

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang, tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawa atau warna yang terbentuk (Cairns, 2009)

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan di serap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang di serap sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet(Sastrohamidjojo, 2007)

Spektrofotometer UV-VIS adalah pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200-350nm) dan sinar tampak (350-800nm) oleh suatu senyawa. Serapan cahaya UV atau VIS (cahaya tampak) mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih rendah.

2.1.1. Bagian-bagian Spektrofotometer

a. Sumber cahaya

Spektrofotometri Sinar Tampak (UV-Vis) adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day, 2002). Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan

sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

d. Monokromator

Monokromator adalah alat yang berfungsi untuk menguraikan cahaya polikromatis menjadi beberapa komponen panjang gelombang tertentu (monokromatis) yang berbeda (terdispersi).

e. Detektor

Peranan detektor penerima adalah memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang. Detektor akan mengubah cahaya menjadi sinyal listrik yang selanjutnya akan ditampilkan oleh penampil data dalam bentuk jarum atau angka digital. Mengukur transmitansi larutan sampel, dimungkinkan untuk menentukan konsentrasinya dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Spektrofotometer akan mengukur intensitas cahaya melewati sampel, dan membandingkan ke intensitas cahaya sebelum melewati sampel. Rasio disebut transmitansi dan biasanya digunakan dalam presentase.

f. Mikroprosesor

Mikroprosesor dan output software dari kalibrator dapat disimpan dan konsentrasi sampel yang tidak diketahui secara otomatis dapat dihitung (KEMENKES,2010).

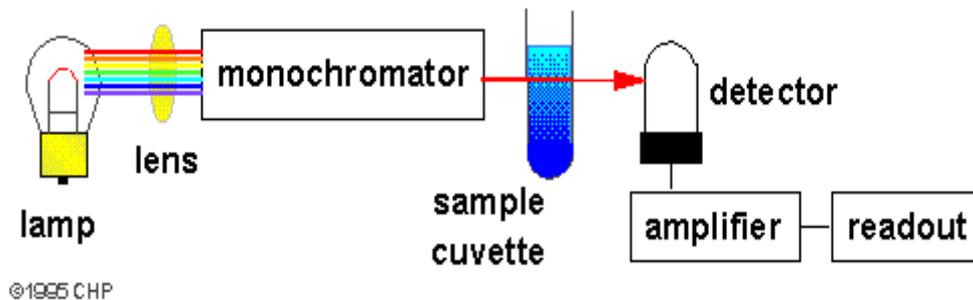
g. Piranti pembaca

Fungsinya adalah membaca sinyal listrik dari detector dimana data digambarkan dalam bentuk yang bisa diinterpretasikan atau disajikan pada display yang dapat dibaca oleh pemeriksa (KEMENKES,2010).

2.1.2.Prinsip spektrofotometer

Prinsip kerja spektrofotometer adalah penyerapan cahaya pada panjang gelombang tertentu oleh bahan yang diperiksa. Tiap zat memiliki absorbansi pada panjang gelombang tertentu yang khas. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi digunakan untuk mengukur kadar zat yang diperiksa. Banyaknya cahaya yang diabsorpsi oleh zat berbanding lurus dengan kadar zat. Memastikan ketepatan pengukuran, kadar yang hendak diukur dibandingkan terhadap kadar yang diketahui (standar). Setelah dimasukan blangko (KEMENKES, 2010)

Prinsip kerja dari spektrofotometer dapat di gambarkan sebagai berikut :



Gambar.1 cara kerja spektrifotometer

2.1.3. Jenis-jenis Spektrofotometer

Spektrofotometer memiliki 2 tipe yaitu spektrofotometer sinar tunggal dan spektrofotometer sinar ganda. Spektrofotometer sinar tunggal biasanya dipakai untuk kawasan spectrum ultraungu dan cahaya yang terlihat. Spektrofotometer sinar ganda dapat dipergunakan baik dalam kawasan ultraungu dan cahaya yang terlihat maupun dalam kawasan inframerah (Ganjar, 2007).

1. *Singel Beam*

Single-Bean instrument dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Pengukuran sampel dan larutan blangko atau standar harus dilakukan secara bergantian dengan sel yang sama (Suharti T, 2013)

2. *Double Beam*

Spektrofotometer memiliki berkas sinar ganda, sehingga dalam pengukuran absorbansi tidak perlu bergantian antara sampel dan larutan blangko, spektrofotometer double bean memakai absorbansi (A) otomatis sebagai fungsi panjang gelombang (Suhartati T, 2013)

2.2. kuvet

Berbagai bahan yang digunakan untuk pembuatan kuvet seperti kaca, plastik hingga kuarsa. Bentuk kuvet juga bermacam-macam. Kuvet berbentuk jajaran genjang lebih tepat untuk pengukuran karena cahaya akan jatuh dengan sudut tegak lurus pada permukaan kuvet. pemeriksaan yang memerlukan UV sebaiknya kuvet dari kwartz. Diameter standar kuvet adalah 1 cm. (KEMENKES, 2010).

Berbagai jenis bahan kuvet yang sering digunakan dilaboratorium yaitu kuvet gelas dan kuvet plastik. Kuvet gelas adalah kuvet yang terbuat dari kaca dan dapat digunakan berulang-ulang, namun pada pengukuran di daerah UV hanya dapat digunakan kuvet yang terbuat dari bahan kuarsa, karena kuvet yang terbuat dari kaca tidak dapat mengabsorpsi sinar UV sehingga tidak dapat digunakan pada saat pengukuran di daerah UV.

Bahan kuvet dipilih berdasarkan daerah panjang gelombang yang digunakan. Sedangkan kuvet plastik adalah kuvet yang terbuat dari plastik dan merupakan disposable atau sekali pemakaian. Wadah sampel yang baik terbuat dari bahan gelas dan plastik, dan khusus untuk sampel yang mudah bereaksi dengan plastik, maka harus menggunakan wadah yang terbuat dari bahan gelas (Sastrohamidjojo, 2007).

Kuvet harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut:

- 1) Tidak berwarna sehingga dapat mentransmisikan semua cahaya.
- 2) Permukaan secara optis harus benar-benar sejajar.
- 3) Tidak bereaksi terhadap bahan-bahan kimia.

- 4) Tidak boleh rapuh.
- 5) Mempunyai bentuk (desain) yang sederhana.

2.2.1. Macam-macam kuvet

Berbagai jenis bahan kuvet yang sering digunakan di laboratorium yaitu kuvet gelas dan kuvet plastik. Kuvet gelas adalah kuvet yang terbuat dari kaca dan dapat digunakan berulang-ulang, namun pada pengukuran di daerah UV hanya dapat digunakan kuvet yang terbuat dari bahan kuarsa, karena kuvet yang terbuat dari kaca tidak dapat mengabsorpsi sinar UV sehingga tidak dapat digunakan pada saat pengukuran di daerah UV. Bahan kuvet dipilih berdasarkan daerah panjang gelombang yang digunakan. Sedangkan kuvet plastik adalah kuvet yang terbuat dari bahan plastik dan merupakan disposable/sekali pemakaian. Wadah sampel yang baik terbuat dari bahan gelas dan plastik, dan khusus untuk sampel yang mudah bereaksi dengan plastik, maka harus menggunakan wadah yang terbuat dari bahan gelas (Sastrohamidjojo, 2007).

Ada beberapa jenis kuvet yang umum digunakan; setiap tipe memiliki panjang gelombang berbeda yang dapat digunakan di mana transparansi melebihi 80%:

- 1) Kaca optis, memiliki jangkauan panjang gelombang optik 340-2,500nm yang mentransmisikan lebih dari 80% cahaya bersama dengan toleransi pencocokan 1% pada 350nm.
- 2) Plastik, dengan panjang gelombang yang dapat digunakan pada 380 hingga 780 nm (spektrum tampak).

- 3) Kuarsa leburan, dengan panjang gelombang di bawah 380 nm (spektrum ultraviolet).
- 4) Kuarsa UV, dengan panjang gelombang yang dapat digunakan pada 190-2,500 nm, dan toleransi pencocokan 1% pada 220 nm.^[3]
- 5) Kuarsa ES, dengan panjang gelombang yang dapat digunakan pada 190 hingga 2,000 nm, dan toleransi pencocokan 1% pada 220 nm.

Kuarsa IR, dengan panjang gelombang yang dapat digunakan pada 220 hingga 3,500 nm, dan toleransi pencocokan 1% pada 2,730 nm (www.biocompare.com.2016).



Gambar.2 Kuvet plastik, sekali-pakai

2.3. Tabung Reaksi

Tabung Reaksi adalah sebuah tabung yang terbuat dari sejenis kaca atau plastic yang dapat menahan perubahan tempertur dan tahan terhadap reaksi kimia. Tabung reaksi ada yang dilengkapi dengan tutup dan ada juga yang tanpa tutup. Terdiri dari berbagai ukuran tergantung kebutuhan. Tabung reaksi disebut juga Test tube atau Culture tube. Culture tube adalah tabung tabung reaksi tanpa bibir yang biasanya digunakan untuk pembiakan mikroorganisme dalam medium cair.

a. Fungsi tabung reaksi antara lain adalah :

- 1) Sebagai tempat untuk mereaksikan bahan kimia
- 2) Sebagai tempat reaksi kimia dalam skala kecil
- 3) Sebagai tempat perkembangbiakan mikroba dalam media cair

Seperti namanya, fungsi tabung reaksi adalah sebagai tempat dimana kita mereaksikan bahan kimia dalam laboratorium. Alat ini terbuat dari bahan kaca sehingga proses reaksi kimia didalam tabung ini dapat terlihat jelas analis. Tabung ini juga mempunyai sifat tahan terhadap panas / api, karena seperti kita ketahui beberapa proses reaksi kimia berjalan dengan membutuhkan panas. Beberapa macam reaksi yang biasanya digunakan.

2.4. Total Protein

Total protein adalah suatu plasma protein yang disintesis terutama di sel parenkim hati, sel plasma, kelenjar limfe, limpa dan sumsum tulang. Protein total terdiri dari dari albumin K pembentukan antibodi, hormone, enzim, factor hemostasis, pertumbuhan dan perbaikan jaringan dan pH buffer. Protein berkaitan dengan beberapa bahan seperti bilirubin, asam lemak, obat dan hormon selama dalam sirkulasi darah (KEMENKES,2010)

2.4.1. Metode Pemeriksaan Total Protein

Analisis Protein dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu : secara kualitatif terdiri atas : reaksi *Xantoprtein*, reaksi *Hopkins-Cole*, reaksi *Millon*, reaksi *Nitroprusida*, dan reaksi *Sakaguchi*. Pemeriksaan secara kuantitatif terdiri dari: metode *Kjeldahl*, metode titrasi formol, metode *Lowry*, metode spektrofotometri visible (Biuret), dan metode spektrofotometri UV.

2.4.1.1 Analisa Kualitatif

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 pada inti benzena yang terdapat pada molekul protein. Reaksi ini positif untuk protein yang mengandung tirosin, fenilalanin dan triptofan.

2. Reaksi *Hopkins-Cole*

Larutan protein yang mengandung triptofan dapat direaksikan dengan pereaksi Hopkins-Cole yang mengandung asam glioksilat 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.

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. Pereaksi *Millon* ini positif untuk fenol-fenol, karena terbentuknya senyawa merkuri dengan gugus hidroksifenil yang berwarna.

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.

5. Reaksi *Sakaguchi*

Pereaksi yang digunakan ialah naftol dan natriumhipobromit. Reaksi memberikan hasil positif apabila ada gugus guanidin. Protein yang mengandung arginin dapat menghasilkan warna merah.

6. Metode Biuret

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

2.4.1.2. Analisa Kuantitatif

Analisis protein dapat digolongkan menjadi dua metode, yaitu: Metode konvensional, yaitu metode *Kjeldahl* (terdiri dari destruksi, destilasi, titrasi), titrasi formol. Digunakan untuk protein tidak terlarut. Metode modern, yaitu metode *Lowry*, metode spektrofotometri visibel, metode spektrofotometri UV digunakan untuk analisa protein terlarut.

1. Metode *Kjeldahl*

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.

2. Metode Titrasi Formol

Larutan protein dinetralkan dengan basa (NaOH) lalu ditambahkan formalin akan membentuk dimethylol. Terbentuknya dimethylol berarti gugus aminonya sudah terikat dan tidak akan mempengaruhi reaksi antara asam dengan basa NaOH sehingga akhir titrasi dapat diakhiri dengan tepat. Indikator yang digunakan adalah p.p, akhir titrasi bila tepat terjadi perubahan warna menjadi merah muda yang tidak hilang dalam 30 detik.

3. Metode *Lowry*

Sampel protein yang terlarut misal albumin, endapkan dahulu dengan penambahan amonium sulfat Kristal (jumlahnya tergantung dari jenis proteinnya, kalau perlu sampai mendekati kejenuhan amonium sulfat dalam larutan). Pisahkan protein yang mengendap dengan sentrifus 11.000 rpm selama 10 menit, pisahkan supernatannya. Presipitat yang merupakan proteinnya kemudian dilarutkan kembali dengan dapar asam asetat pH 5 misal sampai 10,0 ml. Ambil volume tertentu dan lakukan penetapan selanjutnya seperti pada kurva baku mulai dari penambahan 8 ml reagen Lowry A sampai seterusnya.

4. Metode Spektrofotometri Visible (Biuret)

Larutan protein dibuat alkalis dengan NaOH kemudian ditambahkan larutan CuSO₄ encer untuk menunjukkan adanya senyawa-senyawa yang mengandung gugus amida asam yang berada bersama gugus amida yang lain

memberikan reaksi positif yaitu ditandai dengan timbulnya warna merah violet atau biru violet (Sumardjo, 2008).

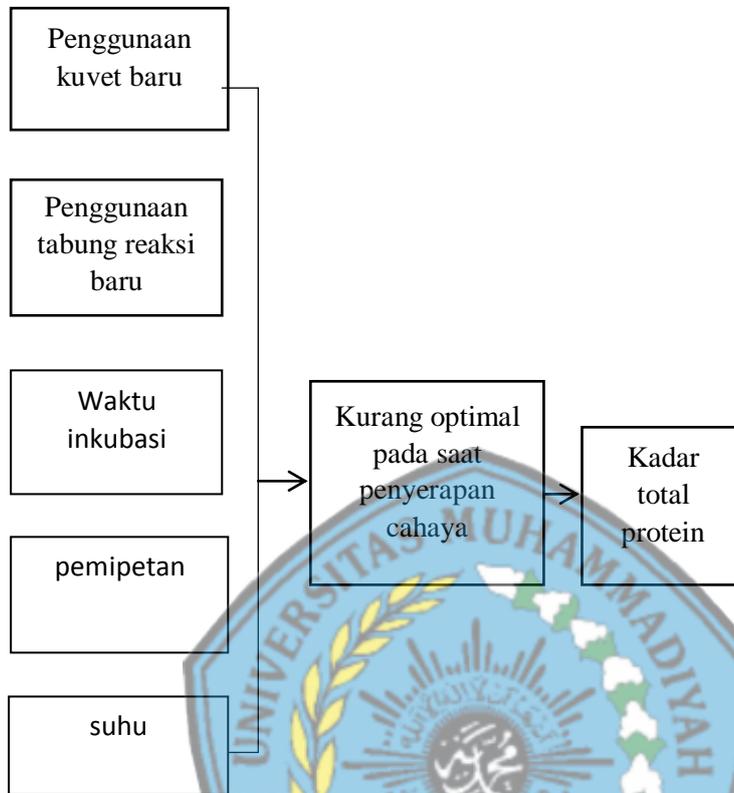
Pembentukan bahan – bahan kimia tertentu pada larutan protein kemungkinan dapat mengakibatkan larutan protein yang semula tidak berwarna menjadi berwarna. Reaksi pembentukan warna protein sering dipakai untuk menunjukkan adanya protein atau protein tertentu, walaupun beberapa diantara reaksi – reaksi tidak spesifik karena beberapa zat lain dengan reagen yang sama memberikan hasil yang sama (Sumardjo, 2008).

5. Metode Spektrofotometri UV

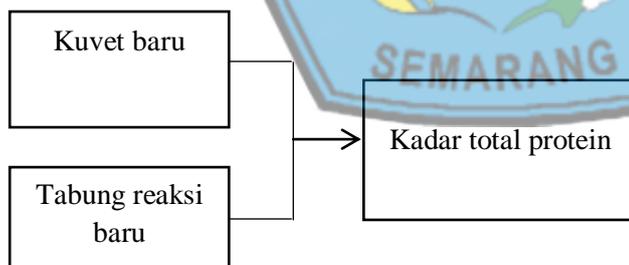
Asam amino penyusun protein diantaranya adalah triptofan, tirosin dan fenilalanin yang mempunyai gugus aromatik. Triptofan mempunyai absorpsi maksimum pada 280 nm, sedang untuk tirosin mempunyai absorpsi maksimum pada 278 nm.



2.5. Kerangka Teori



2.6. Kerangka Konsep



2.7. Hipotesis

Ada perbedaan kadar total protein berdasarkan penggunaan kuvet dan tabung reaksi baru.