

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Gambaran Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dengan judul “Linearitas, *Limit Of Detection* (LoD) dan *Limit Of Quantitation* (LoQ) untuk Validasi Metode GOD-PAP (*Glucose Oxidase - Peroxidase Aminoantipirin*) dengan Penggunaan Seperempat Volume Reagen dan Sampel” ini telah dilakukan dalam 2 waktu yang berbeda, yaitu pada 21 Maret 2025 dan 10 April 2025 di Laboratorium Kimia Klinik Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Sampel didapatkan dengan mengambil darah satu orang partisipan dengan riwayat kadar glukosa darah >250 mg/dL. Darah diambil dengan melakukan flebotomi, yang dilakukan oleh tenaga profesional laboratorium. Darah yang diambil kemudian dibuat menjadi serum dan dijadikan sebagai larutan induk pengenceran.

Penelitian dimulai dengan melakukan uji validitas pada alat dan reagen dengan menggunakan satu kali pengujian serum kontrol untuk memastikan validitas hasil penelitian. Absorban diukur dengan menggunakan Fotometer Mindray BA-88 dengan panjang gelombang 546 nm sesuai dengan prosedur dalam kit reagen.

2. Uji Linearitas

Uji linearitas dilakukan untuk menilai apakah metode GOD-PAP (*Glucose Oxidase - Peroxidase Aminoantipirin*) dengan seperempat volume reagen dan sampel masih mampu menghasilkan hubungan linier antara konsentrasi glukosa dengan respon instrumen (nilai absorban). Pengujian dilakukan pada lima tingkat konsentrasi (0%, 25%, 50%, 75%, 100%) dengan masing-masing konsentrasi diuji sebanyak tiga kali pengulangan. Tingkat konsentrasi dibuat dengan mengencerkan larutan induk yang berasal dari serum partisipan. Serum dilakukan pengenceran hingga mencapai konsentrasi yang dibutuhkan.

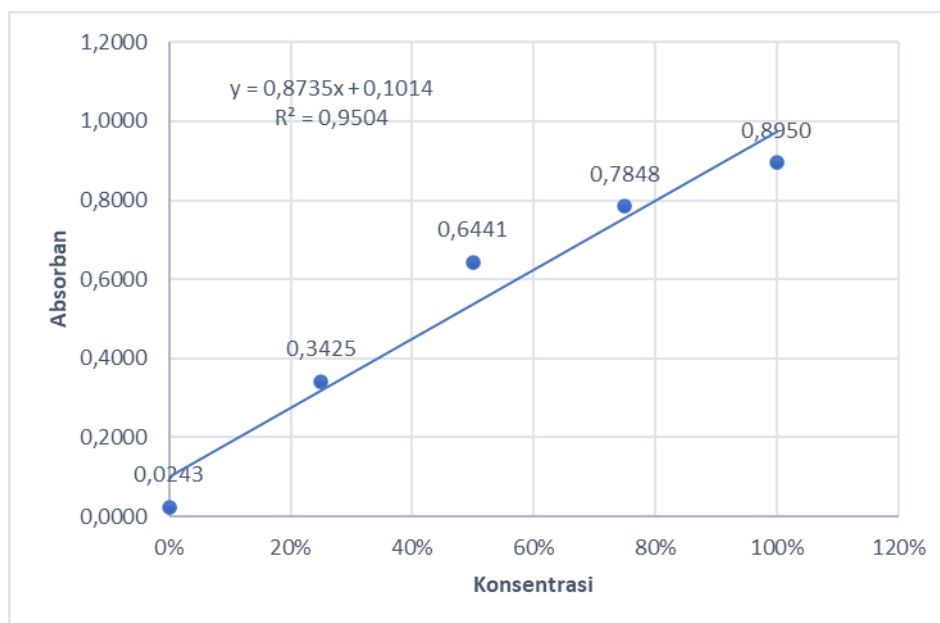
Uji linearitas dilakukan dalam 2 waktu yang berbeda yaitu pada 21 Maret 2025 dan 10 April 2025. Dalam satu waktu dilakukan sebanyak 3 kali uji linearitas dengan membuat pengenceran konsentrasi sebanyak 3 kali. Data hasil uji linearitas pada tanggal 21 Maret 2025 disajikan sebagai berikut.

Tabel 5. Data Uji Linearitas ke-1 pada 21 Maret 2025

Konsentrasi	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Mean Absorban
0%	0,0488	0,0109	0,0131	0,0243
25%	0,3392	0,3239	0,3644	0,3425
50%	0,6834	0,6547	0,5943	0,6441
75%	0,7128	0,6630	0,9785	0,7848
100%	1,1478	1,0474	0,4898	0,8950

Tabel 5. Menunjukkan bahwa rata-rata absorban dalam 3 replikasi uji pada konsentrasi 0% sebesar 0,0242, konsentrasi 25% sebesar 0,3425, konsentrasi 50% sebesar 0,6441, konsentrasi 75% sebesar 0,7848 dan konsentrasi 100% sebesar 0,8950.

Data yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan Microsoft Excel. Hasil uji linearitas ke-1 disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva Kalibrasi Uji Linearitas ke-1 pada 21 Maret 2025

Menampilkan grafik kurva kalibrasi berdasarkan uji linearitas ke-1. Grafik kurva kalibrasi tersebut menghasilkan R^2 sebesar 0,9504, nilai ini berada di bawah syarat linearitas yang diterima. Syarat linearitas yang diterima yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

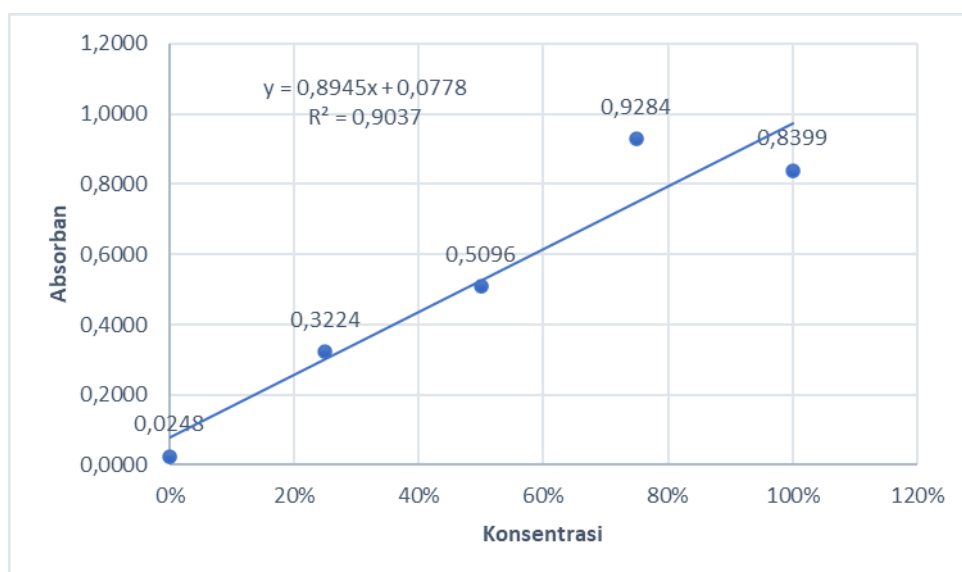
Tabel 6. Data Uji Linearitas ke-2 pada 21 Maret 2025

Konsentrasi	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Mean Absorban
0%	0,0631	0,0067	0,0046	0,0248
25%	0,3021	0,3300	0,3350	0,3224
50%	0,6117	0,5300	0,3871	0,5096
75%	0,9270	0,9638	0,8943	0,9284
100%	0,8210	0,8637	0,8349	0,8399

Tabel 6. Menunjukkan bahwa rata-rata absorban dalam 3 replikasi uji pada konsentrasi 0% sebesar 0,0248, konsentrasi 25%

sebesar 0,3224, konsentrasi 50% sebesar 0,5096, konsentrasi 75% sebesar 0,9284 dan konsentrasi 100% sebesar 0,8399.

Data yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan Microsoft Excel. Hasil uji linearitas ke-2 disajikan pada Gambar 6



Gambar 6. Kurva Kalibrasi Uji Linearitas ke-2 pada 21 Maret 2025

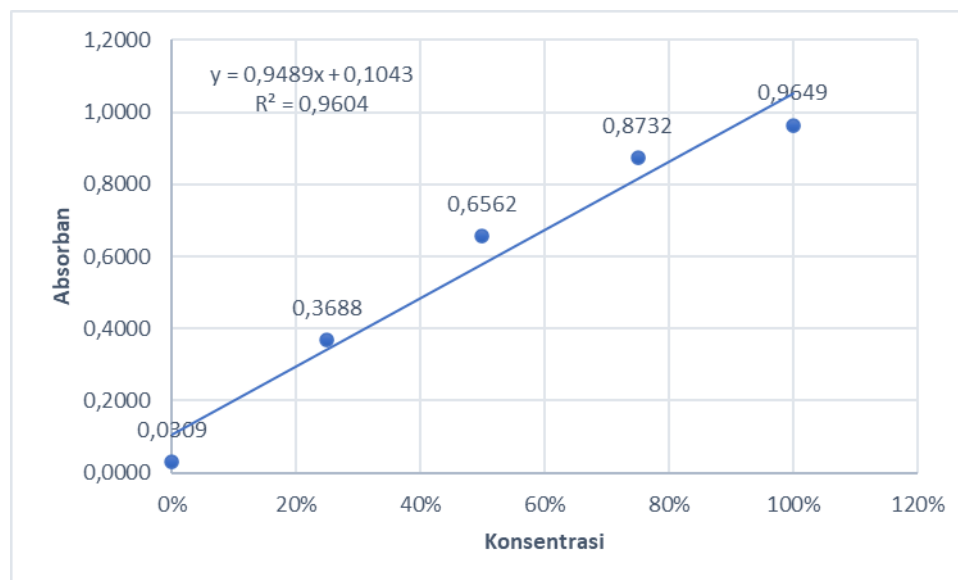
Menampilkan grafik kurva kalibrasi berdasarkan uji linearitas ke-2. Grafik kurva kalibrasi tersebut menghasilkan R^2 sebesar 0,9037, nilai ini berada di bawah syarat linearitas yang diterima. Syarat linearitas yang diterima yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

Tabel 7. Data Uji Linearitas ke-3 pada 21 Maret 2025

Konsentrasi	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Mean Absorban
0%	0,0678	0,0122	0,0126	0,0309
25%	0,3511	0,3659	0,3894	0,3688
50%	0,6377	0,6707	0,6601	0,6562
75%	0,8656	0,9129	0,8410	0,8732
100%	0,8818	1,1130	0,8998	0,9649

Tabel 7. Menunjukkan bahwa rata-rata absorban dalam 3 replikasi uji pada konsentrasi 0% sebesar 0,0309, konsentrasi 25% sebesar 0,3688, konsentrasi 50% sebesar 0,6562, konsentrasi 75% sebesar 0,8732 dan konsentrasi 100% sebesar 0,9649.

Data yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan Microsoft Excel. Hasil uji linearitas ke-3 disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva Kalibrasi Uji Linearitas ke-3 pada 21 Maret 2025

Menampilkan grafik kurva kalibrasi berdasarkan uji linearitas ke-3. Grafik kurva kalibrasi tersebut menghasilkan R^2 sebesar 0,9604, nilai

ini berada di bawah syarat linearitas yang diterima. Syarat linearitas yang diterima yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

Berdasarkan ketiga kurva kalibrasi yang diperoleh pada tanggal 21 Maret 2025, nilai R^2 yang diperoleh $< 0,997$, sehingga tidak memenuhi syarat linearitas yang diterima.

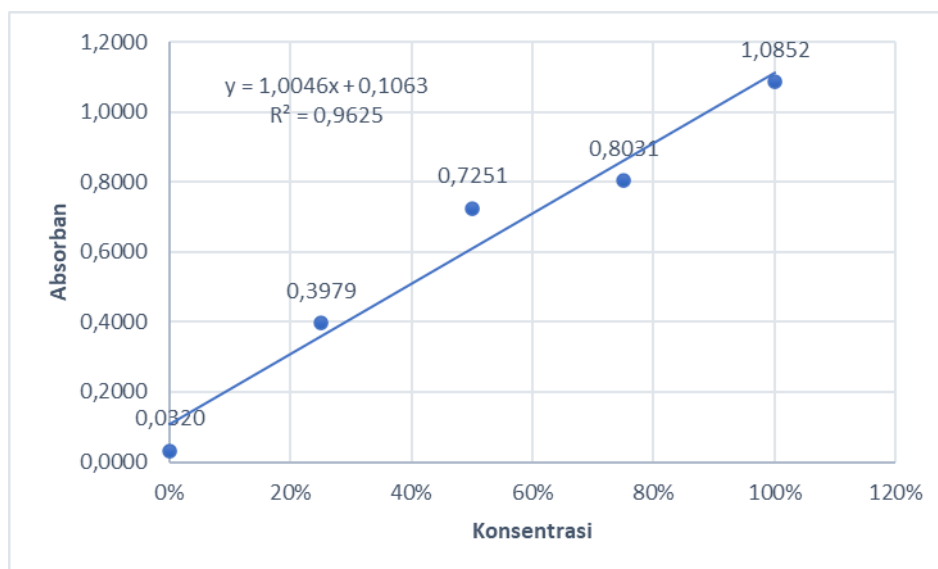
Data hasil uji linearitas pada tanggal 10 April 2025 disajikan sebagai berikut.

Tabel 8. Data Uji Linearitas ke-1 pada 10 April 2025

Konsentrasi	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Mean Absorban
0%	0,0809	0,0086	0,0066	0,0320
25%	0,3975	0,4260	0,3701	0,3979
50%	0,7611	0,7378	0,6765	0,7251
75%	0,7990	0,7563	0,8539	0,8031
100%	1,2122	1,1171	0,9264	1,0852

Tabel 8. Menunjukkan bahwa rata-rata absorban dalam 3 replikasi uji pada konsentrasi 0% sebesar 0,0320, konsentrasi 25% sebesar 0,3979, konsentrasi 50% sebesar 0,7251, konsentrasi 75% sebesar 0,8031 dan konsentrasi 100% sebesar 1,0852.

Data yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan Microsoft Excel. Hasil uji linearitas ke-1 disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Kurva Kalibrasi Uji Linearitas ke-1 pada 10 April 2025

Menampilkan grafik kurva kalibrasi berdasarkan uji linearitas ke-

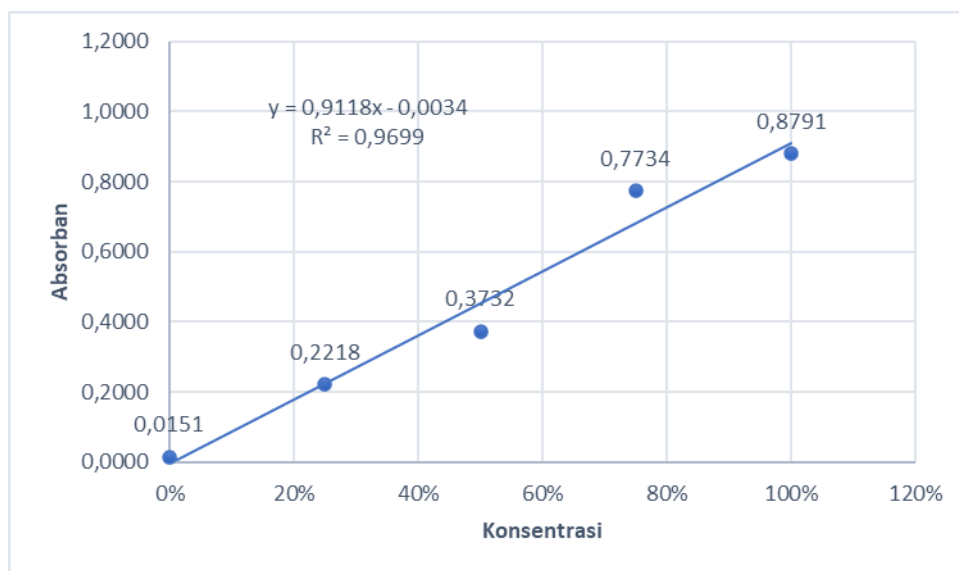
1. Grafik kurva kalibrasi tersebut menghasilkan R^2 sebesar 0,9625, nilai ini berada di bawah syarat linearitas yang diterima. Syarat linearitas yang diterima yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

Tabel 9. Data Uji Linearitas ke-2 pada 10 April 2025

Konsentrasi	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Mean Absorban
0%	0,0324	0,0078	0,0052	0,0151
25%	0,1996	0,2281	0,2376	0,2218
50%	0,4420	0,3745	0,3031	0,3732
75%	0,7660	0,8210	0,7331	0,7734
100%	0,8785	0,8509	0,9078	0,8791

Tabel 9. Menunjukkan bahwa rata-rata absorban dalam 3 replikasi uji pada konsentrasi 0% sebesar 0,0151, konsentrasi 25% sebesar 0,2218, konsentrasi 50% sebesar 0,3732, konsentrasi 75% sebesar 0,7734 dan konsentrasi 100% sebesar 0,8791.

Data yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan Microsoft Excel. Hasil uji linearitas ke-2 disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Kurva Kalibrasi Uji Linearitas ke-2 pada 10 April 2025

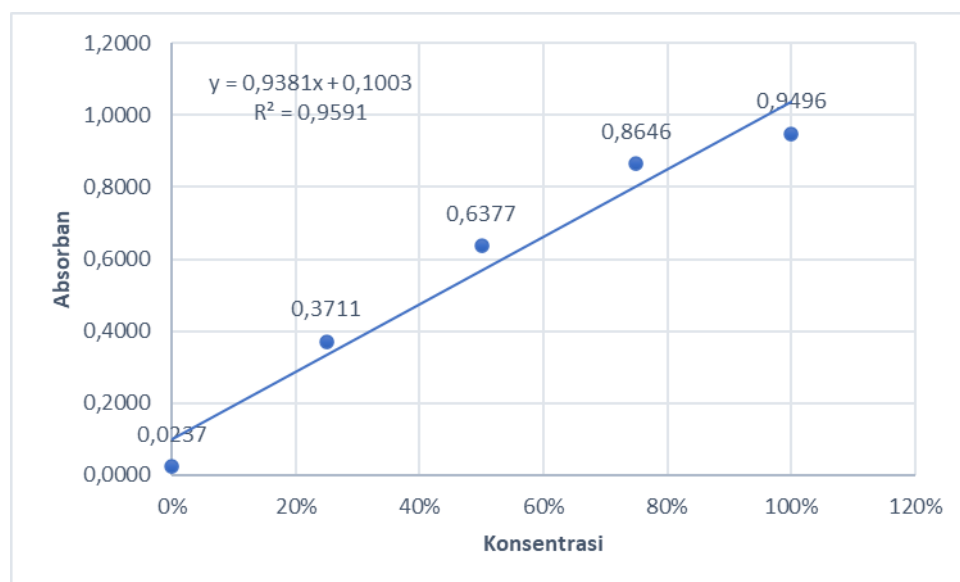
Menampilkan grafik kurva kalibrasi berdasarkan uji linearitas ke-2. Grafik kurva kalibrasi tersebut menghasilkan R^2 sebesar 0,9699, nilai ini berada di bawah syarat linearitas yang diterima. Syarat linearitas yang diterima yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

Tabel 10. Data Uji Linearitas ke-3 pada 10 April 2025

Konsentrasi	Absorban I	Absorban II	Absorban III	Mean Absorban
0%	0,0049	0,0044	0,0619	0,0237
25%	0,3927	0,3745	0,3460	0,3711
50%	0,6837	0,6410	0,5885	0,6377
75%	0,9211	0,8737	0,7990	0,8646
100%	0,9394	0,8462	1,0631	0,9496

Tabel 10. Menunjukkan bahwa rata-rata absorban dalam 3 replikasi uji pada konsentrasi 0% sebesar 0,0237, konsentrasi 25% sebesar 0,3711, konsentrasi 50% sebesar 0,6377, konsentrasi 75% sebesar 0,8646 dan konsentrasi 100% sebesar 0,9496.

Data yang telah diperoleh, dianalisis menggunakan Microsoft Excel. Hasil uji linearitas ke-3 disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Kurva Kalibrasi Uji Linearitas ke-3 pada 10 April 2025

Menampilkan grafik kurva kalibrasi berdasarkan uji linearitas ke-3. Grafik kurva kalibrasi tersebut menghasilkan R^2 sebesar 0,9591, nilai ini berada di bawah syarat linearitas yang diterima. Syarat linearitas yang diterima yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

Berdasarkan ketiga kurva kalibrasi yang diperoleh pada tanggal 10 April 2025, nilai R^2 yang diperoleh $< 0,997$, sehingga tidak memenuhi syarat linearitas yang diterima.

3. Uji LoD dan LoQ

Uji ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi glukosa terendah yang masih dapat dideteksi dan yang dapat dikuantifikasi dengan presisi dan akurasi yang memadai. Pengujian LoD dan LoQ tidak dilakukan karena hasil uji linearitas tidak memenuhi kriteria nilai R^2 . Nilai R^2 sebagaimana disyaratkan untuk validitas metode yaitu $R^2 > 0,997$ (Riyanto, 2014).

4. Analisis Kualitatif LoD dan LoQ

Uji ini digunakan untuk memastikan kebenaran nilai LoD dan nilai LoQ. Analisis kualitatif LoD dan LoQ tidak dilakukan karena hasil uji linearitas tidak memenuhi kriteria nilai R^2 sebagaimana disyaratkan untuk validitas metode yaitu $R^2 > 0,997$.

B. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode pemeriksaan glukosa menggunakan GOD-PAP (*Glucose Oxidase - Peroxidase Aminoantypirin*) dengan seperempat volume reagen dan sampel tidak memenuhi kriteria linearitas metode validasi, yaitu nilai koefisien determinasi (R^2) $> 0,997$. Pada penelitian ini, nilai R^2 dari enam kali uji berkisar antara 0,9037 hingga 0,9699. Menurut Riyanto (2014), linearitas metode menunjukkan ketelitian analisis suatu metode, yang ditandai dengan nilai koefisien determinasi $> 0,997$. Apabila nilai R^2 tidak mencapai batas tersebut, maka hubungan antara konsentrasi analit dan respons instrumen dianggap tidak cukup linear.

Kondisi ini menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi tidak diikuti oleh kenaikan respons secara proporsional, sehingga dapat menyebabkan ketidakakuratan dalam pengukuran. Jika nilai ini tidak terpenuhi, maka metode dianggap tidak valid.

Menurut Buchholz dkk. (2012), enzim seperti glukosa oksidase (GOD) dan peroksidase (POD) membutuhkan konsentrasi substrat tertentu untuk dapat bekerja secara optimal. Ketika konsentrasi substrat berada di bawah ambang minimum, kecepatan reaksi enzimatik menurun drastis dan sinyal hasil reaksi tidak lagi proporsional terhadap kadar glukosa, yang dapat menyebabkan deviasi terhadap pola linier pada kurva kalibrasi. Pengurangan volume reagen turut berdampak pada penurunan kapasitas buffer dalam sistem reaksi. Buffer berfungsi menjaga kestabilan pH, yang sangat penting agar enzim bekerja dalam lingkungan optimal. Namun, kapasitas buffer tidak hanya bergantung pada rasio, tetapi juga pada jumlah absolut dalam reaksi.

Segel (1993) menyatakan bahwa pada volume reaksi yang sangat kecil, buffer menjadi kurang efektif dalam mempertahankan kestabilan pH akibat interaksi dengan komponen serum atau proses reaksi itu sendiri. Ketidakseimbangan pH tersebut dapat mengganggu aktivitas enzimatik. Marini dkk. (2017) menunjukkan bahwa perubahan pH sekecil 0,5 unit saja dapat menurunkan aktivitas enzim hingga 30%, karena perubahan pH dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim dan mengganggu interaksinya dengan substrat.

Dari sisi teknis, penggunaan volume pipet yang sangat kecil (2,5 μ L) juga menjadi faktor yang dapat memengaruhi presisi hasil. Lippi dan Plebani (2015) menjelaskan bahwa kesalahan pemipetan pada volume mikro dapat menyebabkan variabilitas hasil hingga 15%, yang berpengaruh terhadap nilai absorban dalam reaksi enzimatik. Whitesides (2006) menambahkan bahwa sistem mikroskala seperti ini rentan terhadap fluktuasi suhu, efisiensi pencampuran dan risiko kontaminasi karena rasio permukaan terhadap volume yang tinggi. Komponen dalam serum, yang merupakan campuran kompleks dari protein, ion, dan metabolit, juga dapat memengaruhi kestabilan sistem, terutama bila kapasitas buffer terbatas. Burtis dan Bruns (2015) menyatakan bahwa kontaminan atau variasi ionik dari serum dapat memengaruhi pH sistem secara signifikan, terutama dalam sistem volume kecil.

Akumulasi dari berbagai faktor tersebut termasuk jumlah enzim dan substrat yang rendah, kapasitas buffer yang terbatas, serta tantangan teknis pada pemipetan mikro dapat menghambat terbentuknya kurva kalibrasi yang linier dan valid. Menurut Shrivastava dan Gupta (2011), uji validasi lanjutan seperti *Limit of Detection* (LoD) dan *Limit of Quantitation* (LoQ) bergantung pada kemiringan kurva kalibrasi dan keabsahan linearitas metode. Ketika linearitas tidak tercapai, maka parameter tersebut tidak dapat dihitung dengan andal.

Keterbatasan penelitian ini meliputi tidak dilakukannya pengukuran menggunakan volume standar sebagai kontrol pembanding. Tanpa data ini,

evaluasi terhadap dampak spesifik dari penggunaan seperempat volume terhadap linearitas tidak dapat dilakukan secara langsung. Selain itu, pengujian dengan instrumen yang berbeda juga belum dilakukan, sehingga reproduisibilitas metode pada kondisi peralatan bervariasi belum dapat dievaluasi secara menyeluruh. Menurut Miller dan Miller (2010), pengujian antar-instrumen merupakan salah satu aspek penting dalam menilai validitas metode secara menyeluruh, khususnya untuk aplikasi laboratorium klinis yang memerlukan presisi tinggi.