

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Pemeriksaan protein merupakan pemeriksaan yang rutin untuk mengetahui fungsi ginjal (Lerma, 2008) dan untuk mendiagnosis adanya penyakit hati (Hayden dan Heyningen, 2001). Pemeriksaan protein urin merupakan pemeriksaan yang rutin untuk mengetahui fungsi ginjal selain pemeriksaan kreatinin. Protein dapat masuk ke dalam urin bila terjadi kerusakan pada glomeruli atau tubula pada ginjal. Tes proteinuria merupakan pemeriksaan yang hingga kini cukup efektif untuk mengetahui apakah fungsi ginjal mulai atau sudah terganggu (Sibuea, 2005). Sedangkan pengukuran aktivitas SGPT dan SGOT serum dapat menunjukkan adanya kelainan fungsi hati. Peningkatan SGPT dan SGOT disebabkan perubahan permeabilitas atau kerusakan dinding sel hati sehingga digunakan sebagai penanda gangguan integritas sel hati (hepatoseluler). (Rosida, 2016). Manfaat hasil pemeriksaan ini sangat ditentukan oleh akurasi, presisi dan selektivitas metode analisis yang digunakan. Adanya penyimpangan dalam hasil pemeriksaan akan mempengaruhi terhadap tindakan terapi yang akan dilakukan.

Pengukuran kadar protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya adalah metode Lowry. Metode Lowry merupakan metode 50 – 100 kali lebih sensitif daripada metode Biuret. Selain itu, metode Lowry lebih spesifik daripada metode lain dan relatif sederhana dalam eksekusinya sehingga tidak membutuhkan waktu terlalu lama, sekitar 1 – 1,5 jam (Nielsen, 2010). Namun

metode Lowry memiliki kelemahan, yaitu dapat mengalami interferensi karena adanya senyawa lain yang bersifat mereduksi (Folin and Ciocalteu, 1927; Lowry, *et al.*, 1951) seperti senyawa flavonoid, tanin dan juga vitamin C. Senyawa ini mereduksi kompleks asam fosfomolibdat – fosfotungstat yang berasal dari pereaksi Folin Ciocalteu (Folin and Ciocalteu, 1927; Lowry, *et al.*, 1951) dan juga mampu mereduksi kuprum secara langsung (Winters and Minchin, 2005).

Apel (*Malus sylvestris* Mill) merupakan salah satu buah yang mengandung senyawa pereduksi seperti vitamin C (Aprillia, 2014), flavonoid, (Khotimah dkk., 2016) dan juga tannin. Apel merupakan salah satu tanaman subtropis yang digemari oleh masyarakat. Apel terdapat dalam berbagai varietas unggulan yang memiliki karakteristik dan kekhasan tersendiri seperti apel *rome beuty*, Manalagi, anna dan wangling. Dari keempat varietas unggulan tersebut, apel Manalagi merupakan yang paling populer dan banyak terlihat dijual di swalayan. Di masyarakat, pada umumnya cara pengonsumsi buah apel adalah dikonsumsi dalam bentuk segar (buah potong) atau dikonsumsi dalam bentuk jus (Cempaka, dkk., 2014). Berdasarkan Biro Pusat Statistik, rata-rata konsumsi apel penduduk Indonesia adalah 0,6 kg perkapita pertahun, dan mengalami peningkatan rata-rata 0,02% tiap tahun dari tahun 1985 sampai tahun 1987 (Bastian, 2004). Sedangkan pada tahun 2006 rata – rata konsumsi apel di Indonesia hingga 1,1 kg perkapita pertahun (Widyawati dkk., 2012). Berdasarkan data tersebut kemungkinan terjadinya interferensi oleh buah apel yang mengandung senyawa yang bersifat mereduksi sangat besar, karena jumlah konsumsi masyarakat yang cukup tinggi dan mengalami kenaikan tiap tahunnya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah sari buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) mengandung senyawa-senyawa yang bersifat mereduksi?
2. Adakah pengaruh sari buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap terjadinya interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry?
3. Bagaimana pola interferensi yang terjadi sebagai akibat sari buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap terjadinya interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui senyawa-senyawa pereduksi yang terdapat dalam buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill)
2. Mengetahui pengaruh sari buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry.
3. Mengetahui pola interferensi yang terjadi sebagai akibat sari buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry.

D. Manfaat Penelitian

Skripsi ini diajukan untuk memberikan bukti ilmiah dan menjadi sumber informasi bagi masyarakat sehingga diperoleh hasil anailis klinik yang akurat.

E. Tinjauan Pustaka

1. Protein

Protein merupakan komponen utama dalam semua sel hidup, baik tumbuhan maupun hewan. Pada sebagian besar jaringan tubuh, protein merupakan komponen utama terbesar selain air. Lebih dari 50% berat kering sel terdiri atas protein. Protein adalah senyawa organik yang tersusun dari monomer – monomer asam amino yang saling berinteraksi melalui ikatan peptida (Sumarlin, 2013).

Berat molekul protein sangat besar (ribuan sampai jutaan Dalton) sehingga merupakan senyawa makromolekuler. Protein akan dihidrolisis oleh penambahan asam, basa atau oleh kerja enzim protease yang akan memecah molekul protein menjadi asam – asam amino (Poedjiadi, 1994). Molekul protein mempunyai gugus amina ($-NH_2$) dan gugus karboksil ($-COOH$) pada salah satu ujung rantainya. Hal ini menyebabkan protein bersifat amfoter sehingga dapat bereaksi dengan asam maupun basa. Dalam pH rendah, gugus amino pada protein akan bereaksi dengan ion H^+ menjadi $-NH_3^+$ sehingga protein bermuatan positif. Sebaliknya dalam suasana basa, gugus karboksilnya akan bereaksi dengan ion OH^- sehingga protein bermuatan negatif (Bintang, 2010).

Penetapan kadar protein merupakan salah satu pemeriksaan klinik untuk penetapan diagnosis suatu penyakit. Pada penyakit ginjal kronik kehilangan protein melalui urin dapat menyebabkan terjadinya penurunan kadar albumin serum atau hipoalbuminemia. Dimana keluarnya albumin

melalui urin adalah karena peningkatan permeabilitas di tingkat glomerulus yang menyebabkan protein lolos ke dalam filtrat glomerulus (Lin, 2011). Selain itu pengukuran aktivitas serum glutamate oxaloacetate transferase (SGOT) dan serum glutamate piruvattransferase (SGPT) serum dapat menunjukkan adanya kelainan sel hati. Peningkatan SGOT atau SGPT disebabkan perubahan permeabilitas atau kerusakan dinding sel hati sehingga digunakan sebagai penanda gangguan integritas sel hati (Hepatoseluler) (Rosida, 2016).

Peningkatan konsentrasi protein total dalam dapat disebabkan oleh infeksi kronis, hipofungsi kelenjar adrenal, kegagalan fungsi hati, penyakit kolagen pada pembuluh darah, hipersensitif (alergi), dehidrasi, penyakit saluran pernafasan (sesak nafas), hemolisis dan leukimia. Sedangkan penurunan konsentrasi protein total disebabkan malnutrisi dan malabsorpsi, diare kronis maupun akut, terbakar, ketidakseimbangan hormon dan penyakit ginjal (proteinuria) (Kaslow, 2010).

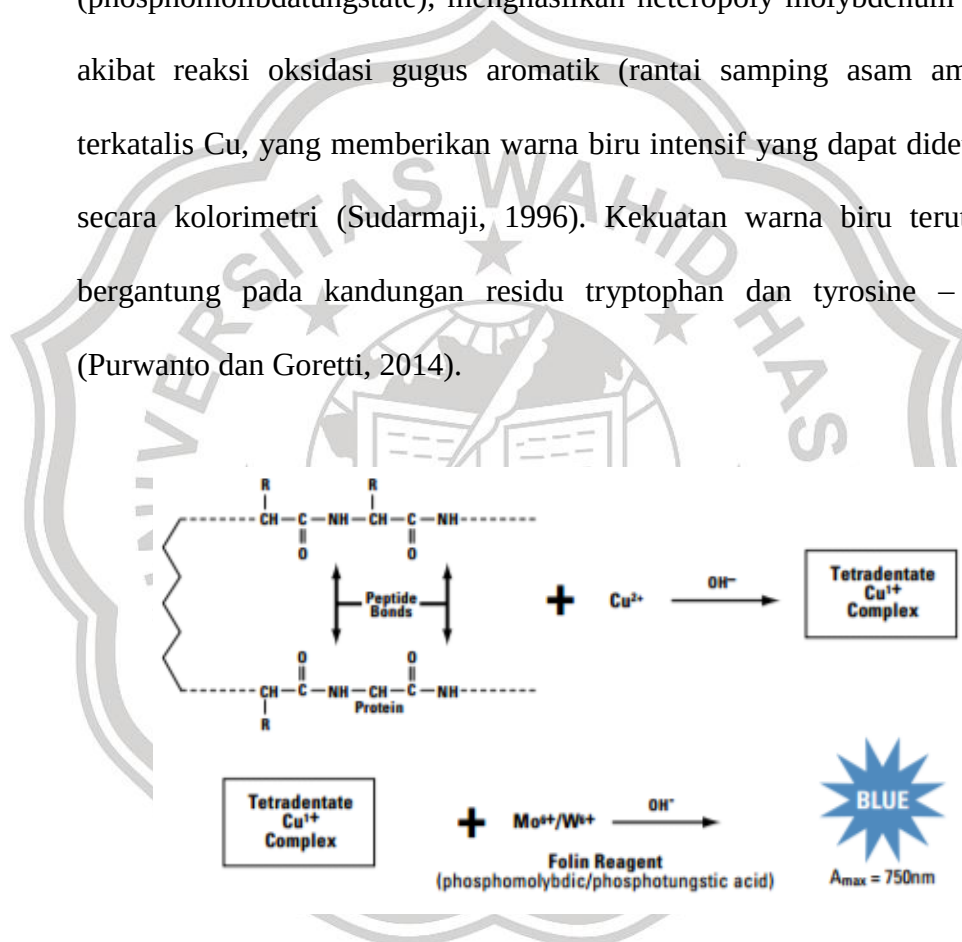
2. Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Analisis Protein dapat dilakukan dengan dua metode yaitu secara kualitatif dan secara kuantitatif. Analisis protein secara kualitatif terdiri atas ; reaksi Xantoprotein, reaksi Hopkins – Cole, reaksi Millon, reaksi Nutroprusida, dan reaksi sakaguchi. Sedangkan secara kuantitatif terdiri dari ; metode kjedahl, metode titrasi formol, metode lowry, metode spektrofotometri visible (Biuret), dan spektrofotometri UV (Poedjiadi, 2007).

Pengukuran kadar protein dapat dilakukan dengan berbagai metode. Metode Spektrofotometri merupakan metode yang menggunakan prinsip absorbansi dan transmisi cahaya dalam mengukur konsentrasi suatu senyawa (Lestari, 2010). Dasar penggunaan metode spektrofotometri adalah dengan menggunakan metode Lowry dan Bradford. Prinsip metode Lowry adalah terbentuknya warna biru akibat penambahan pereaksi folin ciocalteu dan biuret. Terbentuknya warna biru tersebut disebabkan oleh reaksi ion Cu^{2+} dengan ikatan peptida dalam larutan alkalis pada saat penambahan pereaksi biuret serta terjadinya reaksi reduksi pereaksi folin ciocalteu dengan asam amino dalam protein (Kolakowski, 2012).

Pereaksi pendeteksi gugus-gugus fenolik seperti pereaksi Folin dan Ciocalteu telah digunakan dalam penentuan konsentrasi protein oleh Lowry (1951) yang kemudian dikenal dengan metode Lowry. Dalam bentuk yang paling sederhana pereaksi Folin Ciocalteu dapat mendeteksi residu tirosin (dalam protein) karena kandungan fenolik dalam residu tersebut mampu mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat, yang merupakan konstituen utama pereaksi Folin Ciocalteu, menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru. Hasil reduksi ini menunjukkan puncak absorpsi yang lebar pada daerah merah. Sensitivitas dari metode folin ciocalteu ini mengalami perbaikan yang cukup signifikan apabila digabung dengan ion-ion Cu (Folin and Ciocalteu, 1927).

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode biuret. Dalam metode ini terlibat 2 reaksi. Awalnya, kompleks Cu(II) – protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret yang dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi reagen Folin – Ciocalteu kompleks phosphomolibdat phosphotungstat (phosphomolibdatungstate), menghasilkan heteropoly molybdenum blue akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri (Sudarmaji, 1996). Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu tryptophan dan tyrosine – nya (Purwanto dan Goretti, 2014).



Gambar 1. Mekanisme reaksi metode Lowry (Pierce, 2005)

Metode Lowry mengkombinasikan pereaksi Biuret dengan pereaksi lain (Folin – Ciocalteuphenol) yang bereaksi dengan residu tyrosine dan tryptophan dalam protein. Reaksi ini menghasilkan warna

kebiruan yang bisa dibaca di antara 500 – 750 nm, tergantung sensitivitas yang dibutuhkan. Akan muncul puncak kecil disekitar 500 nm yang dapat digunakan untuk menentukan protein dengan konsentrasi tinggi dan sebuah puncak besar disekitar 750 nm yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein dengan konsentrasi rendah. Metode ini lebih sensitif untuk protein dengan konsentrasi rendah dibanding metode biuret. Keuntungan metode Lowry adalah lebih sensitif (100 kali) daripada metode Biuret sehingga memerlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksinya berkisar pada konsentrasi 0.01 mg/mL. Namun metode Lowry lebih banyak interferensinya akibat kesensitifannya (Purwanto, 2014).

Berdasarkan sumber interferan, interferensi dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu interferensi endogen dan interferensi eksogen. Interferensi endogen terjadi karena adanya materi yang secara alami terdapat dalam spesimen, seperti lipid, hemoglobin, dan bilirubin. Sedangkan interferensi eksogen terjadi karena adanya materi yang secara alami tidak terdapat pada spesimen, seperti obat, racun, produk herbal, dan cairan intravena (Saibaba *et al.*, 1998).

3. Interferensi Analisis Pada Klinik

Interferensi merupakan kesalahan sistemik dari hasil analisis yang disebabkan adanya materi lain yang berada dalam sampel. Interferensi akan menyebabkan penyimpangan pada hasil pemeriksaan klinik yang diperoleh, baik berupa kenaikan maupun penurunan. (Selby, 1999)

Berdasarkan sumber interferan, interferensi dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu interferensi endogen dan interferensi eksogen. Interferensi endogen terjadi karena adanya materi yang secara alami terdapat dalam spesimen, seperti lipid, hemoglobin, dan bilirubin. Sedangkan interferensi eksogen terjadi karena adanya materi yang secara alami tidak terdapat pada spesimen, seperti obat, racun, produk herbal, dan cairan intravena (Saibaba *et al.*, 1998).

Selain dari sumber interferan, interferensi juga dapat terjadi karena adanya interaksi interferan dan analit. Adapun beberapa tipe interferensi yang dapat terjadi yaitu : *analyte dependent*, merupakan interferensi yang terjadi tergantung dari kadar; *analyte independent*, yaitu saat interferensi nilainya konstan sebarang kadar analit; serta pola interferensi kombinasi keduanya, yaitu saat efek yang dihasilkan interferan tergantung pada interaksi analit dan interferan. (Kroll *et al.*, 1987).

Pola interferensi ditentukan menggunakan metode regresi berganda, dengan 3 variasi bebas yaitu kadar analit (A), kadar Sari buah apel (S) dan kadar interaksi analit-sari buah apel (A-S). Model persamaan regresi ganda antara variabel-variabel tersebut dirumuskan dalam persamaan berikut :

$$F(A,S) = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2S + \beta_3A-S$$

Interferensi $F(A,S)$ sebagai variabel tergantung dinyatakan sebagai besarnya perubahan absorbansi yang terbaca atau besarnya perubahan

kadar protein. Signifikansi koefisien regresi menunjukkan pola interferensi yang terbentuk (Kroll *et al.*, 1987)

4. Buah Apel Manalagi

a. Morfologi

Apel merupakan pohon dengan tinggi batang 7 – 10 m. Daun berbentuk bulat telur dengan tepi bergerigi kecil. Bunga yang membesar atau mengembang akan menjadi buah yang padat dan berisi. Buah berbentuk bulat dan bersegi empat. Warna buah hijau atau merah. Tanaman apel dapat hidup subur di daerah yang mempunyai temperatur udara dingin. Tanaman apel di Eropa dibudidayakan terutama di daerah subtropis bagian utara, sedangkan apel lokal di Indonesia yang terkenal berasal dari daerah Malang, Jawa Timur. Tanaman apel di Indonesia dapat tumbuh dan berkembang dengan baik apabila dibudidayakan pada daerah yang mempunyai ketinggian sekitar 700 – 1200 meter di atas permukaan laut (Sufrida dan Maloedyn, 2006).

Apel (*Malus sylvestris* Mill) terdapat dalam berbagai varietas unggulan yang memiliki karakteristik dan kekhasan tersendiri seperti rome beauty, Manalagi, anna, dan wangling. Dari keempat varietas unggulan tersebut, apel rome beauty dan Manalagi merupakan yang paling populer dan banyak terlihat dijual di swalayan (Cook, 2006).

Apel Manalagi mempunyai rasa manis walaupun masih muda dan aromanya harum. Bentuk buahnya bulat dan kulit buahnya berpori putih. Jika dibungkus kulit buahnya berwarna hijau muda kekuningan, sedangkan jika dibiarkan terbuka warnanya akan tetap hijau. Diameter buah berkisar antara 5 – 7 cm dan berat 75 – 100 gram/buah (Untung dan Onny, 1994).

b. Klasifikasi

Tanaman apel dalam tata nama atau sistematika tumbuh – tumbuhan dilasifikasikan sebagai berikut :

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Rosales
Famili	: Rosaceae
Genus	: Malus
Spesies	: <i>Malus Sylvestril</i> Mill

(Prihatman, 2000; Sufrida, 2007)



Gambar 2. Buah Apel Manalagi (Sumber: balitjestro.litbang.pertanian.go.id)

c. Kandungan Kimia

Buah apel mengandung komposisi kimia seperti yang terlihat pada tabel 1. diantaranya :

Tabel 1. Komposisi kimia Apel Manalagi per 100 gram Apel (Soelarso, 1996)

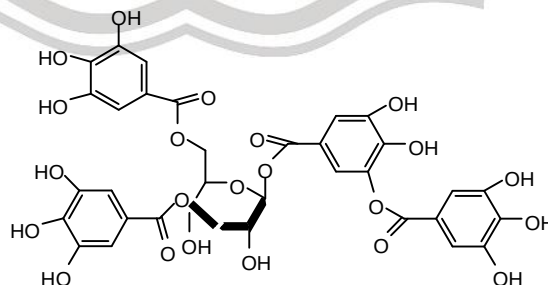
Komposisi	Kandungan
Kadar Air (g)	84.05
Vitamin C (mg)	7.43
Kandungan Asam (g)	0.22
pH cairan buah	4.65
Fruktosa (mg)	45.00
Glukosa (mg)	37.20
Sukrosa (mg)	45.40

d. Senyawa pereduksi pada buah Apel

Apel mengandung berbagai macam senyawa kimia yang dapat menyebabkan interferensi diantaranya :

1) Tanin

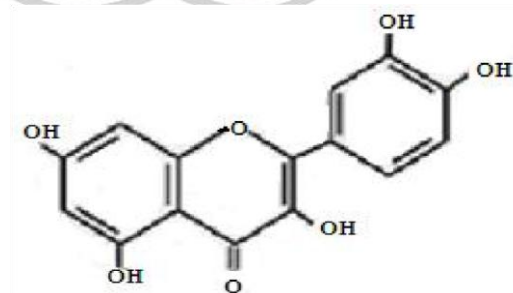
Tanin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol. Umumnya tanin tersebar hampir pada seluruh bagian tumbuhan seperti pada bagian kulit, kayu, batang, daun, dan buah (Sajaratud, 2013). Tanin biasanya disebut juga asam tanat atau galotanat. Apel mengandung tannin berkonsentrasi tinggi. Menurut Bale – Smith dalam Tannin Chemistry (Hagerman, 2002) mendefinisikan tannin sebagai zat fenol yang larut dalam air dan mempunyai berat molekul antara 500 – 3000, serta memberikan reaksi gugus fenol pada umumnya, yaitu mengganggu sintesis RNA dan mendenaturasi protein. Tannin mempunyai kemampuan khusus seperti menggumpalkan alkaloid, gelatin dan protein lainnya. Berikut adalah struktur tanin yang dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 3. Struktur Senyawa Tanin (Noer dkk., 2016)

2) Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk kedalam senyawa fenolik dengan struktur kimia yang diisolasi dari berbagai bagian dari tanaman. Berbagai jenis turunan senyawaan ini telah berhasil diisolasi dan diuji bioaktivitasnya. Flavonoid mempunyai kerangka dasar 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzen (C6) terikat pada suatu rantai propana (C3) sehingga membentuk suatu susunan C6-C3-C6 (Lenny, 2006). Apel memiliki kadar flavonoid dalam jumlah tinggi (Wolfe dkk., 2003). Apel mengandung senyawa flavonoid yang disebut kuersetin. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa apel kaya serat fitokimia dan flavonoid. Institut kanker nasional Amerika Serikat menyatakan apel paling banyak mengandung zat flavonoid dibandingkan dengan buah – buahan lainnya (Sufrida, 2006). Berikut adalah struktur umum flavonoid yang dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 4. Struktur Umum Flavonoid (Harborne, 1987)

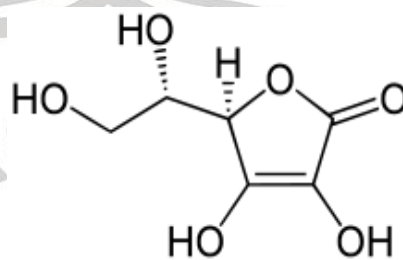
3) Vitamin C

Menurut (Perricone, 2007) vitamin C merupakan asam askorbat, senyawa kimia yang larut dalam air. Vitamin C merupakan antioksidan yang paling efektif untuk menghambat terjadinya kerusakan karena radikal bebas. Vitamin C juga meningkatkan sel – sel darah putih yang dapat melawan infeksi sehingga flu sembuh lebih cepat, membantu mengaktifkan asam folat, meningkatkan penyerapan zat besi sehingga mencegah anemia, meregenerasi vitamin E sehingga bisa dipakai lagi sebagai antioksidan. Hasil analisis yang dilakukan oleh Aprillia dkk (2014) menunjukkan kandungan vitamin C pada buah apel manalagi sebesar 6,37 mg/100mg yang dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis buah apel manalagi (Aprillia dkk., 2014)

Analisis	Kandungan
Total Asam (%)	0.31
Gula reduksi (%)	7.11
Total Fenol (mg/g)	5.44
Vitamin C (mg/100mg)	6.37
Aktifitas Antioksidan (%)	5.62

Vitamin C ini bekerja dalam komponen air, seperti pada sitoplasma. Apel mengandung vitamin C yang merupakan antioksidan dan berfungsi meningkatkan kekebalan tubuh. Sari buah apel sangat baik untuk melawan berbagai serangan virus (Hemila, 1994). Berikut adalah struktur vitamin C yang dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 5. Struktur Senyawa Vitamin C (Depkes RI, 1995)

F. Landasan Teori

Apel (*Malus Sylvestris* Mill) merupakan salah satu buah yang mempunyai senyawa yang bersifat mereduksi antara lain senyawa vitamin C (Aprillia dkk., 2014), flavonoid, (Khotimah dkk., 2016) dan juga tanin. senyawa yang dapat menginterferensi reaksi pada metode Lowry adalah senyawa yang mempunyai sifat mereduksi. Senyawa ini mereduksi kompleks asam fosfomolibdat – fosfotungstat yang berasal dari pereaksi Folin Ciocalteu (Folin and Ciocalteu, 1927; Lowry, *et al.*, 1951) dan juga mampu mereduksi kuprum secara langsung (Winters and Michin, 2005).

Berdasarkan penelitian dari Hayva, (2015) membuktikan bahwa doksisisiklin mengandung senyawa fenolik yang merupakan senyawa

pereduksi dapat menyebabkan terjadinya interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Pola yang dihasilkan dari penambahan doksisisiklin berupa *analyte dependent*. Penelitian lain dari Budiarti, (2017) juga mengungkapkan bahwa vitamin C yang merupakan senyawa pereduksi dapat menyebabkan terjadinya interferensi. Pola interferensi yang terjadi merupakan *analyte dependent*. Dengan demikian buah apel Manalagi (*Malus Sylvestris* Mill) diperkirakan juga memiliki efek yang sama karena apel juga mengandung senyawa pereduksi.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang disampaikan, hipotesis yang diajukan dalam penelitian sebagai berikut :

1. Buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) mengandung senyawa yang bersifat mereduksi seperti flavonoid, tanin dan vitamin C
2. Sari buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) dapat menginterferensi hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry
3. Pola interferensi yang terjadi berupa *analyte dependent*