



PERBEDAAN KADAR HEMOGLOBIN METODE SIAMMETHEMOGLOBIN DENGAN DAN TANPA SENTRIFUGASI PADA SAMPEL LEUKOSITOSIS

Wahdah Norsiah

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Banjarmasin
Jl Mistar Cokrokusumo 4a Banjarbaru
e-mail: hlsdonluf@yahoo.com

Abstract: Examination of hemoglobin levels influenced leukocytosis sianmethemoglobin method that causes increased absorbance measurements of hemoglobin levels increased significantly and the false blood sample that has been diluted with a solution Drabkins in centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes and then the absorbance of the supernatant was measured with a photometer at λ 546 nm. This study aimed to analyze the differences in hemoglobin level examination sianmethemoglobin method with and without centrifugation at sample leukocytosis. This type of research is observational research laboratory. The study design was cross-sectional study. Samples were taken from the remaining blood samples of patients who have been examined leukositnya number more than 20,000 / μ L with Hematology Analyzer (CEL-DYN Ruby) February-April 2014, and were divided into 4 groups based on criteria that group 1. leukocyte count of 20,000 / μ L-29 999 / μ L, group II. 30,000 / μ L-39 999 / μ L, the group III. 40,000 / μ L-49,999 / μ L, the group IV. More than 50,000 / μ L. The number of samples taken were 20 samples of each group, a total sample of 80 samples. The analysis showed no significant difference in hemoglobin levels sianmethemoglobin method with and without centrifugation at sample leukocytosis with a value of $p = 0.000$ less than 0.05α . Leukocytosis Turbidity affects the difference in hemoglobin levels with and without centrifugation, the higher the number the greater the difference in leukocyte levels of hemoglobin, hemoglobin level examination results of the study based on the criteria of the number of leukocytes obtained by the difference in hemoglobin levels with and without centrifugation in group I. 0.22 ± 0.07 g / dL, group II 0.40 ± 0.22 g / dL, a group III. 0.44 ± 0.14 g / dL, Group IV. 0.85 ± 0.41 g / dL. The level of hemoglobin in the sample sianmethemoglobin method leukocytosis with more than 20,000 / μ L need a centrifuge so that appropriate hemoglobin levels over the patient's clinical condition.

Keywords: sianmethemoglobin methods, centrifugation, leukocytosis

Abstrak: Pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dipengaruhi leukositosis yang menyebabkan pengukuran absorban meningkat signifikan dan kadar hemoglobin meningkat palsu maka sampel darah yang sudah diencerkan dengan larutan Drabkins di sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit kemudian absorban supernatant diukur dengan fotometer pada λ 546 nm. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis. Jenis penelitian merupakan penelitian observasional laboratorik. Rancangan penelitian ini adalah penelitian *cross sectional*. Sampel penelitian diambil dari sisa sampel darah pasien yang sudah diperiksa jumlah leukositnya lebih dari 20.000/ μ L dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby) Pebruari-April 2014, dan dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan kriteria jumlah leukosit yaitu kelompok 1. 20.000/ μ L-29.999/ μ L, kelompok II. 30.000/ μ L-39.999/ μ L, kelompok III. 40.000/ μ L-49.999/ μ L, kelompok IV. Lebih dari 50.000/ μ L. Jumlah sampel yang diambil adalah 20 sampel

setiap kelompok, jumlah sampel seluruhnya 80 sampel. Hasil analisis menunjukkan ada perbedaan yang bermakna kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dengan nilai $p = 0,000$ lebih kecil dari $\alpha 0,05$. Kekeruhan leukositosis berpengaruh terhadap selisih kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi, semakin tinggi jumlah leukosit semakin besar selisih kadar hemoglobin, hasil penelitian pemeriksaan kadar hemoglobin berdasarkan kriteria jumlah leukosit diperoleh selisih kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada kelompok I. $0,22 \pm 0,07$ g/dL, kelompok II $0,40 \pm 0,22$ g/dL, kelompok III. $0,44 \pm 0,14$ g/dL, kelompok IV. $0,85 \pm 0,41$ g/dL. Pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin pada sampel leukositosis dengan jumlah lebih dari $20.000/\mu\text{L}$ perlu dilakukan sentrifugasi sehingga kadar hemoglobin lebih sesuai kondisi klinis pasien.

Kata kunci : metode sianmethemoglobin, sentrifugasi, leukositosis

PENDAHULUAN

Hemoglobin adalah komponen utama sel darah merah atau eritrosit yang terdiri dari globin dan heme terdiri dari cincin porfirin dengan satu atom besi (ferro). Globin terdiri atas 4 rantai polipeptida yaitu 2 rantai polipeptida alfa/ $(\alpha)_2$ dan 2 rantai polipeptida beta/ $(\beta)_2$. Rantai polipeptida alfa terdiri dari 141 asam amino dan rantai polipeptida beta terdiri dari 146 asam amino. Hemoglobin normal dalam darah orang dewasa terdiri dari Hb A (96-98%), Hb F (0.5-0.8 %) dan Hb A₂ (1,5-3,2%)(Henry, 2001).

Hemoglobin merupakan protein utama tubuh manusia yang berfungsi sebagai pengangkut oksigen ke jaringan dan media transport karbondioksida dari jaringan tubuh ke paru-paru, pengangkutan oksigen berdasarkan atas interaksi kimia antara molekul oksigen dan heme, suatu cincin tetrapirrol porfirin yang mengandung besi (ferro), kandungan zat besi yang terdapat dalam hemoglobin membuat darah berwarna merah. Hemoglobin mengikat 2 proton untuk setiap 4 molekul oksigen yang dilepaskan sehingga hemoglobin merupakan bufer utama dalam darah (Tarwoto, 2008).

Heme (ferro) yang terikat pada oksigen disebut hemoglobin teroksidasi atau oksihemoglobin (HbO_2) sedangkan heme (ferro) yang sudah melepaskan oksigen disebut deoksihemoglobin. Heme juga dapat mengikat karbonmonoksida (CO), yaitu heme yang teroksidasi dari ferro menjadi ferri atau methemoglobin, methemoglobin tidak mampu lagi untuk mengikat oksigen (Koolman, 2005).

Pentingnya hemoglobin ini menyebabkan pemeriksaan hemoglobin dalam darah mempunyai peranan penting dalam diagnosis suatu penyakit. Kegunaan dari pemeriksaan kadar hemoglobin adalah untuk menilai tingkat anemia, respons terhadap terapi anemia, atau perkembangan penyakit yang berhubungan dengan anemia dan polisitemia. Anemia ditentukan oleh penurunan kadar hemoglobin darah di bawah nilai normal, klasifikasi anemia yang umum dipakai yaitu anemia ringan sekali ($\text{Hb } 10 \text{ g/dL}$ -kurang dari nilai normal), anemia ringan ($\text{Hb } 8-9,9 \text{ g/dL}$), anemia sedang ($\text{Hb } 6-7,9 \text{ g/dL}$), anemia berat ($\text{Hb } < 6 \text{ g/dL}$) (Bakta, 2006). Polisitemia adalah peningkatan kadar hemoglobin melebihi batas atas rentang nilai normal, yaitu pada pria $\text{Hb } > 18,5 \text{ g/dL}$ dan wanita $> 16,5 \text{ g/dL}$ (Hoffbrand, 2013).

Pemeriksaan hemoglobin merupakan salah satu pemeriksaan darah rutin yang paling sering dilakukan oleh setiap laboratorium. Pemeriksaan kadar hemoglobin dapat ditentukan dengan beberapa metode, yaitu metode Sahli, metode sianmethemoglobin dengan cara manual dan otomatis (wirawan, 2011)

Metode pemeriksaan hemoglobin paling sederhana adalah metode Sahli, pada metode Sahli hemoglobin dihidrolisis dengan HCL menjadi asam hematin yang berwarna coklat, warna yang terbentuk dibandingkan dengan warna standar.

Perubahan warna asam hematin dibuat dengan cara pengenceran, sehingga warna sama dengan warna standar. Cara ini kurang baik karena tidak semua hemoglobin dapat diubah menjadi asam hematin misalnya karboksihemoglobin, methemoglobin dan sulfhemoglobin. Hasil pemeriksaan dipengaruhi oleh faktor subjektivitas, warna standar pudar, penyinaran, faktor kesalahan mencapai 5%-10 % (Gandasoebrata, 2007).

Metode lain yang banyak digunakan dalam laboratorium klinik adalah metode sianmethemoglobin, untuk tujuan klinis pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin mudah dilakukan dan hasil pemeriksaan lebih akurat daripada metode Sahli. Metode sianmethemoglobin adalah metode referensi untuk estimasi hemoglobin, semua jenis hemoglobin dapat diukur kecuali sulfhemoglobin, faktor kesalahan $\pm 2\%$, metode sianmethemoglobin masih banyak digunakan di beberapa rumah sakit dan puskesmas (Wirawan, 2011).

Prinsip dari pemeriksaan sianmethemoglobin adalah heme (ferro) dioksidasi oleh kalium ferrisianida menjadi (ferri) methemoglobin kemudian methemoglobin bereaksi dengan ion sianida membentuk sianmethemoglobin yang berwarna coklat, absorban diukur dengan kolorimeter atau spektrofotometer pada λ 540 nm.

Pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin menggunakan larutan drabkins dengan komposisi kalium ferrisianida yang mengikat heme (ferro) menjadi (ferri) methemoglobin, ion sianida yang mengubah methemoglobin menjadi sianmethemoglobin, KH_2PO_4 mengatur pH larutan (7.0-7.4) dan *non ionic detergent* berfungsi untuk mempercepat lisisnya eritrosit, sehingga jumlah sel leukosit yang tinggi dapat menyebabkan kekeruhan dan mengganggu pembacaan spektrofotometer. Kekeruhan juga dapat disebabkan hiperlipemia (McPherson, 2011) dan adanya globulin (Gandasoebrata, 2007). Kekeruhan yang disebabkan leukositosis menyebabkan pengukuran absorban meningkat signifikan dan kadar hemoglobin meningkat palsu (Wirawan, 2011).

Chanarin (1991) menyatakan jumlah leukosit lebih dari 40.000/ μL akan menyebabkan kekeruhan dan McPherson (2011) menyatakan pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin, adanya leukosit lebih dari 30.000/ μL menyebabkan pengukuran kadar hemoglobin lebih tinggi dari seharusnya, maka sampel darah yang sudah diencerkan dengan larutan Drabkins di sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit kemudian absorban supernatan diukur dengan spektrofotometer pada λ 540 nm.

Penelitian Rahman, 2006, *Very high leucocytes count interfere with colorimetric measurement of hemoglobin level*, didapatkan peningkatan kadar hemoglobin sebesar 0,5 g/dL sampai 0,6/dL setiap 50.000 sel leukosit/ μL darah pada sampel yang tidak di sentrifugasi dan didapatkan kadar hemoglobin meningkat palsu dengan jumlah leukosit tinggi, setelah dilakukan sentrifugasi didapatkan kadar hemoglobin sesuai dengan kondisi klinis pasien.

Peningkatan jumlah sel leukosit dalam darah lebih dari 11.000/ μL disebut leukositosis, leukositosis dapat terjadi karena adanya respon normal dari sumsum tulang terhadap proses infeksi atau inflamasi, peningkatan jumlah leukosit normal dapat terjadi sebagai akibat dari infeksi, kanker, atau pemberian obat (epinefrin, kortikosteroid) (Porth, 2011). Leukositosis adalah salah satu tanda dari kelainan sumsum tulang utama dalam produksi sel darah putih, pematangan atau kematian (apoptosis) secara fisiologik maupun patologik. Nilai kritis leukositosis pada orang dewasa 20.000/ μL , pada bayi baru lahir jumlah leukosit normal adalah 10.000/ μL -20.000/ μL . Leukositosis dengan jumlah 20.000/ μL -50.000/ μL dapat disebabkan oleh leukemia dan reaksi leukemoid. Pada leukemia jumlah leukosit dapat meningkat lebih dari 100.000/ μL (Zorc, 2009).

Kekeruhan yang disebabkan oleh jumlah leukosit yang tinggi mempengaruhi pengukuran absorban pada spektrofotometer sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan pemeriksaan

kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dilakukan sebagai salah satu cara untuk mengatasi kekeruhan yang disebabkan leukositosis dengan cara sentrifugasi sehingga hasil pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer didapatkan kadar hemoglobin yang lebih sesuai.

Tujuan penelitian ini adalah : Menganalisis kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis. Menganalisis kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan sentrifugasi pada sampel leukositosis.

Menganalisis perbedaan pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian observasional laboratorium. Rancangan penelitian ini termasuk penelitian *cross sectional study* (Sastroasmoro, 2010).

Populasi penelitian ini adalah semua sampel darah pasien yang memeriksakan darah rutin ke Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr Soetomo dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L mulai bulan Pebruari sampai dengan April 2014.

Sampel penelitian adalah sisa sampel darah dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L yang dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan kriteria jumlah leukosit yaitu kelompok I. 20.000/ μ L-<30.000/ μ L, kelompok II. 30.000/ μ L-<40.000/ μ L, kelompok III. 40.000/ μ L-<50.000/ μ L, kelompok IV. \geq 50.000/ μ L

Besar sampel dihitung dengan rumus besar sampel untuk proporsi tunggal dengan derajat kepercayaan 95% Besar sampel yang akan diambil adalah 20 sampel setiap kelompok berdasarkan kriteria jumlah leukosit,

besar sampel seluruhnya $4 \times 20 = 80$ sampel (Hanafiah, 2001).

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen-Instalasi Patologi Klinik FKUA-RSUD Dr Soetomo Surabaya pada bulan Pebruari- April 2014.

Alat yang digunakan pada penelitian: Fotometer 4010, sentrifugasi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kuvet, sarung tangan, klinipet+tip, tabung sentrifus, bola isap, botol sampel, label, pipet volume.

Bahan dalam penelitian terdiri dari: sampel darah dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L, darah kontrol, darah normal, larutan Drabkins dengan komposisi yaitu KH_2PO_4 140 mg, kalium ferrisianida 200 mg, kalium sianida 500 mg, *non ionic detergent* 0,5-1mL, aquades ad 1000 mL, simpan dalam botol coklat pada suhu kamar (Rondax, 2010).

Prosedur Pra Pelaksanaan Penelitian

Sebelum melakukan penelitian ini kendali mutu pemeriksaan laboratorium hemoglobin harus dilakukan, agar hasil pemeriksaan kadar hemoglobin tidak terjadi penyimpangan sehingga diperoleh hasil pemeriksaan kadar hemoglobin yang tepat dan teliti yaitu dengan mengetahui presisi (SD dan CV) dan akurasi.

Presisi pemeriksaan kadar hemoglobin menggunakan sampel darah dengan jumlah leukosit lebih dari 40.000/ μ L sebanyak satu sampel, kemudian diukur kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi dengan pengulangan sebanyak 20 kali, kemudian ditentukan standar deviasi (SD), mean, *Coefficient of Variation* (CV). Beda hasil yang diperbolehkan dalam pengukuran berulang pada kadar hemoglobin dengan CV \pm 3% (Mengko, 2013).

Akurasi adalah kesesuaian hasil pemeriksaan laboratorium dengan nilai sebenarnya. Sebelum melakukan akurasi terlebih dahulu dilakukan factor koreksi kadar

hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan kadar hemoglobin *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby). Sampel faktor koreksi diambil dari darah normal sebanyak 20 sampel, kemudian diperiksa kadar hemoglobin dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby) dan metode sianmethemoglobin, kemudian dihitung faktor koreksi pemeriksaan kadar hemoglobin.

Akurasi pemeriksaan kadar hemoglobin pada penelitian ini menggunakan bahan kontrol darah yang diperiksa dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby). Bahan kontrol mempunyai tiga rentang nilai kadar hemoglobin yaitu kadar hemoglobin low/rendah (7,3 - 8,1g/dL) nomor katalog (Kontrol L 4006), kadar hemoglobin normal (11,6 - 12,8g/dL) nomor katalog (Kontrol N 4006), kadar hemoglobin high/tinggi (15,3- 16,9g/dL) nomor katalog (Kontrol H 4006), ketiga kontrol hemoglobin masing-masing diperiksa kadar hemoglobin dengan metode sianmethemoglobin sebanyak 10 kali pengulangan, kadar hemoglobin yang didapat dikalikan dengan faktor koreksi. Hasil akurasi dilihat apakah kadar hemoglobin terletak di dalam atau di luar rentang nilai kontrol, bila terletak di dalam rentang nilai kontrol maka hasil pemeriksaan bahan kontrol dianggap tepat sehingga dapat dinyatakan hasil pemeriksaan kadar hemoglobin terhadap sampel juga tepat (Herman, 2012).

Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Prosedur pemeriksaan kadar hemoglobin metode sian methemoglobin. Prinsip pemeriksaan hemoglobin: Heme (ferro) dioksidasi oleh kalium ferrisianida menjadi (ferri) methemoglobin yang kemudian bereaksi dengan ion sianida membentuk sianmethemoglobin yang berwarna coklat, absorban diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda 540$ nm atau fotometer pada $\lambda 546$ (Randox, 2010).

Prosedur pemeriksaan: Pipet 5 mL larutan Drabkins kedalam tabung reaksi. Tambah 20 μ L sampel darah EDTA, campur, inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Masukkan

larutan Drabkin(blanko) kedalam kuvet posisi-kan penunjuk fotometer pada angka nol dengan $\lambda 546$ nm, kemudian larutan sampel yang sudah diinkubasi bagi 2, tabung 1 (2,5 mL) untuk kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi, masukkan ke dalam kuvet ukur absorban dengan fotometer pada $\lambda 546$ nm (kadar Hb-1). Tabung 2 (2,5 mL) untuk kadar hemoglobin dengan sentrifugasi, masukkan ke dalam sentrifus, sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan masukkan ke dalam kuvet ukur absorban dengan fotometer pada $\lambda 546$ nm (kadar Hb-2). Baca kadar hemoglobin (Hb-1 dan Hb-2 dalam g/dL). Perhitungan: Kadar hemoglobin = Absorban sampel x 36,77 g/dL (Randox, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Presisi

Hasil presisi kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi didapatkan nilai SD 0,36 dan CV 2,97%, hasil presisi kadar hemoglobin dengan sentrifugasi nilai SD 0,34 dan CV 2,89%. Data hasil presisi sesuai pada tabel 1 berikut :

Tabel 1. Hasil presisi pemeriksaan kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis

	Rerata kadar Hb g/dL	SD	CV (%)
Kadar Hb tanpa sentrifugasi	12,16	0,36	2,97
Kadar Hb dengan sentrifugasi	11,74	0,34	2,89

Tabel diatas hasil presisi menunjukkan nilai CV untuk pemeriksaan kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi kurang dari 3%, maka penelitian pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dapat dilakukan.

Akurasi

Sebelum melakukan akurasi terlebih dahulu dilakukan faktor koreksi kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan kadar hemoglobin *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby). data sesuai pada tabel 2 berikut :

Tabel 2. Hasil factor koreksi pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin terhadap *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby)

Rerata Hb <i>Hematology Analyzer</i> g/dL	Rerata Hb sianmethHb g/dL (X)	Faktor Koreksi (F)=Y : X
13,38	12,147	1,1015

Akurasi pemeriksaan kadar hemoglobin pada penelitian ini menggunakan bahan kontrol berupa darah yang diperiksa dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby), bahan kontrol darah mempunyai tiga nilai yaitu kadar hemoglobin low/rendah (7,3 - 8,1g/dL) nomor katalog (Kontrol L 4006), kadar hemoglobin normal (11,6 - 12,8g/dL) nomor katalog (Kontrol N 4006), kadar hemoglobin high/tinggi (15,3 - 16,9g/dL) nomor katalog (Kontrol H 4006), ketiga bahan kontrol tersebut diperiksa kadar hemoglobin dengan metode sianmethemoglobin masing-masing sebanyak 10kali. Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dikalikan dengan faktor koreksi (1,1015), data sesuai pada tabel 3 berikut :

Tabel 3. Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin darah kontrol dengan metode sianmethemoglobin

Rerata kadar Hb sianmethHb (g/dL)	Hb sian-met X 1,1015	Rentang nilai kadar Hb kontrol (g/dL)
7,1	7,82	7,3 - 8,1
11,18	12,3	11,6 - 12,8
14,86	16,37	15,3 - 16,2

Tabel 3 hasil pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin setelah dikalikan

faktor koreksi (1,1015) diperoleh rerata kadar hemoglobin low/rendah 7,82g/dL berada di dalam rentang nilai kadar hemoglobin kontrol 7,3-8,1 g/dL, rerata kadar hemoglobin normal 12,3g/dL berada di dalam rentang nilai kadar hemoglobin kontrol 11,6-12,8g/dL, dan rerata kadar hemoglobin high/tinggi 16,37 g/dL berada di dalam rentang nilai kadar hemoglobin kontrol 15,3-16,9g/dL. Hasil akurasi kadar hemoglobin berada di dalam rentang nilai kontrol, maka hasil pemeriksaan bahan kontrol dianggap tepat sehingga dapat dinyatakan hasil pemeriksaan kadar hemoglobin terhadap sampel juga tepat (Herman, 2012).

Uji Normalitas

Penelitian kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada 80 sampel leukositosis dilakukan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test*. Hasil uji normalitas kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi menunjukkan nilai $p = 0,9703$ lebih besar dari $\alpha 0,05$ dan kadar hemoglobin dengan sentrifugasi menunjukkan $p = 0,9702$ lebih besar dari $\alpha 0,05$, karena $p > 0,05$ berarti data tidak berbeda nyata, hal ini menunjukkan bahwa data-data tersebut berdistribusi normal. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 4. Uji Normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* terhadap kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis

		Rerata	SD	p
Kadar tanpa sentrifugasi	Hb	9,61	2,037	0,9703
Kadar dengan sentrifugasi	Hb	9,13	2,091	0,9702

Tabel 4 uji normalitas terhadap 80 sampel leukositosis diperoleh hasil pada sampel kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi dengan nilai $p = 0,9703$ lebih besar dari nilai $\alpha 0,05$ yang berarti data terdistribusi normal dan hasil sampel kadar hemoglobin dengan sentrifugasi nilai $p = 0,9702$ lebih besar dari nilai $\alpha 0,05$ yang berarti data terdistribusi normal. Data hasil pemeriksaan kadar hemoglobin dapat dilanjutkan dengan uji *Paired t-test*.

Hasil Analisis perbedaan kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi.

Hasil analisis pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi, didapatkan rerata nilai kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi 9,62 g/dL SD 2,038 dan rerata kadar dengan sentrifugasi 9,14g/dL SD 2,09.

Tabel 5. Hasil uji *Paired t-test* pemeriksaan kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi

	Rerata kadar Hb g/dL dan SD	Rerata beda kadar Hb g/dL	p
Hb tanpa sentrifugasi	9,62 ± 2,04	0,48 ± 0,336	0,000
Hb dengan sentrifugasi	9,14 ± 2,09		

Tabel 5 hasil *Paired t test* menunjukkan nilai $p = 0,000$ lebih kecil dari nilai $\alpha 0,05$, karena nilai $p < 0,05$ berarti ada perbedaan bermakna kadar hemoglobin metode sian methemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L. pemeriksaan kadar hemoglobindengan sentrifugasi lebih rendah dibandingkan dengan kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi, beda kadar hemoglobindengan dan tanpa sentrifugasi 0,48 g/dL \pm 0,336.

Uji *Paired t test* kadar hemoglobin

berdasarkan kriteria jumlah leukosit yaitu :kelompok I. 20.000/ μ L-29.999/ μ L diperoleh rerata kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi 9,55 (g/dL) \pm 2,28, dengan sentrifugasi 9,33(g/dL) \pm 2,28,kelompok II. 30.000/ μ L-<40.000/ μ L diperoleh rerata kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi 9,89(g/dL) \pm 1,81, dengan sentrifugasi 9,49 (g/dL) \pm 1,84, kelompok III. 40.000/ μ -50.000/ μ Ldiperoleh rerata kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi 9,78(g/dL) \pm 2,60, dengan sentrifugasi 9,34 g/dL \pm 2,59, kelompok IV. > 50.000/ μ diperoleh rerata kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi 9,25(g/dL) \pm 1,32, dengan sentrifugasi 8,39 g/dL \pm 1,44. Data dapat dilihat pada tabel 6

	Rerata kadar Hb dan SD	Beda kadar Hb (g/dL)	p
Kel I 20.000-29.999/ μL			
Hb tanpa sentrifugasi	9,55± 2,28	0,22 ± 0,07	0,000
Hb dengan sentrifu- gasi	9,33 ± 2,28		
Kel II 30.000-39.999/ μL			
Hb tanpa sentrifugasi	9,89 ± 1,82	0,40 ± 0,22	0,000
Hb dengan sentrifu- gasi	9,49 ± 1,85		
Kel III 40.000-49.999/μL			
Hb tanpa sentrifugasi	9,78 ± 2,60	0,44 ± 0,14	0,000
Hb dengan sentrifu- gasi	9,34± 2,59		
Kel IV > 50.000/μL			
Hb tanpa sentrifugasi	9,25 ± 1,32	0,85 ± 0,41	0,000
Hb dengan sentrifu- gasi	8,39 ± 1,44		

berikut :

Tabel 6 Hasil Uji *Paired t-test* kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis menurut kriteria jumlah leukosit.

Tabel 6 hasil uji *Paired t-test* menunjukkan bahwa semua kelompok sampel berdasarkan kriteria jumlah leukosit diperoleh nilai $p = 0,000$ lebih kecil dari nilai $\alpha 0,05$, yang berarti semua kelompok ada perbedaan bermakna kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin

dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis. Hasil penelitian menunjukkan kadar hemoglobin dengan sentrifugasi lebih rendah dibanding kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi, dengan beda kadar hemoglobin kelompok I. $0,22 \pm 0,07$ g/dL, kelompok II. $0,40 \pm 0,22$ g/dL, kelompok III $0,44 \pm 0,14$ g/dL, kelompok IV. $0,85 \pm 0,41$ g/dL.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Departemen-Instalasi Patologi Klinik FKUA-RSUD Dr Soetomo, Populasi penelitian ini adalah semua sampel pasien yang memeriksakan darah rutin dan diperiksa dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby), sampel penelitian diambil dari sisa darah pasien dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L yang dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan kriteria jumlah leukosit yaitu kelompok I. 20.000/ μ L-<30.000/ μ L, kelompok II. 30.000/ μ L-<40.000/ μ L, kelompok III. 40.000/ μ L-<50.000/ μ L, kelompok IV. $\geq 50.000/\mu$ L. Setiap kelompok diambil 20 sampel, besar sampel seluruhnya 80 sampel.

Pemeriksaan kadar hemoglobin pada penelitian ini menggunakan reagen Drabkins dari Randox (2010), perhitungan hasil kadar hemoglobin diperoleh dari absorban sampel dikali 36,77 g/dL, absorban diukur dengan alat fotometer 4010 pada panjang gelombang 546 nm. Setiap sampel dilakukan pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi sebanyak dua kali pengulangan, kemudian diambil hasil rerata untuk uji statistik *Paired t-test*.

Kendali Mutu Laboaratorium

Kendali mutu laboratorium pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui presisi dan akurasi pemeriksaan kadar hemoglobin. Presisi adalah beda hasil pemeriksaan yang dilakukan secara berulang-ulang pada sampel yang sama. Sampel yang digunakan adalah sampel darah dengan jumlah leukosit

lebih dari 40.000/ μ L, pemeriksaan kadar hemoglobin dilakukan pengulangan sebanyak 20 kali, hasil presisi kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi didapatkan nilai SD 0,36 dan CV 2,97%, hasil presisi kadar hemoglobin dengan sentrifugasi nilai SD 0,34 dan CV 2,89%, beda hasil yang diperbolehkan dalam pengukuran berulang pada kadar hemoglobin dengan CV $\pm 3\%$ (Mengko, 2013).

Berdasarkan hasil presisi tersebut maka penelitian dapat dilaksanakan dan hasil pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi dapat dikeluarkan, karena memenuhi syarat Mengko (2013) beda hasil pemeriksaan kadar hemoglobin tidak lebih dari CV $\pm 3\%$.

Penentuan akurasi pada penelitian ini menggunakan bahan kontrol berupa darah yang diperiksa dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby), bahan kontrol darah mempunyai tiga nilai yaitu nilai kadar hemoglobin low/rendah (7,3 - 8,1g/dL) nomor katalog (Kontrol L 4006), kadar hemoglobin normal (11,6 - 12,8g/dL) nomor katalog (Kontrol N 4006), kadar hemoglobin high/tinggi (15,3 - 16,9g/dL) nomor katalog (Kontrol H 4006) dan diperiksa dengan metode sianmethemoglobin masing-masing kontrol sebanyak 10 kali pengulangan.

Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin kontrol dikoreksi dengan kadar hemoglobin *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby), faktor koreksi diperoleh dari pemeriksaan sampel darah normal sebanyak 20 sampel, kemudian diperiksa kadar hemoglobin dengan *Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby) dan metode sianmethemoglobin, rerata kadar hemoglobin-*Hematology Analyzer* (CEL-DYN Ruby) dibagi rerata kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin didapatkan hasil faktor koreksi 1,1015 (tabel 5.5). Hasil pengukuran kadar hemoglobindarah kontrol dengan metode sianmethemoglobin dikalikan dengan faktor koreksi (1,1015).

Tabel 5.6 diperoleh rerata kadar

hemoglobin low/rendah 7,82g/dL berada di dalam rentang nilai kadar hemoglobin 7,3-8,1 g/dL, rerata kadar hemoglobin normal 12,3g/dL berada di dalam rentang nilai kadar hemoglobin 11,6-12,8g/dL, dan rerata kadar hemoglobin kontrol high/tinggi 16,37 g/dL berada di dalam rentang nilai kadar hemoglobin kontrol 15,3-16,9g/dL. Hasil akurasi pemeriksaan kadar hemoglobin terletak di dalam rentang nilai kontrol, maka hasil pemeriksaan bahan kontrol dianggap tepat sehingga dapat dinyatakan hasil pemeriksaan kadar hemoglobin terhadap sampel juga tepat(Herman, 2012).

Analisis Kadar Hemoglobin Dengan dan Tanpa Sentrifugasi

Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin menurut derajat anemia pada tabel 5.8 menunjukkan peningkatan jumlah persentase kadar hemoglobin dengan sentrifugasi dibandingkan kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi, pada anemia sedang(6-7,9 g/dL) tanpa sentrifugasi sebanyak 15 (19%) dengan sentrifugasi meningkat menjadi 19 (24%), anemia berat (< 6 g/dL) tanpa sentrifugasi sebanyak 2 (2,5%) dengan sentrifugasi meningkat menjadi 4 (5%).

Hasil penelitian kadar hemoglobin terhadap 80 sampel leukositosis metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi, diperoleh rerata nilai kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi 9,6176 g/dL dengan SD 2,03797 dan rerata nilai kadar hemoglobin dengan sentrifugasi 9,1376 g/dL dengan SD 2,09186. Kadar hemoglobin dengan sentrifugasi lebih rendah dibanding kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi, beda kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi $0,48 \text{ g/dL} \pm 0,33602$. Hasil uji *Paired t-test* diperoleh nilai $p = 0,000$ lebih kecil dari nilai $\alpha 0,05$ yang berarti ada perbedaan bermakna kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μL . Hasil

penelitian ini sesuai dengan teori yang menyatakan kekeruhan yang disebabkan leukositosis menyebabkan pembacaan absorbansi meningkat dan kadar hemoglobin tinggi palsu sehingga kekeruhan yang disebabkan leukositosis perlu dilakukan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan kadar hemoglobin yang lebih sesuai.

Turgeon (1989) menyatakan salah satu sumber kesalahan pada pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin adalah meningkatnya jumlah leukosit dan lipemia menyebabkan kadar hemoglobin meningkat palsu karena kekeruhan. Kekeruhan dapat dihilangkan dengan cara sentrifugasi dan pembacaan absorbansi pada supernatanan lebih akurat.

Gandasoebrata (2007) dan WHO (2011) menyatakan kekeruhan dalam suatu sampel darah mengganggu pengukuran pada fotometer sehingga menghasilkan absorbansi dan kadar hemoglobin yang lebih tinggi dari yang sebenarnya, kekeruhan dapat disebabkan antara lain leukositosis, lipemia dan adanya globulin abnormal.

Andriyoko (2009) menyatakan bahwa pengukuran kadar hemoglobin dengan metode spektrofotometer dipengaruhi oleh kekeruhan yang disebabkan leukositosis, penelitian perbandingan kadar hemoglobin metode spektrofotometer dengan metode Hemocue pada sampel leukositosis, kekeruhan yang disebabkan leukosit dihilangkan dengan sentrifugasi selama 10 menit 3000 rpm.

Uji *Paired t-test* pemeriksaan kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dibagi menjadi 4 kelompok berdasarkan kriteria jumlah leukosit yaitu kelompok I. 20.000/ μL -<30.000/ μL kelompok II. 30.000/ μL -40.000/ μL kelompok III. 40.000/ μL -<50.000/ μL , kelompok IV. $\geq 50.000/\mu\text{L}$, diperoleh nilai $p = 0,000$ lebih kecil dari nilai $\alpha 0,05$ yang berarti semua kelompok ada perbedaan bermakna kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis.

Kekeruhan yang disebabkan leukositosis berpengaruh terhadap beda kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi, semakin tinggi jumlah leukosit semakin besar beda kadar hemoglobin yang didapat, hasil penelitian pemeriksaan kadar hemoglobin berdasarkan kriteria jumlah leukosit diperoleh beda kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada kelompok I. 20.000/ μ L- <30.000/ μ L beda kadar hemoglobin $0,22 \pm 0,07$ g/dL, kelompok II. 30.000/ μ L- <40.000/ μ L beda kadar hemoglobin $0,40 \pm 0,22$ g/dL, kelompok III. 40.000/ μ L- <50.000/ μ L beda kadar hemoglobin $0,44 \pm 0,14$ g/dL, kelompok IV. $\geq 50.000/\mu$ L beda kadar hemoglobin $0,85 \pm 0,41$ g/dL.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Rahman (2006) mengemukakan bahwa jumlah leukosit yang tinggi meningkatkan kadar hemoglobin, hasil penelitian kadar hemoglobin yang diperoleh sesudah sentrifugasi lebih rendah dibandingkan kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi, pada jumlah leukosit 20.000-30.000/ μ L diperoleh beda maksimum kadar hemoglobin 0,3 g/dL, jumlah leukosit 30.000-40.000/ μ L beda maksimum kadar hemoglobin 0,45 g/dL, jumlah leukosit 40.000-50.000/ μ L beda maksimum kadar hemoglobin 0,6 g/dL, jumlah leukosit 50.000-100.000/ μ L beda maksimum kadar hemoglobin 1,2 g/dL.

Hasil penelitian ini dengan jumlah leukosit 20.000/ μ L sudah ada perbedaan yang bermakna kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi, hasil penelitian ini memberikan gambaran hasil yang berbeda karena Rodak (2002) dan McPherson (2011) menyatakan, jumlah leukosit lebih dari 30.000/ μ L pada pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dapat menyebabkan kekeruhan dan pengukuran kadar hemoglobin lebih tinggi dari seharusnya.

Chanarin (1991) dan Jiu (2003) menyatakan pemeriksaan kadar hemoglobin jumlah leukosit lebih dari 40.000/ μ L mempengaruhi pengukuran dan Wirawan (2002) menyatakan jumlah leukosit lebih dari 50.000/ μ L menyebabkan kekeruhan sehingga hasil pen-

gukuran kadar hemoglobin lebih tinggi dari seharusnya, kekeruhan yang disebabkan leukositosis dapat diatasi dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit untuk menghilangkan pembacaan absorban palsu.

Hasil penelitian pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L dengan nilai $p = 0,000$ yang berarti ada perbedaan bermakna sehingga dapat disimpulkan bahwa pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin pada sampel leukositosis perlu dilakukan sentrifugasi sebelum diukur absorban untuk memperoleh kadar hemoglobin yang sebenarnya.

KESIMPULAN

Hasil penelitian tentang perbedaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dengan jumlah leukosit lebih dari 20.000/ μ L dapat disimpulkan sebagai berikut: Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin pada sampel leukositosis dengan sentrifugasi lebih rendah dibandingkan dengan kadar hemoglobin tanpa sentrifugasi

Hasil uji *Paired t-test* menunjukkan ada perbedaan yang bermakna kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis.

Kekeruhan yang disebabkan leukositosis berpengaruh terhadap beda kadar hemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi, semakin tinggi jumlah leukosit semakin besar beda kadar hemoglobin yang didapat.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang perbedaan kadar hemoglobin metode sianmethemoglobin dengan dan tanpa sentrifugasi pada sampel leukositosis dengan kadar lipid normal sehingga hasil penelitian lebih akurat karena selain leukositosis kekeruhan juga dapat disebabkan oleh lipemik.

Penelitian ini tidak menggunakan standar hemoglobin, untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat disarankan menggunakan reagen yang ada standar hemoglobin.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriyoko., B., (2009). 'Comparison of spectrophotometer method with hemocue method for haemoglobin measurement in leucocytosis sample', *Media Clinical Pathology and Medical Laboratory*, Vol. 15 no 3, Journal.unair.ac.id/filterPDF/abstrak_38099_tpjua.pdf
- Bakta M I., (2006). *Hematologi klinik ringkas*, EGC, Jakarta, pp. 1-13.
- Chanarin I., (1991), *Laboratory haematology : an account of laboratory techniques*, Churchill Livingstone, pp. 7-14.
- Clin, J, Chem, Clin, Biochem, (1980), 'Expert panel on nomenclature and principle of quality control in clinical chemistry', *International federal of cilinical chemistry*, vol. 18, pp. 69-77.
- Gandasoebrata R, (2007), *Penuntun laboratorium klinik*, Dian Rakyat, pp. 8-19.
- Greenstein B & Adam G, (1996), *Medical biochemistry at a glance*, London, pp. 101-105.
- Hanafiah K. A., (2001), *Rancangan percobaan teori dan aplikasi*, edisi revisi, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Henry J.B., (2001), *Clinical diagnosis and management by laboratory method*, twentieth edition, WB.Saunders company, Philadelphia, pp. 479-481.
- Herman H., (2012), Pemantapan mutu http://herdianaakhyar.blogspot.com/2012/10/pemantapan-mutu_5523.html
- Hoffbrand, A. V & Pettit J.E, (1993), *Essential haematology*, Blackwell Science Ltd, pp. 17-19.
- Hoffbrand, A. V & Moss H, (2013), *Essential haematology*. Ed 6, EGC, Jakarta, pp. 16-139.
- Jiu W.S.Y, (2003), 'Comparison of hemocue with cyanmethemoglobin method for estimating hemoglobin', *Institute of nutrition and food safety chinese center for disease control and prevention beejing, china*. Vol. 32, no.5, pp. 495-7.
- Kosasih EN & Kosasih AS, (2008), *Tafsiran hasil pemeriksaan laboratorium klinik*, edisi 2, Karisma Publishing Group, Tangerang, pp. 72-79.
- Koolman J & Klaus H. R., (2005). *Color atlas of biochemistry*, 2 edition, Marburg Germany. pp 193-204.
- McPherson R A & Pincus M R., (2011), *Henry's clinical diagnosis and management laboratory methods*, 22nd Edition Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 34-515.
- Mehta A,B& Hoffbrand A.V., (2008), *At a glance hematologi*. Edisi kedua, Erlangga, Jakarta, pp. 19-25.
- Mengko R., (2013), *Instrumentasi laboratorium klinik*, ITB, Bandung, pp. 11-22.
- Pratiknya A. W., (2001), *Dasar-dasar metode penelitian kedokteran & kesehatan*, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta, pp. 50-61.
- Rahman M., (2006), 'Very high leucocytes count interfere with colorimetric measurement of hemoglobin level', *Northern Medical journal*, Vol. 15 no 2, pp. 14-20.
- Randox Laboratories Limited, (2008), *Haemoglobin (Hb) colorimetric method manual*, United Kingdom.
- Riswnto, (2009), Penetapan kadar hemoglobin, http://labkesehatan.blogspot.com/2009_11_01_archive.html
- Rodak B.F., (2002), *Hematology clinical principles and applications*, second edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp.105-131.
- Sastroasmoro S & Sofyan I, (2010). *Dasar-dasar metode penelitian klinis*, Sagung Seto, Jakarta, pp. 112-115.

- Silalahi U, ,(2010), *Metode penelitian sosial*, PT Refika Aditama, Bandung, pp. 385-387.
- Soewoto H, Mohammad S., Vita K, Septilia I.W, Dwirini R, Parwati A, Ani R.P, Indriati P.H, Sri Widia A. J, (2001), *Biokimia : eksperimen laboratorium*, Widia Medika, Jakarta, pp. 1-9.
- Tarwoto & Wartomeh, (2008), *Keperawatan medikal bedah: gangguan sistem hematologi*, Trans Info Media Jakarta, pp. 9-21.
- Turgeon M L., (1989), *Clinical hematology theory and procedures*, second edition, Little, Brown and Company, London, pp. 18-343.
- Wirawan R., (2002), *Ketidak sesuaian hasil pemeriksaan hematologi dengan alat hitung sel darah otomatis*. FKUI, Jakarta, pp. 138-145.
- Wirawan R., (2011). *Pemeriksaan laboratorium hematologi*, FKUI, Jakarta. pp 25-42
- World Health Organization (WHO), (2011), *Manual for a health laboratory*, edition 2, ISBN 978-979-044-005-0, pp. 261-271.