180	7	96.1%	1800000
ikan 4	163	161	2	98.8%	1610000
ikan 5	168	165	3	98.2%	1650000
ikan 6	157	157	0	100.0%	1570000
ikan 7	165	169	4	97.6%	1690000
ikan 8	154	154	0	100.0%	1540000
ikan 9	161	160	1	99.4%	1600000
ikan 10	58	57	1	98.2%	570000
ikan 11	54	54	0	100.0%	540000
ikan 12	39	39	0	100.0%	390000
ikan 13	41	41	0	100.0%	410000
ikan 14	49	49	0	100.0%	490000
ikan 15	73	72	1	98.6%	720000
ikan 16	49	50	1	98.0%	500000
ikan 17	61	61	0	100.0%	610000
ikan 18	60	62	2	96.8%	620000
ikan 19	51	51	0	100.0%	510000
ikan 20	41	41	0	100.0%	410000
Rata-rata prosentase akurasi				98.9%	

#### IV. PENUTUP

Kesulitan dalam menghitung jumlah *eritrosit* ikan bisa diselesaikan menggunakan pengolahan citra. Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Pemanfaatan *haemocytometer* sebagai preparat dalam pengambilan citra *eritrosit* bisa digunakan sebagai skala, sehingga penghitungan jumlah *eritrosit* pada citra bisa mencerminkan jumlah *eritrosit* pada 1 mm<sup>3</sup> darah ikan.
2. Hasil perbandingan dengan teknik pelabelan, tingkat akurasi penghitungan menggunakan sistem cukup besar, proses penghitungan pun jadi lebih mudah dan lebih cepat. Tingkat akurasi penghitungan menggunakan sistem mencapai 98,9%.

3. Pada beberapa citra, hasil penghitungan sistem kadang lebih besar dan kadangkala lebih kecil jika dibandingkan dengan teknik pelabelan.
4. Penghitungan sistem yang lebih besar disebabkan terjadinya *over segmented* saat dilakukan proses *watershed*, sedangkan hasil penghitungan sistem yang lebih kecil disebabkan karena hilangnya beberapa sel saat dilakukan proses morfologi.

Penelitian yang telah dilakukan masih jauh dari sempurna, perbaikan pada proses *acquisition* maupun pada proses *preprocessing* sangat mungkin untuk dilakukan terutama untuk menghindari terjadinya *over segmented* maupun hilangnya sel saat dilakukan proses morfologi.

## V. DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. Noercholis, Maftuch, M. Aziz M., *Ekstraksi Fitur Roundness untuk Menghitung Jumlah Leukosit dalam Citra Sel Darah Ikan*. Jurnal EECCIS Vol. 7, No. 1, Juni 2013.
- [2] Anonime. *Upaya Pencegahan Dan Penanggulangan Upwelling Bagi Pembudidaya Ikan Keramba Jaring Apung (KJA) Di Danau/Waduk*. <http://www.djpb.kkp.go.id/berita.php?id=518>.
- [3] Bastiawan, D, Taukhid, M. Alifudin, dan T. S. Dermawati. *Perubahan Hematologi dan Jaringan Ikan Lele Dumbo (Clarias gariepinus) yang diinfeksi Cendawan Aphanomyces sp.* Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. 106-115. 1995.
- [4] Bastiawan, D; A. Wahid; M. Alifudin, dan I. Agustiawan. *Gambaran Darah Lele dumbu (Clarias spp.) yang Diinfeksi Cendawan Aphanomyces sp pada pH yang Berbeda*. Jurnal penelitian Indonesia 7(3): 44-47. 2001.
- [5] FAO (Food and Agricultur Organization of The United Nations), *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014: Opportunities and Challenges*. 2014. <http://www.wpi.kkp.go.id/index.php/86-kilas-perdagangan-dunia/113-ulasan-singkat-fao-2014-peluang-dan-tantangan-sektor-perikanan> dan <http://www.fao.org/fishery/publications/sofia/en>
- [6] Intan E. A., dkk. *The use of hematology method and blood endoparasite observation for determining catfish (Clarias gariepinus) health in fishery Mangkubumen, Boyolali*. Biodiversitas ISSN: 1412-033X. Vol.8, No.1. Januari. 2007.
- [7] Jung, Chanhoo and Changick Kim, *Segmenting Clustered Nuclei Using H-minima Transform-Based Marker Extraction and Contour Parameterization*, IEEE Transactions On Biomedical Engineering, Vol. 57, pp.2600-2604, 2010.
- [8] Lestari, Edward. *Dampak pencemaran logam berat terhadap kualitas air laut dan sumberdaya perikanan (studi kasus kematian massal ikan-ikan di teluk jakarta)*. Makara, Sains, Vol.8, No.2. Agustus. 2004. <http://www.journal.ui.ac.id/index.php/science/article/download/414/410>
- [9] Lestari, A.S. *Studi Karakteristik dan Patologi Aeromonas hydrophila pada Ikan Lele dumbu (Clarias gariepinus)*. Makalah Falsafah Sains. Program Pasca Sarjana. IPB .Bogor. 2001.
- [10] Meyer D. J., Harvey J.W., *Veterinary Laboratory Medicine Interpretation and Diagnosis*. 1998.
- [11] N.H. Mahmood, Poon C.L., *Blood Cells Extraction Using Color Based Segmentation Technique*,. Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res. April. 2013. <http://www.ijlbpr.com>
- [12] Seiverd Cahrles E., *Hematology For Medical Technologists*, Fourth Edition, Lea & Febiger, Philadelphia. 1977.