

PENGARUH VARIASI WAKTU INKUBASI TERHADAP KADAR HEMOGLOBIN MENGUNAKAN METODE SAHLI

The Effect of Incubation Time on Hemoglobin Levels using Sahli Method

¹*Rinny Ardina, ²Yemimasike Putri

¹Universitas Muhammadiyah Palangkaraya, Jl. RTA. Milono Km. 1,5, Palangka Raya, Indonesia

²Universitas Muhammadiyah Palangkaraya, Jl. RTA. Milono Km. 1,5, Palangka Raya, Indonesia

*e-mail : rinyardina@gmail.com

ABSTRAK

Beberapa laboratorium klinik kecil dan puskesmas di kota Palangka Raya masih menggunakan cara sederhana untuk menentukan kadar hemoglobin yaitu dengan menggunakan metode Sahli. Masih banyak ditemukan perbedaan prosedur terkait waktu inkubasi pada pemeriksaan hemoglobin metode Sahli, dimana ada yang tidak menggunakan inkubasi, inkubasi 3 menit atau inkubasi 5 menit. Tujuan penelitian untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh yang signifikan antara variasi waktu inkubasi terhadap kadar hemoglobin dengan menggunakan metode Sahli. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, dimana kadar hemoglobin diukur dengan metode Sahli dengan variasi waktu inkubasi yaitu 0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit, dan 10 menit. Sebanyak 21 sampel darah diperoleh dengan teknik *Purposive Sampling*. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji *One Way ANNOVA*. Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan ($p=0,00$) antara variasi waktu inkubasi (0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit dan 10 menit) terhadap kadar hemoglobin dengan menggunakan metode Sahli. Tampak peningkatan kadar hemoglobin terjadi seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Dimana nilai terendah dari rerata kadar hemoglobin pada pengukuran 0 menit yaitu 10,9 g/dl dan nilai tertinggi pada pengukuran dengan waktu inkubasi 10 menit yaitu 14,2 g/dl. Penting diperhatikan oleh petugas laboratorium untuk melakukan inkubasi pada darah sesuai dengan prosedur yang ditetapkan oleh metode Sahli, sebab kesalahan pada tahap analitik memberikan kontribusi sebesar 25% penyebab kesalahan dalam hasil pemeriksaan laboratorium.

Kata kunci : hemoglobin, waktu inkubasi, metode Sahli

ABSTRACT

Several clinical laboratory and community health centers in Palangka Raya still use a simple method to determine hemoglobin levels with Sahli method. There are many differences in procedures related to incubation time in Sahli method of hemoglobin examination. There are those who don't use incubation, incubation for 3 minutes or incubation for 5 minutes. This study aimed to determine the effect of incubation time on hemoglobin levels using the Sahli method. This study was experimental study, where hemoglobin levels are measured by Sahli method with incubation time variations of 0 minutes, 3 minutes, 5 minutes, 8 minutes, and 10 minutes. A total of 21 blood samples were obtained by purposive sampling technique. The data obtained were statistically analyzed using the One Way ANNOVA test. The results showed there are significant effect of incubation time (0 minutes, 3 minutes, 5 minutes, 8 minutes and 10 minutes) on hemoglobin levels using Sahli method ($p = 0.00$). Increased hemoglobin levels occur with increasing incubation time. Where the lowest value of the average hemoglobin level at the measurement of 0 minutes was 10.9 g / dl and the highest value on the measurement of 10 minutes was 14.2 g / dl. It is important to laboratory personnel to incubate blood according to the procedures established by the Sahli method, because errors in the analytical stage contribute 25% to the causes of errors in laboratory result.

Keyword: hemoglobin, incubation time, Sahli method

PENDAHULUAN

Pemeriksaan hemoglobin merupakan salah satu pemeriksaan darah rutin yang paling sering dilakukan oleh setiap laboratorium. Pemeriksaan ini dilakukan terutama untuk mendeteksi kasus anemia. Seseorang dapat dikatakan anemia apabila kadar hemoglobin <12,0 g/dl untuk perempuan dan <13,0 g/dl untuk laki-laki (Bain, *et al.*, 2017).

Pemeriksaan kadar hemoglobin dapat ditentukan dengan cara manual atau otomatis. Beberapa laboratorium klinik kecil dan puskesmas di kota Palangka Raya diketahui masih menggunakan cara yang sederhana atau manual untuk menentukan kadar hemoglobin yaitu dengan menggunakan metode Sahli. Dalam metode Sahli, hemoglobin dihidrolisis dengan HCl 0,1 N menjadi asam hematin yang berwarna coklat. Warna yang terbentuk dibandingkan dengan warna standard dan perubahan warna asam hematin dibuat dengan cara pengenceran sehingga warna sama dengan warna standard. Pada pemeriksaan ini faktor kesalahan atau penyimpangan mencapai 15-30%. Asam hematin adalah ferroheme dimana oleh oksigen yang ada di udara akan dioksidasi menjadi ferri heme yang selanjutnya segera bereaksi dengan ion Cl⁻ membentuk ferrihemechlorid atau disebut hematin atau hemin yang berwarna coklat (Gandasoebrata, 2016).

Dalam pemeriksaan kadar hemoglobin metode Sahli perlu dilakukan proses inkubasi yang bertujuan untuk membuat suatu larutan menjadi saling berikatan sehingga menjadi suatu larutan yang homogen. Berdasarkan hasil observasi pada beberapa pusat layanan kesehatan di kota Palangka Raya, diketahui masih banyak ditemukan perbedaan prosedur terkait waktu inkubasi pada pemeriksaan hemoglobin metode Sahli. Ada yang tidak menggunakan inkubasi, ada yang menggunakan inkubasi selama 3 menit dan ada juga yang menggunakan inkubasi selama 5 menit. Menurut Gandasoebrata (2016) waktu inkubasi yang dibutuhkan untuk pemeriksaan kadar hemoglobin metode Sahli yaitu 3-5 menit.

Waktu inkubasi yang singkat dapat menyebabkan asam hematin tidak terbentuk sempurna sehingga menghasilkan kadar hemoglobin yang cenderung rendah. Sedangkan pada waktu inkubasi yang terlalu lama dapat menyebabkan eritrosit menjadi pecah atau lisis sehingga kadar hemoglobin yang didapatkan cenderung tinggi (Fitri, 2012).

Menurut *International Committee for Standardization in Hematology (ICSH)*, *gold standard* untuk pemeriksaan kadar hemoglobin yaitu menggunakan metode sianmethemoglobin-spektrofotometrik. Pada metode ini, darah diencerkan dengan larutan mengandung potassium ferricyanide dan potassium cyanide. Potassium ferricyanide mengoksidasi besi yang ada di dalam heme untuk mengubah bentuk ferri (Fe²⁺) menjadi methemoglobin yang dikonversi menjadi sianmethemoglobin oleh potassium cyanide. Sianmethemoglobin merupakan produk berwarna yang stabil yang dapat diukur oleh spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Penentuan konsentrasi didasarkan oleh hukum Beer-Lambert. Dimana absorbansi sampel setara dengan konsentrasi hemoglobin (Higgins, 2005).

Metode sianmethemoglobin pada masa kini, telah dimodifikasi agar tidak berbahaya dikarenakan penggunaan bahan yang mengandung sianida. Pemeriksaan kadar hemoglobin dengan *Hematology Analyzer* mengadaptasi metode sianmethemoglobin-spektrofotometrik tanpa menggunakan bahan sianida dan ini jauh lebih aman. Bahan *Sodium Lauryl Sulfate (SLS)* merupakan bahan yang digunakan dalam metode ini. SLS dapat melisiskan eritrosit dan secara cepat membentuk kompleks dengan hemoglobin membentuk methemoglobin yang stabil. Methemoglobin dapat diukur pada panjang gelombang 539 nm dan absorbansi sampel setara dengan konsentrasi hemoglobin (Higgins, 2005).

Prosedur inkubasi pada pemeriksaan kadar hemoglobin metode Sahli merupakan salah satu prosedur yang masuk dalam tahap analitik. Kesalahan dalam tahap pra analitik memberikan kontribusi sebesar 61% dari total kesalahan dalam

pemeriksaan di laboratorium, disusul oleh tahap analitik sebesar 25% dan pasca analitik sebesar 14% (Mengko, 2013). Oleh sebab itu, sangatlah perlu ditekankan kepada petugas laboratorium untuk dapat memperhatikan dan menjalankan prosedur dengan benar terutama dalam hal inkubasi sampel darah pada tahap analitik ini untuk mencegah hasil pemeriksaan yang tidak representatif dengan kondisi pasien sebenarnya.

METODE PENELITIAN

Jenis dan metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Dimana kadar hemoglobin diukur dengan metode Sahli dengan variasi waktu inkubasi darah yaitu 0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit, dan 10 menit. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji normalitas dan homogenitas. Data yang normal dan homogen selanjutnya di uji secara statistik dengan uji *One Way ANNOVA* untuk mengetahui ada/tidaknya pengaruh yang signifikan dari variasi waktu inkubasi terhadap hasil kadar hemoglobin.

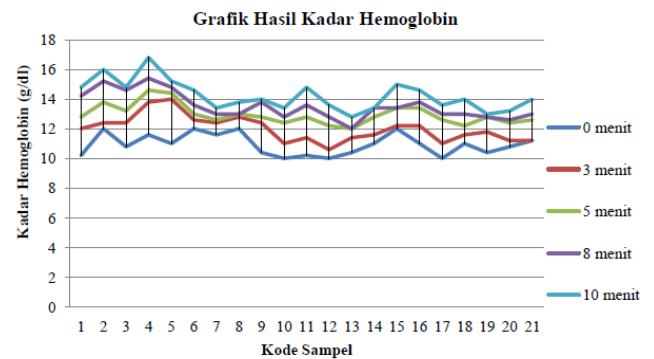
Dalam penelitian ini sampel yang diperoleh sebanyak 21 orang diambil dengan teknik *purposive sampling* dengan kriteria: perempuan, tidak memiliki riwayat anemia, tidak sedang menstruasi, tidak mengkonsumsi obat yang dapat mempengaruhi hasil kadar hemoglobin, dan bersedia menjadi responden.

Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel darah vena pada responden berdasarkan prosedur baku dari Departemen Kesehatan RI (2008) dengan alat dan bahan antara lain spuit 3 cc, tabung vakum ungu (K_3EDTA), *tourniquet*, kapas alkohol 70%, dan plester. Pemeriksaan kadar hemoglobin dilakukan dengan menggunakan metode Sahli dengan variasi waktu 0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit, dan 10 menit. Data selanjutnya dianalisis secara statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbedaan hasil pemeriksaan kadar hemoglobin dengan waktu inkubasi 0 menit, 3 menit,

5 menit, 8 menit dan 10 menit dengan metode Sahli dapat dilihat pada grafik berikut:



Gambar 1. Grafik Kadar Hemoglobin Berdasarkan Variasi Waktu Inkubasi (0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit, dan 10 menit)

Pada grafik tampak hasil kadar hemoglobin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Dimana didapatkan hasil kadar hemoglobin tertinggi yaitu pada waktu inkubasi 10 menit dan hasil kadar hemoglobin terendah pada 0 menit. Sedangkan hasil rerata kadar hemoglobin dapat dilihat pada tabel berikut.

TABEL 1. Rerata Kadar Hemoglobin Berdasarkan Variasi Waktu Inkubasi

No.	Perlakuan	Kadar Hemoglobin (g/dl)		
		Terendah	Tertinggi	Rerata±SD
1.	0 menit	10,0	12,0	10,9±0,7
2.	3 menit	11,0	14,0	12,0±0,8
3.	5 menit	12,0	14,6	12,9±0,6
4.	8 menit	12,0	15,4	13,5±0,9
5.	10 menit	12,8	16,8	14,2±0,8

Berdasarkan tabel 1 didapatkan hasil kadar hemoglobin terendah pada 0 menit yaitu 10,0 g/dl, dan hasil kadar hemoglobin tertinggi pada waktu inkubasi 10 menit yaitu 16,8 g/dl. Sedangkan berdasarkan rerata kadar hemoglobin dari 21 sampel pada waktu inkubasi 0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit dan 10 menit berturut-turut adalah 10,9 g/dl, 12,0 g/dl, 12,9 g/dl, 13,5 g/dl, dan 14,2 g/dl. Dilihat dari hasil rerata kadar hemoglobin tampak semakin lama waktu inkubasi maka semakin tinggi kadar hemoglobin yang diperoleh.

Pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap kadar hemoglobin dengan metode Sahli dapat dilihat pada tabel berikut.

Sumber Varian	Jumlah Kuadrat	Df	Rerata	F hitung	F tabel	Sig.
Antar Group	140.004	4	35.001	49.474	3.20	0.00
Dalam Group	70.747	100	0.707			
Total	210.750	104				

Hasil uji statistik menggunakan *One Way ANNOVA* diperoleh $F_{hitung} (49,47) > F_{tabel} (3,20)$ dan nilai sig. 0,00 ($<0,05$). Hasil ini menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan antara waktu inkubasi 0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit dan 10 menit terhadap kadar hemoglobin dengan metode Sahli. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Husin (2013) yang menyatakan bahwa ada perbedaan yang signifikan terhadap hasil kadar hemoglobin dengan waktu inkubasi yang berbeda.

Selain itu Barduagni, *et al.* (2003) yang melakukan penelitian untuk menentukan status anemia pada 149 anak sekolah di wilayah Qena, negara Mesir menggunakan metode Sahli untuk mengukur kadar hemoglobin. Inkubasi yang digunakan oleh Barduagni, *et al.* (2003) yaitu selama 3 menit setelah darah ditambahkan dengan HCl.

Diketahui bahwa pada waktu inkubasi 5 menit kadar hemoglobin mencapai titik optimum dimana eritrosit pecah atau terurai dan terikat sempurna. Setelah darah ditambahkan dengan larutan HCl 0,1 N dan diinkubasi selama 3-5 menit eritrosit akan terikat dan membentuk senyawa hematin yang sempurna kemudian diencerkan dengan aquadest sehingga warna sama dengan warna standart (Gandasoebrata, 2016).

Hasil pemeriksaan kadar hemoglobin yang diperiksa secara langsung tanpa adanya inkubasi menunjukkan kadar hemoglobin rendah yang disebabkan asam hematin belum terbentuk sempurna. Sedangkan waktu inkubasi yang terlalu lama dapat menyebabkan kadar hemoglobin semakin tinggi dikarenakan semakin banyaknya eritrosit yang pecah atau lisis (Fitri, 2012).

Barduagni, *et al.* (2003) melakukan penelitian untuk menentukan status anemia pada 149 anak sekolah di wilayah Qena, negara Mesir. Status anemia ditentukan dengan membandingkan kadar hemoglobin menggunakan metode Sahli, skala warna Tallquist, dan fotometer hemoglobin portabel "HemoCue". Didapatkan hasil 17,4% anak-anak

anemia dengan "HemoCue", 66,4% anak-anak anemia dengan metode Sahli, dan 57,7% anak-anak anemia dengan skala warna Tallquist. Baik Sahli maupun skala warna Tallquist merupakan metode yang sensitif namun memiliki spesifisitas (39,0%) yang sangat rendah, sehingga memberikan hasil positif palsu yang besar.

Metode Sahli memiliki banyak kelemahan diantaranya bersifat subjektif karena sangat tergantung pada cara membandingkan warna secara visual, membutuhkan pipet yang akurat, standard warna yang sudah tidak baik (luntur/buram), sensitivitas dan akurasi yang buruk, dan bukan merupakan standard internasional (Srivastava, *et al.*, 2014).

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan antara variasi waktu inkubasi (0 menit, 3 menit, 5 menit, 8 menit dan 10 menit) terhadap kadar hemoglobin dengan menggunakan metode Sahli. Tampak peningkatan kadar hemoglobin terjadi seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Dimana nilai terendah dari rerata kadar hemoglobin pada pengukuran 0 menit yaitu 10,9 g/dl dan nilai tertinggi pada pengukuran dengan waktu inkubasi 10 menit yaitu 14,2 g/dl. Penting diperhatikan oleh petugas laboratorium untuk melakukan inkubasi pada darah sesuai dengan prosedur yang ditetapkan oleh metode Sahli tersebut, sebab kesalahan pada tahap analitik memberikan kontribusi sebesar 25% penyebab kesalahan dalam hasil pemeriksaan laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

Bain, B. J., Bates, I., & Laffan, M. A. (2017). *Dacie and Lewis Practical Haematology (Twelfth Edition)* (Twelfth Ed; M. Emeritus S. MITCHELL LEWIS, BSc & F. FRCPath, DCP, eds.). Elsevier B.V.

Barduagni, P., Ahmed, A. S., Curtale, F., Raafat, M., & Soliman, L. (2003). Performance of Sahli and colour scale methods in diagnosing anaemia among school children

in low prevalence areas. *Tropical Medicine and International Health*, 8(7), 615–618. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.01062.x>.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Pedoman Praktik Laboratorium yang Benar*. Jakarta : Depkes RI.

Fitri, A. 2012 . Pengaruh Warna Standar Terhadap Hasil Pemeriksaan Hemoglobin Metode Sahli. *Karya Tulis Ilmiah*. Program Studi Analisis Kesehatan. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Palangkaraya: Palangka Raya.

Gandasoebrata R. 2016. *Penuntun Pemeriksaan Klinik*. PT. Dian Rakyat: Jakarta.

Higgins, C. (2005). Hemoglobin and its measurement. *Acutecaretesting.Org*, (July), 1–10. Retrieved from <https://acutecaretesting.org/~/.media/acutecaretesting/files/pdf/hemoglobin-and-its-measurement.pdf>.

Husin, H.Y. 2013. Pengaruh Waktu Inkubasi Pemeriksaan Hemoglobin Metode Sahli. *Karya Tulis Ilmiah*. Program Studi Analisis Kesehatan. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Palangkaraya: Palangka Raya.

Mengko, R. 2013. *Instrumentasi Laboratorium Klinik*. Penerbit ITB: Bandung.

Srivastava, T., Negandhi, H., Neogi, S. B., Sharma, J., & Saxena, R. (2014). Methods for Hemoglobin Estimation: A Review of “What Works .” *Journal of Hematology and Transfusion*, 2(3), 2005–2006.