

**PENGARUH VARIASI LAMA WAKTU INKUBASI TERHADAP
KADAR KOLESTEROL TOTAL SERUM METODE *Cholesterol
Oxidase – Para aminoantypirin (CHOD-PAP)***

*Effect Of Incubation Period On Measurement Of Total Cholesterol Serum
Cholesterol Oxidase - Para aminoantypirin (CHOD-PAP) Methods*

Yuli Anipah^{1*}, Nani Kurnaeni², Dewi Nurhayati³, Ani Riyani⁴

^{1*,2,3,4} Poltekkes Kemenkes Bandung, Prodi Teknologi Laboratorium Medis

Email: yulianipah15@gmail.com

ABSTRACT

Total cholesterol serum measurement is one part of lipid profile examination which must pay attention to the incubation period so that the examination results obtained are accurate and valid. However, in some cases incubation is not given much attention, because of the many requests for examinations. This study aims to determine the effect of incubation times of 10, 30, 60, 90, 120, and 150 minutes on total cholesterol serum measurement. This research is a laboratory experimental research with a total sample of 4 students majoring in Medical Laboratory Technology Poltekkes Kemenkes Bandung. The research design used was quasi-experimental by providing different treatment lengths of incubation period on total cholesterol serum measurement. The data analysis used is the General Linear Model (GLM) Test and the F Test. The average results of total cholesterol serum decreased as the incubation period increased. The General Linear Model (GLM) test shows the Sig. value of 30 minutes and 60 minutes incubation period is 0,561 and 0,091 where the Sig value. > 0,05, which means there is no statistical significant difference in total serum cholesterol levels during 30 and 60 minute incubation with total serum cholesterol levels during 10 minute incubation. Sig. value of incubation time 90, 120, and 150 is 0,000 where the Sig value. <0,05, which means that the total serum cholesterol level at 90, 120 and 150 minutes incubation is statistically significant different from the total serum cholesterol level at 10 minutes incubation. The F test shows the value of Sig. 0.000 where the value of Sig. < 0.05, which means that the incubation time has an effect on serum total cholesterol levels. There is an effect of decreasing serum total cholesterol levels with increasing incubation time.

Keywords : *Total cholesterol, serum, incubation period*

ABSTRAK

Pemeriksaan kadar kolesterol total serum merupakan bagian dari pemeriksaan profil lipid yang harus memperhatikan waktu inkubasi agar hasil pemeriksaan yang didapatkan merupakan hasil yang akurat dan valid. Namun, dalam beberapa kasus waktu inkubasi tidak terlalu diperhatikan disebabkan banyaknya permintaan pemeriksaan. Tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi 10, 30, 60, 90, 120, dan 150 menit terhadap kadar kolesterol total serum. Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium dengan jumlah sampel 4 orang Mahasiswa Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung. Desain penelitian yang digunakan yaitu *quasy experimental* dengan memberikan perbedaan perlakuan lama waktu inkubasi pada pemeriksaan kadar kolesterol total serum. Analisis data yang digunakan yaitu Uji *General Linear Model* (GLM) dan Uji F. Hasil rata-rata kadar kolesterol total serum mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu inkubasi. Uji GLM menunjukkan nilai Sig. waktu inkubasi 30 menit dan 60 menit yaitu 0,561 dan 0,091 dimana nilai Sig. > 0,05 yang artinya kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 30 dan 60 menit secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 10 menit. Nilai Sig. waktu inkubasi 90, 120, dan 150 yaitu 0,000 dimana nilai Sig. < 0,05 yang artinya kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 90, 120 dan 150 menit secara statistik terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 10 menit. Uji F menunjukkan nilai Sig. 0,000 dimana nilai Sig. < 0,05 yang artinya waktu inkubasi memiliki pengaruh terhadap kadar kolesterol total serum. Terdapat pengaruh penurunan kadar kolesterol total serum seiring bertambahnya waktu inkubasi.

Kata kunci: Kolesterol total, serum, waktu inkubasi

PENDAHULUAN

Kolesterol total merupakan jumlah keseluruhan kandungan kolesterol dalam darah¹. Sekitar 70% kolesterol dalam darah merupakan hasil sintesis di dalam hati. Kolesterol berfungsi dalam sintesis hormon steroid, dan sintesis asam empedu². Rumus molekul kolesterol yaitu $C_{27}H_{40}OH$ yang memiliki struktur dasar berupa inti sterol³. Metabolisme kolesterol terjadi ketika kolesterol yang berasal dari makanan digabungkan dengan kolesterol yang disimpan di hati sebagai kolesterol ester. Kolesterol ester bergabung dengan trigliserida membentuk kolesterol bersama dengan trigliserida membentuk Very Low Density Lipoprotein (VLDL) kemudian masuk ke dalam plasma.

Trigliserida dalam VLDL plasma dilepaskan oleh enzim lipoprotein lipase sehingga mengubah trigliserida menjadi asam lemak bebas. Oleh karena itu, VLDL yang kekurangan trigliserida berikatan dengan reseptor Low Density Lipoprotein (LDL) dan menyebabkan tingkat ekspresi LDL meningkat pada sel dengan kolesterol rendah dan menurun pada sel dengan kolesterol tinggi⁴.

Pemeriksaan kadar kolesterol total serum merupakan bagian pemeriksaan profil lipid yang banyak dilakukan di laboratorium klinik⁵. Namun dalam praktiknya di Rumah Sakit dan Puskesmas terkadang pembacaan kadar kolesterol total melewati waktu inkubasi yang seharusnya. Hal tersebut dapat disebabkan karena banyaknya jumlah

pemeriksaan, terjadi kendala pada alat, dan keterbatasan tenaga kesehatan⁶.

Berdasarkan kit insert Biolabo waktu inkubasi pada suhu ruang yaitu 10 menit dan reaksi warna stabil selama 60 menit⁷. Berdasarkan kit insert Cromatest waktu inkubasi pada suhu ruang yaitu selama 10 menit dan reaksi warna stabil selama 30 menit⁸. Berdasarkan kit insert Accurex waktu inkubasi pada suhu ruang yaitu selama 10 menit dan reaksi warna stabil selama 120 menit⁹.

Prinsip pemeriksaan kolesterol total serum menggunakan metode *Cholesterol Oxidase – Para aminoantypirin* (CHOD-PAP) yaitu kolesterol ester dipecah menjadi kolesterol dan asam lemak bebas oleh enzim kolesterol esterase. Kolesterol yang terbentuk kemudian diubah menjadi kolesten-4-one-3 dan hidrogen peroksida oleh enzim kolesterol oksidase. Hidrogen peroksida yang dibentuk oleh kolesterol peroksidase dengan dengan fenol dan 4-aminoantypirin membentuk *quinoneimine* berwarna merah muda¹⁰.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh variasi lama waktu inkubasi selama 10, 30, 60, 90, 120, dan 150 menit terhadap kadar kolesterol total serum.

METODE

Metode yang digunakan adalah kauntitatif dan jenisnya yaitu eksperimen laboratorium dengan menggunakan desain penelitian *quasy experimental* dimana peneliti tidak mampu mengontrol variabel yang tidak diteliti. Adapaun desain penelitian yang dilakukan adalah memberikan perbedaan perlakuan lama waktu inkubasi Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2023 di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium

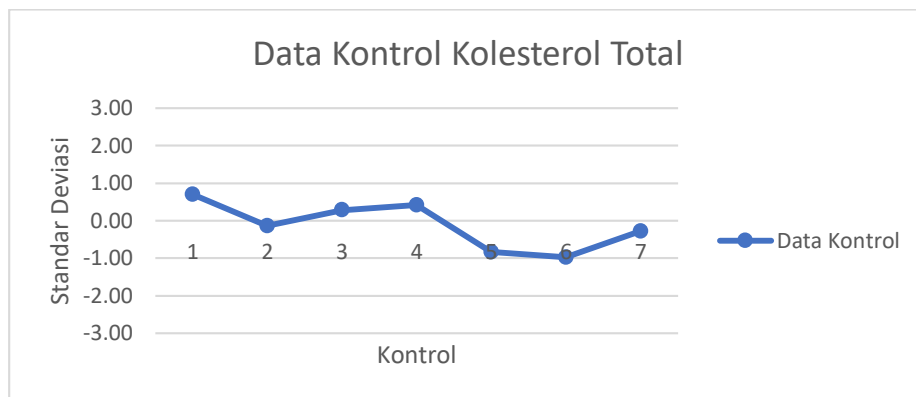
Medis (TLM) Poltekkes Kemenkes Bandung.

Populasi pada penelitian ini adalah Mahasiswa Jurusan TLM Poltekkes Kemenkes Bandung. Sampel sebanyak 4 orang Mahasiswa Jurusan TLM Potekkes Kemenkes Bandung. Data penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh dari hasil pemeriksaan kadar kolesterol total serum Mahasiswa TLM Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah mendapatkan perlakuan berbeda pada lama waktu inkubasi. Data kemudian dianalisis menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 24 dengan menggunakan uji *General Linear Model* (GLM) dan uji F (Simultan).

HASIL

Terdapat dua kelompok waktu inkubasi, yaitu kelompok kontrol dan kelompok percobaan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan dimana waktu inkubasinya yaitu 10 menit sesuai prosedur Kit Insert Biolabo, sedangkan kelompok percobaan adalah kelompok yang diberi perlakuan penambahan waktu inkubasi. Pemeriksaan dilakukan menggunakan metode CHOD-PAP dan hasil dibaca dengan alat fotometer Microlab 300.

Pemeriksaan kontrol serum dilakukan sebelum pemeriksaan kadar kolesterol total serum. Kontrol serum yang digunakan adalah Extrol-N produk Biolabo (No LOT 062138A) dengan range kontrol 124 - 167 mg/dL, true value 145 mg/dL dan nilai 1SD yaitu 7,16 mg/dL. Range kontrol serum yang diperkenankan untuk penelitian adalah $\pm 1SD$ dengan nilai 137,84 – 152,16 mg/dL. Grafik kontrol serum untuk kolesterol total dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Distribusi Data Kontrol

Gambar 1. menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan kontrol serum untuk kolesterol total yang dibaca menggunakan fotometer Microlab 300 masuk dalam range $\pm 1SD$. Setelah kontrol serum memenuhi persyaratan, dilanjutkan dengan pemeriksaan

kadar kolesterol total serum metode CHOD-PAP dengan variasi waktu inkubasi yang kemudian dibaca pada alat fotometer Microlab 300.

Tabel 1. Rerata Pemeriksaan Kadar Kolesterol Total Serum (mg/dL)

Sampel	Waktu Inkubasi (menit)					
	10	30	60	90	120	150
A	197,25	196,75	186,75	180,75	156	138,35
B	194,5	173,5	168,5	160,75	158,35	156,75
C	184,5	179,75	170	156,5	153,25	148,5
D	157,25	149,75	148,25	139,25	136,5	126,25
Rata-rata	183,375	174,938	168,375	159,313	148,5	142,438

Tabel 1. menunjukkan rerata kadar kolesterol total serum nilainya semakin menurun seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi.

Analisis data dilanjutkan dengan Uji *General Linear Model* (GLM) dan Uji F.

Tabel 2. Uji *General Linear Model* (GLM)

Kelompok Data	Sig.
Waktu Inkubasi 30 menit vs 10 menit	0,561
Waktu Inkubasi 60 menit vs 10 menit	0,092
Waktu Inkubasi 90 menit vs 10 menit	0,000
Waktu Inkubasi 120 menit vs 10 menit	0,000

Waktu Inkubasi 150 menit vs 10 menit	0,000
--------------------------------------	-------

Tabel 2. menunjukkan bahwa nilai Sig. pada waktu inkubasi 30 menit vs 10 menit yaitu 0,561 dimana nilai Sig. > 0,05 yang artinya tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 30 menit dengan 10 menit. Nilai Sig. pada waktu inkubasi 60 menit vs 10 menit yaitu 0,092 dimana nilai Sig. > 0,05 yang artinya tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 60 menit dengan 10 menit.

Pada Tabel 2. dapat dilihat juga bahwa nilai Sig. pada waktu inkubasi 90, 120, dan 150 vs 10 menit yaitu 0,000 dimana nilai Sig. < 0,05 yang artinya terdapat perbedaan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 90 dengan 10 menit, 120 dengan 10 menit, dan 150 dengan 10 menit.

Tabel 3. Uji F

Waktu Inkubasi (menit)	Sig.
10, 30, 60, 90, 120, dan 150	0,000

Tabel 3. menunjukkan bahwa nilai Sig. pada hasil Uji F yaitu 0,000 dimana nilai Sig. < 0,05 yang artinya waktu inkubasi memiliki pengaruh terhadap kadar kolesterol total serum. Untuk melihat korelasi dan arah

hubungan antara waktu inkubasi dengan kadar kolesterol total serum dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Korelasi Waktu Inkubasi dengan Kadar Kolesterol Total Serum

Koefisien Korelasi	Sig.
-0,597	0,000

Tabel 4. menunjukkan dapat dilihat bahwa nilai Sig. 0,000 dimana nilai Sig. < 0,05 yang artinya terdapat korelasi antara waktu inkubasi dengan kadar kolesterol total serum. Koefisien korelasi -0,597, tanda negatif (-) berarti bahwa kadar kolesterol total serum akan semakin menurun seiring dengan lamanya waktu inkubasi dan waktu inkubasi memiliki pengaruh yang kuat terhadap kadar kolesterol total serum. Untuk mengetahui besarnya pengaruh waktu inkubasi terhadap kadar

kolesterol total serum dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$\begin{aligned} &\text{Persentase pengaruh} \\ &= R^2 \times 100\% \\ &= (-0,597)^2 \times 100\% \\ &= 0,357 \times 100 \\ &= 35,7\% \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut dapat diketahui bahwa sebanyak 35,7% kadar kolesterol total serum

dipengaruhi oleh kenaikan waktu inkubasi. Untuk mengetahui persentase penurunan secara klinis pada masing-masing waktu inkubasi dapat dilakukan perhitungan dengan menghitung selisih dari rata-rata hasil pemeriksaan kadar kolesterol total serum. Total Error Allowable (TEa) untuk pemeriksaan kadar kolesterol total serum berdasarkan Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) yaitu $\pm 10\%$. Persentase penurunan kadar kolesterol total serum secara klinis pada waktu inkubasi 30, 60, 90, 120, dan 150 menit berturut-turut yaitu sebesar 4%, 8%, 13%, 19%, dan 22%.

Berdasarkan persentase penurunan kadar kolesterol total serum dapat diketahui bahwa jika dibandingkan dengan TEa $\pm 10\%$ waktu inkubasi 30 dan 60 menit secara klinis tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol total serum, sedangkan waktu inkubasi 90, 120, dan 150 menit secara klinis berpengaruh terhadap kadar kolesterol total serum.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini rata-rata hasil pemeriksaan kadar kolesterol total serum mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu inkubasi. Penurunan kadar kolesterol total serum disebabkan karena ketidakstabilan dari warna *quinoneimine*. Terjadinya ketidakstabilan *quinoneimine* dapat menyebabkan memudarnya warna larutan yang dapat disebabkan karena terjadinya oksidasi oleh udara, pengaruh keasaman, dan suhu¹¹. Dalam reaksi enzimatik kolesterol, terdapat hidrogen peroksida bersama dengan fenol dan 4-aminoantipirin yang membentuk *quinoneimine* berwarna merah muda¹². Hidrogen peroksida mempunyai sifat dapat

memberikan suasana asam pada reaksi. Dengan adanya keasaman tersebut dapat menjadi salah satu penyebab dari ketidakstabilan warna *quinoneimine* karena ketika larutan asam dibiarkan terlalu lama akan menyebabkan terjadinya oksidasi oleh udara sehingga warna *quinoneimine* akan semakin memudar dimana ketika dilakukan pengukuran dengan fotometer absorbansi sampel akan menurun sehingga kadar kolesterol total serum menjadi turun.

Kadar kolesterol total serum yang mengalami penurunan dalam penelitian ini juga dapat disebabkan oleh aktivitas enzim dalam reaksi enzimatik kolesterol yang semakin menurun. Besarnya aktivitas enzim berbanding terbalik dengan kenaikan waktu inkubasi. Aktivitas enzim akan semakin rendah pada waktu inkubasi yang lebih lama¹³. Pada reaksi enzimatik kolesterol pembentukan *quinoneimine* dibantu oleh enzim peroksidase yang mengkatalisis reaksi. Dengan demikian ketika nilai aktivitas enzim menurun maka pembentukan *quinoneimine* juga menurun, sehingga kadar kolesterol total serum juga akan menurun.

Uji *General Linear Model* (GLM) menunjukkan bahwa kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 30 dan 60 menit tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 10 menit sedangkan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 90, 120, dan 150 menit terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 10 menit. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi untuk pemeriksaan kadar kolesterol total serum dapat dilakukan sampai 60 menit karena reaksi warna *quinoneimine* stabil sampai 60 menit.

Stabilitas warna *quinoneimine* pada penelitian ini juga sesuai dengan Kit Inset Biolabo yang menyatakan bahwa kompleks warna merah muda stabil sampai 60 menit sehingga hipotesis diterima. Kit Inset Biolabo dibandingkan dengan Kit Inset Accurex yang memiliki stabilitas warna sampai 120 menit memiliki perbedaan pada konsentrasi senyawa yang terkandung dalam reagen pemeriksaan. Perbedaan tersebut terdapat pada konsentrasi 4-aminoantipirin dan fenol pada Kit Inset Accurex lebih besar dibandingkan dengan Kit Inset Biolabo. Konsentrasi fenol dan 4-aminoantipirin yang semakin besar dalam reagen akan menjaga stabilitas warna *quinoneimine* yang terbentuk namun tidak merubah reaksi pembentukan warna *quinoneimine*. Dalam reaksi rantai, hidrogen peroksida cepat bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan fenol dengan adanya peroksidase dan akan menghasilkan *quinoneimine* yang berwarna merah muda. Terdapat hubungan linear antara jumlah peroksida dalam larutan dengan intensitas warna yang terbentuk, dimana semakin besar jumlah peroksida maka semakin pekat warna *quinoneimine* yang terbentuk¹⁴.

Uji F menunjukkan bahwa waktu inkubasi memiliki pengaruh yang kuat terhadap kadar kolesterol total serum dimana kadar kolesterol total serum akan semakin menurun seiring dengan lamanya waktu inkubasi. Dengan demikian terdapat pengaruh penurunan kadar kolesterol total serum seiring kenaikan waktu inkubasi sehingga hipotesis diterima. Waktu inkubasi 30 dan 60 menit secara klinis tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol total serum, sedangkan waktu inkubasi 90, 120, dan 150 menit secara klinis berpengaruh terhadap kadar kolesterol total serum.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 30 menit dengan 10 menit dan 60 menit dengan 10 menit sedangkan terdapat perbedaan yang signifikan kadar kolesterol total serum waktu inkubasi 90, 120, dan 150 menit dengan 10 menit. Pada penelitian ini, kadar kolesterol total serum mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu inkubasi.

DAFTAR RUJUKAN

1. Prastiwi DA, Putu Swastini IGAA, Sudarmanto IG. Gambaran Kadar Kolesterol Total Pada Lansia Di Puskesmas I Denpasar Selatan. *Moditory*. 2021;9:68-77.
2. Naim MR, Sulatri S, Hadi S. Gambaran Hasil Pemeriksaan Kadar Kolesterol Pada Penderita Hipertensi di RSUD Syekh Yusuf Kabupaten Gowa. *Jurnal Media Laboran*. 2019;9.
3. Ferrier DR. *Biokimia Ulasan Bergambar*. 7th ed. Buku Kedokteran; 2020.
4. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. *Biokimia Harper*. 31st ed. Penerbit Buku Kedokteran; 2020.
5. Amelda A, Asrori, Karneli. Hasil Pemeriksaan Kolesterol Total Pada Serum Segera Diperiksa Dan Ditunda 7 Hari Pada Suhu 2-8°C. *Jurnal Analis Kesehatan Klinikal Sains*. 2020;8.
6. Purbayanti D. Pengaruh Waktu dan Penyimpanan Serum Untuk

- Pemeriksaan Kolesterol Total. *Jurnal Surya Medika*. 2015;1.
7. Biolabo. *Kit Insert Pemeriksaan Kolesterol Metode CHOD-PAP*; 2022.
 8. Cromatest. *Kit Insert Pemeriksaan Kolesterol Metode CHOD-PAP*; 2022.
 9. Accurex. *Kit Insert Pemeriksaan Kolesterol Metode CHOD-PAP*; 2019.
 10. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnostic And Management By Laboratory Methods*. Elsevier; 2022.
 11. Yudoyono B. *Spektrofotometri*. 1st ed.; 2017.
 12. Nurisani A, Mamay, Sugiah, Ziyani M. Gambaran Kadar Kolesterol Total Berdasarkan Karakteristik Perokok Pada Perokok Aktif Usia Remaja Di Kecamatan Ciwalu Kabupaten Garut. *Student Scientific Creativity Journal*. 2023;1.
 13. Adam, Shavotri M. Pengaruh Waktu dan pH Inkubasi Terhadap Aktivitas Enzim Keratinase dari Isolat *Bacillus SLII-I*. Published online 2021.
 14. Sumardjo D, Wuryanti. Penanganan Limbah Fenol dengan Peroksidase Hasil Isolasi dari Lobak (Horseradish). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 1998;1:11-14.