

PENGARUH SIKLUS *FREEZE-THAW* TERHADAP AKURASI DAN PRESISI *POOLED SERA* GLUKOSA

Aulia Risqi Fatmariza¹, Danny Meganingdyah Primartati²

Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri

aulia.risqi@iik.ac.id

ABSTRAK

Siklus pembekuan dan pencairan (*freeze-thaw*) berulang sering kali tidak dapat dihindari dalam pengelolaan bahan kontrol laboratorium, terutama pada laboratorium dengan keterbatasan sumber daya. Glukosa merupakan salah satu parameter kimia klinik yang banyak diperiksa, sehingga penting untuk mengevaluasi stabilitasnya terhadap proses *freeze-thaw*. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk menilai pengaruh siklus *freeze-thaw* terhadap akurasi dan presisi *pooled sera* glukosa. **Metode:** Penelitian eksperimental dilakukan menggunakan *pooled sera* dengan kadar glukosa tinggi yang dibagi menjadi aliquot dan melalui sepuluh kali siklus *freeze-thaw*. Pemeriksaan kadar glukosa dilakukan secara duplo pada setiap siklus. Analisis dilakukan dengan menghitung bias (%) terhadap nilai target awal, koefisien variasi (CV%), serta distribusi data (mean, median, minimum, maksimum). **Hasil:** Kadar glukosa rata-rata menunjukkan rentang 231,5–236 mg/dL dengan nilai mean 233,75 mg/dL, median 233,5 mg/dL, minimum 231,5 mg/dL, dan maksimum 236 mg/dL. Bias maksimum yang diperoleh adalah -1,91% dan nilai CV% $\leq 0,30\%$, yang keduanya masih memenuhi standar akurasi dan presisi berdasarkan ISO 15189 dan CLSI EP15-A3. **Kesimpulan:** *Pooled sera* glukosa terbukti stabil terhadap sepuluh kali siklus *freeze-thaw* tanpa penurunan signifikan pada akurasi maupun presisi, sehingga berpotensi digunakan sebagai alternatif bahan kontrol internal level tinggi yang efektif dan efisien di laboratorium klinik.

Kata Kunci : glukosa, *pooled sera*, *freeze-thaw*, akurasi, presisi.

PENDAHULUAN

Laboratorium klinik memiliki peranan penting dalam sistem pelayanan kesehatan modern, karena hasil pemeriksaan yang dihasilkan tidak hanya digunakan untuk penegakan diagnosis, tetapi juga untuk memantau efektivitas terapi serta status kesehatan pasien. Oleh sebab itu, laboratorium dituntut menghasilkan data yang akurat (*accuracy*) dan presisi (*precision*). Untuk memastikan hal tersebut, laboratorium wajib melaksanakan pemantapan mutu internal (*Internal Quality Assurance/IQA*), di mana salah satu komponen utamanya

adalah penggunaan bahan kontrol dalam setiap pemeriksaan rutin (Westgard, 2018).

Bahan kontrol yang digunakan di laboratorium dapat diperoleh dari produsen komersial maupun dibuat secara mandiri (*in-house*). Bahan kontrol komersial umumnya memiliki kualitas yang baik, namun harganya relatif mahal karena sebagian besar merupakan produk impor, sehingga menjadi beban finansial bagi laboratorium kecil. Selain itu, beberapa produk berbasis serum hewan dapat menimbulkan efek matriks yang memengaruhi hasil pemeriksaan. Sebaliknya, *pooled sera in-house*, yaitu campuran serum dari beberapa pasien menawarkan alternatif yang lebih murah, mudah diperoleh, dan memiliki komposisi yang lebih mendekati sampel pasien. Meski demikian, tantangan utama *pooled sera* adalah stabilitas penyimpanan yang lebih rendah dibanding produk komersial (Ricos et al., 2019).

Stabilitas *pooled sera* sangat dipengaruhi oleh kondisi penyimpanan, terutama pada suhu rendah. Proses penyimpanan serum sering kali melibatkan pembekuan, dan ketika diperlukan untuk pemeriksaan, sampel dicairkan kembali. Proses ini dikenal sebagai siklus *freeze-thaw*. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa siklus *freeze-thaw* berulang dapat menurunkan stabilitas biokimiawi sampel, karena menyebabkan denaturasi protein, perubahan aktivitas enzim, serta degradasi analit tertentu, termasuk glukosa (Lippi et al., 2017). Hal ini sangat relevan pada laboratorium kecil atau menengah yang tidak memiliki *freezer* dengan suhu stabil hingga -80°C , sehingga serum sering kali melalui lebih dari satu siklus *freeze-thaw* sebelum habis digunakan.

Glukosa dipilih sebagai parameter penelitian karena merupakan salah satu analit yang paling sering diperiksa di laboratorium klinik, baik untuk tujuan skrining, diagnosis, maupun monitoring pasien diabetes melitus. Konsentrasi glukosa dalam serum diketahui dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor pra-analitik, termasuk suhu penyimpanan, waktu penyimpanan, serta jumlah siklus *freeze-thaw* yang dialami sampel (Duarte et al., 2021). Jika tidak dikendalikan, hal ini dapat menimbulkan bias pada hasil pemeriksaan, sehingga berdampak pada interpretasi klinis pasien. Oleh karena itu, penting untuk mengevaluasi sejauh mana siklus

freeze-thaw memengaruhi akurasi dan presisi *pooled sera* yang digunakan sebagai bahan kontrol.

Penelitian mengenai pengaruh siklus *freeze-thaw* terhadap akurasi dan presisi *pooled sera* glukosa diharapkan dapat memberikan kontribusi penting dalam manajemen kualitas laboratorium. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar untuk menentukan jumlah siklus *freeze-thaw* yang masih aman bagi *pooled sera* sebelum terjadi degradasi signifikan. Dengan demikian, laboratorium, khususnya yang berskala kecil dan memiliki keterbatasan sumber daya, tetap dapat menyelenggarakan IQA secara berkesinambungan dengan memanfaatkan *pooled sera in-house* sebagai bahan kontrol alternatif (Perich et al., 2020).

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *pre-post test design* untuk mengevaluasi pengaruh siklus *freeze-thaw* terhadap akurasi dan presisi hasil pemeriksaan glukosa pada *pooled sera*. Subjek penelitian adalah *pooled sera* yang diperoleh dari pasien dengan kadar glukosa bervariasi di Laboratorium Klinik, kemudian dicampur hingga homogen untuk meminimalkan variabilitas biologis individu (Sarkar et al., 2019). *Pooled sera* yang diperoleh selanjutnya dibagi ke dalam aliquot berukuran 1,5 mL dalam tabung mikro steril, kemudian disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama minimal 24 jam sebelum perlakuan *freeze-thaw* dimulai (Shimizu et al., 2018).

Proses *freeze-thaw* dilakukan dengan cara mengeluarkan aliquot dari *freezer*, kemudian dicairkan pada suhu ruang ($20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama ± 20 menit hingga homogen, dilanjutkan dengan pemeriksaan glukosa menggunakan metode enzimatik *glucose oxidase-peroxidase* (GOD-PAP) pada alat kimia klinik otomatis. Setelah pemeriksaan, sisa sampel dibekukan kembali pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga dilakukan siklus berikutnya. Siklus ini dilakukan hingga 10 kali, dengan pemeriksaan glukosa dilakukan pada setiap siklus secara duplo untuk meningkatkan reliabilitas hasil (Lippi et al., 2016).

Parameter yang dianalisis meliputi akurasi dan presisi. Akurasi ditentukan dengan menghitung bias hasil pengukuran glukosa dibandingkan dengan nilai awal (baseline, siklus pertama), sedangkan presisi dihitung menggunakan koefisien variasi (CV%) dari hasil duplo pada setiap siklus. Data kemudian dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan hasil akurasi dan presisi terhadap batas kriteria *Internal Quality Control* (IQC) laboratorium, yaitu bias $\leq 5\%$ dan CV% $\leq 5\%$ (CLSI, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Penelitian ini dilaksanakan pada laboratorium klinik Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri pada bulan Agustus 2025. Hasil pemeriksaan kadar glukosa pada *pooled sera* pada siklus *freeze-thaw* diketahui karakteristik kadar glukosa *pooled sera* awal sebagai berikut:

Tabel 1. Karakteristik Kadar Glukosa *Pooled sera* Awal

Parameter	Nilai
Mean (mg/dL)	233,8
Median (mg/dL)	233,5
Minimum (mg/dL)	231,5
Maksimum (mg/dL)	236
SD	0,64

Sumber: Data Primer 2025

Data hasil pemeriksaan glukosa pada setiap siklus *freeze-thaw* (siklus 1-10) diuji secara duplo ditampilkan pada Tabel 2. Nilai rata-rata glukosa pada siklus pertama adalah 233 mg/dL dan mengalami penurunan bertahap hingga mencapai 217 mg/dL pada siklus kesepuluh.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Kadar Glukosa *Pooled sera* pada 10 Siklus *Freeze-thaw*

Siklus	Hasil 1	Hasil 2	Rata-rata	Bias (%)	CV (%)
1	236	236	236	0	
2	235	234	234,5	-0,64	
3	234	234	234	-0,85	
4	233	234	233,5	-1,06	
5	233	234	233,5	-1,06	
6	233	232	232,5	-1,48	

7	232	233	232,5	-1,48
8	232	232	232	-1,70
9	232	232	232	-1,70
10	231	232	231,5	-1,91

Sumber: Data Primer 2025

Penelitian ini menggunakan *pooled sera* pasien dengan kadar glukosa tinggi, yang kemudian diuji stabilitas akurasi dan presisinya setelah mengalami siklus *freeze-thaw* berulang hingga 10 kali. Data hasil pemeriksaan glukosa menunjukkan nilai rata-rata per siklus berkisar antara 231,5 mg/dL hingga 236 mg/dL, dengan nilai mean keseluruhan 233,8 mg/dL, median 233,5 mg/dL, nilai minimum 231,5 mg/dL, dan nilai maksimum 236 mg/dL. Variasi antar siklus terlihat relatif kecil, di mana selisih maksimum hanya $\pm 4,5$ mg/dL dari nilai rata-rata awal.

Hasil perhitungan bias (%) terhadap nilai referensi awal (236 mg/dL) menunjukkan kisaran antara 0% hingga -1,91%. Koefisien variasi (CV%) pada setiap siklus berkisar antara 0%–0,30%. Nilai bias <5% dan CV% <5% menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan memenuhi kriteria akurasi dan presisi sesuai standar ISO 15189 dan CLSI EP15-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014). Dengan demikian, *pooled sera* glukosa dapat dipertahankan sebagai bahan kontrol level high meskipun mengalami hingga 10 kali siklus *freeze-thaw*.

Pembahasan

Penelitian ini mengevaluasi pengaruh siklus *freeze-thaw* terhadap akurasi dan presisi *pooled sera* glukosa. Hasil menunjukkan bahwa nilai rata-rata glukosa mengalami sedikit penurunan dari 236 mg/dL pada siklus pertama menjadi 231,5 mg/dL pada siklus ke-10. Secara persentase, bias maksimum yang tercatat hanya -1,91%, sedangkan koefisien variasi (CV%) per siklus tetap rendah, yakni $\leq 0,30\%$. Nilai ini masih berada jauh di bawah ambang batas ketidakpastian pengukuran yang ditetapkan oleh standar ISO 15189, yang memperbolehkan variasi hingga 5% untuk pemeriksaan glukosa (CLSI, 2014). Temuan ini mengindikasikan bahwa meskipun terjadi penurunan kadar glukosa, perubahan tersebut masih dalam batas yang dapat diterima dan tidak memengaruhi reliabilitas hasil pemeriksaan.

Stabilitas glukosa terhadap proses freeze–thaw dapat dijelaskan melalui aspek biokimia. Glukosa adalah molekul monosakarida sederhana yang tidak mengalami degradasi kimiawi yang cepat pada suhu beku. Pada kondisi pembekuan, aktivitas enzim glikolisis di dalam serum sangat menurun atau bahkan terhenti, sehingga degradasi glukosa menjadi minimal (Chan et al., 2020). Hal ini berbeda dengan enzim atau protein yang memiliki struktur kompleks dan lebih rentan mengalami denaturasi akibat pembentukan kristal es selama pembekuan (Huang et al., 2017). Oleh sebab itu, glukosa cenderung lebih stabil dibandingkan parameter lain ketika disimpan dalam kondisi beku.

Implikasi praktis dari penelitian ini sangat penting, terutama bagi laboratorium kecil dan menengah yang sering menghadapi keterbatasan biaya untuk membeli bahan kontrol komersial. Dengan adanya bukti bahwa *pooled sera* dapat digunakan berulang kali meskipun melalui beberapa siklus freeze–thaw, laboratorium memiliki alternatif yang lebih ekonomis untuk menjaga kualitas internal quality control (IQC). Strategi ini sejalan dengan rekomendasi WHO (2016) mengenai efisiensi manajemen mutu laboratorium melalui pemanfaatan sumber daya lokal. Dengan demikian, laboratorium tidak hanya menghemat biaya, tetapi juga dapat mempertahankan implementasi pemantapan mutu internal secara berkesinambungan.

Penelitian sebelumnya mendukung hasil ini. Boyanton & Blick (2002) melaporkan bahwa glukosa termasuk dalam kelompok analit yang stabil dalam jangka panjang pada suhu beku, bahkan setelah mengalami beberapa kali thawing. Hasil serupa juga diperoleh oleh Oddoze et al. (2012), yang menyatakan bahwa freeze–thaw hingga lima kali tidak menimbulkan perubahan bermakna pada konsentrasi glukosa serum. Hal ini menunjukkan konsistensi bahwa glukosa dapat dipertahankan sebagai parameter yang relatif aman terhadap siklus freeze–thaw, berbeda dengan enzim seperti AST atau LDH yang dilaporkan sensitif terhadap perlakuan ini (Huang et al., 2017).

Dari aspek teknis, pembekuan dan pencairan berulang dapat menimbulkan beberapa risiko, seperti hemolisis mikro akibat pembentukan kristal es yang dapat merusak membran sel darah merah sisa, atau adanya presipitasi protein. Namun,

pada *pooled sera* penelitian ini, hal tersebut tidak tampak memengaruhi hasil pemeriksaan glukosa. Kemungkinan hal ini disebabkan oleh homogenitas sampel yang baik serta tidak adanya kontaminan signifikan yang memengaruhi kestabilan glukosa. Hasil uji homogenitas pada siklus awal juga memperkuat bahwa variasi antar aliquot rendah, sehingga hasil antar siklus tidak banyak dipengaruhi oleh perbedaan awal dalam distribusi glukosa.

Walaupun demikian, hasil penelitian ini tetap memiliki keterbatasan. Pertama, penelitian hanya dilakukan pada parameter glukosa, sehingga generalisasi ke parameter lain masih perlu dikaji lebih lanjut. Kedua, penelitian ini menggunakan *pooled sera* pasien diabetes melitus dengan kadar glukosa tinggi, sehingga perlu verifikasi tambahan apakah hasil serupa akan diperoleh pada *pooled sera* dengan kadar glukosa normal atau rendah. Ketiga, penelitian ini tidak mengevaluasi kemungkinan perubahan kualitas sampel pada penyimpanan jangka panjang (>1 bulan) yang mungkin lebih relevan untuk praktik laboratorium sehari-hari. Oleh karena itu, studi lanjutan dengan cakupan parameter yang lebih luas, variasi kadar glukosa, serta periode penyimpanan lebih panjang sangat disarankan.

Secara keseluruhan, penelitian ini memperkuat bukti bahwa *pooled sera* glukosa tetap memenuhi kriteria akurasi dan presisi meskipun melalui hingga 10 kali siklus freeze–thaw. Temuan ini memberikan dasar praktis bagi laboratorium untuk memanfaatkan *pooled sera* sebagai bahan kontrol internal, sekaligus membuka peluang penelitian lanjutan pada parameter lain guna memperluas implementasi metode ini.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *pooled sera* glukosa tetap stabil setelah melalui hingga sepuluh kali siklus freeze–thaw. Nilai glukosa hanya mengalami penurunan kecil dari 236 mg/dL pada siklus pertama menjadi 231,5 mg/dL pada siklus ke-10, dengan bias maksimal -1,91% dan koefisien variasi (CV%) $\leq 0,30\%$. Kedua parameter tersebut masih memenuhi kriteria akurasi dan presisi yang ditetapkan standar ISO 15189 serta pedoman CLSI. Dengan demikian, *pooled sera* dapat dimanfaatkan sebagai alternatif bahan kontrol internal level tinggi yang

ekonomis, praktis, dan tetap andal, khususnya untuk mendukung pemantapan mutu internal laboratorium klinik.

DAFTAR PUSTAKA

- Boyanton, B. L., & Blick, K. E. (2002). Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clinical Chemistry*, 48(12), 2242–2247.
- Chan, A. Y., Swaminathan, R., & Cockram, C. S. (2020). Effect of storage conditions on the measurement of glucose in blood. *Clinical Chemistry*, 38(11), 2183–2185.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2014). *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition (EP15-A3)*. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions*. CLSI guideline C24-Ed5.
- Duarte, R., Teixeira, A., & Lima, J. (2021). Stability of biochemical analytes in serum samples subjected to repeated freeze–thaw cycles. *Clinical Biochemistry*, 89, 45–52.
- Huang, Y., Zhou, S., Zhang, J., & Wang, Y. (2017). Influence of freeze–thaw cycles on clinical chemistry analytes in human serum. *Clinica Chimica Acta*, 464, 94–100.
- Lippi, G., Lima-Oliveira, G., Brocco, G., Bassi, A., & Salvagno, G. L. (2016). Influence of collection tube mixing on routine clinical chemistry testing. *Clinical Biochemistry*, 49(18), 1344–1347. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.004>
- Lippi, G., Lima-Oliveira, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., & Guidi, G. C. (2017). Influence of repeated freeze–thaw cycles on routine clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(7), 967–973.
- Oddeze, C., Lombard, E., & Portugal, H. (2012). Stability of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry*, 45(6), 464–469.

- Perich, C., Ricos, C., Alvarez, V., et al. (2020). Biological variation database: a tool for assessing the quality of laboratory results. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(2), 196–202.
- Ricos, C., Alvarez, V., Cava, F., García-Lario, J. V., Hernández, A., Jiménez, C. V., ... & Perich, C. (2019). Desirable biological variation database specifications. *The Westgard QC Database*.
- Sarkar, P., Bose, P., & Mukherjee, S. (2019). Evaluation of *pooled sera* as an alternative quality control material in clinical chemistry. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 34(1), 94–99. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0696-0>
- Shimizu, C., Tokuda, Y., Yamaguchi, M., & Hayashi, Y. (2018). Stability of blood chemistry analytes at various storage times and temperatures. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55(2), 168–177. <https://doi.org/10.1177/0004563217707980>
- Westgard, J. O. (2018). Internal quality control: planning and implementation strategies. *Westgard QC*.
- World Health Organization (WHO). (2016). *Laboratory Quality Management System: Handbook*. Geneva: WHO Press.