

EVALUASI PEMERIKSAAN BILIRUBIN TOTAL MENGGUNAKAN MODEL *SPECIMEN INSIGNIFICANT* DAN *MILD HEMOLYSIS*

^KSuryanata Kesuma¹, Siti Rodiyah¹, Maulida Julia Saputri¹

¹Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur, Kalimantan Timur, Indonesia

Info Artikel:

Disubmit: 03-08-2023

Direvisi: 05-10-2023

Diterima: 17-10-2023

Dipublikasi: 28-12-2023

^KPenulis Korespondensi:

Email:

suryanatakesuma@gmail.com

Kata kunci:

Bilirubin Total,

Specimen Insignificant

Hemolysis,

Specimen Mild Hemolysis

DOI: 10.47539/gk.v15i2.428

ABSTRAK

Bilirubin total merupakan salah satu pemeriksaan fungsi hati. Pemeriksaan bilirubin total umumnya menggunakan sampel darah yang tidak boleh hemolisis, sehingga sampel hemolisis menjadi salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan bilirubin total. Hemolisis dapat terjadi secara *in vivo* dan *in vitro*. Hemolisis secara *in vitro* menyebabkan kesalahan pemeriksaan bilirubin total. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hasil evaluasi pemeriksaan bilirubin total menggunakan model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Metode penelitian ini adalah kuasi eksperimen. Pembuatan hemolisis menggunakan larutan *aquadest*. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 40 sampel. Pemeriksaan menggunakan metode kolorimetri pada alat fotometer DIRUI DR-7000D. Pemeriksaan hemoglobin digunakan untuk melakukan validasi *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Hasil uji statistik *one-way Anova* didapatkan nilai Sig < 0.05. Hasil akurasi yang didapatkan adalah -1.83% dan -4.40% < 11.4%, presisi 22.0% dan 20.6% > 7%, TE 38.1% dan 38.5% > 20% TEa berturut-turut sampel *insignificant* dan *mild hemolysis*. Kesimpulan terdapat perbedaan secara statistik dan klinis pada hasil evaluasi pemeriksaan bilirubin total model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*.

ABSTRACT

The total bilirubin is one of the liver function tests. The entire bilirubin test generally uses blood samples, which are one of the factors that can't be hemolyzed, so hemolysis samples are one of the factors that can affect the result of the total bilirubin test. Hemolysis can occur *in vivo* and *in vitro*. Hemolysis *in vitro* causes an error in the entire bilirubin test. However, hemolysis specimens are still examined for total bilirubin under certain conditions. The evaluation aims to find out the results of natural bilirubin test specimens *insignificant* and *mild hemolysis*. This research method is quasi-experimental. They are making hemolysate using an *aquadest* solution. The number of samples in this research was 40, and examination was done using the colorimetric method on the DIRUI DR-7000D photometer. A hemoglobin test is used to validate specimens of *insignificant* and *mild hemolysis*. The one-way Anova statistical test results obtained a sig value < 0.05. Accuracy results were -1.83% and -4.40% < 11.4%, precision 22.0% and 20.6% > 7%, TE 38.1% and 38.5% > 20% TEa, respectively, samples of *insignificant* and *mild hemolysis*. The conclusion: statistical and clinical differences exist in evaluating total bilirubin test results in the tiny and soft hemolysis specimen models.

Keywords: Insignificant Hemolysis Specimen, Mild Hemolysis Specimen, Total Bilirubin

PENDAHULUAN

Secara umum, mutu laboratorium dipengaruhi oleh dua komponen dasar, yaitu mutu pemeriksaan dan mutu pelayanan. Mutu pemeriksaan merupakan tujuan dari proses dalam suatu prosedur dengan harus memperhatikan dua faktor utama, yaitu ketepatan (*accuracy*) dan ketelitian (*precision*) sehingga akan memberikan informasi hasil pemeriksaan yang tepat dan akurat, sedangkan mutu pelayanan ialah yang mengarah pada tingkat kesempurnaan pelayanan kesehatan. Salah satu laboratorium yang perlu selalu fokus pada mutu pelayanan dan pemeriksaan adalah laboratorium klinik. Laboratorium klinik merupakan laboratorium yang melakukan pelayanan pemeriksaan dengan menggunakan spesimen klinik, salah satunya adalah pemeriksaan bilirubin total (Siregar et al., 2018).

Pemeriksaan bilirubin total dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri pada alat fotometer DIRUI DR-7000D. Pada hari pertama pemeriksaan dilakukan *setting* alat sesuai pada kit *insert* bilirubin total yang digunakan, setelah itu dilakukan kalibrasi dengan menggunakan reagen multikalibrator untuk mendapatkan faktor yang sesuai. Setiap kali dilakukan pemeriksaan terhadap sampel diawali dengan kontrol terlebih dahulu menggunakan serum kontrol yang disesuaikan pada faktor pemeriksaan bilirubin total yang telah ditentukan. Kontrol yang dilakukan bertujuan agar mendapatkan hasil pemeriksaan yang tepat dan akurat. Kemudian dilakukan pemeriksaan bilirubin total menggunakan *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* sesuai pada kit *insert* prosedur pemeriksaan bilirubin total (Diagnostics, 2017).

Hemolisis adalah gangguan membran sel eritrosit yang mengakibatkan terlepasnya hemoglobin ke media sekitarnya yang ditandai dengan keadaan sampel berwarna kemerahan (Kahar, 2017). Pada kondisi tertentu yang kerap kali terjadi di lapangan ialah penolakan sampel karena hemolisis. Menurut (Adiga & Yogish, 2019) mengemukakan bahwa persentase kejadian hemolisis ringan sekitar 52,7% serta berjumlah sebanyak 31,36% untuk hemolisis sedang. Pada umumnya jika menemukan sampel hemolisis maka wajib dilakukan pengambilan ulang, akan tetapi tidak menutup kemungkinan untuk menghasilkan sampel hemolisis dikarenakan hemolisis bisa terjadi dengan cara *in vitro* maupun *in vivo*. Hemolisis dengan cara *in vivo* disebabkan oleh adanya situasi maupun kondisi patologis yang salah satunya ialah terjadi anemia hemolitik autoimun, infeksi, atau juga reaksi transfusi. Dalam beberapa kasus tersebut tidak dapat dihindari, dikarenakan kondisi patologis tersebut akan membuat terjadinya kerusakan pada sel darah merah sehingga dihasilkan sampel yang lisis (Riviana et al., 2019). Hemolisis secara *in vitro* jauh lebih sering terjadi dikarenakan adanya tahap pengambilan sampel, penanganan, maupun juga sentrifugasi sampel yang tidak benar (Lippi et al., 2015)

Pemantapan mutu (*quality assurance*) kimia klinik ialah rangkaian aktivitas ataupun kegiatan untuk mendapatkan jaminan dalam hal ketelitian dan ketepatan dari hasil pemeriksaan laboratorium kimia klinik. Salah satu faktor penting dari pemantapan mutu yakni Pemantapan Mutu Internal (PMI). PMI ialah aktivitas pemantauan maupun pencegahan yang mencakup tahap pra-analitik, analitik, serta pasca analitik oleh tiap-tiap laboratorium secara berkelanjutan untuk mencegah atau mengurangi terjadinya kesalahan hingga didapatkan hasil pemeriksaan yang benar dan juga tepat. Tahap pra-analitik

mencakup diantaranya kompetensi sumber daya manusia, persiapan pasien, evaluasi permintaan pemeriksaan, serta pengiriman maupun penerimaan sampel. Tahap analitik mencakup diantaranya seluruh perihal disaat melakukan suatu pemeriksaan. Tahap pasca analitik mencakup diantaranya pelaporan maupun pencatatan hasil. Pada tahap pra-analitik hingga tahap pasca analitik bisa mempunyai kesalahan yang akan mempengaruhi hasil pemeriksaan (Risa, 2017).

Kesalahan dapat terjadi dalam tahap pra-analitik yang memiliki nilai persentase dengan jumlah sebesar 68%, 25% pada tahap analitik, dan 14% pada tahap pasca analitik. Penelitian Dereen Najat (2017) menjelaskan bahwa kesalahan penanganan sampel pada tahap pra-analitik mencapai 39% dengan sumber utama kesalahan adalah 6% untuk sampel beku (*clotted*), 8% untuk kesalahan identifikasi sampel, dan 9% untuk sampel yang terjadi hemolisis (Wahyu Wijayati & Ayuningtyas, 2021). Sampel hemolisis bisa mempengaruhi hampir keseluruhan pemeriksaan laboratorium kimia klinik. Hasil pemeriksaan laboratorium klinik yang bermutu sangat dibutuhkan, salah satu pemeriksaan laboratorium yang wajib untuk dipertahankan kualitasnya ialah mengenai penanganan sampel, terutama terhadap sampel hemolisis. Dengan adanya penanganan sampel yang baik, maka akan memberikan hasil pemeriksaan spesimen yang akurat, maupun juga sebaliknya (Fadhilah, 2019).

Salah satu pemeriksaan yang sampelnya rentan terhadap hemolisis adalah pemeriksaan bilirubin. Hal ini dikarenakan sampel dapat dengan mudah terganggu stabilitasnya maka dari itu perlu dilakukan pemeriksaan dengan segera (Fadhilah, 2019). Pemeriksaan bilirubin ialah salah satu pemeriksaan yang dilakukan untuk mengetahui nilai fungsi hati. Bilirubin terbagi menjadi bilirubin indirek serta bilirubin direk, sedangkan pemeriksaan bilirubin total ialah jumlah dari bilirubin direk serta indirek (Rosida, 2016). Salah satu faktor yang mempengaruhi pemeriksaan bilirubin total adalah terjadinya hemolisis terhadap sampel. Sampel hemolisis secara *in vivo* dapat mengakibatkan peningkatan kadar bilirubin total. Namun sampel hemolisis secara *in vitro* dapat menyebabkan penghambatan pembentukan warna azo oleh aktivitas pseudoperoksidase sehingga terjadi penurunan kadar bilirubin total (Koseoglu et al., 2013)

Pemeriksaan yang dilakukan pada sampel hemolisis dapat diamati secara visual, yaitu menurut densitas warna yang muncul dan masing-masing individu mempunyai perbedaan visualisasi sehingga walaupun menilai tingkat hemolisis spesimen akan memberikan hasil yang sama namun mempunyai kadar hemoglobin yang berbeda-beda (Koseoglu et al., 2013). Hemolisis dapat ditentukan berdasarkan kadar hemoglobin bebas pada serum/plasma menggunakan alat spektrofotometer. Pada penelitian ini, tingkat hemolisis dibagi menjadi tiga yaitu tidak hemolisis (normal plasma) dengan kadar hemoglobin < 0.25 g/L, *insignificant hemolysis* dengan kadar hemoglobin 0.25 – 0.5 g/L, dan *mild hemolysis* dengan kadar hemoglobin 0.5 – 3.0 g/L (Lippi, 2015). Hemolisis ringan mempunyai dampak yang kecil di sebagian besar nilai pemeriksaan daripada hemolisis sedang yang mempengaruhi konstituen sehingga dapat mengubah konsentrasi plasma/serum atau aktivitas komponen tertentu karena terjadinya peningkatan atau penurunan nilai yang disebabkan oleh gradien konsentrasi antara sel dan plasma (Thomas, 2014).

Pada riset yang telah dilakukan oleh (Lippi et al., 2015) dan (Koseoglu et al., 2013) membuat kesimpulan bahwa hasil kadar bilirubin total akan menurun karena dipengaruhi oleh sampel yang hemolisis. Sampel hemolisis ialah faktor utama ketetapan hasil pemeriksaan bilirubin total, namun kerap kali dianggap kurang cukup penting oleh beberapa tenaga laboratorium. Maka dari itu, didasarkan dari latar belakang ini penulis melakukan suatu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui hasil evaluasi pemeriksaan bilirubin total menggunakan model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Kelebihan metode yang digunakan yaitu agar mengetahui model level hemolysis yang masih dapat diterima oleh pemeriksaan bilirubin total, sedangkan kekurangan metode yang digunakan yaitu model level hemolysis belum tentu akan sama oleh parameter pemeriksaan kimia klinik lainnya sehingga harus memperhatikan *interference* kadar hemoglobin yang diperbolehkan pada setiap kit insert parameter pemeriksaan kimia klinik.

METODE

Jenis penelitian ini ialah kuasi eksperimen dengan rancangan penelitian *one group pre and post test design*. *Pre test* merupakan hasil pemeriksaan kadar bilirubin total pada plasma yang tidak ditambah hemolisis, dan *Post test* berupa hasil pemeriksaan kadar bilirubin total pada plasma yang ditambah hemolisis dengan model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* (Destiani & Wiryanti, 2022). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hematologi dan Kimia Klinik Program Studi Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur. Teknik pengambilan sampel yang dilakukan ialah *simple random sampling* dengan sampel spesimen darah normal yang diambil secara acak (Firmansyah & Dede, 2022). Besaran sampel berdasarkan aturan *westgard* yaitu sebanyak 40 sampel (Westgard, 2019). Sebelum dilakukan pengambilan spesimen, kaji etik telah dilakukan dengan hasil layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011 (NO : 47/KEPK-AWS/IV/2013).

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan dengan pembuatan hemolisis. Hemolisis dibuat menggunakan larutan *aquadest*. Perbandingan darah dan *aquadest* adalah 1 : 2. Prosedur pembuatan hemolisis yaitu darah yang telah didapat sebanyak 6 ml pada dua tabung berisi EDTA disentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 1500 rpm. Kemudian plasma dipisahkan dari endapan eritrosit sehingga diperoleh volume sebesar 3 ml plasma dari kedua tabung EDTA. Endapan eritrosit yang diperoleh dilakukan pencucian sebanyak 3 kali menggunakan NaCl 0,9% dengan perbandingan 1 : 1 (satu bagian darah dengan satu bagian NaCl). Setelah dilakukan pencucian eritrosit, diperoleh endapan eritrosit dengan volume sebesar 3 ml dari kedua tabung EDTA. Kemudian ditambahkan 1500 µl *aquadest* pada tabung yang berisi endapan eritrosit dengan perbandingan volume 1 : 2 (satu bagian darah dengan dua bagian *aquadest*). Lalu disentrifuge selama 15 menit pada kecepatan 5000 rpm. Pembuatan hemolisis dilakukan untuk menghasilkan kadar hemolisis yang *insignificant* dan *mild hemolysis*. Setelah itu dilakukan pembuatan *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* dengan penambahan 20 µl dan 80 µl hemolisis yang masing-masingnya ditambah 1000 µl plasma kemudian homogenkan. Sumber prosedur yang dilakukan merupakan modifikasi dari (Atika et al., 2020).

Hasil pembuatan hemolizat divalidasi dengan melakukan pemeriksaan hemoglobin metode *cyanmethemoglobin* untuk menentukan 2 level hemolisis yang berbeda, yaitu *level insignificant* dan *mild hemolysis*. Kadar hemoglobin untuk *level insignificant hemolysis* sebesar 0,25 – 0,5 g/L, dan kadar hemoglobin untuk *level mild hemolysis* sebesar 0,5 – 2,0 g/L. Pada penelitian ini juga dilakukan pengukuran kadar hemoglobin dengan sampel normal plasma sebagai acuan nilai standar dengan kadar hemoglobin sebesar <0,25 g/L (Lippi, 2015). Digunakan level *insignificant* karena menurut (Lippi et al., 2015) menyatakan bahwa sampel hemolisis yang *insignificant* (tidak mengganggu pemeriksaan), maka masih dapat diperiksa dan dikerjakan. Sehingga dilakukan pemeriksaan level *insignificant hemolysis* untuk membuktikan bahwa pada level *insignificant hemolysis* masih dapat diperiksa pada parameter pemeriksaan bilirubin total. Setelah diketahui bahwa level *insignificant* masih dapat diperiksa pada parameter pemeriksaan bilirubin total, lalu dilanjutkan mengukur level *mild hemolysis* sebagai level dengan kadar hemoglobin yang lebih besar daripada *insignificant* untuk membuktikan kembali bahwa level *mild hemolysis* juga memiliki hasil yang masih dapat diperiksa pada pemeriksaan bilirubin total.

Analisa data pada penelitian ini terbagi menjadi analisa secara uji statistik dan uji klinis. Analisa uji statistik dilakukan dengan uji *one-way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kadar bilirubin total menggunakan *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* terhadap *specimen normal plasma*. Kemudian dilakukan analisa uji klinis dengan perhitungan akurasi, presisi, dan *total error* bilirubin total. Hasil uji *Total error* dibandingkan dengan *total error allowable* yang telah ditetapkan oleh CLIA sebesar 20% untuk pemeriksaan bilirubin total.

HASIL

Penelitian dilakukan pada sampel *specimen normal plasma* (sebagai nilai standar) dengan konsentrasi hemoglobin < 0.25 g/L, *insignificant hemolysis* (plasma ditambahkan 20µl hemolizat) dengan kadar hemoglobin 0.25 – 0.5 g/L, dan *mild hemolysis* (plasma ditambahkan 80µl hemolizat) dengan kadar hemoglobin 0.5 – 3.0 g/L. Berdasarkan hasil penelitian, dilakukan perhitungan persentase rata-rata hasil pemeriksaan hemoglobin dan bilirubin total menggunakan model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* sebagai validasi dengan hasil sebagai berikut:

Parameter Pemeriksaan	Level Hemolysis	Interpretasi %	Hasil (%)
Hemoglobin	<i>Insignificant</i>	Kenaikan	123.5
	<i>Mild</i>		447
Bilirubin Total	<i>Insignificant</i>	Penurunan	2.4
	<i>Mild</i>		3.6

Tabel 1 menunjukkan persentase hasil pemeriksaan hemoglobin mengalami kenaikan sebesar 123.5% untuk *specimen insignificant hemolysis* dan 447% untuk *specimen mild hemolysis*, sedangkan persentase hasil pemeriksaan bilirubin total mengalami penurunan sebesar 2.4% untuk *specimen insignificant hemolysis* dan 3.6% untuk *specimen mild hemolysis*. Kemudian dilakukan uji statistik,

seperti pada Tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Hasil uji normalitas

<i>Normality Test</i>			
Shapiro – Wilk			
	Statistic	df	Sig.
HB Normal	.948	40	.063
HB <i>Insignificant Hemolysis</i>	.915	40	.176
HB <i>Mild Hemolysis</i>	.938	40	.316

Tabel 2 menunjukkan hasil uji normalitas dengan nilai Sig. > 0.05 maka itu data berdistribusi secara normal sehingga memungkinkan untuk dilakukan uji *one-way Anova*, seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji *one-way anova* pemeriksaan bilirubin total *specimen insignificant hemolysis*

<i>One-way Anova Test</i>					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.982	31	.064	4.427	.017
Within Groups	.116	8	.014		
Total	2.097	39			

Tabel 4. Hasil uji *one-way anova* pemeriksaan bilirubin total *specimen mild hemolysis*

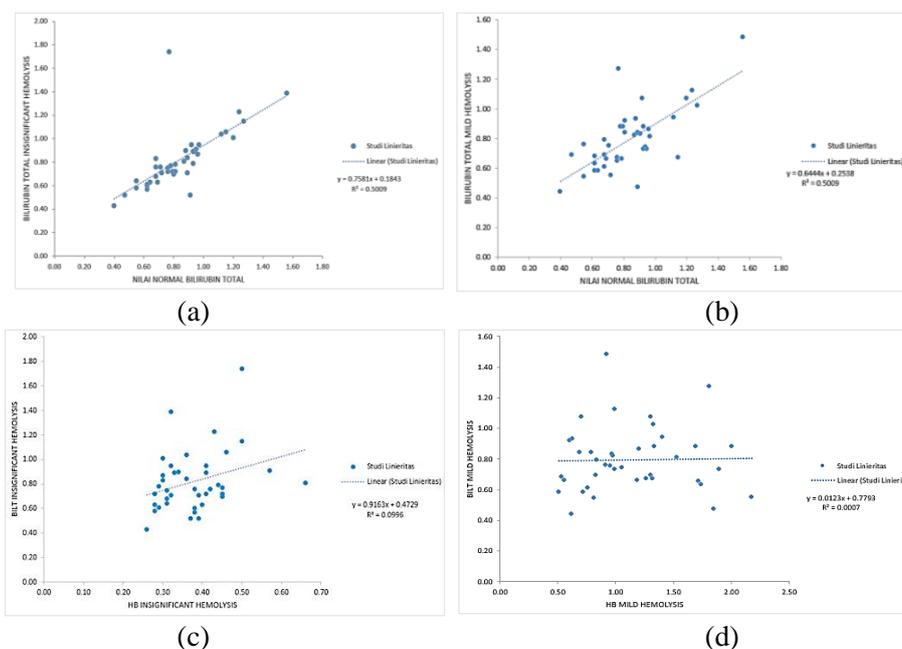
<i>One-way Anova Test</i>					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.938	31	.065	3.653	.023
Within Groups	.159	9	.018		
Total	2.097	39			

Tabel 3 dan 4 menunjukkan hasil uji statistik *one-way Anova* yaitu sig < 0.05 maka dengan demikian H₀ ditolak serta H₁ diterima, yang berarti terdapat perbedaan pemeriksaan kadar bilirubin total dengan menggunakan sampel *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* terhadap sampel *specimen normal plasma*. Selanjutnya dilakukan uji klinis, seperti pada Tabel 5 berikut :

Tabel 5. Hasil uji klinis

<i>Clinical Test</i>				
<i>Level Hemolysis</i>	Bias (%)	CV (%)	TE (%)	TEa (%)
<i>Insignificant Hemolysis</i>	-1.83	22.0	38.1	20
<i>Mild Hemolysis</i>	-4.40	20.6	38.5	20

Tabel 5 menunjukkan nilai bias (akurasi) yang kurang dari nilai bias sebenarnya yaitu 11.4 (Sepulveda, 2013), sedangkan nilai CV (presisi) melebihi nilai CV Max yaitu 7% (Kemenkes RI, 2013), sehingga memperoleh nilai TE > TEa yang berarti terjadi kesalahan sistematis pada penelitian ini. Untuk mengetahui besarnya pengaruh hemolisis pada kadar bilirubin total dilakukannya uji regresi linier, seperti pada Gambar 1 :

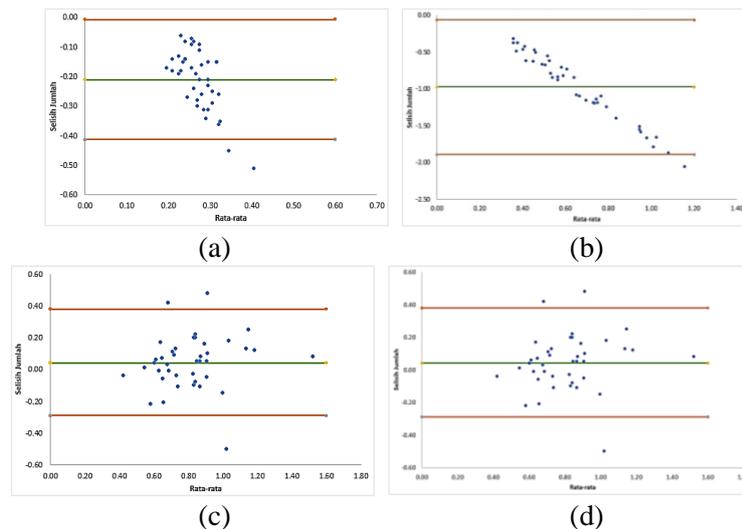


Gambar 1. Regresi Linier (a) Bilirubin Total *Specimen Insignificant Hemolysis*, (b) Bilirubin Total *Specimen Mild Hemolysis* (c) Hemoglobin dan Bilirubin Total *Specimen Insignificant Hemolysis* (d) Hemoglobin dan Bilirubin Total *Specimen Mild Hemolysis*

Gambar 1 (a) dan (b) masing-masingnya menunjukkan nilai $r = 0.70$ hampir mendekati 1 sehingga terdapat korelasi yang kuat antara nilai normal bilirubin total terhadap bilirubin total model *insignificant* dan *mild hemolysis*. Gambar 1 (c) dan (d) masing-masingnya menunjukkan nilai $r = 0.31$ dan 0.26 hampir mendekati 0 sehingga menunjukkan korelasi yang sangat rendah antara kadar hemoglobin dan bilirubin total *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Teruntuk menilai keberterimaan (*agreement*) yang ada diantara 2 metode pengukuran klinis, dilakukannya analisis grafik bland altman.

Pada grafik bland altman menunjukkan hasil analisis dari selisih (*difference*) dengan nilai rata-rata (*mean*) pada parameter pemeriksaan hemoglobin dan bilirubin total *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* terhadap *specimen normal plasma*. Pada grafik tergambaran sebaran plot berupa titik dalam grafik yang merupakan suatu observasi maupun pengamatan diantara 2 metode pengukuran yang dilakukan. Titik tersebut haruslah ada di dalam LOA (*limit of agreement*) dengan interval kesepakatan yakni dengan nilai persentase 95%. Grafik tersebut disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2 (a) Hasil Analisis Grafik Bland Altman Pemeriksaan Hemoglobin *Specimen Insignificant Hemolysis*, garis hijau menyatakan bias (*mean difference*) dengan jumlah sebesar -0.21 . Dua garis merah pada grafik menyatakan *Upper Limit* dan *Lower Limit*. Diperoleh *upper limit* dengan jumlah sebesar -0.007 serta *lower limit* dengan jumlah sebesar -0.412 . Berdasarkan pada grafik terdapat dua pengamatan atau titik yang terletak di luar *lower limit*.



Gambar 2. Grafik Bland Altman (a) Hemoglobin *Specimen Insignificant Hemolysis*, (b) Hemoglobin *Specimen Mild Hemolysis*, (c) Bilirubin Total *Specimen Insignificant Hemolysis*, (d) Bilirubin Total *Specimen Mild Hemolysis*

Gambar 2 (b) Hasil Analisis Grafik Bland Altman Pemeriksaan Hemoglobin *Specimen Mild Hemolysis*, garis hijau menyatakan bias (*mean difference*) dengan jumlah sebesar -0.97. Dua garis merah pada grafik menyatakan *Upper Limit* dan *Lower Limit*. Diperoleh *upper limit* dengan jumlah -0.058 serta *lower limit* dengan jumlah sebesar -1.884. Berdasarkan pada grafik ditemukan satu pengamatan atau titik yang terletak di luar dari *lower limit*.

Gambar 2 (c) Hasil Analisis Grafik Bland Altman Pemeriksaan Bilirubin Total *Specimen Insignificant Hemolysis*, garis hijau menyatakan bias (*mean difference*) dengan jumlah sebesar 0.02. Dua garis merah pada grafik menyatakan *Upper Limit* serta *Lower Limit*. Didapatkan hasil nilai dari *upper limit* dengan jumlah sebesar 0.379 serta *lower limit* dengan jumlah sebesar -0.343. Berdasarkan pada grafik terdapat dua pengamatan maupun titik yang melebihi batas *upper limit* serta satu pengamatan atau titik yang melebihi batas *lower limit*.

Gambar 2 (d) Hasil Analisis Grafik Bland Altman Pemeriksaan Bilirubin Total *Specimen Mild Hemolysis*, garis hijau menyatakan bias ataupun (*mean difference*) dengan jumlah sebesar 0.04. Dua garis merah pada grafik menyatakan *Upper Limit* serta *Lower Limit*. Didapatkan hasil nilai dari *upper limit* berjumlah sebesar 0.378 serta *lower limit* dengan jumlah -0.290. Berdasarkan pada grafik ditemukan dua pengamatan maupun titik yang terletak di luar *upper limit* serta terdapat satu pengamatan maupun titik yang terletak di luar *lower limit*.

BAHASAN

Persentase rata-rata hasil pemeriksaan hemoglobin pada Tabel 1 mengalami kenaikan, hal ini dikarenakan salah satu sebab terjadinya hemolisis adalah dengan adanya penambahan larutan hipotonis berupa *aquadest* secara sengaja pada sampel darah untuk membuat hemolisis, sehingga larutan tersebut masuk ke dalam sel darah merah dengan cara melalui membran semipermeabel yang membuat sel darah merah menjadi bengkak dan mengalami hemolisis atau pecah. Pecahnya membran sel darah merah ini

mengakibatkan lepasnya hemoglobin ke dalam media di sekelilingnya sehingga menyebabkan kenaikan kadar hemoglobin dari setiap level (Kahar, 2017; Koseoglu et al., 2013). Data yang diperoleh sejalan pada hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Juni Ni pada Tahun 2020 mengenai “*A reference chart for clinical biochemical test of hemolyzed samples*” bahwa rata-rata hasil kadar pemeriksaan hemoglobin mengalami peningkatan sesuai dengan indeks hemolisis yaitu tidak hemolisis, hemolisis ringan, hemolisis sedang, dan hemolisis berat. Dilakukan pemeriksaan hemoglobin sebagai validasi model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*.

Persentase rata-rata hasil pemeriksaan bilirubin total berdasarkan Tabel 1 mengalami penurunan, dikarenakan terhambatnya pembentukan warna azo sebagai akibat aktivitas pseudoperoxidase dari hemoglobin. Persentase penurunan kadar bilirubin total tergantung kadar hemolisis yang ditambahkan ke dalam plasma (Koseoglu et al., 2013) sehingga semakin tinggi level hemolisis berdasarkan kadar hemoglobin yang didapat, maka memiliki hasil kadar bilirubin total yang semakin rendah palsu. Data ini sejalan pada hasil riset yang sudah dilakukan oleh (Thomas, 2014) dengan judul “*Haemolysis as influence & interference factor*” bahwa hasil rata-rata pemeriksaan bilirubin total setelah menggunakan sampel yang hemolisis akan mengalami konsentrasi rendah palsu.

Hasil uji statistik yang didapat berdasarkan Tabel 2 bahwasanya keseluruhan data hasil penelitian terdistribusi secara normal sehingga memungkinkan untuk dilanjutkan pada uji statistik *one-way Anova*. Hasil uji *one-way anova* berdasarkan Tabel 3 dan 4 bahwa pemeriksaan bilirubin total *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* terdapat perbedaan pemeriksaan kadar bilirubin total dengan menggunakan sampel *specimen normal plasma*, *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Menurut (Koseoglu et al., 2013) menyatakan bahwa sel darah merah (eritrosit) yang pecah menyebabkan hemoglobin bebas masuk ke serum/plasma sehingga mengakibatkan terjadinya perubahan warna serum/plasma yang menyebabkan gangguan penyerapan warna pada analisa fotometri sehingga berpengaruh pada hasil pemeriksaan bilirubin total.

Hasil uji klinis pada Tabel 5 didapat dari perhitungan akurasi, presisi, dan *total error* pada pemeriksaan bilirubin total. Diperoleh hasil nilai uji akurasi yang mengalami penurunan dari nilai sebenarnya (Sepulveda, 2013) sesuai dengan hasil persentase rata-rata pemeriksaan bilirubin total yang mengalami penurunan pada Tabel 1, namun terdapat perbedaan nilai presisi dan *total error* yang lebih besar daripada nilai standar presisi (Siregar et al., 2018) dan nilai *total error allowable* (CLIA) pada pemeriksaan bilirubin total *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Hal ini dikarenakan terjadinya kesalahan sistematik yaitu dengan pembuatan hemolisis secara sengaja menggunakan *aquadest* sehingga sampel menjadi hemolisis. Berdasarkan hasil penelitian Mahdiah Syumarliyanty pada Tahun 2020 dengan judul “Evaluasi Analitik Hematology Analyzer Diatron Abacus 3 pada Parameter Hematologi Rutin di Laboratorium Hematologi Poltekkes Kemenkes Kalimantan Timur” bahwa dari perhitungan akurasi (d%) dan impresisi (CV%) didapatkan hasil yang lebih besar atau tidak sesuai dengan kit insert Abacus 3, hal tersebut dikarenakan terjadinya kesalahan sistematik. Salah satu faktor yang menyebabkan nilai presisi melebihi batas maksimal yaitu pada teknik prosedur pemeriksaan.

Setelah diketahui *total error* yang didapat melebihi *total error allowable* yang telah ditentukan, kemudian dilakukan uji regresi linier untuk mengetahui besarnya pengaruh hemolisis terhadap kadar bilirubin total. Berdasarkan Gambar 1 (a) dan (b), didapatkan hasil yang menunjukkan kolerasi kuat antara nilai normal bilirubin total terhadap bilirubin total *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Sedangkan berdasarkan Gambar 1 (c) dan (d), didapatkan hasil yang menunjukkan korelasi sangat rendah antara kadar bilirubin total dan kadar hemoglobin *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*.

Analisis grafik bland altman juga digunakan pada penelitian ini untuk menilai kecocokan dua pengukuran menggunakan perbedaan rata-rata dengan hasil bias yang mungkin terjadi, dan untuk memperkirakan interval kesepakatan yang dikenal sebagai LOA (*limit of agreements*). Pada hasil grafik didapat sebaran plot X dan Y, yaitu perbedaan antara dua pasang pengukuran pada plot terhadap rata-rata dari kedua pengukuran tersebut. Analisis ini merekomendasikan bahwa 95% titik data berada dalam ± 2 detik dari *mean difference* (perbedaan rata-rata). Metode ini hanya menunjukkan interval pencocokan tanpa menentukan apakah pembatasan dapat diterima. Batas yang dapat diterima harus ditetapkan berdasarkan keperluan klinis, peninjauan biologis, atau tujuan lainnya (Giavarina, 2015).

Grafik analisis bland altman menunjukkan hubungan antara selisih pengukuran dan rata-rata dari setiap pemeriksaan yang dilakukan. Grafik tersebut memiliki garis hijau yang menunjukkan bias atau *mean difference* (perbedaan rata-rata), dan dua garis merah menunjukkan *upper limit* dan *lower limit*. Batas kesepakatan digunakan sebagai 1.96 (95% *Z-score*), *upper limit* dan *lower limit* dihitung dengan mengalikan standar deviasi dengan $1.96 \pm$ dari perbedaan rata-rata. Grafik ini menyajikan plot distribusi berupa titik dalam grafik yang menggambarkan pengamatan antara dua metode pengukuran yang digunakan. Jika titik-titik tersebut terletak di dalam *upper limit* dan *lower limit* berarti terdapat pengamatan yang sama antara kedua metode pengukuran tersebut. Jika titik terletak di luar *upper limit* dan *lower limit* berarti terdapat pengamatan yang berbeda atau dianggap sebagai outlier. Outlier yang diamati tidak boleh melebihi dua titik atau plot dari setiap *upper limit* dan *lower limit*. Outlier yang tidak melebihi dua titik atau plot dari setiap *upper* dan *lower limit* maka masih masuk dalam kriteria atau keberterimaan. Berdasarkan Gambar 2, Hasil analisis grafik bland altman pada setiap pengukuran dua metode yang berbeda seperti pemeriksaan hemoglobin *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*, pemeriksaan bilirubin total *specimen specimen insignificant* dan *mild hemolysis* didapatkan hasil bahwa terdapat melebihi dua titik atau plot yang berada diluar *upper limit* maupun *lower limit* yang disebut sebagai outlier, sehingga tidak masuk dalam kriteria atau keberterimaan.

Dari seluruh data yang didapat pada evaluasi pemeriksaan bilirubin total model *specimen insignificant* dan *mild hemolysis* terhadap *specimen normal plasma* (sebagai nilai standar pengukuran) didapatkan hasil secara visual *specimen insignificant hemolysis* berwarna merah muda dan *specimen mild hemolysis* berwarna merah yang lebih gelap daripada *specimen insignificant hemolysis*, dengan rata-rata nilai hemoglobin yang mengalami peningkatan, sedangkan rata-rata nilai bilirubin total mengalami penurunan dari setiap levelnya, sehingga semakin tinggi level hemolysis berdasarkan kadar hemoglobin yang diperoleh, maka memiliki hasil kadar bilirubin total yang semakin rendah palsu. Hal

ini dikarenakan adanya aktivitas psudoperoxidase hemoglobin yang menghambat pembentukan warna azo. Pada penelitian ini didapatkan kadar maksimal hemoglobin yang lebih kecil yaitu 1.14 g/L daripada batas *interference* berdasarkan (G. Diagnostics, 2023) kit insert pemeriksaan bilirubin total yaitu 16 g/L, maka dengan penambahan hemolisis sebesar 80 µl pada 1000 µl plasma yang secara visual menghasilkan warna merah pada *specimen mild hemolysis* ini masih dapat digunakan pada parameter pemeriksaan bilirubin total.

Pada penelitian ini digunakan analisis data statistik dengan hasil yang berdistribusi normal sehingga dilanjutkan pada uji *One-way Anova* dengan hasil terdapat perbedaan kadar bilirubin total menggunakan *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Dilakukan uji klinis untuk mengetahui perbedaan lain yang terjadi dengan menghitung nilai akurasi, presisi dan *total error* yang didapat dengan hasil nilai akurasi pemeriksaan mengalami penurunan sehingga sesuai pada hasil persentase rerata pemeriksaan bilirubin total yang juga mengalami penurunan, namun terdapat perbedaan nilai presisi dan *total error* yang lebih besar daripada nilai standar presisi dan nilai *total error allowable* pada pemeriksaan bilirubin total *specimen insignificant* dan *mild hemolysis*. Hal ini dikarenakan terjadinya kesalahan sistematik yaitu dengan pembuatan hemolisis secara sengaja menggunakan *aquadest* sehingga sampel menjadi hemolisis, dengan demikian hasil dari uji regresi linier menunjukkan pengaruh yang cukup lemah antara variasi hemoglobin dan kadar bilirubin total namun menunjukkan pengaruh yang kuat pada nilai normal bilirubin total terhadap bilirubin total model *insignificant* dan *mild hemolysis*, dan pada grafik bland altman tidak masuk dalam kriteria atau keberterimaan.

SIMPULAN DAN SARAN

Pada penelitian ini terdapat perbedaan statistik yang dilakukan perhitungan hasil statistik uji *one-way Anova*, dan terdapat perbedaan nilai klinis yang dilakukan dengan perhitungan akurasi, presisi (CV%), dan Total Error (TE%). Saran pada penelitian ini adalah pemeriksaan bilirubin total tidak dapat dilakukan pada sampel dengan *level hemolysis* yang sangat rendah, khususnya nilai bilirubin total yang mendekati nilai tidak normal.

RUJUKAN

Adiga, U. S., & Yogish, S. (2019). Hemolytic Index: A Tool to Measure Hemolysis In Vitro. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*, 2(2), 49–52. www.iosrjournals.org

Atika, I., Rahmawati, I., & Anggraeni, N. (2020). Pengolahan Serum Hemolisis Menggunakan Reagen Anti-Rh Pada Pemeriksaan Glukosa Darah Metode GOD-PAP. *Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)*, 7(2), 93. <https://doi.org/10.32807/jambs.v7i2.185>

Destiani, D., & Wiryanti, W. (2022). *Perhitungan Indeks Hemolisis Pada Pemeriksaan Kolesterol Total Metode Kolesterol Oksidase Para Amino Phenazon*.

Diagnostics, G. (2017). *Kit Insert Bilirubin (Total and Direct)*. Glory Diagnostics.

- Fadhilah, F. (2019). Pengaruh Lamanya Pencahayaan Terhadap Kadar Bilirubin Total Metode Kolorimetric Diazo. *Klinikal Sains: Jurnal Analisis Kesehatan*, 7(1), 1–7. https://doi.org/10.36341/klinikal_sains.v7i1.597
- Firmansyah, D., & Dede. (2022). Teknik Pengambilan Sampel Umum dalam Metodologi Penelitian: Literature Review. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Holistik (JIPH)*, 1(2), 85–114. <https://doi.org/10.55927/jiph.v1i2.937>
- Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman Analysis. *Biochemia Medica*, 19(1), 10–16.
- Kahar, H. (2017). Pengaruh Hemolisis Terhadap Kadar Serum Glutamate Pyruvate Transaminase (SGPT) Sebagai Salah Satu Parameter Fungsi Hati. *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*, 1(1), 38. <https://doi.org/10.30651/jmlt.v1i1.981>
- Kemendes RI. (2013). *Pedoman Pemeriksaan Kimia Klinik* (p. 18). Direktorat Bina Pelayanan Penunjang Medik Dan Sarana Kesehatan Direktorat Jenderal Bina Upaya Kesehatan.
- Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A., & Çuhadar, S. (2013). Effects of Hemolysis Interferences On Routine Biochemistry Parameters. *Biochemia Medica*, 21(1), 79–85.
- Lippi, G. (2015). Systematic Assessment of the Hemolysis Index: Pros and Cons. In *Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 71). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.05.002>
- Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A. J., & Plebani, M. (2015). Hemolysis: An Overview of the Leading Cause of Unsuitable Specimens in Clinical Laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(6), 764–772. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.170>
- Risa, W. (2017). Analisis Pemantapan Mutu Internal Pemeriksaan Trombosit di Instalasi Laboratorium RSUD Sultan Imanuddin Pangkalan Bun. *Borneo Cendekia*. <https://doi.org/10.54411/jbc.v1i1.188>
- Riviana, O., Sistiyono, & Nuryani, S. (2019). Pengaruh Kadar Hemoglobin Dalam Serum Terhadap Hasil Pemeriksaan dan Kadar Albumin. *JlabMed*, 3, 36–40.
- Rosida, A. (2016). Pemeriksaan Laboratorium Penyakit Hati. *Berkala Kedokteran*, 12(1), 123. <https://doi.org/10.20527/jbk.v12i1.364>
- Sepulveda, J. L. (2013). Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction, Second Edition. In *Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction, Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-04205-5>
- Siregar, M. T., Sriwulan, W. S., Setiawan, D., & Nuryati, A. (2018). *Kendali Mutu*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Thomas, L. (2014). Haemolysis as Influence & Interference Factor. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 13(4), 95–98.
- Wahyu Wijayati, R. P., & Ayuningtyas, D. (2021). Identifikasi Waste Tahap Pra Analitik dengan Pendekatan Lean Hospital di Laboratorium Patologi Klinik RS XYZ Depok Jawa Barat Tahun 2021. *Jurnal Manajemen Kesehatan Indonesia*, 9(2), 101–112. <https://doi.org/10.14710/jmki.9.2.2021.101-112>
- Westgard, J. O. (2019). *Basic Method Validation: The Comparison of Methods Experiment*. <http://www.westgard.com>.