

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan laboratorium merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari pelayanan kesehatan modern karena berfungsi sebagai dasar dalam menegakkan diagnosis, memantau efektivitas pengobatan, serta menilai kondisi fisiologis pasien. Hasil pemeriksaan laboratorium dapat memberikan informasi kuantitatif dan kualitatif yang penting bagi pengambilan keputusan klinik. Oleh karena itu, mutu hasil pemeriksaan laboratorium harus dijaga agar dapat mencerminkan kondisi pasien yang sesungguhnya (Kemendikbud, 2023)(Rosita dkk., 2019).

Perkembangan teknologi laboratorium klinik saat ini memungkinkan pemeriksaan dilakukan dengan tingkat presisi dan akurasi tinggi. Namun, keandalan alat saja tidak menjamin hasil yang benar bila tahapan sebelum dan sesudah analisis tidak dilakukan sesuai standar. Nordin dkk., (2024) melaporkan bahwa lebih dari 60% kesalahan laboratorium terjadi bukan pada proses analisis, melainkan pada tahap persiapan dan penanganan spesimen. Dengan demikian, keberhasilan suatu pemeriksaan tidak hanya ditentukan oleh teknologi yang digunakan, tetapi juga oleh kompetensi petugas, ketepatan prosedur, serta pengendalian mutu di setiap tahap kerja laboratorium.

Selain itu, pemeriksaan laboratorium memiliki peran penting dalam sistem pelayanan kesehatan berbasis bukti (*evidence-based medicine*). Hasil pemeriksaan yang akurat dapat membantu dokter dalam menentukan diagnosis yang tepat dan memberikan terapi yang sesuai, sedangkan hasil yang tidak valid dapat menimbulkan kesalahan diagnosis dan pengobatan. Setiap tenaga laboratorium medik memiliki tanggung jawab profesional untuk menjaga mutu hasil pemeriksaan melalui penerapan prosedur

standar operasional (SOP) di setiap tahapan kerja, mulai dari pengambilan hingga pelaporan hasil pemeriksaan (Indrawati dkk., 2023).

Keberhasilan pemeriksaan laboratorium bergantung pada tiga tahapan utama, yaitu tahap praanalitik, analitik, dan pascaanalitik (Nordin dkk., 2024):

a. Tahap Praanalitik

Mencakup seluruh proses sebelum sampel dianalisis, dimulai dari persiapan pasien, pemilihan alat dan wadah spesimen, pengambilan darah, penanganan, penyimpanan, hingga pengiriman ke laboratorium. Berdasarkan penelitian oleh Nordin dkk., (2024), sekitar 60–70% kesalahan laboratorium terjadi pada tahap ini, yang sebagian besar disebabkan oleh kesalahan identifikasi pasien, penggunaan alat yang tidak sesuai, atau teknik pengambilan darah yang salah. Kesalahan pada tahap praanalitik seperti keterlambatan pencampuran darah dengan antikoagulan atau tekanan mekanik berlebih saat transfer dapat memicu hemolisis, yang akhirnya menurunkan akurasi hasil pemeriksaan (Indrawati dkk., 2023).

b. Tahap Analitik

Meliputi proses pemeriksaan sampel menggunakan metode dan instrumen tertentu untuk menghasilkan data numerik atau kualitatif. Kesalahan pada tahap ini biasanya berasal dari faktor teknis seperti kalibrasi alat, kualitas reagen, atau ketidaksesuaian metode (Nordin dkk., 2024). Menurut Naz dkk., (2012), tahapan analitik membutuhkan kontrol kualitas internal maupun eksternal untuk memastikan hasil yang dihasilkan sesuai standar laboratorium klinik yang berlaku.

c. Tahap Pascaanalitik

Meliputi kegiatan setelah proses analisis selesai, termasuk validasi, pelaporan, dan interpretasi hasil oleh tenaga laboratorium medik. Kesalahan pada tahap ini dapat berupa kesalahan input data, keterlambatan pelaporan, atau penyampaian hasil yang tidak sesuai format. Akurasi dan ketepatan waktu dalam tahap ini sangat

menentukan keandalan informasi diagnostik bagi dokter dan pasien (Nordin dkk., 2024).

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa mutu hasil pemeriksaan laboratorium ditentukan oleh keseluruhan proses mulai dari tahap praanalitik hingga pasca-analitik. Namun, karena sebagian besar kesalahan terjadi pada tahap praanalitik, maka aspek ini perlu mendapat perhatian khusus. Pemahaman terhadap teknik pengambilan dan penanganan darah yang benar, termasuk metode transfer darah dari spuit ke tabung, menjadi salah satu faktor penting dalam menjaga validitas hasil pemeriksaan laboratorium.

2. Tahap Praanalitik

a. Pengambilan Darah

1) Pengertian Pengambilan Darah

Pengambilan darah atau flebotomi merupakan prosedur medis untuk mendapatkan sampel darah dari tubuh pasien yang digunakan dalam pemeriksaan laboratorium, transfusi, maupun penelitian klinis. Prosedur flebotomi harus dilakukan dengan prinsip kehati-hatian, menggunakan teknik aseptik, serta memperhatikan keamanan pasien dan petugas. Setiap tahap mulai dari persiapan alat, pemilihan lokasi penusukan, hingga penanganan sampel harus mengikuti standar operasional prosedur agar hasil pemeriksaan laboratorium tetap akurat dan reliabel (Umar, 2023).

Flebotomi juga memiliki peranan penting dalam fase praanalitik pemeriksaan laboratorium. Kesalahan pada tahap ini dapat menyebabkan hasil yang salah, meskipun analisis di laboratorium dilakukan dengan benar. Karena itu, ketepatan dalam teknik pengambilan dan transfer darah menjadi aspek krusial dalam menjaga mutu hasil pemeriksaan (WHO, 2010).

2) Peralatan Pengambilan Darah

Peralatan pengambilan darah merupakan komponen penting dalam pelaksanaan prosedur flebotomi yang aman dan efektif.

Peralatan yang digunakan harus memenuhi standar sterilitas, keamanan kerja, serta kesesuaian dengan jenis pemeriksaan laboratorium yang akan dilakukan.

Pemilihan alat yang tepat berfungsi untuk menjaga kualitas spesimen, mencegah terjadinya hemolisis, serta menghindari risiko infeksi silang antar pasien (Umar, 2023).

Secara umum, peralatan yang digunakan dalam proses pengambilan darah meliputi beberapa kelompok utama sebagai berikut:

a) Jarum (*Needle*)

Jarum merupakan alat utama untuk menembus pembuluh darah dan mengalirkan darah ke dalam tabung atau spuit. Berdasarkan pedoman *UF Health Medical Laboratories* (2019), jarum yang umum digunakan berukuran 21–23 gauge (G), disesuaikan dengan kondisi vena pasien. Jarum berukuran lebih besar (21G) digunakan pada orang dewasa dengan vena besar, sedangkan jarum berukuran kecil (23G) digunakan pada anak-anak atau pasien dengan vena kecil dan rapuh.

WHO (2010) menambahkan bahwa jarum yang digunakan harus sekali pakai (*disposable*) dan memiliki sistem pengaman (*safety needle*) untuk mencegah cedera tusukan jarum atau *needlestick injury*. Setelah digunakan, jarum wajib langsung dibuang ke dalam wadah tahan tusuk (*sharps container*) tanpa dilakukan penutupan kembali (*recapping*).

b) Sistem Vakum (*Vacuum Collection System*)

Sistem vakum atau *Vacutainer*® merupakan metode modern dalam pengambilan darah dengan sistem tertutup. Sistem ini terdiri atas tiga bagian, yaitu jarum ganda, adaptor (*holder*), dan tabung vakum. Menurut *Melbourne Pathology* (2024), sistem vakum memiliki beberapa keunggulan, antara lain:

- (1) Mengurangi risiko paparan darah terhadap tenaga kesehatan.
- (2) Menjamin volume darah yang diambil sesuai kebutuhan karena tekanan negatif di dalam tabung.
- (3) Memungkinkan pengambilan beberapa tabung sekaligus dari satu penusukan.
- (4) Mengurangi risiko hemolisis akibat tekanan manual seperti pada penggunaan spuit.
- (5) Sistem vakum sangat direkomendasikan karena menjaga integritas spesimen dan mempercepat proses pengambilan.

c) Jarum Kupu-Kupu (*Winged Infusion Set / Butterfly Needle*)

Jarum kupu-kupu memiliki dua sayap fleksibel di dekat pangkalnya dan selang pendek yang terhubung dengan adaptor atau tabung vakum. Menurut Umar (2023), alat ini digunakan pada pasien dengan pembuluh kecil atau rapuh seperti bayi, anak-anak, lansia, dan pasien dengan akses vena yang sulit.

Keuntungan penggunaan jarum kupu-kupu adalah kontrol penusukan yang lebih baik dan risiko cedera lebih rendah. Namun, penggunaannya membutuhkan keterampilan khusus dan biasanya digunakan pada pengambilan dengan beberapa tabung atau saat diperlukan stabilitas lebih tinggi pada proses *venipuncture*.

d) Spuit dan Alat Transfer Darah (*Syringe and Blood Transfer Device*)

Metode jarum dan spuit masih digunakan pada kondisi tertentu, misalnya ketika sistem vakum tidak memungkinkan atau pada pasien dengan pembuluh darah sangat kecil. Setelah darah ditarik, sampel harus segera dipindahkan ke dalam tabung koleksi menggunakan *blood transfer device*, bukan dengan menyemprotkan darah secara langsung.

Melbourne Pathology (2024) menegaskan bahwa membuka tutup tabung atau memasukkan darah langsung dengan tekanan

tinggi dapat menyebabkan hemolisis dan menurunkan kualitas sampel. Oleh karena itu, transfer darah harus dilakukan secara perlahan melalui adaptor khusus untuk menghindari kerusakan sel darah merah.

e) *Tourniquet*

Tourniquet berfungsi membantu menahan aliran darah vena agar pembuluh darah menjadi lebih jelas dan mudah ditemukan. Menurut *UF Health Medical Laboratories* (2019), *tourniquet* harus diletakkan 3–4 cm di atas lokasi penusukan dan tidak boleh dibiarkan terpasang lebih dari satu menit untuk mencegah hemokonsentrasi. *Tourniquet* harus berbahan lateks bebas alergi (*latex-free*), bersih, dan idealnya sekali pakai (*disposable*) untuk mencegah kontaminasi silang antar pasien.

f) Antiseptik dan Kapas Steril

Sebelum penusukan, kulit pasien harus dibersihkan menggunakan antiseptik seperti alkohol 70% isopropil dengan gerakan melingkar dari pusat keluar. Kapas steril digunakan untuk mengeringkan area tusukan dan menekan bekas luka setelah prosedur selesai. WHO (2010) menegaskan pentingnya antisepsis kulit karena sebagian besar kontaminasi mikroba pada sampel berasal dari flora kulit.

g) Tabung Koleksi Darah (*Blood Collection Tubes*)

Tabung koleksi darah memiliki berbagai warna tutup yang menunjukkan jenis aditif di dalamnya, misalnya:

- (1) Biru muda (*Sodium Citrate*): untuk tes koagulasi.
- (2) Merah/Gold (Serum): untuk kimia klinik dan imunologi.
- (3) Hijau (Heparin): untuk pemeriksaan plasma.
- (4) Ungu/Pink (EDTA): untuk hematologi dan bank darah.
- (5) Abu-abu (*Fluoride/Oxalate*): untuk pemeriksaan glukosa.

Setiap tabung harus diisi penuh sesuai kapasitas dan dihomogenkan dengan cara inversi lembut, bukan dikocok keras,

agar aditif bercampur merata tanpa merusak eritrosit (Melbourne Pathology, 2024; UF Health Medical Laboratories, 2019).

h) Kasa Steril, Plester, dan Wadah Limbah

Kasa steril digunakan untuk menekan area tusukan setelah jarum dicabut, sementara plester atau perban berfungsi menutup luka agar tidak terjadi perdarahan ulang. Selain itu, setiap area pengambilan darah wajib memiliki wadah benda tajam (*sharps container*) yang bersifat tahan tusuk, diberi label *biohazard*, dan digunakan untuk pembuangan jarum serta alat tajam sekali pakai. Pengelolaan limbah medis harus mengikuti standar keselamatan kerja dan kebersihan lingkungan (UF Health Medical Laboratories, 2019; WHO, 2010).

3) Jenis-Jenis Pengambilan Darah

Menurut *World Health Organization* (2010), pengambilan darah dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis utama berdasarkan lokasi dan tujuan pengambilan darah, yaitu:

a) Darah Kapiler

Pengambilan darah kapiler dilakukan pada lapisan dermis superfisial, umumnya menggunakan jarum *lancet*. Lokasi yang biasa digunakan adalah ujung jari tangan (dewasa) atau tumit (bayi). Darah kapiler digunakan untuk pemeriksaan yang membutuhkan volume kecil seperti kadar glukosa darah, hemoglobin, dan pemeriksaan cepat (*rapid test*). Teknik ini dipilih karena minim invasif dan lebih nyaman bagi pasien anak (WHO, 2010).

b) Darah Vena (*Venipuncture*)

Teknik pengambilan darah vena merupakan metode yang paling sering digunakan untuk pemeriksaan laboratorium klinik. Darah diambil dari vena perifer, terutama vena median cubiti, vena basilika, atau vena sefalika pada lengan. Menurut *UF Health Medical Laboratories* (2019), prosedur ini dilakukan dengan

menyiapkan alat seperti *vacutainer*, *tourniquet*, kapas alkohol 70%, serta tabung koleksi dengan warna tutup berbeda sesuai jenis pemeriksaan. Urutan pengisian tabung (*order of draw*) harus diikuti dengan tepat untuk mencegah kontaminasi aditif yang dapat memengaruhi hasil uji (UF Health Medical Laboratories, 2019).

Selain itu, penggunaan sistem evakuasi tertutup (*evacuated system*) seperti *vacutainer* lebih direkomendasikan dibandingkan dengan jarum dan spuit karena dapat mengurangi risiko hemolisis dan paparan darah terhadap tenaga kesehatan. Namun, pada pasien dengan vena sulit dijangkau, metode jarum dan spuit masih dapat digunakan dengan syarat darah dipindahkan menggunakan *blood transfer device* agar tidak terjadi kerusakan sel darah (Melbourne Pathology, 2024).

c) Darah Arteri

Pengambilan darah arteri dilakukan untuk pemeriksaan gas darah (*arterial blood gas analysis/ABG*) yang digunakan dalam penilaian fungsi paru dan keseimbangan asam-basa tubuh. Menurut WHO (2010), lokasi yang umum digunakan adalah arteri radialis, arteri brakialis, atau *arteri femoralis*. Prosedur ini membutuhkan keterampilan lebih tinggi karena risiko komplikasinya lebih besar, seperti perdarahan, hematoma, atau spasme arteri.

4) Prosedur Pengambilan Darah

Menurut pedoman *World Health Organization* (2010) dan *UF Health Pathology Laboratories* (2019), langkah-langkah umum dalam pengambilan darah vena meliputi:

- a) Identifikasi pasien dengan dua cara aktif (nama dan tanggal lahir).
- b) Persiapan alat steril sesuai kebutuhan, termasuk jarum, tabung, dan *tourniquet*.
- c) Pemilihan lokasi vena yang sesuai dan mudah dijangkau.

- d) Pemasangan *tourniquet* sekitar 3–4 cm di atas lokasi penusukan, tidak lebih dari satu menit.
 - e) Desinfeksi kulit dengan kapas alkohol 70% dengan gerakan melingkar keluar dan biarkan kering.
 - f) Penusukan jarum dengan posisi *bevel* menghadap ke atas dan sudut 15–30°.
 - g) Pengisian tabung sesuai urutan yang direkomendasikan (*order of draw*).
 - h) Melepas *tourniquet*, kemudian menarik jarum dan menekan area tusukan dengan kasa steril.
 - i) Pelabelan tabung segera setelah pengambilan darah, mencantumkan nama, tanggal lahir, waktu pengambilan, dan inisial petugas.
- b. Penanganan Sampel: Teknik Transfer Darah ke Tabung

Proses pemindahan darah dari spuit ke tabung pemeriksaan merupakan salah satu titik kritis pada tahap praanalitik. Kesalahan pada proses ini, terutama terkait tekanan mekanik dan kecepatan aliran darah, dapat menyebabkan hemolisis yang akan memengaruhi akurasi hasil pemeriksaan laboratorium. Oleh karena itu, teknik transfer harus mempertimbangkan tekanan, turbulensi aliran, dan tingkat shear stress pada eritrosit (Faruq dkk., 2022).

Pedoman internasional seperti *World Health Organization* (2010) dan standar laboratorium seperti *Melbourne Pathology Collection Guidelines* (2024) menegaskan bahwa risiko hemolisis meningkat ketika darah dipindahkan melalui ruang sempit bertekanan tinggi, misalnya melalui lumen jarum atau akibat dorongan plunger yang kuat. Prinsip-prinsip ini menjadi dasar teori untuk memahami pengaruh teknik transfer darah.

World Health Organization (2010) menyatakan bahwa penggunaan syringe berisiko menyebabkan hemolisis jika plunger ditekan terlalu kuat saat darah dipindahkan ke tabung. Tekanan tinggi

menyebabkan eritrosit mengalami stres mekanik sehingga membrannya pecah.

Melbourne Pathology (2024) juga menegaskan bahwa darah tidak boleh disemprotkan melalui jarum ke dalam tabung, karena aliran darah menjadi cepat, turbulen, dan bertekanan tinggi, kondisi yang sangat memicu hemolisis. Pernyataan ini menunjukkan bahwa lumen jarum merupakan salah satu faktor utama penyebab hemolisis.

c. Faktor Penyebab Kesalahan pada Sampel Darah

Kesalahan pada sampel darah umumnya terjadi pada tahap preanalitik dan dipengaruhi oleh beberapa faktor utama (Rosya dkk., 2024):

- 1) Hemolisis merupakan salah satu penyebab penting, yang dalam dokumen tercatat sebagai penyebab 34% penolakan sampel, terutama terjadi karena darah dipindahkan dari spuit ke tabung tanpa melepas jarum sehingga tekanan tinggi merusak sel darah merah.
- 2) Lipemia juga dapat memengaruhi kualitas sampel, ditandai dengan tampilan serum yang keruh akibat tingginya kadar lemak, sehingga dapat mengganggu pembacaan parameter biokimia. Selain itu, ikterus, yaitu kondisi tingginya bilirubin yang membuat serum berwarna kuning pekat, turut menjadi faktor interferensi karena dapat memengaruhi hasil pemeriksaan tertentu.
- 3) Penggumpalan (*clotting*) bahkan menjadi penyebab penolakan paling tinggi, sebesar 47%, yang umumnya disebabkan oleh tidak dilakukannya inversi tabung EDTA sehingga darah tidak tercampur dengan antikoagulan.
- 4) Rasio darah dan antikoagulan yang tidak sesuai, yang dapat menyebabkan pembekuan sebagian atau hasil pemeriksaan hematologi dan koagulasi yang tidak akurat.
- 5) Kontaminasi sampel juga menjadi kesalahan preanalitik yang perlu diperhatikan, misalnya akibat pengambilan darah melalui jalur infus, penggunaan alat yang tidak tepat, atau kesalahan identifikasi, yang

seluruhnya dapat menurunkan kualitas dan kelayakan sampel untuk dianalisis.

Faktor-faktor tersebut menunjukkan pentingnya keterampilan flebotomi, kepatuhan terhadap SOP, serta penanganan sampel sesuai standar WHO untuk mengurangi penolakan dan kesalahan hasil laboratorium

3. Tahap Analitik

a. Pemeriksaan Hasil

Pemeriksaan hasil pada tahap analitik merupakan proses evaluasi terhadap data yang dihasilkan oleh instrumen laboratorium untuk memastikan validitas dan keandalan hasil. Menurut Sciacovelli dkk. (2023), kualitas dalam laboratorium klinik perlu dipantau melalui penerapan *quality indicators* (QIs) yang mencakup seluruh tahapan dalam *Total Testing Process* (TTP). Evaluasi ini penting untuk mendeteksi potensi kesalahan pada setiap fase pemeriksaan serta meningkatkan keselamatan pasien melalui pengendalian mutu yang berkelanjutan.

Ia menekankan bahwa sebuah nilai yang tampak berada dalam batas normal sekalipun dapat menyesatkan apabila dipengaruhi bias analitik atau ketidakstabilan reaksi. Pemeriksaan hasil juga melibatkan penilaian terhadap flagging instrumen, kecocokan hasil dengan nilai kontrol internal, dan konsistensi antarparameter terkait. Dengan demikian, pemeriksaan hasil merupakan langkah krusial untuk memastikan hasil yang dilaporkan benar-benar mencerminkan kondisi klinis pasien dan bukan artefak dari proses analitik.

b. Metode Analisis

Metode analisis merupakan kerangka ilmiah dan prosedural yang digunakan untuk mengukur analit secara akurat. Kualitas metode ditentukan oleh kemampuan analitiknya, meliputi presisi, akurasi, linearitas, serta kemampuan deteksi, yang semuanya harus divalidasi sebelum digunakan (Sepetiene dkk., 2022).

Performa metode sering kali tidak mencapai tingkat sigma tinggi, sehingga evaluasi berkala sangat diperlukan untuk memastikan metode masih memenuhi batas penerimaan klinis. Selain itu, pemilihan metode juga harus mempertimbangkan interferensi spesifik metode dan karakteristik instrumentasi, karena metode yang tidak sesuai dapat menghasilkan bias hasil pada populasi sampel tertentu. Dengan demikian, metode analisis merupakan pilar utama keandalan data laboratorium dan harus dievaluasi secara ketat untuk menjamin mutu hasil (Sepetiene dkk, 2022).

c. Interferensi Analitik

Interferensi analitik merupakan gangguan yang menyebabkan hasil pemeriksaan tidak mencerminkan nilai analit yang sebenarnya. Interferensi dapat berasal dari hemolisis, ikterus, lipemia, obat, atau metabolit yang memengaruhi reaksi kimia maupun pembacaan instrumen. Hemolisis dapat meningkatkan kalium atau *Lactate Dehydrogenase* (LDH) secara artifisial, sedangkan lipemia mengganggu pengukuran fotometrik. Perubahan matriks, seperti keberadaan paraprotein, juga dapat menyebabkan hasil tidak stabil. Oleh karena itu, identifikasi interferensi analitik sangat penting untuk memastikan ketepatan hasil laboratorium (Naz dkk., 2012).

d. Standarisasi dan Kalibrasi Alat

Standarisasi dan kalibrasi alat merupakan proses penjaminan mutu yang bertujuan menjaga konsistensi dan ketertelusuran hasil pengukuran. As dkk., (2015) menjelaskan bahwa kalibrasi berperan penting dalam mencegah bias sistematis, karena penyimpangan kecil pada kalibrator atau prosedur penanganannya dapat menyebabkan kesalahan yang merata pada seluruh pemeriksaan.

Studi tersebut juga menegaskan bahwa kalibrasi harus dilakukan secara berkala, mengikuti protokol internal, dan diulang ketika hasil kontrol kualitas menunjukkan tren penyimpangan. Selain itu, mereka menyoroti bahwa kegagalan kalibrasi merupakan salah satu penyebab

dominan kesalahan analitik, terutama pada instrumen otomatis yang sangat bergantung pada ketepatan sistem kalibrasi. Dengan demikian, standarisasi dan kalibrasi menjadi fondasi akurasi hasil laboratorium dan harus dilakukan secara sistematis, terjadwal, dan sesuai standar akreditasi.

4. Tahap Pasca-Analitik

a. Validasi Hasil Pemeriksaan

Menurut Alghamdi dkk. (2024), seluruh tahapan dalam *Total Testing Process* (TTP), termasuk fase pasca-analitik, berperan penting dalam menjamin kualitas hasil laboratorium dan keselamatan pasien. Kesalahan pada fase pasca-analitik dapat terjadi dalam bentuk keterlambatan pelaporan, kesalahan pencatatan, maupun interpretasi hasil yang tidak tepat, yang berpotensi memengaruhi pengambilan keputusan klinis. Oleh karena itu, diperlukan sistem pengendalian mutu yang baik serta komunikasi yang efektif antara laboratorium dan klinisi untuk memastikan bahwa hasil pemeriksaan dapat digunakan secara akurat dan tepat dalam praktik klinis.

b. Pelaporan

Tahap pelaporan merupakan fase akhir di mana hasil laboratorium yang telah divalidasi ditata dalam bentuk laporan resmi dan disampaikan kepada klinisi. Artikel tersebut menjelaskan bahwa pelaporan mencakup beberapa komponen penting: penyusunan laporan, keputusan pelepasan hasil, penyampaian hasil, hingga pengarsipan dan dokumentasi. Laporan harus memenuhi persyaratan ISO 15189, termasuk identitas pasien, waktu pengambilan sampel, rentang rujukan, tanda hasil kritis, serta komentar interpretatif bila dibutuhkan. Selain itu, disebutkan bahwa laporan dapat dikirim dalam bentuk elektronik atau cetak, namun harus berada dalam format yang aman (*read-only*), hanya dapat diakses oleh pihak berwenang, dan disertai mekanisme pencatatan hasil yang disampaikan secara lisan seperti pada kasus hasil kritis. Rekomendasi ini juga menekankan

pentingnya dokumentasi lengkap bila laporan harus direvisi atau ditarik kembali, termasuk alasan perubahan dan identitas petugas yang bertanggung jawab. Semua langkah ini bertujuan memastikan bahwa hasil dapat digunakan secara tepat, aman, dan bermanfaat dalam pengambilan keputusan klinis (Krlaza dkk., 2019).

5. Darah

Darah merupakan jaringan cair yang berperan penting dalam mempertahankan kehidupan melalui fungsi transportasi, regulasi, dan perlindungan tubuh. Menurut Cahyani dan Parwati (2022), darah berfungsi sebagai media utama untuk mengedarkan oksigen, karbon dioksida, hormon, nutrisi, serta produk sisa metabolisme ke seluruh tubuh. Selain itu, darah juga berperan dalam menjaga kestabilan suhu tubuh, pH, serta tekanan osmotik. Dalam konteks pemeriksaan laboratorium, darah menjadi spesimen yang paling banyak digunakan karena komposisinya mencerminkan kondisi fisiologis maupun patologis pasien secara menyeluruh.

Secara umum, darah terdiri atas dua komponen utama, yaitu seluler (bentuk padat) dan plasma (bentuk cair). Bagian seluler terdiri dari eritrosit, leukosit, dan trombosit, sedangkan plasma berisi air, elektrolit, protein, enzim, hormon, serta zat sisa metabolisme (Kemenkes RI, 2017). Ketika darah dibiarkan membeku dan kemudian disentrifugasi, bagian cair yang tersisa disebut serum, yang banyak digunakan dalam pemeriksaan kimia klinik.

a. Komponen Darah

Komponen darah terbagi menjadi dua bagian besar yaitu elemen seluler dan komponen cair (plasma). Elemen seluler terdiri atas eritrosit (sel darah merah), leukosit (sel darah putih), dan trombosit (keping darah). Eritrosit berfungsi membawa oksigen dari paru ke jaringan dan mengangkut karbon dioksida dari jaringan ke paru. Leukosit berperan dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi,

sedangkan trombosit berfungsi dalam proses pembekuan darah (Indrawati dkk., 2023).

Sementara itu, komponen cair darah yaitu plasma berperan sebagai medium tempat berbagai zat terlarut berada, seperti protein, glukosa, lipid, elektrolit, serta hormon. Cahyani dan Parwati (2022) menyatakan bahwa keseimbangan antara komponen cair dan seluler sangat memengaruhi kestabilan fisiologis tubuh dan hasil pemeriksaan laboratorium. Oleh karena itu, pengambilan darah yang tidak tepat dapat mengubah proporsi komponen tersebut dan menimbulkan hasil pemeriksaan yang bias.

b. Serum

1) Pengertian

Serum merupakan komponen cair darah yang diperoleh setelah darah mengalami proses pembekuan dan disentrifugasi untuk memisahkan sel-sel darah dan fibrinogen. Berbeda dengan plasma, serum tidak mengandung faktor pembekuan karena sebagian besar telah digunakan dalam proses koagulasi. Menurut Rosita dkk. (2019), serum terdiri dari air (sekitar 90%), protein seperti albumin dan globulin, elektrolit, hormon, enzim, serta metabolit hasil proses fisiologis tubuh.

Serum sering digunakan dalam pemeriksaan kimia klinik seperti kolesterol, glukosa, trigliserida, dan elektrolit karena memiliki kestabilan analit yang baik serta tidak mengandung antikoagulan yang dapat mengganggu proses pengukuran (Mardiana & Rahayu, 2017). Dalam penelitian laboratorium, serum dianggap sebagai spesimen yang paling representatif untuk analisis parameter biokimia, termasuk pemeriksaan klorida, karena tidak terjadi interaksi antara zat antikoagulan dan analit yang diukur.

2) Jenis-Jenis Serum Abnormal

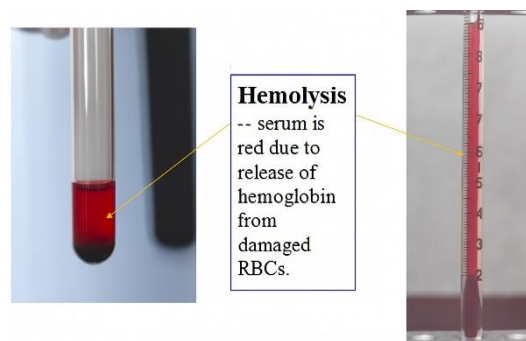
Dalam praktik laboratorium, tidak semua serum yang diperoleh memiliki penampakan jernih dan kuning muda. Faktor-

faktor seperti hemolisis, peningkatan bilirubin, atau kadar lipid tinggi dapat mengubah penampilan fisik serum serta memengaruhi hasil analisis kimia. Menurut Ho dkk., (2021), terdapat tiga bentuk utama serum abnormal yang dikenal sebagai interferensi HIL (*Hemolysis, Icterus, and Lipemia*). Masing-masing kondisi memiliki karakteristik visual dan implikasi laboratorium yang berbeda.

a) Serum Hemolitik (*Hemolysis*)

Serum hemolitik terjadi akibat pecahnya eritrosit sehingga hemoglobin dan komponen intraseluler lain terlepas ke dalam cairan serum. Secara visual, serum tampak kemerahan atau merah muda dengan intensitas warna tergantung pada derajat hemolisis. Hemolisis dapat terjadi *in vivo* (karena kelainan patologis seperti anemia hemolitik atau reaksi transfusi) maupun *in vitro* akibat kesalahan teknis seperti penyedotan darah terlalu cepat, penggunaan jarum berukuran kecil, atau pengocokan tabung yang terlalu kuat (Ho dkk., 2021).

Kandungan hemoglobin bebas menyebabkan gangguan spektrofotometri karena pigmen ini menyerap cahaya pada panjang gelombang 500–600 nm, sehingga banyak parameter kimia klinik seperti kalium (K^+), LDH, AST, dan fosfat dapat meningkat secara palsu.



Gambar 1. Tampilan Visual Serum Hemolitik (Sumber: Vidt, 2006).

b) Serum Ikterik (*Icteric Serum*)

Serum ikterik adalah serum yang berwarna kuning pekat hingga kehijauan akibat peningkatan kadar bilirubin dalam darah. Kondisi ini biasanya ditemukan pada pasien dengan gangguan hati, obstruksi bilier, atau peningkatan hemolisis *in vivo*. Bilirubin, terutama bentuk indirek (*unconjugated*), memiliki sifat menyerap cahaya pada panjang gelombang yang sama dengan banyak reaksi uji enzimatik, sehingga dapat menyebabkan hasil palsu rendah (*false low*) pada uji seperti kolesterol, protein total, atau glukosa (Ho dkk., 2021).

Selain gangguan optik, bilirubin juga dapat bereaksi secara kimia dengan reagen penguji sehingga mengubah aktivitas enzim atau hasil warna reaksi. Dalam laboratorium otomatis, kadar bilirubin diukur sebagai indeks I (*Icterus Index*) untuk menentukan tingkat keparahan interferensi.



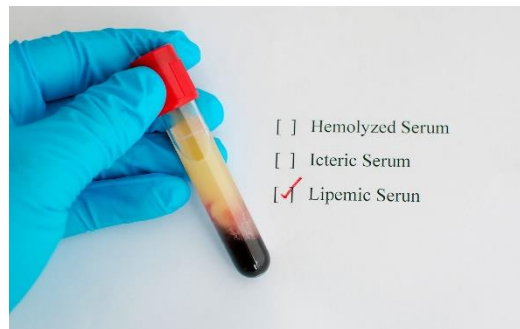
Gambar 2. Tampilan Visual Serum Ikterik (Khan, 2022).

c) Serum Lipemik (*Lipemic Serum*)

Serum lipemik memiliki tampilan keruh atau seperti susu akibat kadar lipid, khususnya trigliserida dan kilomikron, yang sangat tinggi. Kondisi ini dapat disebabkan oleh pengambilan darah setelah makan, pemberian infus lipid, atau gangguan metabolisme seperti hiperlipidemia primer (Ho dkk., 2021).

Lipemia terutama memengaruhi hasil pengukuran dengan metode fotometrik, misalnya kadar bilirubin langsung, enzim

hati, dan elektrolit. Sampel dengan derajat lipemia tinggi biasanya diberi catatan khusus dalam laporan hasil atau diproses dengan teknik sentrifugasi ultracepat untuk menghilangkan lapisan lemak (Nordin dkk., 2024).



Gambar 3. Tampilan Visual Serum Lipemik (Sumber: istockphoto.com, 2015).

c. Plasma

Plasma adalah komponen cair darah yang diperoleh dari darah yang tidak dibiarkan membeku karena ditampung dalam tabung berantikoagulan seperti EDTA, heparin, atau natrium sitrat. Plasma mengandung sekitar 90% air dan 10% zat terlarut yang terdiri dari protein (albumin, globulin, fibrinogen), elektrolit, nutrien, serta produk metabolik (Rosita dkk., 2019).

Perbedaan utama antara plasma dan serum terletak pada keberadaan fibrinogen. Plasma masih mengandung fibrinogen, sedangkan serum tidak. Menurut penelitian Evriarti dan Toruan (2024), penggunaan plasma lebih sesuai untuk pemeriksaan koagulasi atau hematologi karena keberadaan faktor pembekuan penting untuk analisis tersebut. Sebaliknya, untuk pemeriksaan kimia klinik seperti elektrolit atau lipid, serum lebih disarankan karena hasilnya lebih stabil dan bebas dari interferensi antikoagulan.

6. Hemolisis

a. Pengertian Hemolisis

Hemolisis merupakan proses pecahnya membran eritrosit (sel darah merah) sehingga isi sel, terutama hemoglobin (Hb), keluar ke

plasma darah. Kondisi ini mengubah warna plasma menjadi kemerahan akibat terlarutnya Hb bebas dalam serum atau plasma (Kemenkes RI, 2018).

Menurut Rosita dkk., (2019), hemolisis dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis, tergantung pada keseimbangan antara pembentukan dan penghancuran eritrosit. Dalam keadaan normal, eritrosit memiliki umur rata-rata sekitar 120 hari sebelum dihancurkan secara alami oleh sistem retikuloendotelial, khususnya di limpa dan hati. Namun, bila penghancuran eritrosit terjadi lebih cepat daripada pembentukannya, kondisi ini disebut hemolisis patologis, yang dapat menyebabkan anemia hemolitik.

Hemolisis memiliki arti klinis penting baik dalam konteks fisiologis, imunologis, maupun laboratorium. Dalam laboratorium klinik, hemolisis dapat memengaruhi hasil pemeriksaan biokimia karena pelepasan komponen intraseluler seperti kalium, *laktat dehidrogenase* (LDH), dan enzim AST ke dalam plasma, sehingga menimbulkan hasil yang salah (*false high result*). Sementara dalam konteks imunologi transfusi, hemolisis menjadi indikator adanya reaksi antigen–antibodi yang merusak eritrosit, seperti pada reaksi transfusi inkompatibilitas golongan darah (Kemenkes RI, 2018).

b. Jenis Hemolisis

Hemolisis secara umum dibedakan menjadi dua bentuk besar, yaitu hemolisis *in vivo* dan hemolisis *in vitro*, berdasarkan lokasi dan penyebab terjadinya.

1) Hemolisis *In Vivo*

Hemolisis *in vivo* terjadi di dalam tubuh pasien, akibat proses patologis yang menyebabkan kerusakan eritrosit secara prematur. Berdasarkan mekanisme penyebabnya, hemolisis *in vivo* dapat bersifat imunologis atau non-imunologis.

Menurut Kemenkes RI (2018), hemolisis imunologis terjadi karena aktivasi sistem komplemen setelah antibodi (terutama IgG

atau IgM) berikatan dengan antigen pada permukaan eritrosit. Antibodi yang terbentuk dapat berasal dari paparan antigen transfusi, kehamilan, atau paparan imun lain yang menyebabkan terbentuknya antibodi terhadap antigen sel darah merah. Ketika kompleks antigen–antibodi terbentuk, aktivasi komplemen akan berakhir dengan pembentukan *membrane attack complex* (C5b–C9), yang menyebabkan lisis membran eritrosit.

Contoh kondisi hemolisis imunologis *in vivo* meliputi:

- a) Reaksi transfusi inkompatibilitas ABO, di mana antibodi anti-A atau anti-B menyebabkan hemolisis intravaskular akut.
- b) Penyakit hemolitik pada bayi baru lahir (HDN) akibat inkompatibilitas rhesus (Rh).
- c) *Autoimmune hemolytic anemia* (AIHA), yaitu pembentukan antibodi terhadap eritrosit sendiri.

Sedangkan hemolisis *in vivo* non-imunologis disebabkan oleh faktor mekanik, toksik, atau infeksius. Penyebab non-imun meliputi trauma mekanik pada eritrosit (seperti katup jantung buatan), racun, infeksi malaria, atau gangguan metabolisme eritrosit seperti defisiensi enzim G6PD. Proses ini biasanya menyebabkan hemolisis ekstrasvaskular, di mana eritrosit rusak dan difagositosis oleh makrofag limpa dan hati, menghasilkan peningkatan bilirubin indirek dan retikulositosis (Mehta dan Hoffbrand, 2014).

2) Hemolisis *In Vitro*

Berbeda dengan hemolisis *in vivo*, hemolisis *in vitro* terjadi di luar tubuh, biasanya sebagai artefak akibat kesalahan prosedur pada saat atau setelah pengambilan darah. Menurut Rosita dkk., (2019) dan Kemendikbud (2023), hemolisis *in vitro* sering kali disebabkan oleh:

- a) Penggunaan jarum terlalu kecil atau tekanan negatif berlebih saat aspirasi darah dengan spuit.
- b) Pengocokan tabung darah yang terlalu kuat.

- c) Penundaan transfer darah ke tabung vakum.
- d) Penyimpanan sampel pada suhu ekstrem.
- e) Kontaminasi bahan kimia atau penggunaan alkohol yang belum kering pada kulit saat penusukan.

Darah yang mengalami hemolisis *in vitro* tidak mencerminkan kondisi fisiologis pasien, melainkan merusak hasil pemeriksaan laboratorium karena kebocoran komponen intraseluler. Oleh karena itu, sampel dengan plasma atau serum berwarna merah muda hingga merah harus ditolak dan dilakukan pengambilan ulang (Kemenkes RI, 2018).

c. Terjadinya Hemolisis

Secara fisiologis, membran eritrosit memiliki komposisi lipid, protein, dan karbohidrat yang menjaga integritas serta fleksibilitas sel. Ketika terjadi paparan agen penyebab hemolisis (fisik, kimia, atau imunologis), keseimbangan osmolaritas dan struktur membran akan terganggu. Dijelaskan bahwa reaksi hemolisis imunologis dimulai dari (Kemenkes RI, 2018):

- 1) Terbentuknya ikatan antigen–antibodi di permukaan eritrosit.
- 2) Aktivasi komplemen C1–C9 secara berurutan.
- 3) Pembentukan kompleks serangan membran (MAC) yang menembus lapisan lipid bilayer.
- 4) Masuknya ion air dan natrium ke dalam sel hingga menyebabkan pecahnya membran dan pelepasan hemoglobin.

Pada hemolisis non-imunologis, mekanisme utama melibatkan kerusakan mekanik atau stres oksidatif yang melemahkan struktur membran eritrosit. Lalu, radikal bebas, toksin, atau defisiensi enzim (seperti G6PD) dapat menurunkan daya tahan membran eritrosit terhadap oksidasi, menyebabkan deformasi dan akhirnya lisis.

d. Dampak dan Implikasi Klinis Hemolisis

Hemolisis yang terjadi di dalam tubuh dapat menimbulkan berbagai konsekuensi klinis, antara lain:

- 1) Anemia hemolitik dengan gejala pucat, ikterus, dan splenomegali.
- 2) Peningkatan bilirubin indirek, akibat pemecahan heme.
- 3) Hemoglobinemia dan hemoglobinuria, bila hemolisis terjadi secara intravaskular.
- 4) Kegagalan ginjal akut, pada hemolisis berat akibat toksisitas hemoglobin bebas terhadap tubulus ginjal.

Sementara itu, hemolisis *in vitro* berdampak langsung terhadap kualitas spesimen laboratorium. Hasil pemeriksaan kalium, AST, LDH, fosfat, dan magnesium biasanya meningkat secara palsu, sedangkan beberapa pemeriksaan seperti bilirubin dan troponin bisa menurun karena degradasi enzimatis oleh hemoglobin bebas. Oleh karena itu, prosedur pengambilan darah yang benar dan transfer yang hati-hati sangat penting untuk mencegah hemolisis buatan (Kemenkes RI, 2018).

7. Klorida

a. Pengertian

Klorida (Cl^-) merupakan anion utama dalam cairan ekstraseluler yang berperan penting dalam menjaga keseimbangan elektrolit, tekanan osmotik, dan keseimbangan asam-basa tubuh. Ion ini berfungsi bersama natrium (Na^+) untuk mempertahankan tekanan osmotik plasma serta menjaga keseimbangan ion antara kompartemen intraseluler dan ekstraseluler (Yaswir dan Ferawati, 2012). Sebagian besar klorida terdapat di ruang ekstraseluler (sekitar 88%), sedangkan sisanya berada di dalam eritrosit dan cairan jaringan (Kementrian Kesehatan RI, 2010).

Klorida juga berperan dalam proses pembentukan asam lambung melalui ionisasi natrium klorida menjadi H^+ dan Cl^- di mukosa lambung. Kekurangan atau kelebihan klorida dapat menyebabkan gangguan keseimbangan asam-basa seperti asidosis atau alkalosis. Dalam konteks pemeriksaan laboratorium, kadar klorida serum

mencerminkan status keseimbangan cairan tubuh dan sering diukur bersama elektrolit lainnya untuk menilai fungsi ginjal, keseimbangan asam-basa, serta gangguan metabolik (Azizah dan Aliviameita, 2019).

b. Metode Pemeriksaan Klorida

Pemeriksaan kadar klorida serum dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu metode titrimetri, kolorimetri, dan *ion selective electrode* (ISE).

1) Metode Titrimetri (Metode Schales & Schales):

Merupakan metode klasik yang menggunakan larutan merkuri nitrat sebagai titran dan indikator difenilkarbazone untuk mendeteksi titik akhir. Meskipun sederhana, metode ini kurang banyak digunakan karena risiko toksisitas merkuri dan keterbatasan sensitivitasnya (Kemenkes RI, 2010).

2) Metode Kolorimetri:

Berdasarkan reaksi klorida dengan merkuri (II) tiosianat, menghasilkan senyawa kompleks berwarna yang diukur secara spektrofotometrik pada panjang gelombang tertentu. Metode ini cocok untuk laboratorium dengan fasilitas manual.

3) Metode *Ion Selective Electrode* (ISE):

Merupakan metode modern yang paling banyak digunakan di laboratorium kimia klinik. Prinsipnya adalah pengukuran potensial listrik yang terbentuk antara elektroda selektif ion klorida dan elektroda pembanding. Nilai potensial tersebut berbanding lurus dengan konsentrasi ion klorida dalam sampel (Kemenkes RI, 2010). Metode ISE memiliki keunggulan karena cepat, presisi tinggi, dan tidak dipengaruhi oleh warna serum. Oleh sebab itu, metode ini banyak digunakan untuk pemeriksaan elektrolit secara otomatis, termasuk natrium, kalium, dan klorida.

c. Nilai Rujukan

Nilai rujukan kadar klorida dalam serum atau plasma bervariasi sedikit antar laboratorium, namun kisarannya relatif seragam secara global (Kemenkes RI, 2010). Nilai rujukan kadar klorida serum adalah:

Tabel 1. Nilai Rujukan Klorida

Jenis Spesimen	Nilai Rujukan	Satuan
Serum/Plasma	98 – 108	Mmol/L

Kadar di bawah nilai normal disebut hipokloremia, sedangkan kadar di atas batas normal disebut hiperkloremia. Hipokloremia dapat terjadi pada kondisi muntah berlebihan, alkalosis metabolik, atau gagal ginjal kronik. Sebaliknya, hiperkloremia sering ditemukan pada asidosis metabolik, dehidrasi, atau akibat pemberian cairan infus yang mengandung natrium klorida dalam jumlah tinggi (Yaswir dan Ferawati, 2012).

d. Faktor yang Mempengaruhi Pemeriksaan Klorida

Berbagai faktor dapat memengaruhi hasil pemeriksaan kadar klorida serum, baik yang bersifat biologis maupun praanalitik.

1) Faktor Biologis

Kadar klorida dapat berubah karena variasi fisiologis seperti umur, asupan cairan, dan aktivitas metabolik tubuh. Kadar klorida cenderung lebih rendah pada bayi dan meningkat seiring pertumbuhan. Asupan garam tinggi juga dapat meningkatkan kadar klorida serum (Azizah dan Aliviameita, 2019).

2) Faktor Praanalitik

Kesalahan pada tahap praanalitik memiliki pengaruh besar terhadap akurasi hasil pemeriksaan. Menurut Nordin dkk., (2024), hemolisis merupakan salah satu penyebab utama bias hasil pemeriksaan elektrolit. Pecahnya eritrosit menyebabkan pelepasan cairan intraseluler yang dapat mengencerkan serum dan menurunkan kadar klorida yang terukur.

3) Faktor Penyimpanan dan Waktu Pemeriksaan

Klorida relatif stabil pada suhu ruang selama 24 jam, namun penundaan yang terlalu lama dapat menimbulkan evaporasi atau perubahan konsentrasi akibat redistribusi ion antar kompartemen (Kemenkes RI, 2010). Azizah dan Aliviameita (2019) melaporkan bahwa pemeriksaan yang ditunda lebih dari enam jam menunjukkan peningkatan kadar klorida yang signifikan akibat perubahan keseimbangan ion antara plasma dan eritrosit.

4) Interferensi Alat dan Reagen

Pada metode ISE, keberadaan hemoglobin bebas dari sampel hemolisis dapat mengganggu pembacaan potensial listrik pada elektroda dan menyebabkan hasil pengukuran bias. Kalaria dkk. (2022) menegaskan bahwa efek hemolisis terhadap klorida bersifat tidak konsisten, tergantung pada protokol hemolisis dan kalibrasi alat yang digunakan.

8. Hubungan Kadar Klorida terhadap Perlakuan Pemindahan Sampel Darah dengan Melepas Jarum dan Tanpa Melepas Jarum

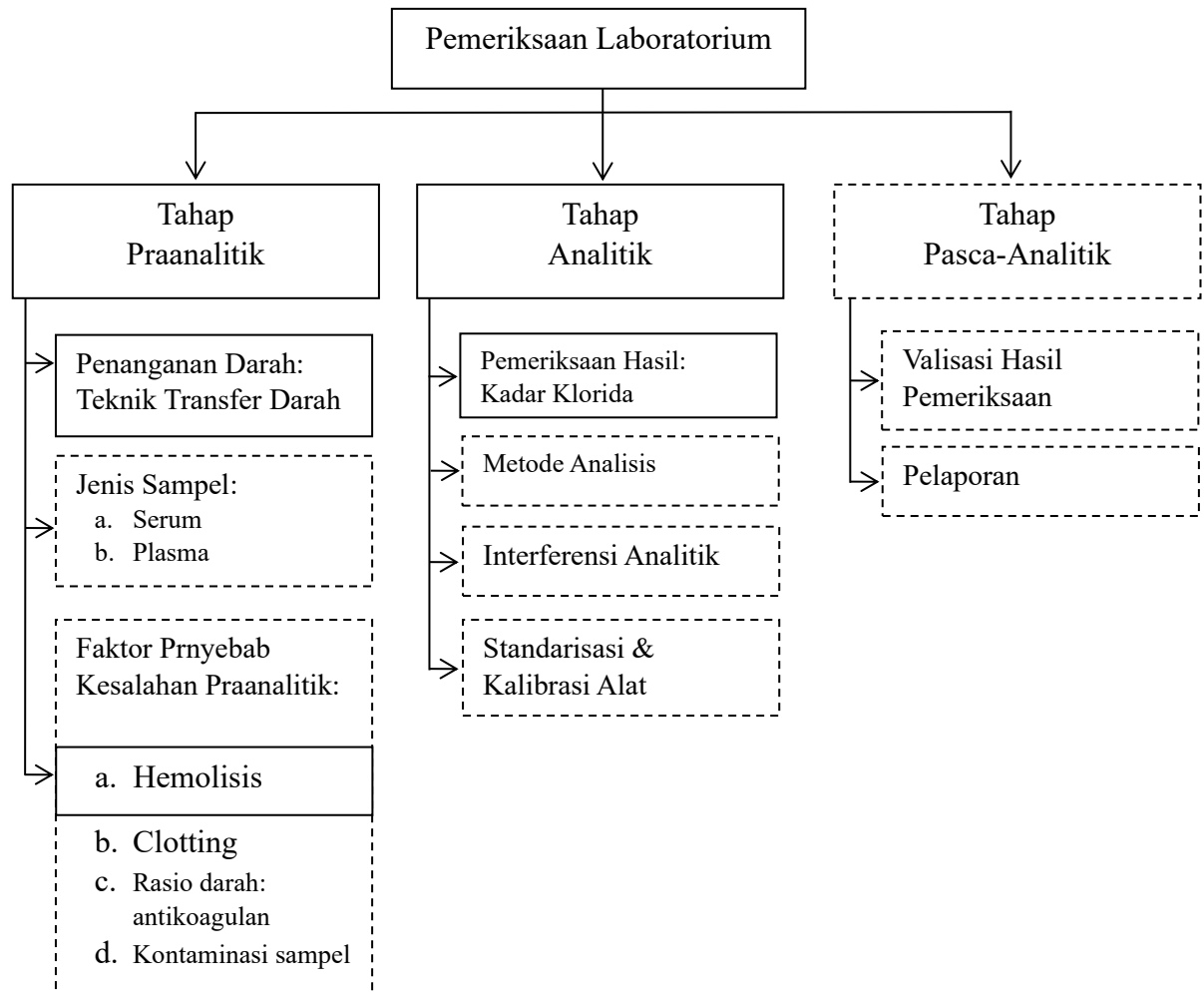
Perlakuan pemindahan sampel darah dari spuit ke tabung pemeriksaan merupakan salah satu faktor praanalitik yang dapat memengaruhi hasil pengukuran kadar klorida serum. Teknik pemindahan yang dilakukan tanpa melepas jarum (*needle-to-tube*) berpotensi menimbulkan hemolisis mekanik akibat tekanan tinggi ketika plunger spuit ditekan untuk memindahkan darah melalui lubang jarum yang sempit. Tekanan ini dapat menyebabkan ruptur eritrosit, sehingga komponen intraseluler masuk ke dalam serum dan mengubah keseimbangan elektrolit yang terukur. Sebaliknya, teknik dengan melepaskan jarum sebelum pemindahan darah memungkinkan darah mengalir lebih perlahan ke dinding tabung, mengurangi tekanan mekanik

serta menurunkan risiko hemolisis (UF Health Medical Laboratories, 2019; WHO, 2010).

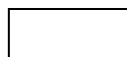
Efek hemolisis terhadap kadar klorida bersifat kompleks. Meskipun klorida bukan elektrolit intraseluler utama seperti kalium, pecahnya eritrosit dapat menyebabkan pengenceran serum dan pergeseran keseimbangan ionik, yang pada akhirnya dapat menurunkan kadar klorida yang terukur (Kalaria dkk., 2022). Selain itu, hemoglobin bebas dari eritrosit yang pecah dapat mengganggu proses pembacaan elektroda ion selektif (ISE) sehingga menghasilkan kadar klorida yang tidak akurat. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa perbedaan protokol hemolisis dapat menghasilkan efek yang berbeda terhadap kadar klorida, sehingga standar metode penanganan sampel sangat diperlukan untuk memastikan hasil pemeriksaan yang valid (Kalaria dkk., 2022; Nordin dkk., 2024).

Dengan demikian, perbedaan teknik transfer darah dari spuit ke tabung, baik dengan maupun tanpa pelepasan jarum, dapat menimbulkan perbedaan tingkat hemolisis, yang pada gilirannya memengaruhi hasil pemeriksaan kadar klorida serum. Teknik dengan pelepasan jarum lebih disarankan karena menurunkan tekanan mekanik dan risiko hemolisis, sehingga hasil pemeriksaan elektrolit seperti klorida lebih stabil dan representatif terhadap kondisi fisiologis sebenarnya.

B. Kerangka Teori



Keterangan :



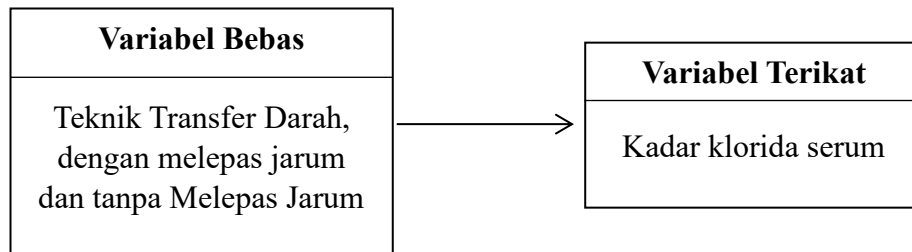
Diteliti



Tidak Diteliti

Gambar 4. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 5. Kerangka Konsep

D. Hipotesis

Terdapat perbedaan berupa penurunan pada kadar klorida dengan teknik transfer darah tanpa melepas jarum dibandingkan dengan pemindahan sampel darah dengan melepas jarum.