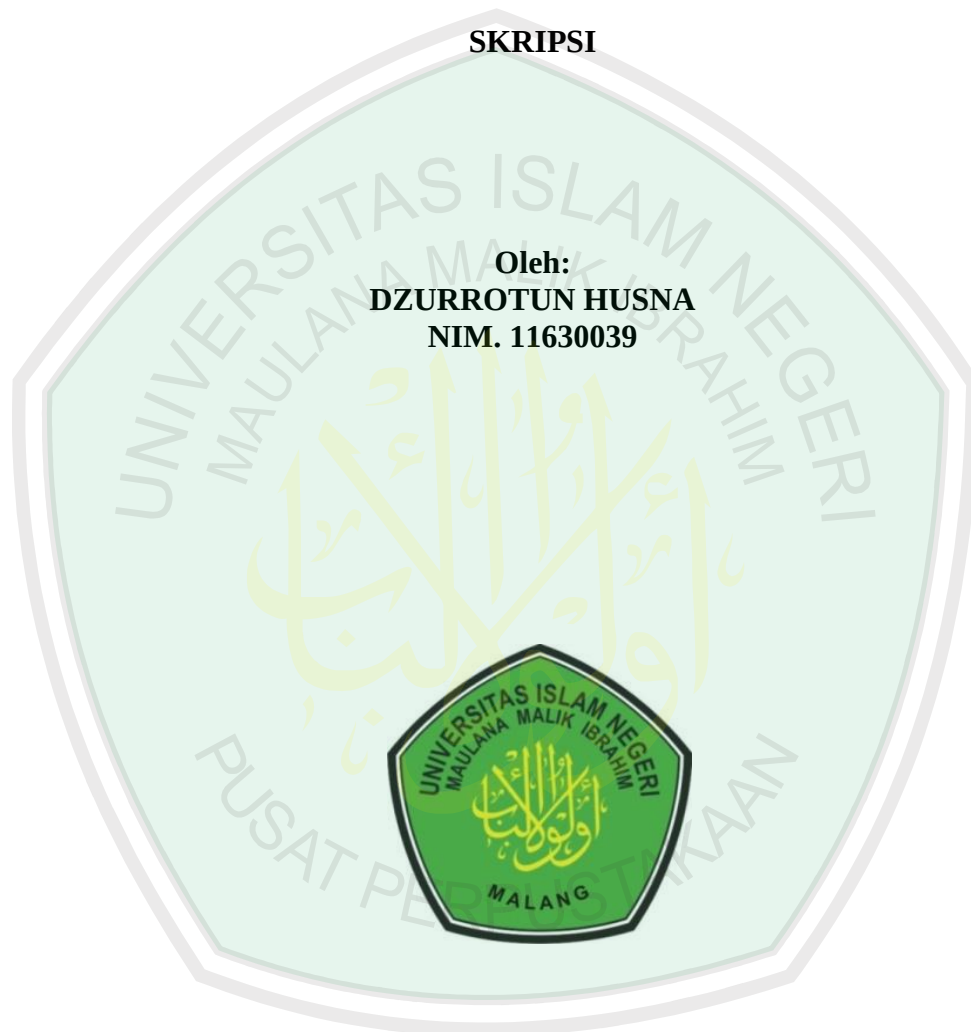


**PENGARUH POLIETILEN GLIKOL (PEG)
DAN ETILENDIAMINATETRAASETAT (EDTA) DALAM ANALISIS
FENILPIRUVAT MENGGUNAKAN PLAT SILIKA GEL
TERIMMOBILISASI FERRI AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

Oleh:
DZURROTUN HUSNA
NIM. 11630039



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2015**

**PENGARUH POLIETILEN GLIKOL (PEG)
DAN ETILENDIAMINATETRAASETAT (EDTA) DALAM ANALISIS
FENILPIRUVAT MENGGUNAKAN PLAT SILIKA GEL
TERIMMOBILISASI FERRI AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

Oleh:
DZURROTUN HUSNA
NIM. 11630039

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2015

**PENGARUH POLIETILEN GLIKOL (PEG)
DAN ETILENDIAMINATETRAASETAT (EDTA) DALAM ANALISIS
FENILPIRUVAT MENGGUNAKAN PLAT SILIKA GEL
TERIMMOBILISASI FERRI AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

**Oleh:
DZURROTUN HUSNA
NIM. 11630039**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 17 Desember 2015**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Diana Candra Dewi, M.Si
NIP. 19770720 200312 2 001**

**Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP. 19761003 200312 1 004**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**

**Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

**PENGARUH POLIETILEN GLIKOL (PEG)
DAN ETILENDIAMINATETRAASETAT (EDTA) DALAM ANALISIS
FENILPIRUVAT MENGGUNAKAN PLAT SILIKA GEL
TERIMMOBILISASI FERRI AMMONIUM SULFAT**

SKRIPSI

Oleh:
DZURROTUN HUSNA
NIM. 11630039

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 17 Desember 2015**

Penguji Utama	: Suci Amalia, M.Sc	(.....)
	NIP. 19821104 200901 2 007	
Ketua Penguji	: Arief Rahmatulloh, M.Si	(.....)
	LB. 63027	
Sekretaris Penguji	: Diana Candra Dewi, M.Si	(.....)
	NIP. 19770720 200312 2 001	
Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M.Pd	(.....)
	NIP. 19761003 200312 1 004	

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**

Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dzurrotun Husna

NIM : 11630039

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : “Pengaruh Polietilen Glikol (PEG) Dan Etilendiaminatetraasetat (EDTA) Dalam Analisis Fenilpiruvat Menggunakan Plat Silika Terimmobilisasi Ferri Ammonium Sulfat”

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 23 Desember 2015

Yang Membuat Pernyataan,

Dzurrotun Husna

NIM. 11630039

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin. Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena hanya berkat rahmat, hidayah dan karunia-Nya penulis berhasil menyelesaikan skripsi dengan judul “Pengaruh Polietilen Glikol (PEG) dan Etilendiaminatetraasetat (EDTA) Dalam Analisis Fenilpiruvat Menggunakan Plat Silika Terimmobilisasi Ferri Amonium Sulfat”. Dalam penyusunan skripsi ini, mahasiswa telah mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Atas terselesaikannya skripsi ini dengan tulus saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. drh. Bayyinatul Muctaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Diana Candra Dewi, M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang telah membimbing dan mengarahkan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik, Ahmad Abtokhi, M.Pd selaku Dosen Pembimbing II.
5. Suci Amalia, M.Sc selaku Penguji Utama, Arief Rahmatulloh, M.Si selaku konsultan.
6. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

7. Kedua orang tua kami yang telah memberikan dukungan serta do'anya, sehingga kegiatan dan penyusunan penelitian ini dapat berjalan dengan lancar. Kedua kakak dan adik terima kasih atas kasih sayang dan dukungannya.
8. Ervan Soesanto terima kasih atas kasih sayang, perhatian, dan kesabaranmu yang telah memberikanku semangat.
9. Teman-teman kimia angkatan 2011 yang telah memberikan semangat dan dukungan dalam menyelesaikan tugas akhir ini, terutama Muslimatul K, Indrayati, Makhshushotul R, Ainun S, Hari M, Hanim Istatik, Yunus M.
10. Semua pihak yang turut membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu.

Kami menyadari bahwa tanpa bantuan dari pihak tersebut, penulisan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh sebab itu, saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk penelitian lanjutan di masa mendatang. Semoga Allah SWT memberikan rahmat kepada semua. Amin

Malang, 23 Desember 2015

Dzurrotun Husna

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Phenylketonuria</i> (PKU)	9
2.2 Urin	15
2.3 Asam Fenilpiruvat	18
2.4 Polietilen Glikol (PEG)	19
2.5 Etilendiaminatetraasetat (EDTA)	21
2.6 Metode Deteksi <i>Phenylketonuria</i>	23
2.7 Plat Silika Gel	29
2.8 Immobilisasi	30
2.9 Adsorpsi	31
2.10 Spektrofotometer UV-Vis	33
2.11 Penyakit dalam Perspektif Islam	35
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Pelaksanaan Penelitian	37
3.2 Alat dan Bahan	37
3.2.1 Alat	37
3.2.2 Bahan	37
3.3 Tahapan Penelitian	37
3.4 Langkah Kerja	38
3.4.1 Preparasi Sampel Urin	38
3.4.2 Preparasi Bahan	38
3.4.2.1 Pembuatan Larutan Natrium Fenilpiruvat	38
3.4.2.2 Pembuatan Reagen Identifikasi Fenilpiruvat	39
3.4.3 Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Fenilpiruvat dengan Ion Ferri Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis	40
3.4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kompleks Fe- Fenilpiruvat (Fe-PP ₃)	40

3.4.3.2	Penentuan Waktu Kestabilan Kompleks Fe-Fenilpiruvat.....	40
3.4.3.3	Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen Ferri Amonium Sulfat Yang Bereaksi dengan Fenilpiruvat...	41
3.4.3.4	Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen PEG dan EDTA Terhadap Reaksi Fe-Fenilpiruvat.....	41
3.4.4	Immobilisasi Larutan Ferri Ammonium Sulfat, Polietilen Glikol, Etilendiamintetraasetat, dan Larutan Buffer KCl-HCl pada Plat Silika untuk Identifikasi Fenilpiruvat	42
3.4.5	Performansi Reagen Identifikasi Fenilpiruvat Terhadap Plat Silika Gel.....	43
3.4.6	Pengujian Plat Silika Terimmobilisasi Terhadap Sampel	43
3.4.7	Pengumpulan Data.....	43
3.4.8	Analisa Data	44
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Preparasi Sampel Urin.....	45
4.2	Preparasi Bahan.....	45
4.3	Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Fenilpiruvat dengan Ion Ferri Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	46
4.3.1	Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kompleks Fe-Fenilpiruvat (Fe-PP ₃)	46
4.3.2	Penentuan Waktu Kestabilan Kompleks Fe-fenilpiruvat	50
4.3.3	Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen Ferri Amonium Sulfat yang Bereaksi dengan Fenilpiruvat.....	53
4.3.4	Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen PEG dan EDTA terhadap Reaksi Fe-fenilpiruvat	56
4.4	Immobilisasi Reagen Ferri Amonium Sulfat, Polietilen Glikol, Etilendiaminatetraasetat, dan buffer KCl-HCl pada Plat Silika untuk Identifikasi Fenilpiruvat.....	61
4.5	Performansi Reagen Identifikasi Fenilpiruvat terhadap Plat Silika Gel.....	62
4.6	Pengujian Plat Silika Gel Terimmobilisasi Terhadap Sampel	64
4.7	Pandangan Islam Tentang Penelitian Pengaruh Polietilen Glikol dan Etilendiamintetraasetat dalam Analisis Fenilpiruvat Menggunakan Plat Silika Terimmobilisasi Ferri Amonium Sulfat	66
 BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	69
5.2	Saran.....	69
 DAFTAR PUSTAKA.....		70
LAMPIRAN.....		75

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kejadian PKU pada beberapa Populasi di Negara.....	13
Tabel 2.2 Hubungan warna dengan panjang gelombang sinar tampak.....	33
Tabel 4.1 Hasil pencampuran larutan dengan menggunakan variasi konsentrasi FAS.....	55
Tabel 4.2 Hasil pencampuran larutan dengan variasi konsentrasi PEG.....	58
Tabel 4.3 Hasil dari penentuan konsentrasi optimum EDTA	60
Tabel 4.4 Immobilisasi plat silika dengan reagen identifikasi optimum	61
Tabel 4.5 Hasil penetesan natrium fenilpiruvat dengan variasi konsentrasi	62
Tabel 4.6 Variasi konsentrasi natrium fenilpiruvat dalam pelarut urin	64



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Reaksi Fenilalanin menjadi Asam Amino Tirosin	10
Gambar 2.2 Reaksi Fenilalanin menjadi Senyawa Fenilpiruvat	10
Gambar 2.3 Struktur Kimia Fenilalanin	12
Gambar 2.4 Struktur Senyawa Natrium Fenilpiruvat	18
Gambar 2.5 Struktur Polietilen Glikol	21
Gambar 2.6 Struktur Oktahedral Besi(III)EDTA.....	22
Gambar 4.1 Spektra UV-Vis kompleks Fe-fenilpiruvat	47
Gambar 4.2 Diagram Tanabe-Sugano untuk kompleks dengan ion pusat d^6	49
Gambar 4.3 Grafik penentuan waktu kestabilan pembentukan kompleks Fe-fenilpiruvat	51
Gambar 4.4 Grafik penentuan konsentrasi optimum FAS dengan fenilpiruvat...	54
Gambar 4.5 Dugaan struktur kompleks Fe-Fenilpiruvat.....	56
Gambar 4.6 Grafik penentuan konsentrasi optimum PEG dengan fenilpiruvat...	57
Gambar 4.7 Grafik penentuan konsentrasi optimum EDTA dengan fenilpiruvat.....	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir	75
Lampiran 2 Perhitungan Pembuatan Bahan	84
Lampiran 3 Spektrum Panjang Gelombang Optimum Kompleks Fe- Fenilpiruvat	89
Lampiran 4 Hasil Penentuan Waktu Optimum Pembentukan Kompleks Fe- Fenilpiruvat.....	90
Lampiran 5 Hasil Jumlah Konsentrasi Optimum Reagen FAS, PEG, dan EDTA	91
Lampiran 6 Uji Statistika Pengaruh Polietilen Glikol (PEG) dan Etilendiaminatetraasetat (EDTA) Terhadap Kompleks Fe- fenilpiruvat.....	92



ABSTRAK

Husna, Dzurrotun. 2015. **Pengaruh Polietilen glikol (PEG) dan Etilendiamintetraasetat (EDTA) Dalam Analisis Fenilpiruvat Menggunakan Plat Silika Terimmobilisasi Ferri Amonium Sulfat**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Diana Candra Dewi, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Konsultan: Arief Rahmatulloh, M.Si.

Phenylketonuria ialah suatu penyakit genetik yang dikenali dengan kurangnya atau bahkan tidak adanya enzim phenylalanin hidroksilase (PAH) yang merubah asam amino fenilalanin menjadi tirosin. Kadar fenilalanin yang tinggi pada tubuh akan dikonversi menjadi asam fenilpiruvat dan dikeluarkan lewat urin. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh dari larutan polietilen glikol dan etilendiamintetraasetat dalam analisis fenilpiruvat terhadap kompleks Fe-fenilpiruvat pada urin. Penelitian ini meliputi preparasi sampel urin, preparasi bahan, penentuan panjang gelombang optimum kompleks Fe-fenilpiruvat, penentuan jumlah konsentrasi optimum reagen feri amonium sulfat (FAS), polietilen glikol (PEG) dan etilendiamintetraasetat (EDTA), immobilisasi reagen feri amonium sulfat (FAS), polietilen glikol (PEG), etilendiamintetraasetat (EDTA) dan larutan buffer KCl-HCl pada plat silika gel untuk identifikasi fenilpiruvat, performansi reagen identifikasi fenilpiruvat terhadap plat silika, pengujian plat silika terimmobilisasi terhadap sampel, dan analisis data. Hasil penelitian menunjukkan bahwa polietilen glikol (PEG) dan etilendiamintetraasetat berpengaruh terhadap kompleks Fe-fenilpiruvat yang berwarna hijau pada plat silika gel dan diperoleh konsentrasi optimum yaitu 700 ppm. Hasil identifikasi fenilpiruvat menggunakan plat silika terimmobil reagen identifikasi optimum ditunjukkan oleh warna hijau yang jelas dan stabil cukup lama ketika ditetesi natrium fenilpiruvat 500 ppm, warna bertahan selama kurang lebih 1 jam. Perubahan warna dari kuning menjadi hijau pada plat silika gel terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat mulai tampak pada konsentrasi natrium fenilpiruvat 100 ppm.

Kata kunci: *phenylketonuria*, polietilen glikol, EDTA, fenilpiruvat, ferri amonium sulfat, urin

ABSTRACT

Husna, Dzurrotun. 2015. **The Effect of Polyethylene Glycol (PEG) and Ethylenediaminetetraacetat (EDTA) for Phenylpyruvate Analysis Using Silica Gel Plate Immobilization Ferric Ammonium Sulfate**. Thesis. Chemistry Major of Science and Technology Faculty, Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor: Diana Candra Dewi, M.Si; Supervisor of Religion: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Consultant: Arief Rahmatulloh, M.Si.

Phenylketonuria is a genetic disease caused by deficiencies or inexistence phenylalanine hidroxylase enzyme (PAH). PAH has a purpose to shift the phenylalanine amino acid into tyrosine. The high concentration of phenylalanine in human body will be converted into phenylpyruvic acid and released through baby urine. The aim of this research is to the effect of polyethyleneglycol solution and ethylenediaminetetraasetat in phenylpyruvate analysis of the complex Fe-phenylpyruvate in the urine. This research consist of sample preparation (urine); materials preparation; determination of the optimum wavelength of Fe-phenylpyruvate; determination of the best concentration of $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, polyethylene glycol (PEG), and ethylenediaminetetraasetat (EDTA); immobilization of $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, polyethylene glycol (PEG), and ethylenediaminetetraasetat (EDTA), and KCl-HCl buffer into silica gel plate to identify phenylpyruvate; identify the performance of phenylpyruvate into silica gel plate; immobilized silica gel plate testing on samples and data analyze. The result of this research show polyethylene glycol (PEG) and ethylenediaminetetraacetat (EDTA) affects the complex on the Fe-phenylpyruvate green into silica gel plate and obtained the optimum concentration of 700 ppm. The result of phenylpyruvate conducted by silica gel plate that immobilized was gave when it checked examined by sodium phenylpyruvate 500 ppm. Phenylpyruvate identification results using a silica plate immobilized optimum reagent identification indicated by the green color of the clear and stable long enough when spilled sodium phenylpyruvate 500 ppm, color last approximately 1 hour. Color transformation from yellow to green on silica gel plate reagent identification immobilized phenylpyruvate began to appear on sodium phenylpyruvate concentration of 100 ppm.

Keywords: phenylketonuria, polietilen glikol, ethylenediaminetetraacetat, phenylpyruvate, ferric ammonium sulfate, urine

الملخص

حسنى، ذرة. ٢٠١٥. تأثير فولي اتيلن كليكول (PEG) وأتيلن دينامن تترأستات (EDTA) في تحليل استخدام فينيل البيروفات لوحة هلام السيليكا المشلول فري امونيوم سلفات (FAS). البحث. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك ابراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: دياناجندرا دوي الماجستير، وأحمد ابوتوخي الماجستير، وأريف رحمتو الله الماجستير.

فينيل كتونرياهو المرض الوراثي الذي عرفه بسبب بنقص أنزيم الفينيل ألانين هيدروكسيلاسي (PAH) أن يغير الأحماض الأمينية الفينيل إلى التيروسين. قدر الفينيل ألانين المرتفع في البدان سيغير يتحول حمض فينيل البيروفات واستخرج من البول. وكانت الأهداف من هذا البحث هي لمعرفة تأثير من محلول فولي اتيلن كليكول (PEG) وأتيلن ديامن تترأستات (EDTA) في تحليل فينيل البيروفات معقدة في البول. هذا البحث هو إعداد عينة البول، وإعداد المواد، وتحديد الطول الموحى الأمثل مجمع في فينيل البيروفات، وتحديد جملة الاكزاث الأمثل لكاشف فري امونيوم سلفات (FAS)، فولي اتيلن كليكول (PEG) وأتيلن ديامن تترأستات (EDTA)، كاشف مستوقف فري امونيوم سلفات، فولي اتيلن كليكول وأتيلن ديامن تترأستات وبوكل KCl-HCl لوحة هلام السيليكا لتحديد فينيل البيروفات، أداء مستوقف تحديد فينيل البيروفات في لوحة هلام السيليكا، يجمع ملوحة هلام السيليكا المشلول على العينات، وتحليل البيانات. حصيلة البحث يدل أن فولي اتيلن كليكول (PEG) وأتيلن ديامن تترأستات (EDTA) يأتثر لمجمع في فينيل البيروفات ولونه أخضر على لوحة هلام السيليكا ويحصل تركيز ٧٠٠ جزء في المليون. حصيلة البحث فينيل البيروفات يلبس لوحة هلام السيليكا المشلول مستوقف من افضل عن يتعرض الأخضر واضحة وطولية بمامتد ننتريوم فينيل البيروفات ٥٠٠ جزء في المليون. لون الماضي أحوال الساعة. يغير اللون من الأصفر إلى الأخضر في لوحة هلام السيليكا يظهر في تركيز ١٠٠ جزء في المليون.

الكلمات الرئيسية: فينيل كتونريا، فولي اتيلن كليكول، أتيلن دينامن تترأستات، فينيل البيروفات، فري امونيوم سلفات، البول.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Setiap manusia pasti akan diuji oleh Allah SWT, yakni mendapatkan cobaan dan kesenangan dalam hidup. Maka dari itu sepantasnya kita bersyukur atas apa yang telah diberikan oleh Allah SWT. Salah satu diantara cobaan Allah adalah penyakit dan setiap penyakit pasti ada obatnya. Manusia wajib untuk selalu berusaha dan ber'doa agar semua berjalan dengan lancar. Sebagaimana firman Allah SWT:

وَإِنْ يَمْسَسْكَ اللَّهُ يَضُرَّ □ فَلَا كَاشِفَ لَهُ إِلَّا هُوَ وَإِنْ يَمْسَسْكَ خَيْرٌ □ فَهُوَ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ □ ١٧

Artinya:

“Dan jika Allah menimpakan sesuatu kemudharatan kepadamu, Maka tidak ada yang menghilangkannya melainkan dia sendiri. dan jika dia mendatangkan kebaikan kepadamu, Maka dia Maha Kuasa atas tiap-tiap sesuatu”. (Q.S. Al An'am: 17).

Sebagian dari ayat (tanda kekuasaan) Allah adalah terjadinya bencana yang dapat diatasi oleh manusia, misalnya sakit. Manusia tidak dapat menyembuhkan, Allah-lah yang menyembuhkan. Ibnu Abbas menafsirkan ayat ini, bahwa Nabi Ayyub menderita penyakit dalam waktu yang sangat lama (ada yang mengatakan selama 18 tahun beliau menderita penyakit itu). Lebih dari itu anak-anaknya wafat, hartanya binasa dan manusia menjauhinya selain istrinya, maka Allah mendapatkannya dalam keadaan sabar dan ridha terhadap musibah itu, dan setelah sekian lama, ia pun berdoa. Beliau bertawasul kepada Allah dengan keadaannya yang begitu parah dan dengan rahmat Allah yang luas lagi merata, maka Allah mengabulkan doanya. Menurut Ibnu Abbas adalah dengan dihidupkan kembali dan dikembalikan hartanya kepadanya. Menurut Wahab bin

Munabbih, “Allah mewahyukan kepada Ayyub (yang isinya), “Aku telah mengembalikan keluarga dan dikembalikan hartamu kepadamu dan melipatgandakan jumlahnya, maka mandilah dengan air ini, karena di sana terdapat penyembuh bagimu, berkurbanlah untuk sahabat-sahabatmu dan mintakanlah ampunan untuk mereka, karena mereka telah bermaksiat kepada-Ku dalam masalah kamu (Putra, 2009 dalam Nofemmy 2014).

Penyakit merupakan perubahan-perubahan pada individu yang menyebabkan parameter kesehatan mereka di bawah kisaran normal atau jika beberapa struktur dan fungsi tubuh menyimpang dari normal sampai pada suatu keadaan berupa rusak. Pada abad ke-19 sudah mulai dikenal penyakit atau kelainan metabolisme dalam tubuh manusia, disebabkan karena tidak adanya gen yang mengawasi pembentukan enzim yang sangat dibutuhkan untuk berbagai proses fisiologi. Pembentukan serta kemampuan suatu enzim dalam merubah suatu zat ke zat lain pada proses metabolisme itu diawasi oleh gen tertentu. Apabila gen tertentu ini tidak ada maka enzim tidak akan terbentuk dan terjadilah gangguan metabolisme dalam tubuh yang menimbulkan kelainan metabolisme bawaan (Suryo, 2005). Kesalahan metabolisme bawaan yang paling sering dikenal berasal dari ketiadaan protein yang menolong fungsi enzimatik (Linder, 2006).

Ada 100 kasus penyakit yang disebabkan kelainan metabolisme asam amino, diantaranya adalah *phenylketonuria*, alkaptonuria, histidinemia, penyakit *maple syrup urin*, homosistinuria, tyrosinemia, dan sejumlah penyakit metabolisme asam amino lainnya (Harris, 1994). Diantara penyakit tersebut, penyakit metabolisme asam amino yang paling umum terjadi adalah *phenylketonuria* (Anonim, 2010).

Phenylketonuria (PKU) merupakan suatu penyakit keturunan yang disebabkan tidak adanya enzim fenilalanin hidroksilase (PAH) dalam hati, sehingga orang tidak mampu merubah asam amino fenilalanin menjadi tirosin. PKU melibatkan suatu gen resesif (pH) dan terjadi antara 1 dalam 10.000 atau 15.000 kelahiran (Veneziano, 2008). Apabila tidak ada enzim fenilalanin hidroksilase menyebabkan fenilalanin terakumulasi dalam darah dan jaringan. Tingginya kadar fenilalanin dalam tubuh akan dikonversi menjadi asam fenilpiruvat dan dikeluarkan lewat urin, sehingga pada urin penderita PKU akan ditemukan fenilketon (*Phenylketonuria* artinya fenilketon pada urin). Sedangkan pada urin orang normal tidak ditemukan fenilketon. Pada bayi dan anak-anak kadar fenilalanin yang tinggi dalam tubuh mempunyai pengaruh yang serius terhadap fungsi otak. Sel saraf otak bersifat sangat sensitif terhadap kadar fenilalanin, sehingga jumlah yang berlebihan dari substansi ini dapat menyebabkan kerusakan otak. Hal ini dapat menyebabkan gangguan mental dan pembentukan pigmen pada rambut, mata dan kulit berkurang biasa terjadi (FKUI, 1998).

Penyakit PKU dapat diobati atau dicegah dengan melakukan pengobatan. Untuk mengetahui penyakit PKU lebih cepat, bayi dan anak-anak dapat dirawat secara normal dengan pemberian diet yang sangat rendah kandungan fenilalanin untuk mengurangi kerusakan otak dan mengontrol hiperaktifnya (Linder, 2006). Oleh sebab itu, deteksi dini adanya gejala PKU sangat diperlukan untuk mencegah kerusakan otak pada bayi dan anak-anak sehingga retardasi otak dapat dihambat dengan optimal.

Deteksi dini penyakit PKU dapat diketahui dengan menggunakan tes urin. Urin merupakan hasil metabolisme tubuh manusia yang dikeluarkan melalui

ginjal. Pada ginjal terdapat glomerulus, dan akan dilalui 1200 mL darah per menit yang akan terbentuk filtrat 120 mL per menit. Filtrat tersebut akan mengalami reabsorpsi, difusi, dan ekskresi oleh tubulus ginjal yang akhirnya terbentuk satu mili liter urin per menit (R.Wirawan, S. Immanuel, R. Dharma, 2008). Menurut Woolf (1959), prosedur skrinning untuk penderita PKU dapat dilakukan dengan pengujian pada sampel urin dan darah. Pendeteksian pada sampel urin dapat dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan besi klorida untuk asam fenilpiruvat dan metode kromatografi untuk asam amino, sedangkan pengujian pada sampel darah dapat dilakukan dengan tes Guthrie dan analisa kimia yaitu spektrofotometer atau fluorometri.

Deteksi PKU telah banyak dikembangkan melalui uji serum darah menggunakan metode HPLC, GCMS dan *micro assay* seperti *Guthrie Test*. Menurut Lee (2006), penentuan fenilalanin pada serum darah manusia menggunakan *Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry* (ID-LC/MS/MS) memberikan hasil yang cukup baik dengan tingkat kepercayaan 95% dan simpangan baku 1,2%. Penelitian Lemanska (2002), tentang pengukuran konsentrasi fenilalanin dalam serum darah menggunakan metode fluorometri dan konsentrasi fenilalanin darah dalam *filter paper* dengan metode kolorimetri enzimatis menunjukkan hasil yang komperatif. Hasil pengukuran fenilalanin dalam serum darah dengan metode fluorometri diperoleh range konsentrasi 2 – 6 mg/dL untuk anak dan < 12 mg/dL untuk pasien yang lebih tua, sedangkan pengukuran fenilalanin dalam darah dalam *filter paper* dengan kolorimetri enzimatis diperoleh range konsentrasi 4 – 10 mg/dL. Metode yang digunakan oleh Lee (2005) untuk deteksi penyakit *phenylketonuria* adalah *Isotope Dillution Liquid Chromatography/tandem mass Spectrometry* (ID-

LC/MS/MS). Metode ini dikembangkan sebagai metode untuk penentuan kadar fenilalanin serum darah manusia. Hasil analisis sampel serum darah dengan metode (ID-LC/MS/MS) dibandingkan dengan metode klinis yang biasa dilakukan Laboratorium Klinis dengan HPLC. Metode (ID-LC/MS/MS) menunjukkan kestabilan dan kekonsistensian ketika diuji beberapa kali dengan berbagai sampel dibandingkan HPLC.

Pada penelitian terdahulu oleh Saifer (1959), dilakukan penentuan beberapa faktor yang mempengaruhi formasi kompleks warna FeCl_3 -asam fenilpiruvat (FeCl_3 -PPA). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi ion ferro, kerusakan kompleks warna FeCl_3 -PPA semakin menurun. Adanya efek sinar matahari langsung menyebabkan kompleks warna FeCl_3 -PPA cepat memudar dan semakin menurunnya temperatur membuat kompleks warna FeCl_3 -PPA semakin stabil.

Metode deteksi PKU pada sampel urin masih terbatas dan beberapa metode deteksi PKU yang sudah dilakukan adalah menggunakan metode kolorimetri dengan larutan FeCl_3 , Phenistix, 2,4-dinitrophenylhydrazine, metode *filter paper*, metode kromatografi gas dan metode kromatografi kertas. Deteksi PKU menggunakan uji urin cenderung lebih efektif, efisien, dan murah serta proses sampling yang lebih mudah. Berdasarkan hal tersebut maka dapat digunakan untuk mendeteksi PKU pada bayi dan anak. Deteksi dini PKU pada bayi dan anak-anak secara cepat dapat dilakukan apabila hasil pendeteksian melalui sampel urin positif. Selanjutnya dikonfirmasi dengan tes pada sampel darah secara kuantitatif dan segera dilakukan diet rendah kandungan fenilalanin.

Menurut Fitriani (2013), metode penentuan fenilpiruvat pada urin dengan menggunakan ion ferri yang diimmobilisasi pada plat silika gel, yaitu:

immobilisasi terbaik reagen identifikasi fenilpiruvat dalam plat silika gel dilakukan dengan direndam selama 30 menit dan mengeringkannya dengan dioven pada suhu 35 °C selama 10 menit, serta konsentrasi terkecil dari natrium fenilpiruvat yang dapat dideteksi yaitu natrium fenilpiruvat 0,5 mmol/L. Penambahan Etilendiamintetraasetat (EDTA) digunakan sebagai penstabil Fe^{3+} agar tidak mudah tereduksi menjadi Fe^{2+} dan membentuk kompleks yang stabil. Logam Fe merupakan logam bebas yang akan terikat jika direaksikan dengan ion sejenisnya yaitu EDTA maka akan menjadi stabil, jika kompleks ini stabil maka akan lebih sulit mengalami pengendapan sehingga penstabil Fe^{3+} tidak mudah tereduksi menjadi Fe^{2+} . Hasil pengukuran dengan MSB (*Magnetic Susceptibility Balance*) diperoleh bahwa senyawa kompleks besi(III)-EDTA memiliki sifat kemagnetan 5,1 BM (Setyawati dan Irminda, 2010).

Pada penelitian ini selain ditambahkan EDTA juga ditambahkan polietilen glikol (PEG). Tujuan penambahan PEG sama dengan EDTA yakni untuk menstabilkan logam Fe. Hal ini dikarenakan PEG stabil jika berikatan dengan logam. Menurut Nuzully (2013) *polyethylene glycol* memiliki karakteristik dapat larut dalam air, *methanol*, *benzene*, dan dichlorometan.

Pada penelitian ini akan digunakan strip test berupa plat silika untuk mendeteksi adanya senyawa fenilpiruvat dalam sampel (urin) dan buffer KCl-HCl yang tidak volatil untuk memperoleh hasil yang maksimal serta memberikan hasil warna yang akan lebih tajam dan tahan lama. Sampel urin yang digunakan adalah urin bayi sehat yang hanya mengonsumsi air susu ibu (ASI) yang berumur 0 – 5 tahun. Hal ini dikarenakan agar bayi sehat dapat dipastikan negatif PKU, yang selanjutnya akan di tes dengan tes Folling. Cara pengambilan sampel urin

dipastikan benar dan bersih agar tidak terkontaminasi dengan senyawa kimia yang lain, dikhawatirkan akan mempengaruhi hasil analisis urin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah konsentrasi optimum reagen ferri amonium sulfat (FAS), polietilen glikol (PEG), dan etilendiaminatetraasetat (EDTA) untuk bereaksi dengan fenilpiruvat secara spektrofotometri UV-Vis?
2. Berapakah konsentrasi terkecil fenilpiruvat pada pelarut air dan urin bayi sehat yang dapat merubah warna plat silika gel terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan konsentrasi optimum reagen ferri ammonium sulfat, PEG dan EDTA untuk bereaksi dengan fenilpiruvat secara spektrofotometri UV-Vis.
2. Menentukan konsentrasi terkecil fenilpiruvat pada pelarut air dan urin bayi sehat yang dapat merubah warna plat silika gel terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel urin yang dianalisis adalah sampel urin bayi sehat dan sampel urin bayi yang ditambahkan senyawa fenilpiruvat standard dengan jumlah tertentu.
2. Kriteria bayi sehat dilihat dari kondisi fisik yang normal dan tidak menunjukkan hasil positif *phenylketonuria* pada tes FeCl_3 , serta umur bayi

sehat yang digunakan adalah 0 – 5 tahun, tidak dalam kondisi sakit atau mengkonsumsi obat.

3. Konsentrasi natrium fenilpiruvat yang digunakan 50; 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm. Konsentrasi ferri ammonium sulfat yang digunakan 2000; 3000; 5000; 7000; 10.000; dan 20.000 ppm. Konsentrasi polietilen glikol yang digunakan 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm. Konsentrasi etilendiamintetraasetat yang digunakan 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm. pH buffer KCl-HCl yang digunakan pH 2,3.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Secara Umum
Memberikan pengetahuan umum tentang cara pendeteksian dini penyakit *phenylketonuria* melalui piranti kesehatan yang efektif, efisien dan murah.
2. Secara Khusus
Meningkatkan keterampilan mahasiswa dalam aplikasi ilmu kimia secara praktis, sehingga dapat menghubungkan antara teori dan aplikasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

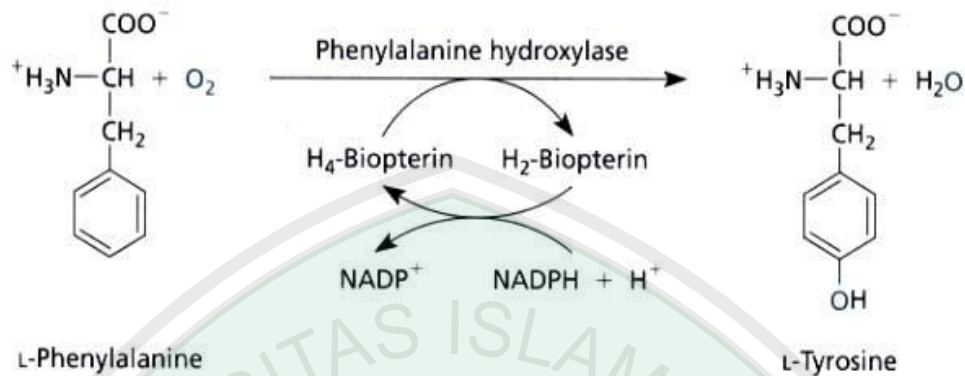
2.1 *Phenylketonuria* (PKU)

Phenylketonuria adalah suatu penyakit keturunan yang disebabkan karena orang tidak mampu merubah asam amino fenilalanin menjadi tirosin. *Phenylketonuria* merupakan kelainan bawaan pada proses metabolisme yang menyebabkan keterbelakangan mental. Pengaruh terhadap cara tubuh memproses makanan: anak-anak tidak dapat memproses komponen protein (asam amino) yang disebut fenilalanin karena kurangnya enzim yang sesuai. Akibatnya, fenilalanin terakumulasi dalam darah dan menyebabkan kerusakan otak dan keterbelakangan mental (Aryani, 2013).

PKU disebabkan oleh mutasi gen pada kromosom 12. Kode gen untuk protein yang disebut PAH (fenilalanin hidroksilase), suatu enzim di hati. Enzim ini memecah asam amino fenilalanin menjadi asam amino tirosin yang dibutuhkan tubuh. Ketika gen ini bermutasi, enzim PAH tidak dapat berfungsi dengan baik sehingga fenilalanin tidak dapat diubah menjadi asam amino tirosin. Fenilalanin menumpuk dalam darah dan sel-sel saraf (neuron) di otak (Evelyn, 1973).

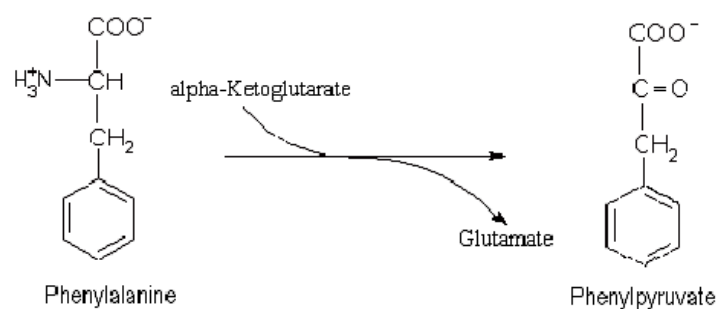
Gejala yang timbul adalah anak-anak tampak normal awal. Kemudian mulai kehilangan minat di sekelilingnya dan memiliki keterbelakangan mental, yang membuat mereka mudah tersinggung, gelisah dan merusak. Kejang-kejang mungkin terjadi. Kulit kering, ruam kulit dan berbau seperti jamur. Mereka memiliki rambut pirang dan tumbuh dengan baik (Aryani, 2013).

Berikut reaksi fenilalanin menjadi asam amino tirosin jika enzim fenilalanin hidroksilase tersedia di dalam tubuh:



Gambar 2.1 Reaksi fenilalanin menjadi asam amino tirosin

Fenilalanin diambil dari protein makanan dan sangat penting bagi tubuh orang, karena menjadi bahan untuk mensintesa protein, tirosin dan pigmen melanin. Di atas tingkat normal fenilalanin beracun bagi sel-sel yang membentuk sistem saraf dan menyebabkan kelainan permanen pada struktur otak. Fenilalanin adalah jenis teratogen. Teratogen merupakan zat atau suatu organisme yang dapat menyebabkan cacat lahir pada janin yang sedang berkembang (Evelyn, 1973). Karena banyaknya fenilalanin yang tertimbun maka sebagian fenilalanin itu diubah menjadi asam fenilpiruvat. Reaksi fenilalanin menjadi asam fenilpiruvat :

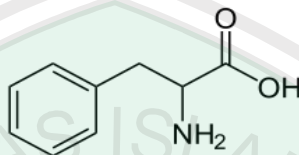


Gambar 2.2 Reaksi fenilalanin menjadi senyawa fenilpiruvat

Semua reaksi kimia ini tentunya membutuhkan enzim sebagai katalisa. Tiap reaksi itu dikatalisa oleh enzim tertentu (Suryo, 2005). PKU adalah suatu kondisi pada seseorang yang disebabkan oleh kelainan genetik dan ditandai retardasi (kemunduran) mental. PKU karena adanya gangguan metabolisme fenilalanin (biasanya terdapat pada daging). Secara normal fenilalanin digunakan untuk sintesis protein, sedangkan kelebihanannya diubah oleh hati menjadi tirosin atau fenilpiruvat. Pada bayi penderita PKU yang baru lahir dijumpai kekurangan (tidak memiliki) enzim untuk mengubah fenilalanin menjadi tirosin (Kaufman, 1975), walaupun masih mampu mengubah menjadi fenilpiruvat. Sebagai akibatnya akan terjadi akumulasi fenilalanin dan fenilpiruvat yang dapat menyebabkan malformasi struktur otak sehingga terjadi retardasi mental. Gejala penderita PKU yang tampak antara lain: hiperaktifitas, *distractibility*, dan kelainan perilaku karena mental retardasi. Tirosin juga akan diubah menjadi melatonin sehingga kulit kelihatan agak pucat (*light*), rambutnya pirang, karena melatonin bertanggung jawab terhadap pigmentasi. Kelainan (kekurangan) satu enzim saja dapat menyebabkan perubahan perilaku dan abnormalitas fisik. PKU terutama terjadi pada orang kulit putih (Amerika). PKU dapat diketahui dari kadar fenilalanin dan fenilpiruvat dari serum atau urine (Kalat, J.W., 1984: 6-8)..

Sebagai akibat tidak terurainya fenilalanin menjadi tirosin, maka tertimbunlah fenilalanin dalam hati dan kelebihanannya akan masuk dalam peredaran darah serta diedarkan ke seluruh tubuh. Kelebihan fenilalanin dan asam fenilpiruvat dikeluarkan oleh ginjal bersama-sama dengan air kencing (urin). Urin orang yang mengidap mengandung 300 – 1000 mg fenilalanin per 100 mL, sedangkan pada orang normal hanya sekitar 30 mg fenilalanin per 100 mL.

Plasma darah penderita PKU mengandung 15 – 65 mg fenilalanin per 100 mL, sedang pada orang normal hanya 1 – 2 mg fenilalanin per 100 mL. Kadar fenilalanin yang berlebihan dalam darah itu mengganggu perkembangan dan pekerjaan otak, karena itu penderita PKU mengalami kelemahan mental dan pigmentasi rambut biasanya berkurang (Suryo, 2005).



Gambar 2.3 Struktur Kimia Fenilalanin (Suryo, 2005)

Penentuan kadarfenilalanin dalam serum darah dan urin dapat dilakukan menggunakan kromatografi gas. Sampel urin dipreparasi dengan asam nitrit membentuk asam fenilaktat. Kemudian diekstraksi dengan eter dan diderivatisasi menggunakan bis(trimetilsilil)trifloroasetamida dalam suasana mild. Hasil derivatisasi dapat diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Metode ini memberikan hasil yang cukup baik namun preparasi cukup rumit (Shihabi,Z.K., 1970).

Kadar fenilalanin yang tinggi dalam cairan tubuh menghambat transport asam amino ke dalam sel, sehingga dengan demikian terdapat kekurangan serebrosid dalam otak yang menyolok. Perubahan ini akan menyebabkan gangguan mental. Pada umur enam bulan terdapat penghambatan dalam perkembangan mental, kejang, serta kelainan saraf lainnya berupa gejala ekstra piramidal. Gangguan pembentukan melanin oleh enzim tirosinase akan mengakibatkan berkurangnya pembentukan pigmen pada rambut, mata, dan kulit

(FKUI, 1998). Kerusakan otak yang signifikan biasanya terjadi bila nilai fenilalanin serum mencapai 15 mg/dL (Kee, 1997).

PKU terjadi antara 1 dalam 10.000 atau 15.000 kelahiran (Veneziano, 2008). Penduduk yang berkulit putih dan penduduk asli Amerika banyak mengalami penyakit PKU, dan pada Afrika-Amerika, Hispanics dan Asia jarang terjadi (National Institutes of Health (NIH), Consensus Development Panel, 2006 dalam Sharlin, 2010).

Tabel 2.1 Kejadian PKU pada beberapa populasi di Negara

Wilayah atau Negara	Kejadian PKU
Asia	
China	1 : 17.000
Jepang	1 : 125.000
Turki	1 : 2600
Israel	1 : 5300
Scotlandia	1 : 5300
Cekoslovakia	1 : 7000
Hungarai	1 : 11.000
Denmark	1 : 12.000
Eropa	
Perancis	1 : 13.500
Norwegia	1 : 14.500
United Kingdom	1 : 14.300
Itali	1 : 17.000
Kanada	1 : 22.000
Firlandia	1 : 200.000
Arab	Diatas 1 : 6000
Samudra	
Australia	1 : 10.000

Sumber: Scriver dan Kaufman, 2001 dalam Veneziano, 2008

Orang yang heterozigotik (*carrier*) biasanya mudah dideteksi dengan menggunakan tes toleran fenilalanin. Mereka yang normal homozigotik merubah fenilalanin dalam waktu singkat, sedangkan mereka yang memerlukan waktu lama adalah heterozigotik. Seorang *carrier* tidak memperlihatkan cacat mental, akan tetapi IQ-nya lebih rendah daripada yang normal homozigotik (Suryo, 2003). *Carrier* memiliki kadar fenilalanin lebih tinggi dibandingkan dengan orang

normal sehingga *carrier phenylketonuria* otomatis memiliki kadar tirosin dibawah orang normal. Hal ini pun berpengaruh pada pembentukan melanin. Namun, hipopigmentasi yang terjadi pada *carrier* tidak seekstrem penderita bahkan pada fenotip sering tidak terlihat (FKUI, 1998).

Menurut Durham-Shearer (2008), penyakit PKU terbagi menjadi dua, yaitu PKU klasik dan PKU varian. Homozigot untuk satu dari beberapa mutasi yang berbeda dalam gen fenilalanin hidroksilase memiliki defisiensi enzimatis yang bervariasi dan sebagai akibatnya terjadi kenaikan kadar fenilalanin yang beragam. PKU klasik relatif sering dijumpai di antara orang-orang keturunan Skandinavia, tetapi jarang ditemukan pada orang kulit hitam. PKU klasik merupakan kondisi yang umum terjadi dan menyebabkan aktivitas fenilalanin hidroksilase secara drastis turun atau bahkan berhenti. Seseorang dengan penderita PKU klasik mempunyai kadar fenilalanin yang cukup untuk menyebabkan kerusakan otak parah dan problem serius lainnya. Pada PKU klasik, kadar fenilalanin darah melebihi 20 mg/dL padahal nilai normalnya kira-kira 1 – 2 mg/dL atau batas normalnya adalah 4 mg/dL (Schulze, 2003 dalam Lee, 2006). PKU varian merupakan suatu kondisi versi sedang atau ringan dimana mutasi dalam gen PAH hanya membuat aktivitas enzim fenilalanin hidroksilase terhambat (Durham-Shearer, 2008). Kadar fenilalanin dalam plasma pada PKU varian biasanya berada antara kadar fenilalanin pada orang normal dan kadar fenilalanin pada PKU klasik (Harris, 1994). Kadar fenilalanin darah pada PKU varian umumnya antara 8 – 20 mg/dL (Schulze, 2003 dalam Lee, 2006). PKU varian memiliki risiko yang lebih kecil dari kerusakan otak.

Penderita yang mengalami penyakit PKU akan mengalami gangguan mental atau perkembangan mental mereka menjadi sangat terganggu bila pengobatan efektif tidak dimulai sejak kehidupan dini, sedangkan pada perkembangan fisik tidak terpengaruh secara serius. Penderita yang tidak diobati biasanya menunjukkan keterbelakangan mental yang sangat parah. Sebagian besar keterbelakangan mental PKU dapat digolongkan sebagai idiot (IQ kurang dari 20) dan sisanya semuanya sebagai imbesil (IQ kurang dari 50), meskipun beberapa individu menderita kerusakan derajat ringan (Harris, 1994).

Pengobatan PKU dengan memulai makanan rendah fenilalanin, maka makanan tersebut disesuaikan untuk memperoleh kadar fenilalanin serum yang berkisar dari 0,18 sampai 0,91 mM (3 sampai 15 mg/dL). Suatu makanan rendah fenilalanin barangkali diperlukan sampai kira-kira umur 15 tahun atau sampai kadar fenilalanin plasma tetap di bawah 0,73 mM (12 mg/L) pada penderita dengan diet normal (Montgomery, 1993).

2.2 Urin

Urin merupakan larutan encer yang mengandung air sekitar 96%. Sifat fisika urin meliputi warna, kekeruhan, berat jenis, suhu, viskositas, pH dan aroma. Sifat kimia urin terkait dengan keberadaan senyawa-senyawa terlarut di dalamnya. Urin merupakan suatu cairan berwarna kuning transparan yang terdiri dari sisa metabolisme tubuh yang tidak dikehendaki. Sebagian besar komposisi urin adalah air, garam, amoniak, urea, sisa vitamin dan mineral. Kadang-kadang juga terdapat glukosa, protein dan senyawa keton terlarut (Encarta, 2004).

Individu yang normal akan mengonsumsi kurang lebih 1 hingga 2 liter air per hari, dan dalam keadaan normal seluruh asupan cairan ini akan diekskresikan keluar termasuk 400 hingga 500 mL yang diekskresikan ke dalam urin. Sisanya akan diekskresikan lewat kulit, paru-paru saat bernafas, dan feses. Sebagian substansi yang terdapat dengan kadar konsentrasi yang tinggi dalam darah biasanya akan direabsorpsi seluruhnya melalui transportasi aktif dalam tubulus ginjal (Brunner, 2002).

Urin manusia pada umumnya mempunyai bau spesifik yang ditimbulkan oleh senyawa aromatik turunan nitrogen dari protein. Berat jenis urin tergantung dari jumlah zat yang larut di dalam urin atau terbawa di dalam urin. Ciri-ciri urin yang normal jumlahnya rata-rata 1 – 2 liter sehari, tetapi berbeda-beda sesuai dengan jumlah cairan yang dimasukkan. Banyaknya bertambah pula bila terlampaui banyak protein yang dimakan, sehingga tersedia cukup cairan yang diperlukan untuk melarutkan ureanya. Warnanya bening orange pucat tanpa endapan, tetapi adakalanya jonjot lendir tipis nampak terapung di dalamnya. Baunya tajam, dan reaksinya sedikit asam terhadap lakmus dengan pH rata-rata 6. Berat jenis berkisar dari 1010 mg/L sampai 1025 mg/L (Evelyn, 1997).

Urin sering dianggap hasil buangan yang sudah tidak berguna. Padahal urin sangat membantu dalam pemeriksaan medis. Urin merupakan salah satu cairan fisiologis yang sering dijadikan bahan untuk pemeriksaan (pemeriksaan visual, pemeriksaan mikroskopis, dan menggunakan kertas kimia) dan menjadi salah satu parameter kesehatan dari pasien yang diperiksa. Selain darah, urin juga menjadi komponen yang penting dalam diagnosis keadaan kesehatan seseorang. Ada 3 macam pemeriksaan, antara lain (1) pemeriksaan visual. Urin

mengindikasikan kesehatan yang baik bila terlihat bersih. Bila tidak, maka ada masalah dalam tubuh. Kesehatan bermasalah biasanya ditunjukkan oleh kekeruhan, aroma tidak biasa, dan warna abnormal. (2) Tes yang menggunakan kertas kimia yang akan berganti warna bila substansi tertentu terdeteksi atau ada di atas normal. (3) Hasil yang datang dari pemeriksaan mikroskopis yang dilakukan untuk mengetahui apakah kandungan urin berada di atas normal atau tidak (Ganong, 2002).

2.2.1 Macam-macam Sampel Urin

a. Urin sewaktu

Adalah urin yang dikeluarkan pada satu waktu yang tidak ditentukan dengan khusus. Urin sewaktu ini cukup baik untuk pemeriksaan rutin yang menyertai pemeriksaan badan tanpa pendapat khusus (R. Gandasoebrata. 2006).

b. Urin pagi

Adalah urin yang pertama-tama dikeluarkan pada pagi hari setelah bangun tidur. Urin ini lebih pekat dari urin yang dikeluarkan siang hari, jadi baik untuk pemeriksaan sedimen, berat jenis, protein, tes kehamilan dan lain-lain.

c. Urin postprandial

Adalah urin yang pertama kali dilepaskan satu setengah jam sampai tiga jam sehabis makan. Urin ini berguna untuk pemeriksaan terhadap glukosuria.

d. Urin 24 jam

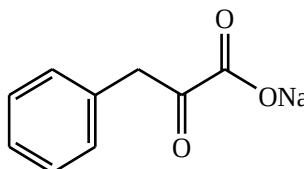
Adalah urin yang dikumpulkan selama 24 jam. Urin yang pertama keluar dari jam 7 pagi dibuang, berikutnya ditampung termasuk juga urin jam 7 pagi esok harinya (R. Gandasoebrata. 2006).

e. Urin 3 gelas dan urin 2 gelas pada laki-laki

Urin ini dipakai pada pemeriksaan urologik yang dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran tentang letaknya radang atau lesi yang mengakibatkan adanya nanah atau darah dalam urin laki-laki. Urin 3 gelas adalah urin yang waktu keluar langsung ditampung ke dalam gelas sedimen (gelas yang dasarnya menyempit) tanpa menghentikan aliran urinnnya. Ke dalam gelas pertama ditampung 20 – 30 mL urin yang mula-mula keluar, ke dalam gelas kedua dimasukkan urin berikutnya, beberapa ml terakhir ditampung dalam gelas ketiga. Untuk medapat urin 2 gelas, caranya sama seperti urin 3 gelas, dengan perbedaan: gelas ketiga ditiadakan dan ke dalam gelas pertama ditampung 50 – 70 mL urin (R. Gandasoebrata. 2006).

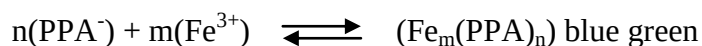
2.3 Asam Fenilpiruvat

Asam fenilpiruvat memiliki rumus molekul $C_9H_8O_3$ dengan berat jenis molekul 164,16 gr/mol. Nama lainnya adalah 2-Oxo-3-asam fenilpropanoat dan berbentuk padatan dengan warna abu-abu kecoklatan. Asam fenilpiruvat dapat berbentuk garam, yaitu natrium fenilpiruvat. Natrium fenilpiruvat berbentuk padatan, berwarna putih, mempunyai berat molekul 186,14 gr/mol dan titik lebur $260\text{ }^{\circ}\text{C}$. Struktur senyawa natrium fenilpiruvat adalah (Sigma-Aldrich, 2011):



Gambar 2.4 Struktur Senyawa Natrium Fenilpiruvat (Sigma-Aldrich, 2011)

Hasil penambahan ferri klorida ke larutan asam fenilpiruvat pada buffer pH 2,2 menghasilkan warna biru kehijauan. Reaksi antara ion ferri dengan asam fenilpiruvat (PPA)(Saifer, 1959):



Tes yang dihasilkan dari reaksi ion besi (III) dengan fenilpiruvat menghasilkan warna *blue-green* (Bettelheim, 2004). Asam fenilpiruvat akan bereaksi memberikan warna khas biru kehijauan dengan tes strip Phenistix dalam 30 detik (Rupe dan Free, 1959).

2.4 Polietilen Glikol (PEG)

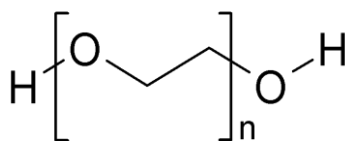
PEG (polietilen glikol) merupakan salah satu jenis bahan pembawa yang sering digunakan sebagai bahan tambahan dalam suatu formulasi untuk meningkatkan pelarutan obat yang sukar larut. Bahan ini merupakan salah satu jenis polimer yang dapat membentuk kompleks polimer pada molekul organik apabila ditambahkan dalam formulasi untuk meningkatkan kecepatan pelarutan yang dapat membentuk kompleks dengan berbagai obat. Cangkang kapsul dengan menggunakan basis polietilen glikol memiliki beberapa keuntungan karena sifatnya yang inert, tidak mudah terhidrolisis, tidak membantu pertumbuhan jamur (Martin, 1993).

Nama lain dari senyawa ini adalah Carbowax, Carbowax Sentry, Lipoxol, Lutrol E dan Phenol E. Polietilenglikol 400 adalah polietilenglikol $\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{OH}$ dimana harga n antara 8,2 dan 9,1. Pemerian: cairan kental jernih, tidak berwarna atau praktis tidak berwarna, bau khas lemah, agak higroskopik. Kelarutan: larut dalam air, dalam etanol (95%) P, dalam aseton P, dalam glikol

lain dan dalam hidrokarbon aromatik, praktis tidak larut dalam eter P dan dalam hidrokarbon alifatik. Bobot molekul rata-rata: 380 – 420, kelembaban: sangat higroskopis walaupun higroskopis turun dengan meningkatnya bobot molekul, titik beku 4 – 8°C (Raymond, 2006).

Polietilen glikol (PEG) disebut juga makrogol, merupakan polimer sintetik dari oksietilen dengan rumus struktur $H(OCH_2CH_2)_nOH$, dimana n adalah jumlah rata-rata gugus oksietilen. PEG umumnya memiliki bobot molekul antara 200–300.000. Penamaan PEG umumnya ditentukan dengan bilangan yang menunjukkan bobot molekul rata-rata. Konsistensinya sangat dipengaruhi oleh bobot molekul. PEG dengan bobot molekul 200 – 600 (PEG 200-600) berbentuk cair, PEG 1500 semi padat, dan PEG 3000 – 20000 atau lebih berupa padatan semi kristalin, dan PEG dengan bobot molekul lebih besar dari 100000 berbentuk seperti resin pada suhu kamar. Umumnya PEG dengan bobot molekul 1500 – 20.000 yang digunakan untuk pembuatan dispersi padat (Leuner and Dressman, 2000; Weller, 2003). Polimer ini mudah larut dalam berbagai pelarut, titik leleh dan toksisitasnya rendah, berada dalam bentuk semi kristalin (Craig, 1990). Kebanyakan PEG yang digunakan memiliki bobot molekul antara 4000 dan 20.000, khususnya PEG 4000 dan 6000. Proses pembuatan dispersi padat dengan PEG 4000, umumnya menggunakan metode peleburan, karena lebih mudah dan murah (Leuner and Dressman, 2000).

Polietilen glikol merupakan polieter asiklik yang mengandung gugus alkohol (OH) pada kedua ujungnya. Struktur polietilen glikol yang berbentuk poliasiklik dapat dilihat pada gambar berikut:



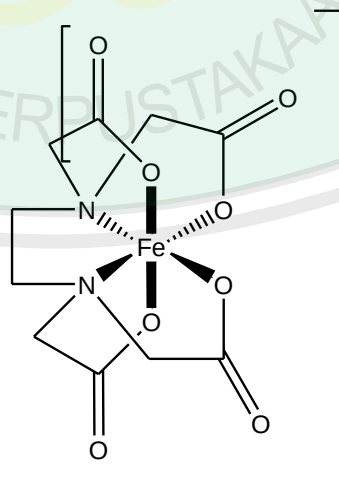
Gambar 2.5 Struktur Senyawa Polietilen glikol

Walaupun gugus OH bukan atom yang stabil tetapi gugus ini mampu membentuk ikatan koordinatan dengan ion logam dan menghasilkan senyawa kompleks yang stabil. Kumpulan OH ini memiliki fungsi ganda seperti molekul air karena dapat menstabilkan dengan saling berinteraksi yaitu pertama dengan kation secara berkoordinatan. Kedua dengan anion melalui ikatan hidrogen sehingga bersifat nukleofilik, adanya reaksi ini menghalangi anion berinteraksi terlalu kuat dengan ion logam sehingga PEG disebut ligan fungsi berganda. Jenis rantai panjang PEG yang biasa dikenal adalah trietilen glikol (EO3) sampai heptaetilen glikol (EO7) (Setyaningrum, 2011).

2.5 Etilendiamintetraasetat (EDTA)

Asam etilendiamintetraasetat atau yang lebih dikenal dengan EDTA, merupakan salah satu jenis asam amina polikarboksilat yang seringkali digunakan sebagai titran dalam titrasi kompleksometri. EDTA sebenarnya adalah ligan seksidentat yang dapat berkoordinasi dengan suatu ion logam lewat kedua nitrogen dan keempat gugus karboksil-nya atau disebut ligan multidentat yang mengandung lebih dari dua atom koordinasi per molekul, misalnya asam 1,2-diaminoetanatetraasetat (asam etilendiaminatetraasetat, EDTA) yang mempunyai dua atom nitrogen – penyumbang dan empat atom oksigen penyumbang dalam molekul (Rival, 1995).

EDTA akan membentuk kompleks ion Besi(III)EDTA dengan cara disintesis dari senyawa $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan ligan EDTA (Clyde dan Selbin, 1985). Besi(III)EDTA dengan rumus molekul $[\text{Fe}(\text{HO}_2\text{CCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]^-$ memiliki nama sistematik IUPAC Etilendiamintetraasetatferat(III) sering disebut juga *ferric versenate*. Senyawa kompleks Besi(III)-EDTA memiliki struktur oktahedral, dimana ada interaksi antara gugus fungsi pada EDTA dengan logam ion pusat Fe, dua atom N dan empat atom O dari ligan EDTA (Etilendiamintetraasetat) terletak pada pojok-pojok oktahedral. Dalam senyawa koordinasi, $(\text{EDTA})^{4-}$ berperan sebagai ligan. $(\text{EDTA})^{4-}$ mengikat kation logam besi melalui dua amina dan empat gugus O dari gugus karboksilat. Panjang gelombang dari kompleks $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ adalah 398 nm dan memiliki warna kuning, sehingga senyawa kompleks tersebut menyerap panjang gelombang di warna komplementer kuning yaitu ungu (380 – 450 nm). pH optimum pada pembentukan senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ adalah pH 6. (Setyawati dan Irminda, 2010).



Gambar 2.6 Struktur Oktahedral Besi(III)EDTA

2.6 Metode Deteksi *Phenylketonuria*

2.6.1 Analisis Asam Fenilpiruvat dalam Urin menggunakan Tes Larutan FeCl_3

Tes dengan larutan FeCl_3 merupakan metode umum Fölling. Beberapa tetes larutan FeCl_3 10% atau 5% ditambahkan ke dalam urin di sebuah tabung reaksi. Warna biru atau hijau muncul di atas 1 atau 2 menit dan kemudian secara berangsur-angsur mulai pudar. Urin yang tidak asam tidak menampilkan warna.

Asam *p*-hidroksifenilpiruvat memberikan warna biru kehijauan dengan larutan FeCl_3 , dimana reaksinya sulit dibedakan dengan asam fenilpiruvat. Asam *p*-hidroksifenilpiruvat terdapat dalam urin pada makanan bayi dengan dosis tirosin atau fenilalanin yang besar, pada penderita *scurvy*, serta pada orang dewasa dan anak-anak yang menderita *hepatic cirrhosis* (Gibbs dan Wolf, 1959). Larutan FeCl_3 ditetaskan di atas popok basah, sehingga tidak membutuhkan cairan spesimen urin secara langsung, tetapi warna hijau lebih sulit terlihat di popok dan FeCl_3 akan menodai pakaian. Ferri amonium sulfat dan garam ferri lainnya berkelakuan seperti FeCl_3 (Sobotka, 1963). Kekurangan dari tes FeCl_3 adalah cairan spesimen dalam urin sulit diperoleh dari bayi yang baru lahir. Kekurangan selanjutnya adalah asam *p*-hidroksifenilpiruvat memberikan warna yang sama dengan warna yang diberikan asam fenilpiruvat dan pembentukan warna ini terjadi di atas 1 % dalam urin bayi (Sobotka, 1963).

2.6.2 Analisis Asam Fenilpiruvat dalam Urin menggunakan Tes Phenistix

Phenistix (Ames Co.) adalah strip dari kertas absorben yang dilapisi dengan ferri amonium sulfat, buffer (asam sikloheksilsulfamat) dan garam magnesium (magnesium sulfat) (Sobotka, 1963).

Ferri amonium sulfat memberikan warna hijau dengan asam fenilpiruvat. Buffer asam sikloheksilsulfamat dicampurkan pada pH optimum 2,3 untuk mempertahankan warna antara ion ferri dengan fenilpiruvat dan garam magnesium akan menjebak ion fosfat dalam urin, meskipun diragukan sedikit fosfat dapat dihilangkan oleh magnesium pada pH 2,3. Penggunaannya lapisan phenistix dicelupkan ke dalam urin, kemudian dengan seketika diambil dan dibaca pada tabel warna setelah $\frac{1}{2}$ atau 1 menit. Tes ini lebih spesifik dari pada FeCl_3 yang ditambahkan ke dalam urin. Phenistix memberikan perubahan warna yang sangat cepat dengan asam *p*-hidroksifenilpiruvat dan paling umum menyebabkan reaksi positif palsu dengan FeCl_3 , selain itu tes Phenistix mudah dan sederhana untuk dilakukan (Sobotka, 1963). Phenistix lebih akurat dari pada tes FeCl_3 . Penambahan 0 mg fenilpiruvat per 100 mL pada urin, Phenistix memberikan reaksi negatif 95,7 %, sedangkan tes larutan FeCl_3 memberikan reaksi negatif 91 %. Penambahan 8 mg fenilpiruvat per 100 mL pada urin, Phenistix memberikan reaksi negatif 18%, sedangkan tes larutan FeCl_3 memberikan reaksi negatif 40,5% (Rupe dan Free, 1959). Strips Phenistix dapat mendeteksi sedikitnya 8 mg fenilpiruvat dalam 100 mL urin (Bettelheim, 2004).

Penelitian Centerwall (1959) dikatakan bahwa persentase dari 104 sampel urin orang PKU memberikan batasan reaksi positif setelah meningkatnya jarak waktu pencahayaan pada suhu ruang. Disebutkan bahwa pada *exposure time* 2; 4; 8; 12; 18 dan 24 jam, phenistix memberikan persentase 99,1; 98,1; 98,1; 97,1; 96,2 dan 91,3.

Phenistix yang diteskan dalam asam fenilpiruvat dan asam *p*-hidroksifenilpiruvat memberikan warna yang berbeda. Pada asam fenilpiruvat

diperoleh warna pada strip biru kehijauan pada waktu maksimal dalam satu menit dan mulai memudar dengan lambat. Pada asam *p*-hidroksifenilpiruvat diperoleh warna hijau yang berlangsung sebentar dan mulai memudar dalam 2 – 3 detik (Gibbs dan Woolf, 1959).

Penelitian Saifer (1959) dengan menggunakan reagen FeCl_3 10 %, ferro amonium sulfat, uranil nitrat dan buffer glisin pH 2,2, kemudian ditambahkan natrium fenilpiruvat 50 mg/100 mL menghasilkan panjang gelombang 630 nm dan *optical density* maksimal 0,620 dalam waktu 3 menit dan suhu 8 °C.

2.6.3 Analisis Asam Fenilpiruvat dalam Urin menggunakan 2,4-Dinitrofenilhidrazin

Sebuah larutan jenuh 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam 1 N HCl atau 2 N HCl memberikan karakteristik endapan kuning 2,4-dinitrofenilhidrazon untuk asam fenilpiruvat ketika reagen ditambahkan pada urin *phenylketonuria*. Terlepas dari *phenylketonuria* yang paling penting adalah tirosiluria dan penyakit *maple syrup urine* (leusinosis). Sensitifitas tes 2,4-dinitrofenilhidrazin tergolong sama seperti penggunaan FeCl_3 atau Phenistix. Dari tiga tes minimal mendeteksi dari 5 sampai 10 mg/100 mL tergantung kemampuan operator (Sobotka, 1963).

2.6.4 Analisis Asam Fenilpiruvat dalam Urin menggunakan Metode *Filter Paper*

Ini merupakan teknik untuk skrining dalam jumlah populasi yang luas dengan mengumpulkan spesimen cairan dari urin atau tes pada popok bayi. Selembar *filter paper* diletakkan pada popok bayi dan setelah terbasahi dengan urin bayi, *filter paper* dikeringkan di udara dan mengirimnya melalui pos ke pusat laboratorium. Teknik ini dikenalkan dari teknik *paper tissue pad* dari Farquhar dan teknik *gauze swab* dimana objek diletakkan pada *pad* atau *swab* basah

sampai diujikan. Larutan FeCl_3 ditetaskan ke *filter paper* kering dan jika terdapat asam fenilpiruvat, spot hijau atau bentuk cincin akan terbentuk (Sobotka, 1963).

2.6.5 Analisis Fenilalanin Urin menggunakan Kromatografi Gas

Penentuan kadar fenilalanin dalam serum darah dan urin dapat dilakukan menggunakan kromatografi gas. Sampel urin dipreparasi dengan asam nitrit membentuk asam fenilaktat. Kemudian diekstraksi dengan eter dan diderivatisasi menggunakan bis(trimetilsilil)trifloroasetamida dalam suasana mild. Hasil derivatisasi dapat diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Metode ini memberikan hasil yang cukup baik namun preparasi cukup rumit (Shihabi, 1973).

2.6.6 Analisis Fenilalanin dalam Darah dengan Uji Guthrie

Uji Guthrie test yang merupakan bagian dari program pemeriksaan biokimia. Uji Guthrie adalah *semi quantitative assay* yang dirancang untuk mendeteksi darah dengan kadar asam amino fenilalanin yang cukup besar berdasarkan kemampuan fenilalanin untuk mempercepat pertumbuhan bakteri pada suatu media kultur dengan inhibitor. Darah diambil dengan cara menusuk tumit bayi baru lahir. Darah dikumpulkan pada selembar kertas filter dan diletakkan dalam sebuah cawan petri yang telah berisi gel agar yang mengandung *Bacillus Subtilis* dan B2 thienyalanin. Gel agar-agar dapat mendukung pertumbuhan bakteri tetapi B-2-thienylalanine menghambat pertumbuhan bakteri. Namun dengan adanya fenilalanin, hambatan ini bisa diatasi dan bakteri dapat tumbuh. Jumlah pertumbuhan, yang diukur sebagai diameter koloni, kira-kira sebanding dengan jumlah fenilalanin di dalam serum. Hasilnya adalah membaca dengan membandingkan diameter koloni setiap disk sampel terhadap koloni dari serangkaian disk referensi dengan kandungan fenilalanin standar. Uji Guthrie ini

memberikan hasil yang cukup baik meskipun mungkin mengalami kontaminasi sehingga menyebabkan hasil positif palsu (Vallian and Moeni, 2006).

2.6.7 Analisis Rasio Fenilalanin/Tirosin dalam Serum dengan HPLC

Analisis rasio fenilalanin/tirosin menggunakan HPLC dengan Fluorimetry digunakan sebagai skrining tes untuk kasus *phenylketonuria* di Amerika Serikat. HPLC yang digunakan adalah jenis ion *exchange*. Sampel yang digunakan adalah setetes darah yang diambil dari kaki dan diabsorpsi dengan *S and S collection paper*. Bercak darah kering kemudian dielusi dengan 850 µl akuades selama 30 menit. Eluat tunggal digunakan untuk analisis rasio fenilalanin/tirosin dengan HPLC. Standar Fenilalanin dan tirosin dilakukan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Range konsentrasi fenilalanin adalah 20 – 4029 µmol/L sedangkan range konsentrasi tirosin 34 – 1104 µmol/L. Analisis rasio fenilalanin/tirosin dengan metode ini mempunyai koefisien variansi 5% (Eastman dkk., 2000).

2.6.8 Analisis Fenilalanin dalam Serum dengan ID-LC/MS/MS

Isotope Dillution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (ID-LC/MS/MS) dikembangkan sebagai metode untuk penentuan kadar fenilalanin serum darah manusia. Keunggulan metode ini adalah preparasi serum darah cukup sederhana tanpa harus diderivatisasi, mendeteksi secara selektif dalam analisisnya dan menggunakan analog isotop sebagai standart internalnya. Metode ini memberikan hasil yang cukup baik dengan tingkat kepercayaan 95 % dan simpangan baku 1,2 %. Metode ini juga diujikan dengan materi referensi standar untuk memverifikasi metode. Hasil analisis sampel serum darah dengan metode dengan (ID-LC/MS/MS) dibandingkan dengan metode klinis yang biasa dilakukan Laboratorium Klinis dengan HPLC. Metode (ID-LC/MS/MS)

menunjukkan kestabilan dan kekonsistenan ketika diuji beberapa kali dengan berbagai sampel dibandingkan dengan HPLC (Lee dkk., 2006).

2.6.9 Analisis Fenilalanin dalam Serum dengan Elektroforesis

Metode analisis fenilalanin serum dengan elektroforesis merupakan salah satu metode alternatif selain kromatografi cair dan kromatografi gas untuk diagnosa penyakit *phenylketonuria*. Instrumen elektroforesis yang digunakan sepanjang 65 cm, menggunakan 50 micron wide kapiler silika, fasa gerak yang digunakan 0,025 M asam borat (pH diatur sampai 10 dengan NaOH), detektor UV pada 214 nm. Efisiensi pemisahan untuk fenilalanin mencapai 150000 plate/kolom. Hasil penelitian menunjukkan linieritas 5 – 175 µg/mL, sensitivitas 3 µg/mL, koefisien korelasi 0,9998 dan koefisien variansi 4 %. Metode ini cukup memuaskan untuk analisis fenilalanin serum meskipun agak mahal (Tagliaro dkk., 1994).

2.6.10 Analisis Fenilalanin dalam Serum dengan *Flow Injection Analysis* (FIA)

Sistem *Flow Injection Analysis* (FIA) dengan reaktor enzim termobilisasi digunakan untuk penentuan fenilalanin serum. Sampel serum dideproteinisasi dengan asam tungstat dan disaring dengan membran ultrafiltrasi. Sampel diinjeksi dengan fasa gerak akuades. NADH yang terbentuk dideteksi dengan fluorometri pada 465 nm. Kurva kalibrasi linier pada range konsentrasi 0,9 – 600 µm, dengan limit deteksi 0,3 µm (Kiba dkk., 1997).

2.6.11 Analisis Fenilalanin Darah dalam *Filter Paper* Menggunakan Fluorometri dan Kolorimetri Enzimatis

Metode fluorometri dan kolorimetri sudah mulai menggeser Guthrie Test untuk monitoring pasien *phenylketonuria*. Pengukuran serum fenilalanin

dilakukan dengan fluorometri dan diperoleh range konsentrasi antara 2 – 6 mg/dL. Pengukuran fenilalanin darah dengan *filter paper* dilakukan dengan kolorimetri enzimatis dan diperoleh range konsentrasi 4 – 10 mg/dL. Koefisien korelasi yang diperoleh 0,97 (Lemanska dkk., 2002).

2.6.12 Metode Penentuan Fenilpiruvat pada Urin Menggunakan FeCl_3 yang Diimmobilisasi pada Plat Silika Gel

Metode analisis fenilketonuria menggunakan plat silika gel yang terimmobilisasi reagen FeCl_3 , MgSO_4 dan larutan buffer $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$. Jumlah mol terbaik reagen FeCl_3 dan MgSO_4 untuk bereaksi dengan fenilpiruvat secara spektrofotometri tampak adalah FeCl_3 3 mmol/L dan MgSO_4 3 mmol/L, sedangkan pH optimum larutan buffer $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$ adalah pH 2,0. Teknik immobilisasi reagen FeCl_3 , MgSO_4 pada mol terbaik dan larutan buffer pada pH optimum diperoleh pada waktu perendaman plat silika gel selama 30 menit dan pengeringan pada suhu 35 °C selama 10 menit. Konsentrasi terkecil fenilpiruvat pada pelarut air dan urin bayi sehat yang dapat terdeteksi dengan metode plat silika gel terimmobilisasi reagen identifikasi fenilpiruvat menunjukkan hasil yang sama yaitu natrium fenilpiruvat 0,5 mmol/L (Fitriani, W., 2013).

2.7 Plat Silika Gel

Silika gel merupakan penyerap polar yang paling sering digunakan, meskipun demikian silika gel juga banyak dijumpai dalam bentuk yang termodifikasi. Silika gel merupakan padatan pendukung yang ideal karena stabil pada kondisi asam, *non swelling*, memiliki karakteristik pertukaran serta memiliki daya tahan tinggi terhadap panas dan mudah dimodifikasi dengan bahan lain.

Selain itu silika gel memiliki situs aktif berupa gugus silanol (SiOH) dan siloksan (Si-O-Si) di permukaan (Buhani dkk., 2009).

Partikel silika gel mengandung gugus hidroksil di permukaannya yang membentuk ikatan hidrogen dengan molekul-molekul polar. Air yang terserap dalam gel mencegah molekul-molekul polar dari pencapaian permukaan. Untuk mengatasinya gel diaktifkan dengan pemanasan sehingga air yang terserap dapat dikeluarkan.

Silika gel merupakan fase diam pada kromatografi lapis tipis. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendarflour dalam sinar ultra violet (Solihat, 2004).

2.8 Immobilisasi

Immobilisasi suatu zat dapat dilakukan dengan mencampurkan senyawa dengan suatu adsorben. Senyawa dapat teradsorbsi secara fisika atau kimia dan tertahan bersama adsorben dengan stabil. Immobilisasi pada KLT yang paling umum adalah menambahkan agent fluorosense sehingga KLT dapat berpendar di bawah lampu ultraviolet (Sholecha, 2002).

Teknik immobilisasi adalah suatu cara bagaimana mengikat reagen pada suatu matriks dengan syarat aktifitas dari reagen tersebut masih tetap ada (Sholecha, 2002). Metode immobilisasi secara fisik meliputi proses penyerapan (adsorpsi), pemerangkapan (*entrapment*), pengkapsulan (*encapsulation*) dan interaksi elektrostatis. Sedangkan secara kimia meliputi pembentukan ikatan kovalen dan crosslinking (Kuswandi, 2010).

1. Cara fisik yang meliputi teknik secara penjebakan (*entrapment*) yang merupakan suatu cara immobilisasi dimana reagen yang akan digunakan diperangkap dalam suatu matriks, *encapsulation* dan adsorpsi pada penyangga padat (Wang, 2009 dalam Setiwan, 2010).
2. Cara kimia yaitu meliputi teknik pengikatan baik secara kovalen, non kovalen dan teknik ikatan silang (*crosslinking*). Teknik kovalen membutuhkan waktu yang sangat lama dan seringkali memerlukan beberapa tahap kimia.
3. Kombinasi secara fisik dan kimia.

2.9 Adsorpsi

Adsorpsi adalah pengumpulan substansi pada permukaan adsorban berbentuk padatan (Reynolds dan Paul, 1995). Adsorpsi juga memiliki pengertian sebagai peristiwa penyerapan atau pengayaan (*enrichment*) suatu komponen di daerah antar fasa. Adsorpsi sendiri merupakan pengaruh dari gaya kohesi seperti ikatan valensi dan gaya tarik Van der Waals. Molekul-molekul tersebut saling mengikat kesemua arah sehingga dicapai suatu titik keseimbangan (*equilibrium*). Akan tetapi molekul lapisan terluar suatu zat padat mempunyai gaya tarik yang tidak diimbangi oleh molekul lainnya seperti zat cair dan gas sehingga permukaan zat padat dapat menangkap molekul fluida yang berdekatan. Fenomena ini dikenal dengan istilah adsorpsi pada permukaan adsorben.

Padatan berpori yang menghisap atau menyerap (*adsorp*) dan melepaskan (*desorp*) suatu fluida disebut adsorben. Molekul fluida yang dihisap tetapi tidak terakumulasi atau melekat ke permukaan adsorben disebut adsorptive, sedangkan

yang terakumulasi atau melekat disebut adsorbat. Faktor yang mempengaruhi adsorpsi antara lain (Pohan dalam Kusnanto, 2007):

1. Karakteristik fisika dan kimia dari adsorben antara lain luas permukaan dan ukuran pori.
2. Konsentrasi adsorbat di dalam fasa cair.
3. Karakteristik fasa cair antara lain pH dan temperatur.
4. Waktu adsorpsi.

Adsorpsi dapat dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan gaya yang menyebabkan adsorpsi yaitu (Oscik, 1982):

1. Adsorpsi fisika

Gaya yang menyebabkan adsorpsi pada adsorpsi fisika merupakan gaya Van der Waals. Gaya ini menyangkut tarik menarik elektrostatis antar molekul secara fisika yang terjadi antara permukaan adsorben dan adsorbat tanpa disertai perubahan kimia. Adsorbat dalam adsorpsi fisika tidak terikat kuat dengan adsorbennya sehingga dapat dengan mudah terjadi desorpsi atau pelepasan kembali adsorbat dari permukaan adsorben. Adsorpsi fisika ini mempunyai panas adsorpsi molar kurang dari 40 kJ/mol.

2. Adsorpsi kimia

Adsorpsi kimia merupakan hasil interaksi elektron-elektron molekul adsorben dan adsorbat sehingga mencakup pembentukan ikatan kimia. Gaya ikat yang terjadi lebih kuat daripada adsorpsi fisika sehingga adsorpsi kimia sulit terjadi desorpsi atau pelepasan kembali adsorbat dari permukaan adsorben. Adsorpsi kimia mempunyai panas adsorpsi tinggi yaitu sekitar 40 – 800 kJ/mol. Adsorbat hanya dapat membentuk satu lapisan atau monolayer pada permukaan adsorben.

2.10 Spektrofotometer UV-Vis

Radiasi elektromagnetik, yang mana sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan salah satunya, dapat dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Panjang gelombang merupakan jarak linier dari suatu titik pada suatu gelombang ke titik yang bersebelahan pada gelombang yang berdekatan (Ibnu Gholib., dkk, 2007).

Analisis spektrofotometri Uv-vis digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dari ikatan rangkap terkonjugasi. Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200 – 400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400 – 800 nm. Warna sinar tampak dapat dihubungkan dengan panjang gelombangnya. Sinar putih mengandung radiasi pada semua panjang gelombang di daerah sinar tampak. Sinar pada panjang gelombang tunggal (radiasi monokromatik) dapat dipilih dari sinar putih (sebagai contoh dengan alat prisma), warna-warna yang dihubungkan dengan panjang gelombang diringkas pada tabel di bawah ini (Ibnu Gholib., dkk, 2007):

Tabel 2.2 Hubungan warna dengan panjang gelombang sinar tampak

Panjang Gelombang	Warna yang diserap	Warna yang diamati atau warna komplementer
400 – 435 nm	Ungu (Lembayung)	Hijau kekuningan
450 – 480 nm	Biru	Kuning
480 – 490 nm	Biru kehijauan	Orange
490 – 500 nm	Hijau kebiruan	Merah
500 – 560 nm	Hijau	Merah anggur
560 – 580 nm	Hijau kekuningan	Ungu (Lembayung)
580 – 595 nm	Kuning	Biru
595 – 610 nm	Orange	Biru kekuningan
610 – 800 nm	Merah	Hijau kebiruan

Sumber: Ibnu Gholib, 2007

Pada kolom ketiga kolom tabel di atas disebutkan juga warna komplementer, mempunyai makna sebagai berikut: jika salah satu komponen

warna putih dihilangkan (biasanya dengan absorpsi) maka sinar yang dihasilkan akan nampak sebagai komplemen warna yang diserap tadi. Jadi jika warna biru 450 – 480 nm dihilangkan dari sinar putih tersebut (atau warna biru diabsorpsi) maka radiasi yang dihasilkan adalah warna kuning (Ibnu Gholib., dkk, 2007).

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum UV dan tampak tergantung pada struktur elektronik dari molekul (Sastrohamidjojo, 1995). Energi yang diserap dalam suatu molekul dapat menyebabkan transisi tingkat emisi atom atau molekul dari tingkat yang rendah (dasar) ke tingkat energi yang lebih tinggi (tereksitasi). Molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek yaitu pada daerah violet. Untuk molekul yang memerlukan energi yang lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang, yaitu pada daerah tampak (Fessenden, 1986).

Sumber radiasi elektromagnetik, yang mana sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan salah satunya, dapat dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Beberapa istilah dan hubungan digunakan untuk menggambarkan gelombang ini. Panjang gelombang merupakan jarak linier dari satu titik gelombang ke titik yang bersebelahan pada gelombang yang berdekatan (Gandjar dan Rohman, 2008).

Spektrum ultraviolet adalah salah satu gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmisi atau absorbansi). Sering juga data ditunjukkan sebagai gambar grafik atau tabel yang menyatakan panjang gelombang lawan serapan molar atau log dari serapan molar, $E_{\max}$ atau $\log E_{\max}$. Dalam praktek, spektrofotometri ultraviolet digunakan terbatas pada sistem

terkonjugasi. Meskipun demikian terdapat keuntungan yang selektif dari serapan ultraviolet, yaitu gugus-gugus karakteristik dapat dikenal dalam molekul-molekul yang sangat kompleks. Sebagian besar dari molekul yang relatif kompleks mungkin transparan dalam ultraviolet sehingga kita mungkin memperoleh spektrum yang semacam dari molekul sederhana. Sebagai contoh, spektrum pada hormon testosteron laki-laki sangat mirip dengan spektrum yang berasal dari mesitiloksida. Ternyata serapan dihasilkan dari struktur enon terkonjugasi dari kedua senyawa tersebut (Sastrohamidjojo, 1991).

Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah *spectrum* ultraviolet dan sinar tampak terdiri dari atas suatu *system optic* dengan kemampuan menghasilkan sifat monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang 200 – 800 nm (Ibnu Gholib., dkk, 2007).

2.11 Penyakit dalam Perspektif Islam

Menurut sabda Nabi Muhammad SAW, “Kesehatan merupakan salah satu hak bagi tubuh manusia”. Maka dari itu, Islam menegaskan perlunya istiqomah memantapkan dirinya dengan menegakkan agama Islam. Satu-satunya jalan dengan melaksanakan perintah-Nya dan meninggalkan larangan-Nya (Elitha, 2007). Allah berfirman:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ قَدْ جَاءَكُمْ مَوْعِظَةٌ مِّن رَّبِّكُمْ وَشِفَاءٌ لِّمَا فِي الصُّدُورِ وَهُدًى وَرَحْمَةٌ لِّلْمُؤْمِنِينَ ٥٧

Artinya:

“Hai manusia, Sesungguhnya Telah datang kepadamu pelajaran dari Tuhanmu dan penyembuh bagi penyakit-penyakit (yang berada) dalam dada dan petunjuk serta rahmat bagi orang-orang yang beriman.”(QS. Yunus: 57).

Di antara bentuk kesabaran terhadap takdir Allah adalah bersabar atas semua penyakit yang menimpa. Banyak faktor yang bisa membantu dan

memudahkan seseorang untuk bersabar. Di antaranya adalah dengan mengetahui keutamaan orang yang terkena musibah termasuk sakit. Siapa yang mengetahui hakikat dari semua musibah dan penyakit niscaya dia bukan hanya akan bersabar, tetapi dia akan bersyukur karena telah tertimpa musibah dan penyakit (Muawiah, 2010).

Salah satu nikmat dari Allah Azza wajalla, ketika Allah Subhaanahu wata'aala, memberikan obat dari penyakit apa saja yang diderita oleh seorang hamba. Telah disebutkan dalam sahih Bukhari dari hadits Abu Hurairah Radhiallohu Anhu bahwa Rasulullah Shallallohu'alaihi wasallam, bersabda:

مَا يُصِيبُ الْمُسْلِمَ مِنْ نَصَبٍ وَلَا وَصَبٍ وَلَا هَمٍّ وَلَا حُزْنٍ وَلَا أَذًى وَلَا غَمٍّ حَتَّى الشَّوْكَةُ يُشَاءَ كُفَّهَا، إِلَّا كَفَّرَ اللَّهُ بِهَا مِنْ خَطَايَا

Artinya :

“Tidaklah Allah menurunkan satu penyakit melainkan Allah telah menurunkan untuknya obat penyembuh.”(HR.Bukhari,no:5354)

Tidak ada yang mampu memberikan kesembuhan dari penyakit-penyakit hati dan jasmani selain Allah Swt. Tidak ada kesembuhan kecuali kesembuhan yang berasal dari-Nya. Tidak ada yang mampu menyembuhkan kecuali Dia. Hal ini seperti dikatakan Nabi Ibrahim As. dalam Al Qur'an:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ٨٠

Artinya:

“ dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku,” (QS. Asy Syu'araa: 80).

BAB III

METODOLOGI

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Juni 2015 di Laboratorium Riset Kimia Analitik dan Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, oven merk Heraeus, indicator pH universal, seperangkat spektrofotometer UV-Vis, dan neraca analitik.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah KCl-HCl, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ p.a, HCl 32% p.a, PEG p.a, EDTA p.a, aquades, plat silika gel, urin bayi sehat usia 0 – 5 tahun.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi preparasi sampel urin; preparasi bahan; penentuan kondisi optimum reaksi fenilpiruvat dengan ion ferri menggunakan spektrofotometri UV-Vis; immobilisasi reagen $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, polietilen glikol, etilendiaminatetraasetat dan larutan buffer KCl-HCl pada plat silika untuk identifikasi Fenilpiruvat (Fitriani, 2013);

performansi reagen identifikasi fenilpiruvat terhadap plat silika; pengujian plat silika terimmobilisasi terhadap sampel; pengumpulan data dan analisa data.

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Preparasi Sampel Urin

Sampel urin yang digunakan adalah urin bayi sehat yang berumur 0 – 5 tahun. Waktu pengambilan urin dilakukan pada pagi hari sekitar pukul 09.00 sampai 10.30 WIB. Urin bayi dikumpulkan dengan membersihkan daerah genital bayi terlebih dahulu, kemudian dipasang kantung penampung urin pada genitalnya. Ditunggu sampai bayi mulai berkemih, kemudian urin yang diperoleh, dipindahkan pada tempat yang bersih, kering dan tertutup rapat.

3.4.2 Preparasi Bahan

Preparasi bahan meliputi pembuatan larutan KCl-HCl, pembuatan reagen identifikasi KCl-HCl yaitu larutan Ferri Ammonium Sulfat $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$, larutan PEG, larutan EDTA. Plat silika yang disiapkan dengan ukuran 2x2 cm.

3.4.2.1 Pembuatan Larutan Natrium Fenilpiruvat (Rupe dan Free, 1959)

Natrium fenilpiruvat 5000 ppm disiapkan sebagai stok natrium fenilpiruvat sebanyak 100 mL. Natrium fenilpiruvat ditimbang sebanyak 0,5 gr. Dilarutkan dengan aquades sebanyak 5 mL. Larutan natrium fenilpiruvat dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL. Ditandabatkan dengan aquades dikocok hingga homogen. Natrium fenilpiruvat dibuat dengan konsentrasi 50; 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm sebanyak 50 mL dari larutan stok natrium fenilpiruvat 5000 ppm.

3.4.2.2 Pembuatan Reagen Identifikasi Fenilpiruvat (Mulyono, 2006)

Pembuatan reagen identifikasi fenilpiruvat meliputi pembuatan reagen ferri ammonium sulfat, reagen PEG, reagen EDTA, dan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3.

a. Pembuatan Reagen Ferri Amonium Sulfat

Ferri amonium sulfat 30.000 ppm disiapkan sebagai stok ferri amonium sulfat sebanyak 100 mL. Ferri amonium sulfat ditimbang sebanyak 3 gr. Aquades ditambahkan sebanyak 5 mL. Larutan ferri amonium sulfat dipindahkan dalam labu takar 100 mL. Ditandabatkan dengan aquades dikocok hingga homogen. Ferri ammonium sulfat dibuat pada konsentrasi 2000; 3000; 5000; 7000; 10.000; dan 20.000 ppm sebanyak 50 mL dari larutan stok ferri ammonium sulfat 30.000 ppm.

b. Pembuatan Polietilen glikol (PEG)

PEG 3000 ppm disiapkan sebagai stok PEG sebanyak 100 mL. PEG ditimbang sebanyak 0,3 gr. Aquades ditambahkan sebanyak 5 mL. Larutan PEG dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL. Ditandabatkan dengan aquades dikocok hingga homogen. PEG dibuat dengan konsentrasi 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm sebanyak 50 mL dari larutan stok PEG 3000 ppm.

c. Pembuatan Etilendiamintetraasetat

EDTA 3000 ppm disiapkan sebagai stok EDTA sebanyak 100 mL. EDTA ditimbang sebanyak 0,3 gr. Aquades ditambahkan sebanyak 5 mL. Larutan PEG dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL. Ditandabatkan dengan aquades dikocok hingga homogen. EDTA dibuat dengan konsentrasi 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm sebanyak 50 mL dari larutan stok EDTA 3000 ppm.

d. Pembuatan Larutan Buffer KCl-HCl pH 2,3

KCl ditimbang sebanyak 2,5 gr dan dilarutkan dengan aquades dalam beaker glass 100 mL. Larutan KCl dipindahkan dalam labu takar 50 mL dan ditandabatkan. Kemudian dihomogenkan. Larutan KCl 5 % dipipet sebanyak 50 mL dan dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL. Larutan HCl ditambahkan tetes demi tetes. pH larutan buffer dilihat dengan menggunakan indikator pH universal sampai pH larutan buffer memenuhi pH 2,3.

3.4.3 Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Fenilpiruvat Dengan Ion Ferri Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

3.4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kompleks Fe-Fenilpiruvat (Fe-PP₃)

Larutan ferri ammonium sulfat 2000 ppm dipipet sebanyak 2 mL ke dalam labu takar 10 mL. Larutan PEG 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL, larutan EDTA 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL, larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sebanyak 2 mL, dan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm sebanyak 2 mL. Aquades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan. Absorbansi larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400 – 800 nm selama 10 menit, sehingga diketahui panjang gelombang optimum.

3.4.3.2 Penentuan Waktu Kestabilan Kompleks Fe-fenilpiruvat

Larutan ferri ammonium sulfat 2000 ppm dipipet sebanyak 2 mL ke dalam labu takar 10 mL. Larutan PEG 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL, larutan EDTA 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL, larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sebanyak 2 mL, dan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm sebanyak 2 mL. Aquades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan. Waktu kestabilan larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis selama 15 menit dan dibuat kurva perbandingan antara absorbansi dan waktu.

3.4.3.3 Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen Ferri Amonium Sulfat Yang Bereaksi Dengan Fenilpiruvat

Larutan ferri amonium sulfat 2000 ppm dipipet sebanyak 2 mL ke dalam labu takar 10 mL. Larutan EDTA 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL, larutan PEG 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL, dan larutan buffer KCl-HCl pH 2,0 sebanyak 2 mL. Larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL. Aquades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang optimum. Prosedur di atas diulangi dengan larutan ferri ammonium sulfat 3000; 5000; 7000; 9000; 10.000; dan 20.000 ppm. Diidentifikasi absorbansi terukur menggunakan konsentrasi natrium fenilpiruvat 500 ppm, ferri ammonium sulfat berbagai konsentrasi, larutan PEG 500 ppm, larutan EDTA 500 ppm, dan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sehingga diperoleh konsentrasi optimum larutan ferri ammonim sulfat. Prosedur di atas diulangi sebanyak tiga kali pengulangan.

3.4.3.4 Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen PEG dan EDTA Terhadap Reaksi Fe-fenilpiruvat

Reagen ferri amonium sulfat diambil pada konsentrasi optimum sebanyak 2 mL ke dalam labu takar 10 mL. Larutan PEG 50 ppm dipipet sebanyak 2 mL. Reagen EDTA 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL. Larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 ditambahkan sebanyak 2 mL dan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL. Aquades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan. Absorbansi larutan tersebut diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Prosedur di atas diulangi dengan reagen PEG 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm.

Konsentrasi optimum dari reagen PEG digunakan untuk mencari konsentrasi optimum reagen EDTA. Larutan ferri ammonium sulfat diambil pada konsentrasi optimum sebanyak 2 mL ke dalam labu takar 10 mL. Larutan PEG diambil pada konsentrasi optimum sebanyak 2 mL. Larutan EDTA 50 ppm dipipet sebanyak 2 mL. Larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 ditambahkan sebanyak 2 mL dan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm ditambahkan sebanyak 2 mL. Aquades ditambahkan sampai tanda batas dan dihomogenkan. Absorbansi larutan tersebut diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Prosedur di atas diulangi dengan larutan EDTA 300; 500; 700; 1000; 2000; dan 3000 ppm.

Konsentrasi optimum reagen PEG dan EDTA yang diketahui dapat ditentukan pengaruh reagen PEG dan EDTA terhadap larutan ferri ammonium sulfat dengan larutan natrium fenilpiruvat. Prosedur di atas diulangi sebanyak tiga kali pengulangan.

Hasil percobaan di atas dapat dibuat kurva perbandingan antara absorbansi dengan konsentrasi PEG dan EDTA untuk mengetahui konsentrasi optimum (terbaik) dari larutan PEG dan EDTA.

3.4.4 Immobilisasi Reagen Ferri Ammonium Sulfat, Polietilen Glikol, Etilendiamintetraasetat, dan Buffer Kcl-Hcl Pada Plat Silika Untuk Identifikasi Fenilpiruvat

Reagen identifikasi fenilpiruvat disiapkan berupa reagen ferri ammonium sulfat pada konsentrasi optimum, PEG dan EDTA pada konsentrasi optimum, serta larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 dengan perbandingan volume 1:1:1:1 sebanyak 30 mL, serta plat silika ukuran 2x2 cm. Diimobilisasikan reagen identifikasi fenilpiruvat ke atas fasa diam plat silika gel ukuran 2x2 cm dengan direndam selama 30 menit pada seluruh bagian plat silika gel. Plat silika yang

terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat dikeringkan dengan dioven pada suhu 35 °C selama 10 menit. Plat silika ditetesi dengan setetes sampel larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm pada pelarut air. Diidentifikasi plat dengan mengamati waktu bercak warna mulai terlihat, kejelasan, dan kestabilan dari bercak warna yang terbentuk, sehingga diketahui deteksi fenilpiruvat. Prosedur di atas diulangi sebanyak tiga kali (Fitriani, 2013).

3.4.5 Performansi Reagen Identifikasi Fenilpiruvat Terhadap Plat Silika

Plat silika terimmobil ditetesi dengan setetes sampel larutan natrium fenilpiruvat 50; 100; 300; 500; 700; dan 1000 ppm pada pelarut air. Diidentifikasi plat dengan mengamati waktu bercak warna yang terbentuk. Reagen identifikasi fenilpiruvat akan membentuk warna hijau dengan fenilpiruvat.

3.4.6 Pengujian Plat Silika Terimmobilisasi Terhadap Sampel

Plat yang telah diimmobilisasi dengan reagen identifikasi fenilpiruvat dengan komposisi optimum selanjutnya ditetesi dengan larutan natrium fenilpiruvat dengan konsentrasi 50; 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm dalam pelarut air dan pelarut urin bayi sehat. Plat didiamkan kira-kira selama 5 menit. Diidentifikasi plat dengan mengamati waktu bercak warna mulai terlihat, kejelasan dan kestabilan bercak warna yang terbentuk sehingga diketahui konsentrasi terkecil dari fenilpiruvat yang dapat terdeteksi dengan menggunakan metode plat silika terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat. Prosedur di atas diulangi menggunakan sampel yang sama sebanyak tiga kali pengulangan.

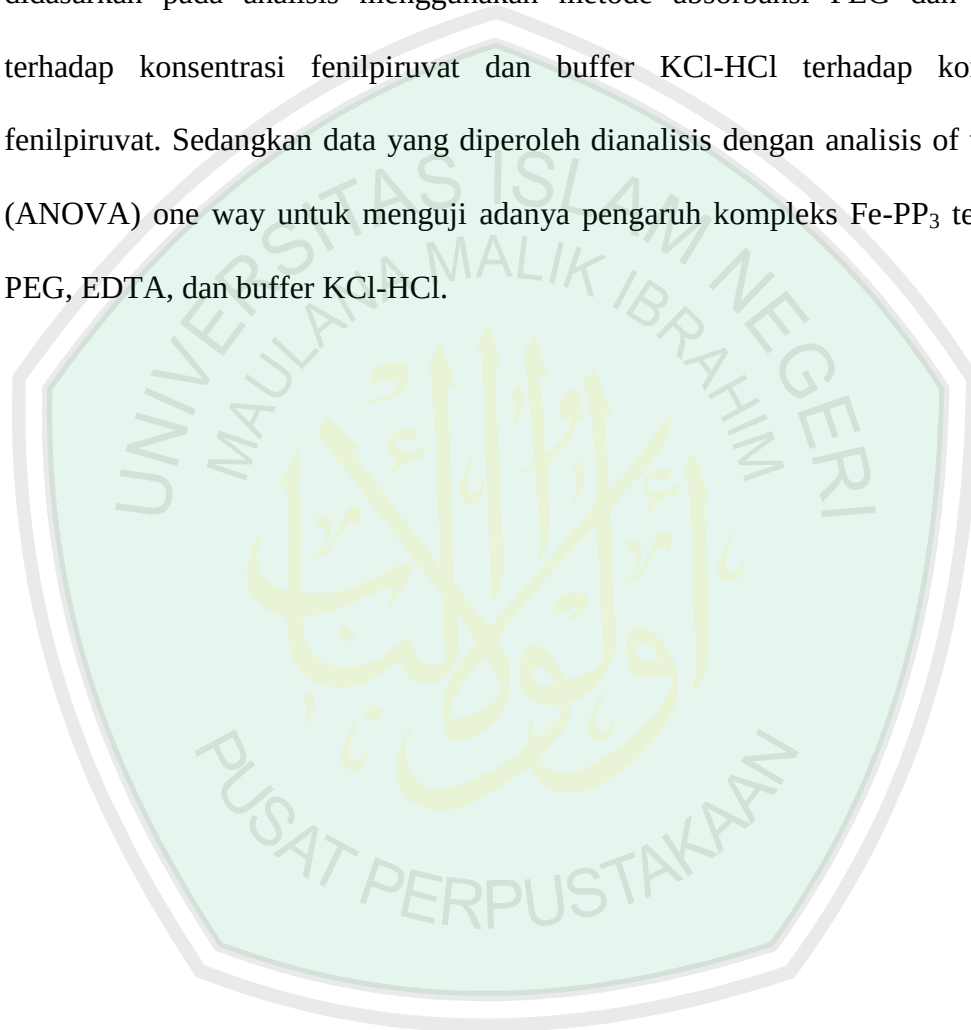
3.4.7 Pengumpulan Data

Pengumpulan data menggunakan pengamatan langsung dimana peneliti langsung mengamati hasil penelitian secara berulang (*repeated measurement*).

Warna yang timbul pada plat silika yang terimmobilisasi reagen identifikasi fenilpiruvat akan diamati secara langsung dan diambil gambarnya.

3.4.8 Analisa Data

Data yang telah diperoleh dalam penelitian ini meliputi data yang didasarkan pada analisis menggunakan metode absorbansi PEG dan EDTA terhadap konsentrasi fenilpiruvat dan buffer KCl-HCl terhadap kompleks fenilpiruvat. Sedangkan data yang diperoleh dianalisis dengan analisis of varians (ANOVA) one way untuk menguji adanya pengaruh kompleks Fe-PP₃ terhadap PEG, EDTA, dan buffer KCl-HCl.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel Urin

Penelitian ini menggunakan sampel urin bayi sehat. Urin bayi sehat yang akan dianalisis adalah bayi yang berumur 0 – 5 tahun, tidak dalam kondisi sakit, dan tidak mengkonsumsi obat. Pengumpulan sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan teknik pengumpulan urin acak. Waktu pengambilan urin bayi dilakukan pagi hari sekitar pukul 06.00 – 08.00 WIB. Hal ini disebabkan pada jam tersebut pengaruh asupan cairan dan aktivitas bayi terhadap urin belum terlalu lama. Urin bayi yang akan dianalisis harus dalam keadaan segar. Hal ini dikarenakan urin bayi yang terlalu lama didiamkan setelah pengambilan menyebabkan bakteri yang terdapat dalam urin berkembang biak. Oleh karena itu diduga dapat mempengaruhi hasil perlakuan terhadap urin.

Urin bayi dikumpulkan dengan membersihkan daerah genital bayi dengan air bersih terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk membersihkan mikroba dari luar uretra agar tidak mencemari spesimen urin, kemudian dipasang kantung penampung urin pada genitalnya. Ditunggu sampai bayi mulai berkemih, kemudian urin yang diperoleh, dipindahkan pada tempat yang bersih, kering dan tertutup rapat.

4.2 Preparasi Bahan

Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat dibuat dengan pelarut air dan pelarut urin. Larutan natrium fenilpiruvat pada pelarut air dibuat dengan variasi konsentrasi natrium fenilpiruvat 50; 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm.

Larutan natrium fenilpiruvat pada pelarut urin dibuat dengan variasi konsentrasi 50; 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm. Selanjutnya larutan-larutan tersebut dicampur dengan urin dengan perbandingan 1 : 1 sebanyak 1 mL. Variasi konsentrasi natrium fenilpiruvat digunakan untuk menentukan konsentrasi terkecil natrium fenilpiruvat yang dapat terdeteksi dengan metode plat silika gel yang terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat.

Reagen ferri ammonium sulfat (FAS) dibuat dengan variasi konsentrasi 2000; 5000; 7000; 9000; 10000; dan 20000 ppm. Reagen FAS digunakan untuk bereaksi dengan natrium fenilpiruvat membentuk kompleks Fe-fenilpiruvat berwarna hijau. Reagen polietilen glikol (PEG) dan etilendiamintetraasetat (EDTA) dibuat dengan variasi konsentrasi 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000ppm. Reagen PEG dan EDTA merupakan senyawa yang mampu menstabilkan Fe^{3+} sehingga membentuk kompleks yang stabil dan warna yang terbentuk juga stabil. Larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 dipilih karena larutan ini tidak volatil yang digunakan untuk memperoleh hasil yang maksimal yakni warna yang dihasilkan lebih tajam dan tahan lebih lama. Larutan tersebut juga digunakan untuk mempertahankan warna yang terbentuk dari pembentukan kompleks Fe-fenilpiruvat.

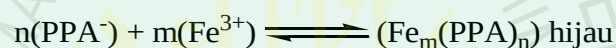
4.3 Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Fenilpiruvat Dengan Ion Ferri Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kompleks Fe-Fenilpiruvat (Fe-PP_3)

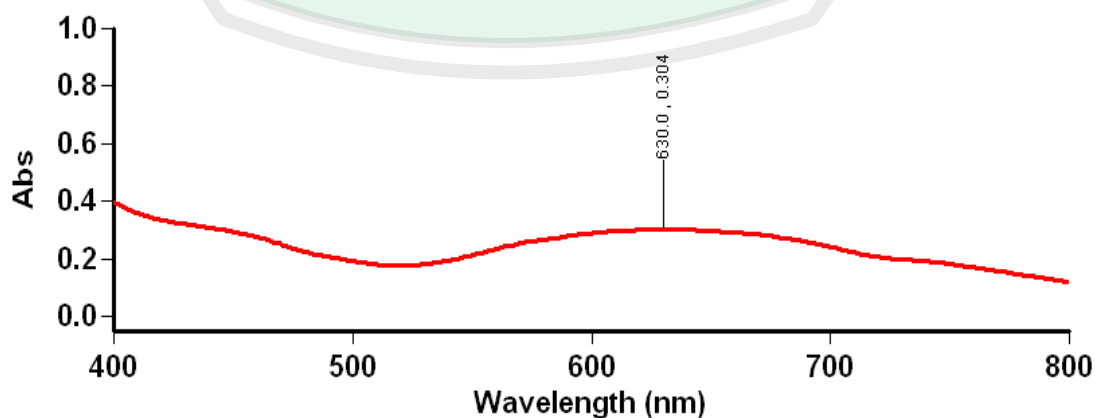
Penentuan panjang gelombang optimum kompleks Fe-Fenilpiruvat dilakukan dengan membuat larutan FAS 2000 ppm, PEG 500 ppm, EDTA 500 ppm, buffer KCl-HCl pH 2,3 dan natrium fenilpiruvat 500 ppm. Selanjutnya

larutan-larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang antara 400 – 800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Analisis UV-Vis didasarkan pada interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan molekul yang mengalami transisi elektron. Interaksi ini yang menyebabkan terjadinya penyerapan energi radiasi elektromagnetik.

Penggunaan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur absorbansi kompleks Fe-fenilpiruvat, karena senyawa kompleks tersebut berwarna hijau sehingga dapat dianalisa menggunakan alat tersebut. Ion ferri (Fe^{3+}) bereaksi dengan fenilpiruvat akan memberikan warna hijau dan reaksinya sebagai berikut (Saifer, 1990):



Penentuan panjang gelombang optimum untuk kompleks Fe-fenilpiruvat menggunakan panjang gelombang daerah visibel yaitu antara 610 – 750 nm (Ibnu Gholib, dkk, 2007). Sehingga untuk menentukan panjang gelombang optimum ini digunakan range pada daerah panjang gelombang 400 – 800 nm. Berdasarkan penelitian didapatkan bahwa panjang gelombang optimum kompleks Fe-fenilpiruvat dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut:



Gambar 4.1 Spektra UV-Vis kompleks Fe-fenilpiruvat

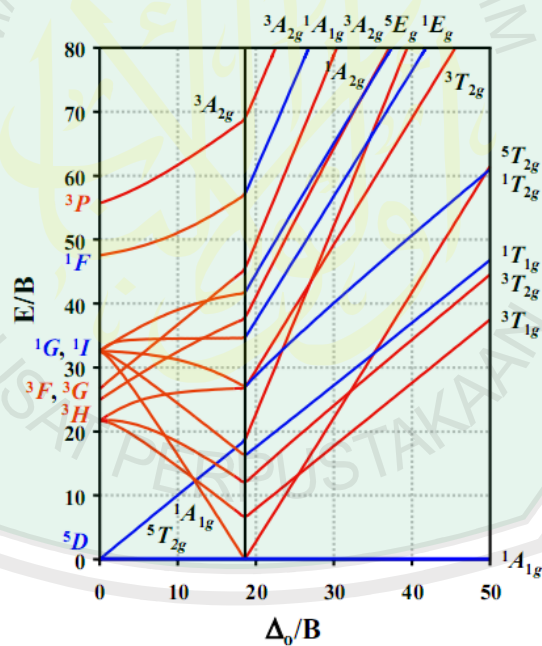
Berdasarkan Gambar 4.1 tersebut, panjang gelombang optimum dari senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat adalah 630 nm ($A = 0,304$). Hal ini menunjukkan bahwa serapan optimum kompleks Fe-fenilpiruvat pada panjang gelombang 630 nm. Panjang gelombang optimum yang diperoleh akan digunakan untuk menentukan konsentrasi optimum reagen ferri ammonium sulfat, PEG, dan EDTA. Menurut penelitian Fitriani (2013), panjang gelombang senyawa kompleks Fe-Fenilpiruvat yang diperoleh adalah 637 nm ($A = 0,816$) dengan reagen identifikasi fenilpiruvat yang digunakan adalah reagen FeCl_3 , MgSO_4 , serta buffer pH $\text{CH}_3\text{COONa-HCl}$. Menurut penelitian Nofemmy (2014), panjang gelombang senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat yang diperoleh adalah 640 nm ($A = 0,416$) dengan reagen identifikasi fenilpiruvat yang digunakan adalah FeCl_3 , Na-EDTA dan buffer KCl-HCl .

Menurut penelitian Saifer (1960), panjang gelombang senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat yang diperoleh adalah 630 nm ($A = 0,620$) dengan reagen identifikasi fenilpiruvat yang digunakan adalah campuran FeCl_3 10% dengan ferro ammonium sulfat, buffer glisin dan uranin nitrat. Maka dapat dikatakan bahwa panjang gelombang optimum yang diperoleh di daerah *visible* dimana panjang gelombang yang dihasilkan sama dengan penelitian Saifer (1960).

Kompleks Fe-fenilpiruvat yang terbentuk mempunyai warna komplementer yaitu warna yang mampu dilihat mata. Warna yang mampu dilihat mata adalah hijau, sedangkan warna yang diserap oleh spektrum sinar tampak adalah merah. Hal ini dapat dilihat pada panjang gelombang 630 nm.

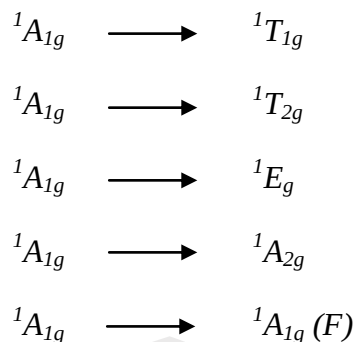
Spektrum suatu senyawa kompleks dapat dijelaskan dalam teori medan kristal sebagai akibat dari transisi elektronik yang terjadi pada senyawa

kompleks. Transisi pada senyawa kompleks seringkali dikaitkan dengan dengan transisi d-d karena melibatkan orbital-orbital molekul yang karakter utamanya adalah karakter orbital *d* dari logam atau ion logam yang menjadi pusat dari suatu kompleks (Effendy, 2010). Spektrum senyawa kompleks oktahedral medan kuat seperti pada kompleks $[\text{Fe(PP)}]^{2+}$ dapat dijelaskan menggunakan diagram Tanabe-Sugano. Pada diagram Tanabe-Sugano, absis atau sumbu x menyatakan kekuatan medan ligan dimana semakin ke kanan maka kekuatan medan ligan suatu kompleks adalah semakin bertambah. Ordinat atau sumbu y menyatakan tingkat energi dari *term* yang ada. Diagram Tanabe-Sugano untuk kompleks oktahedral dengan konfigurasi d^6 diberikan pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Diagram Tanabe-Sugano untuk kompleks dengan ion pusat d^6

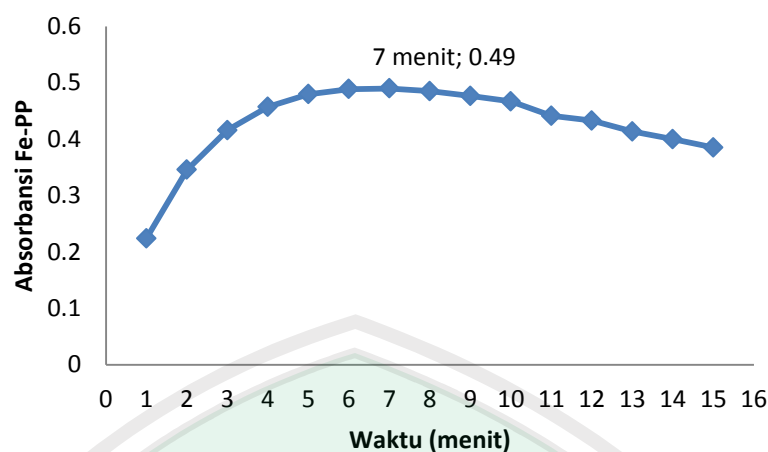
Berdasarkan Gambar 4.2, diketahui bahwa ada beberapa transisi yang dapat terjadi menurut aturan seleksi spin yaitu



Akan tetapi hanya satu puncak yang dapat teramati pada spektrum yang dihasilkan. Hal ini dapat dikarenakan transisi lain terjadi pada frekuensi yang relatif tinggi sehingga energi transisi yang dihasilkan semakin besar dan terjadi pada λ lebih pendek dari daerah λ *visible* maka tidak dapat teramati pada spektrum yang dihasilkan. Puncak yang dihasilkan pada λ 630 nm kemungkinan merupakan hasil transisi ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1T_{1g}$ dan ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1T_{2g}$ yang mengalami saling silang atau *crossover* sehingga puncaknya berdekatan dan tampak sebagai satu puncak (Effendy, 2010). Energi transisi keduanya relatif rendah sehingga transisinya dapat diamati pada panjang gelombang *visible* sementara transisi lain yang energinya lebih tinggi yaitu ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1E_g$, ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1A_{2g}$ dan ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1A_{1g}(F)$ sehingga tidak dapat teramati pada daerah *visible*.

4.3.2 Penentuan Waktu Kestabilan Kompleks Fe-Fenilpiruvat

Penentuan waktu optimum pembentukan kompleks Fe-fenilpiruvat dilakukan pada FAS 2000 ppm, PEG 500 ppm, EDTA 500 ppm, buffer KCl-HCl pH 2,3 dan natrium fenilpiruvat 500 ppm selama 15 menit dengan interval 1 menit. Penentuan waktu kestabilan ini bertujuan untuk mengetahui saat ion Fe^{3+} bereaksi sempurna dengan fenilpiruvat. Berdasarkan waktu optimum pembentukan kompleks Fe-fenilpiruvat menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebagai berikut:

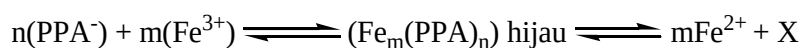


Gambar 4.3 Grafik penentuan waktu kestabilan pembentukan kompleks Fe-fenilpiruvat

Berdasarkan Gambar 4.3 waktu kestabilan kompleks Fe-fenilpiruvat yaitu 7 menit dengan nilai absorbansi tertinggi 0,4900. Ion Fe^{3+} akan bereaksi dengan fenilpiruvat (PPA) membentuk kompleks Fe-fenilpiruvat.



Pada waktu 1 – 7 menit menunjukkan nilai absorbansi mengalami kenaikan yakni 0,2242; 0,3459; 0,4158; 0,4574; 0,4798; 0,4888 dan 0,4900. Sedangkan pada waktu 8 – 15 menit menunjukkan nilai absorbansi mengalami penurunan. Berdasarkan nilai absorbansi tersebut dapat dilihat bahwa waktu kestabilan kompleks Fe-fenilpiruvat adalah pada menit ke-7 dengan nilai absorbansi 0,4900. Hal ini kemungkinan pada menit ke-7, reaksi pembentukan kompleks Fe-fenilpiruvat sudah optimal sehingga intensitas warna yang dihasilkan juga optimal. Pada menit ke 8 – 15, nilai absorbansi mengalami penurunan yang ditandai dengan pudarnya warna larutan kompleks Fe-Fenilpiruvat. Jika direaksikan dapat ditulis sebagai berikut (Saifer, 1960):



X diduga sebagai senyawa teroksidasi.

Pudarnya warna kompleks hijau yang terjadi kemungkinan disebabkan karena adanya dekomposisi kompleks Fe(III)-PPA yang melibatkan reduksi Fe(III) menjadi Fe(II). Saifer (1959) mengungkapkan bahwa reaksi yang terjadi dapat dianalogikan dengan reaksi antara FeCl_3 dan tiosulfat. Reaksi tersebut melibatkan ikatan koordinasi fenolat dalam pembentukan kompleksnya sama seperti pada kompleks Fe(III)-PPA yang juga melibatkan ikatan koordinasi fenolat dalam penelitian Paine (2004) mengenai pembentukan ikatan koordinasi besi dengan fenilpiruvat. Saifer (1959) membuktikan terjadinya reduksi Fe(III) pada kompleks Fe(III)-PPA dengan melakukan penambahan ligan a-a-dipyridil pada campuran Fe(III) dan PPA dan hasilnya menunjukkan bahwa terbentuk kompleks Fe(II) sebagai Fe(II)-a-a-dipyridil dengan warna merah gelap dan hasil pengukuran spektrofotometri menunjukkan serapan maksimum pada 520 nm. Menurut Nayak dan Dash (2006) dalam penelitiannya tentang studi perbandingan laju oksidasi ion tiosulfat dengan kompleks Fe(III) dengan koordinasi fenolat-amida-amina, kompleks Fe(III) juga mengalami reduksi menjadi kompleks Fe(II) yang dibuktikan secara spektrofotometri sebagai kompleks dengan Fe(II)-(phenantroline)₃.

Pembentukan suatu kompleks menurut teori medan kristal dipengaruhi oleh beberapa faktor yang dapat membantu untuk mengetahui kestabilannya. Begitu pula dalam menjelaskan pembentukan kompleks pada rangkaian reaksi pembentukan kompleks Fe-PP dengan melibatkan ion pusat Fe^{3+} dan Fe^{2+} dalam reaksinya. Salah satu hal penting dalam menjelaskan pembentukan suatu kompleks adalah harga energi penstabilan medan kristal atau CSFE (*crystal*

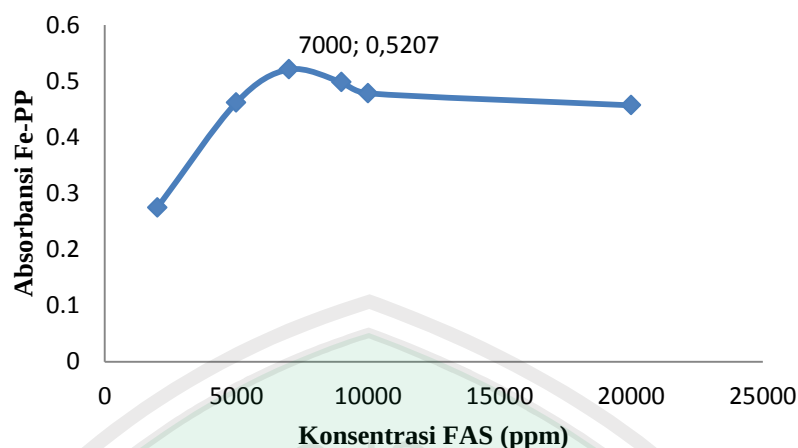
stabilization field energy) yaitu energi yang terlibat pada penstabilan suatu kompleks (Effendy, 2010).

Fe^{3+} pada tahapan reaksi ini membentuk kompleks oktahedral medan kuat dengan tiga ligan fenilpiruvat (PPA) yang dalam reaksinya akan mengalami oksidasi dan reduksi sehingga ion pusat Fe^{3+} tereduksi menjadi Fe^{2+} . Fe^{3+} adalah ion pusat dengan konfigurasi d^5 sementara Fe^{2+} adalah d^6 . Harga CSFE untuk kompleks oktahedral medan kuat dengan ion pusat yang memiliki konfigurasi d^5 adalah $-20Dq+2P$ sementara untuk d^6 adalah sebesar $-24Dq+3P$. Ditinjau dari harga tersebut, diketahui bahwa Fe^{2+} memiliki harga CSFE yang lebih besar dari Fe^{3+} . Menurut Effendy (2010), semakin besar harga CSFE yang dihasilkan dalam pembentukan suatu kompleks, maka kompleks yang dihasilkan cenderung lebih stabil sehingga pembentukan kompleks yang lebih stabil dihasilkan oleh Fe^{2+} ketimbang Fe^{3+} . Hal inilah yang menyebabkan kompleks Fe(III)PP tereduksi menjadi Fe(II) .

4.3.3 Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen Ferri Ammonium Sulfat yang Bereaksi dengan Fenilpiruvat

Penentuan konsentrasi optimum reagen ferri ammonium sulfat dilakukan pada variasi konsentrasi FAS 2000; 5000; 7000; 9000; 10000; dan 20000 ppm. Penentuan konsentrasi optimum ferri ammonium sulfat ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum ferri ammonium sulfat di saat bereaksi dengan fenilpiruvat membentuk kompleks Fe-fenilpiruvat.

Analisis penentuan konsentrasi optimum ferri ammonium sulfat dilakukan dengan cara spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa penentuan konsentrasi optimum ferri ammonium sulfat menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebagai berikut:

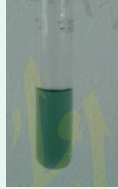


Gambar 4.4 Grafik penentuan konsentrasi optimum FAS dengan fenilpiruvat

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa konsentrasi optimum FAS adalah 7000 ppm dengan nilai absorbansi 0,5207. Semakin banyak ion Fe^{3+} , maka akan semakin banyak ion Fe^{3+} yang bereaksi dengan fenilpiruvat membentuk senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat. Pada konsentrasi 7000 ppm ini merupakan reaksi kompleks antara Fe-fenilpiruvat yang paling optimum dilihat dari nilai absorbansi yang tinggi. Kemudian pada konsentrasi 9000; 10.000; dan 20.000 ppm nilai absorbansi mengalami penurunan. Hasil penentuan konsentrasi optimum ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Pada Tabel 4.1 dapat dilihat bahwa warna senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat adalah hijau. Semakin besar konsentrasi FAS maka warna yang dihasilkan semakin pekat.

Tabel 4.1 Hasil pencampuran larutan dengan menggunakan variasi konsentrasi FAS

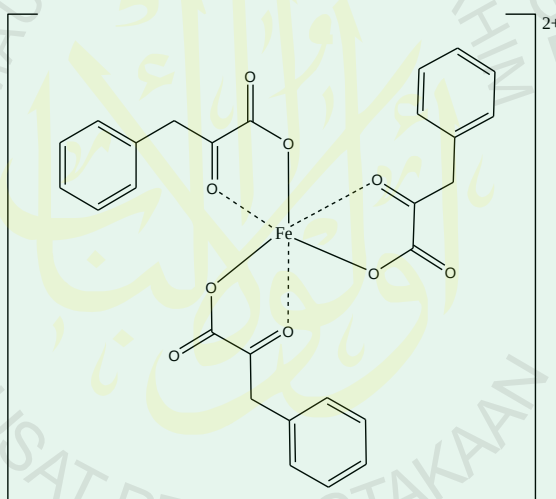
Konsentrasi FAS (ppm)	Intensitas warna	Keterangan
2000		+
	Hijau muda	
5000		+
	Hijau muda	
7000		++
	Hijau kuat	
9000		++
	Hijau tua	
10.000		++
	Hijau tua	
20.000		+++
	Hijau sangat tua	

Keterangan: + : hijau muda
 ++ : hijau tua
 +++ : hijau sangat tua

Larutan Fe^{3+} pada pH asam berbentuk ion ferri akuo, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (Cotton, 1989). Sehingga ion Fe^{3+} saat bereaksi dengan fenilpiruvat membentuk senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{PPA})]^{2+}$:



Logam transisi pertama akan membentuk kompleks yang stabil dengan ligan yang atom donornya N, O atau F (Sukardjo, 1992). Ion Fe^{3+} yang termasuk logam transisi pertama akan membentuk kompleks dengan fenilpiruvat yang mempunyai atom O. Dugaan struktur dari kompleks Fe-Fenilpiruvat sebagai berikut:

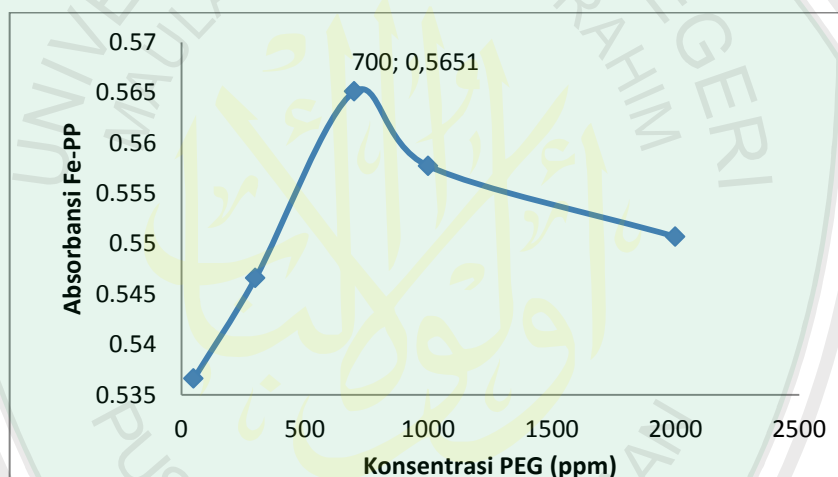


Gambar 4.5 Dugaan struktur kompleks Fe-Fenilpiruvat

4.3.4 Penentuan Konsentrasi Optimum Reagen PEG Dan EDTA Terhadap Reaksi Fe-Fenilpiruvat

Penentuan konsentrasi optimum reagen PEG dilakukan pada variasi konsentrasi PEG 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm. Penentuan konsentrasi optimum reagen PEG ini berfungsi membentuk khelat dengan Fe^{3+} sehingga membentuk kompleks yang stabil.

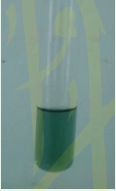
Berdasarkan Gambar 4.5 di bawah ini dapat dilihat bahwa konsentrasi optimum PEG adalah 700 ppm dengan nilai absorbansi 0,5733. Warna yang terbentuk adalah hijau dan stabilitas warna sekitar 29 menit. Jika konsentrasi PEG kurang dari 700 ppm maka kompleks yang dihasilkan mudah terionisasi. Sebaliknya jika konsentrasi PEG lebih dari 700 ppm maka polietilen glikol yang awalnya bersifat menstabilkan dia akan berubah menjadi kompetitor bagi fenilpiruvat. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa penentuan konsentrasi optimum PEG menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebagai berikut:



Gambar 4.6 Grafik penentuan konsentrasi optimum PEG dengan fenilpiruvat

Pada Tabel 4.2 merupakan hasil pencampuran dari larutan FAS, PEG, EDTA, dan buffer KCl-HCl pH 2,3 untuk menentukan konsentrasi optimum PEG. Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa warna senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat adalah hijau. Semakin besar konsentrasi PEG maka warna yang dihasilkan semakin hijau (pekat).

Tabel 4.2 Hasil pencampuran larutan dengan variasi konsentrasi PEG

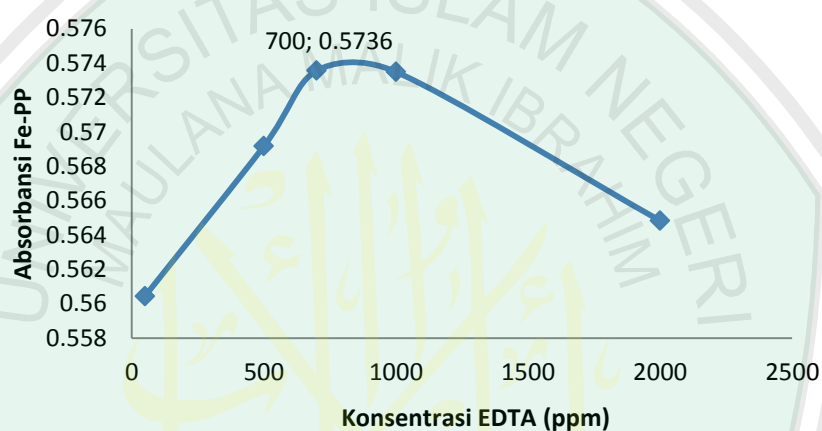
Konsentrasi PEG (ppm)	Intensitas warna	Keterangan
50		+
	Hijau muda	
300		++
	Hijau tua	
500		++
	Hijau tua	
700		+++
	Hijau tua	
1000		++
	Hijau tua	
2000		++
	Hijau tua	

Keterangan: + : hijau muda

++ : hijau tua

Langkah selanjutnya ialah menentukan konsentrasi optimum reagen EDTA dilakukan pada variasi konsentrasi 50; 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm. Penentuan konsentrasi optimum reagen EDTA ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum EDTA yang berfungsi membentuk khelat dengan Fe^{3+} sehingga membentuk kompleks yang stabil.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa penentuan konsentrasi optimum reagen EDTA menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebagai berikut:

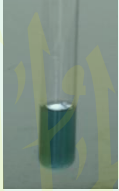


Gambar 4.7 Grafik penentuan konsentrasi optimum EDTA dengan fenilpiruvat

Gambar 4.7 menunjukkan bahwa konsentrasi optimum reagen etilendiamintetraasetat (EDTA) adalah 700 ppm dengan nilai absorbansi 0,5736. Warna yang terbentuk adalah hijau dan stabilitas warna yang terbentuk sekitar 34 menit. EDTA sangat mempengaruhi warna yang terbentuk. Hasil dari penentuan konsentrasi optimum EDTA dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Pada Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa warna senyawa kompleks Fe-fenilpiruvat adalah hijau. Semakin besar konsentrasi EDTA maka warna yang dihasilkan semakin hijau (pekat).

Tabel 4.3 Hasil dari penentuan konsentrasi optimum EDTA

Konsentrasi EDTA (ppm)	Intensitas warna	Keterangan
50	 Hijau muda	+
300	 Hijau muda	+
500	 Hijau tua	++
700	 Hijau tua	++
1000	 Hijau tua	++
2000	 Hijau tua	++

Keterangan: + : hijau muda
++ : hijau tua

Analisis uji statistika menggunakan uji satu arah ANOVA pada data absorbansi PEG menghasilkan nilai F_{hitung} pada konsentrasi optimum PEG sebesar 20,83. Sedangkan F_{tabel} data absorbansi PEG dan EDTA pada konsentrasi optimum dengan tingkat toleransi 5% sebesar 8,70. Hal ini menunjukkan bahwa hasil data absorbansi PEG mempunyai nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$. Dan dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan hasil absorbansi di konsentrasi optimum PEG, dengan demikian konsentrasi optimum PEG mempunyai pengaruh terhadap pembentukan kompleks Fe-Fenilpiruvat. Sehingga dapat dikatakan konsentrasi optimum PEG mempunyai pengaruh terhadap kompleks Fe-fenilpiruvat. Analisis uji statistika menggunakan uji satu arah ANOVA pada data absorbansi EDTA menghasilkan nilai F_{hitung} pada konsentrasi optimum EDTA sebesar 16,22. Sedangkan F_{tabel} data absorbansi EDTA pada konsentrasi optimum dengan tingkat toleransi 5% sebesar 8,70. Hal ini menunjukkan bahwa hasil data absorbansi EDTA mempunyai nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$. Dan dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan hasil absorbansi di konsentrasi optimum EDTA, dengan demikian konsentrasi optimum EDTA mempunyai pengaruh terhadap pembentukan kompleks Fe-Fenilpiruvat. Sehingga dapat dikatakan konsentrasi optimum EDTA mempunyai pengaruh terhadap kompleks Fe-fenilpiruvat.

4.4 Immobilisasi Reagen Ferri Ammonium Sulfat (FAS), PEG, EDTA dan Buffer KCl-HCl Pada Plat Silika Untuk Identifikasi Fenilpiruvat

Immobilisasi reagen FAS, PEG, EDTA dan larutan buffer KCl-HCl pada plat silika gel untuk identifikasi fenilpiruvat dilakukan dengan cara fisik yaitu teknik adsorpsi fisik. Teknik adsorpsi fisik tidak disertai perubahan kimia ketika reagen identifikasi fenilpiruvat terikat pada plat silika gel. Kelemahan teknik ini

adalah mudah terjadi desorpsi atau pelepasan kembali absorbat (reagen identifikasi fenilpiruvat) dari permukaan adsorben (plat silika gel). Reagen identifikasi fenilpiruvat terdiri dari reagen FAS 7000 ppm, PEG 700 ppm, EDTA 700 ppm dan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 dengan perbandingan 1:1:1:1 sebanyak 30 mL. Plat silika kemudian direndam selama 30 menit dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 35 °C selama 10 menit. Selanjutnya plat silika diuji dengan sampel natrium fenilpiruvat dalam pelarut air dengan konsentrasi 500 ppm. Hasil dari immobilisasi plat silika sebagai berikut.

Tabel 4.4 Immobilisasi plat silika dengan reagen identifikasi optimum

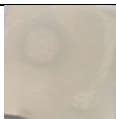
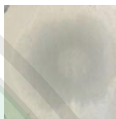
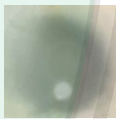
Pengulangan	Warna Kompleks Fe-fenilpiruvat	Respon mulai terbentuknya warna	Stabilitas Warna
1	Hijau	17 detik	>25 menit mulai pudar
2	Hijau	20 detik	>25 menit mulai pudar
3	Hijau	22 detik	>25 menit mulai pudar

Tabel 4.4, menunjukkan terbentuknya warna hijau pada kompleks Fe-fenilpiruvat membutuhkan waktu sekitar 20 detik. Sedangkan stabilitas warna yang terbentuk pada plat tersebut sekitar $\pm$ 25 menit. Hasil tersebut merupakan rata-rata dari replikasi tiga kali pengukuran pada plat silika.

4.5 Performansi Reagen Identifikasi Fenilpiruvat Terhadap Plat Silika Gel

Performansi reagen identifikasi fenilpiruvat terhadap plat silika dilakukan dengan menguji plat silika yang telah terimmobil dengan sampel larutan natrium fenilpiruvat 50; 100; 300; 500; 700; dan 1000 ppm pada pelarut air. Hasil uji plat silika dengan sampel larutan, natrium fenilpiruvat tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil penetesan natrium fenilpiruvat dengan variasi konsentrasi

Konsentrasi Natrium fenilpiruvat (ppm)	Waktu respon mulai terbentuknya warna	Intensitas Warna
50	-	
100	20 detik	
200	17 detik	
300	15 detik	
500	12 detik	
700	8 detik	
1000	4 detik	

Pada Tabel 4.5 dapat diketahui konsentrasi terkecil natrium fenilpiruvat dalam pelarut air yang dapat terdeteksi menggunakan plat silika terimmobilisasi reagen identifikasi. Plat silika yang telah terimmobilisasi reagen, diuji dengan sampel natrium fenilpiruvat dengan variasi konsentrasi yang tercantum pada Tabel 4.5. Konsentrasi terkecil dari natrium fenilpiruvat adalah 100 ppm. Warna yang terbentuk adalah warna hijau dan warna mulai tampak dalam waktu 20 detik, memudar dalam 10 menit, dan hilang dalam 2 jam.

Pada Tabel 4.5 dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi natrium fenilpiruvat maka warna hijau pada plat silika yang dihasilkan semakin tua. Pada

konsentrasi 50 ppm plat silika tidak menunjukkan perubahan warna. Pada konsentrasi 100 ppm plat silika menunjukkan perubahan warna yaitu hijau sangat tipis. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa perubahan warna plat silika dari kuning menjadi hijau pada plat silika gel terimmobil reagen identifikasi mulai tampak pada konsentrasi natrium fenilpiruvat 100 ppm.

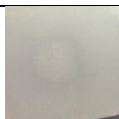
4.6 Pengujian Plat Silika Terimmobilisasi Terhadap Sampel Urin

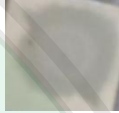
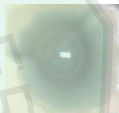
Pengujian plat silika terimmobilisasi terhadap sampel (urin) digunakan untuk menentukan konsentrasi terkecil dari natrium fenilpiruvat yang dapat terdeteksi pada pelarut urin.

Pada sampel natrium fenilpiruvat pada pelarut urin telah diamati bahwa natrium fenilpiruvat 50 tidak menunjukkan perubahan warna hijau pada plat silika gel dilihat pada Tabel 4.6. Konsentrasi terkecil natrium fenilpiruvat pada pelarut urin adalah 100 ppm, yang menunjukkan perubahan warna menjadi hijau. Warna mulai tampak dalam 58 detik, warna mulai pudar dalam 3 menit, dan warna hijau hilang dalam 1 jam.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penentuan konsentrasi terkecil fenilpiruvat dalam sampel natrium fenilpiruvat pada pelarut urin dapat dilihat pada Tabel 4.6, yaitu:

Tabel 4.6 Variasi konsentrasi natrium fenilpiruvat dalam pelarut urin

Konsentrasi Natrium Fenilpiruvat (ppm)	Waktu respon warna mulai terbentuk	Intensitas Warna
50	-	
Warna hijau belum tampak		

100	58 detik	
		Warna hijau tipis
200	53 detik	
		Warna hijau kurang kuat
300	47 detik	
		Warna hijau kuat
500	23 detik	
		Warna hijau kuat
700	19 detik	
		Warna hijau lebih kuat
1000	13 detik	
		Warna hijau sangat kuat

Pada Tabel 4.6 dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi natrium fenilpiruvat pada pelarut urin, maka warna hijau pada plat silika yang dihasilkan semakin tua. Pada konsentrasi natrium fenilpiruvat 50 ppm tidak menunjukkan perubahan warna. Pada konsentrasi 100 ppm plat silika menunjukkan perubahan warna yaitu hijau sangat tipis. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa perubahan warna plat silika dari kuning menjadi hijau pada plat silika gel terimmobil reagen identifikasi mulai tampak pada konsentrasi natrium fenilpiruvat 100 ppm.

4.7 Pandangan Islam Tentang Penelitian Pengaruh Polietilen Glikol dan Etilendiamintetraasetat Dalam Analisis Fenilpiruvat Menggunakan Plat Silika Terimmobilisasi Ferri Ammonium Sulfat

Penyakit merupakan perubahan-perubahan pada individu yang menyebabkan parameter kesehatan mereka di bawah kisaran normal atau jika beberapa struktur dan fungsi tubuh menyimpang dari normal sampai pada suatu keadaan berupa rusak. Penyakit ada yang disebabkan oleh faktor keturunan atau bawaan, dimana penyakit tersebut merupakan kelainan yang diwariskan dari orang tua kepada anaknya juga dapat dipicu oleh lingkungan dan gaya hidupnya.

Salah satu dari penyakit bawaan ialah *phenylketonuria*. *Phenylketonuria* ialah suatu penyakit keturunan yang disebabkan karena orang tidak maksimal merubah asam amino fenilalanin menjadi tirosin. *Phenylketonuria* merupakan salah satu penyakit keturunan yang dibawa oleh pembawa sifat (orang tua), maka perlu dilakukan pendeteksian sejak awal dari kondisi riwayat kedua orang tua apakah penderita PKU atau *carrier*. Allah Swt berjanji bahwa dalam kesulitan pasti ada kemudahan sesuai dengan firman-Nya dalam surat al-Insyirah ayat 5 – 6:

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ۝ إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ۝ ٦١

Artinya: “Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan”. (Q.S al-Insyirah: 5-6)

Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan pendeteksian penyakit *phenylketonuria* sejak dini dengan mencari metode yang tepat dalam penentuan fenilpiruvat dalam urin yang nantinya dapat diaplikasikan dalam masyarakat umum. Pendeteksian dini penyakit PKU ini merupakan salah satu usaha manusia untuk mengetahui seberapa jauh akibat dari penyakit ini, dimana mencegah lebih baik untuk meminimalisir PKU. Setiap manusia akan diuji oleh Allah sesuai

dengan kemampuan masing-masing, dan Allah pulalah yang akan mengangkat penyakit tersebut.

PKU merupakan penyakit yang disebabkan faktor alel resesif autosomal, dimana kedua orang tua yang mempunyai gen abnormal pembawa PKU dapat menurunkan penyakit PKU pada keturunannya. Asupan makanan yang dikonsumsi oleh ibu sangat berpengaruh terhadap perkembangan genetik janin, selain itu, ibu juga harus mengontrol asupan makanan untuk deteksi awal asam amino fenilalanin secara maksimal.

Allah semata yang memberikan kesembuhan, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam memberikan kesembuhan. Oleh karena itu, wajib bagi kita memiliki keyakinan yang mantap bahwasanya tidak ada yang mampu menyembuhkan kecuali Allah. Keimanan dan keyakinan hanya Allah yang dapat menyembuhkan segala penyakit bukan berarti menjadi penghalang seorang hamba untuk melakukan pengobatan. Terdapat banyak hadits dari Nabi Saw. tentang perintah untuk berobat dan penyebutan tentang obat-obat yang bermanfaat. Hal tersebut tidaklah bertentangan dengan tawakal seseorang kepada Allah dan keyakinan bahwasanya kesembuhan berasal dari Allah Swt. Sebagaimana telah di jelaskan pada Q.S asy Syu'araa ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

Artinya:

“dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku”. (Q.S. asy Syu'araa: 80)

Perlu diketahui, bahwa Allah menurunkan segala penyakitnya tanpa menjelaskan secara terperinci mengenai jenis penyakitnya dan Allah menurunkan obatnya tanpa menyebutkan detail apa obatnya dan bagaimana

memakainya. Masalah ini haruslah dikerjakan oleh manusia dengan akal, ilmu dan penyelidikan yang sekarang dinamai “science” bersama teknologinya.

Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan kadar dan ukuran tertentu, begitupun dengan obat yang dibuat oleh manusia pasti ada kadar yang harus disesuaikan sehingga bermanfaat bagi makhluk hidup. Hal ini dijelaskan dalam Q.S. al-Furqon ayat 2,

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

Artinya:

“Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu baginya dalam kekuasaan(Nya), dan dia Telah menciptakan segala sesuatu, dan dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya.” (Q.S. Al Furqon: 2)

Kata *qaddara* berarti kadar tertentu yang tidak bertambah atau berkurang, atau berarti kuasa, atau berarti ketentuan dari sistem yang ditetapkan terhadap segala sesuatu. Ayat ini menyangkut pengaturan Allah SWT serta keseimbangan yang dilakukan-Nya antar makhluk. Artinya tidak ada satu pun ciptaan-Nya yang bernilai sia-sia sebab semuanya memiliki potensi yang sesuai dengan kadar yang cukup (Shihab, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian ini, diperoleh bahwa PEG (Polietilen glikol) dan EDTA (Etilendiamintetraasetat) berpengaruh untuk analisis fenilpiruvat pada urin, yaitu dengan ditunjukkannya warna hijau yang terbentuk pada plat silika gel. Perubahan warna plat silika dari kuning menjadi hijau pada plat silika gel terimmobil reagen identifikasi mulai tampak pada konsentrasi natrium fenilpiruvat 100 ppm.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Panjang gelombang optimum kompleks Fe-Fenilpiruvat adalah 630 nm. Konsentrasi optimum reagen Ferri Ammonium Sulfat (FAS), PEG dan EDTA untuk bereaksi dengan fenilpiruvat secara spektrofotometri UV-Vis dalam penelitian ini adalah FAS 7000 ppm, PEG 700 ppm, dan EDTA 700 ppm.
2. Konsentrasi fenilpiruvat pada pelarut air dan pelarut urin bayi sehat yang dapat merubah warna dari kuning menjadi hijau pada plat silika gel terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat yaitu 100 ppm.

5.2 Saran

Disarankan perlu adanya penelitian lanjutan untuk melengkapi dan menyempurnakan penelitian ini sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan pengujian langsung terhadap popok bayi dengan menggunakan alat deteksi yang lebih akurat dan bagus daripada plat silika.
2. Plat silika gel terimmobilisasi reagen identifikasi fenilpiruvat perlu diujikan pada bayi yang baru lahir dan terutama pada bayi penderita *phenylketonuria*.
3. Perlu dilakukan pencampuran larutan antara Fe^{2+} dengan fenilpiruvat dan Fe^{3+} dengan fenilpiruvat untuk dibandingkan warna yang terbentuk.
4. Perlu dilakukan dengan menggunakan media lain seperti kertas Whatman, alumina, gelatin, dan sebagainya.
5. Perlu ditambahkan senyawa lain yang digunakan untuk menghambat Fe^{3+} .

DAFTAR PUSTAKA

- Alberty, R.A., dan F. Daniel. 1938. *Kimia Fisika Jilid I*. Jakarta: Airlangga
- Aryani, F. 2013. *Gangguan Metabolisme*. Bandung: Politeknik Piksi Ganesha
- Bettelheim, A. Frederick dan Landesberg, M. Joseph. 2004. *Laboratory Experiments for General, Organic and Biochemistry Fifth Edition*. Canada: Adelphi University Canada
- Brunner dan Suddarth. 2002. *Buku Ajar Keperawatan Medikal-Bedah Brunner dan Suddarth*. Jakarta: EGC
- Buhani dkk. 2009. Hibrida Amino-silika dan Merkpto-silika sebagai Adsorben untuk Adsorpsi Ion Cd(II) dalam Larutan. *Indo, J, Chem*, 9 (2): 170-176
- Centerwall, R. W. dkk. 1959. Phenylketonuria: Screening Programs and Testing Methods. *A.J.P.H*, 50 (11): 1667-1677
- Cotton, A. F. 1989. *Kimia Anorganik Dasar*. Jakarta: UI Press
- Craig. 1990. *Pharmaceutical Dosage Forms : Tablet*, Vol. 2, New York: Marcel Dekker Inc. 124-130, 158-183
- Clyde, D dan Selbin. 1985. *Teori Kimia Anorganik*. Terjemahan Wisnu Susetyo. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press
- Durham, S.J. dkk. 2008. Knowledge, Compliance and Serum Phenylalanine Concentration in Adolescents and Adults with Phenulketonuria and The Effect of a Patient-focused Educational Resource. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 21: 474-485
- Eastman, J.W. dkk. 2000. Use of The Phenyalanine: Tyrosine Ratio Test Newborn for Phenylketonuria in a Large Public Health Screening Programme. *Journal of Medical Screen*, 7: 131-135
- Effendi. 2010. *Spektroskopi UV-Vis Senyawa Koordinasi*. Malang: FMIPA UM
- Elitha. 2007. Petunjuk Al-Qur'an tentang Pengobatan. <http://www.elitha-eri.net/2007/11/21/petunjuk-al-quran-tentang-pengobatan>. Diakses tanggal 21 Desember 2014
- Encarta. 2004. *Encarta Encyclopedia 2005 Ed*
- Evelyn, Pearce. 1973. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: Gramedia Gramedia

- Evelyn, Pearce. 1997. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Bagian Ilmu Kesehatan Anak. 1998. *Buku Kuliah 1 Ilmu Kesehatan Anak*. Jakarta: FKUI
- Fessenden, R.J dan Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2*. Jakarta: Erlangga
- Fialova, Lenka dan Vejrazka, Martin. 2010. Urine Analysis I: Chemical Axamination, *General Medicine*, 1-9
- Fitriani, W. 2013. Metode Penentuan Fenilpiruvat pada Urin Menggunakan FeCl_3 yang Diimobilisasi pada Plat Silika Gel. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia. Fakultas Saintek. Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang
- Gandasoebrata, R. 2006. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat
- Gandjar dan Rohman. 2008. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Ganong, W.F. 2002. *Fisiologi Kedokteran*. Terjemahan Adrianto P. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Gibbs, K.N. dan Woolf, I.L. 1959. Test Phenylketonuria Results of a One-Year Programe for its Detection in Infancy and among Mental Defectives. *British Medical Journal*, 532-535
- Harris, H. 1994. *Dasar-dasar Genetika Biokemis Manusia*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press
- Harjadi, W. 1993. *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Jakarta: Erlangga
- Ibnu Gholib. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Kalat, J. W. 1984. *Biological Psychology* 2nd edition. California: Wadsworth Publishing Company
- Kaufman, Seymour., dkk. 1975. Phenylketonuria Due to a Deficiency of Dihydropteridine Reductase. *Chemistry*, Vol.293(16)
- Kee, L. J. 1997. *Pemeriksaan Laboratorium dan Diagnostik dengan Implikasi Keperawatan Edisi 2*. Jakarta: EGC
- Kiba, N., Itagaki, A and Furusawa, M. 1997. Determination of L-Phenylalanine in Serum by Flow Injection Analysis Using Immobilized Phenylalanine Dehydrogenase and Flourometric Detection. *Talanta*, 44 (1): 131-134

- Khopkar, S. M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press
- Kusnanto. 2007. Sorpsi Zat Warna Remazol Yellow FG oleh Hydrotalcite Like (Mg/Al-HTLc). *Skripsi*. Surakarta: FMIPA UNS Surakarta
- Kuswandi, B. 2010. *Sensor*. Jember: Universitas Jember Press
- Lee, Hwashim, Park Sangryoul and Lee Gaeho. 2005. Determination of Phenylalanine in Human serum by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 20: 1913-1917
- Lee, Hwashim, Park Sangryoul and Lee Gaeho. 2006. Determination of Phenylalanine in Human serum by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 20: 1913-1917
- Lemanska, D.T., Otarzewski, M and Kostyk, E. 2000. Measurement of Phenylalanine in Blood on Filter Paper as Method of Monitoring PKU Treatment. *Journal Medical Screen*, 9: 64-66
- Lemanska, D.T., Otarzewski, M and Kostyk, E. 2002. Measurement of Phenylalanine in Blood on Filter Paper as Method of Monitoring PKU Treatment. *Journal Medical Screen*, 9: 64-66
- Leuner., C and Dressman., J. 2000. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 47-60
- Linder, C. Maria. 2006. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian secara Klinis*. Jakarta: UI-Press
- Martin, Alfred. 1993. *Farmasi Fisik Jilid I Edisi III*. Jakarta: UI Press
- Montgomery, Rex., Conway, W. Thomas dan Spector, A. Arthur. 1993. *Biokimia Berorientasi pada Kasus Klinis*. Jakarta: Binarupa Aksara
- Nofemmy, Zahra. 2013. Pengaruh EDTA (Etilendiamintetraasetat) Sebagai Pengkhelat FeCl₃ Untuk Analisis Fenilpiruvat Pada Urin. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Novyanti, L. 2011. Sintesis Katalis Adsorber Besi(III)EDTA. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bandung: Jurusan Kimia. FMIPA. Universitas Pendidikan Indonesia
- Oscik, J. 1982. *Adsorption*. New York: John Wiley & Sons.

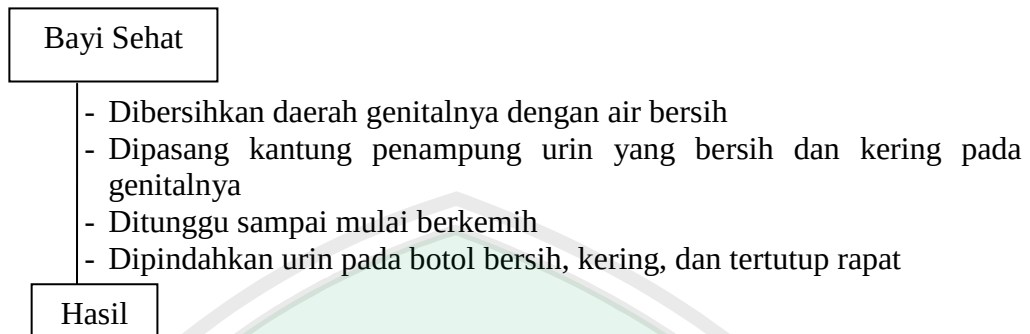
- Raymond, Chang. 2006. *Kimia Dasar: Konsep-konsep Inti Jilid I*. Jakarta: Erlangga
- Reynolds, T.D., dan Paul, A.R. 1995. *Unit Operations And Processes In Environmental Engineering*. Boston: PWS Publishing Company
- Rival, Harrizul. 1995. *Asas Pemeriksaan Kimia*. Jakarta: UI Press
- Saifer, Abraham dan Harris, F. Alfred. 1959. Studies on the Photometric Determination of Phenylpyruvic Acid in Urine. *Clinical Chemistry*, 5 (3): 203-217
- Sastrohamidjojo, Hardjono. 1991. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta
- Sastrohamidjojo, Hardjono. 1995. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta
- Setyaningrum, Mega Virleenda. 2011. Peningkatan Fluoresensi pada Komposit Europium Trietilena Glikol Pikrat/Polimetilmetakrilat untuk Aplikasi Fotosensor. *Skripsi*. Jakarta: FT UI Jakarta
- Setyawati, dan Irminda. 2010. Sintesis dan Karakteristik Senyawa Kompleks Besi(III)EDTA. *Prosiding Seminar Nasional Sains 2010 "Optimalisasi Sains untuk Memperdayakan Manusia"*
- Setiwan. 2010. *Terjemahan Kimia Anorganik Teori Clyde and Joel*. Yogyakarta: UGM Press
- Sharlin, Judith dan Edelstein, Sari. 2010. *Essentials of Life cycle Nutrition*. New York: David Cella
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Shihabi, Z.K. dan Summer, G.K. 1970. Determination of Serum and Urinary Phenylalanine by Gas Chromatography. *Clinical Chemistry*, 19 (5): 496-498
- Shihabi, Z.K. dan Summer, G.K. 1973. Determination of Serum and Urinary Phenylalanine by Gas Chromatography. *Clinical Chemistry*, 19 (5): 496-498
- Sholecha, D.I. dan Kuswandi, B. 2002. Penentuan Cu (II) dalam Sampel Air Secara Spektrofotometri Berbasis Reagen Kering TAR/PVC. *Jurnal Ilmu Dasar FMIPA Universitas Jember*, volume 3
- Sigma. 2011. Safety Data Sheet Sodium Phenylpyruvate. <http://www.sigma-aldrich.com/sodiumphenylpyruvate.html>. Diakses tanggal 5 Oktober 2014.

- Solihat, U. 2004. *Analisis Kromatografi Tipis dan Kromatografi Kertas*. Bandung: Dinas Pendidikan Program Analisis Kimia
- Sobotka, Harry dan Stewart C.P. 1963. *Advances in Clinical Chemistry Volume 6*. Amerika: Academic Press Inc
- Suryo. 2003. *Genetika Manusia*. Yogyakarta: UGM Press
- Suryo. 2005. *Genetika Strata I*. Yogyakarta: UGM Press
- Tagliaro, F. 1994. Capillary Zone Electrophoresis Determination of Phenylalanine in Serum: a Rapid, Inexpensive and Simple Method for The Diagnosis of Phenylketonuria. *Journal Electrophoresis*, volume 15: 94-7
- Vallian, S dan Moeini, H. 2006. Quantitative Bacterial Micro-Assay for Rapid Detection of Serum Phenylalanine on Dry Blood-Spot: Application in Phenylketonuria Screening. *Clinical Chemistry*, 44 (1): 76-9
- Veneziano, Maria. 2008. *Analytical Methods Development for the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism*. Napoli Federico: Indirizzo Biotechnologie Mediche Universita di Napoli Federico II
- Wirawan, R., Immanuel, S., dan Dharma, R. 2008. *Penilaian Hasil Pemeriksaan Hematologi Rutin*. Jakarta: Patologi Klinik FKUI/RSCM
- Zhao, Zhiwei dan Jiang. 2010. Phenylketonuria: a Review. *Postgraduate Medical Journal*, 46: 430-446

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir

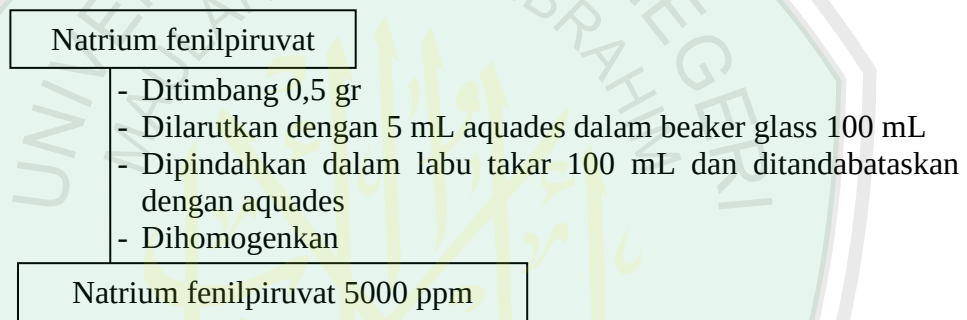
1. Preparasi sampel urin



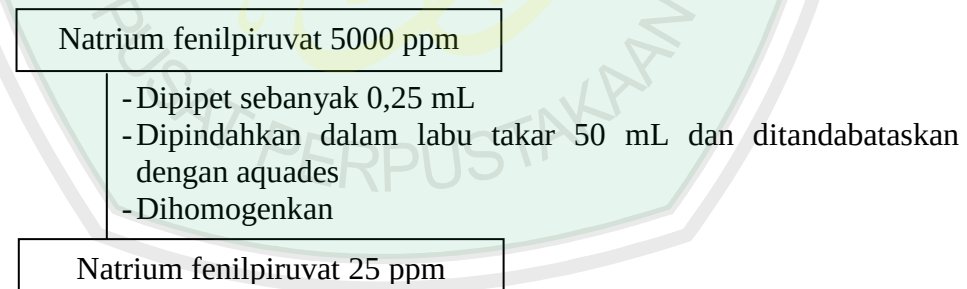
2. Preparasi bahan

a. Pembuatan Larutan Natrium Fenilpiruvat

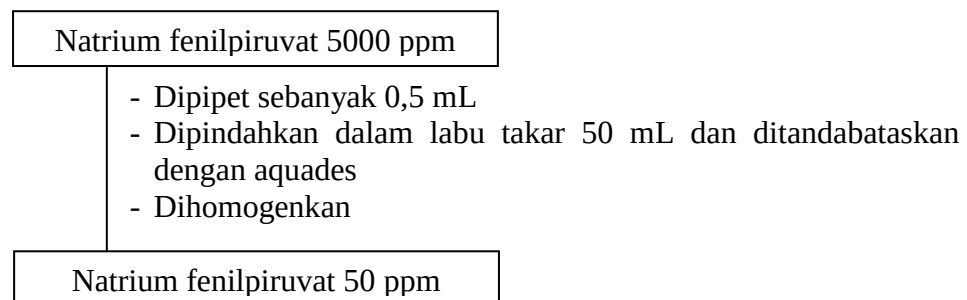
• Pembuatan Larutan Stok Natrium Fenilpiruvat 5000 ppm



• Pembuatan Larutan Standar Natrium Fenilpiruvat 25 ppm sebanyak 50 mL dari Larutan Standar Natrium Fenilpiruvat 5000 ppm



• Pembuatan Larutan Standar Natrium Fenilpiruvat 50 ppm sebanyak 50 mL dari Larutan Standar Natrium Fenilpiruvat 5000 ppm



Catatan: Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm sebanyak 50 mL

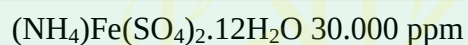
Larutan natrium fenilpiruvat (ppm)	Larutan natrium fenilpiruvat 5000 ppm (mL)
100	1
200	2
300	3
500	5
700	7
1000	10

b. Pembuatan Reagen Ferri Ammonium Sulfat

- **Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 30.000 ppm sebanyak 100 mL**



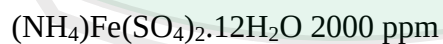
- Ditimbang 3 gr
- Dipindahkan dalam beaker glass 100 mL dan dilarutkan dengan 5 mL aquades
- Dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan ditandabatkan dengan aquades
- Dihomogenkan



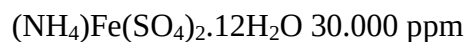
- **Pembuatan Reagen ferri ammonium sulfat 2000 ppm dari reagen ferri ammonium sulfat 30.000 ppm sebanyak 50 ml**



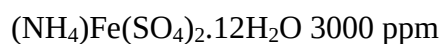
- Dipipet 3,33 mL
- Dipindahkan dalam labu takar 50 mL dan ditandabatkan dengan aquades
- Dihomogenkan



- **Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 3000 ppm dari reagen ferri ammonium sulfat 30.000 ppm sebanyak 50 ml**



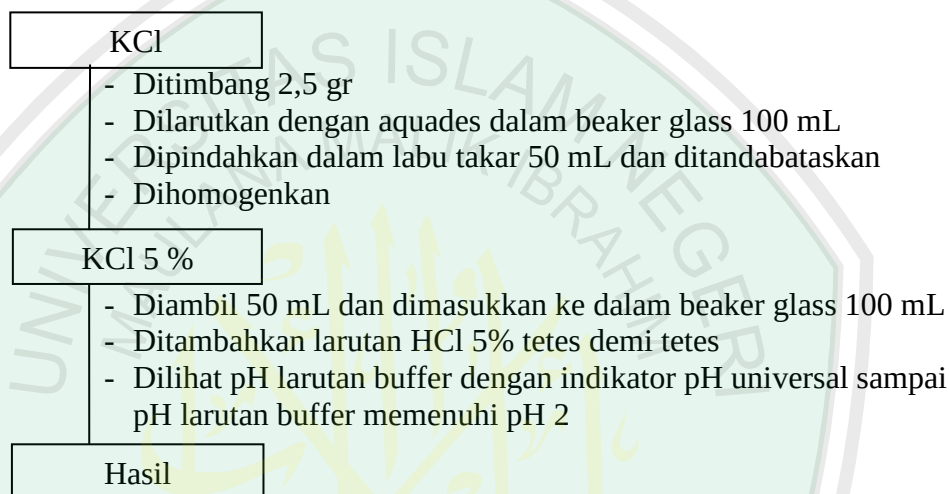
- Dipipet 5 mL
- Dipindahkan dalam labu takar 50 mL dan ditandabatkan dengan aquades
- Dihomogenkan



Catatan: Pembuatan larutan ferri ammonium sulfat 5000; 7000; 9000; 10.000; dan 20.000 ppm sebanyak 50 mL

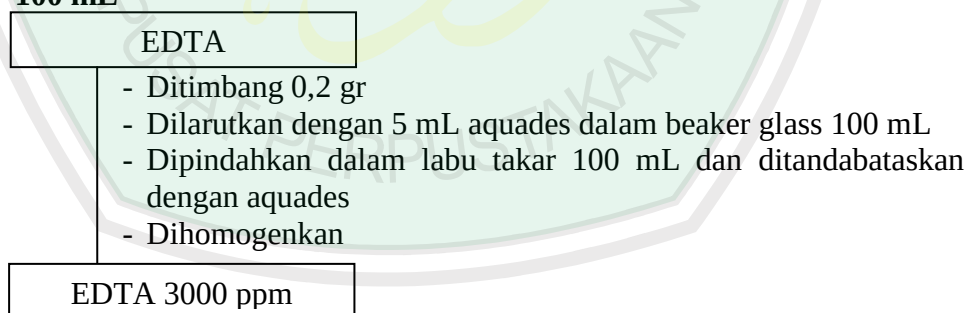
Larutan ferri ammonium sulfat (ppm)	Larutan ferri amonium sulfat 30.000 ppm (mL)
5000	8,33
7000	11,67
9000	15
10.000	16,67
20.000	33,33

c. Pembuatan Larutan Buffer KCl-HCl pH 2,3

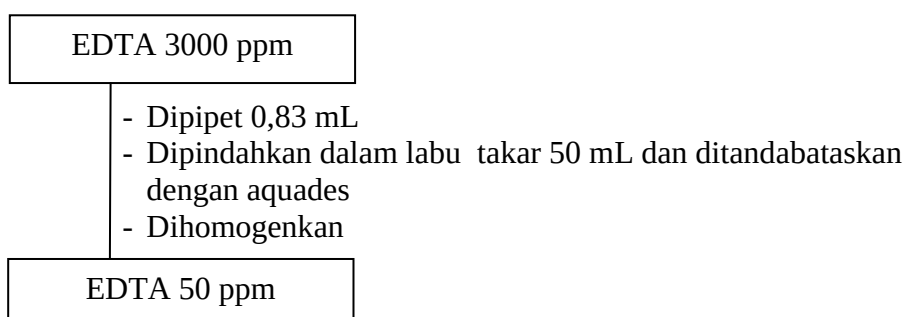


d. Pembuatan larutan Etilendiamintetraasetat (EDTA)

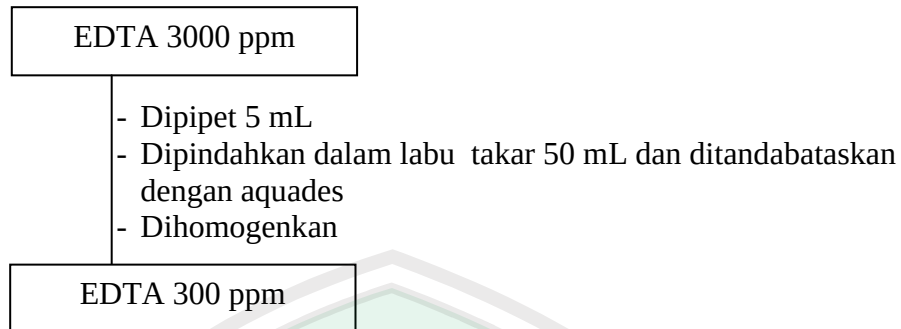
- **Pembuatan larutan EDTA 3000 ppm sebagai larutan stok sebanyak 100 mL**



- **Pembuatan larutan EDTA 50 ppm dari larutan EDTA 3000 ppm sebanyak 50 mL**



- **Pembuatan larutan EDTA 300 ppm dari larutan EDTA 3000 ppm sebanyak 50 mL**

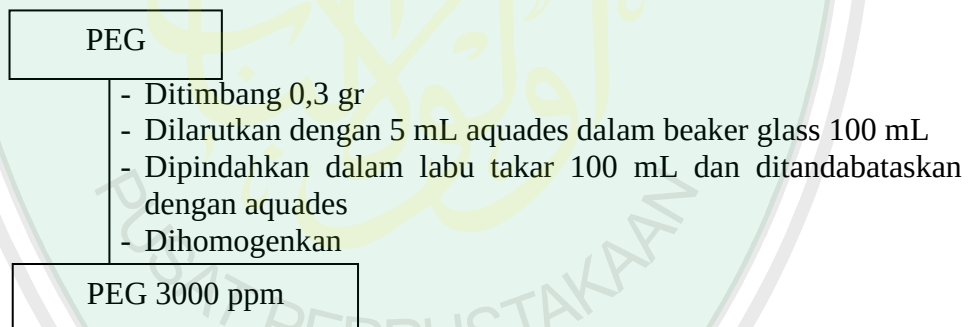


Catatan: Pembuatan larutan EDTA 500; 700; 1000; dan 2000 ppm sebanyak 50 mL

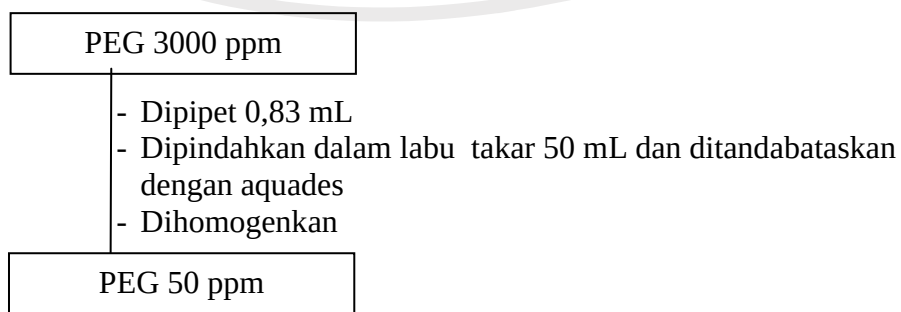
Larutan EDTA (ppm)	Larutan EDTA 3000 ppm (mL)
500	8,33
700	11,67
1000	15
2000	16,67

e. Pembuatan larutan Polietilen glikol (PEG)

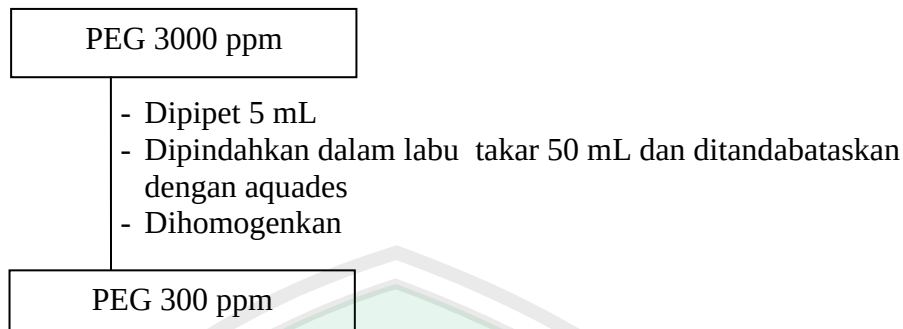
- **Pembuatan larutan PEG 3000 ppm sebagai larutan stok sebanyak 100 mL**



- **Pembuatan larutan PEG 50 ppm dari larutan PEG 3000 ppm sebanyak 50 mL**



- **Pembuatan larutan PEG 300 ppm dari larutan PEG 3000 ppm sebanyak 50 mL**

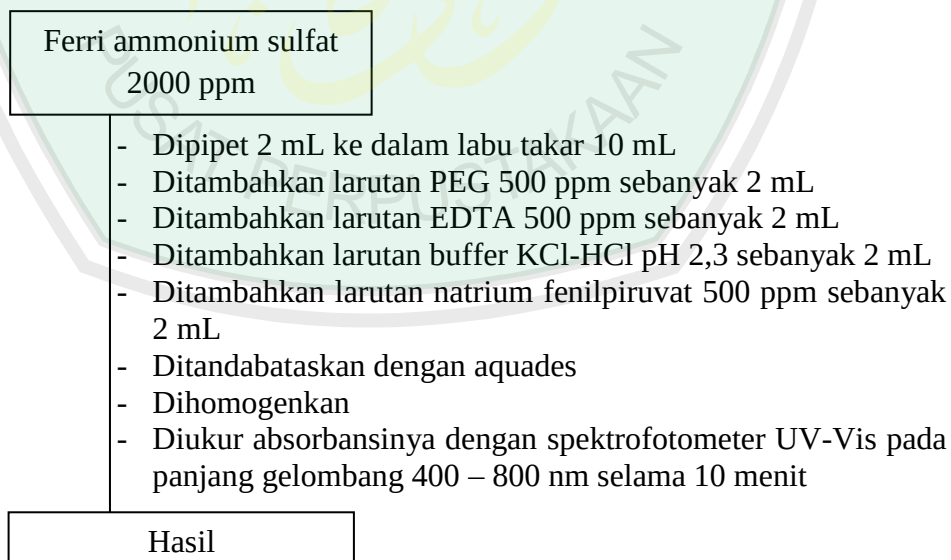


Catatan: Pembuatan larutan PEG 500; 700; 1000; dan 2000 ppm sebanyak 50 mL

Larutan PEG (ppm)	Larutan PEG 3000 ppm (mL)
500	8,33
700	11,67
1000	15
2000	16,67

3. Penentuan Kondisi Optimum Reaksi Fenilpiruvat dengan Ion Ferri menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

a. Penentuan Panjang Gelombang Optimum Kompleks Fe-Fenilpiruvat (Fe-P_{P3})



b. Penentuan Waktu Kestabilan Kompleks Fe-Fenilpiruvat

Ferri amonium sulfat 2000 ppm	- Dipipet 2 mL ke dalam labu takar 10 mL - Ditambahkan larutan PEG 500 ppm sebanyak 2 mL - Ditambahkan larutan EDTA 500 ppm sebanyak 2 mL - Ditambahkan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sebanyak 2 mL - Ditambahkan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm sebanyak 2 mL - Ditandabatkan dengan aquades - Dihomogenkan - Waktu kestabilan larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis selama 15 menit, dan dibuat kurva perbandingan antara absorbansi dan waktu
Hasil	

c. Penentuan Konsentrasi Terbaik Reagen Ferri Ammonium Sulfat yang bereaksi dengan Fenilpiruvat

Ferri ammonium sulfat 2000 ppm	- Dipipet 2 mL ke dalam labu takar 10 mL - Ditambahkan larutan PEG 500 ppm sebanyak 2 mL - Ditambahkan larutan EDTA 500 ppm sebanyak 2 mL - Ditambahkan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sebanyak 2 mL - Ditambahkan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm sebanyak 2 mL - Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan - Diukur absorbansinya dengan spektrofotometri uv-vis pada panjang gelombang optimum - Prosedur di atas diulangi dengan larutan ferri amonium sulfat 5000; 7000; 9000; 10.000; dan 20.000 ppm - Diidentifikasi absorbansi terukur menggunakan konsentrasi natrium fenilpiruvat 500 ppm, larutan PEG 500 ppm, larutan EDTA 500 ppm, dan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sehingga diperoleh konsentrasi terbaik larutan ferri amonium sulfat - Diulangi prosedur di atas sebanyak tiga kali
Hasil	

d. Penentuan Konsentrasi Terbaik Reagen PEG dan EDTA terhadap Reaksi Fe-Fenilpiruvat

• Variasi konsentrasi PEG

Ferri amonium sulfat
konsentrasi terbaik

- Dipipet 2 mL ke dalam labu takar 10 mL
- Ditambahkan larutan PEG 50 ppm sebanyak 2 mL
- Ditambahkan larutan EDTA 500 ppm sebanyak 2 mL
- Ditambahkan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sebanyak 2 mL
- Ditambahkan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm sebanyak 2 mL
- Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometri uv-vis pada panjang gelombang optimum
- Prosedur di atas diulangi dengan reagen PEG 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm
- Diulangi prosedur di atas sebanyak tiga kali

Hasil

• Variasi konsentrasi EDTA

Ferri ammonium sulfat
konsentrasi terbaik

- Dipipet 2 mL ke dalam labu takar 10 mL
- Ditambahkan larutan PEG pada konsentrasi terbaik sebanyak 2 mL
- Ditambahkan larutan EDTA 50 ppm sebanyak 2 mL
- Ditambahkan larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 sebanyak 2 mL
- Ditambahkan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm sebanyak 2 mL
- Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan
- Diukur absorbansinya dengan spektrofotometri uv-vis pada panjang gelombang optimum
- Prosedur di atas diulangi dengan reagen EDTA 300; 500; 700; 1000; dan 2000 ppm
- Diulangi prosedur di atas sebanyak tiga kali

Hasil

4. Immobilisasi larutan ferri ammonium sulfat, PEG, EDTA dan Larutan Buffer KCl-HCl pada Plat Silika untuk Identifikasi Fenilpiruvat (Fitriani, 2013)

Reagen Identifikasi
Fenilpiruvat

- Ferri ammonium sulfat pada konsentrasi terbaik, PEG pada konsentrasi yang terbaik, EDTA pada konsentrasi yang terbaik, larutan buffer KCl-HCl pH 2,3 dengan perbandingan volume 1:1:1:1 sebanyak 30 mL, serta plat silika ukuran 2x2 cm
- Diimmobilisasikan reagen identifikasi fenilpiruvat ke atas fasa diam plat silika ukuran 2x2 cm dengan direndam selama 30 menit
- Dikeringkan plat silika yang terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat dengan dioven pada suhu 35 °C selama 10 menit
- Ditetesi plat silika dengan setetes sampel larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm pada pelarut air

Hasil

5. Performansi Reagen Identifikasi Fenilpiruvat terhadap Plat Silika

Plat silika terimmobil

- Ditetesi dengan setetes sampel larutan natrium fenilpiruvat 50; 100; 300; 500; 700; dan 1000 ppm pada pelarut air
- Diidentifikasi plat dengan mengamati bercak warna yang terbentuk, kejelasan, dan kestabilan bercak warna yang terbentuk
- Reagen identifikasi fenilpiruvat akan membentuk warna hijau dengan fenilpiruvat

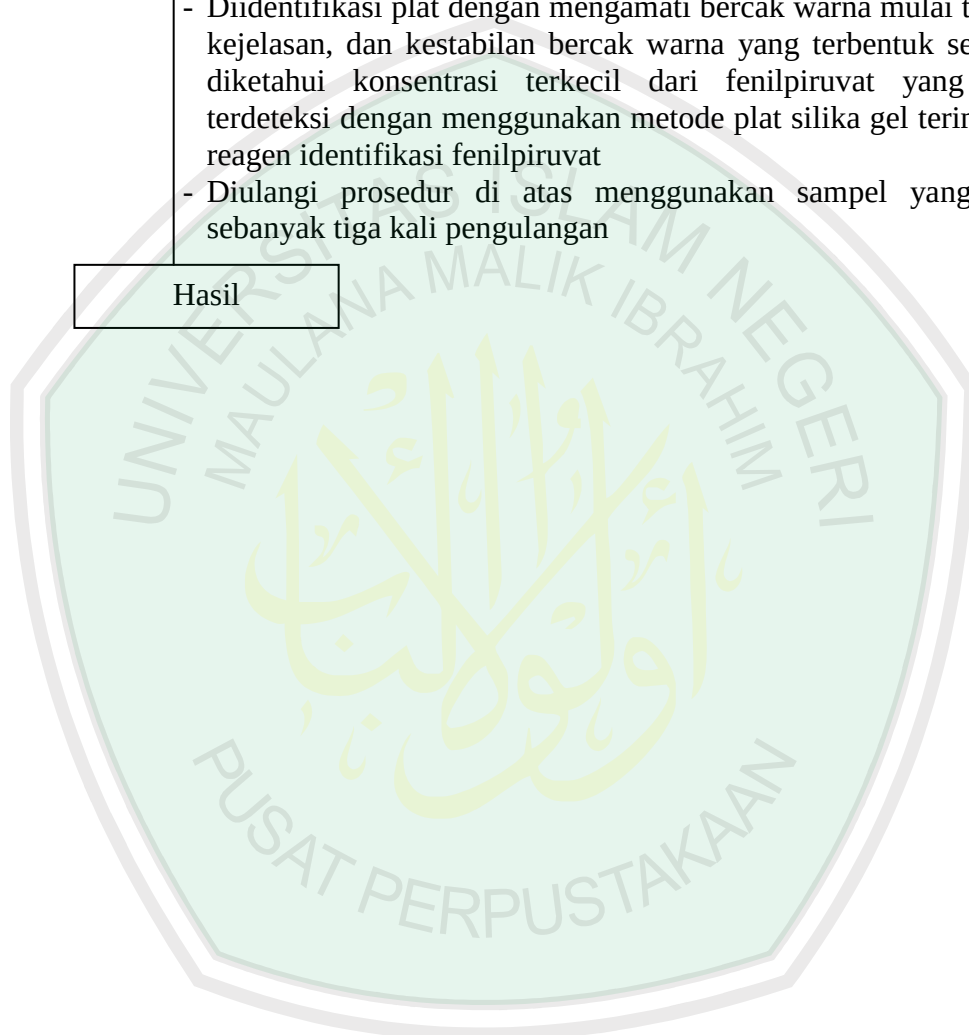
Hasil

6. Pengujian Plat Silika terimmobilisasi terhadap sampel

Plat silika yang terimmobilisasi

- Ditetesi dengan larutan natrium fenilpiruvat dengan konsentrasi 25; 50; 100; 200; 300; 500; 700; dan 1000 ppm dalam pelarut air dan pelarut urin bayi sehat
- Plat didiamkan kira-kira selama 5 menit
- Diidentifikasi plat dengan mengamati bercak warna mulai terlihat, kejelasan, dan kestabilan bercak warna yang terbentuk sehingga diketahui konsentrasi terkecil dari fenilpiruvat yang dapat terdeteksi dengan menggunakan metode plat silika gel terimmobil reagen identifikasi fenilpiruvat
- Diulangi prosedur di atas menggunakan sampel yang sama sebanyak tiga kali pengulangan

Hasil



Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Bahan

1. Pembuatan Larutan Natrium Fenilpiruvat

- Pembuatan larutan stok natrium fenilpiruvat 5000 ppm dalam 100 mL

$$5000 \text{ ppm} = 5000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$5000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{5 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,5 \text{ gr}}{100 \text{ mL}}$$

Natrium fenilpiruvat ditimbang sebanyak 0,5 gr dalam 100 mL.

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 25 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\ &= \frac{50 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\ &= 0,25 \text{ mL} \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 50 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\ &= \frac{50 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\ &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 100 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\ &= \frac{50 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\ &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 200 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\ &= \frac{50 \text{ mL} \times 200 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\ &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 300 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\ &= \frac{50 \text{ mL} \times 300 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\ &= 3 \text{ mL} \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 500 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\ &= \frac{50 \text{ mL} \times 500 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} = 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 700 ppm dalam 50 mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\
 &= \frac{50 \text{ mL} \times 700 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\
 &= 7 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- Pembuatan larutan natrium fenilpiruvat 1000 ppm dalam 50 mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\
 &= \frac{50 \text{ mL} \times 1000 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \\
 &= 10 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

2. Pembuatan Reagen Identifikasi Fenilpiruvat

a. Pembuatan Reagen Ferri Ammonium Sulfat

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 30.000 ppm sebagai stok

$$\begin{aligned}
 30.000 \text{ ppm} &= 200 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\
 30.000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} &= \frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{3 \text{ gr}}{100 \text{ mL}}
 \end{aligned}$$

Ferri ammonium sulfat ditimbang sebanyak 3 gr dalam 100 mL.

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 2000 ppm dalam 50 mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\
 &= \frac{50 \text{ mL} \times 2000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}} \\
 &= 3,33 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 3000 ppm dalam 50 mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\
 &= \frac{50 \text{ mL} \times 3000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}} \\
 &= 5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 5000 ppm dalam 50 mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1} \\
 &= \frac{50 \text{ mL} \times 5000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}} \\
 &= 8,33 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 7000 ppm dalam 50 mL

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 &= \frac{V_2 \times M_2}{M_1}
 \end{aligned}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 7000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}}$$

$$= 11,67 \text{ mL}$$

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 9000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 9000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}}$$

$$= 15 \text{ mL}$$

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 10.000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 10.000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}}$$

$$= 16,67 \text{ mL}$$

- Pembuatan reagen ferri ammonium sulfat 20.000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 20.000 \text{ ppm}}{30.000 \text{ ppm}}$$

$$= 33,33 \text{ mL}$$

b. Pembuatan Larutan Polietilen glikol (PEG)

- Pembuatan larutan PEG 3000 ppm sebagai stok

$$3000 \text{ ppm} = 3000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$3000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{3 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,3 \text{ gr}}{100 \text{ mL}}$$

PEG ditimbang sebanyak 0,3 gr dalam 100 mL.

- Pembuatan larutan PEG 50 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,83 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan PEG 300 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 300 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 5 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan PEG 500 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 500 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 8,33 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan PEG 700 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 700 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 11,67 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan PEG 1000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 1000 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 16,67 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan PEG 2000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 2000 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 33,33 \text{ mL}$$

c. Pembuatan Larutan Etilendiamintetraasetat (EDTA)

- Pembuatan larutan EDTA 3000 ppm sebagai stok

$$3000 \text{ ppm} = 3000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$3000 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{3 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,3 \text{ gr}}{100 \text{ mL}}$$

EDTA ditimbang sebanyak 0,3 gr dalam 100 mL.

- Pembuatan larutan EDTA 50 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 0,83 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan EDTA 300 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 300 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 5 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan EDTA 500 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 500 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 8,33 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan EDTA 700 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 700 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 11,67 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan EDTA 1000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 1000 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 16,67 \text{ mL}$$

- Pembuatan larutan EDTA 2000 ppm dalam 50 mL

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times M_2}{M_1}$$

$$= \frac{50 \text{ mL} \times 2000 \text{ ppm}}{3000 \text{ ppm}}$$

$$= 33,33 \text{ mL}$$

d. Pembuatan Larutan Buffer KCl-HCl pH 2,0

- Dibuat KCl 5 % dalam 50 mL.

$$\text{Massa} = \frac{5}{100} \times 50 \text{ mL}$$

$$= 2,5 \text{ gr}$$

Ditimbang KCl sebanyak 2,5 gr dalam 50 mL.

- Pembuatan larutan HCl 5 %

Mengencerkan dari larutan HCl 32 %

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{M_2 \times V_2}{M_1}$$

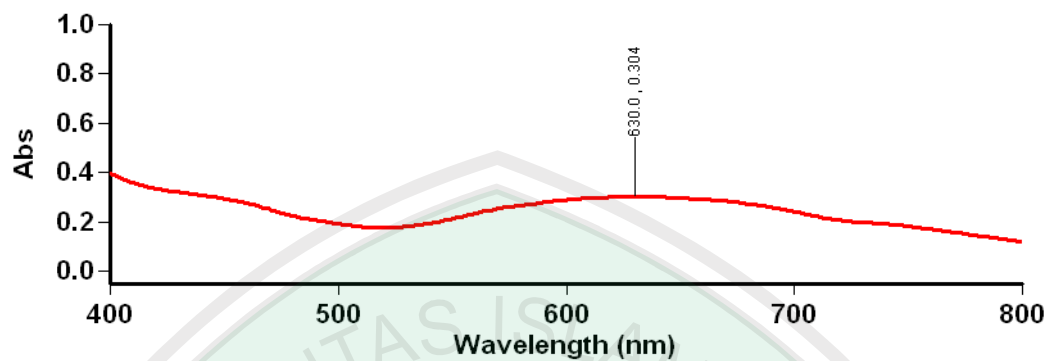
$$= \frac{5 \% \times 10 \text{ mL}}{32 \%}$$

$$= 1,6 \text{ mL}$$

- Pembuatan buffer KCl-HCl pH 2,3

Larutan KCl 5 % ditetesi dengan larutan HCl 5 % sedikit demi sedikit hingga pH larutan menjadi 2,3.

Lampiran 3. Spektrum Panjang Gelombang Optimum kompleks Fe-fenilpiruvat (Fe-PP₃)



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 01 Apr 10:04:00 AM 2015
 Method:
 Batch: D:\Dzurrotun Husna\Lamdha Maks Phenyl Piruvat (01-04-2015).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: Phenyl Piruvat

Collection Time 4/1/2015 10:05:02 AM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.0nm to 400.1nm

Wavelength (nm)	Abs
630.0	0.304

Lampiran 4. Hasil Penentuan Waktu Optimum Pembentukan Kompleks Fe-Fenilpiruvat

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh nilai absorbansi dari masing-masing waktu pengukuran, sebagai berikut:

Variasi Waktu	Absorbansi
1 menit	0,2242
2 menit	0,3459
3 menit	0,4158
4 menit	0,4574
5 menit	0,4798
6 menit	0,4888
7 menit	0,4900
8 menit	0,4851
9 menit	0,4766
10 menit	0,4669
11 menit	0,4414
12 menit	0,4329
13 menit	0,4137
14 menit	0,4000
15 menit	0,3853

Lampiran 5. Hasil Jumlah Konsentrasi Terbaik Reagen FAS, PEG, dan EDTA

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh konsentrasi terbaik FAS adalah:

Konsentrasi FAS (ppm)	Absorbansi			Rerata Absorbansi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	
2000	0,2723	0,2650	0,2863	0,2745
5000	0,5083	0,4273	0,4490	0,4615
7000	0,5277	0,4925	0,5419	0,5207
9000	0,4960	0,4914	0,5068	0,4981
10000	0,4983	0,4695	0,4671	0,4783
20000	0,4444	0,4647	0,4614	0,4568

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh konsentrasi terbaik PEG (Polietilen Glikol) adalah:

Konsentrasi PEG (ppm)	Absorbansi			Rerata Absorbansi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	
50	0,5277	0,5339	0,5483	0,5366
300	0,5466	0,5466	0,5539	0,5670
700	0,5651	0,5598	0,5950	0,5733
1000	0,5577	0,5398	0,5637	0,5537
2000	0,5507	0,5120	0,5973	0,5533

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh konsentrasi terbaik EDTA (Etilendiaminatetraasetat) adalah:

Konsentrasi EDTA (ppm)	Absorbansi			Rerata Absorbansi
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	
50	0,6563	0,6296	0,6054	0,6304
300	0,6353	0,6373	0,6364	0,6363
700	0,6518	0,6581	0,6671	0,6590
1000	0,6007	0,5917	0,5807	0,5910
2000	0,5665	0,5223	0,5358	0,5415

Lampiran 6. Uji Statistika Pengaruh Polietilen Glikol (PEG) dan Etilendiaminatetraasetat (EDTA) Terhadap Kompleks Fe-fenilpiruvat

1. Hasil absorbansi pengaruh PEG terhadap reagen FAS dan fenilpiruvat

Perlakuan Polietilen Glikol	Absorbansi pada FAS Maximum			Jumlah perlakuan	Rataan perlakuan
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
50	0,5277	0,5339	0,5483	1,6099	0,5366
300	0,5466	0,5466	0,5539	1,6263	0,5670
700	0,5651	0,5598	0,5950	1,7199	0,5733
1000	0,5577	0,5398	0,5637	1,6612	0,5537
2000	0,5507	0,5120	0,5973	1,66	0,5533
Jumlah ulangan (R)	2,6733	2,7021	2,7332		
Jumlah umum (G)				8,1086	
Rataan umum					2,7029

1. Derajat Bebas (db)

- db umum = $(r.t) - 1 = (5.3) - 1 = 14$
- db ulangan = $r - 1 = 3 - 1 = 2$
- db perlakuan = $t - 1 = 5 - 1 = 4$
- db galat = $(r - 1) (t - 1) = (2) (4) = 8$

2. Jumlah Kuadrat (JK)

$$F.K = \frac{G^2}{r.t} = \frac{(8,1086)^2}{3 (5)} = 4,383$$

$$\begin{aligned}
 JK \text{ umum} &= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r X_{ij}^2 - F.K \\
 &= 0,5277^2 + (0,5339)^2 + (0,5483)^2 + \dots + (0,5973)^2 - 4,383 \\
 &= 4,394 - 4,383 = 0,011
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JK \text{ ulangan} &= \frac{\sum_{j=1}^r R_j^2}{t} - F.K \\
 &= \frac{(2,7478)^2 + (2,6921)^2 + (2,8582)^2}{5} - 4,383 \\
 &= 4,383 - 4,383 = 0
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK perlakuan} &= \frac{\sum_{i=1}^r T_i^2}{r} - F.K \\
 &= \frac{(1,6099)^2 + (1,6263)^2 + (1,7199)^2 + (1,6612)^2 + (1,66)^2}{3} - 4,383 \\
 &= 4,393 - 4,383 = 0,01
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat} &= \text{JK umum} - \text{JK ulangan} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 0,011 - 0 - 0,01 \\
 &= 0,001
 \end{aligned}$$

3. Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned}
 \text{KT ulangan} &= \frac{\text{JK ulangan}}{r-1} & \text{KT perlakuan} &= \frac{\text{JK perlakuan}}{5-1} \\
 &= \frac{0}{2} = 0 & &= \frac{0,01}{4} = 0,0025 \\
 \text{KT galat} &= \frac{\text{JK galat}}{r-1 (t-1)} \\
 &= \frac{0,001}{8} = 0,00012
 \end{aligned}$$

4. F hitung

$$\begin{aligned}
 F \text{ perlakuan} &= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT galat}} \\
 &= \frac{0,0025}{0,00012} = 20,83
 \end{aligned}$$

5. Koefisien Keragaman (KK)

$$\begin{aligned}
 \text{KK} &= \frac{\overline{\text{KT galat}}}{\text{rata-rata umum}} \times 100 \\
 &= \frac{0,00012}{2,703} \times 100 \\
 &= \frac{0,011}{2,703} \times 100 = 0,0041 \times 100 = 0,41 \%
 \end{aligned}$$

Tabel sidik ragam (RKLT)

Sumber ragam	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel
					5 %
Ulangan	2	0	0		
Perlakuan	5	0,01	0,0025	20,83	

Galat	8	0,001	0,00012		
Umum	15	0,011			

Jadi perlakuan mempunyai beda nyata karena $F_{hitung} > F_{tabel}$. Pada taraf nyata 5 % 8,70, disimpulkan bahwa percobaan ini berhasil untuk menunjukkan beda nyata diantara keempat perlakuan.

2. Hasil absorbansi pengaruh EDTA terhadap reagen FAS dan fenilpiruvat

Perlakuan EDTA	Absorbansi pada FAS Maximum			Jumlah perlakuan	Rataan perlakuan
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
50	0,6563	0,6296	0,6054	1,8913	0,6304
300	0,6353	0,6373	0,6364	1,909	0,6363
700	0,6518	0,6581	0,6671	1,977	0,6590
1000	0,6007	0,5917	0,5807	1,7731	0,5910
2000	0,5665	0,5223	0,5358	1,6246	0,5415
Jumlah ulangan (R)	3,1106	3,039	3,0254		
Jumlah umum (G)				9,175	
Rataan umum					3,058

1. Derajat Bebas (db)

- db umum $= (r.t) - 1 = (5.3) - 1 = 14$
- db ulangan $= r - 1 = 3 - 1 = 2$
- db perlakuan $= t - 1 = 5 - 1 = 4$
- db galat $= (r - 1) (t - 1) = (2) (4) = 8$

2. Jumlah Kuadrat (JK)

$$F.K = \frac{G^2}{r.t} = \frac{(9,175)^2}{5 (3)} = 5,612$$

$$\begin{aligned}
 JK \text{ umum} &= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r x_{ij}^2 - F.K \\
 &= 0,6563^2 + (0,6296)^2 + (0,6054)^2 + \dots + (0,5358)^2 - 5,612 \\
 &= 5,640 - 5,612 = 0,028
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK ulangan} &= \frac{\sum_{j=1}^r R_j^2}{t} - F.K \\
 &= \frac{(3,1106)^2 + (3,039)^2 + (3,0254)^2}{5} - 5,612 \\
 &= 5,612 - 5,612 = 0
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK perlakuan} &= \frac{\sum_{i=1}^r T_i^2}{r} - F.K \\
 &= \frac{(1,8913)^2 + (1,909)^2 + (1,977)^2 + (1,7731)^2 + (1,6246)^2}{3} - 5,612 \\
 &= 5,637 - 5,612 = 0,025
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat} &= \text{JK umum} - \text{JK ulangan} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 0,028 - 0 - 0,025 \\
 &= 0,003
 \end{aligned}$$

3. Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned}
 \text{KT ulangan} &= \frac{\text{JK ulangan}}{r-1} \\
 &= \frac{0}{2} = 0
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{KT perlakuan} &= \frac{\text{JK perlakuan}}{5-1} \\
 &= \frac{0,025}{4} = 0,006
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{KT galat} &= \frac{\text{JK galat}}{r-1 (t-1)} \\
 &= \frac{0,003}{8} = 0,00037
 \end{aligned}$$

4. F hitung

$$\begin{aligned}
 F \text{ perlakuan} &= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT galat}} \\
 &= \frac{0,006}{0,00037} = 16,22
 \end{aligned}$$

5. Koefisien Keragaman (KK)

$$\text{KK} = \frac{\sqrt{\text{KT galat}}}{\text{rata-rata umum}} \times 100$$

$$= \frac{0,00037}{3,058} \times 100$$

$$= \frac{0,019}{3,058} \times 100 = 0,0063 \times 100 = 0,63 \%$$

Tabel sidik ragam (RKLT)

Sumber ragam	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel
					5 %
Ulangan	2	0	0		
Perlakuan	5	0,025	0,006	16,22	
Galat	8	0,003	0,00037		
Umum	15	0,028			

Jadi perlakuan mempunyai beda nyata karena F hitung > F tabel. Pada taraf nyata 5 % 8,70, disimpulkan bahwa percobaan ini berhasil untuk menunjukkan beda nyata diantara keempat perlakuan.