

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Validitas dan sumber kesalahan laboratorium

Menjamin mutu hasil pemeriksaan laboratorium diupayakan meminimalkan kesalahan pada setiap tahapan kerja. Kesalahan dalam pelayanan laboratorium dikategorikan menjadi tiga, yaitu kesalahan praanalitik, kesalahan analitik, dan kesalahan pasca analitik. Menurut (Atika dkk., 2020) kesalahan tahap praanalitik memberikan kontribusi paling besar dengan persentase kesalahan mencapai 60–70%. Kesalahan tahap praanalitik berkontribusi signifikan terhadap total kesalahan laboratorium (46-77,1%), dengan hemolisis sebagai penyebab terbesar kesalahan praanalitik yang mencapai 53,2% (Sari, 2023).

Penyebab utama hemolisis sering kali berasal dari faktor *in vitro* akibat kesalahan prosedur flebotomi (pengambilan darah). Kerusakan membran eritrosit yang menyebabkan pelepasan komponen intraseluler ini umumnya dipicu oleh tekanan mekanis yang berlebihan, seperti penggunaan jarum dengan ukuran terlalu kecil, penarikan piston spuit terlalu cepat, atau pencampuran tabung sampel yang terlalu agresif (Marques, 2020).

2. Darah

a. Pengertian darah

Darah merupakan cairan penting yang bersirkulasi di dalam tubuh dengan berbagai manfaat penting. Salah satu peran terpentingnya adalah respirasi, ekskresi, pemeliharaan keseimbangan asam basa normal, nutrisi, pengaturan keseimbangan air, pengaturan suhu tubuh, pengangkutan hormon, garam, dan pengangkutan berbagai vitamin esensial yang dibutuhkan tubuh dan lain-lain. Darah memiliki berbagai komponen yang menjalankan berbagai peran penting. Darah terdiri dari sel darah merah, sel darah putih, trombosit, plasma dan lain-lain (Batra dkk., 2022).

b. Komposisi darah

Setiap individu secara umum memiliki sekitar 70 ml darah per kilogram berat badan. Sekitar 50-60% dari total darah terdiri dari cairan, sementara sisanya terdiri dari sel-sel darah. Bagian cairan dari darah dikenal sebagai plasma, yang terutama terdiri dari 90% air dan 10% bahan-bahan terlarut seperti ion-ion, glukosa, asam amino, hormon dan berbagai protein (Chen dkk., 2023).

Darah menyediakan permukaan untuk pertukaran gas pada paru-paru dan daerah seluler. Gas-gas ini membantu respirasi seluler dan menghasilkan energi seluler seperti *Adenosin Trifosfat* (ATP adalah koin energi sel). Energi ini digunakan dalam aktivitas seluler dan perbaikan seluler. Darah adalah cairan kental yang terbentuk dari

elemen seluler yang tersuspensi dalam plasma. Seluler terdiri dari: Eritrosit (*Red Blood Cell*), Leukosit (*White Blood Cell*) dan Trombosit. Plasma adalah cairan kental, tembus cahaya, kekuningan yang terdiri dari air (90%), protein (7%), garam organik (1%), dan senyawa organik (2%) seperti asam amino, lipid, dan vitamin. Volume darah total sekitar 5 liter (tergantung ukuran tubuh). Di luar pembuluh darah, darah mengalami proses kompleks yang disebut koagulasi atau pembentukan bekuan, yang berperan penting dalam memperbaiki pembuluh darah yang rusak dan mencegah kehilangan darah (Mishra dkk., 2023).

c. Eritrosit

Sel darah merah atau eritrosit adalah komponen utama dalam darah yang berperan dalam mengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh tubuh dan membawa karbon dioksida kembali ke paru-paru untuk dikeluarkan. Eritrosit mengandung hemoglobin, pigmen darah yang memberikan warna pada darah dan memungkinkan darah mengangkut oksigen (Firdayanti dkk., 2024).

Pada umumnya setiap laki-laki dewasa dalam 1 mikro liter atau 1 mm^3 darah mengandung sekitar 4,5 - 6,3 juta eritrosit, sedangkan perempuan dewasa mengandung sekitar 4,2 - 5,5 juta eritrosit. Laki-laki memiliki metabolisme yang lebih tinggi daripada perempuan maka jumlah eritrositnya lebih tinggi, dan konsentrasi eritrosit yang tinggi diperlukan untuk menyediakan pasokan oksigen yang

dibutuhkan untuk berlangsungnya metabolisme sel-sel. eritrosit mempunyai dua fungsi utama, yaitu mengangkut oksigen dari paru-paru serta mengedarkannya ke jaringan lain. Eritrosit juga mengangkut karbon dioksida yang dibawa dari jaringan ke paru-paru (Saadah, 2018).

d. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) merupakan (*metaloprotein*) protein yang mengandung zat besi di dalam tubuh yang memberi warna pada sel darah merah. Oksigen merupakan sumber energi utama yang sangat penting bagi tubuh. Oksigen memasuki eritrosit dan bergabung dengan hemoglobin membentuk oksihemoglobin (HbO_2), yang memberikan warna merah terang untuk darah. Setelah melepas oksigen dari oksihemoglobin ke sel-sel tubuh, darah yang telah melepaskan oksigennya (*deoxyhemoglobin*) dan membawa sejumlah kecil karbon dioksida dari sel-sel tubuh kembali ke paru-paru untuk melepaskan karbon dioksida. *Deoxyhemoglobin* memberikan warna merah gelap (rona kebiruan) untuk darah (Dewi dkk., 2023).

Hemoglobin pada manusia memiliki nilai normal yaitu pada perempuan 12-15 g/dL dan pada laki-laki 13-17 g/dL. Rendahnya kadar Hb dalam tubuh akan mengakibatkan gejala lemas, lelah dan lesu yang merupakan indikasi rendahnya kadar hemoglobin dalam darah yang mengakibatkan anemia. Pemeriksaan kadar hemoglobin bisa menggunakan metode *cyanmethemoglobin* (spektrofotometer) yang

merupakan metode internasional (standar emas) untuk mengukur hemoglobin bebas dengan menggunakan reagen *Drabkin's*. Selain menggunakan spektrofotometer ada juga metode POCT (*Point of Care Testing*) menggunakan alat digital portabel dan *strip test* khusus hemoglobin. Penggunaan POCT praktis dan cepat, sering digunakan untuk skrining awal pemeriksaan hemoglobin, biasanya donor darah PMI (Palang Merah Indonesia) atau puskesmas (Dewi dkk., 2023).

3. Serum

a. Pengertian serum

Serum adalah bagian cair dari darah yang tidak mengandung sel darah maupun fibrinogen karena protein dalam darah telah diubah menjadi fibrin dan terakumulasi bersama sel. Serum didapatkan dengan dua cara, yaitu dengan sentrifugasi darah (*whole blood*) dan mendiamkan darah hingga serum keluar secara spontan (Simamora dkk., 2025). Serum adalah bagian darah yang cair setelah darah membeku. Serum diperoleh setelah darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500-2000 rpm (*revolution per minute*) selama 10 menit. Secara normal, cairan yang tampak akan berwarna kuning jernih (Sugiarti dan Sulistianingsih, 2021).

Sentrifus (*centrifuge*) adalah alat yang digunakan untuk memisahkan partikel organel. Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas serum adalah sentrifugasi. Sentrifugasi merupakan suatu teknik pengendapan yang dilakukan untuk memisahkan endapan dari

suatu suspensi. Kecepatan tersebut dinyatakan dalam rpm (*revolution per minute* atau putaran per menit) (Sebayang dkk., 2020). Serum adalah bagian cair dari darah yang tidak dicampur dengan anti koagulan. Jika darah dibiarkan diam dalam tabung selama 5-10 menit, proses pembekuan akan terjadi. Hal ini menyebabkan terpisahnya darah menjadi dua komponen yaitu serum dan bekuan darah. Serum merupakan cairan yang berwarna kuning sedangkan bekuan darah yang berbentuk massa padat berwarna merah (Flores dkk., 2020).

b. Macam-macam serum

1) Serum Normal

Serum normal adalah serum dengan tampilan yang jernih dan berwarna kuning muda (*straw-colored*). Secara visual, serum ini tidak menunjukkan adanya kekeruhan (turbiditas) akibat lipid ataupun pewarnaan merah akibat hemoglobin. Dalam validasi sampel, serum dikategorikan normal apabila konsentrasi hemoglobin bebas di dalamnya sangat rendah, yaitu kurang dari 20 mg/dL ($< 0,02$ g/dL). Kondisi ini merupakan standar kualitas yang untuk pemeriksaan kimia klinik, termasuk aktivitas enzim ALT (*Alanine Aminotransferase*), karena tidak memiliki gangguan spektral maupun hamburan cahaya yang dapat memengaruhi pembacaan fotometer (Flores dkk., 2020).

2) Serum Lipemik

Serum lipemik adalah serum yang tampak keruh akibat meningkatnya kadar lipoprotein di dalam darah. Kekeruhan ini terjadi karena adanya penumpukan partikel lipoprotein. Namun, tidak semua jenis lipoprotein dapat menimbulkan kekeruhan. Kilomikron merupakan penyebab utama karena memiliki ukuran paling besar, yaitu sekitar 70–1000 nm (nano meter), sehingga memberikan kontribusi paling besar terhadap tampilan keruh pada serum. (Sugiarti dan Sulistianingsih, 2021).

Kekeruhan dapat berpengaruh terhadap penyerapan (absorbansi) spektrofotometer pada semua panjang gelombang, sehingga dapat menyebabkan kesalahan pada nilai analisa. Hampir semua pengukuran yang menggunakan spektrofotometer dengan penyerapan dan penghamburan cahaya terganggu dengan keadaan lipemik. Kualitas serum dapat dipengaruhi oleh makanan seperti, glukosa, lemak dan kalsium. Oleh karena itu pengambilan sampel setelah makan dapat menjadi salah satu faktor penyebab kesalahan praanalitik (Sugiarti dan Sulistianingsih, 2021).

3) Serum Ikterik

Serum ikterik adalah serum yang berwarna kuning kecoklatan akibat adanya hiperbilirubinemia (peningkatan kadar bilirubin dalam darah). Serum ikterik dapat mempengaruhi pengukuran pada panjang gelombang 400-500 nm (nano meter)

akibat warna kuning coklat dari spesimen, sehingga tidak mampu dibaca oleh fotometer (Sujono dkk., 2023).

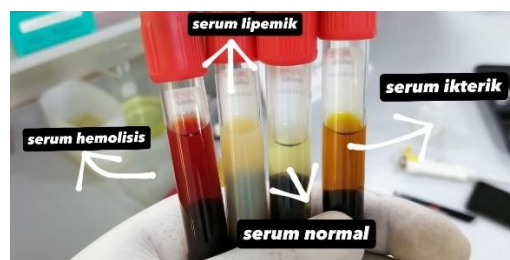
4) *Pooled sera*

Pooled sera merupakan teknik penggabungan beberapa sampel serum individu menjadi satu sampel campuran yang homogen untuk tujuan pemeriksaan atau penelitian tertentu. Metode ini sering digunakan untuk memperoleh volume sampel yang mencukupi, mengurangi variasi biologis antar individu, serta menghasilkan nilai rata-rata yang lebih representatif terhadap populasi yang diteliti (Nishitani dkk., 2023).

Dalam penelitian laboratorium, *pooled* serum dapat digunakan sebagai sampel uji pada validasi metode, pengembangan pemeriksaan biomarker, maupun penelitian eksperimental yang memerlukan karakteristik serum yang seragam. Namun, proses *pooling* dapat menyebabkan hilangnya variasi individu dan berpotensi mengurangi kemampuan mendeteksi perbedaan atau biomarker tertentu yang hanya terdapat pada sebagian sampel. Oleh karena itu, penggunaan *pooled* serum harus disesuaikan dengan tujuan penelitian dan mempertimbangkan kemungkinan terjadinya efek dilusi terhadap analit yang diperiksa (Nishitani dkk., 2023).

5) Serum Hemolisis

Hemolisis ditandai dengan perubahan warna fisik menjadi merah muda hingga merah pekat, berbeda dengan serum normal yang berwarna kuning jernih. Perubahan warna tersebut terjadi akibat bercampurnya serum dengan hemoglobin yang terlepas dari sel darah merah. Dalam praktik laboratorium, serum dengan karakteristik seperti ini dikategorikan sebagai sampel yang rusak (cacat kualitas) dan menjadi penyumbang terbesar angka penolakan spesimen pada tahap praanalitik karena tingginya potensi gangguan pada hasil pemeriksaan (Nugraha, 2022).



Gambar 1. Macam-macam Serum
Sumber: (Vera, 2022)

4. Hemolisis

a. Pengertian hemolisis

Hemolisis berasal dari kata Yunani *haimo* (darah) dan *lysis* (pemecahan). Dalam konteks laboratorium klinis, hemolisis didefinisikan sebagai pecahnya membran eritrosit (sel darah merah) yang menyebabkan pelepasan komponen intraseluler seperti hemoglobin, enzim (termasuk *Alanine Aminotransferase*, *Aspartate Aminotransferase*, *Lactate Dehydrogenase*), dan elektrolit (terutama

kalium) ke dalam cairan ekstraseluler (serum atau plasma). Kebocoran ini mengakibatkan perubahan warna serum menjadi merah muda hingga merah pekat, tergantung pada konsentrasi hemoglobin bebas yang terlarut (Marques, 2020).

b. Penyebab hemolisis

Hemolisis sampel merupakan kesalahan praanalitik yang paling sering terjadi di laboratorium klinis, di mana penyebab utamanya sering kali berasal dari faktor *in vivo* akibat keadaan patologis pasien dan *in vitro* akibat kesalahan prosedur flebotomi. Kerusakan membran eritrosit yang menyebabkan pelepasan hemoglobin ke dalam serum atau plasma umumnya dipicu oleh tekanan mekanis yang berlebihan saat pengambilan darah, seperti penggunaan jarum dengan ukuran yang terlalu kecil, penarikan piston spuit yang terlalu cepat, pencampuran tabung sampel yang terlalu agresif (dikocok, bukan diinversi) dan terguncang-guncang. Selain itu, faktor transportasi sampel yang buruk, seperti guncangan berlebih atau suhu yang tidak terpantau, juga menjadi kontributor signifikan terhadap lisisnya sel darah merah sebelum sampel dianalisis (Marques, 2020).

Kerusakan serum hemolisis dapat terjadi secara eksperimental. Penelitian sebelumnya (Pratiwi, 2023) menunjukkan bahwa intervensi mekanik menggunakan *vortex* efektif menghasilkan tingkatan hemolisis (ringan, sedang dan berat). Lama durasi dan kecepatan *vortex* mempengaruhi tingkatannya. Secara spesifik, durasi *vortex*

selama 20–30 detik pada kecepatan maksimal dinilai cukup untuk menginduksi hemolisis sedang yang merepresentasikan kondisi klinis akibat kesalahan sampling, tanpa menyebabkan kerusakan total pada eritrosit.

c. Tingkat Hemolisis

Tingkat hemolisis ditentukan berdasarkan konsentrasi *cell-free hemoglobin* (cfHb) dalam serum atau plasma, yang dapat dikategorikan dari yang tidak terlihat secara visual hingga yang sangat pekat. Secara visual, serum akan mulai tampak kemerahan jika kadar hemoglobin bebas mencapai ambang batas sekitar 0,5 g/L (50 mg/dL), namun deteksi visual dianggap subjektif dan tidak dapat diandalkan untuk standardisasi mutu. Oleh karena itu, laboratorium modern menggunakan indeks hemolisis otomatis (*H-index*) yang mengukur absorbansi pada panjang gelombang spesifik untuk tingkat hemolisis (Charney dan Dourmashkin, 2021).

Menurut (Bouazza dkk., 2024), tingkat hemolisis dibagi menjadi beberapa kategori:

Tabel 1. Tingkat Hemolisis

Kadar hemoglobin	Tingkat hemolisis
< 20 mg/dL (< 0,02 g/dL)	Tidak hemolisis
20–100 mg/dL (0,02 – 0,1 g/dL)	Hemolisis ringan
100 – 300 mg/dL (0,1 – 0,3 g/dL)	Hemolisis sedang
>300 mg/dL (> 0,3 g/dL)	Hemolisis berat

Sumber : (Bouazza dkk., 2024)

Pemeriksaan derajat hemolisis dalam penelitian laboratorium, diperlukan metode kuantifikasi hemoglobin bebas. Salah satu metode standar yang digunakan adalah metode *Harboe*. Metode *Harboe* merupakan metode spektrofotometri langsung yang digunakan untuk mengukur kadar hemoglobin bebas dalam cairan biologis, seperti plasma atau serum. Metode untuk mendeteksi dan derajat hemolisis dalam sampel darah (Chung dkk., 2020).

Prinsip dasar dari metode ini adalah pengukuran absorbansi hemoglobin pada tiga panjang gelombang yang berbeda untuk meminimalkan gangguan dari zat lain. Hemoglobin (khususnya oksihemoglobin) memiliki puncak serapan atau absorbansi maksimum pada daerah sinar tampak yang dikenal sebagai pita Soret (*Soret band*), yaitu pada panjang gelombang 415 nm. Keunggulan metode *Harboe* tingkat sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi konsentrasi hemoglobin yang rendah di dalam serum. Selain itu, sistem tiga panjang gelombang secara efektif meningkatkan akurasi hasil dengan meminimalkan interferensi zat pengganggu (Chung dkk., 2020).

d. Mekanisme kerusakan hemolisis (membran eritrosit)

Stabilitas eritrosit sangat ditentukan oleh keutuhan sitoskeleton sel, yang terdiri atas jejaring protein spektrin dan aktin yang terletak di bawah membran lipid ganda. Susunan struktur tersebut berperan penting dalam mempertahankan sifat deformabilitas eritrosit, yaitu kemampuan sel untuk berubah bentuk saat melewati kapiler yang

sempit. Namun kekuatan struktur ini memiliki ambang batas terhadap pengaruh tekanan fisik. Paparan gaya mekanik eksternal yang berlebihan, seperti proses pengocokan sampel yang terlalu kuat atau tarikan piston spuit yang dilakukan secara cepat, dapat mengganggu dan merusak ikatan vertikal antara sitoskeleton dan membran sel (Marques, 2020).

Kondisi ini mengakibatkan masuknya air dan ion secara tidak terkontrol ke dalam sel, sehingga eritrosit mengalami pembengkakan dan pada akhirnya mengalami lisis. Peristiwa lisis ini menyebabkan komponen sitoplasma, seperti hemoglobin dan berbagai enzim intraseluler, termasuk *Alanine Aminotransferase* (ALT), terlepas ke dalam serum. Sementara itu, sisa membran sel yang telah kehilangan isi sitoplasmanya (*ghost cells* atau stroma) akan tetap berada dalam serum sebagai partikel koloid, yang menimbulkan kekeruhan (turbiditas) dan berpotensi mengganggu proses pembacaan pada instrumen laboratorium (Marques, 2020).

e. Pengaruh hemolisis

Hemolisis dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan sehingga dapat menyebabkan kesalahan diagnosis. Hasil pemeriksaan laboratorium yang menggunakan serum hemolisis dan diperiksa dengan spektrofotometer akan mempengaruhi pada hasil pemeriksaan. Derajat hemolisis dapat diukur dengan memisahkan plasma dari sel darah merah dan menganalisis jumlah hemoglobin dengan

menggunakan spektrofotometer yang dapat diukur seberapa banyak cahaya dengan panjang gelombang tertentu yang akan diserap oleh sampel. Apabila sampel hemolisis, maka warna yang diserap akan dipengaruhi oleh warna hemoglobin sehingga hasil pada pemeriksaan dengan spektrofotometer akan berubah (Van Buren dkk., 2020).

Hemoglobin merupakan salah satu gangguan kromogen pada metode kolorimetri sehingga hemoglobin dikaitkan dengan absorbansi optik yang kuat pada panjang gelombang 400-600 nm (nano meter). Gangguan kromogen dapat menyebabkan peningkatan intensitas warna dan akan terjadi peningkatan absorbansi yang dibaca oleh fotometer. Hemoglobin tidak boleh ada di dalam serum atau plasma karena dapat menyebabkan kesalahan pada hasil pemeriksaan, dikarenakan dapat menyebabkan kenaikan atau penurunan hasil pada pemeriksaan (Lippi dkk., 2019).

5. Reagen anti-Rh (anti-D)

a. Definisi

Reagen anti-Rh (anti-D) adalah reagen imunohematologi yang mengandung antibodi spesifik (biasanya antibodi monoklonal kelas IgM atau IgG) yang dirancang untuk mendeteksi keberadaan antigen D pada permukaan membran sel darah merah manusia. Dalam pemeriksaan laboratorium rutin, reagen ini digunakan sebagai standar untuk penentuan status golongan darah sistem Rhesus untuk membedakan antara Rhesus positif (memiliki antigen D) dan Rhesus

negatif (tidak memiliki antigen D). Antigen D sendiri merupakan protein transmembran yang bersifat sangat imunogenik dan tertanam kuat pada struktur dinding sel eritrosit (Firdayanti dkk., 2024)

b. Komponen reagen anti-Rh

Secara kimiawi, reagen anti-Rh diformulasikan untuk mengoptimalkan reaksi aglutinasi. Komponen utamanya adalah antibodi monoklonal (umumnya tipe IgM atau campuran IgM/IgG) yang tersuspensi dalam larutan penyangga (*buffer*) dengan pH fisiologis (6,5-7,0) kondisi pH dipertahankan secara stabil untuk menyamakan kondisi fisiologis manusia. Selain itu, reagen ini mengandung protein stabilizer seperti *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang berfungsi menurunkan *zeta potential* (gaya tolak-menolak antar partikel) sehingga memudahkan terjadinya ikatan silang antar membran sel. Terdapat juga bahan pengawet, biasanya Natrium Azida (NaN_3), untuk menjaga stabilitas reagen dari kontaminasi mikroba tanpa mengganggu reaksi kimia enzimatik pada pemeriksaan selanjutnya (Firdayanti dkk., 2024).

c. Mekanisme anti-Rh

Reagen anti-Rh (anti-D) bekerja berdasarkan prinsip reaksi antigen–antibodi yang bersifat spesifik. Antibodi anti-D hanya berikatan dengan antigen Rh-D yang terdapat pada permukaan membran eritrosit. Pada kondisi hemolisis, hemoglobin akan keluar dari eritrosit dan terlarut bebas di dalam serum, sedangkan antigen Rh-

D tetap melekat pada fragmen membran eritrosit (stroma) yang melayang di dalam serum. Penambahan anti-Rh menyebabkan terjadinya aglutinasi fragmen membran eritrosit yang mengandung antigen Rh-D, sehingga partikel penyebab kekeruhan dapat diendapkan melalui sentrifugasi. Mekanisme ini tidak menghilangkan hemoglobin bebas secara total, tetapi mampu mengurangi kekeruhan dan gangguan optik akibat fragmen eritrosit, sehingga interferensi hemolisis terhadap pemeriksaan ALT dapat diminimalkan pada serum hemolisis sedang (Firdayanti dkk., 2024).

d. Mekanisme penjernihan pada serum hemolisis

Antibodi anti-D mengikat pecahan-pecahan membran yang mengandung antigen Rh-D, akan terbentuk kompleks antigen-antibodi berupa gumpalan-gumpalan (aglutinasi). Gumpalan ini memiliki massa yang lebih berat dibandingkan partikel tunggal, sehingga dapat dengan mudah diendapkan ke dasar tabung melalui proses sentrifugasi. Hasilnya, cairan serum di bagian atas (supernatan) menjadi lebih jernih karena sebagian besar partikel penyebab kekeruhan (fragmen membran) telah mengendap, meskipun hemoglobin bebas masih tetap berada dalam serum. Penurunan kekeruhan ini akan mengurangi gangguan pembacaan absorbansi pada spektrofotometer (Atika dkk., 2020).

e. Stabilitas aktivitas enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT)

Penambahan reagen anti-Rh ke dalam serum hemolisis tidak memberikan efek negatif terhadap pengukuran aktivitas enzim ALT. Hal ini dikarenakan antibodi anti-D bekerja secara spesifik hanya mengikat antigen D pada fragmen membran eritrosit dan tidak bereaksi silang dengan molekul enzim ALT yang terlarut dalam serum. Hemoglobin bebas pada serum hemolisis diketahui memiliki spektrum serapan cahaya yang kuat pada panjang gelombang 340 nm (nano meter), yang tumpang tindih dengan panjang gelombang pengukuran ALT (Liu dkk., 2021).

6. Enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT)

a. Pengertian

Alanine Aminotransferase (ALT) adalah enzim yang berperan penting dalam metabolisme asam amino, khususnya transaminasi antara alanin dan α -ketoglutarat untuk membentuk piruvat dan glutamat. ALT terutama ditemukan di hati, namun juga terdapat di ginjal, jantung, otot rangka, pankreas, dan limpa. Fungsi utamanya adalah mendukung glukoneogenesis dan homeostasis energi, terutama saat puasa atau aktivitas fisik berat (Olkus dkk., 2022).

Alanine Aminotransferase (ALT) merupakan penanda sensitif dan ekonomis untuk mendeteksi kerusakan hepatoseluler. aktivitas enzim ALT yang meningkat sering digunakan untuk diagnosis dan pemantauan penyakit hati kronis seperti steatosis hepatic (MASLD),

hepatitis virus kronis, dan penyakit hati terkait metabolik. Namun, nilai ALT dipengaruhi oleh usia, jenis kelamin, dan faktor metabolik, sehingga batas normalnya perlu disesuaikan dengan populasi tertentu (Burra dkk., 2025).

b. Patologi

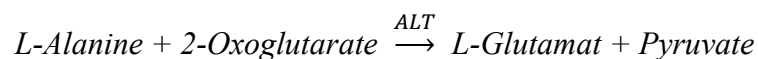
Kondisi fisiologis normal *Alanine Aminotransferase* (ALT) berada di dalam membran sel hati dengan aktivitas serum yang rendah. Peningkatan aktivitas enzim ALT serum berkaitan erat dengan gangguan integritas membran hepatosit. Ketika terjadi cedera pada sel hati yang bersifat akut maupun kronis akibat virus hepatitis, iskemia, toksisitas obat, atau alkohol. Membran sel mengalami kerusakan atau nekrosis. Hal ini menyebabkan enzim ALT yang semula terkurung di dalam sitosol bocor ke dalam sirkulasi ekstraseluler (darah) (Smith dkk., 2020).

Konsentrasi *Alanine Aminotransferase* (ALT) di dalam hepatosit kira-kira 3.000 kali lebih tinggi daripada konsentrasinya di dalam serum. Oleh karena itu, kerusakan minimal pada sejumlah kecil sel hati pun dapat memicu peningkatan aktivitas enzim serum ALT yang signifikan secara klinis (Burra dkk., 2025). Peningkatan ini sering terjadi bahkan sebelum manifestasi klinis fisik seperti ikterus (penyakit kuning) muncul. Selain itu, karena waktu paruh ALT dalam sirkulasi adalah sekitar 47 jam, enzim ini menjadi penanda pemantauan yang stabil untuk perjalanan penyakit hati (Liu dkk., 2021) .

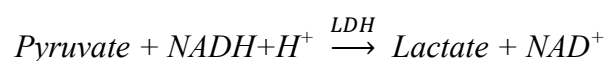
c. Metode Pemeriksaan

Metode standar yang direkomendasikan secara internasional oleh *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) untuk pengukuran ALT adalah metode Kinetik Enzimatis (UV) pada panjang gelombang 340 nm (nano meter). Secara prinsip biokimia, pengukuran ini memanfaatkan sifat koenzim NADH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*) yang mampu menyerap cahaya secara maksimal pada panjang gelombang 340 nm, sedangkan bentuk teroksidasinya (NAD⁺) tidak menyerap cahaya tersebut. Aktivitas enzim ALT dihitung berdasarkan kecepatan penurunan absorbansi dengan berkurangnya jumlah NADH dalam reaksi. Penurunan ini terjadi pada fase kinetika orde nol (*zero-order kinetics*), di mana laju reaksi berlangsung konstan dan proporsional dengan jumlah enzim dalam sampel. Semakin tinggi aktivitas enzim ALT dalam sampel, semakin cepat NADH teroksidasi menjadi NAD⁺, dan semakin cepat penurunan absorbansi yang terukur pada fotometer (Kustiningsih dkk., 2020). Prinsip reaksinya (Labiosis, 2026) adalah sebagai berikut:

1) Reaksi pertama



2) Reaksi kedua



Menurut kit insert (Labiosis, 2026) nilai rujukan *Alanine Aminotransferase* (ALT) :

Tabel 2. Nilai Rujukan Alanine Aminotransferase (ALT)

Nilai normal perempuan	Nilai normal laki-laki
< 34 U/L	<45 U/L

Sumber : (Labiosis, 2026)

d. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT)

Aktivitas enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT) sangat dipengaruhi oleh kualitas sampel, hemolisis menjadi sumber kesalahan praanalitik yang paling dominan. Gangguan ini terjadi melalui mekanisme biologis dan optik. Secara biologis, kebocoran sel darah merah menyebabkan peningkatan palsu yang signifikan karena konsentrasi ALT intraseluler diketahui 3 hingga 5 kali lebih tinggi dibandingkan kadarnya di dalam serum. Selain itu, pada metode kinetik UV panjang gelombang 340 nm (nano meter), hemolisis juga meningkatkan gangguan analitik akibat tumpang tindih spektrum serapan hemoglobin serta meningkatnya kekeruhan akibat fragmen membran sel. Kondisi ini menyebabkan hamburan cahaya (*light scattering*) menurunkan akurasi dan validitas pembacaan absorbansi oleh fotometer (Lippi dkk., 2019). Selain itu, penyimpanan sampel juga berperan penting terhadap kestabilan enzim, karena struktur aktivitas enzim ALT sensitif terhadap perubahan suhu. Penundaan pemeriksaan dan penyimpanan pada suhu yang tidak sesuai dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim akibat degradasi dan perubahan struktur protein, sehingga hasil pemeriksaan ALT menjadi

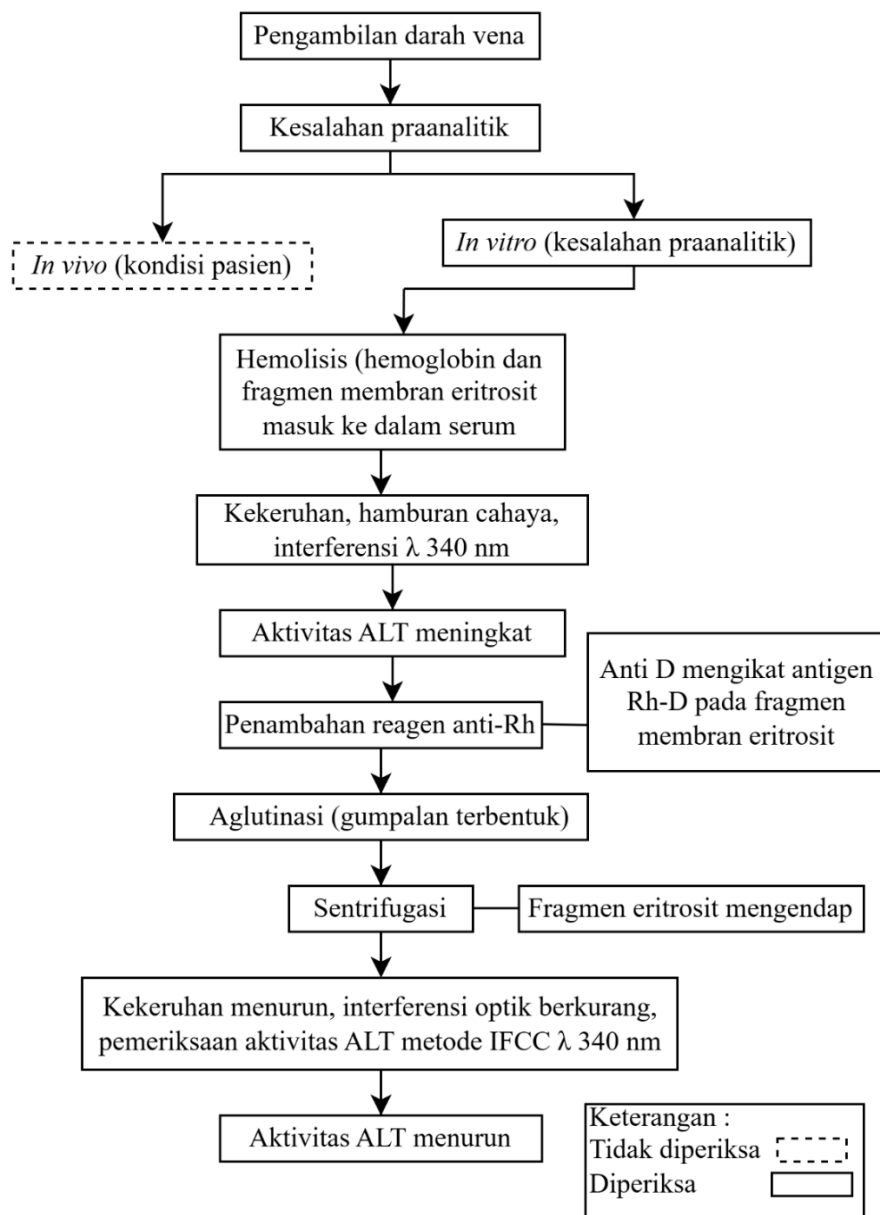
lebih rendah dari nilai sebenarnya. Oleh karena itu, waktu dan suhu penyimpanan sampel perlu dikendalikan sebagai variabel pengganggu dalam penelitian ini. Serum diketahui stabil hingga 24 jam pada suhu ruang dan 7 hari pada suhu 2-8°C, dan reagen disimpan dalam keadaan tertutup rapat, terlindung dari cahaya untuk mengurangi kontaminasi selama penggunaan (Labiosis, 2026)

Selain faktor kualitas sampel, variasi biologis pasien juga memberikan dampak signifikan terhadap nilai rujukan ALT (*Alanine Aminotransferase*). Menurut (Burra dkk., 2025) jenis kelamin mempengaruhi aktivitas enzim ALT, di mana laki-laki memiliki aktivitas ALT lebih tinggi dibandingkan perempuan, karena perbedaan massa otot dan pengaruh hormonal. Indeks Massa Tubuh (IMT) juga memiliki korelasi yang bermakna, pada individu dengan obesitas peningkatan ALT sering kali menjadi indikator klinis adanya perlemakan hati non-alkoholik (*Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease* / MASLD). Selain itu, faktor aktivitas fisik seperti olahraga berat sesaat sebelum pengambilan sampel juga dapat memicu peningkatan enzim sementara yang berasal dari pelepasan jaringan otot rangka.

Dari aspek farmakologis, penggunaan obat-obatan tertentu memiliki potensi hepatotoksik, seperti antibiotik, obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID), statin, dan antiepilepsi dapat memicu cedera hati (*Drug-Induced Liver Injury* / DILI). Proses ini berlangsung melalui

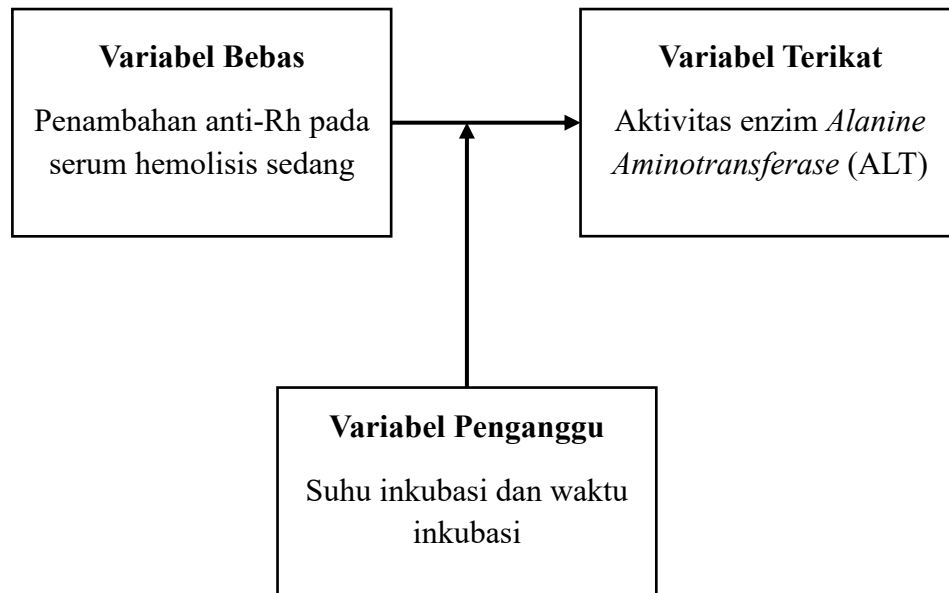
mekanisme toksisitas langsung maupun reaksi idiosinkratik yang melibatkan pembentukan metabolit reaktif, gangguan fungsi mitokondria, serta peningkatan stres oksidatif yang berujung pada nekrosis hepatoseluler (Burra dkk., 2025).

B. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 3. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

Ada perbedaan kadar enzim *Alanine Aminotransferase* (ALT) pada serum hemolisis sedang sebelum dan sesudah penambahan anti-Rh