

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Pemantapan Mutu Internal

Pemantapan Mutu Internal (PMI) merupakan kegiatan pencegahan dan pengawasan yang dilaksanakan secara berkesinambungan oleh laboratorium untuk meminimalkan kesalahan dan memastikan hasil pemeriksaan yang akurat serta dapat dipercaya. Pemantapan Mutu Internal (PMI) bertujuan untuk mengendalikan hasil pemeriksaan harian, mendeteksi penyimpangan secara dini dan melakukan tindakan korektif segera. Implementasi PMI mencakup penggunaan serum kontrol, kalibrasi peralatan, validasi metode dan dokumentasi yang sistematis pada seluruh tahapan pemeriksaan (Siregar dkk., 2018).

Proses Pemantapan Mutu Internal (PMI) dibagi menjadi tiga tahapan yang saling berkaitan: praanalitik, analitik dan pascaanalitik. Setiap tahapan memiliki potensi kesalahan yang dapat mempengaruhi validitas hasil pemeriksaan laboratorium. Pemahaman dan pengendalian pada setiap tahapan sangat penting untuk menghasilkan data laboratorium yang berkualitas dan mendukung keputusan klinis yang tepat (Lippi dkk., 2019).

a. Tahap Praanalitik

Tahap praanalitik merupakan kegiatan yang berfokus pada persiapan sampel sebelum dilakukan pemeriksaan laboratorium. Tahap ini memiliki peran krusial dalam menjamin kualitas dan akurasi hasil pemeriksaan. Proses yang dilakukan meliputi pengumpulan sampel, penanganan spesimen dan penyimpanan yang tepat guna mencegah kerusakan atau perubahan karakteristik sampel. Faktor-faktor lain yang memengaruhi tahap ini mencakup pemilihan alat flebotomi yang sesuai, waktu pengambilan sampel, serta kondisi pasien yang dapat berdampak pada hasil pemeriksaan, seperti asupan makanan dan konsumsi obat-obatan (Siregar dkk., 2018).

Pelayanan pemeriksaan laboratorium mencakup bidang hematologi, kimia klinik, mikrobiologi klinik, parasitologi klinik, imunologi klinik dan patologi anatomi, dengan darah sebagai salah satu spesimen yang paling sering digunakan (Siregar dkk., 2018). Prosedur pemeriksaan laboratorium yang terstandarisasi diperlukan untuk menghasilkan hasil yang akurat dan dapat dipercaya. Pengambilan spesimen merupakan komponen krusial dalam pengendalian mutu tahap praanalitik (Cahyani dan Parwati, 2022).

b. Tahap Analitik

Tahap analitik adalah proses pemeriksaan spesimen yang memerlukan kalibrasi instrumen, reagen berkualitas dan prosedur

standar untuk menjamin presisi dan akurasi. Parameter seperti suhu, waktu inkubasi dan volume sampel harus diawasi ketat untuk menghasilkan data valid (Siregar dkk., 2018).

c. Tahap Pascaanalitik

Tahap pascaanalitik berfokus pada interpretasi hasil pemeriksaan serta pelaporan hasil kepada pasien yang bersangkutan. Tahap ini penting untuk memastikan bahwa data yang diperoleh telah dianalisis secara tepat dan disajikan dalam format yang mudah dipahami. Kesalahan dalam interpretasi hasil, seperti kekeliruan penulisan atau perhitungan, dapat memengaruhi pengambilan keputusan klinis. Oleh karena itu, audit mutu dan verifikasi hasil merupakan komponen penting dalam tahap ini untuk memastikan bahwa hasil pemeriksaan yang dilaporkan sesuai dengan kondisi klinis pasien (Siregar dkk., 2018).

2. Darah

a. Definisi darah

Darah merupakan spesimen yang paling sering digunakan dalam pemeriksaan laboratorium klinis (Turgeon, 2016). Darah adalah komponen esensial organisme hidup yang berada di dalam sistem pembuluh darah dan berfungsi sebagai media komunikasi antara sel dengan berbagai bagian tubuh serta lingkungan eksternal. Fungsi utama darah meliputi pengangkutan oksigen dari paru-paru ke jaringan dan sebaliknya mengangkut karbondioksida untuk

dikeluarkan, mendistribusikan nutrisi dari saluran pencernaan ke jaringan, mengalirkan sisa metabolisme melalui organ ekskresi seperti ginjal, serta menghantarkan hormon dan faktor pembekuan darah (Yunus, Astina dan Hasan, 2022).

Selain itu, darah berperan sebagai pengangkut gas, nutrisi dan produk limbah metabolisme, seperti oksigen yang diangkut dari paru-paru ke sel-sel tubuh, kemudian karbondioksida yang dibawa kembali ke paru-paru untuk dikeluarkan. Darah juga mengangkut produk limbah lainnya, seperti nitrogen berlebih yang dibawa ke ginjal, serta nutrisi dari saluran pencernaan ke sel-sel. Di samping itu, darah mengangkut hormon yang disekresikan oleh berbagai organ ke dalam pembuluh darah untuk disampaikan ke jaringan target (Saadah, 2018). Darah berfungsi mengatur suhu tubuh, tekanan osmotik dan keseimbangan asam-basa. Volume darah orang dewasa sekitar 5-6 liter (7-8% berat badan) dan terdiri dari komponen cair dan padat yang memberikan informasi penting tentang status kesehatan (Dikko dkk., 2024).

b. Komponen darah

Setiap individu secara umum memiliki sekitar 70 mL darah per kilogram berat badan. Sekitar 50-60% dari total volume darah terdiri dari cairan, sedangkan sisanya merupakan sel-sel darah. Bagian cair dari darah disebut plasma, yang sebagian besar terdiri

dari 90% air dan 10% zat-zat terlarut seperti ion-ion, glukosa, asam amino, hormon dan berbagai protein (Chen dkk., 2023).

Darah terdiri dari dua komponen utama, yaitu komponen cair dan komponen padat. Komponen cair adalah plasma darah, sedangkan komponen padat terdiri dari sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit), dan keping darah (trombosit) yang berperan dalam proses pembekuan darah. Keseluruhan komponen darah yang mengalir dalam tubuh manusia dikenal sebagai *whole blood*, yang tersusun atas 55% plasma darah dan 45% sel-sel darah. Darah mengandung sel dan fragmen sel yang secara kolektif disebut elemen padat. Sel dan fragmen sel tersebut tersuspensi dalam cairan yang disebut plasma. Oleh karena itu, darah termasuk dalam kategori jaringan ikat cair (Rosita, Cahya dan Arfira, 2019).

Plasma darah yang mengandung antikoagulan berupa cairan jernih berwarna kekuningan, terdiri dari 90% air, 9% zat-zat organik seperti protein (albumin, globulin, protein pembekuan, protein komplemen), asam amino dan hormon, serta 1% garam-garam anorganik dan gas yang larut dalam nutrisi (Maharani dan Noviar, 2018).

c. Eritrosit

Sel darah merah atau eritrosit merupakan komponen utama dalam darah yang berperan mengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh tubuh dan membawa karbondioksida kembali ke paru-paru

untuk dikeluarkan. Eritrosit mengandung hemoglobin, yaitu pigmen darah yang memberikan warna merah pada darah dan memungkinkan darah mengangkut oksigen (Firdayanti dkk., 2024).

Eritrosit merupakan sel darah merah berukuran kecil dengan bentuk cekung (bikonkaf) dan tidak memiliki inti. Setiap milimeter kubik (mm^3) darah biasanya mengandung sekitar 5.000.000 eritrosit. Fungsi utama eritrosit adalah mengangkut hemoglobin dan mendistribusikan oksigen dari paru-paru ke seluruh jaringan tubuh. Pembentukan eritrosit terjadi di sumsum tulang melalui proses pematangan yang dipacu oleh hormon eritropoietin yang diproduksi oleh ginjal. Hormon ini berperan dalam merangsang produksi eritrosit di sumsum tulang (Gajbhiye dan Aate, 2023).

Eritrosit merupakan sel darah yang paling banyak dengan persentase sekitar 99,9% dari seluruh elemen padat darah. Jumlah eritrosit kurang lebih sekitar 700 kali lebih banyak dibandingkan leukosit dan 17 kali lebih banyak dibandingkan trombosit (Saadah, 2018).

Pada umumnya, setiap laki-laki dewasa dalam 1 mikroliter (1 mm^3) darah mengandung sekitar 4,5 - 6,3 juta eritrosit, sedangkan perempuan dewasa mengandung sekitar 4,2 - 5,5 juta eritrosit. Karena laki-laki memiliki tingkat metabolisme yang lebih tinggi dibandingkan perempuan, jumlah eritrositnya lebih banyak. Konsentrasi eritrosit yang tinggi diperlukan untuk menyediakan

pasokan oksigen yang dibutuhkan dalam proses metabolisme sel. Eritrosit memiliki dua fungsi utama, yaitu mengangkut oksigen dari paru-paru serta mengedarkannya ke jaringan lain dan mengangkut karbondioksida dari jaringan ke paru-paru (Saadah, 2018).

Membran eritrosit tersusun atas lapisan lipid bilayer (fosfolipid) yang bersifat fleksibel dan selektif permeabel. Membran ini mengandung berbagai protein integral dan perifer yang memiliki fungsi struktural dan fungsional (Turgeon, 2016):

- 1) Protein Integral: Termasuk glikoforin dan protein band 3 yang menembus seluruh ketebalan membran. Glikoforin membawa antigen golongan darah (termasuk antigen Rh/D) pada permukaan luar membran.
- 2) Protein Perifer (Skeletal Protein): Spektrin, aktin, ankyrin, dan protein, membentuk jaringan sitoskeleton di bawah membran yang memberikan kekuatan dan elastisitas pada eritrosit.
- 3) Lipid Bilayer: Terdiri dari fosfolipid (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) dan kolesterol yang mengatur fluiditas membran.

Struktur bikonkaf eritrosit memungkinkan fleksibilitas maksimal saat melewati kapiler kecil. Kerusakan pada komponen membran ini menyebabkan eritrosit kehilangan integritas dan mengalami lisis.

d. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) merupakan metaloprotein yang mengandung zat besi dalam tubuh dan memberikan warna pada eritrosit. Oksigen merupakan sumber energi utama yang sangat penting bagi tubuh. Ketika darah mengalir melalui paru-paru, oksigen berdifusi dari ruang udara paru-paru ke dalam darah. Oksigen memasuki eritrosit dan berikatan dengan hemoglobin membentuk oksihemoglobin (HbO_2), yang memberikan warna merah terang pada darah. Setelah melepaskan oksigen dari oksihemoglobin ke sel-sel tubuh, darah yang telah kehilangan oksigennya (*deoxyhemoglobin*) membawa sejumlah kecil karbondioksida dari sel-sel tubuh kembali ke paru-paru untuk dikeluarkan. *Deoxyhemoglobin* memberikan warna merah gelap (rona kebiruan) pada darah (Dewi dkk., 2023).

Selain mengangkut oksigen, hemoglobin juga berikatan dengan karbondioksida. Bagian ion hidrogen asam (H^+) dari asam karbonat yang terionisasi yang dibentuk dari CO_2 pada tingkat jaringan. Enzim karbonat anhidrase berperan penting dalam mengangkut CO_2 . Enzim ini mengkatalis reaksi yang akhirnya menyebabkan perubahan CO_2 . Hasil dari metabolisme menjadi ion bikarbonat (HCO_3^-) yaitu bentuk utama transportasi CO_2 dalam darah. Dapat disimpulkan bahwa eritrosit juga ikut serta dalam pengangkutan CO_2 dengan dua cara, yaitu melalui hemoglobin dan

konversi HCO_3^- oleh karbonat anhidrase. Hemoglobin juga mengikat karbonmonoksida membentuk karboksihemoglobin (Dewi dkk., 2023).

Menurut Hall dan Guyton (2020), Struktur hemoglobin terdiri dari:

- 1) Empat Rantai Globin: Dua rantai α (alpha) dan dua rantai β (beta) pada hemoglobin dewasa (HbA).
- 2) Empat Gugus Heme: Setiap rantai globin mengikat satu gugus heme yang mengandung ion besi (Fe^{2+}) di pusatnya. Ion besi ini berikatan dengan oksigen.
- 3) Struktur Kuarterner: Keempat subunit hemoglobin saling berinteraksi melalui ikatan non-kovalen, membentuk struktur yang stabil namun dapat berubah konformasi saat mengikat atau melepaskan oksigen.

Nilai normal hemoglobin pada manusia adalah 12-15 g/dL untuk perempuan dan 13-17 g/dL untuk laki-laki. Rendahnya kadar hemoglobin dalam tubuh akan menimbulkan gejala lemas, lelah dan lesu yang merupakan indikasi terjadinya anemia (Dewi dkk., 2023).

3. Macam-macam serum

1) 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 mensentrifugasi darah

(*whole blood*) dan mendingkankan darah hingga serum keluar secara spontan (Simamora, Haiti dan Hutabarat, 2025).

Serum adalah bagian cair dari darah yang tidak dicampur dengan antikoagulan. 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).

Serum adalah bagian darah yang cair setelah darah membeku. Serum diperoleh setelah darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 10 menit. Secara normal, cairan yang tampak akan berwarna kuning jernih (Sugiarti dan Sulistianingsih, 2021).

Sentrifugasi adalah alat laboratorium 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, Idawati dan Sinaga, 2020).

2) Serum Lipemik

Serum lipemik merupakan serum yang mengalami kekeruhan akibat peningkatan konsentrasi lipoprotein. Kekeruhan tersebut disebabkan oleh akumulasi partikel lipoprotein. Namun demikian, tidak semua jenis lipoprotein mengakibatkan kekeruhan pada serum. Penyebab utama kekeruhan adalah kilomikron dengan diameter 70-1.000 nm yang merupakan partikel lipoprotein berukuran paling besar (Sugiarti dan Sulistianingsih, 2021).

Kekeruhan dapat berpengaruh terhadap penyerapan (absorbansi) spektrofotometer pada semua panjang gelombang, sehingga dapat menyebabkan kesalahan dalam hasil analisis. Hampir seluruh pemeriksaan 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 akibat warna kuning coklat dari spesimen, sehingga tidak mampu dibaca oleh fotometer (Sujono, Sistiyono dan Widada, 2023).

4) Serum Hemolisis

Hemolisis adalah pecahnya eritrosit disertai keluarnya zat-zat yang terkandung di dalamnya, sehingga serum atau plasma tampak kemerahan dan dapat menyebabkan kesalahan dalam analisis. Hemolisis merupakan penyebab terbesar dari kesalahan praanalitik. Kesalahan laboratorium yang disebabkan oleh variabel praanalitik telah mendapatkan perhatian yang serius. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa hemolisis pada spesimen pasien dapat mengganggu pemeriksaan yang akurat (Ariyani dkk., 2019).

Hemolisis sendiri dapat diukur melalui visual dan semi-otomatis. Secara visual, hemolisis dapat dilihat karena nampak warna merah yang ada di serum atau plasma, tetapi hal ini masih kurang akurat karena tidak dapat menunjukkan kadar hemoglobin bebas yang ada di dalamnya. Secara semi-otomatis, hemolisis diukur menggunakan alat spektrofotometer dengan menghitung kadar hemoglobin bebas yang ada di dalam serum atau plasma sehingga didapatkan kadarnya yang disebut indeks hemolisis (Adiga dan Yogis, 2016).

Sampel dapat dikatakan hemolisis jika kadar hemoglobin bebas yang ada di dalam serum atau plasma ≥ 20 mg/dL. Hemolisis dapat mengganggu banyak metode pemeriksaan dan dapat meningkatkan kadar analit tertentu dalam plasma (seperti kalium atau zat besi) yang normalnya tidak dalam konsentrasi tinggi. Tingkat hemolisis dibagi menjadi 3 (tiga), yaitu hemolisis ringan, sedang dan berat (Adiga dan Yogis, 2016).

4. Hemolisis

a. Definisi Hemolisis

Hemolisis merupakan salah satu penyebab paling umum pada tahap praanalitik. Hemolisis merupakan suatu keadaan di mana sel darah merah pecah, yang mengakibatkan keluarnya hemoglobin dan membuat serum atau plasma berwarna merah. Hemolisis dapat terjadi akibat pengambilan darah menggunakan jarum yang terlalu kecil dari ukuran vena, pengambilan darah di lokasi hematoma, penarikan plunger spuit terlalu cepat, penekanan plunger spuit terlalu kuat saat memasukkan darah ke dalam tabung, pencampuran sampel (inversi) terlalu kuat dan kontaminasi alkohol atau air pada darah (Nugraha, 2022)

Secara medis, hemolisis didefinisikan sebagai kerusakan membran sel darah merah yang menyebabkan lepasnya hemoglobin dan komponen intraseluler lainnya ke dalam cairan di sekitarnya.

Berdasarkan tingkat keparahannya, hemolisis dapat diklasifikasikan menjadi hemolisis ringan, sedang dan berat (Lippi dkk., 2019).

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. Hemolisis secara *in vitro* dapat disebabkan oleh transfer alkohol dari kulit ke sampel darah, jarum dengan ukuran kecil, kesulitan menemukan pembuluh darah, pembuluh darah vena yang kecil atau rentan, adanya tekanan berlebihan pada darah di jarum suntik, homogenisasi yang tidak tepat (dikocok), melakukan sentrifugasi dengan kecepatan tinggi dalam waktu yang terlalu lama dan pemisahan spesimen yang tertunda (Putri, Arfan dan Pratiwi, 2025).

Menurut de Jonge dkk, (2018) hal-hal yang dapat menyebabkan hemolisis *in vitro* sebagai berikut:

- 1) Penggunaan jarum dengan ukuran yang terlalu kecil
- 2) Transfer residu alkohol dari kulit ke sampel
- 3) Pemasangan *tourniquet* yang terlalu lama
- 4) Penusukan berulang di lokasi yang sama
- 5) Ketidaksesuaian volume darah dan volume antikoagulan
- 6) Pencampuran sampel yang terlalu kuat
- 7) Paparan terhadap suhu panas atau dingin yang berlebihan

8) Sentrifugasi dengan kecepatan tinggi dalam waktu yang lama

c. Perbedaan hemolisis *In Vivo* dan *In Vitro* pada serum

Secara visual, serum dari hemolisis *in vivo* dan *in vitro* sama-sama menunjukkan warna kemerahan akibat pelepasan hemoglobin. Menurut McPherson dan Pincus (2020), terdapat perbedaan penting:

- 1) Hemolisis *In Vivo*: Serum menunjukkan peningkatan bilirubin indirek, penurunan haptoglobin dan peningkatan LDH yang mencerminkan proses hemolisis sistemik dalam tubuh. Secara klinis, pasien mungkin menunjukkan gejala anemia, ikterus, atau splenomegali.
- 2) Hemolisis *In Vitro*: Peningkatan hemoglobin bebas murni akibat kerusakan mekanis saat pengambilan atau penanganan sampel. Tidak ada perubahan pada parameter klinis lainnya karena hemolisis terjadi setelah darah keluar dari tubuh. Pasien tidak menunjukkan gejala klinis hemolisis.

d. Tingkat Hemolisis

Hemolisis dapat digolongkan menjadi hemolisis ringan, sedang dan berat (Lippi dkk., 2019). Hemolisis dapat dideteksi secara visual dan penting untuk memperkirakannya dengan analisis langsung. Tingkatan hemolisis juga ditentukan berdasarkan visual seperti kepekatan warna yang timbul. Hemolisis dapat ditentukan

berdasarkan kadar hemoglobin yang terkandung dalam serum (Adiga dan Yogis, 2016).

Tabel 1. Tingkatan Hemolisis Berdasarkan Kadar Hemoglobin

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: (Adiga dan Yogis, 2016).

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 hasil pemeriksaan. Derajat hemolisis dapat diukur dengan memisahkan serum atau plasma dari sel darah merah dan menganalisis jumlah hemoglobin bebas dengan menggunakan spektrofotometer yang dapat mengukur seberapa banyak cahaya dengan panjang gelombang tertentu yang akan diserap oleh sampel (Van Buren, Arwatz dan Smits, 2020).

Hemoglobin merupakan salah satu gangguan kromogen pada metode kolorimetri sehingga hemoglobin dikaitkan dengan absorbansi optik yang kuat pada panjang gelombang 400-600 nm. 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).

f. Mekanisme terjadinya hemolisis

Hemolisis adalah proses kerusakan membran eritrosit yang menyebabkan pelepasan hemoglobin dan komponen intraseluler ke dalam plasma atau serum. Mekanisme hemolisis dapat dibedakan berdasarkan penyebabnya, yaitu hemolisis *in vivo* dan hemolisis *in vitro* (Lippi dkk., 2021).

1) Mekanisme hemolisis *In Vivo*

Hemolisis *in vivo* terjadi di dalam tubuh pasien akibat kondisi patologis. Mekanisme yang mendasari meliputi (Lippi dkk., 2019):

- a) Hemolisis Imun: Terjadi ketika antibodi menempel pada permukaan eritrosit dan mengaktifkan sistem komplemen, menyebabkan lisis sel. Contohnya pada transfusi darah yang tidak kompatibel atau penyakit hemolitik autoimun
- b) Hemolisis Mekanik: Kerusakan fisik eritrosit akibat trauma mekanik, seperti pada katup jantung prostetik atau mikroangiopati
- c) Hemolisis Enzimatik: Defisiensi enzim seperti G6PD (*Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*) menyebabkan eritrosit rentan terhadap stres oksidatif dan mudah mengalami lisis

- d) Hemolisis Osmotik: Perubahan tekanan osmotik yang drastis, seperti pada kondisi hipotonik, menyebabkan air masuk ke dalam eritrosit hingga membran pecah.

2) Mekanisme hemolisis *In Vitro*

Hemolisis *in vitro* terjadi setelah darah diambil dari tubuh pasien akibat kesalahan prosedur praanalitik. Mekanisme yang terjadi meliputi (Lippi dkk., 2019):

- a) Mekanik: Penggunaan jarum berdiameter kecil (<21G) menyebabkan tekanan tinggi saat darah melewati jarum, sehingga eritrosit mengalami kerusakan membran akibat *shear stress* (tekanan geser). Pengocokan tabung yang berlebihan juga menyebabkan benturan antar eritrosit dan dinding tabung
- b) *Osmotic Shock*: Kontaminasi alkohol dari kulit yang belum kering ke dalam sampel darah menciptakan lingkungan hipotonik yang menyebabkan eritrosit membengkak dan pecah
- c) *Thermal Shock*: Perubahan suhu yang ekstrem dan mendadak (pembekuan atau pemanasan) menyebabkan kerusakan membran eritrosit karena perubahan fluiditas lipid membran

- d) Sentrifugasi: Sentrifugasi dengan kecepatan terlalu tinggi atau durasi terlalu lama menyebabkan eritrosit tertekan dan mengalami kerusakan membran.

5. Pemeriksaan Hemoglobin Bebas

Metode Harboe merupakan metode spektrofotometri yang banyak digunakan untuk mengukur kadar hemoglobin bebas dalam plasma atau serum sebagai indikator hemolisis intravaskular. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Harboe dan hingga kini masih dianggap sebagai salah satu metode rujukan dalam pemeriksaan plasma free hemoglobin karena memiliki reprodutibilitas yang baik dan prinsip pengukuran yang relatif sederhana. Prinsip metode ini didasarkan pada pengukuran absorbansi hemoglobin pada beberapa panjang gelombang untuk mengurangi interferensi dari bilirubin dan komponen plasma lainnya (Chung *dkk.*, 2020).

Pada metode Harboe, pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 380 nm, 415 nm, dan 450 nm. Panjang gelombang 415 nm digunakan karena merupakan puncak absorbansi hemoglobin (Soret band), sedangkan pengukuran pada 380 nm dan 450 nm digunakan sebagai koreksi terhadap interferensi zat lain yang juga menyerap cahaya pada rentang spektrum tersebut. Konsentrasi hemoglobin bebas kemudian dihitung menggunakan persamaan Harboe (Chung *dkk.*, 2020):

$$\text{Free hemoglobin (mg/dL)} = 83,6 \times (2 \times A_{415} - A_{380} - A_{450})$$

Metode Harboe banyak digunakan dalam evaluasi hemolisis karena mampu memberikan estimasi kadar hemoglobin bebas secara langsung melalui pendekatan spektrofotometri. Namun, metode ini memiliki beberapa keterbatasan, seperti memerlukan pengukuran manual, operator yang terampil, serta potensi interferensi analitik apabila sampel mengalami ikterus berat atau gangguan optik lainnya. Meskipun demikian, metode ini tetap banyak dijadikan acuan dalam penelitian maupun evaluasi laboratorium klinik (Barši, Lovri dan Lonč, 2026).

6. Reagen Anti-Rh

a. Definisi

Reagen anti-Rh adalah antibodi monoklonal atau poliklonal yang dirancang untuk mengenali dan berikatan dengan antigen D (faktor Rh) yang merupakan protein permukaan pada membran eritrosit dalam sistem golongan darah Rhesus. Antigen D merupakan antigen yang paling imunogenik dalam sistem Rhesus dan terdapat pada sekitar 85% populasi manusia yang disebut sebagai Rh positif, sedangkan 15% sisanya yang tidak memiliki antigen D disebut Rh negatif. Reagen anti-Rh yang digunakan dalam laboratorium imunohematologi umumnya berupa antibodi IgG atau IgM yang diproduksi melalui teknologi hibridoma atau dari serum donor manusia yang telah diimunisasi (Maharani dan Noviar, 2018).

Sistem penggolongan darah yang umum digunakan yaitu sistem ABO yang terdiri atas golongan A, B, AB dan O. Selain itu,

terdapat sistem Rhesus yang mengelompokkan darah berdasarkan keberadaan antigen D (faktor Rh) pada membran eritrosit. Protein Rh sendiri merupakan protein transmembran yang menempel pada permukaan sel darah merah. Antigen Rh menjadi bagian integral dari protein tersebut dan berperan penting dalam menjaga kestabilan struktur membran eritrosit (Putri, Arfan dan Pratiwi, 2025).

b. Komposisi

Komposisi reagen anti-Rh umumnya terdiri dari antibodi anti-D yang terlarut dalam larutan buffer dengan pH fisiologis sekitar 6,5-7,5 yang mengandung stabilizer untuk mempertahankan aktivitas antibodi, pengawet seperti sodium azida untuk mencegah kontaminasi mikroba dan protein carrier seperti bovine albumin untuk meningkatkan stabilitas antibodi. Konsentrasi antibodi dalam reagen bervariasi tergantung produsen, namun umumnya dirancang untuk memberikan reaksi aglutinasi yang optimal dalam aplikasi bank darah dan golongan darah. Dalam konteks pengolahan serum hemolisis, reagen anti-Rh bekerja tidak hanya mengenali antigen D pada membran eritrosit utuh, tetapi juga dapat berikatan dengan fragmen protein membran eritrosit dan hemoglobin yang terlepas ke dalam serum saat terjadi hemolisis (Putri, Arfan dan Pratiwi, 2025).

c. Prinsip kerja

Menurut Westhoff (2004), Reagen anti-Rh mengandung antibodi (IgG atau IgM) yang dirancang untuk mengenali dan

berikatan dengan antigen D (faktor Rh) pada membran eritrosit. Dalam konteks pengolahan serum hemolisis, mekanisme kerjanya meliputi:

1) Ikatan dengan antigen membran eritrosit

Antibodi anti-Rh berikatan dengan antigen D yang merupakan protein transmembran pada permukaan eritrosit. Ikatan ini bersifat spesifik antigen-antibodi melalui interaksi pada region Fab (*Fragment antigen-binding*) antibodi. Fragmentasi membran eritrosit saat hemolisis menyebabkan antigen D tetap melekat pada fragmen membran yang tersuspensi dalam serum

2) Ikatan dengan hemoglobin bebas

Interaksi Elektrostatis: Antibodi bermuatan dapat berinteraksi dengan gugus bermuatan pada rantai globin hemoglobin.

d. Proses aglutinasi dan pengendapan

Menurut Moulds (2020), Setelah antibodi anti-Rh berikatan dengan antigen D pada fragmen membran eritrosit atau hemoglobin bebas, terjadi proses:

- 1) Pembentukan Kompleks Antigen-Antibodi: Satu molekul antibodi IgG dapat berikatan dengan dua antigen (*bivalent*), sementara IgM dapat berikatan dengan hingga 10 antigen (*multivalent*), membentuk jembatan silang (*cross-linking*)

- 2) Aglutinasi: Kompleks antigen-antibodi membentuk agregat berukuran besar yang dapat diamati secara visual sebagai gumpalan
- 3) Sedimentasi: Aglutinasi meningkatkan ukuran dan massa partikel, sehingga dapat diendapkan dengan sentrifugasi kecepatan (1000 rpm selama 1 menit).

e. Reaksi biokimia yang terjadi

Reaksi antara anti-Rh dengan komponen hemolisis dapat dijelaskan sebagai berikut (Rahmawati, 2020):

1) Tahap pengikatan awal

Antibodi anti-Rh + Antigen D (membran eritrosit) → Kompleks Ag-Ab

2) Tahap aglutinasi

N (Kompleks Ag-Ab) → Agregat besar (aglutinasi)

3) Tahap sedimentasi

Agregat + Sentrifugasi (1000 rpm, 1 menit) → Endapan + Supernatan jernih

f. Lokasi Ikatan pada Struktur Hemoglobin

Menurut Rahmawati (2020), ikatan anti-Rh dengan komponen hemolisis terjadi terutama pada:

- 1) Antigen D pada fragmen membran: Ini adalah target utama yang paling spesifik

- 2) Region globin: Interaksi non-spesifik dengan rantai α atau β globin melalui interaksi elektrostatis dan hidrofobik
- 3) Bukan pada gugus heme: Gugus heme terletak di dalam kantong hidrofobik rantai globin dan tidak mudah diakses oleh antibodi.

g. Mekanisme Penurunan Hemoglobin Bebas

Menurut Rahmawati (2020), Penambahan anti-Rh dapat menurunkan konsentrasi hemoglobin bebas dalam serum melalui:

- 1) Pengikatan dan Pengendapan: Kompleks antibodi-antigen yang terbentuk mengendapkan sebagian besar fragmen membran dan hemoglobin bebas
- 2) Penjernihan Supernatan: Setelah sentrifugasi, supernatan memiliki konsentrasi hemoglobin bebas yang lebih rendah

7. Enzim *Aspartate aminotransferase* (AST)

a. Definisi Enzim

Enzim adalah senyawa protein yang berfungsi sebagai biokatalis, mempercepat reaksi kimia tanpa ikut bereaksi, sehingga mendukung metabolisme nutrisi, produksi energi dan sintesis komponen seluler seperti protein, DNA dan membran. Kekurangan enzim dapat menyebabkan kelainan genetik, defisiensi nutrisi atau akumulasi zat toksik. Berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisis, enzim diklasifikasikan menjadi enam golongan: *oksidoreduktase*, *transferase*, *hidrolase*, *liase*, *isomerase*, dan *ligase*. Dalam konteks pengukuran enzim seperti *Aspartate aminotransferase* (AST),

hemolisis serum dapat menyebabkan pelepasan enzim intraseluler, sehingga mengganggu akurasi hasil tes (Wahyuni, 2017).

b. Definisi Enzim *Aminotransferase*

Aminotransferase atau *transaminase* adalah kelompok enzim yang mengkatalisis transfer reversibel gugus amino antara asam amino dan asam α -keto, penting dalam metabolisme asam amino dan pemeriksaan fungsi hati. Enzim ini berkaitan erat dengan kerusakan hepatoseluler, dengan dua jenis utama yang sering diukur adalah *Alanine aminotransferase* (ALT) dan *Aspartate aminotransferase* (AST) (Ariyani dkk., 2019). Hemolisis serum dapat meningkatkan kadar *aminotransferase* terukur akibat pelepasan enzim dari sel darah merah, sehingga memerlukan teknik seperti penambahan anti-Rh untuk mengurangi interferensi ini (Lippi dkk., 2021).

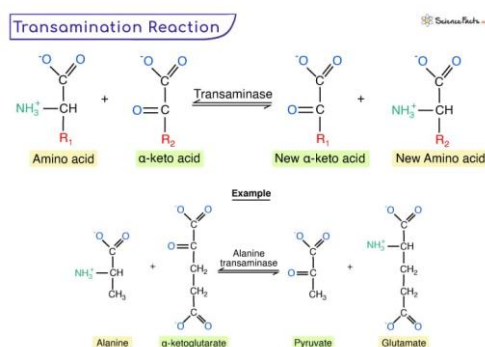
c. Definisi Enzim *Aspartate aminotransferase*

Aspartate aminotransferase (AST) juga dikenal sebagai *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) adalah enzim intraseluler yang mengkatalisis transfer gugus amino dari *aspartat* ke α -ketoglutarat, menghasilkan oksaloasetat dan glutamat, yang penting dalam metabolisme asam amino dan siklus Krebs (Ariyani dkk., 2019). Enzim ini banyak terdapat di hepatosit, kardiomyosit, sel ginjal, otot rangka dan eritrosit (Simamora, Haiti dan Hutabarat, 2025). Hemolisis sedang dapat melepaskan AST dari eritrosit ke

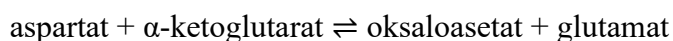
serum, sehingga meningkatkan aktivitas terukur dan memerlukan intervensi seperti anti-Rh untuk mengikat komponen hemolisis (Lippi dkk., 2021).

d. Metabolisme *Aspartate aminotransferase* (AST)

Patologi *Aspartate Aminotransferase* (AST) berkaitan dengan peningkatan kadar enzim ini dalam serum akibat kerusakan seluler, sementara metabolismenya melibatkan peran enzim dalam jalur biokimia normal. Dari segi metabolisme, *Aspartate Aminotransferase* (AST) terlibat dalam reaksi transaminasi reversibel:



Gambar 1. Metabolisme AST
Sumber: ScienceFacts, 2023.



Reaksi ini penting untuk metabolisme asam amino, terutama dalam glukoneogenesis dan produksi energi. Enzim ini memiliki dua bentuk isoenzim, yaitu AST-1 (sitoplasmik) dan AST-2 (mitokondrial), dengan AST-2 lebih banyak terdapat di hati dan jantung (Soenggono dan Sri, 2020).

Secara patologis, peningkatan aktivitas *Aspartate aminotransferase* (AST) (hipertransaminasemia) sering menunjukkan nekrosis atau kerusakan sel, seperti dalam hepatitis (kerusakan hepatosit), infark miokard (kerusakan jantung), sirosis, atau distrofi otot. Rasio *Aspartate aminotransferase* (AST) (<1 biasanya dalam penyakit hati) membantu diferensiasi: rasio tinggi menunjukkan kerusakan ekstrahepatik seperti jantung atau otot. Faktor lain termasuk toksisitas obat (misalnya parasetamol) atau infeksi virus, serta defisiensi vitamin B6 yang mempengaruhi metabolisme *Aspartate aminotransferase* (AST) (Soenggono dan Sri, 2020). Hemolisis dapat menimbulkan peningkatan palsu *Aspartate aminotransferase* (AST) karena pelepasan enzim dari eritrosit, sehingga penambahan anti-Rh diusulkan untuk mengurangi interferensi ini (Lippi dkk., 2021).

e. Fungsi *Aspartate Aminotransferase* (AST)

Fungsi utama *Aspartate aminotransferase* (AST) adalah sebagai katalis dalam transfer gugus amino, menghubungkan metabolisme protein dengan energi seluler melalui siklus Krebs, terutama di hati (untuk glukoneogenesis dan produksi ATP) dan otot (selama kontraksi). Secara klinis, *Aspartate aminotransferase* (AST) berperan sebagai biomarker kerusakan jaringan, seperti dalam pemantauan penyakit hati, kardiovaskular atau muskuloskeletal, di mana peningkatan aktivitasnya menunjukkan

prognosis. Namun, hemolisis dapat mengaburkan fungsi diagnostik ini dengan meningkatkan aktivitas *Aspartate aminotransferase* (AST) yang terukur, sehingga teknik seperti anti-Rh diperlukan untuk mempertahankan akurasi (Soenggono dan Sri, 2020).

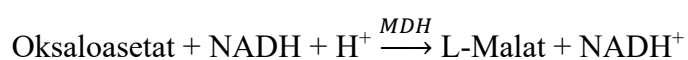
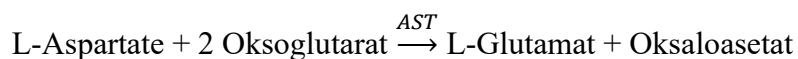
f. Metode pemeriksaan *Aspartate Aminotransferase* (AST)

Aspartate Aminotransferase (AST) merupakan enzim yang terdistribusi secara luas di jaringan tubuh manusia. Pemeriksaan *Aspartate Aminotransferase* (AST) dilakukan melalui pemeriksaan darah serum, yang merupakan bagian dari panel enzim hati (*liver function tests*) atau pemeriksaan kardiovaskular. Konsentrasi tertinggi *Aspartate Aminotransferase* (AST) ditemukan dalam otot jantung, hati, dan otot rangka, sedangkan konsentrasi terendah ditemukan pada ginjal, pankreas dan eritrosit (Nugraha dan Imaduddin, 2021). *Aspartate Aminotransferase* (AST) adalah salah satu dari dua enzim yang mengkatalisis pemindahan gugus nitrogen dari asam amino menjadi residu asam. *Aspartate Aminotransferase* (AST) terkonsentrasi sangat tinggi di hati dan mengkatalisis pembentukan piruvat dan asam oksaloasetat. Aktivitas enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST) dalam serum dapat meningkat ketika terjadi kerusakan sel jaringan tempat enzim tersebut berada (Alwaali, Nurmalasari dan Fitriani, 2023).

Berdasarkan rekomendasi *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) enzim *Aspartate aminotransferase*

(AST) diukur berdasarkan aktivitasnya atau metode kinetik. Pada prinsipnya *Aspartate aminotransferase* (AST) akan mengkatalisis transfer gugus amino L-aspartat ke 2-Oksoglutarat menjadi L-Glutamat dan oksaloasetat. Oksaloasetat yang terbentuk akan bereaksi dengan NADH menyebabkan oksidasi NADH menjadi NAD^+ dengan bantuan *Malat Dehidrogenase* (MDH). Penurunan absorbansi akibat konversi NADH menjadi NAD^+ , sebanding dengan aktivitas *Aspartate aminotransferase* (AST), yang diukur pada panjang gelombang 340 nm (Nugraha dan Imaduddin, 2021).

Pemeriksaan ini menggunakan reagen kerja atau monoreagen dengan mencampurkan 4 bagian reagen 1 dan 1 bagian reagen 2 (rasio 4:1). Prinsip pemeriksaan ini yaitu *Aspartate aminotransferase* (AST) mengkatalis transfer gugus amino dari L-Aspartate ke 2-Oksoglutarat menjadi L-Glutamat dan Oksaloasetat. Oksaloasetat selanjutnya mengalami reduksi dan terjadi oksidasi NADH (*Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen*) menjadi NAD^+ (*Nikotinamida Adenosin Dinukleotida*) dengan bantuan enzim *Malat Dehidrogenase* (MDH) (Kementerian Kesehatan RI, 2015).



Berdasarkan *kit insert* Labiosis reagen untuk pemeriksaan *Aspartate Aminotransferase* (AST) terbagi menjadi dua, yaitu reagen 1 dan reagen 2. Komposisi dari reagen 1 dan reagen 2 sebagai berikut:

a) Reagen 1

AST Substrate TRIS buffer	121 mmol/L
pH	7,8
L-Aspartate	362 mmol/L
MDH (<i>Malate Dehydrogenase</i>)	> 460 U/L
Sodium azide	0.95 g/L

b) Reagen 2

AST coenzym	
NADH	1.3 mmol/L
2-Oxoglutarate	75 mmol/L
Sodium azide	0.95 g/L

Tabel 2. Nilai Normal AST

Nilai Normal	Suhu	Kategori
< 35 U/L	37°C	Pria
< 31 U/L	37°C	Wanita
8 – 20 U/L	30°C	Dewasa

Sumber: *Kit insert* Labiosis

g. Pengaruh hemolisis pada *Aspartate Aminotransferase* (AST)

Menurut Pantasri (2022), Hemolisis memiliki pengaruh signifikan terhadap hasil pemeriksaan *Aspartate Aminotransferase* (AST) melalui beberapa mekanisme :

1) Pelepasan AST Intraseluler dari Eritrosit

Eritrosit mengandung enzim AST dalam konsentrasi tinggi (sekitar 15 kali lebih tinggi dibandingkan serum normal). Ketika hemolisis terjadi:

- a) Membran eritrosit pecah dan melepaskan AST ke dalam serum
- b) Aktivitas AST terukur meningkat palsu

2) Interferensi spektrofotometer oleh hemoglobin bebas

Pemeriksaan AST metode enzimatik menggunakan prinsip penurunan absorbansi NADH pada panjang gelombang 340 nm. Hemoglobin bebas menyebabkan interferensi karena:

- a) Hemoglobin memiliki puncak absorbansi pada 400-600 nm dengan absorbansi signifikan pada 340 nm
- b) Absorbansi hemoglobin menambah nilai absorbansi total yang terbaca oleh fotometer
- c) Hal ini menyebabkan pembacaan aktivitas AST yang lebih tinggi dari nilai sebenarnya

h. Faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST)

Suhu merupakan salah satu faktor kritis yang mempengaruhi stabilitas aktivitas enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST). Enzim AST dalam serum manusia atau plasma heparin menunjukkan tingkat stabilitas yang berbeda-beda tergantung pada suhu

penyimpanannya. Pada suhu 2 – 8°C, aktivitas enzim AST dapat bertahan stabil selama 4 minggu. (Labiosis)

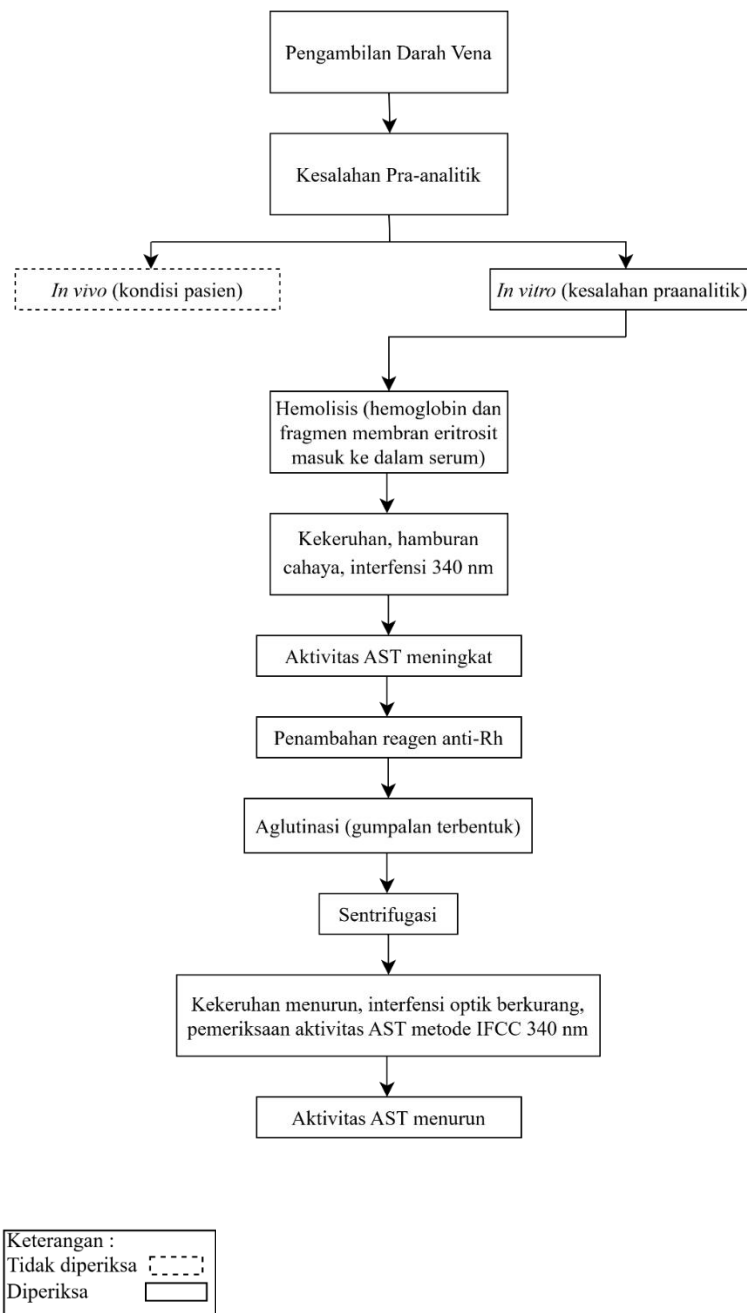
Waktu inkubasi atau lama penyimpanan sampel berkaitan erat dengan stabilitas aktivitas enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST). Semakin lama sampel disimpan, semakin besar terjadinya penurunan aktivitas enzim. Durasi penyimpanan yang diperbolehkan bergantung pada suhu penyimpanan yang digunakan. Oleh karena itu, pemeriksaan sebaiknya dilakukan sesegera mungkin setelah pengambilan sampel atau sampel harus disimpan pada kondisi suhu yang sesuai untuk mempertahankan stabilitas enzim hingga waktu pemeriksaan (DiaSys, 2021).

Aktivitas Enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST) dipengaruhi oleh berbagai faktor fisiologis, patologis dan eksternal. Secara fisiologis, olahraga berat atau trauma otot dapat meningkatkan kadar sementara karena pelepasan enzim dari sel otot. Usia juga berperan, kadar lebih tinggi pada bayi dan menurun seiring dewasa. Jenis kelamin juga mempengaruhi, dengan pria memiliki kadar basal lebih tinggi karena massa otot (Soenggono dan Sri, 2020).

Faktor patologis utama adalah kerusakan jaringan seperti, penyakit hati (hepatitis, sirosis), kardiovaskular (infark miokard), atau muskuloskeletal (rabdomiolisis). Infeksi virus, toksin (alkohol, obat seperti statin atau parasetamol) dan kondisi autoimun juga

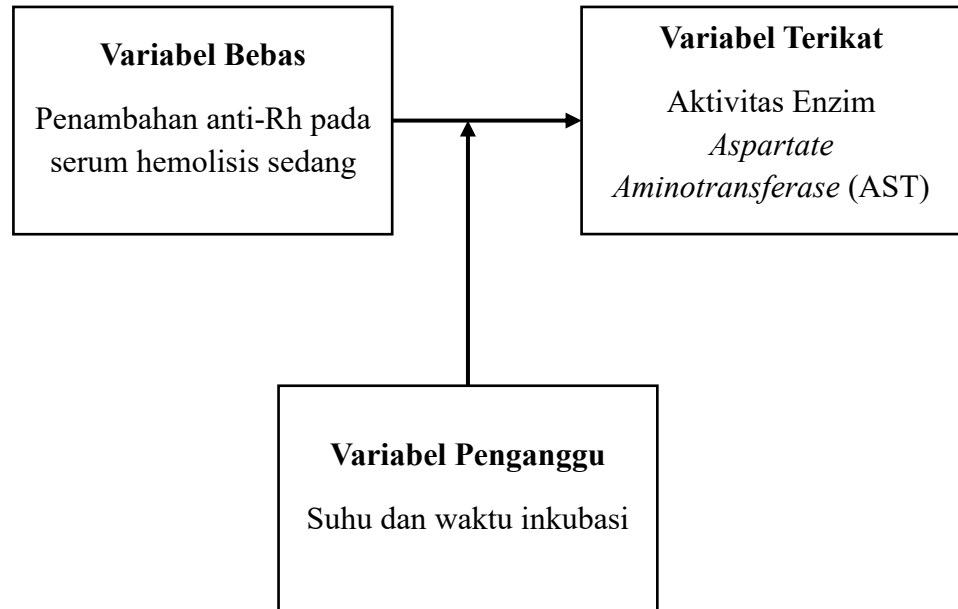
meningkatkan kadar. Faktor eksternal termasuk obat-obatan (misalnya, antibiotik), diet tinggi protein dan hemolisis sampel dapat mempengaruhi hasil (Soenggono dan Sri, 2020).

B. Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori

C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 3. Hubungan Antar Variabel

D. Hipotesis

Ada perbedaan hasil pemeriksaan aktivitas enzim *Aspartate Aminotransferase* (AST) pada serum hemolisis sedang sebelum dan sesudah penambahan anti-Rh.