

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bilirubin

Bilirubin adalah suatu produk penguraian sel darah merah. Setelah sel darah merah menghabiskan rentang umurnya 120 hari, membran sel tersebut menjadi sangat rapuh dan pecah. Hemoglobin dilepaskan dan diubah menjadi bilirubin bebas oleh sel – sel fagositik. Bilirubin bebas berikatan dengan albumin plasma dan mengalir dalam darah menuju hati (Corwin, 2009).

Bilirubin merupakan produk pemecahan sel darah merah. Pemecahan pertama dari sistem RES (*Reticuloendothelial system*) yang diawali dengan pelepasan besi dan rantai peptida globulin (Kosasih, 2008). Bilirubin terbagi menjadi dua jenis yaitu bilirubin indirek yang merupakan bilirubin yang belum mengalami konjugasi oleh hati dengan asam glukoronat dan bilirubin direk yang telah mengalami konjugasi dengan asam glukoronat di dalam hati. Pengukuran bilirubin di laboratorium untuk membedakan bilirubin indirek dan bilirubin direk maka dilakukan juga pemeriksaan bilirubin total yang merupakan pengukuran total bilirubin indirek dan direk (Wibowo, 2007). Bilirubin total dapat diperoleh dengan menjumlahkan kadar bilirubin indirek dengan kadar bilirubin direk. Sedangkan untuk bilirubin indirek cukup dengan melakukan pengurangan kadar bilirubin total dengan bilirubin direk (Sutedjo, 2009).

Bilirubin indirek, sebagian sampai di hati dan masuk ke dalam sel, sedangkan sebagian tetap berada pada sirkulasi tubuh melewati jantung. Bilirubin yang masuk ke sel hati dalam keadaan bebas, berikatan dengan asam glukuronida dan

disebut dengan bilirubin direk atau bilirubin terkonjugasi. Bilirubin direk sebagian besar masuk ke dalam sirkulasi empedu dan sebagian masuk ke dalam sirkulasi darah, sehingga dalam sirkulasi umum terdapat bilirubin indirek dan bilirubin direk. Bilirubin indirek dalam keadaan normal  $< 0,75$  mg% dan bilirubin direk  $< 0,25$  mg%, total bilirubin tidak lebih dari 1 mg%. Bilirubin direk yang memasuki jalur empedu akan terkumpul dalam kantong empedu dan akhirnya masuk ke dalam usus. Bilirubin direk teroksidasi menjadi urobilinogen sampai dalam lumen usus, akibat flora usus (Sutedjo, 2009). Berdasarkan sifat bilirubin terdapat perbedaan antara bilirubin indirek dan bilirubin direk. Perbedaan tersebut tercantum pada tabel 2 berikut.

**Tabel 2. Perbedaan Bilirubin Indirek dan Direk**

<b>Bilirubin Indirek</b>	<b>Bilirubin Direk</b>
Bilirubin yang belum dikonjugasi	Bilirubin yang dikonjugasi
Larut dalam alkohol	Tidak larut dalam alkohol
Terikat oleh protein albumin	Tidak terikat oleh protein
Tidak terdapat dalam urin	Terdapat dalam urin
Tidak dapat difiltrasi oleh glomerulus	Dapat difiltrasi oleh glomerulus
Tidak bereaksi dengan reagent Azo	Langsung bereaksi dengan reagent Azo

(Sumber : Sacher, 2004)

Metabolisme bilirubin meliputi sintesis, transportasi, *intake* dan konjugasi serta ekskresi. Bilirubin merupakan katabolisme dari *heme* pada sistem retikuloendotelial. Bilirubin merupakan pigmen kristal berwarna jingga ikterus yang merupakan bentuk akhir dari pemecahan katabolisme heme melalui proses oksidasi reduksi. Tujuh puluh lima persen produksi bilirubin berasal dari katabolisme hemoglobin dari eritrosit. Satu gram hemoglobin akan menghasilkan 34 mg bilirubin, sisanya 25% berasal dari pelepasan hemoglobin karena eritropoesis yang tidak efektif pada sumsum tulang. Bayi baru lahir akan

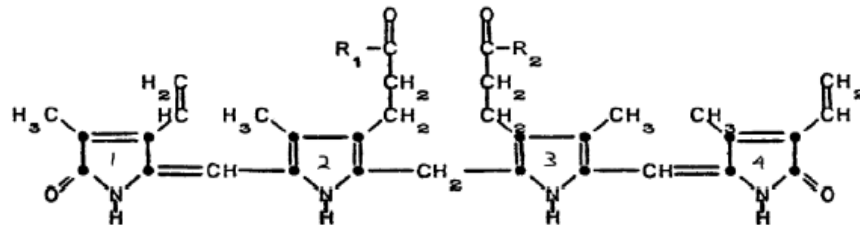
memproduksi 8 sampai 10 mg/kgBB/hari, sedangkan orang dewasa sekitar 3 – 4 mg/kgBB/hari. Peningkatan produksi bilirubin pada bayi baru lahir disebabkan masa hidup eritrosit bayi lebih pendek (70 sampai 90 hari) dibandingkan dengan orang dewasa (120 hari) (Seswoyo, 2016).

Pembentukan bilirubin yang terjadi di sistem retikuloendotelial, selanjutnya dilepaskan ke sirkulasi yang akan berikatan dengan albumin. Bilirubin yang terikat dengan albumin serum tersebut merupakan zat non polar dan tidak larut dalam air dan kemudian akan ditransportasikan ke sel hati. Albumin akan terikat dengan reseptor permukaan sel pada saat kompleks bilirubin albumin mencapai membran plasma hepatosit. Selanjutnya bilirubin ditransfer melalui sel membran yang berikatan dengan ligandin (protein Y). Bilirubin tidak terkonjugasi dikonversi ke bentuk bilirubin konjugasi yang larut dalam air di retikulum endoplasma dengan bantuan enzim *uridine diphosphate glucoronyl transferase* (UDPG-T) (Seswoyo, 2016).

Setelah mengalami proses konjugasi, bilirubin akan diekskresikan ke dalam kandung empedu, kemudian memasuki saluran cerna dan diekskresikan melalui feses. Sedangkan molekul bilirubin tidak terkonjugasi akan kembali ke retikulum endoplasma untuk rekonjugasi berikutnya. Proses bilirubin diserap kembali dari saluran gastrointestinal dan dikembalikan ke dalam hati untuk dilakukan konjugasi ulang disebut sirkulasi enterohepatik (Seswoyo, 2016).

Bilirubin merupakan pigmen kuning yang berasal dari perombakan heme dari hemoglobin dalam proses pemecahan eritrosit oleh sel retikuloendotel. Di

samping itu, sekitar 20% bilirubin berasal dari perombakan zat – zat lain (Sutedjo, 2009).



Gambar 1. Strukur Molekul Bilirubin

**Keterangan :**  $R_1$  (*glucuronic acid*) dan  $R_2$  (*glucuronolactone*). *Methyl* ( $CH_3$ ) dan *Vinyl* ( $CH_2 = CH$ ) kelompok yang berbeda molekulnya. Bilirubin memiliki rumus kimia  $C_{33}H_{36}O_6N_4$  yang terdiri dari 4 cincin pirol dihubungkan oleh 3 karbon. Pada 4 cincin ini terikat gugus metil, 2 gugus *vinyl* dan 2 gugus propinat.

Sel retikuloendotel membuat bilirubin tidak larut dalam air, bilirubin yang disekresikan dalam darah harus diikatkan albumin untuk diangkut dalam plasma menuju hati. Hepatosit yang ada di dalam hati melepaskan ikatan dan mengkonjugasinya dengan asam glukoronat sehingga bersifat larut air, yang disebut bilirubin direk atau bilirubin terkonjugasi. Proses konjugasi melibatkan enzim glukoroniltransferase, selain dalam bentuk diglukoronida dapat juga dalam bentuk monoglukoronida atau ikatan dengan glukosa, *xylosa* dan sulfat. Bilirubin terkonjugasi dikeluarkan melalui proses energi ke dalam sistem bilier (Sutedjo, 2009).

Hati memiliki banyak fungsi yang terkait dengan dengan metabolisme karbohidrat, protein, lemak dan vitamin. Gangguan fungsi hati dapat disebabkan oleh anemia hemolitik, pada keadaan tersebut fungsi hati umumnya normal kecuali bilirubin. Hepatitis, sirosis dan karsinoma hepatitis, ditandai dengan peningkatan enzim

SGOT, SGPT, ALP, GGT, dan protein abnormal sedangkan bilirubin dapat bervariasi. Bilirubin, alkali fosfatase, SGOT dan SGPT akan meningkat, apabila terdapat tumor dan batu empedu (Seswoyo, 2016).

## **2.2 Faktor – faktor yang Berpengaruh terhadap Hasil Pemeriksaan Bilirubin**

Faktor – faktor yang dapat berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan bilirubin terdiri atas faktor luar dan faktor dalam. Faktor dalam meliputi hemolisis dan ikterik. Sedangkan faktor luar meliputi cahaya, suhu, waktu dan tempat penyimpanan (Joyce, 2007).

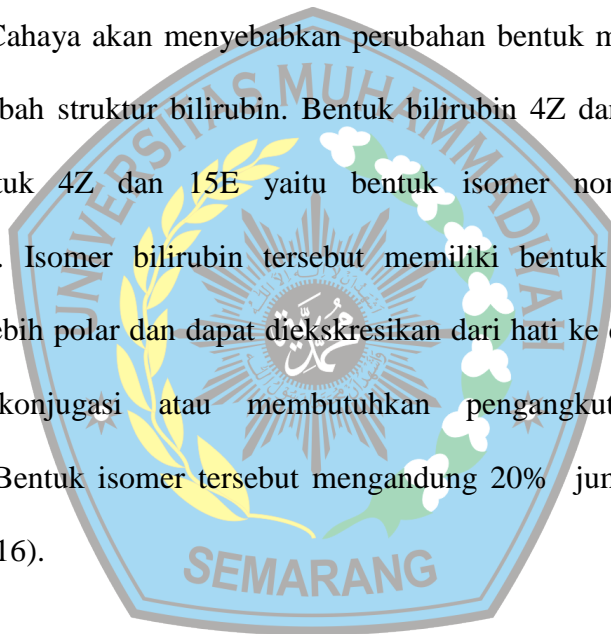
Hemolisis yang dapat berpengaruh terhadap pemeriksaan bilirubin antara lain inkompabilitas ABO atau isoimunisasi Rhesus dan defisiensi G6PD. Selain itu faktor yang berpengaruh terhadap pemeriksaan bilirubin terdiri atas sferositosis herediter, infeksi intrauterina, polisitemia, extravasi sel darah merah, sefalhematom dan konfusio. Faktor lain seperti trauma lahir, ibu diabetes, sidosis, hipoksia atau asfiksia dan sumbatan traktus digestif yang dapat mengakibatkan peningkatan sirkulasi enterohepatik (Joyce, 2007).

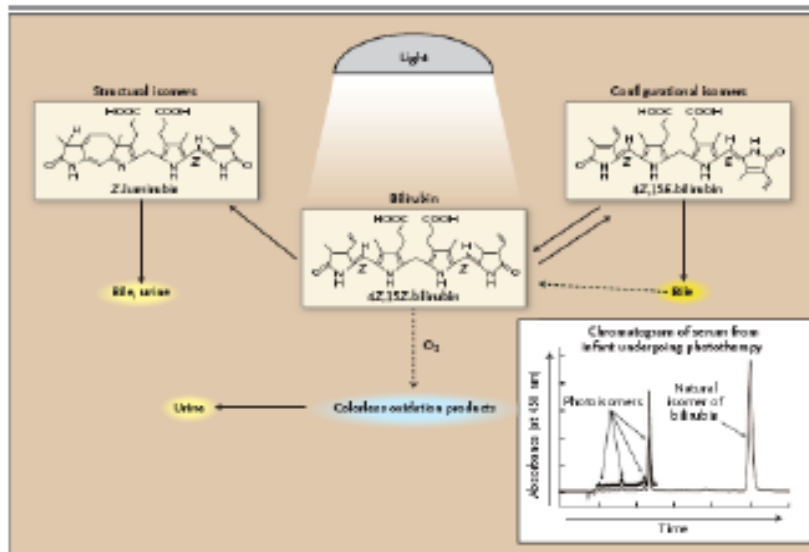
Peningkatan bilirubin dapat terjadi akibat ikterik obstruktif, karena batu atau neoplasma empedu, hepatitis, sirosis hati, mononukleosis infeksiosa, metastasis hati dan penyakit Wilson. Peningkatan bilirubin dapat terjadi akibat pengaruh obat antibiotik (amfoterisin B, klindamisin, eritromisin, gentamisin, linkomisin, oksalisin dan tetrasiklin) serta sulfonamide. Faktor lain, seperti penggunaan obat antituberkulosis (asam para-aminosalisilat, izoniazid), alopurinol dan obat diuretik (asetazolamid dan asam etakrinat). Selain itu konsumsi mitramisin, dekstran, diazepam (valium), barbiturate dan narkotik (kodein,

morfin, meperidin, flurazepam, indometasin, metotreksat, metildopa, papaverin dan proakrilamid) dapat meningkatkan kadar bilirubin. Penggunaan steroid, kontrasepsi oral, torbutamid serta vitamin A, C dan K. Sedangkan untuk penurunan bilirubin dapat disebabkan karena anemia defisiensi besi dan pengaruh obat seperti barbiturate, salisilat (asparin), penisilin dan kafein dalam dosis tinggi (Joyce, 2007).

Cahaya matahari dan cahaya lampu dapat berpengaruh terhadap sifat bilirubin sehingga menyebabkan penurunan konsentrasi bilirubin dalam serum. Pemeriksaan bilirubin dapat menggunakan sampel serum dan plasma. Sampel tidak boleh hemolisis dan terpapar cahaya langsung, karena cahaya matahari maupun cahaya lampu dapat menyebabkan kadar bilirubin turun sampai 50% dalam waktu 1 jam. Pemeriksaan bilirubin harus dilakukan di tempat yang tidak terpapar sinar matahari langsung dan lampu agar terhindar dari faktor resiko. Sampel harus disimpan di tempat yang gelap pada suhu rendah atau menggunakan tabung yang dibungkus dengan kertas gelap atau aluminium foil. Tujuan isolasi sampel dari cahaya adalah agar proses denaturasi protein serum terhambat sehingga kadar bilirubin total tetap stabil. Pengukuran bilirubin harus dilakukan dalam waktu 2 sampai 3 jam (Hardjoeno, 2004). Mekanisme paparan cahaya berpengaruh terhadap penurunan kadar bilirubin total, diawali sampel pemeriksaan bilirubin terpapar cahaya menyerap energi cahaya berupa kalor. Kalor merupakan perpindahan energi cahaya yang disebabkan oleh perbedaan intensitas suhu. Reaksi tersebut akan menyebabkan perubahan pada pirol ke 2 dan 3 pada gugus propionat yang terdapat aldehyd dan keton yang termasuk di dalam

molekul air. Air dihasilkan dari ikatan hidrogen yang diperoleh dari gugus propionat tersebut. Bilirubin memiliki 2 gugus propionat dengan rantai O yang saling berdekatan. Apabila terdapat air mengakibatkan ikatan hidrogen menurun ketika terpapar cahaya. Reaksi tersebut juga terdapat pada fototerapi pada bayi baru lahir yang fungsi hatinya masih melemah untuk mengkonjugasi kadar bilirubin (Puspitosari, 2013). Molekul bilirubin yang terpapar cahaya lampu akan mengalami reaksi fotokimia yang relatif cepat menjadi isomer konfigurasi. Cahaya akan menyebabkan perubahan bentuk molekul bilirubin dan bukan mengubah struktur bilirubin. Bentuk bilirubin 4Z dan 15Z akan berubah menjadi bentuk 4E dan 15E yaitu bentuk isomer nontoksik yang dapat diekskresikan. Isomer bilirubin tersebut memiliki bentuk yang berbeda dari isomer asli, lebih polar dan dapat diekskresikan dari hati ke dalam empedu tanpa mengalami konjugasi atau membutuhkan pengangkutan khusus untuk ekskresinya. Bentuk isomer tersebut mengandung 20% jumlah bilirubin serum (Seswoyo, 2016).





Gambar 2. Reaksi Isomerisasi Pada Proses Fototerapi  
(Speicher, dkk., 1999)

Suhu merupakan salah satu faktor yang dapat berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan kadar bilirubin total. Suhu dapat merusak komponen yang terdapat di dalam serum. Pemeriksaan kadar bilirubin total sebaiknya diperiksa segera. Akan tetapi pemeriksaan bilirubin total dapat juga dilakukan penyimpanan dalam keadaan tertentu. Penyimpanan yang benar tidak akan berpengaruh terhadap stabilitas serum. Sampel tetap stabil dalam waktu sehari apabila disimpan pada suhu 15 – 25 °C, tujuh hari pada suhu 2 - 8 °C dan tiga bulan pada suhu -20 °C. Lama penyimpanan sampel merupakan salah satu faktor yang dapat berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan bilirubin total. Apabila sampel terlalu lama disimpan atau dibiarkan akan berpengaruh terhadap kualitas hasil pemeriksaan bilirubin total dalam serum (Joyce, 2007).

Tabung merupakan tempat menampung sampel yang akan dilakukan pemeriksaan. Tabung yang digunakan merupakan tabung vakum yang terdiri atas



tabung dengan tutup merah tanpa antikoagulan untuk menampung sampel serum. Tabung dengan tutup ungu berisi antikoagulan untuk menampung sampel plasma. Tabung vakum terbuat dari bahan plastik atau kaca yang mudah ditembus cahaya, sehingga mudah berpengaruh terhadap konsentrasi dalam serum/plasma. Tabung vakum yang berisi sampel sebaiknya dibungkus dengan kertas gelap atau aluminium foil pada suhu rendah agar terhindar dari cahaya yang bersifat menembus benda bening dan kestabilan sampel tetap terjaga (Joyce, 2007).

Puspitosari, dkk (2013) mengatakan bahwa kandungan sinar matahari atau lampu yang dapat memberikan pengaruh berupa menurunkan kadar bilirubin adalah sinar biru. Mekanisme ini diawali bilirubin menyerap energi cahaya, yang melalui fotoisomerasi mengubah bilirubin bebas yang bersifat toksik menjadi isomer – isomernya. Lumirubin serta 4Z dan 15E-bilirubin, yang pada akhirnya akan dapat diekskresi oleh hati dan ginjal tanpa memerlukan konjugasi. Sinar biru yang merupakan kandungan dalam sinar matahari atau lampu tersebut dapat mengikat bilirubin bebas sehingga mengubah sifat molekul bilirubin bebas yang semula larut dalam lemak menjadi fotoisomerasi yang larut dalam air, sehingga mengurangi konsentrasi bilirubin dalam serum (Puspitosari dkk, 2013).

### **2.3 Metode Pemeriksaan Bilirubin Total**

Metode pemeriksaan bilirubin total dapat dilakukan dengan metode Jendrassik – Grof. Prinsip pemeriksaan tersebut adalah bilirubin bereaksi dengan DSA (*diazotized sulphanilic acid*) dan membentuk senyawa azo yang berwarna merah. Daya serap dari senyawa warna tersebut dapat langsung dilakukan terhadap sampel bilirubin pada panjang gelombang 578 nm. Bilirubin glukuronida

yang larut dalam air dapat langsung bereaksi dengan DSA. Akan tetapi bilirubin yang terdapat pada albumin yaitu bilirubin terkonjugasi hanya dapat bereaksi apabila terdapat akselerator.

Pemeriksaan laboratorium merupakan pemeriksaan yang membutuhkan ketelitian, tetapi terkadang kekeliruan dapat menyebabkan kesalahan dalam penanganan sampel atau sampel tertukar. Kesalahan dapat terjadi dan dapat berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan meski telah dilakukan secara berulang – ulang. Hal tersebut terkadang sulit untuk dihindari, karena hanya dapat ditekan sekecil mungkin. Kesalahan tersebut disebut *impreccision* dan kesalahan juga terjadi dalam pengukuran yang berupa pipetan, suhu atau kesalahan dalam memprogram alat, sehingga dapat berpengaruh terhadap hasil pemeriksaan (Gandasoebrata, 2008).

#### **2.4 Plasma dan Antikoagulan**

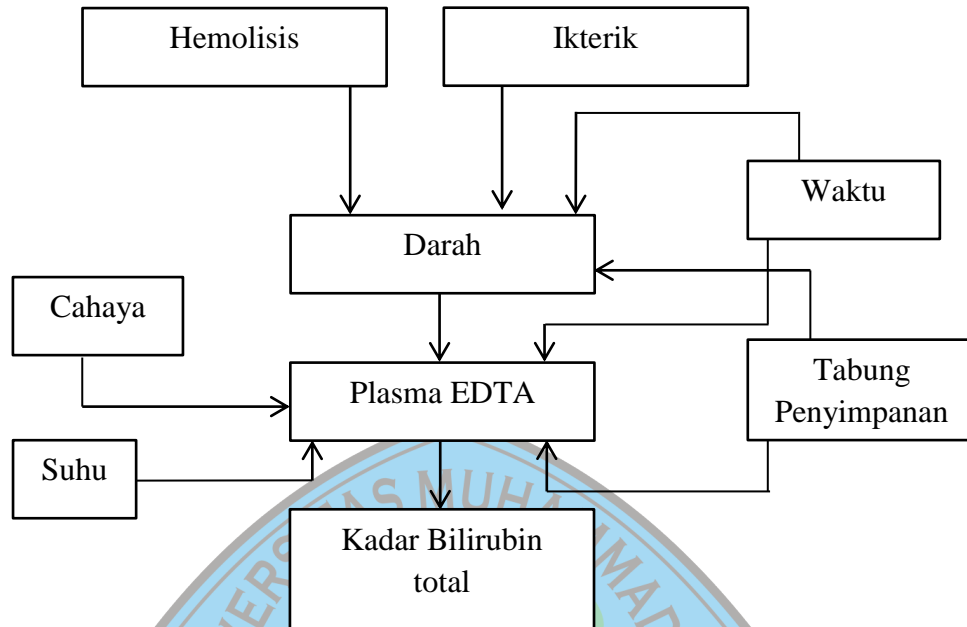
Plasma adalah komponen darah berbentuk cairan berwarna kuning muda yang diperoleh dari pemisahan darah segar dengan penambahan antikoagulan. Darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi dengan antikoagulan. Darah tersebut dihomogenisasi dengan cara dibolak balik dan diputar pada sentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000rpm. Lapisan jernih yang berwarna kuning muda yang terbentuk di bagian atas merupakan plasma (Ratna, 2016).

Antikoagulan adalah zat kimia yang digunakan untuk mencegah sampel darah membeku. Antikoagulan yang digunakan harus memenuhi persyaratan, tidak mengganggu atau mengubah kadar zat yang akan diperiksa (Kemenkes,

2013). Spesimen dengan antikoagulan harus dicampur segera setelah pengambilan spesimen untuk mencegah pembentukan mikrolot (bekuan). Pencampuran yang lembut sangat penting untuk mencegah hemolisis (Ratna, 2016).

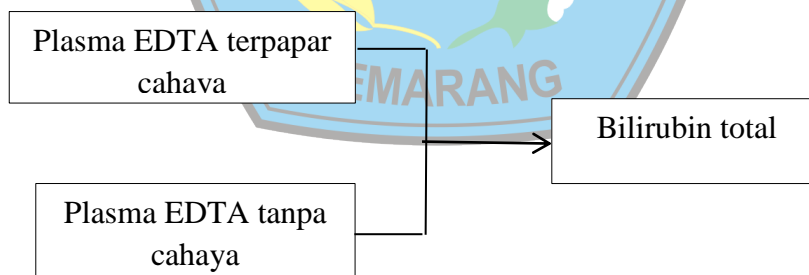
Antikoagulan yang dapat digunakan untuk membuat/memisahkan plasma antara lain EDTA dan heparin. *Ethylendiaminetetraacetic acid* (EDTA), adalah antikoagulan yang tersedia dalam bentuk garam *sodium* (natrium) dan *potassium* (kalium). EDTA berfungsi mencegah koagulasi dengan cara mengikat khelasi kalsium. EDTA memiliki keunggulan sebanding dengan antikoagulan yang lain. EDTA terdiri dari 3 macam yaitu *dinatrium* EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), *dipotassium* EDTA ( $\text{K}_2\text{EDTA}$ ) dan *tripotassium* EDTA ( $\text{K}_3\text{EDTA}$ ).  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan  $\text{K}_2\text{EDTA}$  digunakan dalam bentuk kering dan  $\text{K}_3\text{EDTA}$  digunakan dalam bentuk cair (Kosashi & Setiawan, 2016). Tabung EDTA tersedia dalam bentuk hampa udara (*vacutainer tube*) dengan tutup lavender (*purple*) atau *pink*. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA, kemudian dilakukan homogenisasi untuk menghindari terbentuknya bekuan. Spesimen kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan plasma siap untuk digunakan analisis (Kosashi & Setiawan, 2016). Heparin merupakan asam mukopolisakarida yang bekerja dengan cara menghentikan pembentukan trombin dari prothrombin sehingga menghentikan fibrin dari fibrinogen. Heparin terbagi menjadi tiga yaitu ammonium heparin, lithium heparin dan sodium heparin. Lithium heparin paling sering digunakan sebagai antikoagulan karena tidak mengganggu analisis beberapa macam ion dalam darah (Kosasih & Setiawan, 2016).

## 2.5 Kerangka Teori



Gambar 3. Bagan Kerangka Teori

## 2.6 Kerangka Konsep



Gambar 4. Bagan Kerangka Konsep

## 2.7 Hipotesis

Terdapat perbedaan kadar bilirubin total sampel plasma EDTA terpapar cahaya dan tanpa cahaya.