

VALIDASI METODE GOD-PAP PADA PEMERIKSAAN GLUKOSA DARAH DENGAN PEMAKAIAN SETENGAH VOLUME REAGEN DAN SAMPEL

Nurhayati, Ika¹; Riyani, Ani¹; Kurnaeni, Nani¹; Wiryanti, Wiwin¹; Rinaldi, Sonny Feisal¹

¹Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Kemenkes Bandung,
Email:ikanurhayati.iik@gmail.com, Tlp: +6285315602061

ABSTRAK

Pemakaian setengah volume reagen dan sampel pada pemeriksaan glukosa darah metode GOD-PAP diketahui tidak memiliki perbedaan terhadap nilai simpangan baku dan koefisien korelasi dibandingkan dengan metode standarnya. Metode GOD-PAP setengah volume reagen dan sampel ini lebih efisien dalam segi ekonomi namun belum tervalidasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kinerja metode GOD-PAP setengah volume reagen dan sampel terhadap pemeriksaan glukosa darah. Jenis penelitian ini adalah deskriptif analitik dengan melakukan pengumpulan dan analisis data dari hasil pengujian terhadap delapan parameter validasi yaitu presisi, akurasi, linearitas, *reportable range*, LoD, LoQ, *recovery*, dan interferen. Sampel yang digunakan berupa serum kontrol komersial normal (Level 1) dan patologis (Level 2). Data yang diperoleh diolah dengan uji statistik deskriptif menggunakan Microsoft Excel. Hasil penelitian menunjukkan nilai presisi berupa CV Level 1= 1,66%, Level 2= 1,37% ($CV < 0,33 TEa$); akurasi berupa TE Level 1= 3,84%, Level 2= 3,76% ($TE < TEa$); linearitas dengan nilai $r=0,997$ ($r>0,990$); *reportable range* dengan rentang nilai \geq rentang nilai normal parameter; LoD = 7,51 mg/dL; LoQ = 20,54 mg/dL (lebih kecil dari batas nilai normal terendah); %Recovery = 99% (berada dalam rentang 95-105%); dan uji interferen menunjukkan hemoglobin mulai mengganggu pemeriksaan dengan %selisih $>TEa$ pada konsentrasi 600 mg/dL. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa semua parameter uji validasi memenuhi kriteria penerimaan sehingga metode GOD-PAP dengan pemakaian setengah volume reagen dan sampel diterima kinerjanya sebagai prosedur tervalidasi pada pemeriksaan glukosa darah.

Kata Kunci : Validasi metode, glukosa, metode GOD-PAP, setengah volume

PENDAHULUAN

Metode glukosa oksidase (GOD) merupakan metode yang umum digunakan di laboratorium dalam pengujian untuk mengukur kadar glukosa darah.¹ Glukosa oksidase sangat spesifik untuk β -D-glukosa, dalam reaksinya akan diproduksi H_2O_2 , dan pada reaksi kedua digunakan enzim peroksidase sebagai katalisis agar H_2O_2 mengoksidasi senyawa kromogen kemudian menghasilkan warna dan menyebabkan pergeseran absorbansi yang dapat diukur secara spektrofotometri dan hasilnya setara dengan jumlah glukosa dalam spesimen.^{1,2}

Suatu penelitian oleh Kurniawan Santoso pada tahun 2015 memodifikasi metode GOD-PAP dengan hanya menggunakan setengah volume reagen dan sampel pada pengujinya. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemakaian setengah volume reagen (500 μL) dan setengah volume sampel (5 μL) pada pemeriksaan glukosa darah metode GOD-PAP tidak berpengaruh pada nilai simpangan baku dan koefisien variasi. Jika metode modifikasi tersebut dapat diterapkan di laboratorium untuk pemeriksaan glukosa darah, maka pemakaian reagen dapat lebih efisien dan lebih menghemat biaya pengeluaran reagen.³

Berdasarkan Standar Nasional ISO 15189 dan ISO 17025 setiap laboratorium harus menggunakan metode standar yang telah divalidasi, dan setiap metode baku yang dimodifikasi perlu divalidasi agar dapat diterapkan di laboratorium.^{3,4} Metode analisis diperlukan sebagai konfirmasi bahwa suatu metode telah memenuhi persyaratan untuk tujuan penggunaannya berdasarkan tindakan penilaian dan percobaan terhadap parameter tertentu.^{4,5,6}

Metode GOD-PAP setengah volume reagen dan sampel ini merupakan metode baku yang dimodifikasi dan belum divalidasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk

mengetahui kinerja metode GOD-PAP setengah volume reagen dan sampel pada pemeriksaan glukosa darah. Validasi terhadap metode yang dimodifikasi tersebut untuk mengetahui apakah pemakaian metode setengah volume reagen dan sampel pada pemeriksaan glukosa darah metode GOD-PAP dapat diterima dan dapat digunakan di laboratorium sebagai prosedur tervalidasi.

METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian deskriptif analitik yaitu suatu penelitian yang bertujuan memberikan gambaran tentang realitas pada objek yang diteliti secara objektif. Gambaran keberterimaan kinerja metode tersebut diperoleh dengan melakukan pengumpulan dan analisis data dari hasil pengujian terhadap 8 parameter validasi metode. Unit penelitian adalah reagen GOD-PAP komersial pemakaian setengah volume reagen dan setengah volume sampel, bahan pemeriksaan berupa serum kontrol komersial normal dan patologis. Jenis data merupakan data primer, yang diperoleh dari hasil pengukuran setiap parameter validasi metode pada pemeriksaan glukosa metode GOD-PAP dengan pemakaian setengah volume reagen dan setengah volume sampel.

Pengujian presisi dilakukan dengan cara melakukan uji impresi terhadap 2 level konsentrasi serum kontrol sebanyak 20 kali pengulangan. Uji akurasi dilakukan terhadap 2 level konsentrasi serum kontrol hingga diperoleh *Total Error* pada masing-masing *Medical Decision Levels* glukosa yang kemudian dibandingkan dengan TEa glukosa. *Trueness* diperoleh dengan melakukan uji *recovery*. Uji sensitivitas dilakukan dengan melakukan uji linearitas, *reportable range*, limit deteksi, dan limit kuantitasi. Uji spesifikasi dilakukan dengan melakukan uji interferensi menggunakan zat pengganggu hemolisat. Pengujian dilakukan

menggunakan fotometer Microlab 300. Data yang diperoleh dari pengukuran I diolah menggunakan uji statistik deskriptif dan regresi linier dengan Microsoft Excel. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung dengan Surat Keterangan Layak Etik No.52/KEPK/PE/V/2019.

HASIL

Uji Presisi

Kriteria penerimaan uji presisi untuk *long term imprecision* adalah nilai CV% lebih kecil dari 3,3. Nilai 3,3 diperoleh dari perhitungan $0,33 \times TE_a$ dimana nilai TE_a untuk glukosa berdasarkan CLIA adalah sebesar

Uji Akurasi (TE)

Uji akurasi menunjukkan besarnya bias yang menunjukkan kesalahan sistematis yaitu sebesar 0,11% untuk level 1 dan 0,94% untuk level 2. Nilai TE diperoleh dari kesalahan sistematis (d%) ditambah

10%, sehingga $0,33 \times TE_a$ adalah 3,3. Berdasarkan tabel 1, nilai CV% untuk serum kontrol normal adalah 1,66 dan untuk serum kontrol patologis adalah 1,37. Sehingga uji presisi untuk kedua level tersebut dapat diterima.

Tabel 1. Data Hasil Uji Presisi

	Serum Kontrol Normal	Serum Kontrol Patologis
Rerata	108.05 mg/dL	200.71 mg/dL
Standar Deviasi (SD)	1.79 mg/dL	2.76 mgdL
Coeffisien of Varian (CV%)	1.66%	1.37%
Total Error Allowable (TE _a)	10%	10%
0.33 TE _a	3.3%	3.3%

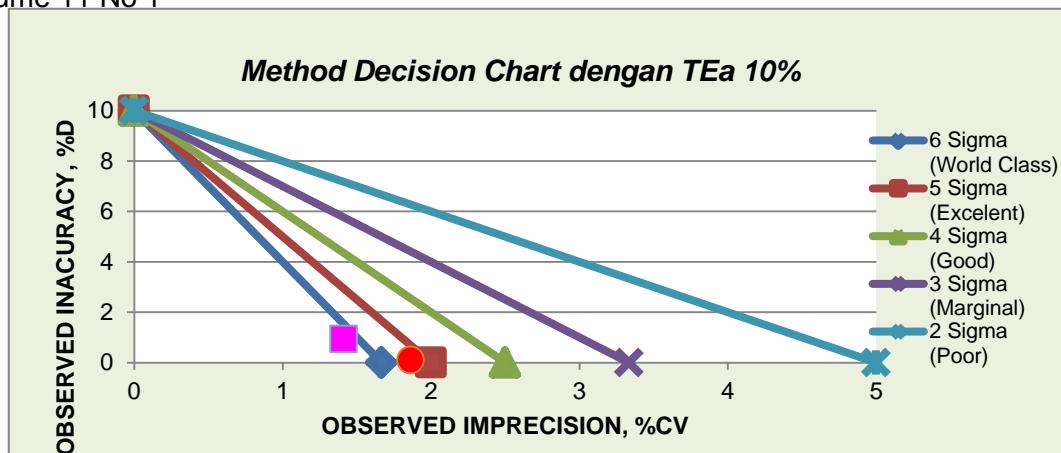
dengan 2 kali CV (kesalahan acak) dan diperoleh hasil TE% pada level 1 yaitu sebesar 3,84% dan pada level 2 yaitu sebesar 3,76%. Akurasi diterima jika nilai $TE\% < TE_a$, nilai TE_a glukosa adalah 10% sehingga dapat disimpulkan bahwa akurasi diterima.

Tabel 2. Data Hasil Uji Akurasi

	Serum Kontrol Normal	Serum Kontrol Patologis
Rerata	107.88 mg/dL	200.10 mg/dL
Standar Deviasi (SD)	2.01 mg/dL	2.83 mg/dL
Coefficien of Varian (CV%)	1.86 %	1.41 %
Bias (d%)	0.11 %	0.94 %
True Value (TV)	108 mg/dL	202 mg/dL
Total Error Allowable (TE _a)	10 %	10 %
TE%	3.84 %	3.76 %

Kemudian dari data hasil pengujian akurasi tersebut dibuat *Method Decision Chart* yang digunakan untuk menggabungkan

kesalahan sistematis dengan kesalahan acak dalam menilai kinerja suatu metode.



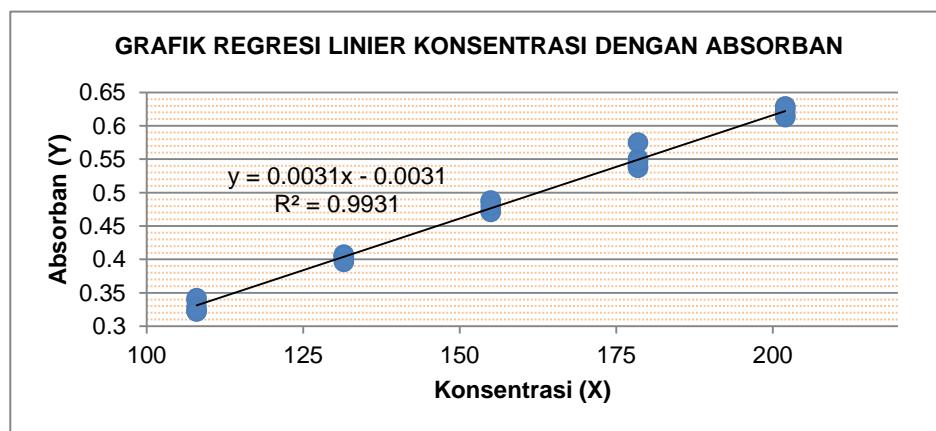
Gambar 1. Method Decision Chart

Gambar di atas menunjukkan gabungan antara kesalahan sistematis dan kesalahan acak pada konsentrasi MDL normal yaitu 108 mg/dL berada di daerah *Excelent* dan pada MDL patologis yaitu 202 mg/dL berada di daerah *World Clas*. Nilai TE pada MDL 50 mg/dL, 100 mg/dL, 160 mg/dL, dan 300 mg/dL yang dihitung dengan menggunakan persamaan regresi adalah 5,8% pada MDL 50 mg/dL, 4,8% pada MDL 100 mg/dL, 3,6% pada MDL 160 mg/dL, dan 3,3% pada MDL 300 mg/dL.

Uji Linearitas

Hasil perhitungan uji linearitas diplotkan pada diagram *Scatter Plot* untuk mendapatkan persamaan garis regresi yang menunjukkan hubungan antara absorban dengan konsentrasi. Berdasarkan uji tersebut diperoleh persamaan garis regresi $y = 0,0031x + (-0,0031)$ Dengan koefisien korelasi (r)

adalah 0,997 atau $r^2 = 0,993$. Hal ini menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara nilai absorban dengan nilai konsentrasi. Perbedaan nilai absorban pada setiap konsentrasi juga diuji dengan menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil perhitungan menunjukkan nilai probabilitas (P) untuk uji anova sebesar 0,000 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 adalah apabila nilai koefisien korelasi (r) lebih dari 0,975 dan nilai probabilitas untuk uji anova kurang dari 0,05. Dari uji regresi linier dan statistik yang telah dilakukan diperoleh nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,997 dan nilai probabilitas untuk uji anova sebesar 0,000 sehingga linearitas diterima.

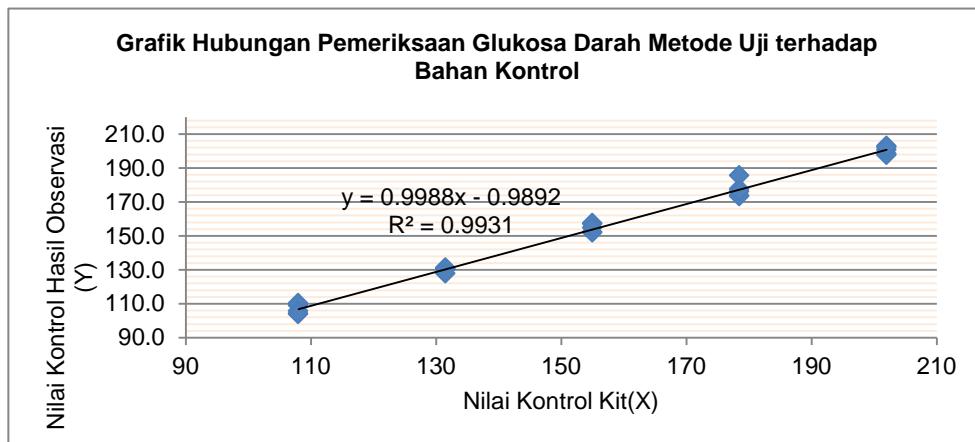


Gambar 3. Scatter Plot Konsentrasi dengan Absorban

Uji Reportable Range

Uji *reportable range* dilakukan dengan cara perhitungan sederhana

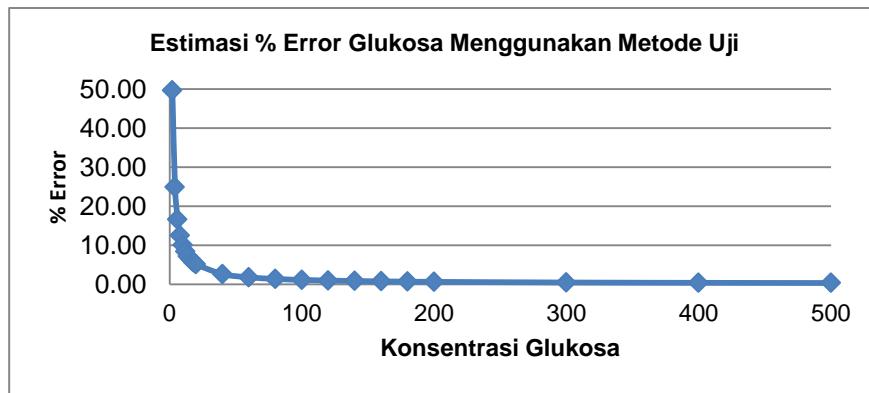
observasi sehingga diperoleh garis regresi linier sebagai berikut:



Gambar 4. Scatter Plot Reportable Range

untuk menentukan nilai konsentrasi tertinggi yang memberikan nilai TE lebih besar dari nilai TEa. Penentuan nilai konsentrasi tertinggi dilakukan dengan cara menghitung rentang nilai observasi dari setiap konsentrasi. Terdapat lima konsentrasi glukosa yaitu 108, 131.5, 155, 178.5, dan 202 mg/dL. Dari masing-masing konsentrasi tersebut diukur konsentrasi glukosanya dan diperoleh 25 data konsentrasi glukosa. Berdasarkan data *reportable range*, setiap konsentrasi memiliki rentang nilai observasi yang memenuhi rentang nilai idealnya sehingga metode tersebut dapat diterima. Dari data pengukuran juga dibuat *scatter plot* antara konsentrasi nilai kontrol kit dengan konsentrasi nilai kontrol hasil

Berdasarkan grafik di atas, diperoleh persamaan garis regresi $y = 0.9988 x - 0.9892$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,997 atau $r^2 = 0,993$. Koefisien korelasi $> 0,99$ menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara kedua nilai konsentrasi sehingga persamaan garis regresi tersebut dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi tertinggi bahan kontrol yang memberikan nilai $TE > TEa$. Kemudian dibuat grafik yang menunjukkan perkiraan peningkatan *Total Error* atau *%Error* pemeriksaan glukosa menggunakan reagen GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel terhadap konsentrasi glukosa seperti berikut:



Gambar 5. Grafik Estimasi % Error Pemeriksaan Glukosa Metode Uji

Berdasarkan grafik pada gambar 5 terlihat bahwa pada konsentrasi tertinggi yang diobservasi yaitu 202 mg/dL, % Error yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan TEa. Peningkatan %Error terjadi pada penurunan konsentrasi glukosa. %Error melebihi TEa pada konsentrasi glukosa 10 mg/dL. Kriteria penerimaan untuk uji *reportable range* adalah apabila rentang nilai konsentrasi tertinggi melebihi atau sama dengan rentang nilai normal parameter glukosa yaitu 70-105 mg/dL.⁽³⁹⁾ Data pada lampiran 6 menunjukkan konsentrasi tertinggi yang diobservasi sebesar 202 mg/dL memiliki rentang nilai yang masuk dalam rentang nilai ideal dan memiliki %Error yang lebih kecil dibandingkan dengan TEa sehingga dapat disimpulkan bahwa pengujian *reportable range* dapat diterima.

Uji Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

Nilai LoD diukur dengan menghitung nilai rerata dan standar deviasi dari pengukuran absorban blanko reagen uji kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi dari hasil uji linearitas untuk memperoleh konsentrasi LoD. Hasil uji menunjukkan nilai rerata absorban blanko sebesar 0,019 dan nilai standar deviasi sebesar 0,001. Absorban LoD diperoleh dari rerata absorban blanko ditambah dengan 3 kali standar deviasi (SD) absorban blanko tersebut, absorban LoD yang diperoleh dari hasil perhitungan yaitu sebesar 0.0202, kemudian dengan menggunakan persamaan regresi $Y = -0,00307 + 0,0031X$ diperoleh konsentrasi LoD yaitu sebesar 7,51 mg/dL. Uji Limit Kuantitasi (LoQ) dilakukan dengan menggunakan perhitungan dari data pengujian LoD seperti yang terdapat pada lampiran 7. Nilai absorban LoQ diperoleh dari $3 \times$ absorban LoD sehingga didapatkan nilai absorban LoQ sebesar 0,0605, dengan menggunakan persamaan regresi yang sama, diperoleh nilai LoQ sebesar 20,54 mg/dL. Kriteria penerimaan

pengujian LoD dan LoQ adalah jika nilai LoD dan LoQ tidak lebih dari nilai normal terendah yaitu 70 mg/dL. Berdasarkan olah data LoD dan LoQ tersebut, dapat disimpulkan bahwa pengujian LoD dan LoQ diterima karena tidak melebihi batas nilai normal terendah.

Uji Recovery

Uji recovery dilakukan dengan mengukur konsentrasi glukosa pada serum kontrol normal dan patologis yang ditambahkan analit berupa standar glukosa. Pengukuran dilakukan terhadap *baseline* dan *spike* sampel pada masing-masing level serum kontrol. Perhitungan *recovery* dilakukan dengan cara membagi selisih rerata *baseline sample* dan *spike sample* dengan kadar standar glukosa yang ditambahkan yaitu sebanyak 10% dari konsentrasi larutan standar, kemudian dihitung reratanya sehingga pada hasil pengukuran diperoleh % *recovery* atau perolehan kembali sebesar 99% dengan nilai *proportional error* sebesar 1%. Kriteria penerimaan uji *recovery* adalah apabila nilai rerata *recovery* berada dalam range 95-105% dan *proportional error* < TRa, sehingga dapat disimpulkan bahwa uji *recovery* metode GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel untuk pemeriksaan glukosa dapat diterima.

Uji Interferen

Uji interferen dilakukan dengan mengukur konsentrasi glukosa yang telah ditambahkan interferen berupa hemolisat, dari uji interferen terhadap 6 variasi konsentrasi hemolisat ini diperoleh 48 data *baseline sample* dan 48 data *spike sample*. Perhitungan pada uji interferen dilakukan dengan menggunakan *Excel* seperti pada lampiran 8 dengan menghitung selisih antara rerata *spike* dengan *baseline sample*. Nilai uji interferen diperoleh dari nilai rerata selisih antara rerata dari masing-masing variasi konsentrasi yang kemudian dibandingkan dengan

TEa menurut CLIA yaitu 10%, dimana %selisih pada penambahan hemolisat sebesar 100-500 mg/dL dapat diterima karena kurang dari TEa (10%), sedangkan pada penambahan hemolisat sebesar 600 mg/dL dan 800 mg/dL rerata selisih lebih besar dari batas kesalahan yang diperbolehkan, sehingga dapat disimpulkan bahwa hemolisat tidak mengganggu pemeriksaan glukosa dengan metode uji ini hingga kadar 500 mg/dL, sedangkan pada kadar di atas 500 mg/dL hemolisat mengganggu dengan menyebabkan terjadinya kenaikan konsentrasi dari yang seharusnya.

PEMBAHASAN

Pengujian terhadap parameter-parameter analisis yang dipertimbangkan dalam validasi metode ini telah dilakukan selama 10 hari dan diperoleh bukti objektif yang menunjukkan bahwa metode GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel ini telah memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam pemeriksaan glukosa darah.^{1, 4, 5, 6}

Pengujian presisi terhadap pemeriksaan glukosa metode GOD-PAP setengah volume reagen dan sampel ini dilakukan dengan cara Total Impresisi. CLSI menggunakan terminologi Total Impresisi untuk *long term imprecision* karena percobaan ini dilakukan dalam 5 hari sehingga dapat memberikan estimasi yang lebih realistik dari keseluruhan kesalahan yang mungkin terjadi karena adanya ketidakstabilan instrument, persiapan reagen, perubahan suhu lingkungan, teknisi, dan lain-lain.^{2, 7, 8, 9}

Pengujian presisi yang dilakukan lebih dari satu hari biasanya akan memiliki variasi yang lebih besar dibandingkan dengan cara *within run*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pemeriksaan glukosa darah metode GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel yang diperiksa menggunakan fotometer Microlab 300 memiliki SD sebesar 1,79 mg/dL untuk level 1, dan 2,76 mg/dL untuk level 2,

atau CV sebesar 1,66% untuk level 1 dan 1,37% untuk level 2. TEa untuk pemeriksaan glukosa adalah 10%, uji impresi diterima jika nilai CV% < 0,33 TEa. Sehingga hasil uji impresi pada metode uji tersebut dapat diterima. Hasil penelitian Kurniawan Santoso (2015) yang membandingkan metode standar (satu resep) terhadap metode ini (setengah resep) dengan menggunakan sampel berupa serum dari 34 responden memperoleh hasil CV% sebesar 6,9895%, bila dibandingkan dengan hasil tersebut maka hasil CV% yang diperoleh dari pengujian impresi ini lebih baik.

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap uji impresi yaitu periode waktu percobaan, matriks sampel pengujian, jumlah dan konsentrasi material sampel yang diuji, dan jumlah sampel yang diuji. Berbeda dengan hasil penelitian Kurniawan Santoso yang menggunakan sampel yang bervariasi, pada uji impresi ini digunakan sampel yang sama yang diperiksa berulang dan diperoleh nilai CV% yang kurang dari 0,33 TEa, sehingga impresi diterima dan dapat dilanjutkan ke pengujian parameter validasi lainnya. Jika dengan cari ini kinerja metoda tidak baik (tidak memenuhi syarat) maka metoda ini tidak dapat digunakan, atau penyebab kesalahan acak yang terjadi harus diidentifikasi dan dieliminasi sebelum melakukan rangkaian uji lainnya.^{3, 8}

Uji akurasi hanya dilakukan jika metode dilaksanakan dengan optimal dan dengan presisi yang baik. Uji impresi diterima maka dapat dilanjutkan pada pengukuran parameter validasi selanjutnya yaitu uji akurasi. Akurasi dalam pengujian ini dinyatakan sebagai persentase yang mewakili perbedaan dengan *True Value*. Uji akurasi ini tidak dilakukan dengan uji perbandingan metode namun dilakukan dengan uji terhadap bahan kontrol. Berbeda dengan konsep lama yang menyatakan bahwa akurasi hanya berhubungan dengan kesalahan sistematis, inakurasi dalam konteks

validasi metode digunakan untuk menilai adanya kesalahan acak dan kesalahan sistematis atau keduanya dalam suatu pengukuran. Pada pengujian akurasi ini, *True Value* yang digunakan adalah *True Value* pabrik sebagai acuan. Perbedaan nilai hasil uji dengan *True Value* dinyatakan sebagai bias. Kesalahan sistematis menciptakan bias karakteristik dalam hasil tes dan dapat dipertanggungjawabkan dengan menerapkan koreksi. Studi akurasi dapat dilakukan dengan perbandingan metode, uji perolehan kembali (*Recovery*), atau uji terhadap bahan acuan atau standar. Studi akurasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan uji terhadap bahan acuan atau standar dengan cara meganalisis sampel yang telah diketahui nilainya yaitu serum kontrol normal dan patologis.^{10, 11, 12}

Salah satu faktor yang harus diperhatikan dalam melakukan uji akurasi yaitu stabilitas spesimen, oleh karena itu pada pengujian akurasi dilakukan dalam waktu dua jam. Pada pengukuran inakurasi dilakukan kombinasi dengan menggunakan *Method Decision Chart* untuk menilai kesalahan sistematis dan kesalahan acak serta dibuat penilaian *Total Error* (TE) observasi metode GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel. Kesalahan acak dapat disebabkan karena ketidakstabilan, seperti teknik penanganan, suhu, instrument, operator, reagen, atau variasi lingkungan. Kesalahan acak sulit dihilangkan namun pengulangan dapat mengurangi pengaruh yang ditimbulkan. Kesalahan acak dapat diminimalisir dengan cara pelatihan, pengawasan dan kepatuhan terhadap standar operasional prosedur.^{2, 8, 13}

Method Decision Chart dirancang untuk menggabungkan nilai bias, impresi, dan *total error allowable*. Estimasi kesalahan sistematis dan kesalahan acak kemudian dikombinasikan membentuk *operating point* yang lokasinya

digunakan untuk menilai keberterimaan suatu metode.^{14, 15}

Berdasarkan gambar 1 terlihat bahwa *operating point* untuk konsentrasi MDL 108 mg/dL berada di daerah *Excelent* dan konsentrasi MDL 202 mg/dL berada di daerah *World Class* yang artinya metode tersebut memenuhi kebutuhan untuk kualitas dan dapat dikelola dengan baik dalam operasional rutin dengan 2 pengukuran kontrol dan menggunakan aturan QC 1-3s. *Total Error* yang diperoleh dari data uji akurasi adalah sebesar 3,84% dengan bias 0,11% pada level 1, dan 3,76% dengan bias 0,94 pada level 2. Nilai TE yang diperoleh lebih kecil dari nilai TEa glukosa yaitu 10%, maka dapat disimpulkan bahwa kinerja metode ini dapat diterima.¹⁶

Uji impresi dan akurasi diterima, kemudian dilanjutkan dengan uji linearitas yang menunjukkan kemampuan metode analisis untuk memberikan respon analit hasil uji yang berbanding lurus atau proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel.^{3, 11, 17} Pengukuran linearitas dimaksudkan untuk menilai dan memeriksa validitas interval linearitas atau interval kerja suatu pengukuran laboratorium dalam kondisi tertentu. Interval ini menggambarkan perkiraan letak presisi dan bias yang dibandingkan dengan TEa. Jika uji linearitas tidak memenuhi kriteria penerimaan, maka jarak presisi dan akurasi dengan klaim pabrikan besar sehingga total error yang dihasilkan melebihi nilai TEa yang menyebabkan metode atau prosedur tersebut tidak dapat diterima penggunaannya dalam pemeriksaan rutin.^{8, 18}

Dalam percobaan ini digunakan serangkaian sampel dengan konsentrasi yang diketahui, yaitu 108 mg/dL, 131.5 mg/dL, 155 mg/dL, 178.5 mg/dL, dan 202 mg/dL kemudian diukur absorbannya. Data yang diperoleh diplotkan ke dalam scatter plot kemudian ditentukan persamaan garis regresinya. Didapatkan absorban sebagai y-axis dan konsentrasi bahan

kontrol sebagai x-axis. Uji ini bekerja dengan asumsi bahwa korelasi antara respon alat atau metode dan konsentrasi diharapkan akan linier dan dapat digambarkan secara matematis oleh koefisien korelasi pada regresi linier.^{8, 11, 19, 20, 21}

Nilai koefisien korelasi yang didapat digunakan untuk menilai kekuatan hubungan antara absorban dan konsentrasi dan untuk menyatakan bahwa suatu metode linier. Suatu metode dinyatakan linier pada saat terdapat hubungan proporsional secara langsung antara respon metode (absorban) dan konsentrasi. Hasil penelitian ini memperoleh persamaan garis regresi $y = 0.0031x - 0.0031$ dengan koefisien korelasi (r) 0,997 dan hasil uji One Way dengan nilai probabilitas 0,000 yang artinya metode tersebut linier dan memenuhi kriteria penerimaan untuk uji linearitas.^{8, 22}

Berdasarkan uji linearitas yang telah dilakukan, dapat pula dihitung *reportable range* atau limit dari linearitas, yaitu rentang konsentrasi (batas terendah dan batas tertinggi) analit dalam spesimen dari suatu pengujian yang dapat diukur dengan akurasi, presisi, dan linearitas yang dapat diterima, *reportable range* tidak boleh dikelirukan dengan rentang referensi.^{6, 11, 23} Pengujian *reportable range* ini dilakukan untuk melihat keakuratan instrumen kerja dan metode yang digunakan untuk pemeriksaan. Melalui uji *reportable range* ini diperoleh rentang nilai suatu metode yang dapat dilaporkan dimana kinerja metode dapat dipercaya.^{8, 11, 12}

Batas terendah dibatasi oleh Limit Kuantitasi seadangan batas tertinggi didefinisikan sebagai konsentrasi dimana anomali signifikan dalam sensitivitas analisis diobservasi yaitu konsentrasi tertinggi yang memberikan nilai *Total Error* (TE) melebihi nilai TEa glukosa yaitu 10%. Berdasarkan data pada hasil pengujian *reportable range* diperoleh rentang nilai observasi yang masuk dalam rentang

nilai ideal pada semua pengukuran konsentrasi sehingga kinerja metode tersebut diterima karena memenuhi kriteria penerimaan uji *reportable range*. Selanjutnya untuk menentukan nilai hasil pengukuran dimana laboratorium dapat memverifikasi keakuratan instrumen atau respon sistem metode pengukuran dilakukan pengujian pada konsentrasi serum kontrol tertinggi yang memberikan TE lebih besar dari TEa. Konsentrasi serum kontrol tertinggi yang diobservasi adalah 202 mg/dL. Pada konsentrasi ini, nilai TE yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan nilai TEa, kemudian dibuat persamaan garis regresi untuk menentukan konsentrasi tertinggi dari serum kontrol yang memberikan nilai $TE > TEa$. Pada gambar 5 terlihat bahwa penurunan konsentrasi dari 10 mg/dL memberikan nilai $TE > TEa$, sedangkan peningkatan konsentrasi hingga 1000 mg/dL masih memberikan nilai $TE < TEa$, hal ini dapat disebabkan karena penurunan nilai konsentrasi tidak diimbangi dengan peningkatan respon instrumen dan metode sehingga TE cenderung stabil pada %Error yang sama yang kemudian berhubungan dengan sensitivitas analisis. Sensitivitas analisis adalah perubahan respon instrumen yang sesuai dengan perubahan dalam kuantitas yang diukur yaitu konsentrasi serum kontrol. Produsen membuat klaim untuk rentang yang dapat dilaporkan dari metode mereka dengan menyatakan batas atas dan bawah kisaran.^{22, 23, 24}

Setelah dilakukan uji linearitas, dapat dihitung nilai limit deteksi (LoD), yaitu jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko, dan limit kuantitasi (LoQ) yang merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dengan nilai presisi dan akurasi yang diterima.^{6, 25} Nilai limit kuantitasi (LoQ) merupakan tiga kali lipat dari nilai limit deteksi (LoD). Pada penelitian ini didapatkan nilai

konsentrasi LoD sebesar 7,51 mg/dL dan LoQ sebesar 20,54 mg/dL. Konsentrasi nilai normal terendah pada pemeriksaan glukosa darah adalah 70 mg/dL, maka nilai LoD dan LoQ yang diperoleh tidak lebih besar dari konsentrasi nilai normal terendah glukosa sehingga LoD dan LoQ diterima.^{6, 8, 11, 12}

Limit deteksi diberikan oleh sejumlah konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang dapat dideteksi meskipun tidak dihitung sebagai nilai yang pasti dan dinyatakan dengan probabilitas sebagai nilai kualitatif. Nilai ini menunjukkan bahwa hasil konsentrasi analit terendah yang dapat bereaksi dengan reagen berbeda dengan nilai nol dan analit dalam bahan pemeriksaan lebih besar daripada blanko.²⁶

Uji Recovery kemudian dilakukan untuk memperkirakan kesalahan sistematis proporsional yang terjadi pada saat penambahan konsentrasi analit uji pada sampel. Kesalahan ini sering terjadi akibat matriks dan analit yang dicari dalam sampel bersaing untuk bereaksi dengan reagen uji. Tujuan dari uji recovery adalah untuk menentukan berapa banyak analit uji yang dapat dideteksi. Kesalahan ini diamati ketika perbedaan kesalahan meningkat seiring dengan konsentrasi analit yang juga meningkat.^{8, 27}

Pada pengujian recovery ini penting untuk menjaga volume standar relatif kecil terhadap volume spesimen asli untuk meminimalkan pengenceran matriks spesimen asli. Jika tidak, kesalahan dapat berubah ketika matriks diencerkan. Pengenceran spesimen asli yang direkomendasikan tidak lebih dari 10%. Recovery harus dinyatakan sebagai persentase karena tujuan eksperimental adalah untuk memperkirakan kesalahan sistematis proporsional, yang merupakan jenis persentase kesalahan. Recovery yang ideal adalah 100,0%. Perbedaan antara 100 dan pemulihan yang diamati (dalam persen) adalah kesalahan

sistematis yang proporsional. Misalnya, pemulihan 95% sesuai dengan kesalahan proporsional sebesar 5%. Kesalahan yang diamati dibandingkan dengan jumlah kesalahan yang diijinkan untuk tes. Untuk glukosa, total kesalahan yang diijinkan adalah 10%. Dari pengujian recovery diperoleh % recovery sebesar 99% dengan *proportional error* sebesar 1%. Nilai tersebut masuk dalam rentang yang diperbolehkan artinya dengan menggunakan metode GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel dapat mengukur analit sebesar 99% sehingga uji recovery diterima^{8, 12, 16, 27}

Uji LoD dan LoQ dilakukan untuk menilai sensitivitas alat, sedangkan untuk menilai spesifikasi metode dilakukan uji interferen. Interferen adalah zat yang dapat bereaksi secara tidak spesifik dengan reagen pendeksi atau sinyal itu sendiri sehingga dapat meningkatkan atau menurunkan konsentrasi atau intensitas analit. Uji interferensi adalah eksperimen validasi metode yang memperkirakan kesalahan sistematis yang dihasilkan oleh bahan lain (interferen) dan kurangnya spesifikasi.¹¹

Pada uji interferensi ini digunakan zat pengganggu berupa hemolisat. Hemolisat dipilih untuk menilai gangguan yang ditimbulkan akibat hemolisis. Perbedaan rata-rata dari pengukuran replikasi dan perbedaan rata-rata untuk sekelompok sampel interferensi memberikan perkiraan kesalahan sistematis yang konstan. Kesalahan yang terjadi dianggap kesalahan sistematis yang konstan karena penambahan konsentrasi tertentu umumnya akan menyebabkan sejumlah kesalahan yang konstan, terlepas dari konsentrasi analit yang diukur dalam spesimen.^{8, 12, 27}

Jumlah interferer yang ditambahkan harus mencapai tingkat yang jelas, lebih disukai jika mendekati konsentrasi maksimum yang

diharapkan dalam populasi pasien, pemilihan konsentrasi pengganggu pada uji ini berdasarkan beberapa kit reagen GOD-PAP yang menyatakan terganggu oleh hemoglobin dengan konsentrasi 200 mg/dL atau 500 mg/dL. Sehingga dilakukan uji interferen dengan konsentrasi 100 mg/dL dan 200 mg/dL untuk melihat respon awal, kemudian hasil pengukuran menunjukkan tidak adanya pengaruh yang signifikan dari penambahan 100 mg/dL atau pun 200 mg/dL hemolisat. Kemudian dilakukan kembali pengujian dengan penambahan konsentrasi hemolisat hingga 800 mg/dL.

Kriteria penerimaan uji dilakukan dengan cara menghitung kesalahan sistematis atau nilai rerata selisih *baseline* dan *spike sample* yang dibandingkan dengan batas kesalahan. Batas kesalahan ditentukan dengan cara mengkalikan batas atas normal pemeriksaan glukosa dengan TEa glukosa. TEa glukosa menurut *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) adalah 6 mg/dL atau 10%. Jika gangguan yang diamati menunjukkan nilai yang lebih besar daripada kesalahan yang diijinkan, maka kinerja metode ini tidak dapat diterima.^{8, 16, 27}

Dari hasil pengujian tersebut didapat nilai rerata selisih yang merupakan nilai bias akibat penambahan bahan pengganggu ke dalam sampel. Rerata selisih yang melebihi batas kesalahan terdapat pada penambahan hemoglobin dengan konsentrasi 600 mg/dL, dimana %selisihnya adalah 10.16% sedangkan TEa untuk pemeriksaan glukosa menurut CLIA adalah 10 % sehingga hasil uji interferen pada konsentrasi tersebut tidak diterima. Pada konsentrasi hemoglobin 800 mg/dL terjadi kenaikan rerata selisih hingga 21 mg/dL, hal ini menunjukkan adanya hemoglobin lebih dari 600 mg/dL pada pengujian glukosa darah dengan metode GOD-PAP pemakain setengah volume reagen dan sampel menyebabkan kenaikan kadar glukosa

darah. Jika suatu efek diamati pada tingkat maksimum, maka sebaiknya dilakukan pengujian juga pada konsentrasi yang lebih rendah dan menentukan tingkat di mana gangguan pertama membatalkan kegunaan hasil analitis. Jumlah hemoglobin yang masih dapat diterima sebelum terjadinya gangguan pertama (600 mg/dL) adalah hingga 500 mg/dL dimana %selisihnya adalah 5,43% yang menunjukkan kesalahan lebih kecil daripada TEa.^{19, 27}

Dalam kit insert AGAPPE yang digunakan dalam penelitian ini tidak terdapat interferensi dalam pemeriksaan, namun pada beberapa kit insert lain seperti SPECTRUM diketahui bahwa tidak ada interferensi yang signifikan dari hemolisis terhadap pemeriksaan glukosa darah metode GOD-PAP hingga kadar 500 mg/dL, sedangkan pada kit insert FS dan DIALAB tidak ada interferensi oleh hemolisis hingga kadar 200 mg/dL, dan pada kit insert BIOLABO dikatakan tidak ada interferensi dari hemolisis. Berdasarkan beberapa penelitian menyebutkan bahwa konsentrasi hemoglobin hingga 6,6 g/L pada dasarnya tidak menyebabkan gangguan pada pemeriksaan glukosa darah. Hemoglobin menyerap cahaya dengan kuat pada 415 nm, oleh karena itu hemolysis meningkatkan penyerapan dalam rentang panjang gelombang tersebut dan menyebabkan peningkatan yang jelas dalam konsentrasi analit pada kisaran tersebut, sedangkan pemeriksaan glukosa metode GOD-PAP ini dilakukan pada panjang gelombang 505 (490-550 nm). Berdasarkan penelitian Lippi G, dkk (2006) gangguan hemolisis tampaknya secara linear tergantung pada konsentrasi akhir lisat sel darah dalam spesimen, glukosa secara substansial menurun. Peningkatan kadar hemoglobin dapat menyebabkan penurunan nilai glukosa sebagai hasil dari zat-zat ini dioksidasi oleh peroksidase, yang kemudian mencegah oksidasi dan deteksi

kromogen. Pada hasil pengujian interferen dengan menggunakan hemolisat, diperoleh hasil bahwa terdapat bias negatif pada kadar hemoglobin hingga 400 mg/dL namun tidak melebihi TEa, sedangkan pada kadar hemoglobin 500 – 800 mg/dL diperoleh interferensi positif dan melebihi nilai TEa pada kadar 600 mg/dL. Tidak diketahui secara pasti alasan kenaikan kadar akibat penambahan hemolisis >500 mg/dL pada metode ini. Sebaiknya perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui penyebab adanya kenaikan kadar tersebut apakah karena kinerja metode yang berbeda atau karena adanya faktor kesalahan lain.^{28, 29}

Seluruh parameter validasi metode yang telah dilakukan menunjukkan bahwa metode GOD-PAP dengan pemakaian setengah volume reagen dan sampel ini dapat digunakan untuk pemeriksaan glukosa darah menggunakan fotometer *Microlab 300* dengan hasil yang dapat dipercaya karena telah memenuhi seluruh kriteria penerimaan uji validasi metode tersebut. Volume pengukuran yang kecil diketahui dapat memberikan kesalahan yang lebih besar, namun berdasarkan penelitian ini diperoleh data yang menunjukkan bahwa metode GOD-PAP dengan pemakaian volume reagen dan sampel yang setengah kali lebih kecil dari metode standarnya memenuhi kriteria keberterimaan dalam seluruh parameter uji validasi yang artinya pemakaian setengah volume reagen dan sampel pada metode tersebut memberikan hasil yang dapat dipercaya untuk pemeriksaan glukosa darah. Walaupun dengan volume yang lebih kecil apabila dikerjakan sesuai standar prosedur, dengan orang yang kompeten, alat yang terkalibrasi, dan kontrol kualitas yang baik maka hasil pemeriksaan dapat diandalkan.

Metode GOD-PAP pemakaian setengah volume reagen dan sampel sudah tervalidasi berdasarkan hasil penelitian ini sehingga dapat digunakan di laboratorium. Bila menggunakan

metode yang dikembangkan di tempat lain dalam laboratorium, metode yang diterbitkan, ada dua isu yang perlu dipertimbangkan yang pertama apakah validasi data yang ada cukup untuk tujuan yang diperlukan atau diperlukan validasi ulang. Jumlah informasi dan keandalan sumber data validasi juga perlu diperhatikan. Kemudian yang kedua adalah jika validasi data yang ada memadai, apakah laboratorium memungkinkan untuk memverifikasi kinerja metode tersebut, dan peralatan serta fasilitas yang tersedia memadai. Jika metode telah divalidasi oleh pengujian dibawah semua kondisi ekstrim operasi, maka analis baru yang kompeten dapat beroperasi secara memuaskan dalam data kinerja yang ada. Jika perlu untuk mengadaptasi atau mengubah metode tervalidasi dari seseorang, validasi ulang yang tepat akan diperlukan. Perubahan yang dilakukan mungkin membuat data validasi asli tidak relevan. Metode GOD-PAP setengah volume reagen dan sampel ini telah teruji untuk pemeriksaan glukosa darah dengan menggunakan fotometer *Microlab 300*, metode ini dapat digunakan untuk laboratorium yang menggunakan fotometer *Microlab 300* atau fotometer yang memiliki spesifikasi serupa dengan *Microlab 300* serta memiliki kemampuan aspirasi sampel kurang dari 500 μL . Kondisi pengujian yang berbeda seperti laboratorium, analis, instrumen, bahan perekusi, suhu, dan hari mungkin dapat berpengaruh pada kinerja metode, sehingga jika metode ini digunakan untuk instrumen dengan spesifikasi yang berbeda dengan *Microlab 300* perlu diketahui ada atau tidaknya pengaruh perbedaan tersebut. Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode dengan perubahan-perubahan kondisi tersebut dapat dilakukan dengan uji ketangguhan atau kekuatan (*Ruggedness* atau *Robustness*) sehingga dapat mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi dengan perubahan kondisi tersebut. Uji ini melibatkan perubahan yang

disengaja untuk metode dan menyelidiki efek berikutnya pada kinerja, mengidentifikasi variabel dalam metode yang memiliki efek paling signifikan dan memastikan bahwa metode tersebut dikontrol ketat. Sehingga dapat dilakukan perbaikan pada bagian-bagian metode yang dianggap kritis. Uji ketangguhan atau kekuatan ini harus ditetapkan untuk metode yang diadaptasi dari literatur ilmiah.^{6,30}

SIMPULAN

Validasi metode *Glucose Oksidase Para Amino Phenazone* (GOD-PAP) pada pemeriksaan glukosa darah dengan pemakaian setengah volume reagen dan sampel mencakup delapan parameter validasi yaitu presisi, akurasi, linearitas, *reportable range*, limit deteksi, limit kuantitasi, *recovery*, dan interferen. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan fotometer *Microlab 300* dapat disimpulkan bahwa semua parameter uji validasi metode tersebut memenuhi kriteria penerimaan sehingga metode GOD-PAP dengan pemakaian setengah volume reagen dan sampel dapat diterima kinerjanya sebagai prosedur tervalidasi pada pemeriksaan glukosa darah.

Disarankan untuk dilakukan pengujian interferen dengan menggunakan bahan pengganggu lain seperti bilirubin dan lipid untuk menilai gangguan yang ditimbulkan akibat ikterik dan lipemik. Kemudian bagi laboratorium yang akan menggunakan metode GOD-PAP pada pemeriksaan glukosa darah dengan pemakaian setengah volume reagen dan sampel namun menggunakan alat dengan spesifikasi di bawah atau di atas spesifikasi fotometer *Microlab 300* sebaiknya dilakukan verifikasi metode kembali, dan sebaiknya dilakukan uji ketangguhan atau kekuatan metode (*Ruggedness* atau *Robustness*) dengan menganalisis sampel yang homogen dalam laboratorium, kondisi operasi, instrumen dan lingkungan yang

berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama untuk mengetahui ketangguhan metode.

DAFTAR RUJUKAN

1. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., Sawyer, B.G. 2008. TIETZ Fundamentals Of Clinical Chemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier.
2. Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff L.E. 2010. Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlations. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer.
3. Santoso, K. 2015. Pengaruh Pemakaian Setengah Volume Sampel dan Reagen pada Pemeriksaan Glukosa Darah Metode God-Pap terhadap Nilai Simpangan Baku dan Koefisien Variasi. Jurnal Wiyata Penelitian Sains & Kesehatan. 2(2): 118-119.
4. Badan Standarisasi Nasional. 2012. SNI ISO 15189: Laboratorium medik - Persyaratan mutu dan kompetensi. Jakarta: BSN.
5. Badan Standarisasi Nasional. 2017. SNI ISO 17025. Persyaratan Umum untuk Kompetensi Pengujian dan Kalibrasi Laboratorium. Jakarta: BSN.
6. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Pharmaceutical Sciences & Research (PSR). 1(3): 117-135.
7. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 43 Tahun 2013 tentang Cara Penyelenggaraan Laboratorium Klinik yang Baik. Jakarta: Kemenkes.
8. Wesgard, J.O. 2008. Basic Method Validation. 3rd Edition. Madison: Wesgard QC.
9. Chesher, D. 2008. Evaluating Assay Precision. NCBI clin biochem Rev. 29(1): 4-6.
10. Wesgard, J.O. 2009. CLSI EP15-A3: Verification of Precision and

- Estimation of Bias. Dari: <https://www.westgard.com/clsi-ep15a3.htm>. Dikutip tanggal 8 September 2018.
11. Wesgard, J.O. 2009. Glossary of QC Terms. Dari: <https://www.westgard.com/glossary.htm>. Dikutip tanggal 8 September 2018.
12. Friedecký, B., Sprongl, L., Kratochvíla, J. 2004. Validation and Verification of Analytical Methods in Clinical Laboratories: Recommendation of the Board of the Czech Society for Clinical Biochemistry. Dalam: <http://www.csrb.cz/res/file/dokumenty/validation-and-verification-of-analytical-methods.pdf>. Dikutip tanggal 4 November 2018.
13. Lumsden, J.H. 2000. Laboratory Test Method Validation. *Revue Med. Vet* 7(151), 623-630
14. Piasio, Roger., David, Perry. 1980. Method and Apparatus for Performing in Nitro Clinical Diagnostic Testing Using a Solid Phase Assay System Having Special Utility for Use with Automatic Pipetting Equipment. United States Patent. 4,197,287
15. Klick, R.L. 1997. Decision Making in the Clinical Laboratory a Quantitative and Statistical Approach for Methods Evaluation. New York: MedTechNet.
16. Wesgard, J.O. 2009. Quality Requirements: CLIA Requirements for Analytical Quality. Dalam: <https://www.westgard.com/clia.htm>. Dikutip tanggal 8 September 2018.
17. Wesgard, J.O. 2009. Basic Method Validation: Determining Inaccuracy. Dalam: <https://www.westgard.com/methodbias.htm>. Dikutip tanggal 8 September 2018.
18. Wesgard J.O. 2009. Selecting a Method to Validate. Dalam: <https://www.westgard.com/lesson20.htm>. Dikutip tanggal 8 September 2018.
19. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2011. Guideline on Bioanalytical Method Validation. London: European Medicines Agency.
20. Kazusaki, M., Ueda, S., Takeuchi, N., Ohgami, Y. 2012. Validation of Analytical Procedures by High Performance Liquid Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *CHROMATOGRAPHY*. 33(2): 69-70.
21. McPolin, O. 2009. Validation of Analytical Method for Pharmaceutical Analysis. Warrenpoint: Mourne Training Service.
22. Quam, E.F. 2009. The Linearity or Reportable Range Experiment. Dalam: <https://www.westgard.com/lesson26.htm>. Dikutip tanggal 19 Oktober 2018.
23. ClinLab Navigator. 2018. Reportable Range: <http://www.clinlabnavigator.com/reportable-range.html>. Dikutip tanggal 19 Oktober 2018.
24. Association of Public Health Laboratories. 2013. CLIA-Compliant Analytical Method Validation Plan and Template For LRN-C Laboratories. Georgia Avenue: APHL.
25. NATA. 2012. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Australia: Copyright National Association of Testing Authorities.
26. Wesgard, J.O. 2009. The Detection Limit Experiment. Dalam: <https://www.westgard.com/lesson29.htm>. Dikutip tanggal 19 Oktober 2018.
27. Wesgard, J.O. 2009. Interference and Recovery Experiments. Dalam: <https://www.westgard.com/lesson27.htm>. Dikutip tanggal 19 Oktober 2018.

JURNAL RISET KESEHATAN
POLTEKKES DEPKES BANDUNG
Volume 11 No 1

28. Thomas, L. 2002. Haemolysis as Influence & Interference Factor. EJIFCC. 13(4): 95-98
29. Lippi, G., Salvagno, GL., Montagnana, M. dkk. 2006. Influence of Hemolysis on Routine Clinical Chemistry Testing. PubMed NCBI. 44(3):311-6.
30. Magnusson, B., Örnemark, U (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from <http://www.eurachem.org>