

ANALISIS DINAMIKA ERITROSIT DALAM DARAH-EDTA BERDASAR PENGUKURAN SPEKTROFOTOMETRI MENGGUNAKAN *PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS* UNTUK IDENTIFIKASI *BIOMARKER* KANKER PAYUDARA

DYNAMIC ANALYSIS OF ERYTHROCYTES IN EDTA BLOOD BASED ON SPECTROPHOTOMETRIC MEASUREMENTS USING PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS FOR BIOMARKER IDENTIFICATION OF BREAST CANCER

Ratna Fadhila Salma^{1*}, Kuncoro Asih Nugroho², Ngadikun³

Mahasiswa Jurusan Pendidikan Fisika Universitas Negeri Yogyakarta¹, Dosen Jurusan Pendidikan Fisika Universitas Negeri Yogyakarta² Dan Dosen Departemen Biokimia Universitas Gadjah Mada³

* Korespondensi Penulis.Email: ratna.fadhila2015@student.uny.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan pola agregasi eritrosit antara subjek normal dan subjek penderita kanker payudara menggunakan *Principal Component Analysis (PCA)* serta untuk mengetahui deskripsi proses terjadinya agregasi eritrosit ditinjau dari parameter muatan listrik Potensial Zeta. *Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)* digunakan untuk mencegah pembekuan darah. Sampel darah Vena yang sudah dimasukkan EDTA dilakukan pengambilan data uji spektrofotometri. Setelah diperoleh data absorbansi selanjutnya nilai absorbansi dengan interval 7 detik diolah menggunakan aplikasi Matlab dan Microsoft Excel. Parameter pembeda pola agregasi eritrosit kedua kelompok dianalisis menggunakan model pendekatan PCA grafik klusterisasi 2 dimensi dan 3 dimensi. Hasil penelitian diperoleh tidak ada perbedaan pola agregasi eritrosit antara subjek penderita kanker payudara dan subjek normal apabila diolah menggunakan metode PCA. Grafik 2 dimensi menunjukkan posisi kedua kelompok saling bertumpang tindih, tidak dapat membedakan subjek kelompok kanker payudara dan subjek normal. Hal ini didukung dengan persen variansi data untuk PC₁ sebesar 23,32% dan PC₂ sebesar 18,02% dengan persen variansi kumulatif 41,34%. Grafik 3 dimensi menunjukkan hal yang serupa, kedua kelompok saling bertumpang tindih dengan persen variansi data PC₃ sebesar 12,86% dan persen variansi kumulatif sebesar 54,2%. Kesimpulan, metode PCA tanpa langkah pra-pemrosesan data tidak dapat membedakan pola absorbansi agregasi eritrosit antara subjek kanker payudara dan subjek normal.

Kata Kunci: absorbansi, EDTA, eritrosit, kanker payudara, PCA

Abstract

This research aims to determine the differences in the aggregation pattern of erythrocytes in breast cancer patients using Principal Component Analysis (PCA) and to describe the process of erythrocyte aggregation in terms of the Zeta Potential electric charge parameter. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) is used to prevent blood clots. Venous blood samples that have been added by EDTA were taken for spectrophotometric test data. After obtaining the absorbance data, the absorbance values with 7 second intervals were processed using Matlab and Microsoft Excel applications. The differentiating parameters of erythrocytes aggregation patterns of the two groups were analyzed using a 2-dimensional and 3-dimensional PCA clustering graph approaches. The results obtained were that there was no difference erythrocytes aggregation patterns between subjects with cancer and normal subjects when processed using the PCA method. The 2 dimensional graph showed the position of the two groups overlapped each other, unable to distinguish between breast cancer and normal subjects. This was supported by the percentage variance of data for PC₁ of 23.32% and PC₂ of 18.02% with a cumulative variance of 41.34%. The 3-dimensional graph showed the similar thing, the two groups overlapped each other with the percent variance of the PC₃ data of 12.86% and the

cumulative percent variance of 54.2%. In conclusion, PCA method without pre-processing step could not distinguish erythrocytes aggregation patterns between cancer subjects and normal subjects.

Keywords: *absorbance, EDTA, erythrocytes, breast cancer, PCA*

PENDAHULUAN

Secara global kanker merupakan penyebab kematian nomor 2 setelah penyakit kardiovaskular, diperkirakan 7,5 juta orang meninggal akibat kanker dan lebih dari 70% kematian terjadi di negara miskin dan berkembang (Kementerian Kesehatan RI, 2015). Data *press release International Agency Researches on Cancer (IARC)* menyebutkan bahwa dari 186 negara dengan 36 jenis kanker yang berbeda terdapat 18,1 juta kasus baru dan 9,6 juta kematian akibat kanker pada tahun 2018 (IARC, 2018). Salah satu jenis kanker dengan kejadian morbiditas dan mortalitas tertinggi adalah kanker payudara. DI Yogyakarta merupakan provinsi dengan prevalensi kanker tertinggi di Indonesia yang didominasi kasus kanker payudara (Dinkes DIY, 2018). Lebih dari 80% kasus kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut. Hal ini cukup memprihatinkan mengingat kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang dapat disembuhkan apabila terdeteksi lebih awal (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Tingginya tingkat morbiditas dan mortalitas dipengaruhi banyak faktor yaitu gejala awal tidak menunjukkan keluhan berarti, adanya rasa takut, serta tahapan skrining saat ini cukup panjang dan masih bersifat sporadik (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Maka mengembangkan metode yang lebih sederhana dengan spesifitas dan sensitifitas tinggi merupakan suatu langkah lain yang dapat digunakan untuk identifikasi ciri khas kanker payudara.

Salah satu tes laboratorium yang digunakan sebagai skrining dan diagnosis kanker payudara adalah tes *tumor marker*. Adanya kanker dalam tubuh dapat dikenali dari kenaikan kadar *tumor marker* tertentu dalam darah secara signifikan (Wayan Rediatning S., 2000). Namun *tumor marker* baru dapat terukur dalam tingkat tertentu dan biasanya diketahui saat jaringan kanker sudah stadium lanjut dan sejauh ini, tidak ada tumor yang memiliki 100% *tumor marker* spesifik dan akurat (Fuda Cancer Hospital, 2019). Misal kanker payudara memiliki kombinasi *tumor marker* protein Ca-15-3 dan CEA (Manuaba, 2010). Namun *tumor marker* Ca 15-3 dapat ditemukan dalam kanker hati dan *tumor marker* CEA dapat ditemukan pada kanker kolorektal (Duffy & Mcging, 2010).

Protein *Tumor marker* memiliki muatan tergantung asam amino penyusunnya. Kehadiran *tumor marker* bermuatan dalam jaringan darah dapat memberikan pertanda biologis (*biomarker*) lain untuk

identifikasi kanker. Salah satu penelitian yang menunjukkan keterkaitan perubahan perilaku sel-sel darah dengan protein *tumor marker* telah dilakukan oleh Ngadikun (2006) untuk kasus kanker hepar. Penelitian tersebut mengamati perubahan potensial zeta sel darah merah dalam EDTA yang berpengaruh terhadap Laju Endap Darah menggunakan spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan adanya spektrum spesifik dengan spesifitas dan sensitivitas 100% (Aryati, 2019).

Metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan sinar monokromatis untuk mengamati terjadinya perubahan kejernihan batas darah-EDTA pada satu titik yaitu bagian teratas yang direkam dalam bentuk nilai absorbansi. Nilai absorbansi cahaya yang berangsur-angsur berubah menunjukkan adanya perubahan konsentrasi pada plasma darah (Nugroho, Abraha, & Ngadikun, 2017). Proses interaksi seluler yang direkam dalam spektrum absorbansi cahaya menyimpan informasi interaksi seluler yang menggambarkan proses agregasi eritrosit. Spektrum absorbansi tersebut dapat dianalisis menggunakan metode *Principal Component Analysis (PCA)* yang merupakan suatu perhitungan yang digunakan untuk analisis data pada multidimensi sekumpulan data (dataset) khususnya pada bidang grafik. PCA mereduksi informasi tanpa harus menghilangkan informasi utamanya dengan menemukan nilai eigen dan vektor eigen untuk mendapatkan nilai kovariansi dan korelasi antar dimensi pada suatu data (Jolliffe & Cadima, 2016).

METODE PENELITIAN

Teknik Pengumpulan Data

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengajukan Permohonan *Ethical Clearance* ke Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan (*Medical & Health Research Ethics Committee*) Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Bahan berupa sampel darah subjek kanker diambil dari pasien kanker RSUP dr. Sardjito Yogyakarta. Sementara subjek normal diambil dari masyarakat umum yang memenuhi persyaratan untuk terlibat sebagai subjek penelitian serta telah menyetujui angket kesanggupan (*inform consent*) pengambilan sampel darah untuk penelitian.

Subjek yang sampel darahnya dijadikan objek penelitian adalah subjek wanita dewasa usia 17-65 tahun yang telah memenuhi syarat tertentu. Syarat untuk kategori subjek normal adalah subjek tidak

memiliki riwayat/turunan penyakit kanker, tidak sedang mengidap kanker, dan tidak menderita infeksi berat. Sementara syarat untuk kategori subjek kanker payudara adalah subjek yang telah melakukan Biopsy/Patologi Anatomi dan terbukti mengidap penyakit kanker payudara, tidak mengidap diabetes melitus dan tidak mengalami inflamasi/sakit berat lainnya.

Pengambilan data penelitian dilakukan selama 6 bulan dari April 2019 - September 2019. Lokasi penelitian berlangsung di Laboratorium Patologi Klinik FKKMK UGM, Instalansi Kanker Tulip RSUP dr. Sardjito, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM, dan Laboratorium FMIPA UNY.

Prosedur Penelitian

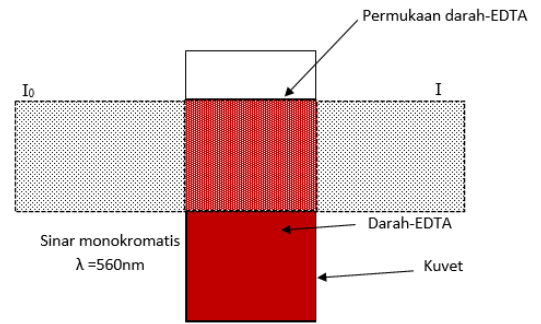
1. Prosedur penelitian subjek normal

Subjek normal yang telah memenuhi persyaratan dan menyetujui angket kesanggupan (*inform consent*), diperiksa ke dokter umum untuk melakukan tes kesehatan. Setelah dinyatakan sehat yang dibuktikan dengan surat keterangan sehat dari dokter, subjek normal kemudian diambil darahnya sebanyak 6 ml di Laboratorium Patologi Klinik FKKMK UGM. Sampel darah 6 ml tersebut ditambahkan Antikoagulan EDTA (*Ethilendiamin Acid*). Dalam rentang waktu maksimal 2 jam dari pengambilan, sampel darah-EDTA diuji untuk pemeriksaan darah rutin sebanyak 3 ml, dan 3 ml sisanya digunakan untuk uji spektrofotometer UV-Vis di Laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada. Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah hasil pemeriksaan darah rutin, nilai absorbansi dari spektrofotometer UV-Vis.

2. Prosedur penelitian subjek kanker

Subjek kanker yang telah memenuhi persyaratan dan menyetujui angket kesanggupan (*inform consent*) diambil darahnya sebanyak 3 ml. Sampel darah tersebut ditambahkan Antikoagulan EDTA (*Ethilendiamin Acid*). Dalam rentang waktu maksimal 2 jam dari pengambilan, sampel darah-EDTA diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis di Laboratorium PAU Universitas Gadjah Mada. Data yang diperoleh berupa data absorbansi sampel darah dari spektrofotometer UV-Vis.

Pada pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dilakukan uji blanko kemudian sampel darah-EDTA dimasukkan ke dalam *cuvett* dan diatur sedemikian rupa agar bagian sampel darah-EDTA yang disinari adalah bagian bawah permukaan.



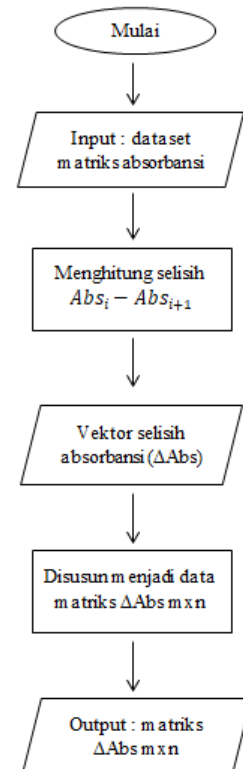
Gambar 1 Ilustrasi pengukuran absorbansi darah-EDTA

Spektrofotometer UV-Vis yang digunakan adalah VWR Spectrophotometers tipe 1600PC. Alat tersebut dihubungkan dengan komputer untuk merekam data analog absorbansi menjadi data digital. Program yang digunakan untuk merekam data tersebut adalah M.Wave Professional dengan keluaran data berupa grafik spektrum absorbansi dan nilai absorbansi yang dapat disimpan dalam format *excel*. Pengamatan dilakukan selama 1800 s dengan selang waktu pengamatan 7 s.

Diagram Alir

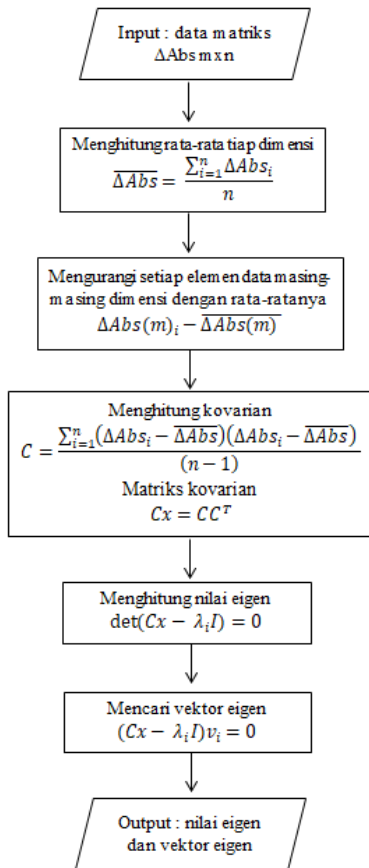
Data absorbansi diperoleh berupa dataset tabel absorbansi darah dalam satuan waktu. Teknik analisis data digambarkan dalam 3 tahapan diagram alir berikut:

1. Tahap pre-PCA



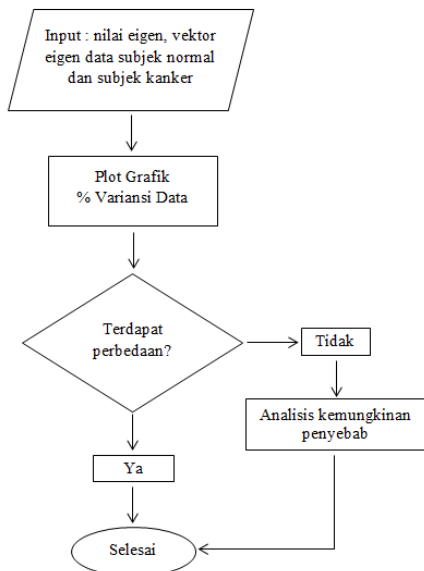
Gambar 2 Diagram Alir Tahap pre-PCA

2. Tahap PCA



Gambar 3 Diagram Alir Tahap PCA

3. Tahap Clustering



Gambar 4 Diagram Alir Tahap Clustering

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

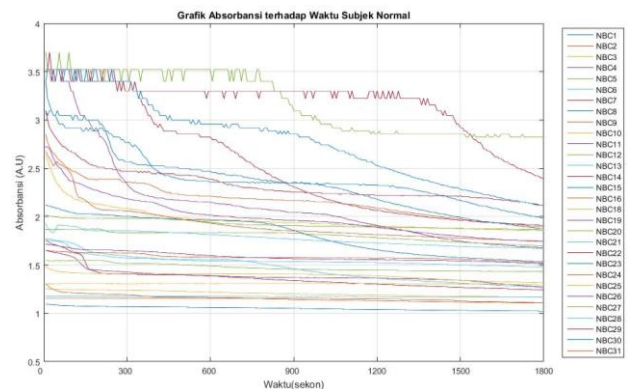
Penelitian ini bertujuan mencari perbedaan antara subjek normal dan subjek kanker payudara berdasarkan selisih nilai absorbansi sel darah merah-EDTA menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Analisis yang digunakan adalah *Principal Component Analysis* (PCA) untuk reduksi dimensi dan klusterisasi menggunakan program MATLAB. Sampel penelitian melibatkan 30 wanita sehat berusia 17-65 tahun serta 34 penderita kanker payudara. Darah vena yang diambil dari setiap subjek dalam waktu kurang dari 2 jam diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis VWR tipe 1600PC. Pengukuran absorbansi dilakukan setiap 7 detik selama 1800 detik menggunakan panjang gelombang 560nm. Data subjek normal diberikan kode NBC + nomor sampel dan subjek kanker payudara diberikan kode BC + nomor sampel.

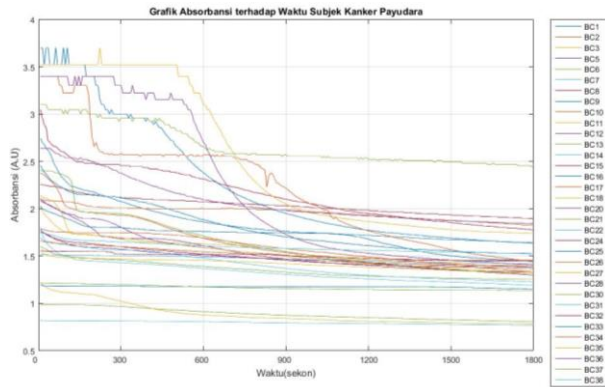
1. Absorbansi darah-EDTA

Pengukuran absorbansi sampel darah vena menggunakan panjang gelombang 560nm. Darah vena mengandung eritrosit-eritrosit dalam keadaan *deoxyhemoglobin* yang dapat menyerap sinar radiasi secara maksimal pada panjang gelombang tersebut (Liu et al, 2012). Absorbansi diperoleh dari perbandingan intensitas sinar datang (I_0) dan intensitas sinar yang ditransmisikan (I) setelah melewati sampel darah-EDTA. Saat I lebih kecil dari pada I_0 maka sampel darah-EDTA menyerap sebagian sinar datang. Semakin besar nilai absorbansi sampel darah-EDTA maka semakin banyak jumlah eritrosit yang menyerap (absorpsi) sinar datang pada zona penyinaran. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi sampel darah-EDTA berbanding lurus dengan nilai absorbansi sesuai dengan Hukum Lambert-Beer.

Data absorbansi disusun menjadi data set matriks kemudian dikategorikan menjadi dua kelompok besar yaitu data absorbansi kelompok subjek normal sebanyak 30 data dan kelompok subjek kanker payudara sebanyak 34 data. Kedua kelompok data absorbansi dibuat grafik menggunakan software MATLAB R2015b



Gambar 5 Grafik absorbansi sel sel darah subjek normal



Gambar 6 Grafik absorbansi sel sel darah subjek kanker payudara

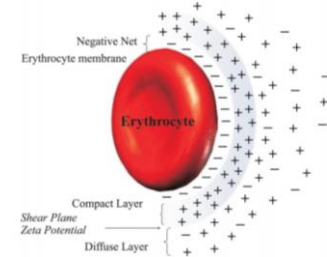
Gambar 21 dan 22 menunjukkan grafik absorbansi yang menyimpan informasi pola absorbansi interaksi sel-sel darah pada interval 7 detik. Pola absorbansi sel-sel darah subjek kanker payudara (gambar 22) terlihat cenderung lebih cepat turun dibanding dengan pola absorbansi sel-sel darah subjek normal (gambar 21). Penurunan nilai absorbansi tersebut terjadi karena adanya perubahan nilai absorbansi. Tabel berikut menggambarkan jumlah kejadian perubahan nilai absorbansi setiap rentang waktu pengukuran.

Tabel 1 Tabel persentase jumlah kejadian perubahan nilai absorbansi

Persentase jumlah kejadian perubahan nilai absorbansi (%)		
waktu (s)	Subjek Normal	Subjek Kanker
0-300	49,5359	62,7223
301-600	42,8682	65,1163
601-900	43,3333	75,3078
901-1200	46,4341	71,6826
1201-1500	50,8527	67,3051
1501-1800	52,1705	60,5335

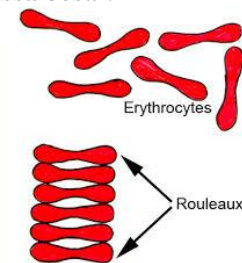
Tabel 1 juga menggambarkan sampel darah-EDTA subjek kanker melalui puncak perubahan nilai absorbansi lebih dahulu pada $t=601-900s$ dibanding dengan sampel darah-EDTA subjek normal pada $t=1501-1800s$. Saat persentase jumlah kejadian sampel darah-EDTA subjek kanker mulai menurun, persentase jumlah kejadian sampel darah subjek normal justru semakin meningkat. Perbedaan waktu penurunan pola absorbansi darah-EDTA antara subjek normal dan subjek kanker payudara mencerminkan adanya perbedaan interaksi seluler antara kedua kelompok tersebut. Perbedaan

interaksi seluler ini dapat ditinjau dari perilaku komponen yang dominan dalam komposisi darah yaitu eritrosit. Eritrosit merupakan komponen sel darah dengan konsentrasi terbesar sehingga dapat digunakan sebagai pusat utama interaksi dalam darah (Rathore & Ali, 2014).



Gambar 7 Skema representasi potensial zeta eritrosit. Sumber : (Fernandes, Cesar, & Barjas-Castro, 2011)

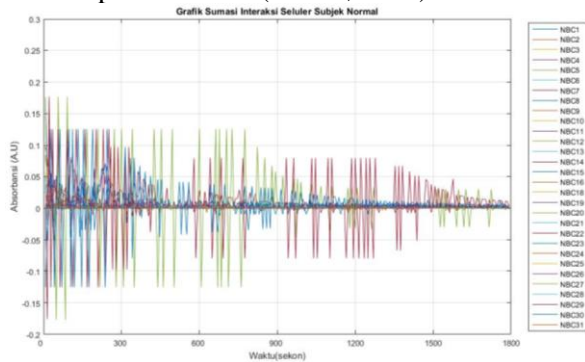
Pada subjek kanker, keberadaan protein dengan muatan listrik ini dapat mengganggu sebaran ion disekitar permukaan eritrosit. Sebaran ion pada permukaan eritrosit membentuk *double electric layer* bermuatan netral yang berperan penting dalam interaksi elektrostatis partikel sistem koloid. Permukaan eritrosit bermuatan negatif menarik ion positif membentuk lapisan compact dengan ion positif yang tidak bergerak karena gaya elektrostatis yang kuat. Kehadiran protein bermuatan hasil sekresi sel kanker mempengaruhi stabilitas kelistrikan lapisan ganda listrik eritrosit yang ditandai dengan potensial zeta pada permukaan eritrosit menurun. Hal ini menunjukkan gaya tolak menolak antar eritrosit sebagai gaya penghambat semakin kecil. Akibatnya eritrosit saling tarik menarik karena gaya van der Waals sehingga eritrosit lebih cepat beragregasi satu sama lain membentuk formasi rouleaux. Kemudian formasi rouleaux eritrosit dapat menempel dan berkumpul menjadi agregat bermassa besar.



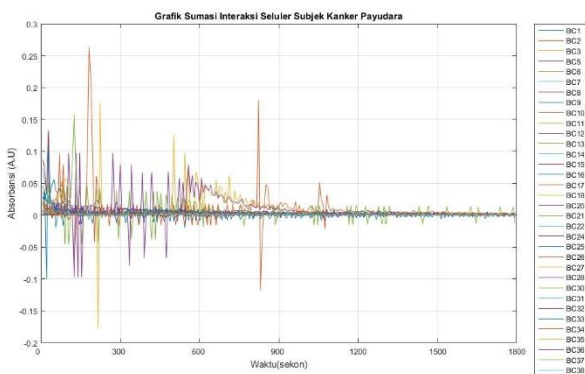
Gambar 8 Formasi rouleaux eritrosit. Sumber : (The McGill Physiology Virtual Lab, 2012)

Pergerakan interaksi eritrosit sangat cepat dan bersifat acak (stokastik). Hal ini karena pergerakan eritrosit bersifat *reversible* mampu beragregasi dan disagregasi tergantung perubahan yang terjadi di lingkungannya. Pembentukan

formasi rouleaux dan agregat bermassa besar tidak selalu cepat stabil karena eritrosit saling berinteraksi dengan gerakan menjauh-mendekat dari waktu ke waktu. Eritrosit dapat berdisgregasi saat agregat yang terbentuk tidak mampu menjaga kestabilannya sehingga endapan tidak cepat terbentuk (Glaser, 2012).



Gambar 9 Grafik absorbansi sumasi interaksi seluler subjek normal



Gambar 10 Grafik absorbansi sumasi interaksi seluler subjek kanker

Gambar 23 dan gambar 24 menunjukkan perubahan nilai absorbansi yang menggambarkan interaksi seluler eritrosit pada kelompok subjek normal dan kelompok subjek kanker. Nilai absorbansi menggambarkan kumpulan eritrosit dalam zona peninaran yang menyerap sinar datang dari spektrofotometer UV-Vis (sumasi interaksi seluler). Grafik vertikal ke bawah bernilai negatif (-) menunjukkan peningkatan pada nilai absorbansi, grafik vertikal ke atas bernilai positif (+) menunjukkan penurunan nilai absorbansi, dan grafik horizontal bernilai 0 (nol) menunjukkan nilai absorbansi konstan selama periode waktu tertentu. Grafik vertikal ke atas, vertikal ke bawah, dan horizontal yang mencerminkan perubahan absorbansi selama periode waktu 7 detik dihitung dari selisih nilai absorbansi. Secara grafis terlihat adanya perbedaan sumasi interaksi seluler eritrosit antara kelompok subjek kanker dan subjek normal. Penelitian ini mencari perbedaan antara

subjek kanker dan subjek normal menggunakan 30 data perubahan nilai absorbansi subjek normal dan 34 data perubahan nilai absorbansi subjek kanker. Perubahan nilai absorbansi setiap subjek dihitung dari selisih nilai absorbansi yang membentuk sebuah data vektor kolom ΔAbs . Vektor kolom ΔAbs tersebut ditransformasikan menjadi sebuah dataset matriks ΔAbs .

2. Principal Component Analysis

Principal component analysis atau PCA merupakan salah satu metode klasik *machine learning* untuk reduksi dimensi sekumpulan dataset. Metode ini dapat digunakan pada data perubahan nilai absorbansi eritrosit yang memiliki dimensi tinggi agar lebih mudah diinterpretasikan.

a. Menyusun matriks $m \times n$

Setiap sampel masing-masing memiliki data absorbansi darah-EDTA interval 7 detik dari *software M.wave professional* berbentuk tabel 258×1 .

Tabel 2 Nilai absorbansi eritrosit subjek NBC1 tiap 7 detik

Time (s)	Abs NBC1
0	1,0953
7	1,0926
14	1,0904
21	1,0888
28	1,0872
35	1,0851
42	1,0841
49	1,083
.	.
.	.
.	.
1800	1,0214

Nilai yang dianalisis adalah perubahan nilai absorbansi (ΔAbs). Nilai tersebut diketahui dari nilai absorbansi pada $t=0$ dikurangi oleh nilai absorbansi pada $t=7$ dan seterusnya sehingga diperoleh data selisih nilai absorbansi bentuk tabel 257×1 dari setiap subjek penelitian. Data vektor kolom tersebut kemudian disusun menjadi sebuah matriks ukuran 257×64 ($m \times n$). Baris matriks (m) merujuk jumlah elemen data dan kolom matriks merujuk jumlah variabel terlibat (n).

Tabel 3 Data ΔAbs eritrosit subjek NBC1

Data ke-m	ΔAbs NBC1
1	0,0027
2	0,0022
3	0,0016

4	0,0016
5	0,0021
6	0,001
7	0,0011
8	0,0016
.	.
.	.
.	.
257	0,0006

Tabel 4 Matriks data ΔAbs eritrosit subjek normal dan kanker

Data ke-m	ΔAbs NBC ke-1	ΔAbs NBC ke-30	ΔAbs BC ke-1	ΔAbs BC ke-34
1	0,0027	0,0533	0	0,005
2	0,0022	0,0621	0	0
3	0,0016	0,0544	0	0
4	0,0016	0,0483	0	0,0024
5	0,0021	0,0434	0,125	0,0025
6	0,001	0,0396	-0,125	0,0024
7	0,0011	0,0184	0	0,0024
8	0,0016	0,0264	0,125	0,0048
.
.
257	0,0005	0,0078	0	0,0093

b. Nilai rata-rata matriks ($\overline{\Delta Abs}$)

Nilai rata-rata dihitung untuk mengetahui distribusi probabilitas data Δabs pada tiap dimensi. Perhitungan dilakukan untuk setiap dimensi data matriks sehingga diperoleh 257 nilai rata-rata yang selanjutnya digunakan dalam perhitungan variansi data ΔAbs.

c. Variansi (σ²)

Variansi merupakan bentuk persamaan standar deviasi (σ) tanpa akar kuadratnya yang mengukur sebaran titik data pada satu dimensi data ΔAbs dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\sigma^2 (\Delta Abs) = \frac{\sum_{i=1}^n (\Delta Abs_i - \overline{\Delta Abs})(\Delta Abs_i - \overline{\Delta Abs})}{(n-1)} \quad (1)$$

Pengukuran variansi satu dimensi bersifat independen dengan dimensi lain, sementara untuk mencari hubungan antara 2 dimensi dihitung menggunakan pengukuran Kovarian. Besarnya nilai kovarian mengindikasikan banyaknya kejadian data berulang dalam sebuah dataset (redundansi). Semakin besar nilai kovarian maka redundansinya semakin tinggi dan semakin kecil nilai kovarian maka redundansinya semakin rendah. Misal untuk menghitung kovarian ΔAbs dimensi 1 dan dimensi 2 digunakan persamaan berikut:

$$C = \frac{\sum_{i=1}^n (\Delta Abs(1)_i - \overline{\Delta Abs(1)})(\Delta Abs(2)_i - \overline{\Delta Abs(2)})}{(n-1)} \quad (2)$$

ΔAbs (1) : Δ absorbansi dimensi ke-1

ΔAbs (2) : Δ absorbansi dimensi ke-2

i : variabel ke-i

n : jumlah variabel (64)

d. Matriks kovarian

Kovarian hanya dapat menghitung hubungan antar 2 dimensi sementara data ΔAbs memiliki 257 dimensi dengan 64 variabel, maka terdapat lebih dari satu perhitungan kovarian. Banyaknya perhitungan kovarian dimensi yang berbeda-beda lebih efektif dihitung menggunakan komputasi matriks. Himpunan nilai kovarian antar dimensi menghasilkan matriks kovarian simetris Cx yang berukuran 257 x 257.

$$C_x = \begin{bmatrix} Cov(\Delta Abs(1), \Delta Abs(1)) & \dots & Cov(\Delta Abs(1), \Delta Abs(257)) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ Cov(\Delta Abs(257), \Delta Abs(1)) & \dots & Cov(\Delta Abs(257), \Delta Abs(257)) \end{bmatrix}$$

Matriks kovarian Cx dihitung menggunakan operasi matriks dengan mengalikan matriks A dengan matriks transposenya (A^T). Matriks A merupakan himpunan hasil pengukuran ΔAbs_i dengan $\overline{\Delta Abs}$ kemudian dibagi n-1 dari setiap dimensi.

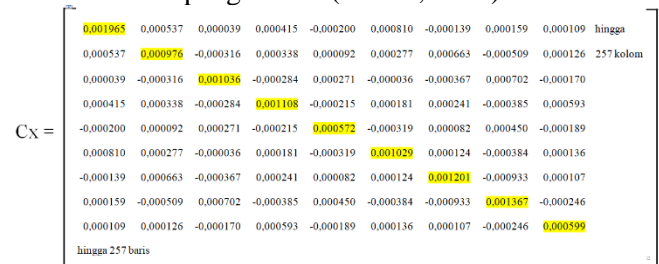
$$C_x = A A^T \quad (3)$$

Cx : matriks kovarian ΔAbs

$$A : \frac{(\Delta Abs_i - \overline{\Delta Abs})}{n-1}$$

A^T : matriks transpose A

Matriks kovarian data ΔAbs menghasilkan matriks simetris berukuran 257 x 257 yang menyimpan informasi karakteristik data ΔAbs subjek kanker dan normal. Komponen diagonal dari Cx (ditandai dengan warna kuning pada gambar 27) merupakan variansi dari setiap dimensi pengukuran, sementara komponen *off-diagonal* Cx (tanpa warna pada gambar 27) merupakan kovarian dari banyaknya kombinasi 2 dimensi pengukuran ΔAbs. Cx menggambarkan korelasi diantara semua kombinasi dimensi yang merefleksikan *noise* dan *redundancy* dari seluruh pengukuran (Shlens, 2005).



Gambar 11 Matriks kovarian ΔAbs (Cx)

Matriks kovarian Δabs (Cx) memiliki skor varian dan kovarian positif-negatif yang beragam sehingga perlu dilakukan

diagonalisasi matriks kovarian C_x untuk meminimalkan redundansi dan memaksimalkan sinyal data yang terukur sehingga data dapat diinterpretasi.

e. *Singular Value Decomposition*

Metode SVD digunakan untuk melakukan perubahan basis (rotasi) dengan mencari jumlah variansi tertinggi. Nilai tersebut merupakan informasi paling penting (*principal component/PC*) dari sebuah dataset. Jumlah variansi maksimum data dalam terminologi matematis disebut dengan nilai eigen dan vektor baru yang merepresentasikan informasi terpenting data disebut dengan vektor eigen. Kedua variabel tersebut berkaitan erat satu sama lain yang memenuhi persamaan:

$$Ax = \lambda x \quad (4)$$

- A : matriks original
- x : vektor eigen
- λ : nilai eigen

Dari persamaan di atas diketahui bahwa deretan vektor eigen merepresentasikan matriks original dalam bentuk matriks baru dengan mengekstraksi sinyal/informasi terpenting dan meminimalkan *noise* dari data. SVD mendekomposisi matriks kovarian menjadi nilai eigen dan vektor eigen berdasarkan persamaan :

$$SVD(C) = U\Sigma V^T \quad (5)$$

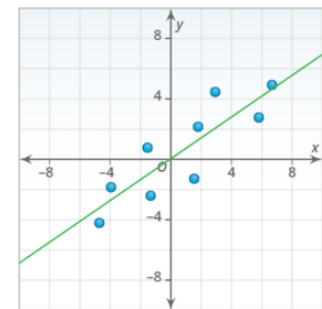
- C : Matriks kovarian
- U : *left singular vector* matriks C
- Σ : *diagonal vector* yang menyimpan *singular value*/nilai eigen
- V^T : *right singular vector* matriks C

Left singular vector merupakan *unitary* matriks yang merepresentasikan informasi penting dari kolom matriks kovarian, *diagonal vector* merupakan nilai eigen yang tersusun secara berurutan dari nilai terbesar hingga nilai terkecil, dan *right singular vector* merupakan *unitary matrix* yang merepresentasikan informasi penting dari baris matriks kovarian. Kolom matriks V^T merupakan vektor eigen yang merepresentasikan informasi terpenting secara keseluruhan dan tersusun berurutan dari vektor eigen terpenting hingga vektor eigen yang kurang penting. Komponen

terpenting yang digunakan untuk analisis lebih lanjut adalah matriks Σ (menyimpan nilai eigen) dan matriks V^T (menyimpan vektor eigen).

1) Nilai eigen

Nilai eigen diperoleh dari jumlah maksimum variansi data yang menunjukkan *best line fitting* sebagai arah ternormalisasi dalam ruang dimensi-m. *Best line fitting* merepresentasikan *principal component (PC)* dari kumpulan data matriks kovarian. Visualisasi grafik 2 dimensi gambar 28 menggambarkan nilai eigen sebagai *PC*.



Gambar 12 Grafik 2D *best line fitting*

Penjumlahan variansi untuk mengetahui arah vektor mana yang memiliki jarak paling dekat dengan data asli. Penentuan arah vektor dilakukan dengan rotasi basis secara tegak lurus. Visualisasi *best line fitting* hanya dapat digunakan untuk data 2 atau 3 dimensi. Data dengan dimensi tinggi tidak dapat divisualisasikan, namun menemukan persamaan *best line fitting* secara matematis tetap dapat dihitung menggunakan operasi matriks berikut :

$$\det(Cx - \lambda_i I) = 0 \quad (6)$$

C_x : matriks kovarian ΔAbs

$\lambda_i I$: matriks identitas nilai eigen

Berdasarkan persamaan di atas, dekomposisi matriks C_x ukuran 257×257 ($i \times j$) menghasilkan 257 nilai eigen (λ_i) yang disimpan dalam matriks diagonal, kemudian diurutkan dari nilai terbesar hingga nilai terkecil (matriks $\Sigma_{\Delta Abs}$). Besarnya nilai eigen menunjukkan *best line fitting* sebagai rekonstruksi terdekat dari data aslinya sehingga besarnya nilai eigen menentukan komponen terpenting data ΔAbs . Nilai eigen terbesar matriks $\Sigma_{\Delta Abs}$ yaitu 0,0102

$$\Sigma_{\Delta Abs} = \begin{bmatrix} 0,0102 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0,0079 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0,0056 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,0041 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0035 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0028 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0020 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & \lambda_{257} \end{bmatrix}$$

Gambar 13 Matriks $\Sigma_{\Delta Abs}$ yang menyimpan nilai eigen

2) Vektor eigen

Vektor eigen berupa deretan angka yang merepresentasikan informasi tentang pola data dengan mengekstraksi karakteristik yang tersembunyi. Vektor eigen diperoleh dari panjang vektor *best line fitting* terhadap titik data. Vektor eigen dari sekumpulan data dimensi tinggi secara matematis dapat diperoleh dari operasi matriks berikut :

$$(Cx - \lambda_i I)v_i = 0 \quad (7)$$

Cx : matriks kovarian ΔAbs

$\lambda_i I$: matriks identitas nilai eigen

v_i : matriks vektor eigen

Persamaan di atas menghasilkan matriks yang menyimpan vektor eigen (V^T) diurutkan berdasarkan nilai eigen terbesar ke nilai eigen terkecil. Semakin besar nilai eigen maka eigen vektornya semakin berpengaruh dalam merepresentasikan karakteristik data. Sementara nilai eigen yang bernilai kecil dapat diabaikan sebagai komponen yang tidak terlalu penting (Smith, 2002).

Dekomposisi matriks kovarian Cx ukuran 257×257 menghasilkan matriks $V^T_{\Delta Abs}$ yang menyimpan 257 vektor eigen. Setiap vektor eigen terdiri dari 257 buah elemen data berupa angka sebagai representasi karakteristik data ΔAbs .

$$V^T_{\Delta Abs} = \begin{bmatrix} -0,1448 & -0,3105 & -0,1885 & -0,0738 & 0,1169 & 0,2201 & -0,4017 & \dots & \text{hingga kolom} \\ 0,0388 & -0,0964 & -0,1534 & 0,3273 & 0,0554 & 0,0094 & -0,2685 & \dots & 257 \\ -0,0538 & 0,1948 & 0,0580 & -0,2423 & 0,0235 & 0,1618 & -0,2421 & \dots & \\ 0,0874 & -0,1986 & 0,1869 & 0,0948 & 0,0582 & 0,0203 & -0,2792 & \dots & \\ -0,0452 & 0,1623 & -0,0532 & 0,0387 & -0,0077 & 0,0305 & -0,2475 & \dots & \\ 0,0526 & -0,2046 & -0,1708 & -0,1230 & 0,0639 & 0,1226 & 0,0075 & \dots & \\ 0,2386 & 0,0070 & -0,1606 & 0,2828 & 0,0207 & -0,0519 & -0,2047 & \dots & \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \text{hingga baris} & & & & & & & & 257 \end{bmatrix}$$

Gambar 14 Matriks V^T yang menyimpan vektor eigen

Vektor kolom ke-1 dari matriks di atas merupakan vektor eigen terpenting disebut *principal component-1 (PC₁)*, vektor kolom ke-2 merupakan vektor eigen terpenting ke-2 disebut *principal component-2 (PC₂)*, dan vektor kolom ke-3 merupakan vektor eigen terpenting ke-3 disebut *principal component-3 (PC₃)*, dan seterusnya. *Principal component* mencerminkan variansi/keragaman dari keseluruhan data matriks ΔAbs . Semakin tinggi posisi PC maka semakin besar pengaruhnya dalam mewakili keragaman data.

3. Clustering

Clustering dengan PCA mengelompokkan subjek normal dan subjek kanker payudara menggunakan nilai eigen dan vektor eigen data ΔAbs . Nilai eigen dan vektor eigen data ΔAbs yang telah diurutkan dan ditransformasikan dalam bentuk tabel data adalah sebagai berikut :

Tabel 5 Nilai eigen data ΔAbs

λ									
0,0102	0	0	0	0	0	0	0	...	0
0	0,0079	0	0	0	0	0	0	...	0
0	0	0,0056	0	0	0	0	0	...	0
0	0	0	0,0041	0	0	0	0	...	0
0	0	0	0	0,0035	0	0	0	...	0
0	0	0	0	0	0,0028	0	0	...	0
0	0	0	0	0	0	0,0020	0	...	0
...
0	0	0	0	0	0	0	0	...	λ_{257}

Tabel 6 Vektor eigen data ΔAbs

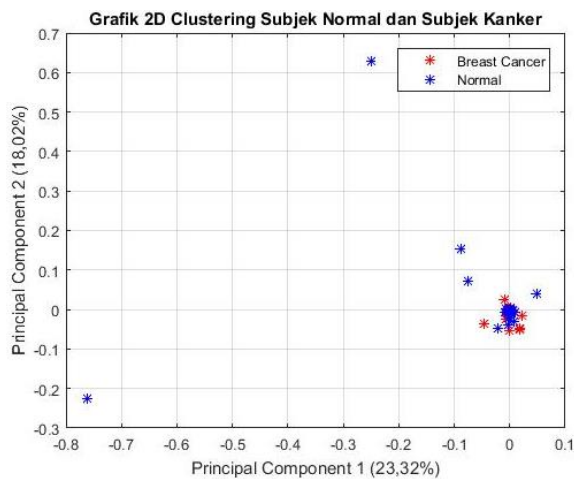
PC ₁	PC ₂	PC ₃	PC ₄	PC ₅	PC ₆	PC ₇	PC ₂₅₇
-0,1448	-0,3105	-0,1885	-0,0738	0,1169	0,2201	-0,4017	0
0,0388	-0,0964	-0,1534	0,3273	0,0554	0,0094	-0,2685	0,0307
-0,0538	0,1948	0,0580	-0,2423	0,0235	0,1618	-0,2421	-0,0190
0,0874	-0,1986	0,1869	0,0948	0,0582	0,0203	-0,2792	0,0197
-0,0452	0,1623	-0,0532	0,0387	-0,0077	0,0305	-0,2475	-0,0028
0,0526	-0,2046	-0,1708	-0,1230	0,0639	0,1226	0,0075	-0,0644
0,2386	0,0070	-0,1606	0,2828	0,0207	-0,0519	-0,2047	0,0432
...
0,0022	0,0121	0,0041	0,0053	0,0050	0,0019	0,0048	0,0073

Persentase keragaman PC dihitung secara kumulatif berdasarkan nilai eigennya menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Variansi} = \frac{\text{nilai eigen ke-}i}{\text{total penjumlahan nilai eigen}} \times 100\% \quad (8)$$

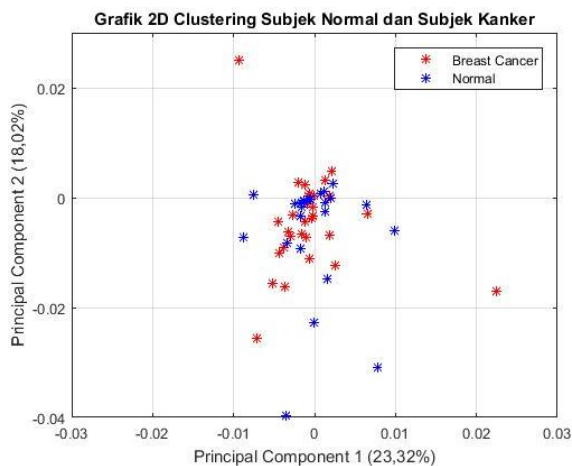
Persentase total variansi adalah alat mendasar untuk menilai kualitas representasi grafis dimensi rendah dari sekumpulan data. Representasi grafis biasanya menggunakan dua atau tiga PC pertama (Jolliffe, 2016). Pengelompokan subjek normal dan subjek kanker payudara berdasarkan ΔAbs menggunakan 3 vektor eigen pertama, yaitu PC₁, PC₂, dan PC₃ yang dikalikan dengan data aslinya sebagai

transformasi data baru yang dimensinya telah direduksi. Kemudian PC tersebut divisualisasikan dalam grafik 2 dimensi dan 3 dimensi. Plotting grafik menggambarkan data asli yang memiliki kesamaan pola akan berdekatan satu sama lain membentuk kelompok sendiri, sementara data yang memiliki pola berbeda akan berada di posisi lebih jauh membentuk kelompok berbeda. Visualisasi grafik 2 dimensi menggunakan variabel PC₁ dan PC₂ sementara grafik 3 dimensi menggunakan variabel PC₁, PC₂, dan PC₃ menggunakan *software* MATLAB.



Gambar 15 Representasi grafis *clustering* 2 dimensi subjek normal dan subjek kanker payudara

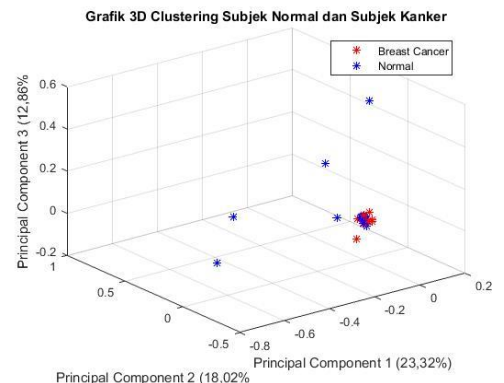
Hasil PCA dalam bentuk representasi grafis pada gambar 30 terlihat bahwa titik data dari subjek kanker payudara yang diwakili poin warna merah saling bertumpang tindih dengan titik data dari subjek normal yang diwakili poin berwarna merah. Zona tumpang tindih grafik 2 dimensi tersebut kemudian diperbesar 3 kalinya untuk melihat letak sebaran data subjek kanker payudara dan subjek normal lebih jelas.



Gambar 16 Representasi grafis *clustering* 2 dimensi subjek normal dan subjek kanker payudara perbesaran 3 kali

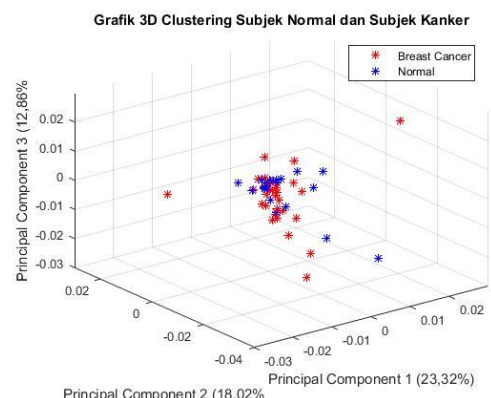
Representasi grafis *clustering* 2 dimensi yang diperbesar menunjukkan data tersebar acak tanpa ada zona batas yang jelas atau membentuk kelompok berbeda antara subjek kanker payudara dan subjek normal. Analisis PCA dengan representasi grafik 2 dimensi tidak dapat memberikan perbedaan yang jelas antara kelompok subjek normal dan subjek kanker payudara. Hal ini didukung besar persentase variansi data PC₁ yaitu 23,32% dan PC₂ 18,02% yang secara kumulatif diperoleh 41,34%.

Hasil analisis PCA representasi grafis 2 dimensi menggambarkan variansi data sebesar 41,34% dari data keseluruhan. Untuk melihat sebaran data lebih luas kemudian dilakukan representasi grafis 3 dimensi dengan menggunakan 3 PC pertama yaitu PC₁, PC₂, dan PC₃.



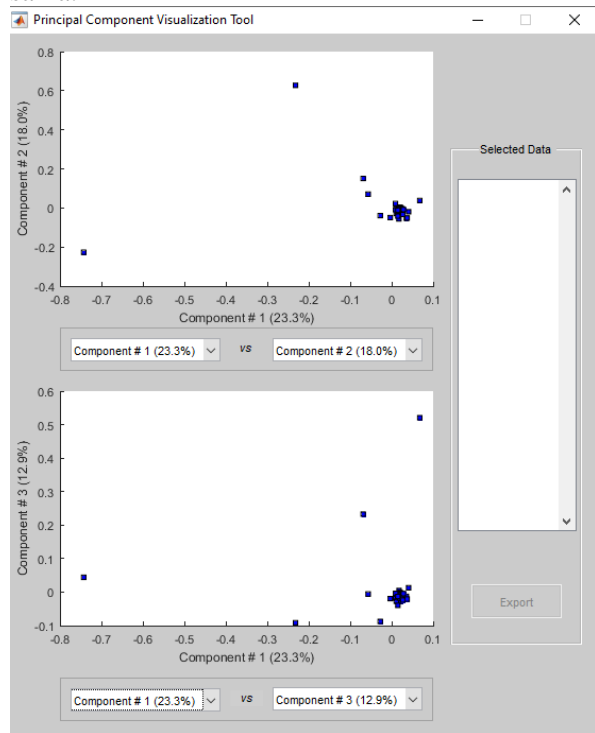
Gambar 17 Representasi grafis *clustering* 3 dimensi subjek normal dan subjek kanker payudara

Hasil analisis PCA perubahan nilai absorbansi dalam representasi grafik 3 dimensi juga terlihat sebaran data subjek kanker payudara dan subjek normal saling bertumpang tindih tidak membentuk kelompok yang berbeda. Zona tumpang tindih kemudian diperbesar tiga kalinya untuk melihat lebih jelas letak sebaran data.



Gambar 18 Representasi grafis *clustering* 2 dimensi subjek normal dan subjek kanker payudara perbesaran 3 kali

Perbesaran tiga kali pada gambar 34 terlihat jelas bahwa letak sebaran data tidak dapat mengelompokkan subjek normal dan subjek kanker payudara. Tidak terpisahkannya kelompok subjek normal dan subjek kanker payudara ditandai pula dengan persentase variansi ketiga PC yang cukup rendah. Persentase variansi PC₁ yaitu 23,32% dan PC₂ 18,02%, dan PC₃ sebesar 12,86% yang secara kumulatif berjumlah 54,2% dari keseluruhan data perubahan nilai absorbansi. Hasil grafik *clustering* dan persentase variansi divalidasi menggunakan *tool* bawaan dari *software* Matlab R2015b yaitu *Principal Component Visualization Tool*. *Tool* tersebut menghasilkan grafik dengan posisi titik data menyerupai grafik 2 dimensi hasil pengolahan data (ditunjukkan grafik atas) serta menghasilkan persen variansi PC₁, PC₂, dan PC₃ yang bernilai sama.



Gambar 19 *Principal Component Visualization Tool*

Rendahnya nilai persentase variansi Δ Abs menunjukkan selisih nilai absorbansi antara subjek normal dan subjek kanker payudara tidak memiliki perbedaan yang mencolok. Hal ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya banyak nilai Δ Abs bernilai 0 dengan persentase sebesar 46,47% dari data Δ Abs subjek kanker payudara dan subjek normal. Redundansi data Δ Abs bernilai 0 dapat mengarah pada anomali data yang dapat mengurangi efektivitas data. Nilai Δ Abs bernilai 0 yang terlalu banyak dimungkinkan membuat perbedaan nilai Δ Abs

subjek kanker payudara dan subjek normal menjadi bias. Nilai tersebut dapat dikategorikan sebagai *missing value* kumpulan data yang perlu ditangani lebih lanjut untuk memperoleh data Δ Abs yang bersih sebelum diolah menggunakan PCA. Faktor lain yaitu jika dilihat dari hasil tes darah rutin diketahui subjek NBC29 memiliki kadar eritrosit yang jauh lebih tinggi dari pada kisaran normal dan subjek NBC1 memiliki kadar eritrosit di bawah kisaran normal. Kemudian jika dilihat dari faktor usia subjek penelitian terdapat 4 subjek penelitian berusia di atas 65 tahun, yaitu BC11, BC20, BC35, dan BC38. Usia di atas 65 tahun menurut kategori usia Kemenkes RI tidak termasuk kategori dewasa melainkan kategori manula sehingga komposisi darah-EDTA dapat berbeda. Idealnya subjek NBC1, NBC29, BC11, BC20, BC35, dan BC38 tidak diikuti sertakan dalam analisis PCA agar *noise* data Δ Abs berkurang.

Faktor lain yang dapat menjadi penyebab tidak terbedakannya pola absorbansi subjek kanker payudara dan subjek normal karena karakteristik dasar dari sistem eritrosit yang merupakan sistem hidup. Sistem hidup eritrosit sebagai media terdispersi dalam darah memiliki perilaku fisis yang rumit, bergerak secara acak dan sangat cepat (Aryati, 2019). Pergerakan eritrosit selama proses perekaman absorbansi berkontribusi pada naik turunnya nilai absorbansi bergantung luas permukaan sumasi eritrosit yang tersinari pada zona penyinaran. Kumpulan eritrosit yang bergerak terlalu cepat dan tidak terarah tidak dapat direkam secara detail perbedaannya oleh spektrofotometer UV-Vis sehingga perbedaan nilai absorbansi pada waktu ke-t dan ke-t+7 dan seterusnya tidak terlihat secara signifikan. Hal ini menyebabkan selisih nilai absorbansi bernilai nol cukup banyak dan tidak memberikan perbedaan berarti antara subjek kanker payudara dan subjek normal ditinjau dari selisih nilai absorbansinya.

SIMPULAN

Metode *Principal Component Analysis* tidak dapat menggambarkan perbedaan interaksi eritrosit antara subjek kanker payudara dan subjek normal dengan hasil grafik *clustering* 2D dan 3D masih tumpang tindih antara kedua kelompok serta persentase variansi kumulatif grafik 2D sebesar 41,3% sementara persentase kumulatif grafik 3D sebesar 54,2%. Agregasi eritrosit terjadi karena terganggunya keseimbangan sebaran ion pada lapisan ganda listrik eritrosit yang menyebabkan nilai potensial zeta menurun sehingga gaya tolak menolak antar eritrosit

melemah, akibatnya eritrosit saling tarik menarik satu sama lain beragregasi membentuk formasi rouleaux. Saran untuk penelitian lanjutan perlu dilakukan studi mengenai kriteria subjek penelitian yang lebih ketat, analisis *pre-processing* data, serta penggunaan selang waktu pengukuran absorbansi darah-EDTA yang lebih lama untuk mengurangi nilai absorbansi bernilai nol. Jika dimungkinkan dapat dilakukan studi mengenai metode *clustering* lain yang dinilai lebih cocok dengan jenis data Δ Abs.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat diselesaikan tidak lepas dari bantuan dan kerjasama dengan pihak lain. Berkenaan dengan hal tersebut, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Dr. Rida Siti Nur'aini Mahmudah, M.Si., selaku penguji utama, Dr. Kuncoro Asih Nugroho, M.Pd., M.Sc., dan Dr. Ngadikun, M.Biomed., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan arahan serta semua pihak yang berperan aktif bekerjasama dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aryati, D. (2019). *Pola Absorbansi Eritrosit Dalam Darah-Edta Penderita Leukemia Limfoblastik Akut (Lla) Melalui Kajian Spektroskopi Uv-Vis*. Universitas Gadjah Mada.
- Duffy, M. J., & Mcging, P. (2010). Guidelines for the use of tumour markers 4th edition. *Scientific Committee of the ACBI*.
- Fernandes, H. P., Cesar, C. L., & Barjas-Castro, M. de L. (2011). Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 33(4), 297–301. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110080>
- Fuda Cancer Hospital. (2019). Hubungan Tumor Marker Dan Tumor - RS Kanker FUDA. Retrieved June 30, 2019, from <https://www.fudaindonesia.com/news/baca/153/2019/05/16/hubungan-tumor-marker-dan-tumor>
- Glaser, R. (2012). *Biophysics : An Introduction* (2nd ed.). Berlin: Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25212-9>
- IARC. (2018). *Latest global cancer data : Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018*. Retrieved from <http://gco.iarc.fr>.
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: A review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Kementerian Kesehatan RI. (2015). Situasi Penyakit Kanker. *Buletin Jendela Data Dan Informasi Kesehatan*, 2–10.
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran : Kanker Payudara, (Juli), 124.
- Manuaba, T. W. (2010). *Panduan Penatalaksanaan Kanker Solid Peraboi 2010*. Jakarta: CV Sagung Seto.
- Nugroho, K. A., Abraha, K., & Ngadikun. (2017). The mechanism of erythrocytes aggregation in EDTA-blood of ovarian cancer patients viewed by Coulomb's law. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 7(6), 2175–2182. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.7.6.3159>
- Rathore, S., & Ali, B. (2014). Effect of Laser Radiation on Superconductivity. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3, 286–290.
- Shlens, J. (2005). A Tutorial on Principal Component Analysis. *Measurement*, 1–13. Retrieved from <papers3://publication/uuid/4D1DBE59-7625-4528-BAB6-E076486F0C77>
- Smith, L. I. (2002). A tutorial on Principal Components Analysis, (1), 511–516. [https://doi.org/10.1016/s1474-6670\(17\)38783-9](https://doi.org/10.1016/s1474-6670(17)38783-9)
- The McGill Physiology Virtual Lab. (2012). Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR). Retrieved February 10, 2019, from <http://www.medicine.mcgill.ca/physio/vlab/bloodlab/esr.htm>
- Wayan Rediatning S., S. O. (2000). IMMUNORADIOMETRICASSA Y (IRMA) DALAM DETEKSI DAN PEMANTAUAN KANKER Pusat Pengembangan Radioisotop dan Radiofarmaka. *Jurnal Radioisotop Dan Radiofarmaka*, 3(deteksi dan pemantauan kanker), 1–70. <https://doi.org/10.1007/s00101-009-1575-3>