

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Telaah Pustaka**

##### **1. Tahapan Pemeriksaan Laboratorium**

###### **a. Pra analitik**

Menurut Thachil et al. (2024), lebih dari 60–70% kesalahan pemeriksaan laboratorium berasal dari tahap pra-analitik, termasuk kesalahan identifikasi, teknik pengambilan darah hingga keterlambatan penanganan sampel. Kesalahan kecil pada fase ini dapat menyebabkan hasil pemeriksaan menyimpang dari kondisi biologis pasien. Beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam pemeriksaan pra-analitik :

###### **1) Persiapan pasien**

Salah satu faktor penting pada pemeriksaan lipid adalah kondisi puasa pasien. Menurut BG & D (2021) menjelaskan bahwa trigliserida sangat dipengaruhi oleh status puasa. Pasien yang tidak berpuasa mengalami kenaikan trigliserida post-prandial akibat peningkatan kilomikron dalam aliran darah. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa standar puasa 10-12 jam masih direkomendasikan pada pemeriksaan lipid tertentu, termasuk trigliserida, untuk menghindari bias hasil.

## 2) Kualitas spesimen

Kualitas spesimen yang baik adalah tidak hemolisis, ikterik, lipemik, atau kontaminasi antikoagulan karena dapat menghasilkan interferensi dan mengganggu akurasi pengukuran reaksi enzimatik menurut (Marques-Garcia, 2020).

## 3) Penyimpanan spesimen

Trigliserida cenderung stabil pada sampel whole blood selama 4–8 jam pada suhu ruang, namun nilai akan mulai menurun setelah periode penyimpanan yang lebih lama akibat degradasi lipid dan perubahan fase serum atau plasma. Pada sampel serum, stabilitas trigliserida selama 8-24 jam di suhu ruang. Oleh karena itu, stabilitas sampel antara pengambilan serta analisis merupakan faktor penting dalam mencegah bias laboratorium (Hedayati et al., 2020).

## 4) Jenis sampel dan tabung.

Penggunaan antikoagulan tertentu seperti EDTA dapat mengganggu reaksi enzimatik tertentu. Pemilihan serum atau plasma heparin lebih direkomendasikan pada pemeriksaan lipid. Serum lebih sering digunakan karena tidak mengandung antikoagulan yang dapat mengganggu reaksi enzimatik, sehingga memungkinkan hasil yang lebih stabil dan akurat. Penggunaan plasma dengan antikoagulan seperti EDTA tidak dianjurkan karena dapat memengaruhi aktivitas enzim dalam metode (Hedayati et al., 2020).

## b. Analitik

Tahap analitik, sebagaimana didefinisikan oleh Thachil et al. (2024), meliputi beberapa langkah krusial, di antaranya penyiapan reagen, teknik pipetasi sampel dan reagen, prosedur inkubasi, hingga tahap pemeriksaan akhir.

### 1) Persiapan Reagen

Dalam prosedur persiapan reagen, dilakukan verifikasi untuk menjamin kualitas reagen melalui pemeriksaan tanggal kedaluwarsa, kondisi fisik, serta memastikan bahwa reagen telah disimpan sesuai. Ketidaksihesuaian dalam persiapan reagen, seperti reagen yang rusak atau tidak homogen, dapat menyebabkan reaksi enzim tidak berlangsung optimal sehingga menghasilkan kadar trigliserida yang tidak akurat (Bishop et al., 2018).

### 2) Pipetasi Reagen dan Sampel

- a) Memastikan seluruh peralatan laboratorium, khususnya pipet dan tip, dalam kondisi bersih dan memenuhi persyaratan kerja untuk mencegah kontaminasi silang. Pipet yang digunakan harus terkalibrasi agar volume reagen maupun sampel .
- b) Kesalahan dalam pipetasi, seperti ketidakakuratan volume, penggunaan alat yang tidak bersih, atau pelanggaran urutan prosedur, dapat berdampak langsung pada reaksi pembentukan kompleks warna pada metode trigliserida, sehingga

menyebabkan hasil pemeriksaan menjadi bias atau tidak dapat diinterpretasikan secara benar (Bishop et al., 2018).

c) Inkubasi

Inkubasi dalam kimia klinik adalah proses penyimpanan atau perlakuan terhadap sampel (biasanya serum atau plasma) pada suhu tertentu dan dalam waktu tertentu sebelum atau selama proses analisis berlangsung

d) Pemeriksaan spesimen

(1) Memastikan instrument berfungsi dengan baik. Instrumen yang digunakan adalah spektrofotomer.

(2) Memastikan pembacaan hasil sudah benar (Bishop et al., 2018).

c. Pasca analitik

Tahap pasca-analitik mencakup interpretasi, validasi, pelaporan hasil laboratorium. Pasca analitik merupakan hasil yang diperoleh dari alat kemudian dipindahkan atau dicatat ke dalam laporan hasil pemeriksaan. Menurut Dugad et al. (2020) :

Tahap pasca analitik meliputi:

1) Membuat laporan hasil.

Setelah didapatkan kadar trigliserida dicantumkan pada laporan hasil berupa identitas pasien, tanggal dan waktu pemeriksaan sampel, kadar trigliserida, satuan dapat dibaca dengan jelas dan tidak menimbulkan kesalahan interpretasi.

## 2) Melakukan validasi hasil pemeriksaan

Validasi hasil yaitu proses memastikan bahwa nilai yang dilaporkan sudah benar, masuk akal secara klinis, serta konsisten dengan kontrol kualitas (QC) yang dijalankan pada hari yang sama. Validasi dapat mencakup pemeriksaan kembali nilai absorbansi, perhitungan konsentrasi, serta kesesuaian dengan riwayat hasil pasien jika tersedia. Pada fase ini, hasil harus dikaji ulang untuk memastikan kesesuaian antara hasil pemeriksaan dan kondisi klinis pasien. Jika terdapat ketidaksesuaian hasil dengan kondisi klinis, maka pemeriksaan ulang (*duplo*) dapat dilakukan sebagai verifikasi.

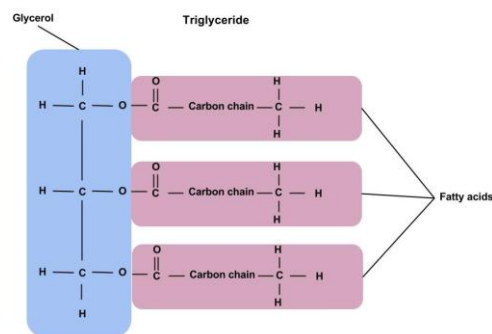
## 2. Triglicerida

### a. Definisi

Secara biokimia, triglicerida didefinisikan sebagai senyawa lemak yang tersusun atas satu unit gliserol dan tiga unit asam lemak. Senyawa lipid netral ini berfungsi sebagai cadangan energi primer di dalam jaringan lemak, yang dapat diuraikan kembali menjadi asam lemak bebas saat tubuh memerlukan pasokan energi tambahan. Triglicerida tidak larut dalam darah karena sifatnya yang tidak menyukai air, sehingga perlu dikemas dalam partikel lipoprotein yang terdiri dari apolipoprotein dan fosfolipid agar bisa mengalir dalam darah hingga ke bagian tubuh yang membutuhkan (Miller et al., 2020)

Secara fisiologis, triglicerida memiliki beberapa peran penting, yaitu menyimpan energi dalam jangka panjang, menyediakan asam

lemak bebas ketika kebutuhan energi meningkat seperti saat puasa atau berolahraga, serta berperan sebagai komponen struktural membran sel melalui metabolit lipid lainnya, atau sebagai bahan baku untuk hormon dan mediator seluler (Borén et al., 2025)



**Gambar 2. 1 Structure of Triglycerides**

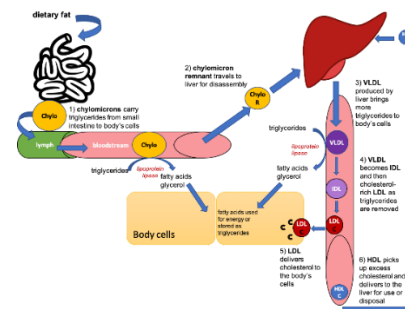
Sumber : Borén et al., 2025

#### b. Transport dan Distribusi

Trigliserida bersifat tidak larut air, sehingga molekul ini tidak bisa bergerak sendirinya di dalam darah. Untuk itu, trigliserida perlu dibawa oleh partikel yang disebut lipoprotein. Lipoprotein adalah struktur khusus yang terdiri dari lemak seperti trigliserida, kolesterol, dan fosfolipid, serta protein yang disebut apolipoprotein. Dengan cara ini, trigliserida dapat dibawa ke jaringan yang membutuhkannya untuk dijadikan energi atau disimpan sebagai cadangan lemak (Borén & Taskinen, 2022).

Dua jenis lipoprotein utama yang mengangkut trigliserida dalam darah adalah:

- 1) *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) diproduksi di hati, membawa trigliserida endogen hasil sintesis dalam tubuh ke jaringan perifer.
- 2) *Chylomicron* (CM) dibentuk di usus halus setelah asupan makanan berlemak kemudian membawa trigliserida ke sirkulasi darah melalui sistem limfatik yaitu *duktus torasikus*.
- 3) Enzim lipoprotein lipase (LPL) berperan dalam proses degradasi trigliserida (TG) yang terkandung dalam VLDL dan kilomikron segera setelah komponen lipid tersebut masuk ke dalam aliran darah.
- 4) Hasil dari degradasi tersebut berupa asam lemak bebas (FFA) yang akan didistribusikan ke jaringan target, terutama otot dan jaringan lemak, di mana senyawa ini dapat segera dioksidasi untuk menghasilkan energi atau disimpan dalam bentuk trigliserida dalam jaringan adiposa. Sisa-sisa partikel tersebut kemudian mengalami metabolisme lebih lanjut, terutama diambil oleh hati atau diubah menjadi jenis lipoprotein lain.
- 5) Proses transportasi dan distribusi trigliserida mulai dari sumber seperti hati atau usus ke dalam darah, kemudian ke jaringan, hingga proses pemrosesan dan pembersihan memungkinkan tubuh memanfaatkan trigliserida sebagai sumber energi atau menyimpannya sebagai cadangan lemak (Borén & Taskinen, 2022).



**Gambar 2. 2 Metabolism of Triglyceride**  
Sumber : Borén & Taskinen, 2022

### c. Fungsi

Menurut Hinou (2024) trigliserida memiliki beberapa fungsi utama :

#### 1) Fungsi Energik

Trigliserida merupakan cadangan energi paling besar dalam tubuh. Dalam kondisi puasa, kelaparan, maupun aktivitas fisik yang intens, trigliserida akan mengalami hidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Senyawa asam lemak tersebut kemudian akan menjadi substrat bagi proses  $\beta$ -oksidasi di dalam mitokondria untuk menghasilkan Adenosine Triphosphate (ATP) sebagai sumber energi utama bagi sel.

#### 2) Fungsi Penyimpanan

Trigliserida disimpan dalam adiposit untuk mempertahankan stabilitas metabolik. Ketika kelebihan energi terjadi setelah makan, hormon insulin menstimulasi lipogenesis dan menghambat lipolisis, mendorong penyimpanan asam lemak.

#### 3) Fungsi Pelindung

Selain energi, lapisan adiposa subkutan berperan sebagai bantalan mekanik terhadap organ vital serta isolator termal. Hal ini penting untuk menjaga suhu tubuh terutama pada lingkungan dingin.

d. Nilai Rujukan

Menurut kit insert trigliserida merk labiosis , kadar trigliserida serum dewasa diklasifikasikan sebagai berikut:

**Tabel 2. 1 Nilai Rujukan Trigliserida**

Kategori	Kadar Trigliserida
Normal	< 150 mg/dL
<i>Borderline high</i>	150 – 199 mg/dL
<i>High</i>	200 – 499 mg/dL
<i>Very high</i>	≥500 mg/dL

Sumber : Kit Insert Trigliserida Labiosis, 2026

e. Faktor Risiko

Menurut Enkhtugs et al. (2024) peningkatan kadar trigliserida serta hipertrigliseridemia dipengaruhi oleh faktor lingkungan, genetik, dan klinis:

1) Diet tinggi kalori dan karbohidrat sederhana

Konsumsi berlebihan gula, tepung putih, sirup fruktosa tinggi dan minuman manis meningkatkan *DNL* di hati sehingga trigliserida plasma naik.

2) Obesitas sentral dan *resistensi* insulin

Pada sindrom metabolik, transport asam lemak meningkat ke hati, aktivitas *LPL* menurun, dan produksi *VLDL* meningkat.

3) Konsumsi alkohol

Alkohol meningkatkan sintesis *VLDL* dan menghambat oksidasi asam lemak sehingga trigliserida serum meningkat tajam, terutama konsumsi kronis.

4) Penyakit Penyerta

Hipotiroidisme, diabetes mellitus tipe 2, *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), penyakit ginjal kronis.

5) Obat-obatan

Estrogen oral, *kortikosteroid*, *antipsikotik atipikal*, *β-blocker non-selektif*, *isotretinoin*, dan *protease inhibitor*.

f. Hipertrigliserida

Hipertrigliseridemia adalah kondisi peningkatan trigliserida serum di atas nilai normal. Secara klinik dibedakan menjadi:

1) Derajat Ringan–Sedang (150–499 mg/dL)

Berhubungan dengan penyakit kardiovaskular aterosklerotik, High Density Lipoprotein rendah, resistensi insulin, sindrom metabolic.

2) Derajat Sangat Tinggi ( $\geq 500$  mg/dL)

Berhubungan dengan risiko pankreatitis akut. Pada kadar  $>1000$  mg/dL risiko meningkat drastis. Mekanisme patofisiologi mencakup hidrolisis trigliserida intravaskular menjadi FFA yang bersifat toksik terhadap sel pankreas (Parhofer & Laufs, 2019).

### 3. Serum

#### a. Pengertian

Serum adalah bagian cair dari darah yang diperoleh setelah proses koagulasi selesai. Pada prosedur laboratorium, darah dibiarkan membeku terlebih dahulu, kemudian disentrifugasi sehingga bekuan darah terpisah dan serum berada pada lapisan atas. Berbeda dengan plasma, serum merupakan fraksi cair darah yang tidak lagi mengandung protein koagulasi, meliputi fibrinogen, protrombin, serta faktor pembekuan VIII, V, dan XIII, karena komponen tersebut telah dikonsumsi selama proses pembekuan darah. Dalam pemeriksaan laboratorium, serum berfungsi sebagai spesimen penting karena mengandung berbagai komponen biologis seperti protein, elektrolit, hormon, metabolit, dan zat terlarut lain yang diperlukan untuk analisis biokimia, imunologi, dan berbagai uji diagnostik lainnya (Kiseleva et al., 2022).

#### b. Jenis- jenis Serum

Menurut Marques Garcia (2020) jenis – jenis serum yaitu :

##### 1) Serum Normal

Serum normal berasal dari individu sehat dan dicirikan dengan tampilan kuning muda yang jernih. Proses sentrifugasi memastikan serum tersebut terpisah sempurna dari elemen seluler dan fibrin.

##### 2) Serum Hemolisis

Proses hemolisis melibatkan ruptur eritrosit yang melepaskan hemoglobin ke dalam serum, sehingga mengubah warna serum menjadi merah. Hal ini merupakan faktor interferensi yang signifikan dalam prosedur pemeriksaan enzimatik, termasuk pada metode penetapan kadar trigliserida, karena dapat memengaruhi pembacaan warna pada spektrofotometer.

### 3) Serum Ikterik

Serum ikterik memiliki karakteristik warna kuning kecokelatan akibat peningkatan konsentrasi bilirubin dalam sampel darah. Bilirubin dapat bereaksi dengan radikal peroksida yang diperlukan dalam metode GPO-PAP dapat menghambat pembentukan warna, menghasilkan *false low*.

### 4) Serum Lipemik

Kondisi lipemik pada serum ditandai dengan kekeruhan yang disebabkan oleh akumulasi lipoprotein, terutama *Very Low-Density Lipoprotein* (VLDL) dan kilomikron. Kekeruhan ini menyebabkan fenomena hamburan cahaya (*light scattering*) pada alat spektrofotometer, yang kemudian mengganggu pengukuran absorbansi dan mengakibatkan hasil pemeriksaan menjadi tidak akurat.

#### 4. Tabung Serum Darah

##### a. Tabung *plain*

Tabung *vacutainer plain* (tutup merah) adalah tabung tanpa penambahan zat aditif yang dirancang untuk mendukung proses pembekuan darah secara alami. Dalam kondisi standar, proses pembekuan darah di dalam tabung ini memerlukan waktu kurang lebih 15 sampai 30 menit sebelum spesimen siap disentrifugasi (Djohan et al., 2023).

##### b. Tabung Serum Separator Tube

Tabung *Serum Separator Tube* (SST) dilengkapi dengan *clot activator* untuk mempercepat proses koagulasi darah, serta mengandung gel polimer yang berfungsi sebagai pemisah fisik antara serum dengan elemen seluler darah setelah proses sentrifugasi. Tabung SST umumnya ditandai dengan tutup berwarna kuning atau emas dapat mempersingkat waktu tunggu sehingga dapat membantu dalam mengeluarkan hasil pemeriksaan dengan segera (Djohan et al., 2023).

#### 5. Metode Pemeriksaan GPO-PAP

##### a. Pengertian

Dalam lingkungan laboratorium klinik modern, metode *Glycerol-3-phosphate Oxidase Phenol Aminophenazone* (GPO-PAP) adalah prosedur enzimatik kolorimetri yang paling luas diimplementasikan untuk penentuan konsentrasi trigliserida dalam serum. Metode ini dikembangkan berdasarkan prinsip pemecahan

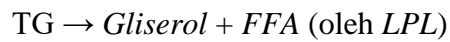
trigliserida menjadi *gliserol*, kemudian menghasilkan senyawa berwarna melalui reaksi enzimatik bertahap yang diukur pada spektrofotometer. Pengukuran absorbansi dilakukan pada rentang panjang gelombang 500–550 nm (umumnya ditetapkan pada 540 nm) menggunakan spektrofotometer. Perhitungan konsentrasi analit diperoleh dengan membandingkan rasio absorbansi sampel terhadap absorbansi larutan standar atau kalibrator. Metode ini distandarkan secara luas serta digunakan dalam sebagian insert kit (Minarsih, 2021).

b. Prinsip Metode GPO-PAP

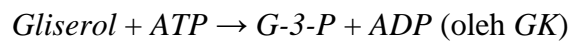
Metode GPO-PAP didasarkan pada serangkaian reaksi enzimatik. Pertama, trigliserida dalam serum atau plasma dihidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak bebas (FFA) dengan bantuan enzim *lipoprotein lipase* (LPL). Selanjutnya, gliserol difosforilasi oleh *adenosine triphosphate* (ATP) dengan bantuan enzim *glycerol kinase* (GK) menghasilkan gliserol-3-fosfat (G-3-P) dan *adenosine diphosphate* (ADP). G-3-P kemudian dioksidasi oleh enzim *glycerol-3-phosphate oxidase* (GPO) menghasilkan dihidroksiaseton fosfat (DAP) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Akhirnya, dengan bantuan katalis *peroxidase* (POD), hidrogen peroksida akan mengoksidasi 4-aminoantipyrine (4-AA) dan fenol menjadi senyawa kompleks kromogen merah. Intensitas warna yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi trigliserida dalam sampel (Kit Insert Trigliserida Merk Labiosis, 2026).

c. Tahapan Reaksi Enzimatik

1) Hidrolisis



2) Fosforilasi



3) Oksidasi



4) Kromogen:

$4\text{-AA} + \textit{Fenol} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{POD}} \textit{Quinoneimine}$  terbentuk warna merah diukur spektrofotometri (Labiosis, 2026).

d. Sifat Enzim dalam Reaksi menurut Bishop et.al (2018) :

1) Reaksi GPO-PAP melibatkan enzim spesifik

Enzim hanya mempengaruhi substrat tertentu saja (*lipase, gyserol kinase, GPO, dan peroksidase*).

2) Enzim bersifat katalis.

Peran utama enzim dalam suatu reaksi biokimia adalah meningkatkan kecepatan reaksi secara signifikan. Enzim tidak memberikan perubahan terhadap termodinamika reaksi, termasuk jenis produk yang dihasilkan maupun konstanta kesetimbangannya, melainkan hanya memperpendek durasi waktu yang diperlukan untuk mencapai keseimbangan.

3) Reaksi enzimatik terjadi secara bertahap (*sequential reaction*)

Reaksi tidak langsung menghasilkan warna, tetapi melalui rantai reaksi enzimatik yaitu *lipase* menghidrolisis trigliserida menghasilkan gliserol. *Glycerol kinase* mengubah gliserol menjadi *gliserol-3-fosfat*. *Glycerol-3-phosphate oxidase (GPO)* *gliserol-3-fosfat* menghasilkan  $H_2O_2$ . Setiap enzim hanya bekerja setelah substratnya tersedia sehingga jika pembentukan gliserol belum optimal, maka gliserol-3-fosfat yang terbentuk juga terbatas dan akhirnya  $H_2O_2$  yang dihasilkan menjadi tidak maksimal sehingga keberhasilan reaksi akhir bergantung kepada kesempurnaan setiap tahap sebelumnya.

#### 4) Pembentukan Warna Quinoneimine

Reaksi pembentukan warna *quinoneimine* yaitu *hidrogen peroksida* bereaksi dengan *4-aminophenazone* dan senyawa *fenolik (peroksidase)* menghasilkan *quinoneimine* + air. Reaksi ini dikenal sebagai *trinder reaction*, yaitu reaksi peroksidase kromogen yang banyak digunakan dalam pemeriksaan kimia klinik berbasis enzimatik. Intensitas warna *quinoneimine* yang terbentuk bersifat proporsional dengan jumlah hidrogen peroksida yang dihasilkan pada tahap reaksi sebelumnya.

Pengukuran absorbansi warna *quinoneimine* dengan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu dapat digunakan untuk menilai kadar trigliserida secara kuantitatif. Proses pembentukan warna *quinoneimine* merupakan langkah terakhir yang

menentukan keberhasilan metode GPO-PAP. Jika jumlah *hidrogen peroksida* yang terbentuk tidak dalam jumlah yang optimal, maka reaksi *peroksidase* tidak akan berjalan dengan efisien, menghasilkan intensitas warna yang lebih rendah. Ini menunjukkan bahwa pembentukan warna *quinoneimine* sangat tergantung pada efektivitas reaksi enzimatik pada tahap-tahap sebelumnya. Dengan demikian, proses pembentukan warna *quinoneimine* berfungsi sebagai indikator akhir yang menghubungkan reaksi dengan metode pengukuran kolorimetri (Bishop et al., 2018).

#### 5) Pembacaan Pemeriksaan GPO-PAP dengan Spektrofotometer

Prinsip operasional spektrofotometer didasarkan pada hubungan linear antara absorbansi dan konsentrasi zat terlarut, sesuai dengan Hukum Lambert-Beer. Instrumen ini digunakan untuk memonitor perubahan warna akibat reaksi kimia atau enzimatik dalam spesimen. Dalam pemeriksaan kadar trigliserida serum melalui metode GPO-PAP, spektrofotometer berperan krusial dalam mengukur nilai absorbansi dari kromogen yang terbentuk sebagai representasi konsentrasi analit. Spektrofotometer terdiri dari sumber cahaya, monokromator (penyaring panjang gelombang), kuvet tempat sampel, dan detektor untuk menangkap cahaya yang diteruskan atau diserap (Talath & Hani, 2024).

e. Faktor yang mempengaruhi pemeriksaan GPO-PAP menurut Burtis et al. (2015) :

1) Suhu pemeriksaan

Berdasarkan *kit insert*, suhu optimum reaksi berkisar antara 20–25°C atau 37°C. Suhu di bawah 20°C akan menghambat kinetika enzimatik, sehingga memperlambat laju reaksi. Sebaliknya, suhu di atas 37°C dapat memicu denaturasi enzim yang menyebabkan hilangnya aktivitas katalitik secara signifikan.

2) Kecepatan enzim

Enzim bersifat jenuh pada konsentrasi substrat tinggi. Peningkatan substrat tidak lagi meningkatkan reaksi. Aktivitas dipengaruhi pH, ion logam, suhu, inhibitor.

3) Konsentrasi reagen

Kelebihan 4-AA mengakibatkan warna terlalu pekat. Kelebihan 4-AA dapat menyebabkan pembentukan warna berlebih, sehingga absorbansi menjadi terlalu tinggi. Kondisi ini dapat mengganggu linearitas kurva kalibrasi dan menghasilkan nilai trigliserida yang tidak akurat .

4) Waktu inkubasi

a) Terlalu singkat maka reaksi belum selesai sehingga pembentukan kromogen belum maksimal dan nilai trigliserida cenderung lebih rendah dari seharusnya (*false-low*)(Peterson et al., 2017).

b) Terlalu lama terjadi degradasi kromogen uji kolorimetri lipid hasil menjadi tidak stabil dan bias negatif.(Peterson et al., 2017).

5) pH

Umumnya reaksi enzimatik optimum pada pH 6.5–7.5. Jika pH terlalu tinggi denaturasi LPL dan GPO maka bisa terjadi *false low*. Lalu pH terlalu rendah mengakibatkan gangguan fosforilasi gliserol.

6) Kualitas reagen dan komposisi sampel

Reagen yang lembap, terkontaminasi, atau kadaluarsa menurunkan stabilitas enzim.

## 6. Inkubasi dalam Pemeriksaan GPO-PAP

a. Definisi

Inkubasi dalam pemeriksaan *Glycerol-3-Phosphate Oxidase Paraaminophenazone (GPO-PAP)* merupakan proses mempertahankan campuran serum darah sebagai sampel dan reagen enzimatik kit trigliserida pada suhu tertentu selama periode waktu tertentu untuk memungkinkan reaksi enzimatik berlangsung secara optimal. Komposisi reagen metode GPO-PAP meliputi enzim-enzim esensial, yaitu *lipoprotein lipase*, *glycerol kinase*, *glycerol-3-phosphate oxidase*, dan *peroxidase*, serta sistem *buffer* yang mengandung 4-*aminophenazone* dan senyawa fenolik. Perpaduan komponen tersebut memungkinkan terjadinya reaksi enzimatik berantai yang terukur secara kolorimetri pada pemeriksaan kimia klinik.

Inkubasi bukan sekadar proses menunggu, melainkan merupakan bagian dari pengendalian kinetika reaksi yang berperan penting dalam menentukan kualitas hasil pemeriksaan. Inkubasi diartikan sebagai periode reaksi di mana komponen reagen, substrat, enzim, dan kofaktor saling berinteraksi hingga mencapai kondisi reaksi yang stabil, sehingga produk akhir dapat terbentuk secara optimal dan diukur secara akurat menggunakan metode spektrofotometri. Pada metode GPO-PAP, kestabilan proses inkubasi menentukan keberhasilan pembentukan produk reaksi yang intensitasnya berbanding lurus dengan kadar trigliserida dalam sampel (Anipah et al., 2023).

b. Fungsi inkubasi

1) Mengoptimalkan reaksi enzimatik

Setiap tahap reaksi dalam GPO-PAP bersifat kinetik:

- a) *Lipase* memutus *ester trigliserida*
- b) *Glycerol Kinase (GK)* memfosforilasi *gliserol*
- c) *Glycerol-3-phosphate oxidase (GPO)* menghasilkan  $H_2O_2$
- d) *Peroxidase (POD)* membentuk kompleks warna

2) Menstabilkan kompleks warna sebelum pembacaan

Metode GPO-PAP adalah senyawa *quinoneimine* berwarna merah, yang terbentuk dari reaksi  $H_2O_2 + \text{fenol} + 4\text{-AA}$ . Absorbansi kromogen harus mencapai stabilitas optik sebelum pembacaan spektrofotometri.

3) Inkubasi standar GPO-PAP

Menurut (Kit Insert Labiosis, 2024) inkubasi metode GPO-PAP berlangsung selama 15 menit pada suhu 25–30°C atau 37°C.

a) Inkubasi terlalu singkat

Sampel belum mencapai fase *plateau kinetik*. Enzim belum memproses trigliserida secara penuh menjadikan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lebih sedikit menjadikan intensitas warna rendah sehingga terjadi *false low* atau bias negatif (Anipah et al., 2023).

b) Inkubasi melebihi waktu optimal (> 60 menit)

Durasi inkubasi yang memanjang mengakibatkan denaturasi enzim. Paparan suhu dan waktu terlalu lama menyebabkan struktur *tersier* rusak. Aktivitas katalitik turun sehingga pembentukan metabolit berkurang. Hal ini menyebabkan *underestimation* trigliserida.

## 7. Hubungan inkubasi terhadap kadar trigliserida

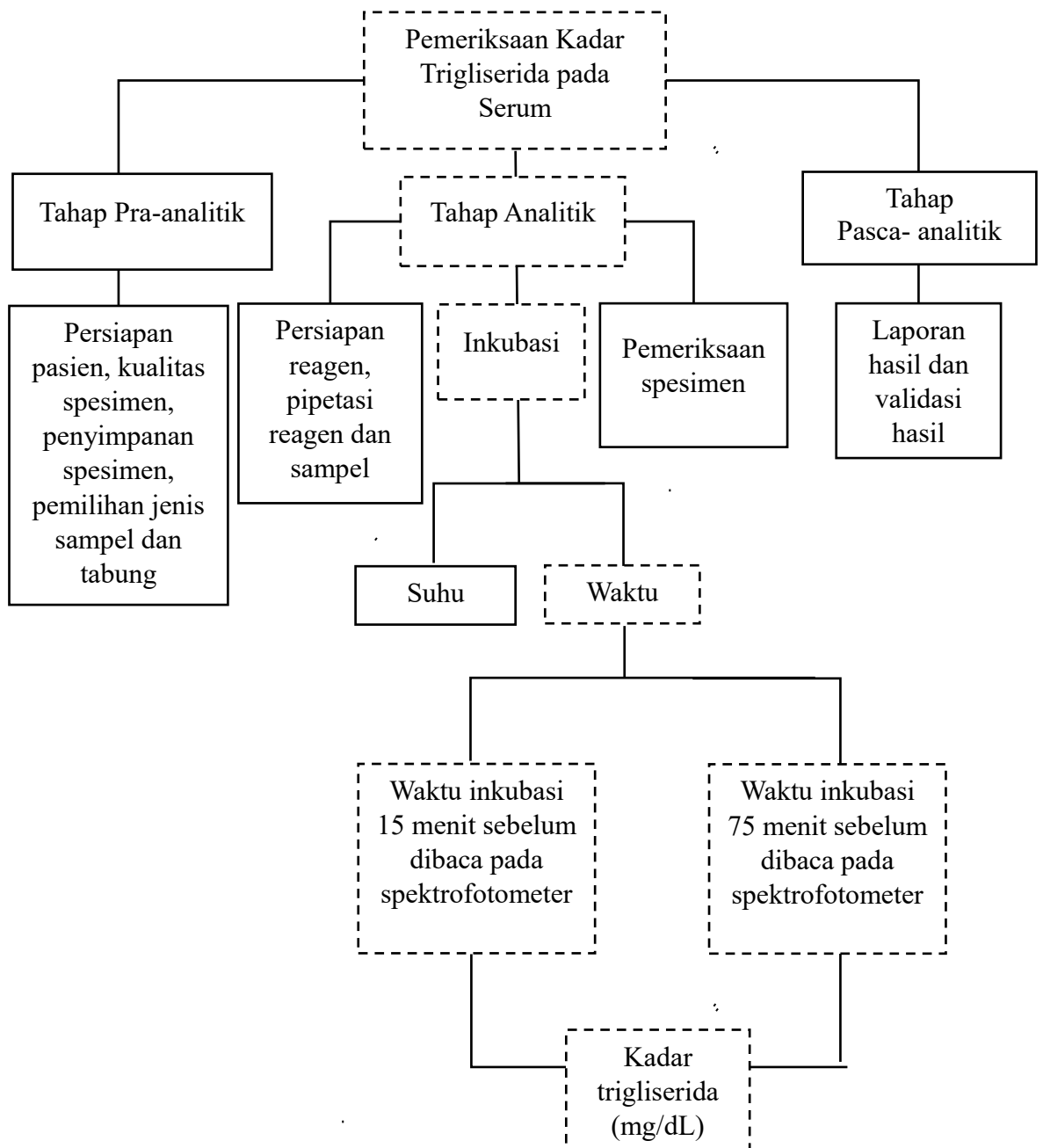
Hubungan waktu inkubasi dan kadar trigliserida pada metode GPO-PAP :

1. Waktu terlalu singkat maka reaksi belum selesai jadi hasil rendah
2. Waktu ideal (10–15 menit) maka enzim maksimum jadi hasil akurat
3. Waktu terlalu lama (> 60 menit) maka aktivitas enzim turun dan degradasi kromogen maka hasil rendah.

Durasi inkubasi yang melebihi standar prosedur operasional meningkatkan risiko penurunan aktivitas enzim *lipase* yang digunakan dalam metode GPO-PAP. Hal ini berpotensi menyebabkan ketidakakuratan

hasil, di mana kadar trigliserida yang terukur cenderung lebih rendah dibandingkan kadar yang sebenarnya (Putri et al., 2024).

## B. Kerangka Teori

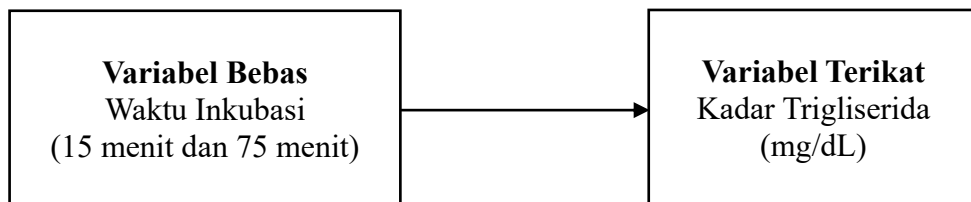


**Gambar 2. 3 Kerangka Teori**

Diteliti :

Tidak diteliti :

### C. Hubungan Antar Variabel



**Gambar 2. 4 Hubungan Antar Variabel**

### D. Hipotesis Penelitian

Terdapat perbedaan signifikan pada kadar trigliserida serum antara spesimen yang diinkubasi selama 15 menit dengan spesimen yang diinkubasi selama 75 menit pada suhu ruang.