

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Penelitian dengan judul "Perbedaan Kadar Kolesterol Total dengan Waktu Inkubasi 5 dan 20 Menit Setelah Sampel Dicampur Reagen Metode CHOD-PAP" yang dilakukan pada tanggal 12 – 23 Januari 2026 bertempat di Laboratorium Puskesmas Gamping 1. Sebelum dilakukan penelitian, diawali dengan pengurusan perizinan dan telah mendapatkan surat layak etik dari KEPK dengan Nomor DP.04.03/e-KEPK.1/517/2026.

Penelitian diawali dengan mengumpulkan sampel serum sisa pemeriksaan pasien. Sampel yang dipilih dengan kriteria volume cukup, tidak hemolisis, lipemik, dan ikterik. Sampel dikumpulkan hingga didapatkan total 30 serum.

Sebelum pemeriksaan sampel, alat ukur yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Riele Photometer 5010 V5+* dilakukan *Quality Control* dengan serum kontrol *TruLab N Diasys* sebanyak 1 kali dan didapatkan hasil dalam rentang normal. Reagensia yang digunakan untuk pemeriksaan kadar kolesterol total yaitu *Proline Cholesterol FS* metode CHOD-PAP dengan kondisi baik dan tidak kedaluwarsa.

Hasil penelitian berupa data primer, data primer yang diperoleh dari penelitian ini adalah kadar kolesterol total pada sampel serum. Kadar ini diukur setelah sampel serum diberi dua perlakuan waktu inkubasi yang berbeda, yaitu 5 menit dan 20 menit (kontrol). Selanjutnya, kadar kolesterol total dalam serum tersebut diperiksa menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 546 nm.

Tabel 3. Kadar Kolesterol Total dengan Waktu Inkubasi 5 Menit dan 20 Menit

	Kadar Kolesterol Total	
	Inkubasi 5 Menit	Inkubasi 20 Menit
Jumlah Sampel	30	30
Nilai Terendah	103	105
Nilai Tertinggi	287	295
Rata-rata	189,13	198,33
Standar Deviasi	31,14	32,67

Tabel 3. Menunjukkan hasil rata-rata kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 5 menit dan 20 menit. Rata-rata kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 5 menit yaitu 189,13 mg/dL. Sedangkan rata-rata kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 20 menit yaitu 198,33 mg/dL. Sehingga didapatkan selisih sebesar 9,2 mg/dL.

Data hasil pengukuran kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 5 menit dan 20 menit kemudian dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan SPSS. Analisis data dilakukan dengan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji 2 sampel berhubungan menggunakan uji non-parametrik (*wilcoxon*). Hasil analisis statistik dilanjutkan pada tabel 4 berikut.

Tabel 4. Hasil Uji Statistik

No.	Uji Statistik	Hasil	Kesimpulan
1	<i>Shapiro-Wilk</i>		Data tidak
	a. Inkubasi 5 Menit	$p = 0,014$	berdistribusi
	b. Inkubasi 20 Menit	$p = 0,038$	normal
2	Uji nonparametrik (<i>Wilcoxon</i>)	$p = < 0,001$	Ada perbedaan

Pada tabel 4. Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai signifikan (p) yaitu 0,014 dan 0,038 yang berarti H_0 ditolak karena $\text{sig } Shapiro-Wilk < 0,05$ maka dinyatakan data tidak berdistribusi normal. Karena data tidak

berdistribusi normal, maka dilanjutkan menggunakan uji nonparametrik (*wilcoxon*). Hasil yang diperoleh yaitu $p = < 0,001$ ($p < 0,05$), maka H_0 ditolak yang berarti ada perbedaan kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 5 menit dan 20 menit.

Data yang telah dianalisis menggunakan statistik dilanjutkan dengan menganalisis secara aturan *National Cholesterol Education Program* (NCEP) untuk menentukan apakah perbedaan yang terjadi dari hasil penelitian bermakna secara klinis dengan cara melihat seberapa dekat hasil pengujian dengan nilai sebenarnya. Menurut aturan NCEP batas bias relatif yang ditoleransi pada kadar kolesterol total adalah $\pm 3\%$. Pada tabel 3 didapatkan hasil rata-rata kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 5 dan 20 yaitu 189,13 mg/dL dan 198,33 mg/dL sehingga nilai bias relatif (d%) yang diperoleh sebesar 4,64%. Jika nilai ini dibandingkan dengan standar yang ditetapkan oleh NCEP, maka hasil tersebut melebihi batas maksimal yang diizinkan yaitu $\pm 3\%$. Hal ini berarti bahwa kadar kolesterol total dengan waktu inkubasi 5 menit dan 20 menit terdapat perbedaan secara klinis.

B. Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian, mempercepat waktu inkubasi menjadi 5 menit menghasilkan kadar kolesterol total yang lebih rendah (189,13 mg/dL) dibandingkan waktu inkubasi standar 20 menit (198,33 mg/dL). Secara teknis, metode CHOD-PAP merupakan reaksi *endpoint* yang membutuhkan waktu optimal agar seluruh substrat terkonversi sempurna menjadi produk warna (*quinoneimine*).

Pada metode CHOD-PAP, pemeriksaan kolesterol melalui beberapa tahap reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Reaksi akhir dari metode ini adalah konversi hidrogen peroksida, fenol, dan 4-aminoantipirin oleh enzim peroksidase (POD) menjadi senyawa *quinoneimine* yang berwarna merah. Intensitas warna merah ini sebanding dengan konsentrasi kolesterol dalam sampel dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 546 nm.

Metode titik akhir (*endpoint*) mewajibkan reaksi dibiarkan dalam kurun waktu tertentu agar semua substrat dalam sampel bereaksi sempurna menjadi produk (*quinoneimine*). Menurut insert kit Proline, waktu inkubasi optimal pada suhu ruang (20-25°C) adalah selama 20 menit. Pada suhu ruang, enzim bekerja lebih lambat dibandingkan pada suhu optimal tubuh manusia (37°C). Oleh karena itu, enzim membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama agar reaksi mencapai fase *steady-state* atau dataran (*plateau*), di mana substrat telah habis bereaksi dan warna mencapai intensitas puncak (Mbira, 2024).

Percepatan waktu inkubasi menjadi 5 menit akan menyebabkan enzim belum selesai bekerja secara keseluruhan. Laju pembentukan produk belum maksimal karena belum tercapainya fase *steady-state* (Kearney & Flegg, 2024). Akibatnya, produk warna (*quinoneimine*) yang terbentuk lebih rendah dari yang seharusnya. Hal ini secara langsung menyebabkan nilai absorbansi yang terbaca di spektrofotometer menjadi lebih rendah, yang akhirnya memberikan hasil kadar kolesterol total yang tidak akurat.

Secara teknis, beberapa fasilitas layanan kesehatan seperti puskesmas terkadang mempercepat waktu inkubasi dengan alasan efisiensi waktu agar hasil

laboratorium keluar lebih cepat. Penelitian sebelumnya oleh Arnodi (2024) menunjukkan bahwa waktu inkubasi 10 menit dan 20 menit tidak memberikan perbedaan yang bermakna secara statistik ($p = 0,062$). Namun, perlu digarisbawahi bahwa penelitian tersebut menggunakan reagen dengan standar waktu 10 menit pada suhu ruang, sehingga perlakuan 20 menit merupakan bentuk perpanjangan waktu inkubasi. Pada kondisi tersebut, reaksi enzimatik telah selesai sehingga produk warna terbentuk sempurna dan tidak memberikan perbedaan yang bermakna. Sebaliknya, penelitian ini membuktikan bahwa jika waktu dipercepat menjadi 5 menit dari waktu standar 20 menit pada suhu ruang, perbedaan yang terjadi menjadi fatal baik secara statistik ($p < 0,001$) maupun secara klinis.

Hasil penelitian ini tidak selaras dengan penelitian Wulansari (2017) pada pemeriksaan glukosa metode GOD-PAP yang membandingkan waktu inkubasi 5 menit di suhu 40°C dan 20 menit di suhu ruang. Pada penelitian tersebut dinyatakan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p = 0,055$). Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan perlakuan suhu. Pada penelitian tersebut, percepatan waktu inkubasi menjadi 5 menit dilakukan dengan suhu 40°C. Sesuai dengan hukum van't Hoff, kenaikan suhu dapat melipatgandakan kecepatan reaksi kimia, sehingga aktivitas enzim bereaksi lebih cepat dan mampu mencapai fase *steady-state* dalam waktu singkat. Sebaliknya, pada penelitian ini percepatan waktu inkubasi menjadi 5 menit tetap dilakukan pada suhu ruang (20-25°C). Hal ini semakin menegaskan bahwa tanpa adanya bantuan suhu

optimal, enzim bekerja lebih lambat dan memerlukan waktu yang lebih lama (20 menit) agar seluruh substrat terkonversi sempurna menjadi produk warna.

Kesalahan dalam tahap analitik ini berisiko besar bagi penanganan pasien. Bias pemeriksaan sebesar 4,64% telah melewati batas yang diizinkan oleh *National Cholesterol Education Program* (NCEP) yaitu $\pm 3\%$. Kesalahan dalam mengukur kadar kolesterol asli dapat mengakibatkan pasien salah diagnosis, sehingga pasien tidak mendapatkan terapi diet maupun pengobatan yang tepat untuk mencegah risiko aterosklerosis dan penyakit jantung koroner.

Keterbatasan pada penelitian ini yaitu terbatas menggunakan satu merek reagen yaitu *Proline*. Setiap merek reagen memiliki spesifikasi dan waktu inkubasi optimal yang berbeda-beda sehingga kecepatan reaksi enzim setiap reagen tidak sama. Oleh karena itu hasil penelitian ini tidak dapat digeneralisasi pada reagen merek lain.