BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Mengkonsumsi buah merupakan salah satu syarat dalam memenuhi menu gizi seimbang yaitu 4 sehat 5 sempurna. Alpukat adalah salah satu buah yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia karena memiliki berbagai kandungan untuk memenuhi nutrisi dalam tubuh, biasanya masyarakat mengkonsumsi buah alpukat langsung dalam bentuk buah, jus maupun yang sudah dibuat dalam bentuk olahan lainnya. Selain mengadung beberapa vitamin yang baik untuk tubuh (Wardhana dkk., 2009), buah alpukat menurut (Arukwe *et al.,* 2012) juga mengandung senyawa pereduksi seperti tanin, flavonoid, alkaloid, dan fenol yang beberapa diantaranya telah diketahui memiliki manfaat untuk tubuh.

Adanya beberapa manfaat yang diperoleh dari buah alpukat terdapat juga masalah yang perlu diwaspadai, seperti halnya ketika pasien mengkonsumsi buah tersebut sebelum dilakukan pemeriksaan penetapan kadar protein menggunakan metode Lowry. Pemeriksaan kadar protein merupakan proses yang rutin digunakan dilaboratorium sebagai petunjuk status nutrisi serta sebagai petunjuk awal yang penting dalam mendiagnosis adanya penyakit hati (Heyden and Hayningen, 2001) dan penyakit ginjal (Lerma, 2008). Manfaat hasil pemeriksaan klinik sangat ditentukan oleh akurasi, presisi dan selektivitas metode analisis yang digunakan. Adanya penyimpangan dalam hasil pemeriksaan akan sangat berdampak pada penatalaksanaan terapi yang dilakukan.

Reagen pendeteksi gugus-gugus fenolik seperti reagen folin dan ceucalteu telah digunakan dalam penentuan konsentrasi protein oleh Lowry (1951) yang kemudian dikenal dengan metode Lowry. Hingga saat ini metode Lowry merupakan metode penetapan kadar protein yang aplikasinya paling banyak digunakan di laboratorium.

Bentuk yang paling sederhana dari reagen folin ceucalteu dapat mendeteksi residu tirosin (dalam protein) karena kandungan fenolik dalam residu tersebut mampu mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat yang merupakan konstituen utama reagen folin ceucalteu menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru. Hasil reduksi ini menunjukkan puncak absorpsi yang lebar pada daerah merah. Sensitivitsas dari metode Lowry ini mengalami perbaikan yang cukup signifikan apabila digabung dengan ion-ion Cu (Hermansyah, 2012). Dengan tereduksinya senyawa yang digunakan dalam metode Lowry ini, maka dimungkinkan terjadinya penyimpangan pada hasil penetapan kadar protein dengan menggunakan metode Lowry.

Seperti yang dijelaskan oleh Sudjadi dan Rohman (2004) adanya inti aromatis pada senyawa fenolik dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum warna biru. Penelitian Budiarti (2017) tentang vitamin C juga menyebutkan bahwa obat tersebut mampu menyebabkan terjadinya interferensi terhadap hasil penetapan kadar protein menggunakan metode Lowry.
Buah alpukat mengandung senyawa pereduksi seperti golongan fenolik dan vitamin C sehingga mampu menginterferensi penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Oleh karena itu apabila pasien mengkonsumsi sari buah alpukat

sebelum melakukan pemeriksaan kadar protein dapat menjadi peluang terjadinya interferensi. Hingga saat ini belum pernah dilakukan penelitian tentang terjadinya interferensi oleh sari buah alpukat terhadap hasil penetapan kadar protein menggunakan metode Lowry. Oleh karena itu, penelitian ini menjadi sangat penting untuk dilakukan.

B. Perumusan Masalah

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

1. Apakah terdapat senyawa pereduksi dalam sari buah alpukat yang mampu menyebabkan terjadinya interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry?
2. Apakah terjadi interferensi oleh penambahan sari buah alpukat terhadap penetapan kadar protein dengan metode Lowry?
3. Bagaimana pola interferensi yang terjadi sebagai akibat penambahan sari buah alpukat terhadap penetapan kadar protein dengan metode Lowry.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi senyawa - senyawa yang bersifat mereduksi terhadap penetapan kadar protein dengan metode Lowry.
2. Mengetahui pengaruh pemberian penambahan sari buah alpukat terhadap hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry.
3. Mengetahui pola interferensi yang terjadi sebagai akibat penambahan sari buah alpukat menggunakan terhadap penetapan kadar protein dengan metode Lowry.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memberikan bukti secara ilmiah serta memberikan sumber informasi bagi masyarakat sehinggga hasil pemeriksaan klinik lebih akurat

E. Tinjauan Pustaka

1. Protein

Protein adalah senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan satu sama lain dengan ikatan peptida. Sebagai salah satu sumber gizi, protein berperan sebagai sumber asam amino bagi mikroorganisme yang tidak mampu membentuk asam amino tersebut (Fessenden, 1986).

Menurut Giriandra, A (1986) protein merupakan suatu zat dalam susunan kimianya mengandung unsur-unsur oksigen, karbon, hidrogen, nitrogen dan kadang-kadang mengandung unsur-unsur lain seperti sulfur dan fosfor. Protein mengatur keseimbangan cairan dalam jaringan dan pembuluh darah. Sifat amfoter protein yang dapat bereaksi dengan asam dan basa dalam tubuh (Winarno, 1990)

2. Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Secara kolorimetri protein dapat ditetapkan kadarnya dengan metode biuret. Prinsipnya adalah bahwa ikatan peptida dapat membentuk senyawa kompleks berwarna ungu dengan penambahan garam kupri dalam suasana basa (Caprette, 2005). Namun metode ini memiliki kekurangan diantaranya hasil pembacaan tidak murni menunjukan kadar protein saja, melainkan bisa saja kadar senyawa yang mengandung benzena, gugus fenol, gugus sulfhidrin, ikut terbaca kadarnya. Selain itu waktu pelaksanaan yang lama sering kali dirasa kurang efisien (Lehninger, 1982)

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Reaksi yang terlibat adalah kompleks Cu (II) akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu (II) akan tereduksi menjadi Cu (I). Ion Cu^{+} kemudian akan mereduksi reagen folin - ceucalteu, kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat (fosfomolibdotungstat), menghasilkan hetero-polymolybdenum blue akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberi warna biru intensif yang dapat

dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu triptofan dan tirosinya (Sudarmanto, 2008)

Reaksi yang akan terjadi dapat dituliskan sebagai berikut :

1. Cu^{2+} + Protein $\longrightarrow$ kompleks Cu^{2+} $\longrightarrow$ protein Cu^{2+} $\longrightarrow$ Protein Cu^{2+} + gugus fenol dari asam amino $\xrightarrow{\text{reduksi}}$ Cu^{+} + (asam amino) $\xrightarrow{\text{oksidasi}}$ $\longrightarrow$
2. Cu^{2+} + (Folin Ciocalteu) $\xrightarrow{\text{oksidasi}}$ Cu^{2+} + (Folin Ciocalteu) $\longrightarrow$ Biru

Prinsipnya mekanisme peralihan warna terjadi reduksi pereaksi Folin - Ciocalteu menjadi heteropolymolybdenum blue (Waterborg and Matthews 1996). Warna biru terbentuk saat inkubasi dalam 30 menit pada suhu kamar (Lowry *et al*.,1951). Selama inkubasi terjadi penataan berulang kompleks biru, awalnya tidak stabil kemudian menjadi kompleks biru yang stabil dengan intensitas warna yang lebih tinggi.

Metode Lowry memiliki kelebihan yang cukup baik dibandingkan dengan metode Biuret yaitu sensitifitasnya yang lebih tinggi (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 kesnsitifanya (Sudarmanto, 2008) salah satunya adalah senyawa fenol. Senyawa fenol seperti asam pikrat, asam fosfomolibdat - fosfotungstat (Folin and Ciocalteu, 1927; Lowry *et al*., 1951). Selain menginterferensi dengan cara mereduksi senyawa kompleks asam fosfomolibdat-fosfotungstat, Winters and Minchin

(2005) menentukan bahwa senyawa fenol dapat mereduksi kuprum secara langsung.

2. Interferensi Terhadap Pemeriksaan Klinik

Interferensi pada analisis klinik adalah penyimpangan pada hasilpemeriksaan klinik yang diperoleh, baik berupa kenaikan maupun penurunan dibandingkan dengan nilai sebenarnya. Interferensi sebagai suatu kesalahan sistemik dari hasil yang dapat menyebabkan suatu substansi lain pada konsentrasi dalam sampel yang akan dianalisis (Selby, 1999)

Berdasarkan sumber interferan, interferensi dapat dibagi menjadi dua yaitu interferensi endogen dan interferensi eksogen. Interferensi endogen terjadi akibat adanya materi yang secara alami terdapat dalam spesimen, seperti lipid, hemoglobin, dan bilirubin. Sedangkan interferensi eksogen terjadi akibat adanya materi yang secara alami tidak terdapat pada spesimen, seperti obat, racun, produk herbal (Saibaba *et al.*, 1998 ; Diemsky 2008)

Krol *et al.*, (1987) menyebutkan bahwa interferensi tidak hanya terjadi dengan adanya suatu interaksi interferan dan reagen, tetapi karena adanya interaksi interferan dengan analit. Pola interferensi suatu obat dapat terjadi, terbagi menjadi tiga bagian yaitu; *analyte dependent*, besarnya derajat interferensi tergantung dari kadar analit ; *analyte independent*, interferensi terjadi dengan nilai konstan tanpa memandang kadar analit; serta pola interferensi kombinasi keduanya, menghasilkan efek interferan yang tergantung dari interaksi analit dengan interferan.

Menetapkan pola interferensi menggunakan analisis regresi berganda dengan model persamaan sebagai berikut :

$$F(A,S) = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 S + \beta_3 A.S$$

Model persamaan ini menggambarkan interferensi yang terjadi (F) sebagai fungsi dari variabel-variabel bebas yang berupa kadar analit (A), kadar sari buah alpukat (S) dan kadar interaksi analit - sari buah alpukat (A-S). Interferensi F(A,S) sebagai variabel bebas dinyatakan sebagai besarnya perubahan absorbansi yang terbaca atau besarnya perubahan kadar protein. Signikansi koefisian regresi menunjukkan pola interferensi yang terbentuk (Kroll *et al*., 1987)

3. Senyawa Fenolik

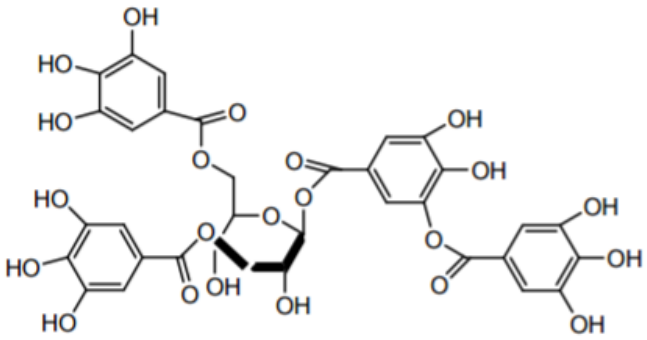
Senyawa fenolik merupakan kelompok besar metabolit sekunder pada tanaman. Senyawa ini termasuk dalam alkohol aromatik karena gugus hidroksilnya selalu melekat pada cincin benzene (Pengelly, 2006). Beberapa senyawa yang termasuk dalam kelompok fenolik adalah fenol sederhana, kumarin, saponin, tannin, alkaloid dan flavonoid. Senyawa fenolik yang tersebar luas dalam tumbuhan cenderung larut dalam air karena kebanyakan lebih sering berkombinasi dengan gula membentuk glikosida dan kebanyakan terdapat pada vakuolasel. Senyawa fenol dapat mengalami oksidasi sehingga dapat berperan sebagai reduktor (Hoffman *et al*.,1997). Menurut Arukwe *et al*., (2012) buah alpukat mengandung beberapa senyawa fenolik yang bersifat mereduksi seperti :

a. Tanin

Tanin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol (Deaville *et al*., 2010) secara kimia terdapat dua jenis tanin yaitu tanin terkondensasi atau flavolan dan tanin terhidrolisis.

Tanin terkondensasi atau flavolan tersebar luas dalam tumbuhan angiospermae, terutama pada tumbuhan-tumbuhan berkayu. Nama lainya adalah proantosianidin karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terpututus dan dibebaskanlah monomer antosianidin. Kebanyakan proantosianidin adalah prosianidin karena bila direaksikan dengan asam akan menghasilkan sianidin. Bila digunakan jaringan kering, hasil tanin agak berkurang terjadinya perlekatan tanin pada tempatnya didalam sel.

Tanin yang terhidrolisis terbatas pada tumbuhan berkeping dua. Terutama terdiri atas dua kelas, yang paling sederhana adalah depsida galoiglukosa. Pada senyawa ini glukosa dikelilingi oleh lima gugus ester galoil atau lebih. Jenis kedua, inti molekul berupa senyawa dimer asam galat, yaitu asam heksahidroksifenat yang berikatan dengan glukosa (Harbone, 1987)



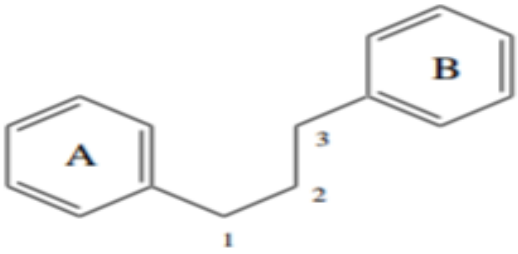
Gambar 1. Struktur Tanin (Noer, 2016)

b. Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol di alam. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang kuat (Robinson, 1995). Dalam tumbuhan, flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida (Harbone, 1987). Aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur (Markham, 1988)

Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C6-C3-C6, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Kerangka dasar karbon pada flavonoid merupakan kombinasi antara jalur sikhimat dan jalur aseto – malonat yang merupakan dua jalur utama biosintesis cincin aromatik. Cincin A pada struktur flavonoid berasal dari jalur poliketida (jalur asetat – malonat), sedangkan cincin B dan tiga atom karbon dari rantai propan berasal dari jalur fenilpropanoid (jalur sikhimat) (Achmad, 1985).

Berikut gambar kerangka dasar flavonoid:



Gambar 2. Struktur Umum Flavonoid (Achmad,1986)

Susunan tersebut dapat menghasilkan 3 struktur, yaitu 1,3 diaril propana (flavonoid), 1,2 diaril propana (isoflavonoid), dan 1,1diaril propana (neoflavonoid) (Markham, 1988) Kelas - kelas yang berlainan dalam golongan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik – oksigen tambahan dari gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1991).

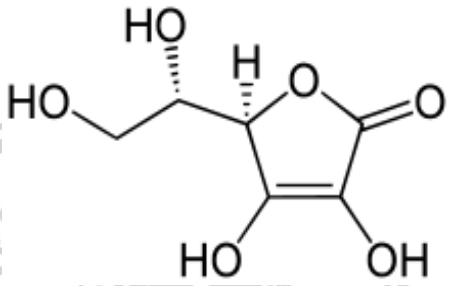
4. Vitamin C

Vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air (aqueous antioxidant). Vitamin C merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh terhadap senyawa oksigen reaktif dalam plasma sel. Vitamin C berbentuk kristal putih dengan berat molekul 176,13 dan rumus molekul $C_6H_8O_6$.. Vitamin C termasuk salah satu vitamin esensial karena manusia tidak dapat menghasilkan vitamin C dalam tubuh sendiri, vitamin C harus diperoleh dari luar tubuh (Sibagariang, 2010)

Vitamin C adalah zat pereduksi kuat yang dapat bertindak sebagai antioksidan (Dewoto, 2007). Sebagai reduktor, vitamin C mereduksi cupri (Cu^{2+}) menjadi cuprus (Cu^{+}) dan ion ferri (Fe^{3+}) menjadi ion ferrous (Fe^{2+})

(Jourkesh *et al.*, 2011). Sumber vitamin C dapat berasal dari sayuran seperti brokoli, bayam, cabai dan buah-buahan seperti jambu biji, nanas, jeruk, tomat, mangga dan masih banyak lagi vitamin C yang terdapat dalam buah dan sayur. Rasa asam pada vitamin C disebabkan oleh asam lain yang terdapat dalam buah bersama dengan vitamin C (Vitahealth, 2006)

Struktur vitamin C dapat dilihat pada gambar 3:



Gambar 3. **Struktur Kimia Vitamin C (Anonim, 1995)**

5. Buah Alpukat(*Persea americana* Mill.)

a. Morfologi

Alpukat berasal dari kawasan Amerika Tengah, buah ini ditanam dikawasan tropis dan suptropis, dan diperkirakan masuk ke Indonesia pada abad ke-18 (Budiana, 2013). Tiga ras botani alpukat telah didomestikasi di pusat asal penyebaranya. Ketiga ras tersebut adalah ras Meksiko (*P.americana* var. *drymifoli* (Schlt & Cham), S.F Blake), ras Guatemala (*P.americana* var. *Guatemilanesis* (L.O Williams), dan ras India Barat (*P.americana* Mill var. *americana).* Setiap ras karakteristik agronomi berbeda seperti bentuk pohon

dan buah, rasa dan warna buah, lama pembentukan buah, toleransi terhadap suhu dingin dan ketahanan penyakit (Douhan *et al.*,2011)

Alpukat di Indonesia termasuk dalam ras India Barat (*P.americana* Mill var. *americana).*Tanaman ini tingginya mencapai 20 meter. Bentuk pohonnya seperti kubah sehingga jauh dari tampak menarik. Daunnya panjang (lonjong) dan tersusun seperti lilin. Pohonnya berkayu, umumnya pencabangan jarang dan arahnya horizontal. Bunga alpukat keluar pada ujung cabang atau ranting dalam tangkai panjang. Warna bunga putih dan setiap bunga akan mekar sebanyak dua kali (Sunarjono, 1998). Daging buah umumnya berwarna kuning seperti mentega dan berbiji satu. Daging buah alpukat bertekstur halus, berserat dan tebal (Wirakusumah, 2008)

b. Varietas alpukat

Tanaman alpukat memiliki lebih kurang 17 varietas. Varietas alpukat yang cukup populer di pasaran adalah alpukat mentega. Alpukat jenis ini termasuk kedalam jenis alpukat unggulan dan paling sering dijajakan di beberapa swalayan dan pinggir jalan. Alpukat mentega juga memiliki daging yang cukup tebal dengan biji yang kecil. Untuk tekstur daging buah ini cukup kenyal dan tak berair. Varietas alpukat unggul yang ditetapkan oleh Menteri Pertanian RI yaitu alpukat hijau panjang dan hijau bundar. Varietas alpukat unggul di Indonesia memiliki ciri -ciri di antaranya produksi buahnya tinggi, toleran terhadap hama dan penyakit, buah seragam berbentuk oval dan berukuran sedang, daging buah berkualitas baik dan tidak berserat, berbiji,

serta kulit buah licin, alpukat mentega termasuk dalam varietas hijau bundar (Redaksi Agromedia, 2009).

Buah masak pohon dicirikan dengan kulit luar yang berubah dari warna hijau mengkilat menjadi hijau kelabu dan terbentuk bintik - bintik kasar berwarna cokelat abu-abu pada kulit buah (Jawa :*burik*). Saat itu jika buah dipetik kemudian buah digoyang - goyangkan akan terasa biji buah yang terlepas dari daging buahnya karena adanya rongga yang terbentuk di antara biji dan daging buah. Pada kondisi ini buah belum dapat dikonsumsi segar dan diperlukan waktu tambahan berkisar antara 3 hingga 5 hari untuk pemeraman buah agar buah dapat dikonsumsi dengan baik (Anonim, 2012).

c. Klasifikasi

Menurut Rukmana (1997) tumbuhan alpukat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Ordo : Laurales

Famili : Lauraceae

Genus : Persea

Species *: Persea americana* Mill.

Gambar 4. Buah alpukat (Chandra, 2013)

d. Komposisi Kimia Buah Alpukat

Menurut Arukwe, U *et al.*, (2012) buah alpukat mengandung saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, fenol, steroid lemak, protein, serat dan karbohidrat. Selain itu buah alpukat juga mengandung beberapa mineral seperti sodium, kalsium, magnesium, fosfor, zinc, iron. Sedangkan menurut penelitian Wardhana, dkk (2009) hasil dari skrining fitokimia buah alpukat mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin A, B, C dan E. Kandungan vitamin C dalam satu setengah buah alpukat (68 g) adalah sebesar 6.0 mg (USDA, 2011) dan menurut Murillo *et al.*, (2012), alpukat mengandung fenol sebesar (51,71 mg/ 100 gram.

F. Landasan Teori

Interferensi merupakan penyimpangan dari hasil yang diharapkan untuk konsentrasi analit tertentu (Kroll *et al.*, 1987). Menurut jurnal *Effect of some chemicals on the accuracy of protein estimation by the Lowry method* (2015), semua senyawa fenolik yang diuji memberikan pengaruh terhadap hasil penetapan proteindengan metode Lowry. Hasil penelitian (Hayva, 2015)

juga menyebutkan bahwa senyawa yang mengandung gugus fenol pada doksisiklin dan (Kartipa, 2015) pada estradiol terbukti menyebabkan interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Pola interferensi yang terjadi *analyte dependent.*

Penelitian Arukwe *et al.*, pada tahun 2012 menyebutkan buah alpukat mengandung beberapa senyawa pereduksi diantaranya golongan fenolik seperti tanin, flavonoid, alkaloid, danfenol selain itu alpukat juga mengandung steroid lemak, protein, serat dan karbohidrat. Sedangkan menurut (USDA, 2011) buah alpukat mengandung vitamin C.

Menurut Kroll *et al.*, (1987) pola interferensi dapat ditentukan melalui analisis regresi linier berganda. Interferensi sebagai fungsi dari variabel-variabel bebas berupa jumlah analit, jumlah interferan dan interaksi analit dengan interferan.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori tersebut maka dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Sari buah alpukat mengandung senyawa pereduksi seperti tanin, flavonoid dan vitamin C.
2. Ada pengaruh terhadap pemberian sari buah alpukat terhadap terjadinya interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry.
3. Pola interferensi yang terjadi *analyte dependent.*