

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi (Gandjar, 2007). Spektrofotometer digunakan untuk mengukur transmittan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang, tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawa atau warna terbentuk (Cairns, 2009). Nilai absorbansi dari cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan didalam kuvet (Sastrohamidjojo, 2007).

Keuntungan dari metode spektrofotometri adalah hasil yang diperoleh cukup akurat, angka yang terbaca langsung dicatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital.

2.1.1. Bagian-bagian Spektrofotometer

1. Sumber cahaya

Sumber sinar polikromatis berfungsi sebagai sumber sinar polikromatis dengan berbagai macam rentang panjang gelombang (Sastrohamidjojo H, 2013). Sumber yang digunakan adalah lampu *wolfram*, keunggulannya yaitu energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang (Khopkar, 2003).

2. Monokromator

Monokromator alat yang berfungsi untuk menguraikan cahaya polikromatis menjadi beberapa komponen panjang gelombang tertentu (monokromatis) yang berbeda (terdispersi) (Khopkar, 2003).

3. Kuvet

Kuvet merupakan alat yang digunakan untuk mengukur konsentrasi reagen yang dibaca pada spektrofotometer. Kuvet berbentuk jajaran genjang lebih tepat untuk pengukuran karena cahaya akan jatuh dengan sudut tegak lurus pada permukaan kuvet (Kemenkes, 2011).

4. 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 (Khopkar, 2003).

2.1.2. Prinsip Spektrofotometer

Cahaya yang berasal dari lampu diteruskan melalui lensa menuju ke monokromator, kemudian cahaya akan diubah cahaya yang awalnya polikromatis menjadi cahaya monokromatis (tunggal). Berkas cahaya dilewatkan pada sampel yang mengandung zat konsentrasi dengan tertentu. Cahaya yang terbentuk ada yang diserap (diabsorpsi) dan ada pula yang dilewatkan. Cahaya yang dilewatkan kemudian diterima oleh detektor. Cahaya yang diterima dihitung dan untuk mengetahui cahaya yang diserap sampel. Cahaya yang diserap sebanding dengan

konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel, sehingga akan diketahui konsentrasi zat dalam sampel secara kuantitatif (Triyati, 1985).

Keuntungan utama metode spektrofotometri adalah metode ini memberikan cara sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang kecil. Selain itu, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan (Yahya S, 2013)

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 spektrum ultraungu dan cahaya yang terlihat. Spektrofotometer sinar ganda dapat dipergunakan baik dalam kawasan ultraungu dan cahaya yang terlihat maupun dalam kawasan inframerah (Gandjar, 2007).

1. Single Beam

Single-beam instrument dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. pengukuran sampel dan larutan blanko atau satandar harus dilakukan secara bergantian dengan sel yang sama (Suhartati T, 2013).

2. Double Beam

Spektrofotometer memiliki berkas sinar ganda, sehingga dalam pengukuran absorbansi tidak perlu bergantian antara sampel dan larutan

blanko. Spektrofometer jenis ini memakai absorbansi (A) otomatis sebagai fungsi panjang gelombang (Suhartati T, 2013).

2.2. Kuvet

Kuvet adalah tabung kecil dengan penampung melintang berbentuk lingkaran atau persegi, yang ditutup pada salah satu ujung. Kuvet terbuat dari beberapa bahan diantaranya kuvet plastik, kuvet kaca, atau kuarsa leburan (untuk cahaya UV) dan dirancang untuk menaruh sampel untuk percobaan spektroskopi cepat, dimana kecepatan lebih penting daripada akurasi yang tinggi (Mantiq A, 2016).

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* atau sekali pemakaian. Kuvet yang digunakan dalam penelitian ini berbahan dasar *crystal clear polystyrene*. 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).

2.3. Total Protein

Protein dapat memerankan fungsi sebagai bahan struktural karena seperti halnya polimer lain, protein memiliki rantai yang panjang dan juga dapat mengalami *cross-linking*. Protein juga berperan sebagai biokatalis untuk reaksi-reaksi kimia dalam sistem makhluk hidup. Makromolekul ini mengendalikan jalur metabolisme yang kompleks untuk menjaga kelangsungan hidup suatu organisme (Hertadi, 2008).

Protein disensis di hati, penetapan kadar protein dalam serum umumnya mengukur kadar total protein dan albumin atau globulin. Spesimen yang digunakan untuk pemeriksaan total protein adalah serum, bila menggunakan plasma kadar protein akan meningkat sekitar 3-5% karena pengaruh fibrinogen dalam plasma (Hertadi, 2008).

Kondisi yang dapat menyebabkan penurunan kadar total protein adalah malnutrisi berkepanjangan, kelaparan, diet rendah protein, sindrom malabsorpsi, kanker gastrointestinal, penyakit Hodgkin, penyakit hati berat, gagal ginjal kronis, luka bakar yang parah dan intoksikasi air. Peningkatan kadar total protein dapat ditemukan dalam kondisi dehidrasi, muntah-muntah, diare, mieloma multiple dan sarkoidosis (Ariffriana D *et al*, 2016).

2.3.1. Metode Pemeriksaan Total Protein

Analisis protein dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu : Secara kualitatif terdiri atas: reaksi *Xantoprotein*, 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.

2.3.1.1 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. 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.

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.

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. Jadi arginin atau protein yang mengandung arginin dapat menghasilkan warna merah.

6. Metode Biuret

Larutan protein dibuat alkalis dengan NaOH kemudian ditambahkan larutan $CuSO_4$ 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.

2.3.2.2. 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. Dengan terbentuknya dimethylol ini 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. 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).

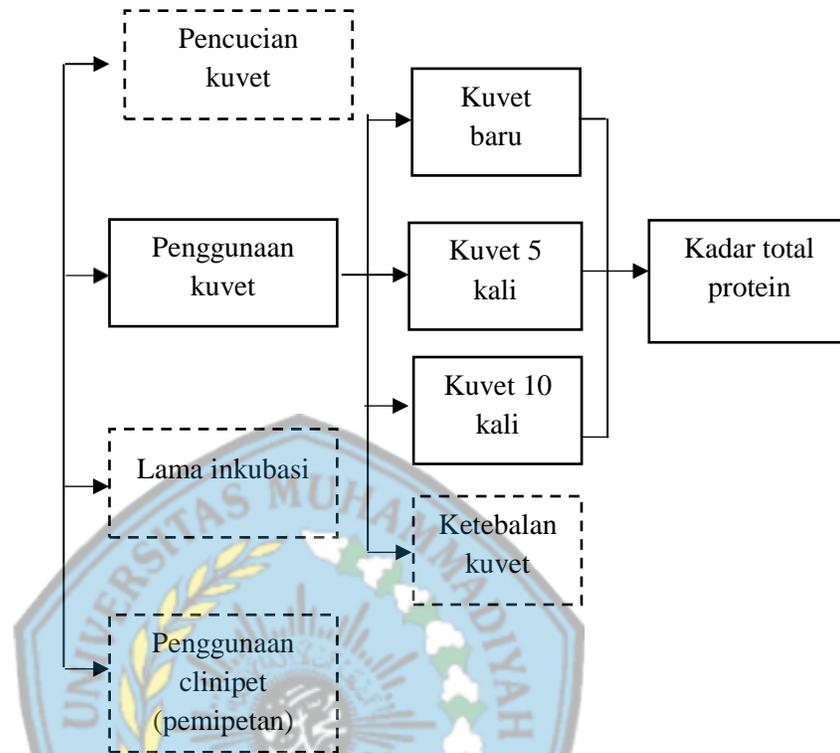
Reagen biuret terdiri dari larutan NaOH dan CuSO₄ komposisi dan konsentrasi reagen biuret meliputi :

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)

5. Metode Spektrofotometri UV

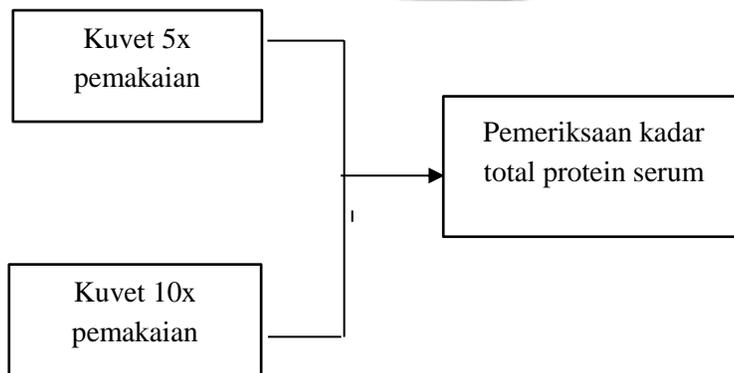
Asam amino penyusun protein diantaranya adalah triptofan, tirosin dan fenilalanin yang mempunyai gugus aromatik. Triptofan mempunyai absorpsi maksimum pada 280 nm, sedang untuk tirosin mempunyai absorpsi maksimum pada 278 nm.

2.4. Kerangka Teori



Bagan 1. Kerangka Teori

2.5. Kerangka Konsep



Bagan 2. Kerangka konsep

2.6 Hipotesis Penelitian

Ada perbedaan kadar total protein serum berdasarkan frekuensi penggunaan kuvet.

