



PERHITUNGAN INDEKS HEMOLISIS PADA PEMERIKSAAN KOLESTEROL TOTAL METODE CHOLESTEROL OKSIDASE PARA AMINO PHENAZON

Deska Destiani ¹, Wiwin Wiryanti ^{2*}

^{1,2*} Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Bandung, Jawa Barat, Indonesia
e-Mail: wiryantiwiwin@gmail.com

Abstract

Hemolysis index (HI) is a (semi) quantitative estimate of free hemoglobin and provides a marker or warning of hemolytic disorders. Management of hemolysis samples should be carried out by each laboratory to determine the hemolysis index of each analyte in each parameter clinical chemistry because its value depends on the method and instrument. The purpose of this study was to determine the hemolysis index in total cholesterol examination using the method Cholesterol Oxidase Para Amino Phenazon (CHOD-PAP). The type of research used is a quasi-experimental study with 25 research units with the criteria of cholesterol levels <200 mg/dL, not hemolysis, not lipemic, and not icteric. Each research unit was added with hemolysate with hemoglobin levels of 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL and 600 mg/dL. Based on the GLM repeated measured test, the value $sig > 0.05$, which means that there is no significant difference between total cholesterol levels and varying hemoglobin levels. Based on a different test with %TE total cholesterol obtained compared to %TEa that has been determined by CLSI, which is 10%, it shows that total cholesterol levels are affected if the hemoglobin level is 400 mg/dL. Suggestions from this study need to calculate the total cholesterol hemolysis index using the CHOD-PAP method on pathological samples and other clinical chemical parameters.

Key words: Hemolysis Index, Total Cholesterol Level, Hemolysate, %TE, %TE key word

Abstrak

Indeks hemolisis (HI) adalah perkiraan (semi) kuantitatif dari hemoglobin bebas dan memberikan penanda atau peringatan terhadap gangguan hemolisis. Pengelolaan sampel hemolisis sebaiknya dilakukan oleh masing-masing laboratorium untuk mengetahui indeks hemolisis pada setiap analit di setiap parameter kimia klinik karena nilainya bergantung pada metode dan instrument. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui indeks hemolisis pada pemeriksaan kolesterol total metode Cholesterol Oksidase Para Amino

Phenazon (CHOD-PAP). Jenis penelitian yang digunakan adalah quasi eksperimen dengan 25 unit penelitian dengan kriteria kadar kolesterol <200 mg/dL, tidak hemolisis, tidak lipemik, dan tidak ikterik. Setiap unit penelitian ditambahkan hemolisis dengan kadar hemoglobin 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL dan 600 mg/dL. Berdasarkan uji GLM repeated measured didapatkan nilai sig > 0,05 yang artinya tidak ada perbedaan yang signifikan kadar kolesterol total dengan kadar hemoglobin yang bervariasi. Berdasarkan uji beda dengan %TE kolesterol total yang didapatkan dibandingkan dengan %TEa yang telah ditetapkan CLSI yaitu 10%, menunjukkan kadar kolesterol total dipengaruhi jika kadar hemoglobin \geq 400 mg/dL. Saran dari penelitian ini perlu dilakukan perhitungan indeks hemolisis kolesterol total metode CHOD-PAP pada sampel patologis dan parameter kimia klinik lainnya.

Kata kunci: Indeks Hemolisis, Kadar Kolesterol Total, Hemolisis, %TE, %TEa

PENDAHULUAN

Pemantapan mutu internal pada pemeriksaan laboratorium terdiri dari tiga tahap yaitu pra analitik, analitik dan pasca analitik (Menkes RI, 2013). Kesalahan dalam tahap pra analitik menjadi penyebab 50%-75% dari semua kesalahan laboratorium termasuk kesalahan identifikasi dan masalah sampel (Plebani et al., 2014). Salah satu jenis sampel yang sering diperiksa di laboratorium yaitu serum, serum yang dipakai harus memenuhi syarat yaitu tidak boleh ikterik atau hemolisis (Menkes RI, 2013).

Hemolisis adalah proses patologis pecahnya sel darah merah yang biasanya disertai dengan berbagai derajat semburat merah ke dalam serum setelah spesimen disentrifugasi (Lippi et al., 2011). Hemolisis dapat terjadi secara *in vivo* atau *in vitro*. Hemolisis *in vitro* merupakan penyebab kesalahan pra analitik yang paling umum dan >60% menjadi alasan penolakan sampel.

Hemolisis memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pemeriksaan darah rutin, hemolisis juga memberikan efek yang berbeda pada setiap analit kimia karena menyebabkan peningkatan atau penurunan konsentrasi analit tergantung arah bias dan besarnya bias (Peng, et al, 2019, Simundic et al., 2020).

Indeks hemolisis (HI) adalah perkiraan (semi) kuantitatif dari hemoglobin bebas dan memberikan penanda atau peringatan terhadap gangguan hemolisis (Smith et al., 2012). Indeks hemolisis dapat ditransmisikan ke dalam sistem informasi laboratorium (LIS) melalui *middleware*. Batas indeks hemolisis yang

menunjukkan gangguan signifikan secara klinis harus dicatat karena akan berpengaruh terhadap aturan keputusan dan tindakan yang akan diambil ketika hasil tes dikeluarkan (Dolci & Panteghini, 2014). Pengelolaan sampel hemolisis sebaiknya dilakukan oleh masing-masing laboratorium untuk mengetahui indeks hemolisis pada setiap analit di setiap parameter analitik karena nilainya bergantung pada metode dan instrument (von Meyer et al., 2018). Perhitungan indeks hemolisis pada pemeriksaan kolesterol total metode CHOD-PAP belum dilakukan. Pemeriksaan kolesterol total metode CHOD-PAP tidak dipengaruhi oleh hemoglobin hingga kadar 499.5 mg/dL (Biolabo, 2019). Hemolisis dapat mengganggu pemeriksaan kolesterol total metode CHOD-PAP karena adanya dekomposisi hemoglobin dari hidrogen peroksida (Koseoglu et al., 2011).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin melakukan penelitian mengenai “Perhitungan Indeks Hemolisis Pada Pemeriksaan Kolesterol Total Metode CHOD-PAP”.

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi: S spuit 5 mL, *tourniquet*, tabung reaksi kecil, tabung reaksi besar, rak tabung reaksi kecil, rak tabung reaksi besar, sentrifuge, vortex, mikropipet (5-50 μL , 10-100 μL , dan 1000 μL), aliquot, tip kuning, tip biru, fotometer, pipet tetes, dan tabung sentrifuge.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi: Serum, darah EDTA, toluene, reagen drabkin's, kontrol serum, NaCl 0,9 %, aquades, reagen kolesterol total dan kertas saring whatmann No.1.

Metoda

Jenis penelitian yang digunakan adalah *quasi eksperimen*. Penelitian ini menghitung indeks hemolisis pada pemeriksaan kadar kolesterol total dalam serum dengan membandingkan kelompok eksperimen dan kelompok kontrol (tidak ditambah hemolizat). Kelompok kontrol merupakan serum yang tidak ditambah hemolizat (0 mg/dL), sedangkan kelompok eksperimen merupakan serum yang telah ditambah hemolizat dengan kadar hemoglobin 300 mg/dL,

400 mg/dL, 500 mg/dL dan 600 mg/dL.

Unit penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah serum normal yang memiliki kriteria inklusi kadar kolesterol normal, serum tidak hemolisis, tidak lipemik, tidak ikterik dan serum dimodifikasi dengan penambahan hemolisat serta memiliki kriteria eksklusi kadar kolesterolnya melebihi nilai normal.

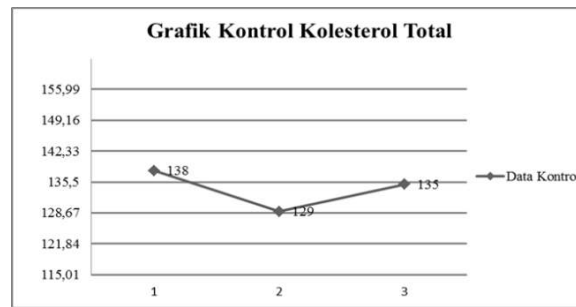
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung dan waktu penelitiannya dilaksanakan pada bulan Februari - Juni 2021.

Data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer, yaitu data yang didapatkan dari hasil pemeriksaan kadar kolesterol total serum normal (kontrol), dan serum hemolisis (dengan penambahan hemolisat) dengan kadar hemoglobin 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, dan 600 mg/dL. Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan dilakukan uji statistika GLM (*Generalized Linear Model*) *repeated measured* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan diantara masing-masing perlakuan. Kemudian dilakukan uji beda %TE kolesterol total yang didapatkan dengan %TEa yang ditetapkan CLSI. Uji beda dilakukan dengan menghitung Mean dan SD, kemudian dilakukan penentuan indeks hemolisis dengan perhitungan %Bias dan %CV untuk menentukan %TE.

HASIL

Sebelum melakukan pemeriksaan terhadap sampel, dilakukan Quality Control (QC) dengan pemeriksaan kontrol serum. Untuk kepentingan penelitian bahwa penerimaan hasil kontrol serum jika berada pada range $\pm 1SD$. Gambar 1 menunjukkan grafik hasil pemeriksaan kontrol serum level normal pada

pemeriksaan kolesterol total metode CHOD-PAP.



Gambar 1. Grafik Pemeriksaan Kolesterol Total pada Kontrol Serum

Penelitian dilakukan terhadap serum normal yang sesuai dengan kriteria inklusi yaitu kadar kolesterol normal, serum tidak hemolisis, tidak lipemik, tidak ikterik dan memiliki kriteria eksklusi kadar kolesterolnya melebihi nilai normal yaitu >200 mg/dL.

Sampel yang telah didapatkan diberikan sejumlah zat pengganggu yaitu hemolisis dalam bentuk hemolizat. Sampel dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan (tidak ditambah hemolizat), sedangkan kelompok eksperimen adalah kelompok yang diberi perlakuan dengan penambahan hemolizat dalam berbagai kadar hemoglobin. Kadar Hemoglobin Campuran antara Serum dengan Hemolizat yang diperiksa menggunakan metode *cyanmethemoglobin* terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Kadar Hemoglobin Campuran antara Serum dengan Hemolizat

Sampel	I	II	III	IV	V
	0 mg/dL	0 mg/dL	0 mg/dL	0 mg/dL	0 mg/dL
	300 mg/dL	300 mg/dL	300 mg/dL	300 mg/dL	300 mg/dL
	400 mg/dL	400 mg/dL	400 mg/dL	400 mg/dL	400 mg/dL
	500 mg/dL	500 mg/dL	500 mg/dL	500 mg/dL	500 mg/dL
	600 mg/dL	600 mg/dL	600 mg/dL	600 mg/dL	600 mg/dL

Pengujian dilakukan dengan memberikan sejumlah zat pengganggu yaitu hemolizat pada serum. Kadar hemoglobin yang diberikan yaitu 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL dan 600 mg/dL. Hasil pemeriksaan kolesterol total pada sampel terdapat pada tabel 2, untuk setiap kelompok Sig. $> 0,05$ sehingga dapat

disimpulkan bahwa data hasil penelitian berdistribusi normal sehingga memungkinkan untuk dilakukan uji *GLM repeted measured*.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Kolesterol Total Metode CHOD-PAP

Perlakuan	Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total (mg/dL) pada Serum dengan Berbagai Variasi Kadar Hemoglobin				
	0 (mg/dL)	300 (mg/dL)	400 (mg/dL)	500 (mg/dL)	600 (mg/dL)
1.	165	166	169	162	166
2.	170	165	172	176	185
3.	153	160	165	172	172
4.	160	165	166	169	166
5.	153	147	153	153	147

Sebelum data yang diperoleh diolah, sebelumnya dilakukan uji normalitas karena uji statistik yang digunakan adalah *GLM (Generalized Linear Model) repeted measured* sehingga data diharuskan berdistribusi normal. Hasil uji normalitas terdapat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Normalitas

Tests of Normality			
Shapiro-Wilk			
	Statistic	Df	Sig.
Kadar Hb U mg/dL	.904	5	.435
Kadar Hb 300 mg/dL	.756	5	.034
Kadar Hb 400 mg/dL	.880	5	.309
Kadar Hb 500 mg/dL	.952	5	.749
Kadar Hb 600 mg/dL	.950	5	.736

Hasil output uji normalitas menunjukkan bahwa data tersebut semua data tersebut semua data untuk setiap kelompok Sig. > 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data hasil penelitian berdistribusi normal sehingga memungkinkan untuk dilakukan uji *GLM repeted measured*. Hasil uji *GLM repeted measured* terdapat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Statistik Perbedaan Kadar Kolesterol Total pada Uji GLM

Tests of Within-Subjects Contrasts						
Source	factor1	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
factor1	Level 2 vs. Level 1	.800	1	.800	.024	.885
	Level 3 vs. Level 1	115.200	1	115.200	5.434	.080
	Level 4 vs. Level 1	192.200	1	192.200	2.608	.182
	Level 5 vs. Level 1	245.000	1	245.000	2.367	.199
	ERROR (factor1)	Level 2 vs. Level 1	135.200	4	33.800	
	Level 3 vs. Level 1	84.800	4	21.200		
	Level 4 vs. Level 1	294.800	4	73.700		
	Level 5 vs. Level 1	414.000	4	103.500		

Hasil output uji *GLM repeated measured* menunjukkan bahwa Hasil analisis nilai output Sig. >0,05 maka H_0 diterima dan H_1 ditolak, artinya tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik pada pemeriksaan kadar kolesterol total pada sampel dengan kadar hemoglobin 0 mg/dL, 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL dan 600 mg/dL.

Selanjutnya dilakukan uji beda %TE kolesterol total yang didapatkan dengan %TEa yang ditetapkan CLSI. Hasil uji beda pemeriksaan kadar kolesterol total pada sampel dengan kadar hemoglobin 0 mg/dL, 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL dan 600 mg/dL dapat dilihat pada tabel 5.

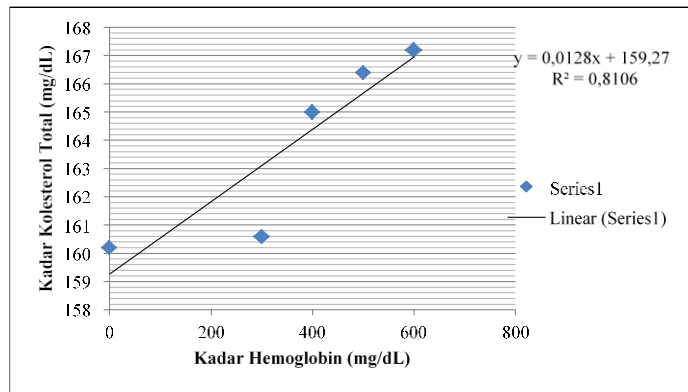
Tabel 5. Hasil Uji beda %TE dengan %TEa

No	Kadar Hemoglobin	Mean	SD	%CV	%Bias	%TE	%TEa
1.	0 mg/dL	160,2					
2.	300 mg/dL	160,6	7,9	4,9	0,2	9,9	10
3.	400 mg/dL	165	7,2	4,3	2,9	11,5	10
4.	500 mg/dL	166,4	9,0	5,4	3,8	14,5	10
5.	600 mg/dL	167,2	13,7	8,1	4,3	20,4	10

Data pada tabel 5 merupakan hasil uji beda %TE dengan %TEa. Pada tabel terdapat %TE yang mengganggu pemeriksaan kolesterol total. Pemeriksaan kolesterol total akan terganggu jika diperoleh %TE > %TEa. %TEa kolesterol total

yaitu 10% sehingga jika dilihat dari tabel 5, kadar kolesterol total dipengaruhi oleh hemoglobin mulai kadar 400 mg/dL.

Untuk melihat besarnya pengaruh hemolisis terhadap kadar kolesterol total, dilakukan uji regresi linier. Adapun regresi linier yang didapat dari hasil pemeriksaan rata-rata sampel terdapat pada gambar 2.



Gambar 2. Regresi Linier Pemeriksaan Kolesterol Total

DISKUSI

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan darah untuk pembuatan hemolisis buatan berupa hemolizat. Dalam studi interferensi hemolisis terdapat beberapa metode untuk membuat hemolisis buatan yaitu metode pembekuan-cairan, syok osmotik dan tegangan geser. Pembuatan hemolisis buatan pada penelitian ini menggunakan metode syok osmotik yang dimulai dengan pencucian sel darah merah murni kemudian dilisiskan dengan aquabidest (Marques-Garcia, 2020).

Hemolisis adalah penyebab paling umum dari kesalahan hasil pemeriksaan laboratorium salah satunya pada pemeriksaan kolesterol total. Pengukuran kadar kolesterol total pada penelitian ini menggunakan metode CHOD-PAP dengan alat fotometer.

Gangguan hasil pemeriksaan kadar kolesterol total disebabkan karena adanya hemoglobin dalam serum sehingga menyebabkan perubahan warna yang disebut gangguan kromorfik (Howanitz, et al., 2015).

Reaksi pada pemeriksaan kolesterol total akan membentuk kompleks warna merah muda, sedangkan adanya hemoglobin dalam serum yang berwarna

merah muda sampai merah akan mempengaruhi kompleks reaksi warna tersebut. Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total dibaca berdasarkan warna yang diserap pada analisa fotometri. Gangguan hasil pemeriksaan kolesterol total juga disebabkan karena keberadaan hemoglobin dalam serum yang mengganggu reaksi dengan cara mendekomposisi dini hidrogen peroksida sebagai kromogen, sehingga terbentuknya warna tidak sempurna yang dapat menyebabkan kenaikan kadar kolesterol total (Koseoglu et al., 2011).

Gangguan pada pemeriksaan kolesterol total dengan adanya hemoglobin dalam serum juga dapat disebabkan oleh gangguan spektrofotometri. Pemeriksaan Kolesterol total diukur pada panjang gelombang 500 nm sedangkan hemoglobin menyerap kuat pada 415 nm (panjang gelombang Soret) dan pada panjang gelombang yang lebih rendah antara 530 dan 600 nm, memiliki dua puncak pada 540 dan 570 nm sehingga hemoglobin dapat sangat mengganggu pemeriksaan yang mencakup pengukuran pada panjang gelombang tersebut (Lippi, et al, 2012).

Indeks hemolisis (HI) adalah perkiraan (semi) kuantitatif dari hemoglobin bebas dan memberikan penanda atau peringatan terhadap gangguan hemolisis (Smith et al., 2012). Interferensi gangguan yang disebabkan oleh serum hemolisis biasanya telah disisipkan oleh pabrikan, namun pengelolaan sampel hemolisis sebaiknya dilakukan oleh masing-masing laboratorium untuk mengetahui indeks hemolisis pada setiap analit di setiap parameter karena nilainya bergantung pada metode dan instrument (Lippi et al., 2011, von Meyer et al., 2018).

Jika ditinjau secara klinis pemeriksaan kolesterol total metode CHOD-PAP sudah mulai terganggu oleh hemoglobin mulai kadar 400 mg/dL. Syarat kualitas pemeriksaan yang tepat telah diatur oleh CLIA yang menetapkan kesalahan maksimal (total error) masih dapat ditoleransi. Berdasarkan CLIA, %TEa pemeriksaan kolesterol total adalah 10%. Pemeriksaan akan terganggu jika diperoleh %TE > %Tea.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Koseoglu, et,al., yang menyimpulkan bahwa hemolisis mempengaruhi kadar kolesterol total. Hasil pemeriksaan kadar kolesterol total memberikan perbedaan yang

signifikan pada kadar hemoglobin 2,5 g/L dalam serum (Koseoglu, et al., 2011).

Dari hasil penelitian ini juga didapatkan hasil korelasi antara variasi konsentrasi hemoglobin dan kadar kolesterol total dengan melihat koefisien korelasi (r). Koefisien korelasi hemolisis terhadap kadar kolesterol total pada nilai rata-rata sampel sebesar 0.900, dengan begitu dapat dikatakan bahwa korelasinya kuat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat diambil kesimpulan bahwa indeks hemolisis pada pemeriksaan kolesterol total metode CHOD-PAP adalah 400 mg/dL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Seluruh Civitas Akademika Poltekes Kemenkes Bandung.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

REFRENSI

- Biolabo. (2019). *Kit Insert Cholesterol Total CHOD-PAP*. France.
- Dolci, A., & Panteghini, M. (2014). Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clinica Chimica Acta*, 432, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.10.012>
- Howanitz, P. J., Lehman, C. M., Jones, B. A., Meier, F. A., & Horowitz, G. L. (2015). *Clinical Laboratory Quality Practices When Hemolysis Occurs*. *Arch Pathol Lab Med*. Vol. 139: 901-906
- Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A., & Çuhadar, S. (2011). Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Biochemia Medica*, 21(1), 79-85. <https://doi.org/10.11613/bm.2011.015>
- Lippi, G., Plebani, M., Di Somma, S., & Cervellin, G. (2011). Hemolyzed specimens: A major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(3), 143-153. <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.600228>
- Marques-Garcia, F. (2020). Methods for hemolysis interference study in laboratory medicine - a critical review. *Electronic Journal of the*
-

-
- International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 31(1), 85-97.
- Menkes RI. 2013. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 43 Tahun 2013 Tentang cara Penyelenggaraan Laboratorium Klinik Yang Baik*.
- Smith, M. B., Yung W., C., Dolci, A., Kellogg, M. D., McCudden, C. R., McLean, M., Miller, J. J., & Zakowski, J. (2012). *Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis; Approved Guideline, CLSI document C56-A, Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute. July 2012, 42.*
- Von Meyer, A., Cadamuro, J., Lippi, G., & Simundic, A. M. (2018). Call for more transparency in manufacturers declarations on serum indices: On behalf of the Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clinica Chimica Acta*, 484(March), 328-332. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.043>
- Peng, Z., Wenqing, X., Jianming Z., Jiajia C., Zhe L., Hui G., Junfeng Z., Hongqiang S., (2019). Hemolytic Specimens In Complete Blood Cell Count: Red Cell Parameters Could Be Revised By Plasma Free Hemoglobin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. <https://doi.org/10.1002/jcla.23218>.
-