

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Tahap Pemeriksaan Laboratorium Klinik

Laboratorium klinik merupakan salah satu fasilitas pelayanan kesehatan yang memiliki peran penting dalam mendukung upaya diagnosis, pemantauan, dan pencegahan penyakit melalui pemeriksaan spesimen biologis manusia. Burtis & Bruns (2013), dalam bukunya “Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics” menjelaskan bahwa laboratorium klinik modern berperan menyediakan data kuantitatif maupun kualitatif yang membantu tenaga medis dalam menegakkan diagnosis dan memantau efektivitas terapi. Oleh karena itu, keberadaan laboratorium klinik dengan sistem mutu yang baik menjadi krusial untuk menghasilkan hasil pemeriksaan yang tepat, andal, dan akurat, sesuai dengan prinsip *total quality management* dalam pelayanan kesehatan laboratorium.

Pemeriksaan laboratorium klinik terdiri atas tiga tahapan utama, yaitu pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik, yang seluruhnya berperan penting dalam menjamin mutu serta keandalan hasil pemeriksaan (Kemenkes RI, 2013).

a. Tahap pra-analitik

Meliputi seluruh proses sebelum analisis spesimen dilakukan, mulai dari persiapan pasien, pengambilan spesimen, penandaan, transportasi, penyimpanan, hingga pemrosesan awal. Kesalahan pada tahap ini merupakan penyebab terbesar ketidakakuratan hasil laboratorium, yakni sekitar 60–70% dari total kesalahan laboratorium (Lippi dan Plebani, 2022). Salah satu aspek penting pada tahap ini adalah waktu pendiaman spesimen sebelum sentrifugasi, terutama untuk pemeriksaan yang sensitif terhadap hemolisis atau degradasi analit seperti bilirubin, enzim hati, dan glukosa. Pendiaman yang terlalu lama dapat menyebabkan perubahan kadar analit akibat aktivitas enzim atau degradasi biologis, sedangkan pendiaman yang terlalu singkat dapat mengakibatkan terbentuknya fibrin yang mengganggu proses sentrifugasi (Lippi dan Plebani 2022).

b. Tahap analitik

Proses inti di mana pengukuran atau pengujian spesimen dilakukan menggunakan metode tertentu sesuai prosedur baku operasional. Validitas hasil pada tahap ini bergantung pada kalibrasi alat, kualitas reagen, kompetensi analis, dan kontrol mutu internal maupun eksternal. Beberapa buku menegaskan bahwa pelaksanaan tahap analitik harus mematuhi standar *quality assurance* dan *traceability* agar hasil yang diperoleh

memiliki akurasi dan presisi tinggi (Burtis *dkk.*, 2013; Praptomo, 2018).

c. Tahap pasca-analitik

Meliputi kegiatan verifikasi, interpretasi, pelaporan, dan penyimpanan hasil pemeriksaan. Pada tahap ini, hasil harus diperiksa kembali sebelum diserahkan kepada tenaga medis untuk memastikan tidak ada kesalahan transkripsi atau interpretasi. Keterlambatan pelaporan atau kesalahan dalam pelaporan hasil dapat berdampak langsung pada keputusan klinis dan keselamatan pasien (Lippi dan Plebani, 2022).

2. Darah

a. Pengertian

Darah merupakan suatu cairan tubuh yang berwarna merah dan kental. Warna merah yang memberi ciri khas darah disebabkan oleh senyawa berwarna merah dalam sel darah merah (Hem) yang tersuspensi dalam darah (Rosita, Cahya dan Arfira, 2019). Sifat kental (viskositas) ini disebabkan karena banyaknya senyawa dengan berbagai macam berat molekul. Viskositas darah atau tepatnya viskositas plasma tergantung pada suhu cairan dan konsentrasi bahan yang terkandung didalamnya.

Sel darah merah merupakan sel dengan populasi terbanyak dalam darah. Sel darah merah mengandung senyawa berwarna merah disebut hemoglobin. Sel darah merah memiliki bentuk bulat

dengan ciri khas tidak berinti sehingga disebut binkonkaf. Sel darah merah tidak selalu berbentuk bikonkaf, tetapi bisa berbentuk lain pada kasus tertentu.

b. Pembekuan Darah

Pembekuan (koagulasi) darah merupakan proses fisiologis yang kompleks dan melibatkan aktivasi jalur intrinsik dan atau ekstrinsik hingga akhirnya membentuk fibrin (Tambayong, 2012). Jalur intrinsik terjadi dalam aliran darah sebagai respons terhadap kerusakan dinding pembuluh darah (Doda *dkk.*, 2020). Proses ini diawali ketika faktor XII (Faktor Hegeman) bersentuhan dengan permukaan asing, misalnya saat darah masuk ke dalam tabung vakum, sehingga mengaktifkan faktor XI (faktor antihemolitik C atau anterior tromboplastin plasma), diikuti oleh aktivasi faktor IX (faktor antihemolitik B atau plasma tromboplasmin). Pada saat yang sama, bahan kimia yang dilepaskan trombosit mempercepat rangkaian reaksi tersebut (Doda *dkk.*, 2020).

Selanjutnya, faktor VIII (faktor antihemolitik A) yang berasal dari trombosit dan sel endotel membentuk kompleks enzim bersama faktor IX untuk mengaktifkan faktor X (faktor Stuart-Prower). Setelah faktor X aktif, enzim prothrombinase mengubah prothrombin (faktor II) menjadi trombin, yang kemudian mengonversi fibrinogen (faktor I) menjadi untaian fibrin. Fibrin yang terbentuk distabilkan oleh faktor XIII. Seluruh rangkaian ini

diikuti oleh proses retraksi bekuan, di mana protein kontraktil dalam trombosit menarik untaian fibrin sehingga mempererat struktur bekuan dan menghasilkan sedikit cairan yang disebut serum, yaitu plasma tanpa faktor pembekuan (Doda *dkk.*, 2020). Untuk mendapatkan serum optimal, darah perlu dibiarkan membeku terlebih dahulu. Aktivator pada beberapa tabung mempercepat proses pembekuan, lalu sampel disentrifugasi untuk memisahkan serum dari sel-sel.

Waktu pendiaman (*clotting time*) yang direkomendasikan berbeda sesuai jenis tabung. Tabung gel separator (SST) biasanya memerlukan waktu sekitar 30 menit agar bekuan stabil dan gel dapat memisahkan sampel dengan baik. Kesalahan dalam tahap ini, seperti *clotting* yang terlalu singkat atau terlalu lama, dapat menyebabkan terbentuknya fibrin dalam serum, hemolisis mikro, atau perubahan komposisi analit yang akhirnya memengaruhi akurasi hasil pemeriksaan laboratorium (LaPelusa dan Dave, 2023)

3. Serum

a. Pengertian Serum

Serum didefinisikan sebagai komponen cair darah yang dihasilkan setelah proses koagulasi (pembekuan) telah selesai, yang membedakannya secara fundamental dari plasma (Vignoli *dkk.*, 2022). Secara komposisi, serum adalah cairan darah yang telah terpisah dari unsur seluler (sel darah merah, sel darah putih, dan

trombosit) dan faktor-faktor pembekuan utama, seperti fibrinogen, protrombin, serta faktor V, VIII, dan XIII.

Serum normal memiliki karakteristik visual berupa cairan yang berwarna kuning jernih. Kandungan utamanya meliputi air, elektrolit, protein spesifik (albumin dan globulin), hormon, dan produk metabolik. Serum menjadi spesimen yang paling sering digunakan untuk pemeriksaan kimia klinik, serologi, dan imunologi karena faktor-faktor pembekuan telah dikeluarkan, sehingga meminimalkan interferensi pada reagen dan metode pengukuran yang digunakan (Moghimi dan Simberg, 2022).

b. Pembuatan Serum

Proses pembuatan serum, terutama pada pemeriksaan kimia klinik baik untuk diagnosis ataupun pemantauan merupakan tahap krusial. Pembuatan serum ini termasuk dalam fase pra-analitik laboratorium dan harus mengikuti prosedur yang ditetapkan oleh institusi terkait.

1) Pengambilan Spesimen

Darah vena diambil dan ditampung dalam tabung spesimen yang tidak mengandung antikoagulan, seperti tabung *plain* atau *Serum Separator Tube*.

2) Koagulasi

Spesimen dibiarkan membeku sempurna pada suhu ruang. Proses koagulasi terjadi ketika fibrinogen diubah menjadi fibrin,

yang membentuk *clot* atau bekuan darah. Pembekuan yang tidak sempurna dapat mengakibatkan sisa fibrinogen atau produk pemecahan fibrinogen yang masih terkandung dalam serum, yang berpotensi mengganggu hasil pemeriksaan. Pembekuan menggunakan tabung *plain* membutuhkan waktu hingga 60 menit, sedangkan pada *Serum Separator Tube* direkomendasikan selama 30 menit (ACL Laboratories, 2020; Mentari *dkk.*, 2024).

3) Sentrifugasi

Setelah terbentuk bekuan pada spesimen, tabung disentrifugasi untuk memisahkan bekuan darah (berada di lapisan bawah) dari cairan serum (berada di lapisan atas). Kecepatan umum yang direkomendasikan adalah sekitar 3000 rpm selama 10 menit (Mentari *dkk.*, 2024).

4) Pemisahan (*Aliquot*)

Serum yang telah terpisah harus segera dipindahkan ke tabung baru (di-*aliquot*) paling lambat dua jam setelah pengambilan spesimen untuk mencegah perubahan konsentrasi analit.

Stabilitas serum dapat terganggu akibat spesimen tidak ditangani dengan baik. Berikut merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas spesimen darah (Jakaria dan Nikma, 2023):

- 1) Terjadi kontaminasi kuman dan bahan kimia
- 2) Terjadi metabolisme sel-sel hidup dalam spesimen

- 3) Terjadi penguapan
- 4) Pengaruh suhu
- 5) Terkena paparan cahaya atau sinar matahari

c. Kelainan Serum

Kualitas serum dievaluasi secara visual untuk mendeteksi adanya kelainan yang berpotensi menimbulkan interferensi pada hasil pemeriksaan. Kelainan spesimen ini merupakan kontributor utama kesalahan pada fase pra-analitik. Tiga jenis kelainan serum yang paling umum, yang dikenal sebagai HIL (Hemolisis, Ikterik, Lipemik), diuraikan sebagai berikut:

1) Hemolisis

Hemolisis adalah kondisi pecahnya membran sel eritrosit (lisis), yang ditandai dengan perubahan warna serum menjadi merah muda, merah, atau merah cerah (Anwari *dkk.*, 2024). Fenomena ini disebabkan oleh pelepasan hemoglobin dan komponen intraseluler lainnya ke dalam serum, seperti kalium (K) dan laktat dehidrogenase (LDH), sehingga menyebabkan peningkatan semu kadar analit tersebut. Hemolisis umumnya diakibatkan oleh kesalahan teknis flebotomi atau penanganan spesimen yang tidak tepat.

2) Lipemik

Serum lipemik ditandai dengan tampilan keruh, seperti susu, atau berkabut (Anwari *dkk.*, 2024). Kondisi ini disebabkan oleh

konsentrasi *lipid* (lemak) yang sangat tinggi, terutama trigliserida, dalam sirkulasi darah. Tingkat kekeruhan lipemik berbanding lurus dengan kadar lipid. Serum lipemik dapat menyebabkan interferensi pada metode pengukuran fotometrik yang digunakan pada alat kimia klinik otomatis, yang berakibat pada hasil pemeriksaan yang tidak akurat.

3) Ikterik

Serum ikterik memiliki warna kuning pekat hingga jingga yang lebih gelap dibandingkan serum normal. Kelainan ini diakibatkan oleh peningkatan kadar pigmen bilirubin dalam serum. Secara klinis, ikterus (kuning) terjadi ketika kadar bilirubin plasma melebihi 2 mg/dL (normalnya <1,2 mg/dL). Kehadiran pigmen bilirubin yang tinggi (terutama bilirubin *direct*) dalam serum dapat mengganggu beberapa prosedur pengukuran karena serapan cahayanya yang kuat, mempengaruhi akurasi hasil pemeriksaan biokimia tertentu (Anwari *dkk.*, 2024).

4. Serum Separator Tube (SST)

Serum Separator Tube (SST) merupakan tabung vakum pengumpul darah yang secara khusus dirancang untuk memperoleh serum melalui proses pemisahan fisik antara komponen seluler dan cairan darah (Kang *dkk.*, 2025). SST dilengkapi dengan silika atau trombin serta *barrier gel* yang memiliki densitas menengah sehingga

mampu bermigrasi ke posisi stabil di antara serum dan bekuan darah setelah proses sentrifugasi. Kombinasi kedua komponen ini memungkinkan pembentukan serum yang lebih cepat, stabil, dan minim kontaminasi oleh sel, sehingga SST menjadi salah satu tabung yang paling direkomendasikan dalam pemeriksaan kimia klinik, imunologi, serta berbagai parameter biokimia lainnya. Tabung ini bekerja dengan mempercepat pembekuan darah dan menciptakan pemisahan optimal antara fase sel dan fase cair melalui gel separator pada saat diberi gaya sentrifugal (Kang *dkk.*, 2025).



Gambar 1. *Serum Separator Tube* (SST)

Sumber: KS Medical, 2025.

Mekanisme kerja SST dimulai pasca pengambilan darah, ketika *clot activator* mempercepat proses pembentukan fibrin sehingga bekuan darah terbentuk secara lengkap dalam kisaran 5–30 menit, bergantung pada jenis tabung yang digunakan. SST konvensional memerlukan waktu pembekuan sekitar 30 menit, sedangkan SST jenis *quick-clot* memiliki

aktivator berbasis trombin yang mampu mempercepat pembekuan hingga lima menit (Kang *dkk.*, 2025). Setelah proses tersebut selesai, sampel disentrifugasi sehingga *barrier gel* akan bergerak ke posisi tengah dan membentuk lapisan pemisah stabil yang mencegah terjadinya kontak lanjutan antara bekuan dengan serum, menjaga kestabilan analit, dan mempermudah proses analisis di instrumen otomatis (Ercan *dkk.*, 2018; Kang *dkk.*, 2025).

Kelebihan penggunaan *Serum Separator Tube* (SST) dalam pemeriksaan kimia klinik terutama berkaitan dengan kemampuannya meningkatkan efisiensi proses praanalitik dan kualitas sampel yang dihasilkan. Kehadiran silika *barrier gel* memungkinkan pembentukan serum yang lebih cepat serta pemisahan yang lebih stabil, sehingga mengurangi risiko kontaminasi seluler, hemolisis, maupun keberadaan mikrofibrin yang dapat mengganggu pembacaan instrumen otomatis (Setiawan, Ulfah dan Muji, 2021; Kang *dkk.*, 2025). Selain itu, keberadaan gel pemisah membuat serum tetap berada pada posisi stabil di tabung primer pasca sentrifugasi, yang secara praktis meminimalkan pemindahan sampel ke tabung lain dan mengurangi peluang terjadinya kesalahan pra-analitik (Ercan *dkk.*, 2018).

SST juga memiliki sejumlah keterbatasan yang perlu diperhatikan. *Gel separator* diketahui dapat menyebabkan adsorpsi terhadap obat atau molekul kecil yang bersifat lipofilik selama penyimpanan jangka panjang, sehingga berpotensi menurunkan konsentrasi sebenarnya dari

zat tersebut di dalam serum. Selain itu, perbedaan komposisi gel dan aktivator pembekuan antarprodusen dapat menghasilkan bias analitik pada parameter tertentu (Kang *dkk.*, 2025).

5. Bilirubin

a. Pengertian Bilirubin

Bilirubin merupakan senyawa yang tidak memiliki fungsi fisiologis dan akan dibuang, berupa pigmen *orange*-kuning yang berasal dari katabolisme hem yang terkandung dalam hemoglobin (Krihariyani *dkk.*, 2024). Sel darah merah yang sudah tua dihancurkan oleh sel makrofag dan hemoglobin yang dibebaskan diolah kembali. Hem yang dipisahkan dari hemoglobin diolah menjadi senyawa berwarna kuning dan dinamakan bilirubin *indirect*. Senyawa ini dibawa ke hati dalam bentuk yang terikat dengan protein plasma, seperti albumin sehingga bilirubin *indirect* tidak larut dalam air. Bilirubin *indirect* diangkut menuju hati dan mengalami biotransformasi menjadi bilirubin *direct* yang larut dalam air lalu disekresikan melalui cairan empedu, urine dan feses.

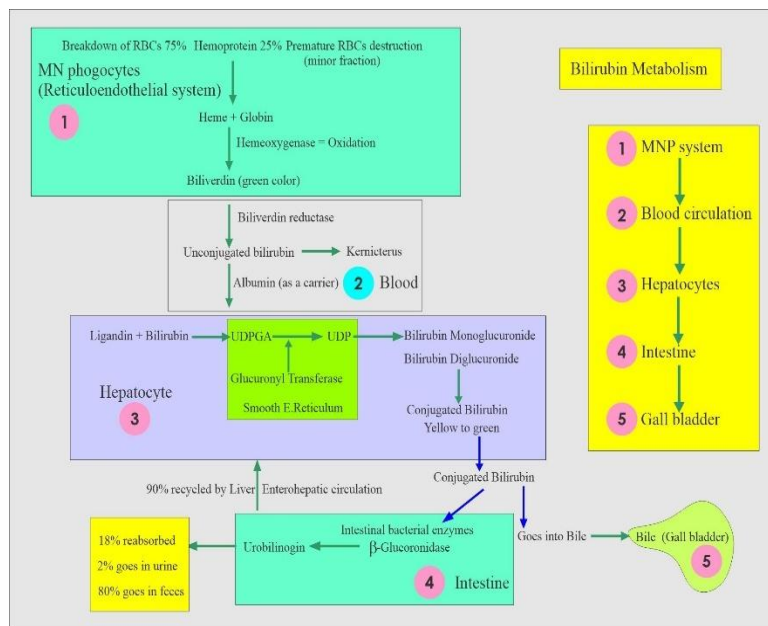
Pengukuran bilirubin dalam darah sering dilakukan untuk menilai fungsi hati. Kadar bilirubin dalam serum darah diukur dalam bentuk bilirubin total, bilirubin *indirect* dan bilirubin *direct* (Awaluddin, 2023). Bilirubin total merupakan kombinasi bilirubin *indirect* (tak terkonjugasi) dan bilirubin *direct* (terkonjugasi) dalam serum darah. Pemeriksaan kadar Bilirubin total merupakan salah

pemeriksaan penting dalam laboratorium klinik untuk menilai fungsi hati dan saluran empedu, serta sebagai indikator hiperbilirubinemia, hemolisis, atau gangguan ekskresi bilirubin.

Bilirubin total merupakan pemeriksaan yang dijadikan pilihan utama untuk pemeriksaan fungsi hati jika dibandingkan dengan bilirubin *indirect* dan bilirubin *direct*. Apabila kadar bilirubin total meningkat, maka bilirubin *indirect* dan bilirubin *direct* diperiksa untuk menentukan penyebab (Awaluddin, 2023). Penyebab peningkatan bilirubin *indirect* adalah hemolisis, reaksi transfuse, anemia pernisiiosa, dan hepatitis. Sedangkan penyebab peningkatan kadar bilirubin *direct* seperti, hepatitis alkoholik, sirosis hati, penyakit kandung empedu, dan batu empedu.

b. Proses Pembentukan Bilirubin

Bilirubin merupakan pigmen empedu berwarna *orange-kuning*, produk pemecahan heme dalam sel-sel makrofag sistem retikuloendotelial. Sebagian besar (85-90%) bilirubin berasal dari penguraian hemoglobin dari sel darah merah yang sudah tua (Sutjahjo, 2015). Produksi normal bilirubin dalam sehari berkisar 0,2–0,3 gram, sebagian besar berasal dari penghancuran sel eritrosit yang sudah tua.



Gambar 2. Metabolisme Bilirubin

Sumber: Bhutta dkk., 2014.

Mekanisme pembentukan dan metabolisme bilirubin melibatkan tiga tahap utama yang berlangsung di berbagai organ, yaitu sistem fagosit mononuklear (SRE), hati, usus, darah, dan ginjal. Berikut adalah uraian proses pembentukan bilirubin (Sutjahjo, 2015).

1) Tahap Pra-Hepatik (Pembentukan Bilirubin *Indirect*)

Proses dimulai dengan pemecahan hemoglobin (Hb) dari penghancuran sel eritrosit yang sudah tua. Proses ini terjadi di limpa, hepar, dan sumsum tulang oleh sistem fagosit mononuklear (SRE).

- a) Pengikatan dengan Albumin : bilirubin yang dibentuk di luar hati kemudian dibawa ke hepar melalui darah.

Bilirubin ini berikatan erat dengan albumin di dalam plasma darah.

- b) Pembentukan Bilirubin *Indirect* : bilirubin yang berikatan dengan albumin ini disebut *Unconjugated* Bilirubin (B1 atau Bilirubin *Indirect*).
- c) Sifat Bilirubin *Indirect*: tidak larut dalam air sehingga tidak dapat diekskresikan melalui urine. Selain itu, bilirubin *indirect* larut dalam lemak, dan jika kadarnya meningkat drastis (tidak berikatan dengan protein), bilirubin *indirect* dapat menjadi toksik terhadap otak, terutama pada bayi.

2) Tahap Intra-Hepatik (Konjugasi Bilirubin *Direct*)

Bilirubin *indirect* memiliki struktur yang terbungkus rapat oleh ikatan hidrogen, sangat lipofilik pada pH netral, sehingga bilirubin *indirect* hampir tidak terlarut dalam plasma darah. Bilirubin *indirect* segera berikatan secara dengan albumin plasma. Ikatan dengan albumin sangat kuat, sehingga bilirubin *indirect* hampir tidak ditemukan dalam darah.

- a) Pelepasan Albumin dan Pengikatan Ligandin: albumin bertindak sebagai pembawa, mengangkut bilirubin ke hati sekaligus mencegah endapan bilirubin di jaringan serta filtrasi ginjal berlebih. Pada permukaan hepatosit,

albumin dilepaskan, dan bilirubin diikat oleh protein ligandin.

- b) Proses Konjugasi: bilirubin yang terikat ligandin dibawa ke retikulum endoplasma sel hepatosit. Setibanya di hepatosit, bilirubin *indirect* mengalami reaksi glukuronidasi oleh enzim UDP-glukuronosil transferase (UTDGPT1A1) menjadi bilirubin diglukuronida (bentuk terkonjugasi).
- c) Pembentukan Bilirubin *Direct* : konjugasi (penambahan dua gugus asam glukuronat) membuat bilirubin menjadi larut dalam air. Bentuk diglukuronida inilah yang selanjutnya dapat diekskresikan ke dalam empedu dan dilewatkan ke usus untuk dikeluarkan (sebagai urobilinogen dan derivatnya). Hasil konjugasi ini adalah bilirubin terkonjugasi (Bilirubin *Direct* atau bilirubin glukoronida).
- d) Sifat Bilirubin *Direct* : larut dalam air, tidak toksik, dan berikatan lemah dengan albumin. Bilirubin *direct* sebagian besar terdiri atas bilirubin diglukuronida (90%). Jika kadarnya berlebihan dalam darah, Bilirubin *direct* dapat diekskresikan melalui urine.

3) Tahap Pasca-Hepatik (Ekskresi dan Daur Ulang)

Pada keadaan normal, hanya bilirubin *direct* yang dapat diekskresikan. Bilirubin *direct* selanjutnya diekskresikan untuk dibuang.

a) Ekskresi ke Usus

Diekskresikan melalui duktus biliaris ke dalam usus halus sebagai empedu.

b) Pembentukan Urobilinogen

Di usus halus, bilirubin *direct* diubah menjadi urobilinogen (yang tidak berwarna) melalui proses dekonjugasi yang dilakukan oleh bakteri beta diglukuronidase.

c) Jalur Akhir Urobilinogen

Sebagian besar urobilinogen diekskresikan bersama feses sebagai sterkobilin. Sebagian kecil urobilinogen diabsorpsi, masuk kembali ke sirkulasi intra-hepatik (darah) dan diekskresikan ulang oleh saluran empedu. Sebagian yang diabsorpsi ini akhirnya dikeluarkan bersama urine sebagai urobilin (melalui ginjal).

c. Metode dan Prinsip Pemeriksaan Bilirubin Total

Kadar bilirubin dalam serum darah dapat diukur dengan berbagai macam metode. Metode yang umum digunakan yaitu

metode spektrofotometri dan metode lain yang dapat digunakan seperti metode kromatografi dan elektroforesis kapiler.

Metode yang paling umum digunakan untuk pemeriksaan kadar bilirubin adalah berdasarkan reaksi diazo yang pertama kali dijelaskan oleh Ekrich pada tahun 1883. Dalam metode ini, bilirubin bereaksi dengan *diazotized sulfanilic acid* yang menghasilkan ungu kemerahan yang selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer. Jendrassik dan Grof pada tahun 1938 menjelaskan tentang pemeriksaan bilirubin total, lalu dimodifikasi oleh Doumas dan Coleaue sehingga dijadikan metode pemeriksaan bilirubin total oleh *the Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Nugraha & Badrawi, 2018).

Warna yang terbentuk akibat reaksi antara reagen dengan serum diukur secara fotometrik dan intensitasnya sebanding dengan konsentrasi bilirubin dalam sampel. Metode ini dijelaskan sebagai berikut:

- 1) Metode Jendrassik–Gróf (reaksi diazo)

Sampel serum ditambahkan reagen *diazotized* (misalnya campuran asam sulfanilat + natrium nitrit) dalam suasana asam. Untuk mengukur *total* bilirubin, digunakan akselerator (misalnya kafein, natrium benzoat, atau urea) yang melarutkan dan memutus ikatan albumin agar bilirubin tak terkonjugasi dapat bereaksi (AuYoung dkk., 2022). Bilirubin tak terkonjugasi

pun terkonjugasi membentuk azobilirubi. Azobilirubin diukur dengan spektrofotometer (panjang gelombang 530–580 nm). Kadar bilirubin total dihitung dari intensitas absorbans kolorimetri ini. Secara klinis, metode ini telah menjadi standar rujukan untuk bilirubin total karena mengukur kedua fraksi bilirubin (AuYoung *dkk.*, 2022).

2) Metode Van den Bergh (Malloy–Evelyn)

Metode Malloy–Evelyn (1930an) juga menggunakan reaksi diazo. Dalam metode ini bilirubin tak terkonjugasi diekstraksi dengan metanol untuk mencegah interferensi, dan kemudian ditambahkan reagen diazo. Tanpa akselerator, hanya bilirubin terkonjugasi yang bereaksi langsung dengan diazo (disebut “bilirubin *direct*”), sedangkan bilirubin tak terkonjugasi harus ditentukan secara tidak langsung (selisih total minus langsung).

d. Nilai Rujukan Kadar Bilirubin Total

Nilai rujukan kadar bilirubin total dapat bervariasi antar laboratorium tergantung pada metode pemeriksaan dan karakteristik populasi yang diuji. Namun secara umum, beberapa literatur laboratorium klinik seperti Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (Burtis *dkk.*, 2013) dan Depkes RI (2019), kadar normal bilirubin total pada individu dewasa sehat berkisar antara 0,3–1,2 mg/dL. Pada pasien dengan ikterus, kadar bilirubin

dapat mencapai lebih dari 3 mg/dL dan mencapai nilai kritis apabila kadar bilirubin melebihi 15 mg/dL (Nugraha dan Badrawi, 2018).

1) Prenatal

Tabel 2.1 Nilai Rujukan Kadar Bilirubin Total pada Prenatal

Bilirubin Total	mg/dL		μmol/L	
	Baru Lahir	Prematur	Prematur	Normal
Tali pusat	< 2,0	< 2,0	< 34	< 34
0-1 hari	< 8,0	1,4 – 8,7	< 137	24 - 149
1-2 hari	< 12,0	3,4 – 11,5	< 205	58 - 197
3-5 hari	< 12,0	1,5 – 12,0	< 274	26 - 205

Sumber: Nugraha dan Badrawi, 2018.

2) Bayi >5 hari, anak-anak dan dewasa

Tabel 2.2 Nilai Rujukan Kadar Bilirubin Total

Keterangan	mg/dL	mmol/L
>5 hari – 60 tahun	0,3 – 1,2	5 – 12
60 – 90 tahun	0,2 – 1,1	3 – 19
>90 tahun	0,2 – 0,9	3 - 15

Sumber: Nugraha dan Badrawi, 2018.

e. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kadar Bilirubin Total

Kadar bilirubin total merupakan salah satu parameter penting dalam pemeriksaan fungsi hati dan evaluasi kondisi klinis pasien. Kadar bilirubin total dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor teknis laboratorium. Terjadinya kesalahan dalam pemeriksaan bilirubin dapat mengakibatkan hasil yang dikeluarkan laboratorium menjadi tidak akurat. Kesalahan ini sering terjadi akibat pemrosesan sampel (Rusady, 2022; Patmasari, Suratno dan Purbayanti, 2025).

1) Cahaya

Paparan cahaya merupakan salah satu penyebab utama kesalahan pra-analitik pada pemeriksaan bilirubin. Bilirubin memiliki struktur tetrapireol yang sangat sensitif terhadap cahaya sehingga mudah mengalami fotoisomerisasi, yaitu perubahan menjadi isomer yang lebih polar. Isomer-isomer ini tidak stabil dan tidak ikut bereaksi dalam metode kolorimetri, termasuk metode Jendrassik–Grof yang mengukur pembentukan kompleks azobilirubin. Akibatnya, sampel yang terpapar cahaya akan mengalami penurunan konsentrasi bilirubin secara progresif, bahkan dapat mencapai penurunan signifikan dalam waktu singkat. Oleh karena itu, sampel bilirubin harus dilindungi dari cahaya dengan penyimpanan dalam wadah gelap atau dibungkus aluminium foil untuk mencegah degradasi fotokimia.

2) Reagen

Reagen memiliki peran penting dalam memastikan reaksi kimia bilirubin berlangsung optimal. Pemeriksaan bilirubin menggunakan reaksi diazo yang memerlukan *diazotized sulfanilic acid* (DSA) untuk membentuk kompleks azobilirubin berwarna. Reagen yang rusak, terkontaminasi, kadaluwarsa, atau disimpan pada suhu yang tidak sesuai dapat menyebabkan pembentukan DSA menjadi tidak sempurna.

Kondisi reagen yang tidak stabil ini akan menurunkan intensitas warna yang terbentuk, sehingga absorbansi yang dibaca spektrofotometer menjadi lebih rendah. Akibatnya, hasil bilirubin akan muncul lebih rendah dari nilai sebenarnya.

3) Ketelitian pipet

Ketelitian dalam pipet merupakan aspek kritis pada pemeriksaan bilirubin karena proses kolorimetri sangat bergantung pada proporsi yang tepat antara sampel dan reagen. Kesalahan pengambilan volume, baik kurang maupun lebih, akan mengubah stoikiometri reaksi dan memengaruhi pembentukan kompleks azobilirubin. Ketidaktepatan volume sampel dapat menghasilkan absorbansi yang lebih rendah atau lebih tinggi dari seharusnya, sehingga menimbulkan kesalahan acak yang berdampak pada ketidakpresisian dan variabilitas hasil pemeriksaan.

4) Suhu

Suhu juga berpengaruh besar terhadap stabilitas bilirubin dan kualitas hasil pemeriksaan. Bilirubin mudah mengalami degradasi kimia pada suhu tinggi akibat peningkatan reaksi oksidatif maupun denaturasi protein pembawa. Pada tahap analitik, reaksi pembentukan azobilirubin juga membutuhkan suhu yang stabil agar reaksi berlangsung optimal. Suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat degradasi bilirubin maupun

reagen, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat memperlambat reaksi kimia dan menurunkan intensitas warna yang terbentuk. Kedua kondisi tersebut dapat menghasilkan bias negatif pada nilai bilirubin.

6. Hubungan Bilirubin Total dengan Waktu Pendiaman

Proses *pra-analitik* pemeriksaan bilirubin sangat dipengaruhi oleh penanganan sampel, khususnya durasi pendiaman darah sebelum pemisahan serum. Pedoman laboratorium merekomendasikan agar serum dipisahkan dari sel darah paling lambat 1–2 jam setelah pengambilan darah untuk menjaga stabilitas analit (Sari, Kesuma dan Kusumawati, 2023). Serum yang disimpan terlalu lama pada suhu ruang dapat mengalami kerusakan komponen, terutama protein, yang sangat peka terhadap pengaruh fisik maupun kimia.

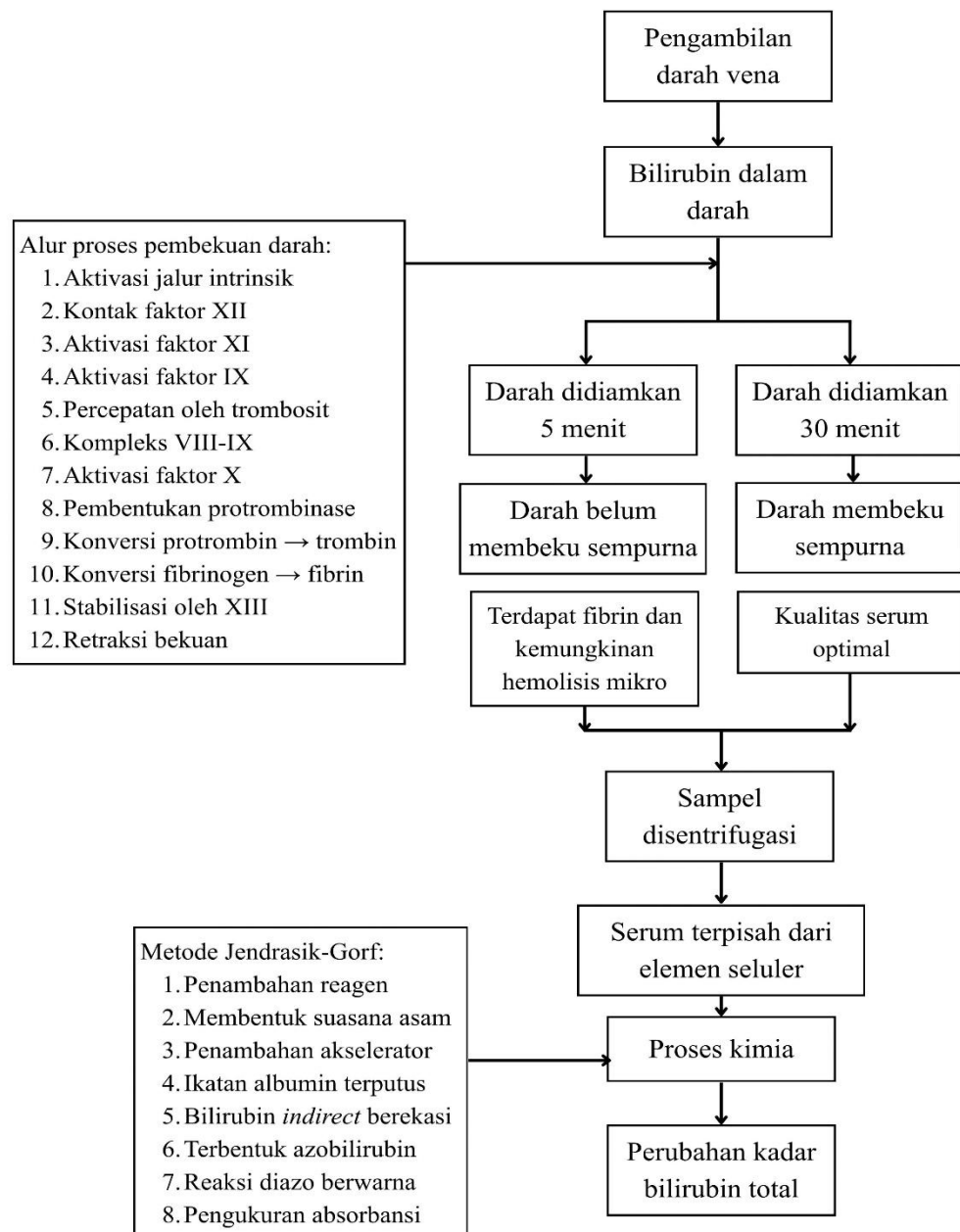
Bilirubin terbentuk dari hemoglobin dan merupakan bagian dari komponen protein, sehingga sifatnya juga mudah mengalami perubahan bila kondisi penyimpanan tidak optimal. Ketika serum dibiarkan dalam waktu lama, proses-proses degradasi dapat terjadi dan memengaruhi stabilitas bahan-bahan yang terkandung di dalamnya, termasuk bilirubin (Patmasari, Suratno dan Purbayanti, 2025). Protein dalam serum sangat rentan mengalami perubahan struktur akibat berbagai pengaruh kimia atau fisik, suatu proses yang dikenal sebagai denaturasi. Denaturasi dapat mengubah sifat-sifat asli protein dan memengaruhi reaktivitas bilirubin dalam serum. Selain itu, bilirubin dalam serum merupakan senyawa yang

mudah mengalami fotodegradasi atau kerusakan akibat paparan cahaya, sehingga konsentrasinya dapat menurun ketika terkena cahaya, baik dari sumber alami maupun buatan (Sapitri, 2025).

Pada kondisi serum segar, perubahan semacam ini tidak terjadi karena pemeriksaan dilakukan segera setelah pemisahan serum, sehingga struktur protein relatif tetap stabil. Namun, semakin lama serum dibiarkan, risiko terjadinya perubahan struktur protein meningkat dan dapat memengaruhi komponen lain yang saling berikatan. Bilirubin yang mengalami perubahan akibat denaturasi protein dapat membentuk kompleks warna yang berbeda saat bereaksi dengan reagen (Murdeswar dan Anjum, 2023). Oleh karena itu, pemeriksaan segera setelah pemisahan serum membantu mempertahankan kestabilan bilirubin (Zunaidi, 2011).

Hasil serupa juga dipaparkan oleh Fadhilah dkk (2019), terdapat pengaruh yang signifikan terhadap lamanya serum terpapar cahaya sebanyak 10% dalam kurun waktu 1 jam dan 25% dalam kurun waktu 3 jam. Menurut Hardjoeno (2003), untuk mencegah risiko kerusakan sampel, pemeriksaan laboratorium sebaiknya dilakukan di tempat yang minim cahaya, pada suhu rendah, serta menggunakan tabung atau botol yang dibungkus kertas gelap atau aluminium foil. Upaya ini bertujuan menghambat denaturasi protein dalam serum sehingga kadar bilirubin total tetap stabil, dengan waktu pemeriksaan ideal dilakukan dalam rentang 2 hingga 3 jam (Patmasari, Suratno dan Purbayanti, 2025).

B. Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori

C. Hipotesis

Ada perbedaan kadar bilirubin total menggunakan *Serum Separator Tube* yang didiamkan selama 5 menit dan 30 menit sebelum disentrifus.