

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

2.1.1 Protein Total

Protein total adalah suatu plasma protein yang disintesa terutama di sel parenkim hati, sel plasma, kelenjar limfe, limpa dan sumsum tulang. Protein total terdiri dari albumin dan globulin. (DEPKES RI, 2010)

Tes fungsi hati adalah tes yang menggambarkan kemampuan hati untuk mensintesa protein (albumin, globulin, faktor koagulasi) dan memetabolisme zat yang terdapat di dalam darah. (DEPKES RI, 2011)

Pengukuran protein total berguna dalam mengidentifikasi berbagai gangguan pada tubuh. Penurunan konsentrasi protein total dapat terdeteksi pada penurunan sintesa protein dari hati, kehilangan protein karena fungsi ginjal terganggu, malabsorpsi atau defisiensi gizi. Peningkatan kadar protein juga terjadi pada gangguan inflamasi kronis, sirosis hati dan dehidrasi. (Insert kit, 2016)

2.1.2 Sampel Pemeriksaan

Sampel untuk pemeriksaan total protein adalah serum atau plasma. Stabilitas sampel selama 6 hari jika disimpan pada suhu 20 - 25 ° C, stabil selama 4 minggu jika disimpan pada suhu 4 - 8 ° C dan stabil sekurangnya 1 tahun jika disimpan pada suhu - 20 ° C. Jangan menggunakan spesimen beku ulang atau terkontaminasi. (Insert kit, 2016)

2.1.3 Metode Pemeriksaan Total Protein

Analisa protein dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara kualitatif dan secara kuantitatif. Analisa protein secara kualitatif yaitu dengan reaksi Xantoprotein, reaksi Hopkins-Cole, reaksi Millon, reaksi Nitropusida dan reaksi Sakaguchi, sedangkan analisa protein secara kuantitatif yaitu dengan metode Kjeldahl, metode titrasi formol, metode Lowry, metode spektrofotometri *visible* (Biuret) dan metode spektrofotometri UV. (Burtis, Ashwood, 2008)

2.1.3.1 Reaksi Xantoprotein.

Larutan asam nitrat pekat ditambahkan dengan hati-hati ke dalam larutan protein. Setelah dicampur terjadi endapan putih yang dapat berubah menjadi kuning apabila dipanaskan. Reaksi yang terjadi ialah nitrasi pada inti benzena yang terdapat pada molekul protein. Reaksi ini positif untuk protein yang mengandung tirosin, fenilalanin dan triptofan. (Achmad, 2011)

2.1.3.2 Reaksi Hopkins-Cole.

Larutan protein yang mengandung triptofan dapat direaksikan dengan pereaksi Hopkins-Cole yang mengandung asam glioksilat. Pereaksi ini dibuat dari asam oksalat dengan serbuk magnesium dalam air. Setelah dicampur dengan pereaksi Hopkins-Cole, asam sulfat dituangkan perlahan-lahan sehingga membentuk lapisan di bawah larutan protein. Beberapa saat kemudian akan terjadi cincin ungu pada batas antara kedua lapisan tersebut. (Sumardjo, 2008)

2.1.3.3 Reaksi Millon.

Pereaksi Millon adalah larutan merkuro dan merkuri nitrat dalam asam nitrat. Apabila pereaksi ini ditambahkan pada larutan protein, akan menghasilkan endapan putih yang dapat berubah menjadi merah oleh pemanasan. Pada dasarnya reaksi ini positif untuk fenol-fenol, karena terbentuknya senyawa merkuri dengan gugus hidroksifenil yang berwarna. (Sumardjo, 2008)

2.1.3.4 Reaksi Natriumnitroprusida

Natriumnitroprusida dalam larutan amoniak akan menghasilkan warna merah dengan protein yang mempunyai gugus –SH bebas. Jadi protein yang mengandung sistein dapat memberikan hasil positif. (Sumardjo, 2008)

2.1.3.5 Reaksi Sakaguchi

Pereaksi yang digunakan ialah naftol dan natriumhipobromit. Pada dasarnya reaksi ini memberikan hasil positif apabila ada gugus guanidin. Jadi arginin atau protein yang mengandung arginin dapat menghasilkan warna merah. (Sumardjo, 2008)

2.1.3.6 Metode Kjeldahl.

Metode ini merupakan metode yang sederhana untuk penetapan nitrogen total pada asam amino, protein, dan senyawa yang mengandung nitrogen. Sampel didestruksi dengan asam sulfat dan dikatalisis dengan katalisator yang sesuai sehingga akan menghasilkan amonium sulfat. Setelah pembebasan alkali dengan kuat, amonia yang terbentuk disuling uap secara kuantitatif ke dalam larutan penyerap dan ditetapkan secara titrasi. (Sumardjo, 2008)

2.1.3.7 Metode Spektrofotometri UV

Asam amino penyusun protein diantaranya adalah triptofan, tirosin dan fenilalanin yang mempunyai gugus aromatik. Triptofan mempunyai absorpsi maksimum pada 280 nm, sedang untuk tirosin mempunyai absorpsi maksimum pada 278 nm. Fenilalanin menyerap sinar kurang kuat dan pada panjang gelombang lebih pendek. Absorpsi sinar pada 280 nm dapat digunakan untuk estimasi konsentrasi protein dalam larutan. Supaya hasilnya lebih teliti perlu dikoreksi kemungkinan adanya asam nukleat dengan pengukuran absorpsi pada 260 nm. Pengukuran pada 260 nm untuk melihat kemungkinan kontaminasi oleh asam nukleat. Rasio absorpsi 280/260 menentukan faktor koreksi yang ada dalam suatu tabel.(Burtis, Ashwood, 2008)

2.1.3.8 Metode Biuret

Larutan protein dibuat alkalis dengan NaOH kemudian ditambahkan larutan CuSO₄ encer. Uji ini untuk menunjukkan adanya senyawa-senyawa yang mengandung gugus amida asam yang berada bersama gugus amida yang lain. Uji ini memberikan reaksi positif yaitu ditandai dengan timbulnya warna merah violet atau biru violet.(Sumardjo, 2008)

Pembentukan bahan – bahan kimia tertentu pada larutan protein kemungkinan dapat mengakibatkan larutan protein yang semula tidak berwarna menjadi berwarna. Reaksi pembentukan warna protein sering dipakai untuk menunjukkan adanya protein atau protein tertentu, walaupun beberapa diantara reaksi – reaksi tidak spesifik karena

beberapa zat lain dengan reagen yang sama memberikan hasil yang sama. (Sumardjo, 2008)

Pemeriksaan protein total menggunakan metode Biuret. Prinsipnya yaitu ion kupri akan bereaksi dengan protein dalam suasana basa membentuk kompleks berwarna ungu. Absorbansi kompleks ini sebanding dengan konsentrasi protein dalam sampel. (Burtis, Aswood. 2008)

2.1.4. Reagen Biuret

Reagen Biuret berisi Na K Tartrat , ion cupri dan larutan alkali. (Sumardjo.2008). Reagen biuret terdiri dari larutan NaOH dan CuSO₄ (Burtis, Aswood. 2008). Komposisi dan konsentrasi reagen biuret meliputi

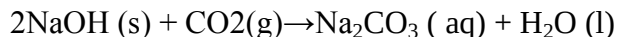
R1	Sodium Hydroxide	100	mmol/L
	Potassium sodium tartrate	17	mmol/L
R2	Sodium Hydroxide	500	mmol/L
	Potassium sodium tartrate	80	mmol/L
	Potassium iodide	75	mmol/L
	Copper sulphate	30	mmol/L (Inser Kit 2016)

2.1.4.1 Natrium Hydroxide (NaOH)

NaOH berwarna putih, berbentuk pellet, serpihan atau batang atau bentuk lain. Sangat basa, keras, rapuh dan menunjukkan pecahan hablur. Bila dibiarkan di udara maka akan cepat menyerap CO₂. Dan lembab, mudah larut dalam air dan dalam etanol tetapi tidak larut dalam eter. NaOH membentuk basa kuat jika dilarutkan dalam

air, NaOH murni merupakan padatan berwarna putih. Senyawa ini sangat mudah terionisasi membentuk ion natrium dan hidroksida.

NaOH bersifat higroskopis, menyerap CO₂ dari udara. Reaksinya sebagai berikut :



Ini berarti bahwa reagen NaOH tidak murni dan harus segera digunakan. (Atkinson .2017)

2.1.4.2 Potassium sodium tartrate (K Na Tartrat)

Disebut juga garam Rochelle atau garam Seignette. Digunakan sebagai stabiliser atau buffer.(FAO.2017)

2.1.4.3 Potassium iodide

Larutan ini stabil. Dapat bereaksi keras reducing agent. Bereaksi dengan bahan organik. Kompatibel dengan arang ozon, logam, arsenic, karbon, fosfor, sulfur, hidrida logam alkali, alkali hidrida logam tanah, sulfida (antimon sulfide, sulfida arsenic, sulfida tembaga, sulfida timah), sianida, tiosianat, mangan dioksida, hidrogen peroksida. Mengoksidasi secara kuat bila dicampur dengan larutan asam. (Merck.2017)

2.1.4.4 Copper sulphate

Berbentuk Kristal atau bubuk berwarna biru, larut dalam methanol, gliserol dan sedikit larut di etanol. Bersifat stabil dan tidak bereaksi dengan air. (CEN.2017)

2.1.5 Penyimpanan Reagen

Stabilitas reagen adalah kemampuan suatu produk reagen untuk mempertahankan sifat dan karakteristiknya agar sama dengan yang dimilikinya pada saat dibuat (identitas, kekuatan, kualitas, kemurnian) dalam batasan yang ditetapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan (shelf-life). Shelf-life adalah periode penggunaan dan penyimpanan yaitu waktu dimana suatu produk tetap memenuhi spesifikasinya jika disimpan dalam wadah yang sesuai dengan kondisi penjualan di pasar. (DEPKES RI.2009)

Tanggal kadaluwarsa adalah waktu yang tertera dalam kemasan yang menunjukkan batas waktu diperbolehkannya reagen tersebut dipergunakan karena diharapkan masih memenuhi spesifikasi yang ditetapkan. (DEPKES RI.2009)

Stabilitas reagen biuret selama 1 tahun pada suhu 2 - 25° C, 6 bulan pada suhu ruang (25 - 35° C) atau sebelum masa kadaluwarsa yang tertera pada label etiket. Penyimpanan reagen Biuret diletakkan di tempat tertutup dan tidak terkena cahaya secara langsung dengan suhu 2 – 25 ° C sesuai petunjuk penyimpanan reagen. (Insert Kit.2017).

2.16 Kimia Analyser (Clinical Chemistry)

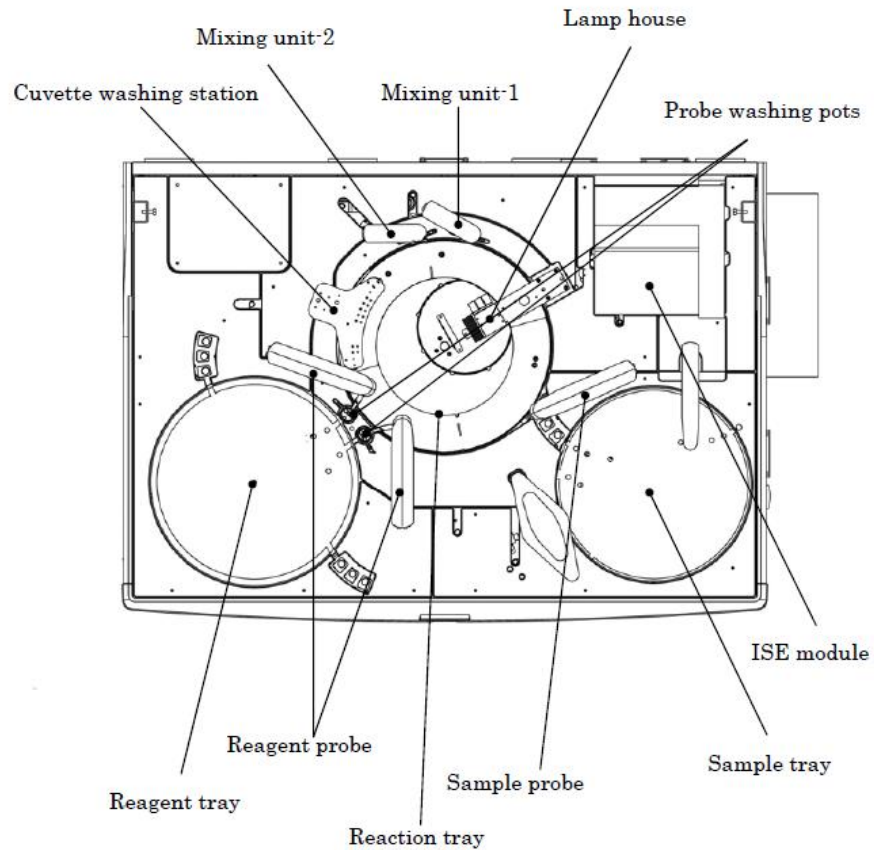
Komponen utama alat kimia analyser meliputi hardware (alat kimia analyser) dan software (komputer atau PC), hardware meliputi sampel tray, reagent tray, reaction tray, probe sampel, probe reagent, probe wash, photometer lamp dan ion selektif electrode (ISE) module. Sedangkan PC berisi software aplikasi program

untuk operating analyser. (Medsys Inc.2016) Berikut spesifikasi alat Tokyo

Boeki jenis TMS 50i.

Througput	: Jumlah test per jam 480 Test
Minimal volume pembacaan cuvette	: 120 mikron
Jenis Sampel yang digunakan	: Serum, Plasma, Wholeblood
Reagent Cooling	:With Cooling unit on Board
Konsumsi Aquabidest yang digunakan : 5 Liter/Jam	
Tipe Mixing system	: Stirer Mixing unit (Pengaduk)
Open sytem	: Open system reagent
Tipe pemeriksaan	: Kimia, Koagulasi, Imunologi
Tipe reaksi	: End Point, Rate (Medsys Inc.2016)

2.1.6.1 Skema komponen utama alat kimia analyser



Gambar 1. Skema komponen utama alat kimia analyser TMS Superior 50i.(Dikutip : Medsys Inc.2016)

Komponen utama alat kimia analyser terdiri dari

- | | | |
|--------------|---|--|
| Sampel tray | : | merupakan tempat untuk meletakkan sampel |
| Probe sampel | : | jarum untuk mengaspirasi sampel |
| Reagen tray | : | tempat meletakkan sampel |

Reagen probe	:	jarum untuk mengaspirasi reagen yang terdiri dari 2 probe yaitu probe R1 dan probe R2
Reaction tray	:	tempat cuvet yang digunakan untuk mereaksikan pemeriksaan.
Mixing unit	:	bagian yang berfungsi untuk mencampurkan
Lamp photometer	:	sebagai sumber cahaya
Probe washing pots	:	tempat untuk melakukan pencucian jarum aspirasi.
Cuvette washing station	:	tempat cuvet dilakukan pencucian.

Prinsip Kerja Alat TMS 50i Superior :

Pengambilan reagent dilakukana oleh *Reagent Probe* dan pengambilan sampel oleh *Sampel Probe*. Pencampuran reaksi dilakukan oleh *mixing unit* di dalam *tray reaction*. Pembacaan absorbansi secara spektrofotometer. Hasil pembacaan abosrban selanjutnya dikonversi ke hasil sesuai satuan hasil. (Medys Inc.2016)

2.1.6.2 *Tray Reagen*



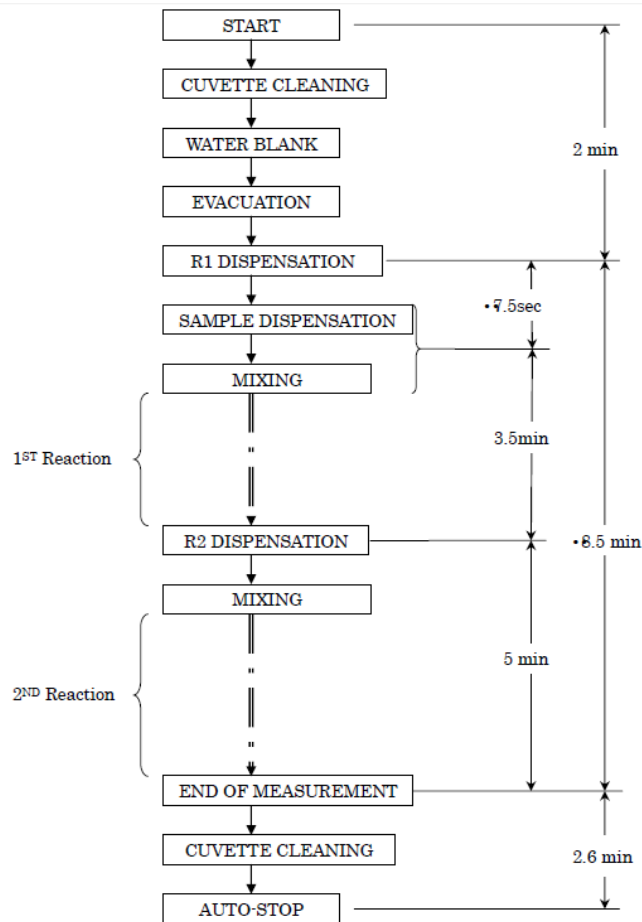
Gambar 2. *Tray Reagen* alat kimia analyser TMS Superior 50i.(Dikutip : Medsys Inc.2016)

Keterangan :

Tempat meletakkan reagen (*reagen tray*) dilengkapi dengan pendingin. Suhu di dalam *tray* reagen 8 – 12 ° C. (Medys Inc.2016)

Reagen sisa setelah digunakan pemeriksaan dapat disimpan dalam *tray* reagen tersebut, tidak perlu diambil disimpan di dalam refrigerator dikarenakan sudah ada pendingin pada *tray* reagen tersebut. (Medys Inc.2016)

2.1.6.3 Alur proses pemeriksaan



Gambar 3. Alur proses pemeriksaan pada alat kima analyser TMS Superior 50i. .(Dikutip : Medsys Inc.2016)

Keterangan :

Alat akan secara otomatis melakukan pemeriksaan setelah dilakukan start, cuvet dan blangko pemeriksaan dipersiapkan, secara otomatis alat akan memipet reagen 1, kemudian memipet sampel dan dihomogenisasikan. Selanjutnya pipetasi reagen R2 , dihomogenisasi dan diinkubasi. Hasil dari reaksi dibaca secara spektrofotometri.

Hasil dikonversikan dalam bentuk digital. Setelah selesai alat akan melakukan pembersihan secara otomatis. (Medsys Inc, 2016).

Prinsip pemeriksaan rutin :

- a. Sebelum dilakukan pemeriksaan alat dihidupkan selanjutnya dilakukan prime untuk pengisian selang- selang yang digunakan untuk pipetting (Transpot fluida : sampel, reagen).
- b. Selanjutnya dilakukan running kontrol : mengetahui kondisi reagent terakhir di alat apakah reagen masih dalam kondisi stabil
- c. Apabila kontrol tidak masuk dapat dilakukan kalibrasi : menyesuaikan kondisi reagent dengan alat agar kontrol masuk dan selanjutnya dapat dilakukan running pasien
- d. Apabila kontrol sudah masuk dapat dilakukan running pasien.
- e. Apabila alat sudah melakukan pemeriksaan, untuk mengakhiri running sampel, sebelum alat akan di *shuttingdown*, dalam jangka waktu lebih dari 10 jam dilakukan *cell washing* (Pencucian cuvette reaksi). (Medsys Inc, 2016)

2.1.7 Hal – hal yang mempengaruhi kadar protein total.

a. Pra Analitik

1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel harus dilaksanakan secara benar agar sampel tersebut mewakili keadaan yang sebenarnya. (DEPKES RI.2013)

2. Kondisi sampel

Serum adalah komponen darah yang berbentuk cairan yang tidak lagi mengandung sel darah tanpa mengandung faktor pembekuan.(DEPKES RI.2010)

Serum lipemik adalah serum yang keruh, putih/ seperti susu karena hiperlipidemia (peningkatan kadar lemak dalam darah) atau adanya kontaminasi bakteri. Serum lipemik dapat mempengaruhi pada saat pengukuran pembacaan spektrofotometri.

Serum Ikterik adalah serum yang berwarna kuning coklat akibat adanya hiperbilirubinemia (peningkatan kadar bilirubin dalam darah). Serum ikterik dapat mempengaruhi pengukuran pada panjang gelombang 400 – 500 nm akibat warna kuning coklat dari spesimen, sehingga tidak mampu dibaca oleh fotometer.(DEPKES RI.2010)

b. Analitik

1. Prosedur pemeriksaan

Dalam melakukan pemeriksaan harus sesuai dengan Standar Prosedur Operasional (SPO).

2. Kompetensi Petugas

Petugas yang melakukan pemeriksaan harus sesuai dengan kompetensinya yaitu sudah mengikuti pelatihan serta lulus mendapatkan sertifikat kompetensi

3. Reagen

Reagen yang digunakan harus sudah divalidasi, tersimpan sesuai dengan prosedur penyimpanan reagen dan belum melewati batas masa kadaluwarsa.

4. Alat

Peralatan yang digunakan harus sudah terkalibrasi dan dilakukan perawatan pemeliharaan secara rutin.

5. Kondisi lingkungan

Ruang laboratorium cukup menampung peralatan yang digunakan, aktifitas dan jumlah petugas yang berhubungan dengan spesimen / pasien untuk kebutuhan pemeriksaan laboratorium.

c. Pasca analitik

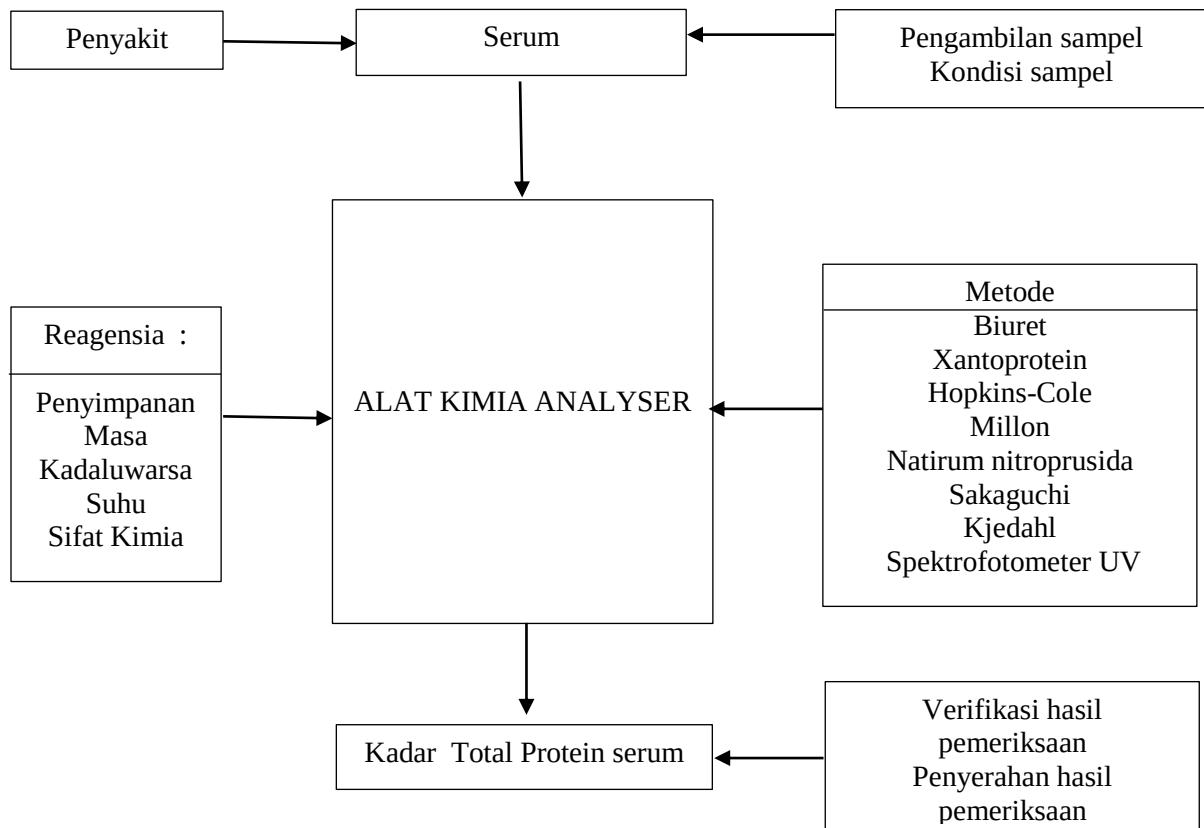
1. Verifikasi hasil

Kesalahan dalam verifikasi hasil meliputi kesalahan proses penulisan hasil pemeriksaan dan penulisan identitas pasien.

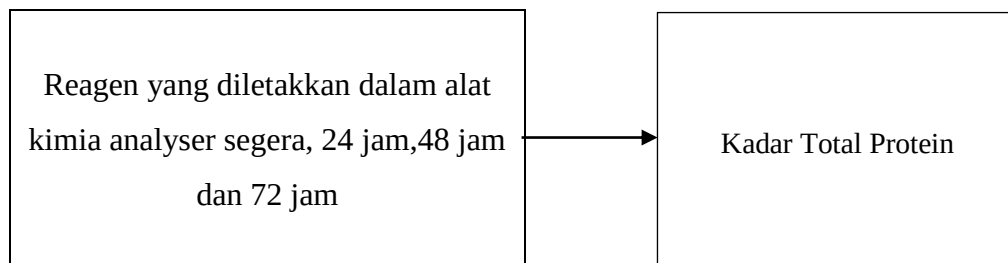
2. Penyerahan hasil

Kesalahan yang terjadi dalam penyerahan hasil dapat terjadi pada saat penyerahan hasil tidak dilakukan pencocokan identitas pasien. (DEPKES RI.2013)

2.2 Kerangka Teori



2.3 Kerangka Konsep



2.4 Hipotesis

Tidak ada perbedaan kadar total protein menggunakan reagen biuret yang diletakkan pada alat kimia analyser segera, 24 jam, 48 jam dan 72 jam.