

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Telaah Pustaka**

##### **1. Bilirubin**

Bilirubin ( $C_{33}H_{36}N_4O_6$ ) adalah pigmen yang berbentuk kristal berwarna jingga dan merupakan hasil akhir pemecahan heme melalui proses reduksi oksidasi. Penghancuran sel eritrosit yang tidak matang dan protein heme seperti myoglobin, sitokrom, katalase dan peroksidase akan menghasilkan 25% kadar bilirubin di dalam darah (Lubis, 2013). Pada pemeriksaan laboratorium, kadar bilirubin dibagi menjadi 3 yaitu kadar bilirubin total, bilirubin direk dan bilirubin indirek. Perhitungan kadar bilirubin indirek didapat dari selisih kadar bilirubin total dengan kadar bilirubin direk (Seswoyo, 2016).

Proses pembentukan bilirubin diawali dengan matinya sel eritrosit yang diikuti dengan lisisnya hemoglobin. Sel eritrosit akan dikeluarkan dan dihancurkan di dalam limfa sehingga menghasilkan 6 mg hemoglobin lisis. Hemoglobin menghasilkan apoprotein dihidrolisis menjadi asam-amino. Semua hemeprotein mengalami proses katabolisme terjadi dalam fraksi mikrosom sel retikuloendotel oleh sistem enzim yang kompleks yaitu heme oksigenase. Pemecahan gugus heme merupakan pemutusan rantai metena menjadi biliverdin yaitu suatu tetrapirrol linier. Biliverdin yaitu pigmen warna hijau yang direduksi oleh

Enzim biliverdin reduktase. Rantai metinil pada biliverdin diubah menjadi rantai metilen antara cincin pirol II-IV dengan NADPH dan menghasilkan bilirubin tak terkonjugasi (Yayok, dan Zairen, 2011).

Jenis bilirubin di dalam darah dibagi menjadi 2 yaitu bilirubin direk dan bilirubin indirek. Bilirubin direk memiliki sifat mudah larut dalam air dan dikeluarkan melalui urin. Sedangkan bilirubin indirek tidak mudah larut dalam air dan terikat albumin. Bilirubin merupakan sumber utama dari pemecahan hemoglobin dan pembentukan sel eritrosit yang tidak sempurna (*inaffective erythropoiesis*) di dalam sumsum tulang. Katabolisme hemoglobin diproduksi di dalam jaringan sistem retikuloendotelial (RES) yang menghasilkan produk yaitu bilirubin. Sebagian kecil dari bilirubin berasal dari pemecahan heme atau sitokrom yang mengandung heme diubah menjadi bilirubin sel-sel hati (Oktavianty, 2017).

Metabolisme bilirubin diawali dengan penghancuran eritrosit yang sudah tua oleh sistem retikuloendotel menjadi heme dan globin. Globin akan mengalami denaturasi menjadi asam amino dan digunakan sebagai pembentuk protein lainnya. Heme akan mengalami proses oksidasi dengan melepaskan karbonmonoksida dan besi menjadi biliverdin. Biliverdin reduktase akan memproduksi bilirubin yang tidak terkonjugasi (bilirubin indirek). Bilirubin indirek dilepaskan ke dalam plasma dan berikatan dengan albumin secara nonkovalen kemudian difusi ke hati

akan dikonjugasi oleh asam glukuronat dengan bantuan enzim glukoronil transferase membentuk bilirubin terkonjugasi (bilirubin direk). Kemudian, bilirubin direk dilepas ke dalam saluran empedu dan saluran pencernaan. Di dalam saluran pencernaan, sebagian bilirubin direk dihidrosis oleh flora usus dengan bantuan enzim glukoronidase yang diubah kembali menjadi bilirubin indirek dan melakukan proses rekonjugasi ke hati. Sisanya, bilirubin direk dibawa ke ginjal berubah menjadi urobilinogen dan pada feses berubah menjadi sterkobilin (Rosida, 2016).

Bilirubin direk atau bilirubin terkonjugasi merupakan bilirubin bebas yang memiliki sifat mudah larut dalam air dan mudah bereaksi saat dilakukan pemeriksaan. Bilirubin direk dihasilkan dari pemecahan hemoglobin yang menghasilkan bilirubin glukoronida atau hepatobilirubin. Asam sulfanilat dapat bereaksi cepat dengan bilirubin direk yang terdiazotasi menjadi azobilirubin. Terjadinya peningkatan kadar bilirubin dapat disebabkan gangguan ekskresi bilirubin seperti penyakit sindroma *Dubin Johnson* dan *Rotor*, recurrent (*benign*) intrahepatik, cholestasis, nekrosis hepatoseluler, obstruksi saluran empedu. Diagnosis pada penyakit tersebut diperkuat dengan pemeriksaan urobilin pada sampel urin dan feses dengan hasil negatif (Rosida, 2016).

Bilirubin indirek atau bilirubin tak terkonjugasi (hematobilirubin) adalah bilirubin bebas yang memiliki sifat berikatan dengan albumin,

tidak mudah larut dalam air, sehingga dalam melakukan pemeriksaan harus dicampur dengan akselerator seperti alkohol, kafein atau pelarut lain agar cepat bereaksi dengan reagen kerja. Peningkatan kadar bilirubin indirek dapat diindikasikan sebagai penyakit bilirubinemia karena organ jantung mengalami kelelahan yang disebabkan oleh pengangkutan bilirubin ke dalam peredaran darah mengalami gangguan. Hemolisis atau eritropoiesis merupakan salah satu terjadinya bilirubinemia yang ditandai dengan anemia hemolitik yaitu pada gambaran apusan darah tepi umur sel eritrosit yang relatif pendek. Kadar bilirubin total merupakan gabungan dari kadar bilirubin direk dan bilirubin indirek dalam pemeriksaan bilirubin di kimia klinik (Kurniawan, dan Fajar B., 2014).

Azobilirubin merupakan suatu senyawa diazo yang terbentuk dari kondensasi DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) dengan bilirubin dalam reaksi Van den Bergh. Munculnya senyawa azobilirubin ditunjukkan dengan perubahan warna yang terjadi yaitu berwarna merah keunguan. Penanda warna dan indikator pada azobilirubin dapat dirubah dengan menambahkan alkali ttrat yang membuat azobilirubin berwarna ungu menjadi biru. Azobilirubin juga dapat digunakan untuk menentukan seberapa banyaknya bilirubin yang terkonjugasi (direk) dalam darah dibandingkan dengan bilirubin tak terkonjugasi (indirek). Proses ini dilakukan dengan penambahan DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) dengan kafein-benzoat sebagai akselerator. Bilirubin terkonjugasi akan

bereaksi dengan reagen azo, sedangkan bilirubin tak terkonjugasi tidak bereaksi dengan reagen azo (Cherian, A., 2010).

DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) merupakan campuran dari kit reagen 1 dan reagen 2 pada metode *Jendrassik-Groff* yang mengandung *sulphanilic acid* ( $\text{H}_3\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_3$ ) dan asam klorida (HCl) ditambah dengan natrium nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) yang membentuk DSA ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ) dan jika ditambahkan bilirubin akan membentuk azobilirubin ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ ). Stabilitas DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) dapat dilakukan dengan penyimpanan reagen dalam keadaan tertutup agar reaksi yang terjadi dilakukan seminimal mungkin atau dengan penambahan senyawa asam 1,3,6 naphthalenetrisulfonic (Diasys, 2015).

Reaksi kimiawi antara DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) dan bilirubin membentuk senyawa azobilirubin pertama kali dijelaskan oleh Ehrlich, kemudian pada tahun 1913 Van den Bergh menerapkan reaksi tersebut pada sampel serum. Tahun 1937, Malloy dan Evelyn dan pada tahun 1938, Jendrassik dan Groff melakukan modifikasi metode dari Van den Bergh, yang mana metode tersebut masih banyak digunakan di laboratorium kimia klinis masa itu, padahal masih terdapat kekurangan pada metode tersebut (Department of Pediatric Biochemistry, 1991).

## 2. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kadar Bilirubin Direk Setelah Penambahan DSA (*Diazotized Sulphaanilic Acid*)

### a. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman atau sering disebut dengan pH digunakan untuk mengukur tingkat keasaman atau basa dalam suatu larutan. pH dapat menentukan kondisi yang mengatur laju reaksi bilirubin dengan DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*). Buffer dapat digunakan untuk meningkatkan laju reaksi pada bilirubin total dan bilirubin indirek. Namun, reaksi yang terjadi berlangsung lambat dalam larutan asam kuat, tetapi sangat cepat dalam larutan netral atau basa. Stabilitas azobilirubin yang terbentuk bergantung pada reaksi medium (terurai dengan cepat dalam larutan alkali) dan keberadaan zat lain, misalnya kafein dalam larutan. Faktanya, kafein muncul untuk mempercepat laju reaksi dan menstabilkan produk dan digunakan sebagai akselerator (Department of Pediatric Biochemistry, 1991).

Bilirubin indirek dan bilirubin total dipengaruhi oleh pH diatas 6,4. Semakin tinggi pH yang direkasikan maka semakin cepat pula reaksi bilirubin indirek yang terjadi. Namun, harus dilakukan dengan penambahan akselerator seperti kafein karena bilirubin indirek cepat bereaksi bila ditambahkan dengan akselerator. Menurunnya laju reaksi disebabkan karena pengaruh pH asam. Maka dari itu, perlu ditambahkan akselerator karena akselerator berperan dalam

mempercepat laju reaksi. Sedangkan pada pemeriksaan bilirubin direk, suasana yang direaksikan sebaiknya dalam suasana asam karea jika dalam suasana basa terjadi penurunan kadar bilirubin direk (Basil T. dan Tai W.W., 1991).

#### b. Akselerator

Akselelator merupakan zat kimia yang dapat digunakan untuk mempercepat suatu reaksi. Pemeriksaan kadar bilirubin direk tidak perlu melakukan penambahan akselerator karena dari sifat bilirubin direk sendiri ialah bereaksi cepat dengan DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*). Sebaliknya jika dilakukan penambahan akselerator justru akan meningkatkan kadar bilirubin direk. Akselerator dapat digunakan pada pemeriksaan kadar bilirubin total dan kadar bilirubin indirek. Terdapat beberapa jenis akselerator seperti alkohol dan kafein. Namun, pada pemeriksaan laboratorium akselerator yang sering digunakan adalah kafein (Department of Pediatric Biochemistry, 1991).

#### c. Hemolisis

Hemolisis adalah kerusakan membran sel eritrosit yang menyebabkan lepasnya hemoglobin dan komponen intraseluler lainnya ke dalam cairan disekitarnya. Hemolisis terlihat berwarna merah pada plasma atau serum (Lippy, dkk., 2008).

Pada dasarnya, puncak reaksi pada bilirubin direk terjadi pada waktu 5 menit. Tetapi, warna pada azobilirubin tersebut terus berkembang selama interval waktu yang akan diteliti. Hemoglobin dapat mengganggu diazotasi bilirubin jika kadar hemoglobin yang berlebihan karena hemoglobin dapat menekan nilai bilirubin yang disebabkan oleh penghancuran azopigmen selama penambahan reagen diazo, namun dapat diatasi dengan penambahan HCl (asam klorida). Terjadinya hemolisis juga dapat mempengaruhi kinerja diazotasi bilirubin (Cherian A., G., dkk., 1981).

#### d. Waktu

Waktu berpengaruh terhadap reaksi DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) terhadap kadar bilirubin untuk membentuk senyawa diazo. Dalam pemeriksaan bilirubin metode *Jendrassik-Groff*, waktu yang optimal dalam terjadinya reaksi tepat 5 menit. Namun, jika melebihi 5 menit terjadi peningkatan absorbansi disebabkan karena bilirubin direk yang bereaksi dengan azobilirubin sudah bereaksi semua sehingga azobilirubin akan bereaksi lagi dengan bilirubin indirek di dalam serum dan jika waktu kurang dari 5 menit, reaksi yang terjadi berjalan tidak sempurna dan belum mencapai keseimbangan untuk membentuk senyawa azobilirubin.



#### e. Kekeruhan

Kekeruhan dapat membengaruhi besarnya absorbansi pada pemeriksaan terutama pada pemeriksaan bilirubin direk. Kekeruhan dapat terjadi pada serum lipemik, ikterik dan intralipid. Kekeruhan dapat menyebabkan kesalahan pada pemeriksaan bilirubin karena pancaran cahaya pada spektrofotometer berbanding terbalik dengan panjang gelombang (Cherian A., G., dkk., 1981).

### 3. Pemeriksaan Bilirubin Direk

Pemeriksaan bilirubin direk merupakan salah satu pemeriksaan laboratorium klinik yang digunakan untuk mendiagnosa suatu penyakit di dalam organ hati. Metode pemeriksaan bilirubin direk yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode *Jendrassik-Groff*. Pada tahun 1938, Jendrassik dan Groff melakukan modifikasi metode diazo dengan menggunakan kafein benzoat sebagai akselelator. Prinsip pemeriksaan adalah bilirubin bereaksi dengan asam sulfanilat yang terdiazotisasi ditambah dengan natrium nitrit yang membentuk azobilirubin yang dapat diukur pada panjang gelombang 546 nm. Reaksi terjadi pada atom karbon metilen antara cincin B dan C, dengan pembentukan masing-masing azopigmen dan *hydroxypyromethenecarbinol*. Pada pemeriksaan bilirubin total dan bilirubin indirek perlu ditambahkan buffer tartrat agar azobilirubin tersebut dalam suasana basa dan berubah warna menjadi biru

untuk mempercepat reaksi. Warna yang berkembang pada pemeriksaan bilirubin total menjadi tidak stabil dalam waktu 3 jam setelah penambahan Fehling II (Basil T. dan Tai W.W., 1991).

Kelebihan dari metode ini adalah pada pemeriksaan kadar bilirubin direk waktu inkubasi yang dilakukan tidak terlalu lama yaitu tepat 5 menit. Kekurangan dari metode ini adalah harga reagen yang begitu mahal, waktu pembacaan harus tepat 5 menit tidak ada batas toleransi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada pengaruh variasi lama waktu inkubasi pemeriksaan terhadap kadar bilirubin direk yang menggunakan sampel serum. Nilai rujukan pemeriksaan bilirubin direk adalah  $\leq 0,2$  mg/dl atau  $\leq 3,4$   $\mu$ mol/L (Haeria, 2010).

#### **4. Serum**

Serum merupakan bagian dari darah yang tidak terdapat faktor pembekuan darah. Pada keadaan normal, jika darah diambil dengan spuit dan dimasukkan ke dalam tabung vacutainer, maka bekuan darah tersebut terbentuk dari setengah benda padat berasal dari sel-sel darah. Cairan yang berwarna kuning disekitar benda padat tersebut disebut serum. Jika proses koagulasi berlangsung abnormal, pada serum akan mengandung sisa-sisa fibrinogen dan protrombin yang belum dikonvensi (Sacher, 2004).

Serum ekuivalen dengan plasma tanpa protrombin, faktor VIII, faktor V dan fibrinogen. Serum didapat dengan cara pembekuan darah dan bekumannya dipisahkan dengan *sentrifuge*. Serum memiliki kelebihan dibandingkan dengan plasma karena serum mencegah pencemaran spesimen oleh antikoagulan yang mempengaruhi satu atau lebih pada pemeriksaan (Zunaidi, 2011).

Kadungan pada serum terdiri dari air 91%, protein 8% (albumin, globulin, protrombin dan fibrinogen), mineral 0,9% (natrium klorida, natrium bikarbonat, garam dan kalium, fosfor, magnesium dan besi), gas oksigen dan karbondioksida, hormon, enzim, antigen dan sisanya diisi bahan-bahan organik seperti glukosa, lemak, urea, asam urat, kreatinin, kolesterol dan asam amino. Warna pada serum normal adalah kekuningan. Ada beberapa sampel serum yang abnormal diantaranya serum hemolisis, serum lipemik dan serum ikterik. Serum hemolisis adalah serum berwarna kemerahan yang disebabkan karena lepasnya hemoglobin dari eritrosit yang rusak. Serum lipemik merupakan serum berwarna putih keruh yang disebabkan adanya partikel lipoprotein yang besar. Serum ikterik adalah serum yang disebabkan karena adanya peningkatan kadar bilirubin yang sering disebut dengan hiperbilirubinemia sehingga warna yang dihasilkan kuning kecoklatan (Siberhagl, 2005).

## 5. Spektrofotometri

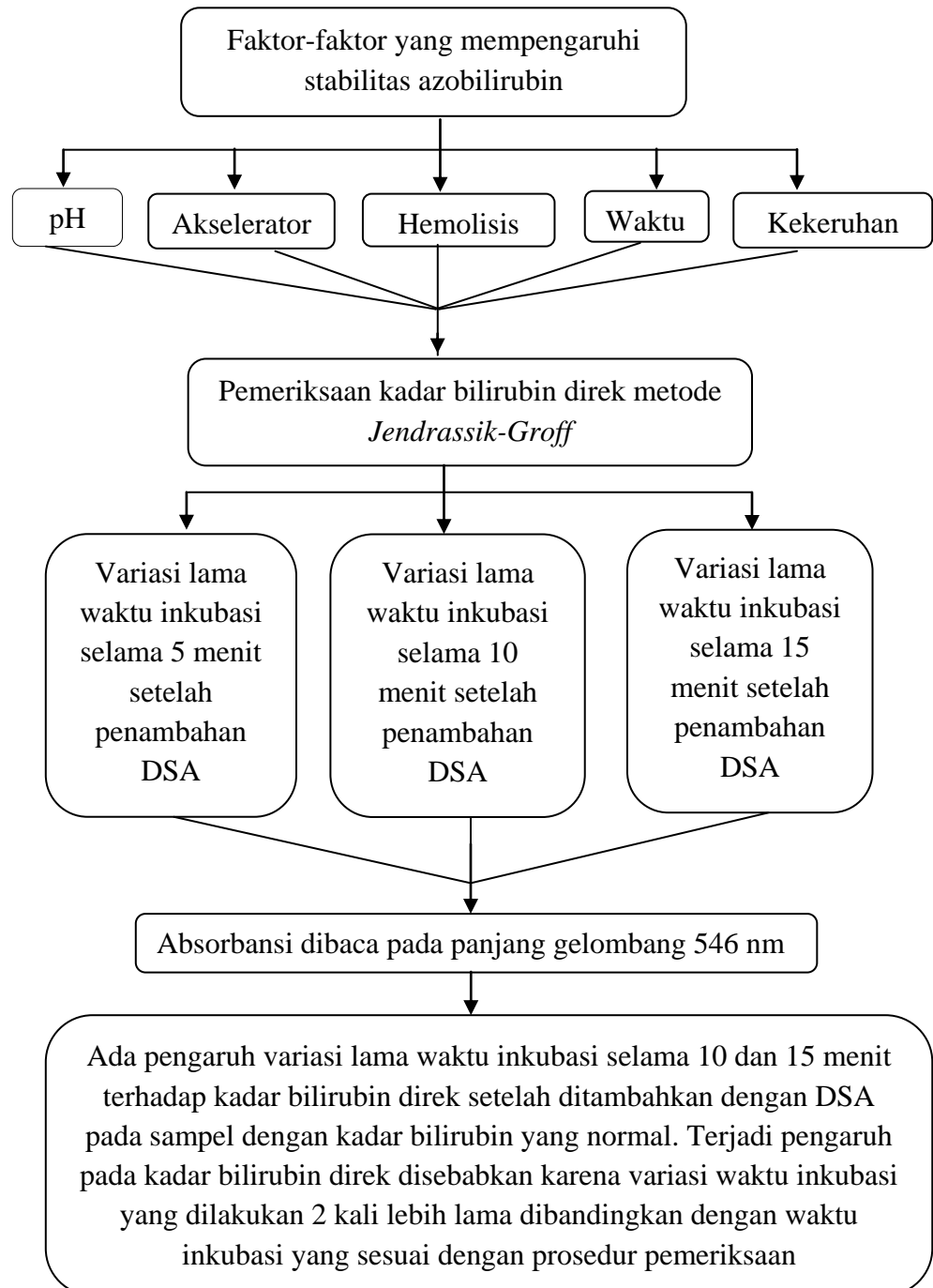
Spektrofotometri merupakan suatu metode pengukuran berdasarkan absorbansi cahaya dengan panjang gelombang tertentu melalui suatu larutan yang mengandung kontaminan dan diukur konsentrasinya yang disebut dengan absorpsi spektrofotometri. Kolorimetri adalah gelombang cahaya tampak yang digunakan pada metode pengukuran spektrofotometri. Panjang gelombang yang digunakan oleh spektrofotometri yaitu gelombang cahaya tampak, gelombang ultraviolet dan gelombang inframerah. Prinsip yang digunakan adalah banyaknya cahaya yang diabsorpsi oleh larutan yang sama dengan konsentrasi kontaminan (Lestari F., 2010).

Konsentrasi larutan di kuvet sebanding dengan cahaya yang diserap. Spektrofotometer merupakan gabungan dari alat spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan cahaya dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer merupakan alat ukur intensitas cahaya yang diabsorpsi. Spektrofotometer dalam pemeriksaan digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika ditransmisikan, direfleksikan sebagai fungsi panjang gelombang (Siregar, M., T., dan dkk., 2018).

Kelebihan dari alat spektrofotometer dibandingkan dengan fotometer adalah sinar putih dari spektrofotometer lebih mudah terseleksi dengan alat pengurai seperti prisma, grating ataupun celah optis.

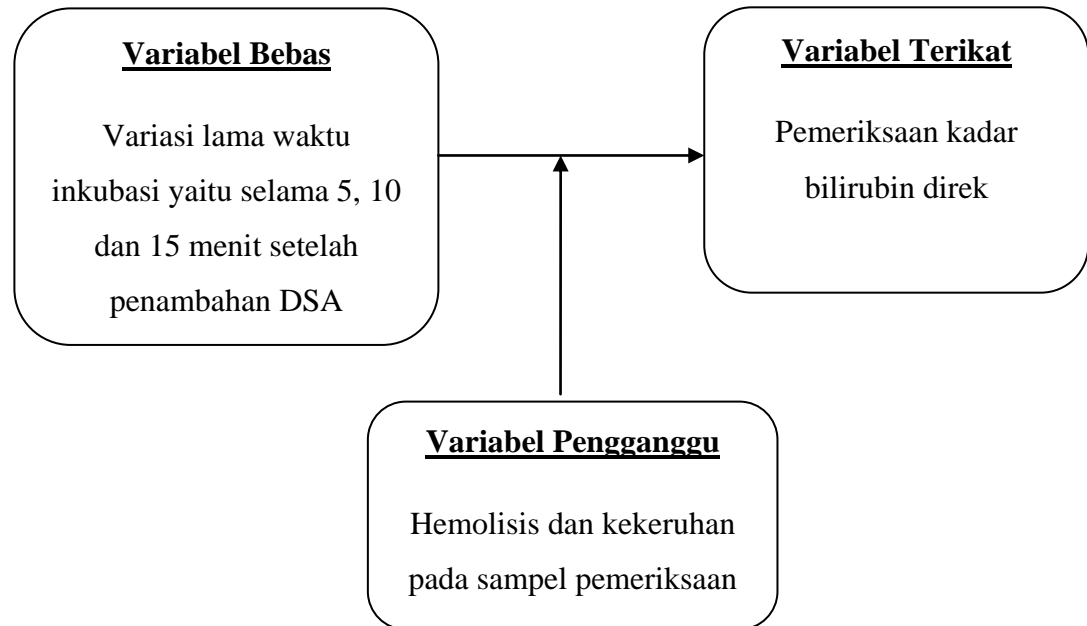
Fotometer filter menggunakan sinar dengan panjang gelombang tertentu yang didapat berbagai filter dari berbagai warna yang mempunyai spesifikasi melewati trayek panjang gelombang tertentu (Siregar, M., T., dan dkk., 2018).

## B. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

### C. Hubungan Antar Variabel



Gambar 2. Hubungan Antar Variabel

### D. Hipotesis Penelitian

Ada pengaruh lama waktu inkubasi selama 5, 10 dan 15 menit terhadap kadar bilirubin direk setelah penambahan DSA (*Diazotized Sulphanilic Acid*) dengan metode *Jendrassik-Groff*.