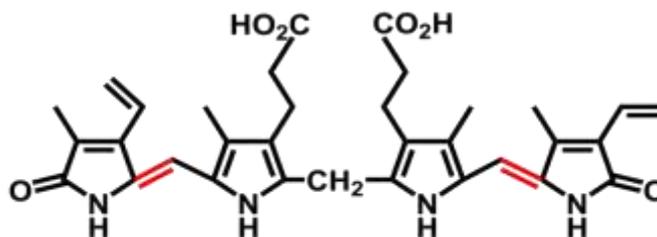


## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bilirubin

Bilirubin adalah produk utama dari penguraian sel darah merah yang tua. Bilirubin disaring dari darah oleh hati dan dikeluarkan pada cairan empedu. Sebagaimana hati semakin rusak, bilirubin total akan meningkat. Sebagian dari bilirubin total termetabolisme dan bagian ini disebut sebagai bilirubin langsung. Meningkatnya dibagian ini, penyebab biasanya di luar hati. Bilirubin langsung didapatkan hasil rendah sementara bilirubin total tinggi, hal ini menunjukkan kerusakan pada hati atau pada saluran cairan empedu dalam hati. Bilirubin mengandung bahan pewarna, yang memberi warna pada kotoran, bila tingkatnya sangat tinggi, kulit dan mata dapat menjadi kuning, yang mengakibatkan gejala ikterus. Bilirubin merupakan produk pemecahan sel darah merah. Pemecahan pertama dari sistem RES ( Reticuleondothehelial System) yang diawali dengan pelepasan besi dan rantai peptide globulin. Bilirubin berawal dari turunan cincin porfirin yang terbuka dan menjadi rantai lurus, dalam sistem RES, turunan tersebut dikenal sebagai biliverdin yang kemudian dikeluarkan ke sirkulasi, didalam plasma, bilirubin diikat oleh albumin yang dikenal sebagai bilirubin indirek (Kosasih, E. N, 2008).



Gambar 2.1 Struktur kimia bilirubin

Bilirubin indirek masuk kedalam sel setelah sampai di hepar, sedangkan yang lain tetap berada disirkulasi tubuh melewati jantung, bilirubin yang masuk ke sel hepar dalam keadaan bebas, berikatan dengan asam glukuronida dan disebut dengan bilirubin terkonjugasi atau yang lebih dikenal dengan bilirubin direk. Setelah itu, bilirubin direk sebagian besar masuk kedalam sirkulasi empedu dan sebagian lagi masuk kedalam sirkulasi darah. Oleh karena itu, dalam sirkulasi umum terdapat bilirubin indirek dan bilirubin direk, dalam keadaan normal, bilirubin indirek  $< 0,75$  mg % dan bilirubin direk  $< 0,25$  mg % dan total bilirubin tidak lebih dari 1 mg %. Bilirubin direk yang memasuki jalur empedu akan terkumpul dalam kantong empedu dan akhirnya akan masuk kedalam usus. Sampai dalam lumen usus, akibat flora usus, bilirubin direk teroksidasi menjadi urobilinogen (Sutedjo, 2009).

#### 2.1.1 Pembentukan bilirubin

Dalam keadaan fisiologis, masa hidup eritrosit manusia sekitar 120 hari, eritrosit mengalami lisis  $1-2 \times 10^8$  setiap jamnya pada orang dewasa dengan berat badan 70 kg, dimana diperhitungkan hemoglobin yang turut lisis sekitar 6 gr per hari. Sel-sel eritrosit tua dikeluarkan dari sirkulasi dan dihancurkan oleh limpa. Apoprotein dari hemoglobin dihidrolisis menjadi komponen asam-asam aminonya. Katabolisme heme dari semua hemeprotein terjadi dalam fraksi mikrosom sel retikuloendotel oleh sistem enzim yang kompleks yaitu heme oksigenase yang merupakan enzim dari sitokrom P450. Langkah awal pemecahan gugus heme adalah pemutusan jembatan  $\alpha$  metena membentuk biliverdin, suatu tetrapirrol linier. Besi mengalami beberapa kali reaksi reduksi dan oksidasi, reaksi-reaksi ini memerlukan oksigen dan NADPH. Pada akhir redaksi dibebaskan  $Fe^{3+}$

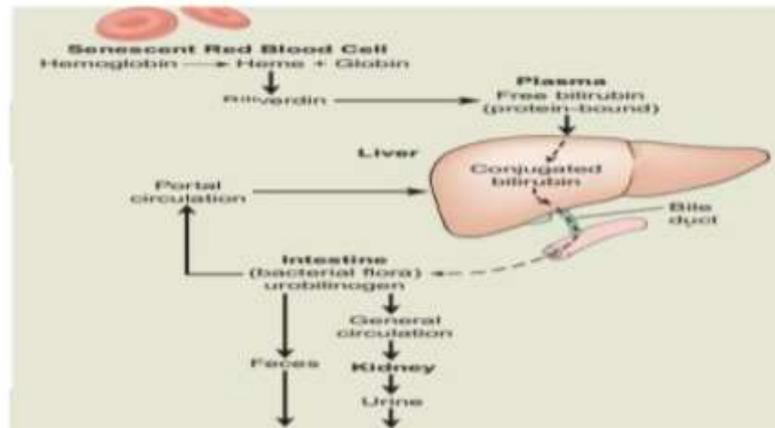
yang dapat digunakan kembali, karbon monoksida yang berasal dari atom karbon jembatan metena dan biliverdin reduktase yang menggunakan NADPH sehingga rantai metenil menjadi rantai metilen antara cincin pirol III – IV dan membentuk pigmen berwarna kuning yaitu bilirubin (Yayan, 2010).

Bilirubin bersifat lebih sukar larut dalam air dibandingkan dengan biliverdin. Dalam setiap 1 gr hemoglobin yang lisis akan membentuk 35 mg bilirubin dan tiap hari dibentuk sekitar 250-350 mg pada orang dewasa berasal dari pemecahan hemoglobin, proses erythropoetik yang tidak efektif dan pemecahan hemeprotein lainnya. Bilirubin dari jaringan retikuloendotel adalah bentuk yang sedikit larut dalam plasma dan air. Bilirubin ini akan diikat nonkovalen dan diangkut oleh albumin ke hepar. Dalam 100 ml plasma hanya lebih kurang 25 mg bilirubin yang dapat diikat kuat pada albumin. Bilirubin yang melebihi jumlah ini hanya terikat longgar hingga mudah lepas dan berdifusi ke jaringan. Bilirubin yang sampai dihati akan dilepas dari albumin dan diambil pada permukaan sinusoid hepatosit oleh suatu protein pembawa yaitu ligandin. Sistem transport difasilitasi ini mempunyai kapasitas yang sangat besar tetapi pengambilan bilirubin akan tergantung pada kelancaran proses yang akan dilewati bilirubin berikutnya. Bilirubin nonpolar akan menetap dalam sel jika tidak diubah menjadi bentuk larut. Hepatosit akan mengubah bilirubin menjadi bentuk larut yang dapat diekskresikan dengan mudah ke dalam kandung empedu. Proses perubahan tersebut melibatkan asam glukoronat yang dikonjugasikan dengan bilirubin, dikatalisis oleh enzim bilirubin glukoronosiltransferase. Hati mengandung sedikitnya dua isoform enzim glukoronosiltransferase yang terdapat terutama pada retikulum endoplasma. Reaksi konjugasi ini berlangsung dua tahap,

memerlukan UDP asam glukoronat sebagai donor glukoronat. Tahap pertama akan membentuk bilirubin monoglukoronida sebagai senyawa antara yang kemudian dikonversi menjadi bilirubin diglukoronida yang larut pada tahap kedua (Yayan, 2010).

### 2.1.2 Metabolisme bilirubin

Metabolisme bilirubin diawali dengan reaksi proses pemecahan heme oleh enzim hemoksigenase yang mengubah biliverdin menjadi bilirubin oleh enzim bilirubin reduksitase. Sel retikuloendotel membuat bilirubin tak larut air, bilirubin yang sekresikan ke dalam darah diikat albumin untuk diangkut dalam plasma. Hepatosit adalah sel yang dapat melepaskan ikatan dan mengkonjugasikannya dengan asam glukoronat menjadi bersifat larut dalam air. Bilirubin yang larut dalam air masuk ke dalam saluran empedu dan diekskresikan ke dalam usus. Didalam usus oleh flora usus bilirubin diubah menjadi urobilinogen yang tak berwarna dan larut air. Urobilinogen mudah dioksidasi menjadi urobilirubin yang berwarna. Sebagian terbesar dari urobilinogen keluar tubuh bersama tinja, tetapi sebagian kecil diserap kembali oleh darah vena porta dikembalikan ke hati. Urobilinogen yang demikian mengalami daur ulang, keluar lagi melalui empedu. Ada sebagian kecil yang masuk dalam sirkulasi sitemik, kemudian urobilinogen masuk ke ginjal dan diekskresikan bersama urine (Wibowo, S, 2007).



**Gambar 2.2** Metabolisme bilirubin

Metabolisme bilirubin oleh sel hati memerlukan empat langkah yaitu:

1. Produksi

Sebagian besar bilirubin terbentuk sebagai akibat degradasi hemoglobin pada Retikulo Endotelia Systema (RES). Satu gram hemoglobin dapat menghasilkan 35 mg bilirubin indirek. Bilirubin indirek yaitu bilirubin yang bereaksi tidak langsung dengan zat warna diazo yang bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam lemak.

2. Transportasi

Bilirubin indirek kemudian diikat oleh albumin. Sel parenkima hepar mempunyai cara yang selektif dan efektif mengambil bilirubin dari plasma. Bilirubin ditransfer melalui membran sel ke dalam hepatosit sedangkan albumin tidak. Pengambilan oleh sel hati memerlukan protein sitoplasma atau protein penerima yang diberi simbol sebagai protein Y dan Z. Di dalam sel bilirubin akan terikat terutama pada ligandin (protein Y, glutation S-transferase B) dan sebagian kecil pada glutation S-transferase lain dan protein Z. Proses ini merupakan proses 2 arah, tergantung dari konsentrasi dan afinitas albumin dalam plasma dan ligandin dalam hepatosit. Sebagian besar bilirubin yang masuk hepatosit dikonjugasi dan diekskresi ke dalam empedu. Dengan adanya sitosol hepar,

ligandin mengikat bilirubin sedangkan albumin tidak. Pemberian fenobarbital mempertinggi konsentrasi ligandin dan memberi tempat pengikatan yang lebih banyak untuk bilirubin.

### 3. Konjugasi

Konjugasi molekul bilirubin dengan asam glukuronat berlangsung dalam retikulum endoplasma sel hati. Langkah ini bergantung pada adanya *glukuronil transferase*, yaitu enzim yang mengkatalis reaksi. Konjugasi molekul bilirubin sangat mengubah sifat-sifat bilirubin. Bilirubin terkonjugasi tidak larut dalam lemak, tetapi larut dalam air dan dapat diekskresi dalam kemih. Sebaliknya bilirubin tak terkonjugasi larut lemak, tidak larut air, dan tidak dapat diekskresi dalam kemih. Transpor bilirubin terkonjugasi melalui membran sel dan sekresi ke dalam kanalikuli empedu oleh proses aktif merupakan langkah akhir metabolisme bilirubin dalam hati. Agar dapat diekskresi dalam empedu, bilirubin harus dikonjugasi. Bilirubin terkonjugasi kemudian diekskresi melalui saluran empedu ke usus halus. Bilirubin tak terkonjugasi tidak diekskresikan ke dalam empedu kecuali setelah proses foto-oksidasi.

### 4. Ekskresi

Setelah konjugasi bilirubin ini menjadi bilirubin direk yang larut dalam air dan diekskresi dengan cepat ke sistem empedu kemudian ke usus. Bakteri usus mereduksi bilirubin terkonjugasi menjadi serangkaian senyawa yang dinamakan sterkobilin atau urobilinogen. Zat-zat ini menyebabkan feses berwarna coklat. Dalam usus bilirubin direk ini tidak diabsorpsi sebagian kecil bilirubin direk dihidrolisis menjadi bilirubin indirek dan direabsorpsi. Siklus ini disebut siklus

enterohepatik. Sekitar 10% sampai 20% urobilinogen mengalami siklus enterohepatik, sedangkan sejumlah kecil diekskresi dalam kemih.

### 2.1.3 Manifestasi klinis bilirubin

Bilirubin terdiri dari 2 jenis yaitu bilirubin direk dan bilirubin indirek. Gabungan antara kedua jenis ini disebut bilirubin total. Pada orang dewasa kadar normal bilirubin total : 0,1 – 1,2 mg/dL ; bilirubin direk : 0,1 – 0,3 mg/dL ; dan bilirubin indirek : 0,1 – 1,0 mg/dL. Pada anak – anak kadar normal bilirubin total : 1 – 12 mg/dL ; bilirubin direk : 0,2 – 0,8 mg/dL dan bilirubin indirek 0,1 – 1,0 mg/dL. Bilirubin terkonjugasi atau bilirubin direk kerap muncul akibat ikterik obstruktif, baik yang bersifat ekstrahepatika (akibat pembentukan batu ataupun tumor) maupun intrahepatika. Pada kasus hepatitis dan sirosis terdekompensasi, baik kadar bilirubin direk maupun indirek dapat meningkat (Joyce, L.F.K, 2008).

### 2.1.4 Perbedaan bilirubin direk dan indirek

**Tabel 2.1** Perbedaan bilirubin indirect dan direct

Bilirubin indirek	Bilirubin direk
Tidak larut dalam air	Larut dalam air
Larut dalam alkohol	Tidak larut dalam alkohol
Terikat oleh protein albumin	Tidak terikat oleh protein
Tidak mewarnai jaringan	Mewarnai jaringan
Dengan reagent Azo tidak bereaksi langsung perlu accelerator	Dengan reagent Azo langsung bereaksi, tidak accelerator
Tidak terdapat dalam urine	Dapat ditemukan dalam urine
Bilirubin yang belum dikonjugasi	Bilirubin yang dikonjugasi
Tidak dapat difiltrasi oleh glomerulus	Dapat difiltasi oleh glomerulus

Sumber : Sacher. *Klinis Tinjauan Hasil Laboratorium*. Jakarta 2004

## 2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Hasil Pemeriksaan Bilirubin Total

Spesimen akan selalu berhubungan langsung dengan faktor luar dan dalam pada pemeriksaan bilirubin total, hal ini erat sekali dengan kestabilan spesimen yang akan diperiksa, sehingga dalam pemeriksaan tersebut harus memperhatikan faktor - faktor yang mempengaruhi stabilitas kadar bilirubin total dalam spesimen tersebut. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi stabilitas spesimen untuk pemeriksaan bilirubin total berupa faktor dari luar dan dalam.

### 1. Faktor luar

#### a. Cahaya

Cahaya matahari maupun cahaya lampu dapat mempengaruhi sifat bilirubin sehingga mengalami penurunan konsentrasi bilirubin dalam serum. Pemeriksaan ini dapat menggunakan bahan sampel serum atau plasma heparin, sampel tidak boleh hemolisis dan terpapar sinar matahari. Cahaya matahari langsung dapat menyebabkan penurunan kadar bilirubin serum sampai 50% dalam 1 jam. Pemeriksaan laboratorium agar terhindar dari faktor resiko penyimpanan harus dilakukan ditempat gelap pada suhu rendah dan menggunakan tabung atau botol yang dibungkus kertas gelap atau aluminium foil agar menghambat proses denaturasi protein dalam serum sehingga kadar bilirubin total tetap stabil dan pengukuran dilakukan 2 hingga 3 jam (Hardjono, 2003).

#### b. Suhu penyimpanan

Suhu merupakan faktor penting untuk pemeriksaan bilirubin total karena suhu mampu menjaga kestabilan serum dan juga merusak komponen dalam serum jika suhu tinggi. Berdasarkan reagen Ecoline Diagnostic System penyimpanan

serum dapat stabil pada suhu 15 - 25°C selama satu hari, pada suhu 2 - 8°C selama tujuh hari dan pada suhu -20°C selama 3 bulan (Hardjono, 2003).

c. Waktu penyimpanan

Waktu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kadar bilirubin dalam serum, bila serum terlalu lama dibiarkan maka mempengaruhi kualitas kadar bilirubin dalam serum. Berdasarkan reagen Ecoline Diagnostic waktu penyimpanan serum masih stabil selama 24 jam pada suhu 20 - 25°C, selama 7 hari pada suhu 2 - 8°C, selama 3 bulan pada suhu -20°C (Hardjono, 2003).

d. Tabung penyimpanan

Tabung merupakan wadah atau tempat penampungan sampel, agar mudah untuk melakukan pemeriksaan, di rumah sakit biasanya menggunakan tabung vakum dengan tutup warna merah untuk menampung bahan sampel serum (Joyce, L.F.K, 2008).

Tabung vacuum tutup merah merupakan tabung tanpa additive, untuk darah beku dan serum dengan cara sentrifuge. Tabung vacuum terbuat dari bahan plastik atau kaca yang mudah ditembus oleh cahaya, sehingga mudah mempengaruhi konsentrasi di dalam serum. Berdasarkan sifat cahaya yang mampu menembus benda bening, hendaknya pemeriksaan dilakukan segera dan apabila dilakukan penyimpanan ditempat gelap, tabung yang berisi serum dibungkus kertas gelap atau kertas alumunium foil pada suhu rendah/kulkas sehingga mampu menjaga kestabilan kadar dalam serum (Joyce, L.F.K, 2008).

2. Faktor dalam

Peningkatan kadar bilirubin menurut Joyce, L.F.K, 2008 yang berlebih dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya yaitu :

a. Hemolisis

Hemolisis akibat inkompabilitas ABO atau isoimunisasi Rhesus, defisiensi G6PD, sferosit herediter dan pengaruh obat, infeksi, septicemia, sepsis, meningitis, infeksi intrauterine, polisitemia, extravasi sel darah merah, sefalhematom, konfusio, trauma lahir, ibu diabetes, sidosis, hipoksia atau afiksia, sumbatan traktus digestif yang mengakibatkan peningkatan sirkulasi enterohepatik (Joyce, L.F.K, 2008).

b. Ikterik

Peningkatan kadar bilirubin total dan direk dapat terjadi akibat ikterik obstruktif karena batu atau neoplasma empedu, hepatitis, sirosis hati, mononucleosis infeksiosa, metastasis hati, penyakit Wilson. Selain terjadi akibat penyakit dapat pula terjadi akibat penggunaan obat misalnya yaitu : antibiotik (amfoterisin B, klindamisin, eritromisin, gentamisin, linkomisin, oksasilin, tetrasiklin), sulfonamide, obat anti tuberculosis (asam paraaminosalisilat, isoniazid), alupurinol, diuretic (asetazolamid, asametakrinat), mitramisis, dekstran, diazepam (valium), barbiturate, narkotik (kodein, morfin, meperidin), flurazepam, indometasin, metotreksat, metildopa, papaverin, prokainamid, steroid, kontrasepsi oral, torbutamid, serta vitamin A, C, K. Sedangkan penurunan kadar dari bilirubin total dan direct dapat disebabkan karena anemia defisiensi besi dan pengaruh obat seperti barbiturate, salisilat (aspirin), penisilin, kafein dalam dosis tinggi (Joyce, L.F.K, 2008).

Berdasarkan penjelasan diatas tentang faktor yang mempengaruhi bilirubin, sehingga dalam pemeriksaan perlu penanganan sampel yang berkualitas, salah satunya dengan menjaga kualitas sampel. Oleh karena itu, perlu

pengendalian terhadap pemeriksaan dengan menghindari faktor-faktor resiko agar mendapatkan hasil yang akurat dan dapat dipercaya (Hardjono, 2003).

### 2.2.1 Jenis kesalahan hasil laboratorium

#### 1. Kesalahan kasar

Kesalahan ini terjadi karena kurang hati-hati, kurang pengalaman, dan kurang perhatian dari orang yang melakukan pengukuran tersebut. Kesalahan ini tidak boleh terjadi dan apabila diketahui ada kesalahan kasar maka segera ulangi kembali proses pengukurannya, sebagai contoh dari kesalahan pengukuran kasar adalah salah baca, salah mencatat, dan salah dengar. Untuk menghindari kesalahan kasar pengukuran, maka pengukuran dilakukan lebih dari satu kali, pengukuran menggunakan model dan teknik tertentu, dan pengukuran dilakukan oleh 2 orang atau lebih sebagai pembanding dan pengawas (Kosasih E.N, 2008).

#### 2. Kesalahan acak

Kesalahan acak adalah kesalahan dalam pengukuran yang mengarah pada nilai-nilai terukur yang tidak konsisten ketika berulang ukuran atribut konstan atau kuantitas yang diambil. Kata acak menunjukkan bahwa mereka secara inheren tidak terduga dan memiliki nilai yang diharapkan nol, yaitu mereka tersebar tentang nilai sebenarnya dan cenderung memiliki aritmatika nol berarti bila pengukuran diulang beberapa kali dengan instrumen yang sama. Semua pengukuran rentan terhadap kesalahan acak. Kesalahan acak yang disebabkan oleh fluktuasi tak terduga dalam pembacaan alat pengukuran atau dalam penafsiran eksperimen terhadap pembacaan instrumen, fluktuasi ini mungkin sebagian karena gangguan dari lingkungan dengan proses pengukuran. Konsep kesalahan acak berkaitan erat dengan konsep presisi. Semakin tinggi ketepatan

instrumen pengukuran, semakin kecil variabilitas (standar deviasi) dari fluktuasi pembacaannya. Kesalahan acak selalu hadir dalam pengukuran, hal ini disebabkan oleh fluktuasi inheren tak terduga dalam pembacaan alat pengukuran atau penafsiran eksperimen terhadap pembacaan instrumental. Kesalahan ini menyebabkan hasil sampel yang sama jika diperiksa berulang-ulang dan tidak akan memberikan hasil yang sama, pasti ada perbedaan. Kesalahan ini disebut *imprecision*. Kesalahan acak susah untuk dihilangkan, hanya dapat ditekan sekecil mungkin. Kesalahan hanya dapat diterima jika dalam batas toleransi yang nilainya ditetapkan berdasarkan kepentingannya (Kosasih E.N, 2008).

### 3. Kesalahan sistemik

Penyimpangan hasil dari nilai target atau nilai rata-rata bersifat searah, seperti nilai keseluruhan yang meninggi atau nilai seluruhnya merendah, hal ini terjadi pada kesalahan ukuran yang telah menyimpang pada prosedur kerja. Kesalahan sistemik (*systematic error*) menunjukkan tingkat ketepatan (akurasi) pemeriksaan. Hasil pemeriksaan selalu lebih besar atau selalu lebih kecil dari nilai seharusnya. Kesalahan sistemik umumnya disebabkan oleh hal-hal berikut ini:

- a. Spesifitas reagen atau metode pemeriksaan rendah (mutu rendah)
- b. Blangko sampel dan blangko reagen kurang tepat (kurva kalibrasi tidak linier)
- c. Mutu reagen dan kalibrasi kurang baik
- d. Alat bantu (pipet) yang kurang akurat
- e. Panjang gelombang yang dipakai

### **2.3 Pengaruh Suhu Penyimpanan dan Waktu Penundaan Terhadap Kadar Bilirubin**

Penyimpanan serum pemeriksaan bilirubin ini penting diperhatikan, karena kemungkinan lokasi pengambilan sampel dan tempat analisis sampel bukan berada pada satu daerah, sehingga cara penyimpanan dan transportasinya akan mempengaruhi aktifitas senyawa di dalamnya. Salah satu cara yang saat ini dipergunakan untuk penyimpanan sampel adalah dengan pendinginan (Feld, 2006).

Suhu dan waktu merupakan faktor luar yang selalu berhubungan langsung terhadap spesimen, baik saat pengambilan transportasi maupun saat pemeriksaan. Pemeriksaan kadar bilirubin total sebaiknya diperiksa segera, tapi dalam keadaan tertentu pemeriksaan kadar bilirubin total bisa dilakukan penyimpanan. Stabilitas serum dengan penyimpanan yang benar masih stabil dalam waktu satu hari bila disimpan pada suhu 15 - 25 °C, empat hari pada suhu 2 - 8 °C, dan tiga bulan pada penyimpanan -20 °C. Lamanya spesimen kontak dengan faktor-faktor di atas berpengaruh terhadap kadar bilirubin didalam spesimen sehingga perlu upaya mengurangi pengaruh tersebut serta mengoptimalkan kadar bilirubin total di dalam serum agar dapat bereaksi dengan zat pereaksi secara sempurna, sedangkan reagen bilirubin total akan tetap stabil berada pada suhu 2 - 8 °C dalam keadaan tertutup, terhindar dari kontaminan dan cahaya (Zairen, 2011).

Jika serum tidak segera dikerjakan, maka hendaknya dipisahkan dari sel-sel dan dimasukkan dalam lemari pendingin. Penyimpanan spesimen dapat dilakukan dengan menyimpannya dalam lemari es dengan suhu 2 - 8 °C, suhu

kamar, suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  atau  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Untuk jenis pemeriksaan yang menggunakan spesimen plasma atau serum, maka plasma atau serum dipisahkan dulu baru kemudian disimpan. Penundaan pemeriksaan sampel darah dapat menyebabkan penurunan kadar bilirubin serum sedangkan peningkatan kadar bilirubin dapat disebabkan oleh sampel yang hemolisis. Penurunan kadar bilirubin serum disebabkan juga oleh pemecahan bilirubin karena paparan cahaya (Saththa, dkk, 2010).

#### 2.4 Metode Pemeriksaan Bilirubin Total

Dalam pemeriksaan bilirubin total metode yang dipakai antara lain:

##### 1. Metode *Jendrasik- Grof*

Prinsip : Bilirubin bereaksi dengan DSA (diazotized sulphanilic acid) dan membentuk senyawa azo yang berwarna merah. Daya serap warna dari senyawa ini dapat langsung dilakukan terhadap sampel bilirubin pada panjang gelombang 546 nm. Bilirubin glukuronida yang larut dalam air dapat langsung bereaksi dengan DSA, namun bilirubin yang terdapat di albumin yaitu bilirubin terkonjugasi hanya dapat bereaksi jika ada akselerator.

Total bilirubin  $\longrightarrow$  bilirubin direk + bilirubin indirek.

##### 2. Metode *Colorimetric Test - Dichloroaniline (DCA)*

Prinsip : Total bilirubin direaksikan dengan dichloroanilin terdiazotisasi membentuk senyawa azo yang berwarna merah dalam larutan asam, campuran khusus (detergen enables) sangat sesuai untuk menentukan bilirubin total.

Reaksi : Bilirubin + ion diazonium  $\longrightarrow$  membentuk Azobilirubin dalam suasana asam (Dialine Diagnostik).