

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Profil Lipid

Profil lipid adalah suatu gambaran kadar lipid di dalam darah. Beberapa gambaran yang diperiksa dalam pemeriksaan profil lipid adalah kolesterol total, trigliserida, HDL (*High Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*), dan VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Gambaran profil lipid merupakan suatu indikator yang baik untuk memprediksi apakah seseorang memiliki resiko yang besar untuk terkena Penyakit Jantung Koroner (PJK) (Selwyn, 2005).

Uji kolesterol atau disebut juga panel lipid atau profil lipid, mengukur kadar lemak (lipid) dalam darah. Pemeriksaan ini memerlukan persiapan puasa mulai jam 12 jam sebelumnya (tidak makan dan minum, kecuali air putih). Setelah serangan jantung, pembedahan, infeksi, cedera atau kecelakaan, sebaiknya menunggu sedikitnya 2 bulan agar hasilnya lebih akurat (Djauzi, 2009). Mengenai harga normal kadar lipid, para pakar dindonesia sepakat untuk menggunakan patokan seperti yang terlihat pada Tabel 2.1 dibawah ini :

Tabel 2.1 Kadar Lipid dalam Darah

	Diinginkan (mg/dl)	Diwaspadai (mg/dl)	Berbahaya (mg/dl)
Kolesterol total	< 200	200-239	≥ 240
Kolesterol LDL	< 130	130-159	≥ 160
Kolesterol HDL	≥ 45	36-44	≤ 35
Trigliserida	<200	200-399	≥ 400

Pada tabel ini dapat dilihat kadar kolesterol total yang diinginkan adalah <200, kolesterol LDL (kolesterol jahat) <130, kolesterol HDL (kolesterol baik > 45 sedangkan trigliserida <200 mg/dl (Marks, 2000).

2.1.1 Kolesterol Total

Asal kata kolesterol berasal dari bahasa Yunani, *chole* yang berarti empedu, dan *stereo* yang berarti padat. Kolesterol adalah senyawa lemak yang lunak, berbentuk seperti lilin yang ditemukan di antara lipid dalam aliran darah dan dalam semua sel tubuh. Diperlukan untuk membentuk membran sel, hormon, dan fungsi-fungsi tubuh lainnya (Mackay, 2004).

Kolesterol adalah steroid dengan gugus hidroksil sekunder pada posisi C3. Kolesterol disintesis di banyak jaringan, tetapi kebanyakan disintesis dalam hati dan dinding intestinal. Rata-rata $\frac{3}{4}$ kolesterol disintesis dan sekitar $\frac{1}{4}$ berasal dari asupan. Kolesterol diukur dalam satuan miligram per desiliter darah (mg/dL) atau milimol per liter darah (mmol/L). Pada hasil pemeriksaan yang diberikan laboratorium atau rumah sakit biasanya akan disajikan informasi tentang 4 komponen lemak utama dalam darah yakni total kolesterol, HDL, LDL, dan Trigliserida (Kurniadi, 2015).

Kolesterol total adalah jumlah keseluruhan kandungan kolesterol darah pasien. Kolesterol diproduksi oleh tubuh sendiri dan juga datang dari asupan makanan yang kita konsumsi (produk hewani). Kolesterol dibutuhkan tubuh untuk mempertahankan kesehatan sel-sel tetapi level yang terlalu tinggi akan meningkatkan risiko sakit jantung. Faktor genetik juga berperan sebagai penentu kadar kolesterol, selain dari makanan yang dikonsumsi. Idealnya total kolesterol harus <200 mg/dL atau 5,2 mmol/L. Kedua ukuran tersebut setara, hanya

dinyatakan dalam satuan yang berbeda. Di Indonesia umumnya menggunakan satuan mg/dL (Kurniadi, 2015).

Kadar kolesterol normal pada manusia adalah <200 mg/dL. Kadar kolesterol dikatakan resiko batas tinggi apabila kadarnya 200-239 mg/dL, dan resiko tinggi pada kadar 240 mg/dL. Resiko yang diwaspadai dibawah 170 mg/dL (Apriyanti, 2010). Berbagai sumber menyebutkan bahwa apabila kadar kolesterol melebihi normal, bahkan melebihi 240 mg/dL maka beresiko terserang penyakit. Dari studi juga diketahui, orang yang mempunyai kadar koesterol darah lebih dari angka batas normal, lebih beresiko menderita penyakit jantung, tekanan darah tinggi, stroke, dan masih banyak lagi penyakit lain. Semakin tinggi nilai kelebihankolesterol dalam darah, maka resiko jenis penyakit yang diderita juga semakin meningkat (Woodward, 2007).

2.1.2 HDL Kolesterol

High Density Lipoprotein (HDL) merupakan senyawa lipoprotein yang berat jenisnya tinggi, membawa lemak total rendah, protein tinggi, dan dibuat dari lemak endogenus hati. HDL dikenal sebagai kolesterol baik. HDL berperan membawa kembali kolesterol LDL ke hati untuk pemrosesan lebih lanjut. Kelebihan kolesterol akan diangkut kembali oleh HDL untuk dibawa ke hati yang selanjutnya akan diuraikan lalu dibuang kedalam kandung empedu sebagai asam (cairan) empedu. Dapat dikatakan HDL Kolesterol merupakan lipoprotein pembersih kelebihan kolesterol dalam jaringan. Protein utama yang membentuk HDL adalah *Apo-A (Apolipoprotein)*. Jika kadar HDL dalam darah cukup tinggi, terjadi proses pengendapan lemak pada dinding pembuluh darah pun dapat dicegah. Kolesterol yang diangkut ke hati terutama berupa kolesterol yang akan

dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan empedu dan hormon. Kandungan HDL dikatakan rendah jika kurang dari 35 mg/dL pada pria dan kurang dari 42 mg/dL pada wanita. HDL dalam plasma darah akan mengikat kolesterol bebas maupun ester kolesterol dan mengangkutnya kembali ke hati. Selanjutnya, kolesterol yang terikat akan mengalami perombakan menjadi cadangan kolesterol untuk sintesis VLDL (Marks, 2000).

Kolesterol LDL atau yang sering dicap sebagai kolesterol jahat mengangkut kolesterol paling banyak didalam darah. Tingginya kadar LDL menyebabkan penyakit jantung koroner sekaligus target utama dalam pengobatan. Sementara kolesterol HDL mengangkut kolesterol lebih sedikit dari LDL dan sering disebut kolesterol baik karena dapat membuang kelebihan kolesterol jahat dipembuluh darah arteri kembali ke hati, untuk diproses dan dibuang. HDL mencegah kolesterol mengendap di arteri dan melindungi pembuluh darah dari proses aterosklerosis (terbentuknya plak dinding pembuluh darah). Mengenai ambang batas atau spesifikasi kadar kolesterol dalam darah dapat dilihat pada Tabel 2.2 dibawah ini :

Tabel 2.2 Spesifikasi Kadar Kolesterol dalam Darah

Kadar Kolesterol Total	Kategori Kolesterol Total
Kurang dari 200 mg/dL	Bagus
200-239 mg/dL	Ambang batas atas
240 mg/dL dan lebih	Tinggi
Kadar Kolesterol LDL	Kategori Kolesterol LDL
Kurang dari 100 mg/dL	Optimal
100-129 mg/dL	Hampir optimal/di atas optimal
130-159 mg/dL	Ambang batas atas
160-189 mg/dL	Tinggi
190 mg/dL dan lebih	Sangat tinggi
Kadar Kolesterol HDL	Kategori Kolesterol HDL

Kurang dari 40 mg/dL 60 mg/dL dan lebih	Rendah (berisiko) Tinggi (melindungi jantung)
Kadar Triglisierida	Kategori Triglisierida
Kurang dari 150 mg/dL	Normal
150-199 mg/dL	Ambang batas atas
200-499 mg/dL	Tinggi
500 mg/dL dan lebih	Sangat tinggi

*sumber diadaptasi dari *National Institute of Health, Detection, Evaluation, dan Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III, september 2002, hlm 11-7.*

2.1.3 LDL Kolesterol

LDL (Low Density Lipoprotein) merupakan lipoprotein utama pembawa kolesterol dan merupakan suatu kumpulan partikel dengan ukuran yang berbeda densitas, kandungan lipid, dan potensi aterogenik yang berbeda. LDL sering disebut kolesterol jahat. Sebab, jika terlalu banyak LDL dalam darah dapat menyebabkan akumulasi endapan lemak (plak) dalam arteri (proses aterosklerosis), sehingga aliran darah menyempit. Plak ini kadang-kadang bisa pecah dan menimbulkan masalah besar untuk jantung dan pembuluh darah. LDL ini adalah target utama dari berbagai obat penurunan kolesterol (Masrufi, 2009).

Berat molekul dari LDL kolesterol kurang lebih 2.000.000 dalton dan BJ 1,006-1,003. LDL kolesterol pada plasma mengandung sedikit triglisierida, fosfolipid sedang, protein sedang, dan kolesterol tinggi, yang kesemuanya 75 % disertai karier (Apo B) sebanyak 25% dan fosfolipid 20-30 % (Masrufi, 2009).

2.1.4 VLDL

VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) yaitu lipoprotein dengan densitas rendah; disintesis oleh hati untuk mengangkut tricylglycerol dari hati ke jaringan perifer. Lipoprotein ini terutama terdiri dari triglisierida, beberapa molekul kolesterol, dan kurang protein. Lemak yang lebih banyak mengandung

lipoprotein, kerapatannya kurang. Dalam kasus ini, VLDL kurang padat daripada kebanyakan lipoprotein karena komposisi lipidnya yang tinggi. VLDL dibuat di hati dan bertanggung jawab untuk mengantarkan trigliserida ke sel-sel di dalam tubuh, yang dibutuhkan untuk proses seluler. Saat trigliserida dikirim ke sel, VLDL tidak mengandung lemak dan lebih banyak protein, meninggalkan kolesterol pada molekul. Seiring proses ini terjadi, VLDL pada akhirnya akan menjadi molekul LDL (Cleveland, 2013).

VLDL merupakan alat pengangkut trigliserol dari hati ke jaringan diluar hati (ekstrahepatik). Antara mekanisme pembentukan kilomikron oleh sel usus dan pembentukan VLDL oleh sel parenkim hati terdapat banyak kesamaan. VLDL mempunyai berat molekul sekitar 600.000 dalton dan berat jenis kurang dari 1,006 (Carl, 2006).

2.1.5 Trigliserida

Trigliserida (TG) adalah tipe lemak lain dalam darah. Level TG yang tinggi umumnya menunjukkan bahwa pasien makan lebih banyak kalori daripada kalori yang dibakar untuk aktivitas, karena itu level TG biasanya tinggi pada pasien gemuk atau pasien yang mengidap Diabetes melitus. Makanan tinggi karbohidrat (gula sederhana) atau alkohol dapat menaikkan TG secara bermakna. Idealnya level trigliserida haruslah <150 mg/dl (1,7 mmol/L). *American Heart Association* (AHA) merekomendasikan bahwa level TG untuk kesehatan jantung “optimal” adalah 100 mg/dL (1,1 mmol/L). Trigliserida yaitu satu jenis lemak yang terdapat dalam darah dan berbagai organ dalam tubuh (Conley, 2006).

2.2 Macam Prosedur Pemeriksaan Laboratorium

2.2.1 Semi-mikro

Proses analisis semi-mikro Ini adalah proses analisis analitik dan kuantitatif. Komponen yang dibutuhkan untuk proses ini lebih banyak daripada proses analisis mikro namun kurang dari proses analisis makro. Proses ini digunakan untuk menganalisa sampel 10 mg sampai kurang dari 100 mg. Proses ini memberi ide tentang unsur yang dihasilkan, radikal atau ion. Pada sistem analisis kelompok, proses ini diterapkan untuk mengetahui adanya radikal alkali. Proses ini sangat normal dan lebih murah karena jumlah analisis dan pemborosan yang dihasilkan sangat kecil, sehingga lingkungan tetap bersih dan tingkat pencemaran yang rendah (Collin, 2016).

Menurut Apriyoannita (2012), keuntungan analisis semi-mikro yaitu :

1. Penggunaan zat yang sedikit
2. Kecepatan analisis tinggi
3. Penghematan reagen
4. Penghematan kerja peralatan
5. Ketajaman pemisahan meningkat
6. Penggunaan asam sulfida lebih sedikit

Proses analisis mikro ini adalah identifikasi dan komponen kuantitatif untuk analisis. Dalam hal ini permukaan yang dianalisis kurang dari 1 cm^2 . Proses ini diterapkan pada spektroskopi modern, UV, IR, NMR, X-Ray, spektrum massa dll. Sekali lagi dalam kromatografi, difraksi HPLC, GPLC, difraksi X-Ray, elektroforesis, proses analitis mikro diikuti karena jumlah analisisnya sangat kecil, Proses ini sangat normal dan lebih murah. Namun, *human error* meningkat.

2.2.2 Makro

Analisis makro yaitu analisis kualitatif yang kuantitas zatnya adalah 0,5-1 gram dengan volume yang dipakai sekitar 20 ml. Proses ini membutuhkan volume reagen lebih banyak dari semi-mikro. Sehingga tingkat kesalahan dari petugas laboratorium (*human error*) sangat kecil. Dilihat dari segi ekonomisnya sangat tidak terjangkau, sebab perlu diketahui bahwa harga dari masing-masing reagen tidaklah murah (Ariyani, 2014).

Menurut Apriyoannita (2012), kekurangan analisis Makro yaitu :

1. Penggunaan zat lebih banyak
2. Kecepatan analisis rendah
3. Pemborosan reagen
4. Pemborosan kerja peralatan

Namun disamping kekurangan pada analisis makro, ada keuntungan dari pemeriksaan dengan cara tersebut, yaitu tingkat kesalahan saat pemipetan sangat rendah. Sehingga hasil dari pemeriksaan tersebut tidak perlu pengulangan, serta lebih kecil kemungkinannya hasil pemeriksaan tinggi palsu atau rendah palsu.

2.3 Pemantapan Mutu

Pemantapan mutu (*quality assurance*) laboratorium adalah keseluruhan proses atau tindakan yang dilakukan untuk menjamin ketelitian dan ketepatan hasil pemeriksaan. Kegiatan ini berupa Pemantapan Mutu Internal (PMI), Pemantapan Mutu Eksternal (PME) dan Peningkatan Mutu.

Pemantapan Mutu Internal (PMI/*Internal Quality Control*) adalah kegiatan pencegahan dan pengawasan yang dilaksanakan oleh setiap laboratorium secara terus menerus agar tidak terjadi atau mengurangi kejadian kesalahan atau penyimpangan sehingga diperoleh hasil pemeriksaan yang tepat. Pemantapan Mutu Eksternal (PME/*External Quality Control*) adalah kegiatan yang

diselenggarakan secara periodik oleh pihak lain di luar laboratorium yang bersangkutan untuk memantau dan menilai penampilan suatu laboratorium dalam bidang pemeriksaan tertentu (Sukorini, 2010).

Pemantapan mutu internal adalah kegiatan yang rutin dilakukan oleh setiap laboratorium baik swasta atau negeri dalam upaya meningkatkan mutu laboratorium. Pemantapan mutu internal dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap pra analitik, analitik, dan pasca analitik (Tahir, 2010).

2.3.1 Metode Pemeriksaan

2.3.1.1 Pra Analitik

1. Identifikasi Sampel

Pemberian identitas pasien atau spesimen adalah tahapan yang harus dilakukan karena merupakan hal yang sangat penting. Pemberian identitas meliputi pengisian formulir permintaan pemeriksaan laboratorium dan pemberian label pada wadah spesimen. Keduanya harus cocok atau sama. Pemberian identitas ini setidaknya memuat nama pasien, nomor ID atau nomor rekam medis serta tanggal pengambilan. Kesalahan pemberian identitas dapat merugikan. Untuk spesimen berisiko tinggi (HIV, Hepatitis) sebaiknya disertai tanda khusus pada label dan formulir permintaan, periksa laboratorium.

Sebelum pengambilan spesimen, periksa form permintaan laboratorium. Identitas pasien harus ditulis dengan benar (nama, umur, jenis kelamin, nomor rekam medis, dsb) disertai diagnosis atau keterangan klinis. Periksa apakah identitas telah ditulis dengan benar sesuai dengan pasien yang akan diambil spesimen (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2010).

2. Persiapan Pasien

Pemeriksaan kolesterol total dan HDL dapat diukur setiap saat sepanjang hari tanpa puasa. Namun, jika tes ini diambil sebagai bagian dari profil lipid total, harus puasa 12-14 jam (tidak makan atau minum kecuali air). Untuk pemeriksaan Trigliserida dan LDL sebaiknya pasien berpuasa 12-14 jam, agar tidak terjadi kesalahan pengukuran akibat adanya pengaruh dari lemak yang baru dikonsumsi. Untuk hasil paling akurat, tunggu setidaknya 2 bulan setelah serangan jantung, operasi, infeksi, cedera, atau kehamilan.

Kadar kolesterol dipengaruhi oleh beberapa obat yaitu pronanolol dan agen beta-blocker lainnya, diuretik, obat penurun lipid, kontrasepsi oral, obat pengganti hormon dan obat penenang. Olahraga berat 15 menit sebelum pemeriksaan lipid dapat meningkatkan kadar kolesterol sekitar 6%. Oleh karena itu, umumnya direkomendasikan bahwa olahraga berat harus dihindari 2-3 jam sebelum pemeriksaan lipid.

Pembendungan vena menggunakan tourniquet yang terlalu lama dapat meningkatkan kadar kolesterol total. Kadar kolesterol dapat meningkat 10-20 % setelah 10 menit pembendungan, dan 2-5% setelah 2 menit. Pada pengambilan darah vena dianjurkan pasien dalam posisi duduk. Beberapa penelitian melaporkan efek kadar kolesterol total yang disebabkan oleh posisi duduk subjek selama pemeriksaan darah. Ada bukti bahwa perubahan posisi dari 30 menit terlentang sampai 30 menit berdiri dapat meningkatkan 9,3% dari konsentrasi total kolesterol. Penelitian lain menunjukkan bahwa pemeriksaan darah setelah transisi dari berdiri ke telentang dapat menghasilkan penurunan 4-6% kolesterol total dibandingkan dengan pemeriksaan darah setelah transisi dari berdiri ke duduk.

3. Preparasi Sampel

Antikoagulan yang umum direkomendasikan untuk plasma adalah disodium Ethylenediaminetetraacetate (EDTA). Hemolisis mungkin terjadi selama pengambilan darah dan penanganan. Ini akan menghasilkan nilai kolesterol tinggi, jika metode langsung “Liebermann-Burchard” yang digunakan. Untuk metode enzimatik, hanya hemolisis gross memiliki efek pada peningkatan kolesterol, lipemik dapat mempengaruhi pengukuran trigliserida dengan mengganggu pengukuran absorbansi.

4. Penyimpanan Sampel

Direkomendasikan bahwa untuk pemeriksaan kolesterol total dan HDL harus segera dilakukan setelah sampel diambil (harus fresh). Penyimpanan sampel segar selama lebih dari 3 hari pada 4°C menyebabkan penurunan kadar kolesterol HDL sekitar 8,2% sampai 14,9% dan pada sampel beku selama lebih dari 14 hari pada suhu -20°C dapat juga menurunkan kadar HDL, sedangkan penyimpanan pada suhu yang lebih rendah tidak menghasilkan perubahan tersebut.

Cara penyimpanan sebelum analisis kolesterol dan trigliserida yaitu penyimpanan menggunakan lemari es dan analisis tampaknya tidak menjadi penting jika bahan yang dianalisis dalam beberapa hari dan kontaminasi bakteri dihindari. Pembekuan dalam botol yang tepat pada suhu -20°C selama 1 tahun atau pada suhu -60°C untuk jangka waktu yang lebih lama. Namun, sebuah penelitian baru menyatakan bahwa penyimpanan jangka panjang serum pada suhu -70°C menunjukkan penurunan 2% per tahun untuk kolesterol total lebih dari 7 tahun 2,8% per tahun pada trigliserida, dan 1,3% (tidak signifikan) per tahun untuk HDL kolesterol.

5. Pengolahan Sampel

Untuk persiapan serum, sampel darah diperbolehkan untuk menggumpal pada tidak lebih dari 20° C biasanya sampai 1 jam sebelum sentrifugasi. Spesimen darah harus disentrifugasi pada suhu tidak lebih dari 20° C minimal 1500 rpm selama 10 menit. Sampel darah keseluruhan tidak boleh dibekukan selama pemrosesan. Untuk persiapan plasma, setelah pencampuran menyeluruh dari sampel darah dengan EDTA, sampel darah harus didinginkan. Dalam waktu 3 jam (dan sebaiknya dalam waktu 1 jam), tabung harus disentrifugasi pada 4° C dalam sentrifugasi didinginkan pada 1500 rpm selama 30 menit. Jika sentrifus didinginkan tidak tersedia dalam 3 jam dari pengambilan, sampel dapat disentrifugasi pada suhu kamar dalam waktu 1 jam dari pengambilan, dan plasma disimpan pada suhu 4° C.

2.3.1.2 Analitik

1. Pemeriksaan Sampel

Metode enzimatik dengan analisa otomatis, yang telah digunakan sejak 1980-an, telah menjadi metode standar dalam pengukuran kolesterol. Metode tersebut memungkinkan presisi yang sangat baik, asalkan digunakan dengan hati-hati dan kalibrasi dengan benar.

Trigliserida diukur secara enzimatik dalam serum atau plasma dengan menggunakan reaksi dimana trigliserida pertama kali dihidrolisis untuk menghasilkan gliserol. Penentuan LDL secara tradisional dilakukan dengan rumus Friedwald yaitu $LDL = \text{kolesterol total} - HDL - 0,45 \times \text{trigliserida}$. Perhitungan ini memiliki beberapa kelemahan. Penentuan LDL ini membutuhkan sampel dari

pasien yang puasa dan hasilnya dipengaruhi pada kadar trigliserida yang tinggi (Hawab, 2007).

2. Teknik Pemipetan

a. Mikropipet

Biasanya pipet digunakan untuk membantu memasukkan cairan dalam jumlah kecil ke dalam suatu media. Pipet digunakan di laboratorium baik itu dalam bidang kedokteran, biologi, atau kimia. Terdapat berbagai macam jenis dan ukuran dari pipet tergantung tujuannya masing-masing.

Ada pipet yang dibentuk dari plastik ataupun kaca. Pada ujung pipet terdapat karet seperti bentuk pompa yang digunakan untuk menarik atau menghembuskan cairan yang masuk ke dalam pipa dari pipet tersebut. Keakuratan dari fungsi pipet itu sendiri tergantung dari jenis pipet tersebut. Biasanya penggunaan pipet kaca tersebut hanya mampu memindahkan cairan dengan volume tidak lebih dari 1 ml. Sedangkan untuk memindahkan cairan dengan volume lebih dari 1 ml bahkan sampai 1000 mikroliter, maka kebanyakan akan memilih untuk menggunakan mikropipet.

Pada awalnya pipet terbuat dari kaca, sebagian lagi dibuat dengan plastik yang dapat diremas, hal tersebut dibuat apabila terdapat cairan yang tidak dibutuhkan dalam pipet dapat dikeluarkan dengan diremas. Kemudian, seorang dokter asal Jerman yang bernama Dr. Heinrich Schnitger mematenkan sebuah Mikropipet pada tahun 1957 dan pada tahun 1961. Mikropipet mulai diproduksi secara komersial.

Untuk mendapatkan hasil yang akurat dan presisi yang baik, seseorang cenderung menggunakan mikropipet atau yang biasa disebut dengan pipet

otomatis. Bila menggunakan mikropipet, seseorang dapat mengatur berapa jumlah volume yang diperlukan selama masih dalam skala volume pipet tersebut. Walaupun pada setiap tempat yang memproduksi alat tersebut telah merancang pengaturannya dengan akurat, tetap saja sebuah mikropipet harus dikalibrasi oleh laboratorium yang bila perlu laboratorium sudah terakreditasi.

Kalibrasi sangatlah penting untuk menjaga nilai standar. Sebuah laboratorium harus memeriksa ulang pengaturan yang sudah dipasang pada sebuah mikropipet dan membandingkannya dengan nilai standar berdasarkan aturan yang sudah berlaku sebelumnya. Melakukan kalibrasi bukanlah perkara yang mudah, hal tersebut melibatkan banyak unsur prosedur, berbagai pihak serta jenis-jenis pipet lainnya sebagai tolak ukur. Ketelitian terhadap tepatnya volume cairan sebuah Mikropipet sangatlah diperhatikan, begitu pula seseorang yang menjadi operator harus mengikuti pelatihan khusus terhadap pengoperasian dan keakuratan penggunaan sebuah Mikropipet.

Mikropipet sendiri memiliki beberapa bagian penting diantaranya, Automatic pipettor dan pipette tips. Masing-masing bagian tersebut memiliki fungsi. Automatic pipettor memiliki fungsi untuk memindahkan cairan dengan memompanya sesuai dengan volume yang sudah diatur, sedangkan pipette tips adalah pasangan dari mikropipet itu sendiri yang bertugas menampung cairan yang akan dipompa.

b. Penggunaan Mikropipet

Tahapan penggunaan mikropipet dengan baik dan benar antara lain:

- 1) Mengatur volume yang akan digunakan
- 2) Memasang tip disposable

- 3) Menekan penyedot hingga pembatas pertama
- 4) Memasukkan tip kedalam sampel
- 5) Mengambil sampel yang akan digunakan
- 6) Kemudian tahan
- 7) Menarik bagian tip
- 8) Mengeluarkan sampel
- 9) Menarik bagian pipet
- 10) Melepaskan tekanan pada penyedot
- 11) Melepaskan bagian tip

c. Jenis dan macam-macam Mikropipet

Sesuai dengan ukurannya terdapat 3 jenis dasar dari Mikopipet yang sering digunakan di laboratorium, yaitu :

- 1) Mikropipet P1000 digunakan untuk mengambil cairan pada volume berkisar 100-1000
- 2) Mikropipet P200 digunakan untuk mengambil cairan pada volume berkisar 20-200
- 3) Mikropipet P20 digunakan untuk mengambil cairan pada volume berkisar 2-20

d. Terdapat beberapa saran agar mendapatkan hasil optimal saat menggunakan Mikropipet

Hal-hal yang harus dihindari, diantaranya yaitu :

- 1) Apabila tidak terdapat tip diujung pipet, sebaiknya jangan digunakan.
- 2) Tidak boleh ada larutan yang sampai masuk ke bagian dalam pipet,hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi.

- 3) Menggunakan pipet dengan memutar volume melebihi ukuran yang paling maksimal dapat menyebabkan ketidakakuratan ukuran bahkan dapat merusak pipet tersebut.
- 4) Jangan terlalu keras menekan tip saat memasangnya, namun jangan terlalu lemah juga, karena sewaktu-waktu akan menjatuhkan tip saat mengerjakannya.
- 5) Penekanan tombol pipet tidak melebihi batas normalnya karena jika tidak, akan menyebabkan pengambilan larutan yang berlebihan.
- 6) Tombol penekan jangan dilepas secara tiba-tiba ketika sedang mengambil larutan, hal tersebut akan berdampak masuknya larutan ke dalam pipet serta menyebabkan ukuran menjadi tidak akurat. Sebaiknya tombol dilepas secara perlahan-lahan.

e. Tip

1) Penggunaan Tip

Apabila diperhatikan, akan terlihat bahwa semua tip pipet tampak seragam, namun tidak semua pipet akan cocok dengan semua tip yang tersedia. Untuk menentukan keakuratan dalam melakukan pipetasi, pemilihan tip sangatlah penting. Sebaiknya, penggunaan tip disesuaikan dengan merk yang sama dengan pipetnya. Namun, apabila tersedia tip yang berbeda dengan merknya maka sebaiknya diperhatikan hal-hal berikut:

- a) Tip yang akan digunakan harus bersih dan tidak mengandung partikel debu.
- b) Bentuk dari bagian yang menempel ke pipet serta ujung dari tip harus benar-benar rapi dan halus
- c) Tampak bening, tembus cahaya atau transparan.

- d) Kuat terhadap berbagai bahan kimia.
- e) Memiliki keterangan untuk nomor identifikasi, nomor batch serata sertifikat mutu yang merupakan hal penting dalam menjamin kualitas dari sebuah tip.
- f) Menggunakan kemasan yang sesuai, baik yang dikemas secara bulk, atau yang sudah rapi berjejer dalam rak, serta ada juga yang sudah melakukan sterilisasi, dll.

f. Kontaminasi saat menggunakan pipet

Saat menggunakan pipet dapat terjadi kontaminasi, berikut macam jenis, penyebab dan pencegahannya.

1) Kontaminasi dari Pipet ke Sampel

Sebab : Menggunakan pipet atau tip yang sudah pernah terkontaminasi oleh suatu bahan.

Pencegahan : Lakukan sterilisasi pada bagian pipet yang akan kontak dengan sampel. Pergunakan tips yang masih steril, serta mengganti tip setiap kali akan berrganti sampel.

2) Kontaminasi dari Sampel ke Pipet

Sebab : Sampel yang berasal dari sampel kontak yang telah memasuki bagian dari pipet.

Pencegahan : Pipet harus selalu disimpan dalam keadaan vertical, jangan diposisikan miring atau menggunakan filter tip.

3) Kontaminasi dari Sampel ke Sampel

Sebab : Saat mengambil sampel yang berbeda, menggunakan tip yang sudah pernah dipakai sebelumnya atau bekas.

Pencegahan : Setiap kali mengambil sampel yang berbeda dianjurkan selalu mengganti tip.

3. Kalibrasi Alat

Kalibrasi yang tepat dari instrumen pengukuran sangat penting untuk presisi dan akurasi pengukuran. Hal yang penting adalah kalibrator sekunder, yang harus menggunakan serum atau plasma manusia, idealnya dalam bentuk yang sama dengan sampel darah. Hanya dengan kalibrator tersebut seseorang bisa memastikan bahwa tidak ada efek matriks. Untuk keandalan kalibrator sekunder, harus dapat dilacak pada metode referensi yang diakui secara internasional (Tahir, 2008).

4. Pemantapan Mutu Internal (PMI) dan Pemantapan Mutu Eksternal (PME)

Setiap laboratorium setidaknya menyiapkan dua pool serum kontrol, yang harus berlangsung melalui periode pemeriksaan secara keseluruhan. Satu pool harus dibuat dari serum manusia non-keruh, mengandung kadar normal pada kolesterol total dan konsentrasi trigliserida. Pool disimpan dalam botol kaca tertutup rapat dan disimpan beku pada -60°C atau dibawahnya. Pool ini digunakan baik untuk kolesterol total dan HDL-kolesterol untuk kontrol metode, pool lain adalah untuk kolesterol yang rendah. Itu mengandung 1,30 -1,60 mmol/l kolesterol. Hal ini dapat dibuat dari pool serum manusia diencerkan dengan konsentrasi kolesterol yang sesuai dengan 0.15m NaCl, atau menggunakan pool serum hewan (sapi, kuda) sedikit diencerkan dengan tingkat konsentrasi kolesterol yang diinginkan.

Kualitas spesimen kontrol harus diperlakukan sama dengan sampel uji. Setiap menjalankan analisis dimulai dengan kalibrasi standar (s), diikuti oleh

sampel PMI. Hasilnya digunakan untuk menunjukkan apakah pemeriksaan berada dalam kontrol dan apakah pemeriksaan berada dalam kontrol dan apakah analisis sampel dapat dimulai/ dilaksanakan.

Batas-batas peringatan dalam pengendalian mutu internal adalah $\pm 3\%$ untuk kolesterol total dan $\pm 6\%$ untuk HDL kolesterol. Batas maksimum adalah $\pm 4,5\%$ untuk kolesterol total dan $\pm 9\%$ untuk HDL kolesterol. Jika nilai-nilai kontrol melampaui batas running harus dihentikan dan hasilnya tidak bisa digunakan, penyebab masalah harus dihilangkan, dan metode harus dikendalikan sebelum pemeriksaan sampel dimulai.

PME melengkapi PMI dan tujuan utamanya adalah untuk memeriksa akurasi (bias). Bias harus berada dalam $\pm 5\%$ untuk kolesterol total dan $\pm 7,5\%$ untuk HDL kolesterol. Penentuan kolesterol sebuah laboratorium hanya dapat dipercaya jika dapat menunjukkan partisipasi sukses dalam program pengendalian mutu eksternal yang diselenggarakan oleh laboratorium rujukan yang berkualitas. Dua program pengendalian mutu internasional utama yang terorganisir, satu oleh WHO Regional Lipid Pusat Referensi (WHO-RLRC) di Praha, Republik Ceko, dan satu oleh CDC, Atlanta, Amerika Serikat. Dua laboratorium rujukan berkolaborasi, untuk memastikan bahwa standar mereka berada dikesepakatan bersama (Sukorini, 2010).

2.3.1.3 Pasca Analitik

Mencantumkan nilai rujukan pada setiap parameter yang diperiksa. Semua hasil pemeriksaan idealnya harus dilaporkan ke 2 desimal dalam SI Unit Internasional. Namun, unit lama (misal mg/dl) masih sering digunakan. Hasil yang diperoleh dalam mmol/l harus dihitung dan dilaporkan dengan dua desimal. Hasil yang diperoleh dalam mg/dl harus dihitung satu desimal, tetapi konsentrasi kolesterol total kemudian harus dilaporkan, dibulatkan ke bilangan bulat dan konsentrasi HDL kolesterol yang dihitung, yaitu untuk satu desimal. Faktor konversi kolesterol dari mg/dl ke mmol/l adalah : 0,025864. Faktor konversi trigliserida dari mg/dl ke mmol/l adalah : 0,0114.

1. Interpretasi Hasil
2. Pelaporan Hasil

2.3.2 Teknik Sentrifugasi

1. Dasar Teori

Campuran dapat tersusun atas beberapa unsur ataupun senyawa. Komponen-komponen penyusun suatu campuran tersebut dapat dipisahkan berdasarkan sifat fisika zat penyusunnya. Salah satu metode yang digunakan dalam pemisahan campuran adalah sentrifugasi. Sentrifugasi ialah proses pemisahan partikel berdasarkan berat partikel tersebut terhadap densitas layangnya (*bouyant density*). Dengan adanya gaya sentrifugal maka akan terjadi perubahan berat partikel dari keadaan normal pada 1 xg (sekitar 9,8 m/s²) menjadi meningkat seiring dengan kecepatan serta sudut kemiringan perputaran partikel tersebut terhadap sumbunya.

Dalam bentuk yang sangat sederhana sentrifus terdiri atas sebuah rotor dengan lubang-lubang untuk meletakkan cairan wadah/tabung yang berisi cairan

dan sebuah motor atau alat lain yang dapat memutar rotor pada kecepatan yang dikehendaki. Semua bagian lain yang terdapat pada sentrifus modern saat ini hanyalah perlengkapan yang dimaksudkan untuk melakukan berbagai fungsi yang berguna dan mempertahankan kondisi lingkungan saat rotor tersebut bekerja (Muina, 2013).

Gaya yang berperan dalam sentrifus adalah gaya sentrifugal yang menyatakan bahwa setiap partikel yang berputar pada kecepatan sudut yang konstan memperoleh gaya keluar sebesar F . Besar gaya tergantung pada kecepatan sudut (ω) dan radius perputaran (r, cm). Perhatikan persamaan rumus pada Tabel 2.3 di bawah ini :

Tabel 2.3 Rumus Persamaan Gaya dalam proses sentrifugasi

$$F = \omega^2 r$$

Pemisahan sentrifugal menggunakan prinsip dimana objek diputar secara horizontal pada jarak tertentu. Apabila objek berotasi di dalam tabung atau silinder yang berisi campuran cairan dan partikel, maka campuran tersebut dapat bergerak menuju pusat rotasi, namun hal tersebut tidak terjadi karena adanya gaya yang berlawanan yang menuju kearah dinding luar silinder atau tabung, gaya tersebut adalah gaya sentrifugasi. Gaya inilah yang menyebabkan partikel-partikel menuju dinding tabung dan terakumulasi membentuk endapan (Zulfikar, 2008).

Instrumen sentrifus, Rotor, dan Tabung (wadah sampel) ialah komponen utama pada proses sentrifugasi. Sedangkan bagian yang sifatnya asesoris umumnya bergantung mengikuti aplikasi yang akan dilakukan pada proses tersebut. Instrumen sentrifus, adalah bagian yang menjadi alat penggerak proses

sentrifugasi karena didalamnya memiliki motor yang mampu berputar dan memiliki pengaturan kecepatan perputaran (Tahir, 2008).

Rotor merupakan komponen sentrifus yang akan menentukan kecepatan yang akan diaplikasikan (*applied speed*) dari suatu proses sentrifugasi serta produk apa yang akan diinginkan dari proses tersebut. Berdasarkan bentuk dan produk hasilnya, rotor dibedakan atas 2 (dua) kategori umum yaitu *Fixed-angleRotor* dan *SwingRotor*. Pada bentuk *Fixed-angleRotor* memiliki sudut kemiringan tetap pada proses sentrifugasi. Hal ini berakibat pada terbentuknya endapan (*pellet*) pada jarak terjauh dari sumbu akibat gaya sentrifugal. Umumnya bentuk *Fixed-angle* ini mampu dioperasikan pada kecepatan yang sangat tinggi. Lain halnya dengan bentuk *SwingRotor*, yang memiliki bentuk berupa lengan utama yang dihubungkan dengan tempat peletakan tabung (*bucket*). Pada proses sentrifugasi ini rotor akan membentuk sudut siku sempurna untuk memisahkan partikel dan membentuk band (daerah) yang mempermudah untuk pengambilan sampel bila ia tercampur.

Ada empat jenis sentrifus yaitu mikrosentrifugasi, sentrifugasi kecepatan tinggi, sentrifugasi dingin, dan sentrifugasi ultra . Sentrifus yang sederhana telah digunakan dalam biologi dan biokimia untuk mengisolasi dan memisahkan biomolekul, organel-organel sel, atau sel secara keseluruhan (Muina, 2013).

2. Klasifikasi

a. Berdasarkan kecepatannya, sentrifugasi dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

1. Kecepatan rendah (3000 – 6000 rpm)
2. Kecepatan sedang (6000 – 20000 rpm)

3. Kecepatan tinggi (20000 – 100000 rpm)
 - b. Berdasarkan fungsi dan tujuannya, sentrifugasi dibedakan menjadi 2, yaitu:
 1. Sentrifugasi analitik, yaitu sentrifugasi yang tidak berkelanjutan dan biasanya hanya digunakan untuk praktikum-praktikum biasa di laboratorium.
 2. Sentrifugasi preparatif, yaitu sentrifugasi yang digunakan untuk analisis berkelanjutan.
 - c. Berdasarkan suhu, sentrifugasi dapat diklasifikasikan sebagai berikut:
 1. Suhu ruang
 2. Suhu dingin

Berdasarkan klasifikasi tersebut dapat diketahui bahwa ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil dalam pemeriksaan HDL kolesterol.

2.3.3 Teknik Spektrofotometri

Spektrofotometer adalah suatu alat atau instrument untuk mengukur transmisi atau absorben suatu contoh sebagai fungsi dari suatu panjang gelombang (Cairns 2009). Sedangkan spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang umum digunakan dalam menentukan komposisi suatu sampel secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diadsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Khopkar, 2007).

Adapun beberapa jenis spektrofotometer yang sering digunakan dalam praktikum, yaitu single beam (berkas sinar tunggal) spektrofotometri double beam (berkas sinar ganda) spektrofotometri dan Gilford spektrofotometri. Single beam spektrofotometri banyak digunakan karena harganya yang murah dan hasilnya cukup berkualitas dan memuaskan. Spektrofotometri jenis ini hanya terdiri atas satu berkas sinar, sehingga dalam praktek pengukuran sampel dan larutan blanko atau standar harus dilakukan bergantian dengan seel yang sama.

Untuk double beam spektrofotometri biasa ditemui pada spektrofotometri yang telah memakai otomatis absorpsi (A) sebagai fungsi panjang gelombang, serta mempunyai dua buah berkas sinar sehingga dalam pengukuran absorpsi tidak perlu bergantian antara sampel dan larutan blanko, tapi dapat dilakukan secara parallel. Sedangkan Gilford spektrofotometri banyak digunakan dilaboratorium biokimia dan mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan spektrofotometri biasa, karena mampu membaca absorpsi sampai tiga satuan (Cairns, 2009).

Spektrofotometer biasanya menggunakan sinar ultra violet, infra merah, atau cahaya tampak. Pengukuran absorpsi atau transmitansi suatu system di daerah ultra violet (UV) digunakan lampu deuterium yang menghasilkan sinar dengan panjang gelombang 190-380 nm. Pengukuran menggunakan sinar tampak menggunakan lampu iodide yang mampu menghasilkan sinar 380-1000 nm. Warna komplementer atau warna kontras adalah warna yang berkesan berlawanan satu dengan lainnya. Warna kontras bisa didapatkan dari warna yang bersebrangan dan terdiri atas warna primer dan sekunder. Warna kontras komplementer yang diserap oleh spektrofotometer dalam bentuk cahaya monokromatik, yakni dua

warna yang saling berseberangan (memiliki sudut 180 derajat) dengan kontras yang paling kuat (Huda 2001).

2.4 Hipotesis

Tidak ada perbedaan kadar HDL kolesterol dengan cara Semi-mikro dan Makro.