

REAGEN BUATAN SENDIRI SEBAGAI REAGEN ALTERNATIF UNTUK PEMERIKSAAN KADAR ALBUMIN

Fusvita Merdekawati*, Nani Kurnaeni

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Bandung

Jl. Babakan Loa Gunung Batu Cimahi Utara Kota Cimahi 40514, (022)6628141/6628142

*Fusvita Merdekawati, e-mail: mfusvita@yahoo.com

Abstract

Background: The use of homemade reagents is a modification of the inspection method that has been validated, so that to be used it needs to be tested first for its quality in order to obtain a guarantee of quality against the results of a good examination. The study aimed to determine the performance of homemade reagents compared to using a commercial reagent kit on albumin examination.

Method: The research method is descriptive with comparative studies where commercial reagent kits act as a comparison method and homemade reagents act as test methods. Both of these reagents are in the form of a solution. Homemade reagents are used for albumin examination in the validation test method which consists of test accuracy, precision, linearity, reportable range, limit detection, limit quantity, recovery, and interference.

Results and conclusion: The data obtained is then processed using descriptive statistical tests, One Way Anova and Wesgard rules. Based on the results of testing, all parameters in the method validation were accepted, so there was no difference in performance between using homemade reagents and commercial reagent kits

Keywords: Homemade reagents, Albumin examination, Validation method

1. Pendahuluan

Penentuan serum albumin direkomendasikan pada pasien hemodialisis sebagai indikator terapi, pada pasien dengan multiple myeloma dan pada pasien yang menjalani terapi penggantian albumin (1). Albumin merupakan protein plasma yang paling banyak dalam tubuh manusia, yaitu sekitar 55–60% dari protein serum yang terukur (2,3).

Beberapa Metode yang dapat digunakan untuk pemeriksaan albumin diantaranya metode presipitasi, kadar triftopan, elektroforesis,

immunochemical dan metode dye binding yaitu *methyl orange*, HABA (2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid), BCG (*Bromocresol Green*), dan BCP (*Bromocresol purple*)(4). Metode tersebut merupakan reagen kit komersial dalam bentuk larutan dan memiliki keunggulan yang sudah terstandarisasi oleh pabrik, tetapi dengan harga yang relatif mahal dan sulit untuk di dapatkan. Untuk mengantisipasi hal tersebut maka diperlukan adanya reagen alternatif. Reagen buatan sendiri merupakan suatu alternatif yang dapat digunakan sebagai reagen kit komersial yang jauh lebih

murah dengan bahan yang mudah didapatkan (1,5)

Penelitian mengenai pembuatan reagen buatan sendiri untuk pemeriksaan albumin telah dilakukan sebelumnya, hanya saja menghasilkan nilai absorban blanko yang tinggi dan terjadinya pengendapan setelah direaksikan dengan albumin(6). Hal tersebut diduga karena tidak ditambahkannya surfaktan pada komposisi reagen yang dibuat. Oleh karena itu pada penelitian ini ditambahkan surfaktan yang dapat mencegah terjadinya pengendapan protein dan menurunkan absorban blanko.

Berdasarkan Standar Nasional Indonesia ISO 15189 tahun 2012 tentang Laboratorium Medik – Persyaratan Mutu Kompetensi, setiap laboratorium harus menggunakan metode standar yang telah divalidasi. Modifikasi terhadap metode pemeriksaan yang telah divalidasi, seperti penggunaan reagen buatan sendiri perlu dilakukan uji kinerja terlebih dahulu agar dapat dijadikan jaminan kualitas terhadap hasil pemeriksaan. Pengujian kualitas tersebut dapat dilakukan dengan cara validasi metode berdasarkan pedoman

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (7,8). Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk menguji Kinerja Reagen Buatan Sendiri untuk Pemeriksaan Albumin dan dibandingkan dengan Reagen Kit Komersial.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian deskriptif dengan studi perbandingan (*Comparative study*). Studi perbandingan dilakukan dengan cara membandingkan kinerja reagen buatan sendiri sebagai metode uji dan kinerja reagen kit komersial sebagai metode pembanding untuk pemeriksaan albumin. Pengujian kinerja dilakukan dengan cara menguji akurasi, presisi, linearitas, *reportable range*, *recovery*, dan *interference*. Bahan pemeriksaan yang digunakan dalam pemeriksaan albumin menggunakan bahan pemeriksaan serum kontrol konsentrasi normal dan patologis.

2.2 Cara Pengumpulan Data

Data yang digunakan adalah data primer yang diperoleh dari hasil pengukuran setiap parameter validasi

metode dengan menggunakan reagen buatan sendiri dan reagen kit komersial pada pemeriksaan albumin.

2.3 Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah reagen buatan sendiri dan serum kontrol

2.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung.

2.5 Alat dan Bahan Penelitian

Mikropipet 10-100 μ l, mikropipet Eppendorf 1000 μ l, fotometer kenzamax, centrifuge T5, vortex VM-300KcE, serum kontrol konsentrasi normal dan patologis, reagen buatan sendiri (buffer sitrat pH 4,2 30 mmol/L, bromocresol green 0,26 mmol/L dan tween 20), kit reagen kit komersial Biolabo dan hemolisat \pm 4 g/dL

2.6 Tahapan Penelitian

Dibuat larutan reagen buatan sendiri dengan cara melarutkan 21,014 g asam sitrat monohidrat ($C_3H_8O_7H_2O$) dalam 1 L aquabidest (Larutan A) dan 29,41 g trisodium sitrat dehidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) dalam larutan 1 L aquabidest (Larutan B). Kemudian diambil 540,0 mL larutan A dan 460,0

mL larutan B ke dalam gelas kimia kemudian dicampurkan sehingga didapatkan larutan buffer sitrat 0,1 M sebanyak 1 L. Diambil sebanyak 300 mL larutan buffer sitrat, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L dan ditambahkan aquabidest hingga batas volume untuk mendapatkan larutan buffer sitrat 30 mmol/L, dituangkan ke dalam gelas kimia dan diukur pH nya menggunakan pH meter dengan rentang pH yang diinginkan sebesar $4,20 \pm 0,05$. Kemudian ditambahkan *bromocresol green* 0,1815 g sambil diaduk perlahan dan ditambahkan surfaktan tween 20.

Bahan pemeriksaan yang digunakan terdiri dari serum kontrol normal dan serum kontrol patologis. Masing-masing serum kontrol dilarutkan dengan aquabidest, kemudian dipisahkan dan dimasukkan ke dalam aliquot untuk dilakukan pengujian validasi metode. Pengujian validasi metode tersebut dilakukan terhadap pemeriksaan albumin metode BCG dengan prinsip bahwa albumin dengan bromocresol green pada suasana pH 4,2 akan mengubah warna indikator dari kuning hijau menjadi hijau biru. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan konsentrasi albumin dalam sampel yang diukur pada

fotometer dengan panjang gelombang 630 nm. Cara Kerja Pemeriksaan Albumin metode BCG terdapat pada tabel 1. Dihomogenkan, inkubasi selama 10 menit pada suhu 20 – 25 °C.

memastikan bahwa nilai yang dilaporkan akan memenuhi harapan klinis dengan tingkat keandalan yang diinginkan. Revalidasi dilakukan jika terdapat perubahan terhadap reagen,

Tabel 1. Pemeriksaan Albumin Metode BCG

	Blanko	Standar	Kontrol		Sampel
			Normal	Patologis	
Standar	-	10 µL	-	-	-
Kontrol	-	-	10 µL	10 µL	-
Serum	-	-	-	-	10 µL
Larutan Kerja	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Dihomogenkan, inkubasi selama 10 menit pada suhu 20 – 25 °C. Kemudian dibaca hasilnya pada fotometer dengan panjang gelombang 630 nm. Warna stabil sampai 30 menit.

2.7 Analisis Data

Pengukuran linearitas, data yang diperoleh diolah menggunakan uji statistik koefisien korelasi r, one way Anova. Pengukuran presisi, akurasi, *reportable range*, limit deteksi, limit kuantitas, *recovery*, dan *interference*, data yang diperoleh diolah dengan uji statistik deskriptif menggunakan Microsoft Excel.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setiap laboratorium harus menggunakan metode standar yang telah divalidasi dan sebelum diperkenalkan untuk pengujian sampel pasien semua tes harus divalidasi untuk

instrumentasi ataupun protokol(9)

Validasi merupakan suatu sistem analitis, sering disebut sebagai pengujian kesesuaian sistem, berkaitan dengan memeriksa kinerja berbagai metode dan peralatan dalam sehari-hari. Validasi metode adalah suatu tindakan penilaian parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode diperlukan untuk menilai tingkat kesalahan dan diharapkan kesalahan tersebut memenuhi persyaratan klinis yang diantisipasi. Beberapa parameter

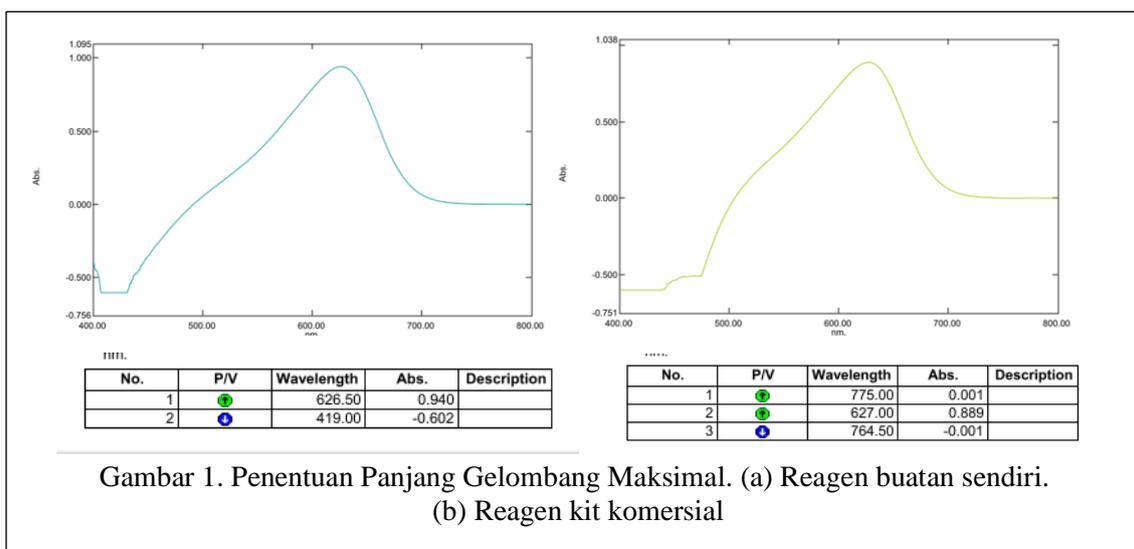
analisis dalam validasi metode adalah presisi, akurasi, linearitas, *reportable range*, limit deteksi, limit kuantitas, *recovery* dan *interference*(10–12)

3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan pengujian validasi metode. Penentuan panjang gelombang ini menggunakan spektrofotometer. Panjang gelombang maksimum adalah

kit komersial 627 nm dengan absorbansi maksimum sebesar 0,889 (Gambar 1b).

Panjang gelombang 630 nm dipilih untuk pemeriksaan albumin serum, agar pemeriksaan albumin dapat dilakukan dengan menggunakan fotometer dan sesuai dengan kit reagen kit komersial albumin metode BCG yang juga menggunakan panjang gelombang 630 nm untuk pemeriksaan albumin serumnya (15).



pengukuran panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi maksimum (13,14). Pada gambar 1a menunjukkan bahwa panjang gelombang optimum yang diperoleh untuk reagen buatan sendiri adalah 626,5 nm dengan absorbansi maksimum sebesar 0,940. Sedangkan panjang gelombang optimum yang diperoleh untuk reagen

3.2 Uji Presisi

Uji presisi untuk pemeriksaan albumin ini menggunakan reagen albumin buatan sendiri dan reagen kit komersial yang dilakukan 1 hari untuk mendapatkan 20 data kontrol serum normal dan 20 data kontrol serum patologis. Dari hasil pengolahan data

didapatkan hasil perhitungan pada tabel 2. kecil dari 2,5 sehingga uji presisi untuk kedua konsentrasi dapat diterima.

Tabel 2 Data Hasil Uji Presisi

	Kontrol Serum Normal	Kontrol Serum Patologis	Kontrol Serum Normal	Kontrol Serum Patologis
	Reagen Buatan sendiri		Reagen Kit Komersial	
Rerata	3,03	4,37	3,11	4,51
Standar Deviasi (SD)	0,040	0,039	0,060	0,097
Coefficient of Varian (CV) %	1,333	0,870	1,933	2,165

Presisi merupakan kedekatan hasil pemeriksaan berulang yang dilakukan di bawah kondisi pengukuran yang sama (16,17) . Pada tabel 2 menunjukkan bahwa rerata hasil uji presisi dengan menggunakan kontrol serum normal dan patologis masing-masing sebesar 3,03 dan 4,37 untuk reagen buatan sendiri, sebesar 3,11 dan 4,51 untuk reagen kit komersial. Sehingga menghasilkan nilai standar deviasii untuk masing-masing sebesar 0,040, 0,039, 0,060 dan 0,097.

Rerata Kriteria penerimaan uji presisi untuk short term imprecision adalah apabila nilai CV% lebih kecil dari 2,5. Nilai 2,5 diperoleh dari perhitungan 0,25 dikalikan dengan TEa albumin yang bernilai 10%. Berdasarkan data pada tabel 2 nilai CV% pada kedua kontrol serum lebih

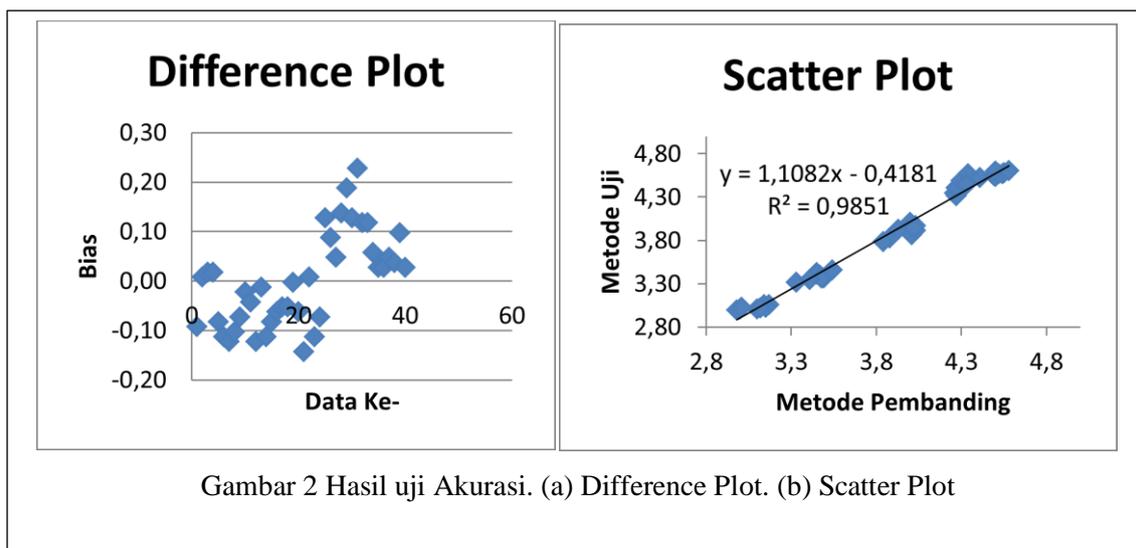
Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa nilai kesalahan acak atau *random error* yang terjadi masih dalam batas yang ditetapkan.

3.3 Uji Akurasi

Pengujian akurasi dilakukan dengan melakukan pemeriksaan albumin dengan menggunakan reagen albumin buatan sendiri sebagai metode uji dan dengan menggunakan reagen albumin kit komersial sebagai metode pembandingan. Pengujian akurasi dilakukan dengan menggunakan kontrol serum normal yang dibuat kedalam 5 konsentarsi yang berbeda, setiap konsentrasinya dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali sehingga secara keseluruhan didapatkan 40 data untuk metode uji dan 40 data untuk metode pembandingan.

Data kemudian diplotkan pada *Difference plot* (Gambar 2a) dan *Scatter plot* (Gambar 2b) untuk menilai rentang, *outliers*, dan regresi linear kedua metode.

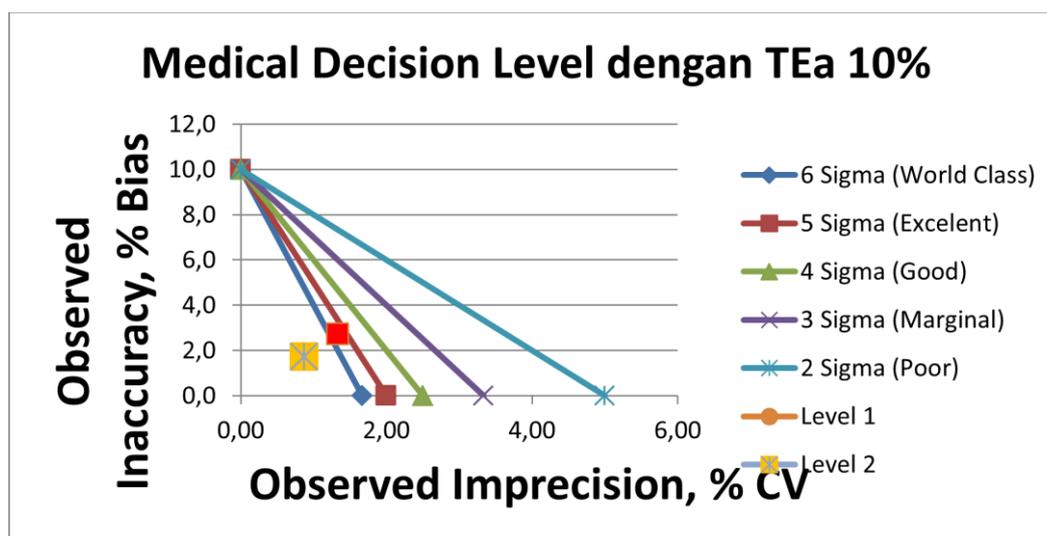
(MDL). Dari perhitungan regresi linear sederhana pada konsentrasi MDL 3,10 g/dL didapatkan SE sebesar 2,66% dan RE sebesar 5,11% sehingga nilai TE sebesar 7,77%. Nilai TE tersebut kurang



Gambar 2 Hasil uji Akurasi. (a) Difference Plot. (b) Scatter Plot

Berdasarkan perhitungan uji akurasi didapatkan nilai rata-rata bias setelah dikoreksi kedua metode menjadi 0,00 g/dL sehingga dapat dikatakan bahwa tidak ada perbedaan akurasi di antara kedua metode. Berdasarkan Gambar 2b didapatkan bahwa nilai $r > 0,9924$, sehingga dapat melakukan perhitungan regresi linear sederhana dan estimasi kesalahan sistematik (SE) dan kesalahan acak (RE) untuk mendapatkan Total Error pada konsentrasi *Medical Decision Levels*

dari nilai TEa sebesar 10%, sehingga kinerja metode uji pada konsentrasi MDL tersebut diterima. Pada konsentrasi MDL 4,57 g/dL didapatkan SE sebesar 1,68% dan RE sebesar 3,35% sehingga nilai TE sebesar 5,02%. Nilai TE tersebut kurang dari nilai TEa sebesar 10%, sehingga kinerja metode uji pada konsentrasi MDL tersebut juga diterima. Kemudian dibuat *Method Decision Chart* (Gambar 3) untuk menilai kinerja suatu metode.



Gambar 3 Medical Decision Level

Sebuah *Method Decision Chart* telah dirancang sedemikian rupa untuk menggabungkan nilai bias, impresisi dan *total error allowable*. Estimasi SE dan RE kemudian dikombinasikan membentuk *operating point* dimana lokasinya digunakan untuk menilai akseptabilitas suatu metode (9,10,18).

Dari Gambar 3 terlihat bahwa kinerja metode pada konsentrasi MDL 3,10 g/dL berada pada posisi *operating point Excellent* dan kinerja metode pada konsentrasi MDL 4,57 g/dL berada pada posisi *operating point world class*. Artinya, Suatu metode dengan "kinerja yang sangat baik" mudah dikelola dalam layanan rutin bahkan dengan rotasi yang meluas dari banyak operator dan dapat dikendalikan dengan biaya minimum, biasanya dengan prosedur

QC satu aturan dan minimum 2 pengukuran kontrol per run.

Kesalahan acak dapat disebabkan karena ketidakstabilan, seperti ketidakstabilan pada penanganan teknik, suhu, instrumen, operator, reagen dan variasi lingkungan. Kesalahan acak sulit dihilangkan, namun pengulangan dapat mengurangi pengaruh yang ditimbulkan. Kesalahan ini dapat diminimalisir dengan cara pelatiha, pengawasan, dan kepatuhan terhadap prosedur standar(4,5,9).

Keakuratan hasil analisis tergantung kepada sebaran kesalahan sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Kesalahan sistematis dapat diminimalisir dengan menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang

baik, pengontrolan suhu, pelaksanaannya cermat, dan taat pada prosedur. Salah satu penyebab timbulnya kesalahan sistematik adalah modifikasi dalam metode pengujian(19). Penggunaan reagen buatan sendiri merupakan suatu modifikasi dalam metode pengujian.

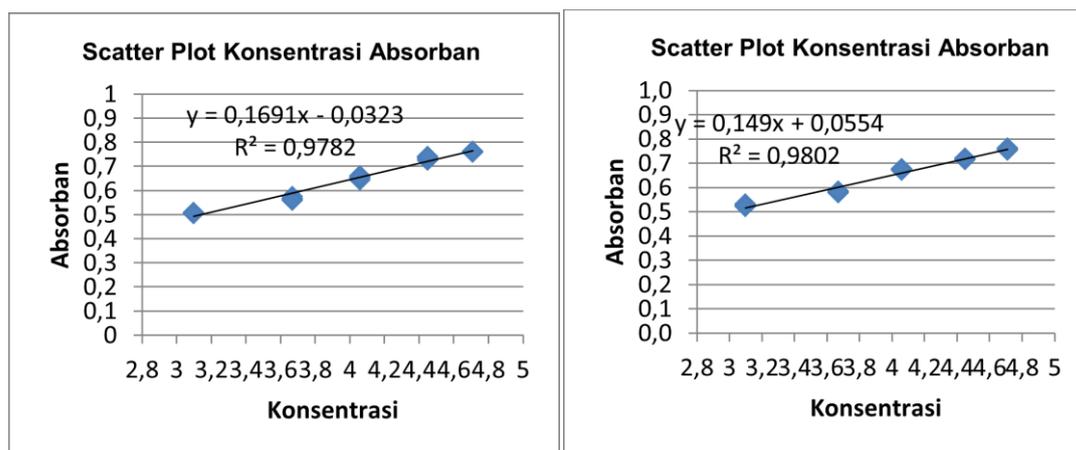
Pada penelitian ini didapatkan rerata absorban blanko reagen buatan sendiri sebesar 0,113. Nilai ini lebih kecil dibandingkan dengan nilai absorban blanko dari reagen pada penelitian sebelumnya yang memiliki rerata sebesar 1,248. Hal tersebut dikarenakan pada penelitian ini sudah ditambahkan surfaktan pada komposisi reagensinya. Surfaktan yang digunakan adalah tween 20.

Surfaktan merupakan suatu molekul yang sekaligus memiliki gugus hidrofilik dan gugus lipofilik sehingga dapat mempersatukan campuran yang terdiri dari air dan minyak. Surfaktan yang biasa digunakan dalam reagen BCG untuk pemeriksaan albumin merupakan surfaktan nonionik yang tidak bermuatan pada bagian alkilnya, yaitu polyoxyethylene (23) lauryl atau Brij 35 ataupun Tween 20 dan segolongannya (20–22).

Tween 20 atau Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate atau Polysorbate 20 dengan rumus kimia C₅₈H₁₁₄O₂₆ dan berat molekul 1227,72 g/mole. Surfaktan ini banyak digunakan dalam aplikasi biokimia, sebagai agen pengemulsi untuk persiapan emulsi minyak-dalam-air yang stabil, digunakan dalam ekstraksi pre-membran untuk menghilangkan protein perifer (digunakan pada 2% untuk ekstraksi protein yang terikat membran).

3.4 Uji Linearitas

Pada uji linearitas dilakukan pemeriksaan albumin metode BCG dengan menggunakan reagen buatan sendiri dan reagen kit komersial untuk mendapatkan 25 data absorban yang didapatkan dari 5 konsentrasi serum kontrol. Selanjutnya data tersebut dilakukan uji statistik yaitu koefisien korelasi r dan uji One Way Anova. Ke 25 data diplotkan pada Scatter plot (Gambar 4) untuk mendapatkan persamaan garis regresi yang menunjukkan hubungan antara absorban dengan konsentrasi.



Gambar 4. Scatter Plot Hasil Uji Linearitas. (a) Menggunakan Reagen Buatan Sendiri. (b) Menggunakan Reagen kit komersial

Dari gambar 4 didapatkan persamaan regresi dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,989 untuk reagen buatan sendiri dan 0,9901 untuk reagen kit komersial. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara nilai absorban dengan nilai konsentrasi. Pada uji linearitas dilakukan juga pengujian terhadap adanya perbedaan nilai absorban pada setiap konsentrasi serum kontrol yang dilakukan dengan uji one way anova. Dari hasil uji statistik didapatkan nilai probabilitas (P) untuk uji anova sebesar 0,000 baik untuk reagen buatan sendiri maupun reagen kit komersial yang menyebabkan H_0 ditolak, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata nilai absorban pada setiap konsentrasi. Kriteria penerimaan uji

linearitas apabila nilai koefisien korelasi r lebih dari 0,975 dan nilai probabilitas untuk uji anova kurang dari 0,05. dari uji statistik yang telah dilakukan didapatkan nilai r sebesar 0,989 dengan probabilitas sebesar 0,000 untuk reagen buatan sendiri dan 0,990 dengan probabilitas sebesar 0,000 untuk reagen kit komersial, sehingga dapat disimpulkan bahwa uji linearitas dapat diterima.

Linearitas didefinisikan sebagai kemampuan metode untuk mendapatkan hasil yang sebanding dengan konsentrasi analit. Sehingga apabila uji ini dilakukan dapat mengorelasikan antara respon alat atau metode dan konsentrasi yang diharapkan dapat linear. Hal tersebut dapat dilihat pada gambaran secara matematis oleh koefisien korelasi pada

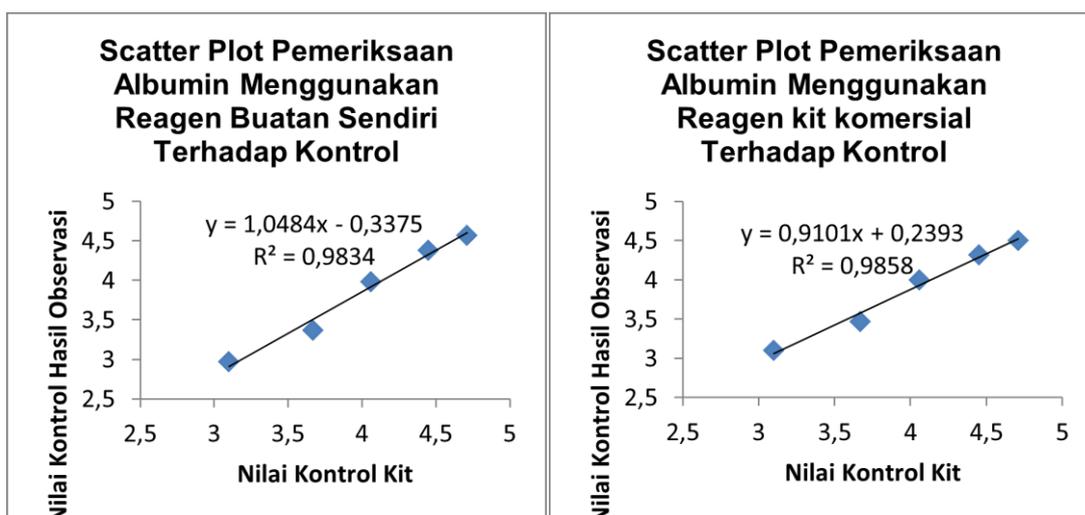
regresi linear. Linearitas juga menunjukkan fungsi kalibrasi yang mencakup pengukuran instrument atau metode secara keseluruhan, dan fungsi keakuratan dari analit yang diperiksa (16,17,19,23). Berdasarkan hasil penelitian koefisien korelasinya >0,989, sehingga dapat diasumsikan bahwa kemampuan metode reagen buatan sendiri ini linear, hasil yang didapatkan sebanding dengan konsentrasi analit yang ada di dalam sampel dan hasilnya tersebut akurat.

3.5 Uji Reportable Range

Pengujian *reportable range* dilakukan untuk mengetahui konsentrasi tertinggi yang memberikan nilai TE lebih besar dari nilai TEa. Penentuan

konsentrasi tertinggi dilakukan dengan cara menghitung rentang nilai observasi dari setiap konsentrasi. Konsentrasi yang diuji yaitu 3,10; 3,67; 4,06; 4,45; dan 4,71. Dari masing-masing konsentrasi diperiksa konsentrasi albuminnya menggunakan reagen kit komersial dan reagen buatan sendiri sebanyak 5 kali pengulangan, sehingga didapatkan 25 data konsentrasi albumin menggunakan reagen kit komersial dan 25 data konsentrasi albumin menggunakan reagen buatan sendiri.

Berdasarkan hasil perhitungan setiap konsentrasi memiliki rentang observasi yang sama dengan rentang idealnya, yang menandakan bahwa metode tersebut dapat diterima. Dari hasil pengukuran juga dibuat scatter



Gambar 5 Scatter Plot Hasil Uji Reportable Range. (a) Menggunakan Reagen Buatan Sendiri (b) Menggunakan Reagen kit komersial

plot antara konsentrasi nilai kontrol yang ada di kit dengan nilai kontrol hasil observasi, sehingga didapatkan garis regresi yang terdapat pada (Gambar 5)

(b) Menggunakan Reagen kit komersial
Dari Gambar 5 didapatkan persamaan garis untuk masing-masing penggunaan reagen buatan sendiri dan reagen kit komersial, dimana keduanya memiliki nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9917 dan 0,9929. Nilai koefisien korelasi yang $>0,99$ menunjukkan hubungan yang kuat antara kedua nilai konsentrasi. Reportable range merupakan batas terendah sampai batas tertinggi yang dapat dilaporkan secara kuantitatif oleh metode dengan keakuratan, ketelitian dan linearitas yang dapat diterima. Batas terendah dibatasi oleh limit kuantitas (LOQ) sedangkan batas tertinggi didefinisikan sebagai konsentrasi dimana anomaly signifikan dalam sensitivitas analisis diobservasi. Reportable range merupakan limit dari linearitas (17,20,21,24)

Kriteria penerimaan pengujian reportable range adalah apabila rentang nilai konsentrasi tertinggi melebihi atau sama dengan rentang nilai normal parameter albumin 3,5-5,2 g/dL. Pada

hasil penelitian didapatkan bahwa konsentrasi tertinggi yang diobservasi yaitu 4,71 g/dL memiliki rentang nilai yang lebih besar untuk yang menggunakan reagen buatan sendiri, dan untuk yang menggunakan reagen kit komersial sama dengan rentang nilai ideal, sehingga dapat dikatakan bahwa pengujian *reportable range* ini dapat diterima. Pengujian pada konsentrasi tertinggi tersebut untuk menentukan rentang nilai hasil pengukuran dimana laboratorium dapat memverifikasi keakuratan instrumen atau respon sistem metode pengukuran(19,25).

3.6 Uji Limit Deteksi dan Limit Kuantitas

Uji limit deteksi (LOD) dilakukan dengan cara mengukur absorbansi blanko reagen albumin buatan sendiri sebanyak 20 kali. Konsentrasi LOD diperoleh dari persamaan garis regresi $Y = a + bx$, dimana Y adalah absorbansi limit deteksi, a adalah intercept, b adalah slope dan x adalah konsentrasi limit deteksi. Absorbansi limit deteksi diperoleh dengan cara menghitung rerata absorbansi blanko ditambah dengan 3 kali standar deviasi. Dari hasil pengolahan data didapatkan rerata pengukuran absorbansi blanko

menggunakan reagen buatan sendiri sebesar 0,11295 dan standar deviasi sebesar 0,0015. sehingga didapatkan konsentrasi LOD sebesar 0,89 g/dL dan konsentrasi LOQ sebesar 2,28 g/dL.

Pengujian limit deteksi dan limit kuantitas dimaksudkan untuk memperkirakan konsentrasi terendah yang dapat diukur oleh suatu metode. Limit deteksi menunjukkan bahwa hasil konsentrasi analit terendah yang dapat bereaksi dengan reagen berbeda dengan nilai nol dan analit dalam bahan pemeriksaan lebih besar daripada blanko. Limit kuantitas menunjukkan konsentrasi terendah analit di dalam bahan pemeriksaan dan ditentukan dengan presisi dan akurasi yang diterima (17,23,25,26).

Kriteria penerimaan uji LOD dan LOQ adalah jika LOD dan LOQ tidak lebih besar dari nilai konsentrasi terendah kadar albumin yaitu 3,5 g/dL, sehingga dapat dikatakan bahwa pengujian limit deteksi dan limit kuantitas dapat diterima. Reagen buatan sendiri dapat mengukur konsentrasi terendah analit dalam bahan pemeriksaan dengan presisi dan akurasi yang baik.

3.7 Uji *Recovery*

Uji *Recovery* dilakukan dengan cara mengukur konsentrasi albumin pada enam bahan pemeriksaan dengan menggunakan kontrol serum normal. Bahan pemeriksaan tersebut dibedakan menjadi baseline sample dan *spike sample*. *Baseline sample* adalah serum yang ditambahkan aquabidest dengan perbandingan 9 : 1. Sedangkan *spike sample* adalah serum yang ditambahkan larutan standar albumin dengan konsentrasi 5,0 g/dl dengan perbandingan 9 : 1.

Bahan pemeriksaan tersebut selanjutnya diperiksa masing-masing sebanyak empat kali pengulangan sehingga diperoleh 24 data untuk baseline sample dan 24 data untuk *spike sample*. Nilai penerimaan uji *recovery* dilakukan dengan cara melakukan perhitungan, yaitu membagi selisih antara rerata masing-masing bahan pemeriksaan *baseline sample* dan *spike sample* dengan kadar albumin yang ditambahkan yaitu sebesar 0,5 g/dL.

Pengujian *recovery* dilakukan untuk mengetahui keakuratan pengukuran analit dari bahan pemeriksaan dan mengukur bias yang terjadi antara bahan pemeriksaan yang ditambahkan analit dengan yang tidak

ditambahkan analit. Pengujian ini memberikan informasi mengenai spesifisitas analitis dengan cara menilai ada tidaknya kesalahan sistematik proporsional yang signifikan dari pengukuran. Kesalahan tersebut dapat dilihat jika perbedaan kesalahan meningkat seiring dengan konsentrasi analit yang ditambahkan (9,19,27)

Idealnya jika konsentrasi analit yang ditambahkan terdeteksi oleh metode, nilai *recovery* akan sebesar 100%. *Proportional error* akan muncul jika % *recovery* metode uji lebih besar atau lebih kecil dari 100%. *Proportional error* dapat disebabkan oleh ketidakstabilan larutan standar, kesalahan saat persiapan, yaitu pencampuran dan pengenceran bahan pemeriksaan, dan kesalahan pada perhitungan data. *Proportional error* pada konsentrasi MDL dapat mengganggu kegunaan dari metode (10,23)

Kriteria penerimaan uji *recovery* adalah apabila nilai rerata perhitungan *recovery* berada pada rentang 95-105% dan *proportional error* < TEa. Berdasarkan hasil pengolahan data diperoleh bahwa nilai *recovery* sebesar 98.17% dengan nilai *proportional error* sebesar 1,83% untuk

pemeriksaan albumin menggunakan reagen sendiri dan diperoleh nilai *recovery* sebesar 95% dengan nilai *proportional error* sebesar 5% untuk pemeriksaan albumin menggunakan reagen kit komersial. Dengan demikian bahwa uji *recovery* reagen buatan sendiri untuk pemeriksaan albumin dapat diterima.

3.8 Uji *Interference*

Uji *Interference* dilakukan dengan cara mengukur konsentrasi albumin pada enam bahan pemeriksaan dengan menggunakan kontrol serum normal. Bahan pemeriksaan tersebut dibedakan menjadi *baseline sample* dan *spike sample*. *Baseline sample* adalah serum yang ditambahkan aquabidest dengan perbandingan 9 : 1. Sedangkan *spike sample* adalah serum yang ditambahkan kontrol Hemoglobin dengan konsentrasi 3,99 g/dl dengan perbandingan 9 : 1. Bahan pemeriksaan tersebut selanjutnya diperiksa masing-masing sebanyak empat kali pengulangan sehingga diperoleh 24 data untuk *baseline sample* dan 24 data untuk *spike sample*. Kriteria penerimaan uji *interference* dilakukan dengan cara menghitung selisih antara rerata masing-masing bahan

pemeriksaan *baseline sample* dan *spike sample*, dibandingkan dengan batas kesalahan.

Didapatkan rerata selisih sebesar 0,20 g/dl untuk reagen buatan sendiri dan 0,29 g/dL untuk reagen komersial yang kemudian dibandingkan dengan batas kesalahan. Batas kesalahan untuk pemeriksaan albumin dengan menggunakan reagen buatan sendiri adalah 0,27 g/dl dan 0,30 g/dL dengan menggunakan reagen kit komersial. Nilai tersebut didapatkan dari perhitungan nilai rerata *baseline sample* albumin dikali dengan TEa%.

Pengujian *Interference* dilakukan untuk memperkirakan kesalahan sistematik yang disebabkan oleh bahan pengganggu yang mungkin ada dalam bahan pemeriksaan yang menyebabkan menurunnya spesifisitas metode. Pengujian ini juga dilakukan untuk mengetahui efek dari bahan pengganggu yang dapat menyebabkan perubahan pada hasil diagnostik secara klinis (7,9,17,19,25–27). Bahan pengganggu yang dimaksud adalah bahan yang terdapat dalam serum manusia yang mungkin ada dalam pemeriksaan, misalnya hemoglobin, bilirubin dan lipid (9,10,23,27). Pada penelitian ini bahan pengganggu yang

digunakan adalah hemolisis untuk menilai gangguan yang ditimbulkan akibat hemolisis.

Kriteria penerimaan uji *Interference* adalah apabila nilai rerata selisih tidak lebih besar dari nilai batas kesalahan. Berdasarkan hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa uji *Interference* dapat diterima. Nilai tersebut juga menunjukkan bahwa dengan penambahan hemolisis pada serum sebesar 3,99 g/dL tidak mempengaruhi pemeriksaan albumin buatan sendiri. Hal ini tidak berbeda dengan menggunakan reagen kit komersial bahwa penambahan konsentrasi hemolisis sebesar 0,4 g/dL tidak mempengaruhi hasil pemeriksaan (15).

4 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil bahwa seluruh kriteria parameter pengujian validasi metode terpenuhi dan dapat diterima. Tidak terdapat perbedaan kinerja antara metode BCG untuk pemeriksaan kadar albumin serum menggunakan reagen kit komersial dengan menggunakan reagen buatan sendiri. Reagen buatan sendiri ini dapat digunakan sebagai alternatif reagen untuk pemeriksaan kadar albumin serum.

DAFTAR PUSTAKA

1. Infusino I, Panteghini M. Serum albumin: Accuracy and clinical use. Clin Chim Acta [Internet]. 2013;419:15–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.01.005>
2. Wardhan P. Clinical Pathology and Clinical Pathology and. Indones J. 2016;22(2).
3. Irsan Hasan TAI. Peran Albumin Dalam Penatalaksanaan Sirosis Hati. Csientific J Pharm Dev Med Appl. 2008;21(2):3–7.
4. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations. Sixth edit. Wolters Kluwer; 2010.
5. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Cara Penyelenggaraan Laboratorium Yang Baik. 2013;
6. Anggi L. Validasi Metode Bromocresol Green Untuk Pemeriksaan Albumin Menggunakan Reagen Buatan Sendiri. Bandung; 2016. 1–3 p.
7. Courses WO. Westgard QC Order Form.
8. CLSI EP 9. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline — Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus. Vol. 22.
9. Lumsden JH. Laboratory test method validation. Rev Méd Vét. 2000;151(7):623–30.
10. UNODC. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens A. New York: UNITED NATIONS PUBLICATION; 2009.
11. Molinaro R, Ascp MT. Method Validation. In Atlanta: Profesional Practice ini Clinical Chemistry; 2013.
12. WHO. Guidelines On Validation – Appendix 4 Analytical Method Validation. 2016;(June):1–11.
13. Supriyanto R, Kimia J, Lampung U, Lampung B. Studi Analisis Spesiasi Ion Logan Cr(III) dan Cr(VI) Dengan Asam Tanat Dari Ekstrak Gambir Menggunakan Spektrometri UV-VIS. 2011;17(1):35–42.
14. Kusumawardhani N, Sulistyarti H, Veteran J. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Dan pH Optimum Dalam Pembuatan Tes Kit Sianida Berdasarkan Pembentukan Hidrindantin. 1(1):711–7.
15. Rives LH. Albumin BCG Method. France; 2011.
16. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi. PETUNJUK Pelaks VALIDASI Metod DAN CARA PERHITUNGANNYA. 2004;I(3):117–35.
17. United Nations Office on Drugs and Crime. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. 2009. 67 p.
18. Westgard S, Qc W. Six Sigma Metric Analysis for Analytical Testing Processes. 2009;
19. Irish National Accreditation Board (INAB). Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories. 2012;(3):36.
20. Coulter B. Albumin. 2009;1–2.
21. Muthalib MI binti A, A. Determination of Critical Micelle Concentration of Mixed Solution

- of Zwitterionic-Nonionic Surfactants. 2011;(Stf 3015).
22. Patent WO1982000056A1 - Improved albumin reagent - Google Patentsuche.
 23. Friedecký B., Šprongl L. KJ. Validation and Verification of Analytical. Valid Verif Anal Methods Clin Lab. 2004;(November):1–15.
 24. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi K. RCSB PDB - 1AO6: Crystal Structure Of Human Serum Albumin Structure Summary Page [Internet]. 1999. Available from: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1AO6>
 25. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods [Internet]. Eurachem Guide, ISBN: 0-94948926-12-0. 1998. 1–61 p. Available from: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>
 26. Validation M, Software V, Methods Q, Summary V, Methods Q, Summary V, et al. Standardized Protocol for Method Validation / Verification Standard Operating Procedure Quality Assurance Unit Laboratory Services Section - Austin Table of Contents I . Purpose II . Scope.
 27. Klick RL. Decision making in the clinical laboratory: a quantitative and statistical approach for methods evaluation. 1997;(November):1–27.