



Analisa Karboksihemoglobin Dalam Sampel Biologis

ap

AYU PUSPITASARI, ST, M.Si

Dipresentasikan untuk acara Bedah Modul Toksikologi oleh AIPTLMI

MODUL PRAKTIKUM TOKSIKOLOGI

*Bagi Mahasiswa Prodi Teknologi
Laboratorium Medik*

Disusun Oleh :

Dra. Anny Thuraidah, Apt, MS

Nur Qadri Rasyid, S.Si., M.Si

Safridha Kemala Putri, S.Si., M.Si

Dra. Warsinah, M.Si

Catu Umirestu Nurdiani, SKM, MKM

Ayu Puspita Sari, ST., M.Si

Siti Fatimah, S.Si, M.Sc, Apt

Dr. Ummy Mardiana, M.Si



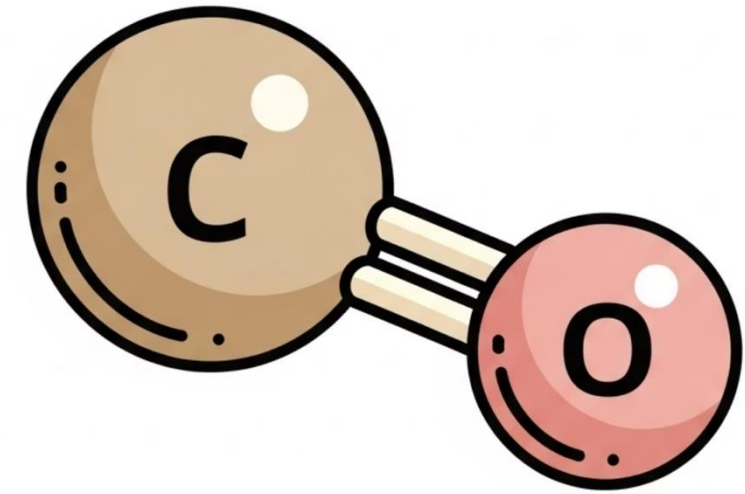
**ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIK INDONESIA (AIPTLMI)
2024**

Karbon Monoksida: Pembunuh Tanpa Warna dan Bau

Karbon Monoksida (CO) adalah gas yang:

- Tidak berwarna
- Tidak berbau
- Tidak berasa
- Tidak menimbulkan iritasi
- Sangat beracun dan dapat mematikan

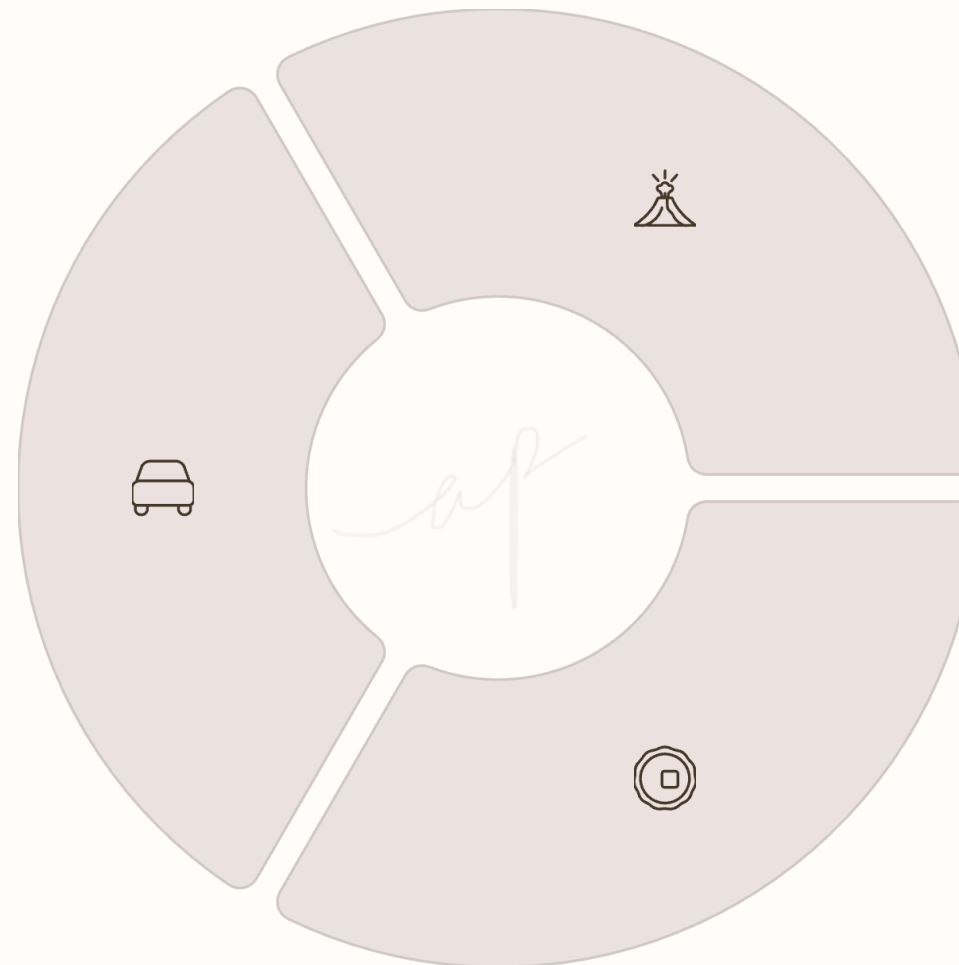
Gas ini dihasilkan dari pembakaran tidak sempurna pada bahan bakar organik ketika terjadi kekurangan oksigen.



Sumber Karbon Monoksida

Eksternal (60%)

- Asap kendaraan bermotor
- Asap rokok
- Sistem ventilasi pemanas yang buruk
- Kebakaran di lingkungan kota



Alami (40%)

- Emisi gas alam
- Erupsi gunung berapi
- Degradasi hewan dan tumbuhan
- Kebakaran hutan alami

Endogen

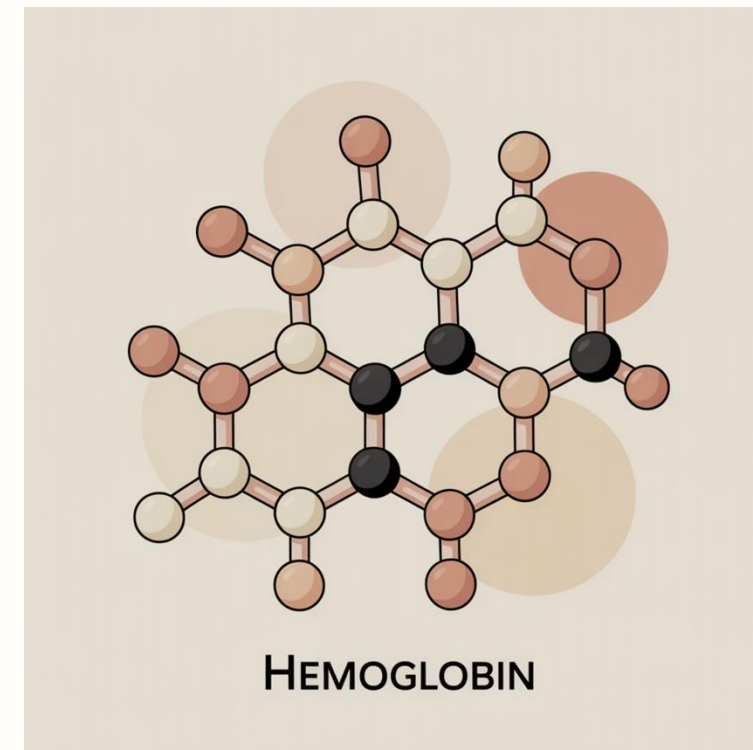
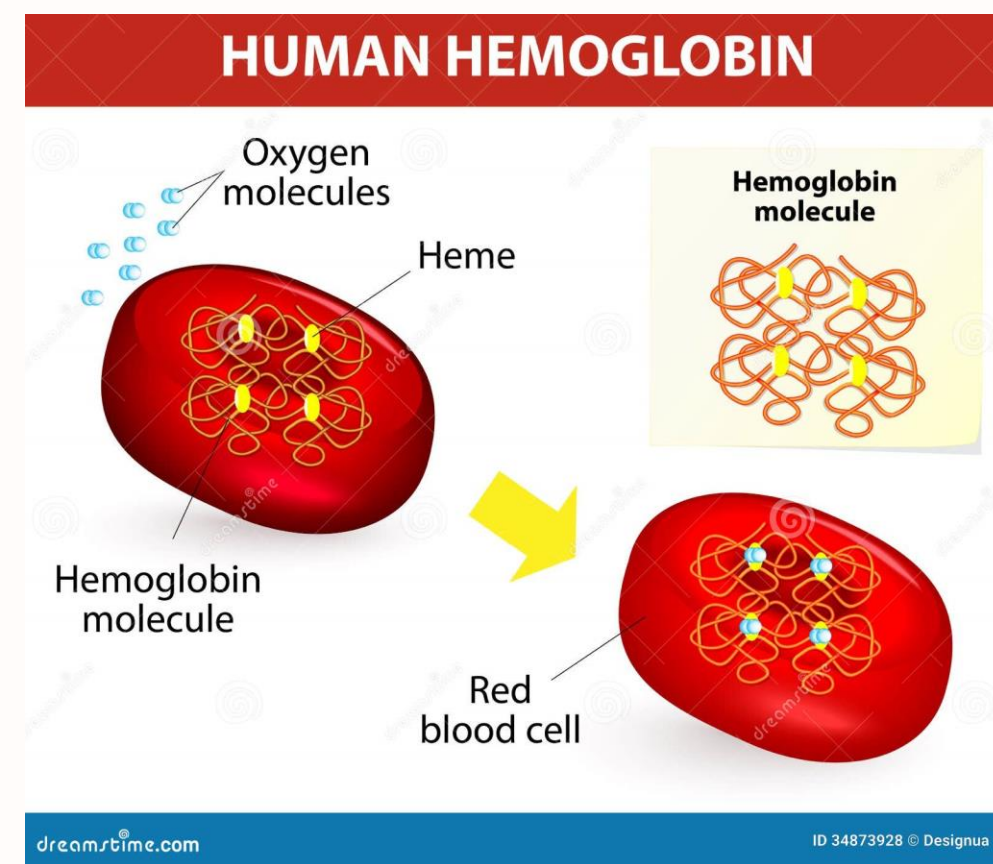
- Penghancuran molekul heme dari eritrosit
- Katalis oleh enzim heme-oksigenase (HO)
- Dari hemeprotein lain seperti mioglobin

Mekanisme Toksisitas CO

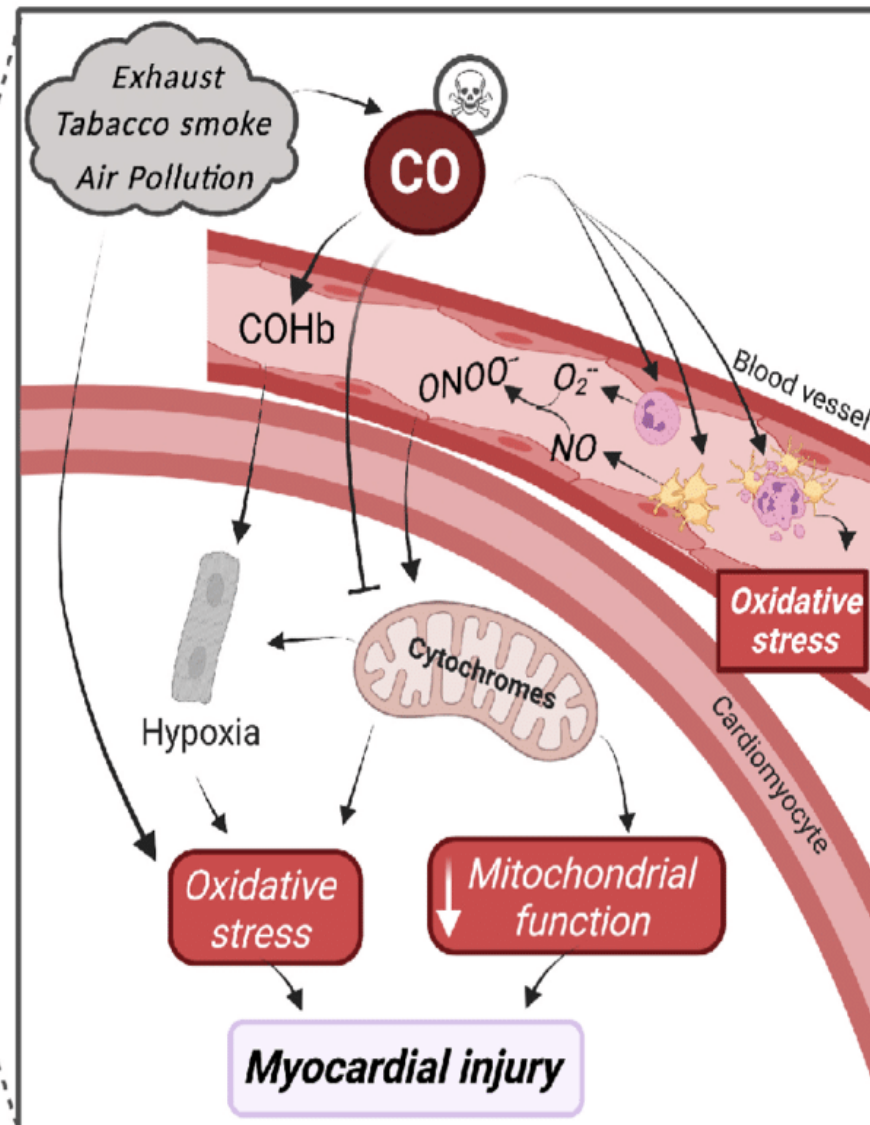
Toksisitas CO pada manusia berkaitan dengan interaksi antara CO dan hemoglobin (Hb):

- CO berikatan dengan hemoglobin membentuk karboksihemoglobin (HbCO)
- Afinitas CO terhadap hemoglobin 200-250 kali lebih tinggi dibandingkan oksigen
- Menyebabkan pergeseran ke kiri pada kurva disosiasi oksihemoglobin
- Menghambat pelepasan O_2 dari darah ke jaringan
- Menghambat respirasi seluler
- Mengakibatkan hipoksia jaringan (kekurangan oksigen)

Ikatan CO dengan hemoglobin menggantikan posisi oksigen pada molekul heme.



Dampak Keracunan CO pada Tubuh



Jaringan Rentan

Jaringan dengan aktivitas metabolisme tinggi seperti jantung dan otak sangat rentan mengalami kekurangan oksigen akibat keracunan CO.

Dampak pada Jantung

Pengikatan CO pada mioglobin dari otot jantung dapat menyebabkan depresi miokardium dan hipotensi yang mengakibatkan iskemia.

Hipoksia Jaringan

Kondisi hipoksia yang terjadi karena keracunan CO dapat semakin memburuk akibat gangguan pada fungsi jantung.

Gejala Keracunan Karbon Monoksida

Keracunan Ringan

- Mual
- Pusing
- Gangguan penglihatan
- Sakit kepala
- Pelebaran otot kulit
- Kulit berwarna merah ceri

Keracunan Sedang

- Nyeri dada
- Takikardia
- Merasa lemah
- Sesak nafas

ap

Keracunan Berat

- Tekanan darah rendah
- Henti jantung dan pernapasan
- Kejang
- Koma
- Dapat berakibat kematian



Metode Pengukuran CO dalam Tubuh

Metode Konvensional

- Uji perbandingan warna sederhana
- Metode Hartridge Reversion Spectroscope
- Metode mikrodifusi
- Metode kolorimetri
- Metode volumetri

Metode Modern

- Differential Protein Precipitation
- Metode spektrofotometri
- Derivative Spectroscopy
- CO-Oximetri
- Fourier Transform Infra Red Spectrophotometry
- Kromatografi Gas

Sampel biologis yang dapat digunakan umumnya adalah darah dan nafas. Metode pengukuran bervariasi dari yang sederhana hingga yang kompleks dengan teknologi modern.

Analisa Kualitatif COHb: Uji Warna

Tujuan

Mengidentifikasi keberadaan Karboksihemoglobin (COHb) sampel darah

Prinsip

Penambahan basa pada sampel yang mengandung COHb akan memberikan warna merah muda

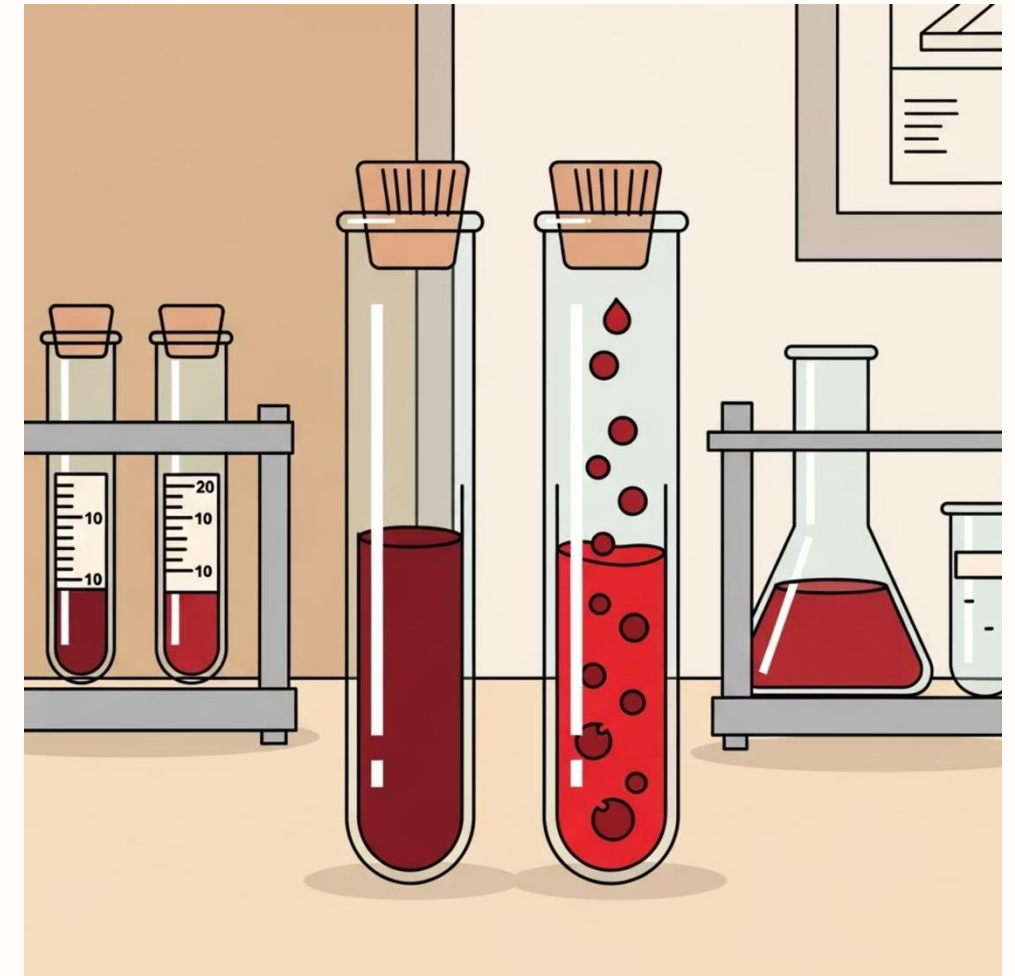
Alat: Tabung reaksi, pipet

Reagen: Larutan NaOH 0,01 M

Sampel : *Whole Blood*

Prosedur Kerja

1. Menyiapkan sampel darah melalui prosedur pengambilan yang sesuai
2. Menambahkan 0,1 mL darah pada 2 mL larutan NaOH 0,1 M di tabung reaksi
3. Melakukan homogenisasi dengan vortex
4. Mengamati perubahan warna yang terjadi



Interpretasi Hasil Uji Warna COHb

Hasil Positif

Warna hasil yang lebih muda dari warna darah normal menunjukkan kemungkinan adanya COHb pada sampel.

Catatan Penting

Keracunan sianida juga akan memberikan warna yang sama, namun keracunan sianida lebih jarang terjadi dibandingkan keracunan CO.

Tindak Lanjut

Jika didapatkan hasil positif, maka konsentrasi karboksihemoglobin (COHb) dalam darah atau konsentrasi CO dalam napas harus segera diukur tanpa ada penundaan menggunakan metode kuantitatif.



Analisa Kuantitatif COHb: Metode Hinsberg-Lang

Tujuan

Menentukan kadar Karboksihemoglobin (COHb) secara kuantitatif

Prinsip

Penambahan senyawa ditionit diperlukan untuk mereduksi atau menghilangkan senyawa oksihemoglobin dan MetHb yang bisa mengganggu pembacaan absorbansi senyawa COHb.

Alat: Tabung reaksi, spektrofotometer, flakon, kuvet, spuit, tourniket, pipet ukur, mikropipet, rak tabung reaksi, spatula

Reagen: Amonium hidroksida 0,1%, sodium ditionit

Sampel : *Whole Blood*

Prosedur Metode Hinsberg-Lang



Pengambilan Darah

Mengambil darah vena sebanyak 3 mL dan memasukkan 0,5 mL ke dalam flakon berisi EDTA untuk membuat *whole blood*.



Persiapan Sampel

Mengambil amonium hidroksida 0,1% sebanyak 20 mL, menambahkan 10 μ L *whole blood*, dan membagi campuran ke dalam 2 tabung reaksi.



Perlakuan Sampel

Tabung 1: tidak ditambah sodium ditionit.
Tabung 2: ditambah sodium ditionit sebanyak 1 spatula.



Pengukuran

Mengukur absorbansi kedua tabung pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.

Perhitungan dan Interpretasi Hasil Hinsberg-Lang

Rumus Perhitungan

$$\text{KadarCOHb} = \frac{\Delta A}{\Delta A_{rHb}} \times 6,08\%$$

Keterangan:

- ΔA adalah absorbansi tabung 1
- ΔA_{rHb} adalah absorbansi tabung 2
- 6,08 adalah faktor konversi persen saturasi COHb

Interpretasi Nilai COHb



Normal

< 2%



Batas Toleransi

2 – 5%



Mulai Timbul Gejala

> 5%

Nilai keracunan COHb darah harus mempertimbangkan berbagai faktor seperti usia, kondisi kesehatan, dan durasi paparan.

Analisa Kuantitatif COHb Metode Conway

Tujuan

Menentukan kadar Karboksihemoglobin (COHb) secara kuantitatif

Prinsip

Asam sulfat digunakan untuk melepaskan karbon monoksida dari molekul hemoglobin. CO kemudian berdifusi ke larutan PdCl_2 dan mereduksi ion Pd^{2+} menjadi logam Pd yang muncul sebagai cermin paladium di permukaan larutan PdCl_2 .

Alat: Spuit, tourniket, tabung vakutainer, *holder*, kapas alkohol, pipet ukur, mikropipet, cawan Conway, labu ukur, kuvet, spektrofotometer UV-Vis

Reagen: Alkohol 70%, KI 5%, PdCl_2 0,005 N, H_2SO_4 5N

Cawan Conway adalah petridish yang memiliki dua area sumuran yang terpisah, yaitu luar dan dalam, dan dapat dibuat kedap udara dengan penutup kaca yang dilapisi dengan bahan penyegel viskus.

Tahapan Analisis Metode Conway



Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Membuat larutan dengan aquades, KI 5%, dan PdCl_2 0,005 N, kemudian membaca absorbansi pada panjang gelombang 350 – 550 nm.



Pembuatan Kurva Baku

Membuat seri larutan dengan volume PdCl_2 yang berbeda, mengukur absorbansi, dan membuat kurva standar.



Penentuan Operating Time

Membuat larutan dengan aquades, darah, KI 5%, dan PdCl_2 0,005 N, kemudian mengukur absorbansi pada menit ke 60 dan 120 dengan λ maksimal.



Penentuan Kadar COHb

Menggunakan cawan Conway untuk memisahkan CO dari darah, mengukur absorbansi, dan menghitung konsentrasi COHb dari kurva standar.

Prosedur Penentuan Kadar COHb Metode Conway

1. Mencuci ceruk Conway dengan cairan pembersih dan akuades
2. Mengisi ceruk cawan Conway: A = 1,5 mL akuades, B = 0,2 mL H_2SO_4 5N, C = 1,0 mL larutan PdCl_2
3. Menambahkan 0,25 mL darah pada bagian A yang berisi akuades
4. Menutup cawan Conway dan menginkubasi selama *operating time*
5. Memipet 0,25 mL larutan PdCl_2 , ujung pipet harus menyentuh dasar agar lapisan tipis logam Pd tidak terhisap
6. Menuang isi pipet ke dalam labu ukur 25 mL yang sebelumnya telah diisi 10 mL akuades dan 1 mL KI 5%
7. Menambahkan akuades sampai tanda tera, kemudian menghomogenkan
8. Mengukur absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimal
9. Menggunakan akuades sebagai blangko
10. Membuat plot absorbansi pada kurva standar untuk mendapatkan konsentrasi COHb



Perbandingan Metode Analisis COHb



1

Uji Warna (Kualitatif)

Keunggulan: Cepat, mudah dilakukan, tidak memerlukan alat canggih

Kelemahan: Akurasi rendah, hanya bersifat skrining awal, keracunan sianida dapat memberikan hasil positif yang sama

2

Metode Hinsberg-Lang

Keunggulan: Lebih akurat dari uji warna, prosedur relatif sederhana, hasil kuantitatif

Kelemahan: Memerlukan spektrofotometer, sampel harus segar, adanya senyawa lain dapat mengganggu pembacaan

3

Metode Conway

Keunggulan: Akurasi tinggi, dapat memisahkan CO dari sampel, mengurangi interferensi

Kelemahan: Prosedur lebih kompleks, memerlukan waktu inkubasi yang lama, membutuhkan peralatan khusus (cawan Conway)

Hal-hal yang Perlu Diperhatikan dalam Analisis COHb

Pra Analitik

- Pengambilan sampel darah harus dilakukan dengan benar
- Sampel harus segera dianalisis atau disimpan dengan tepat
- Hindari paparan udara pada sampel darah
- Gunakan antikoagulan yang sesuai (EDTA atau heparin)
- Dokumentasikan waktu pengambilan sampel

Analitik

- Pastikan reagen dalam kondisi baik
- Kalibrasi alat secara berkala
- Ikuti prosedur dengan tepat
- Perhatikan waktu inkubasi & reaksi
- Lakukan kontrol kualitas

af

Post Analitik

- Interpretasi hasil dengan benar
- Pertimbangkan faktor-faktor yang mempengaruhi hasil
- Dokumentasikan hasil dengan lengkap
- Laporkan hasil dengan cepat pada kasus keracunan
- Simpan sampel untuk analisis ulang jika diperlukan

MODUL PRAKTIKUM TOKSIKOLOGI

Bagi Mahasiswa Prodi Teknologi
Laboratorium Medik

Disusun Oleh :

Dra. Anny Thuraidah, Apt, MS

Nur Qadri Rasyid, S.Si., M.Si

Safridha Kemala Putri, S.Si., M.Si

Dra. Warsinah, M.Si

Catu Umirestu Nurdiani, SKM, MKM

Ayu Puspita Sari, ST., M.Si

Siti Fatimah, S.Si, M.Sc, Apt

Dr. Ummy Mardiana, M.Si



ASOSIASI INSTITUSI PENDIDIKAN TINGGI TEKNOLOGI
LABORATORIUM MEDIK INDONESIA (AIPTLMI)
2024



terima
kasih