

Uji Banding Pengukuran Protein Total Serum antara Metoda Tetes Layang, Refraktometer dan Spektrofotometer

Suryanto, Banundari RH

Bagian Patologi Klinik FK UNDIP/RSUP dr. Kariadi Semarang

Abstract

Examination of serum total protein is often needed to assess the presence of hypoproteinemia or hyperproteinemia in various cases, and the method of examination commonly used is photometric (Biuret) or automatisation. In view of not all regions can make this instrument available, the method of examination using Refractometer device and Flying-drops method can become alternatives for measuring serum total protein in remote region or in many public health centres and small hospitals.

This reseach is aimed to obtain the difference in the findings from serum protein measurement between Flying-drops method and Biuret method, between Refractometer and Biuret, and between Flying-drops and Refractometer.

The materials for examination were 50 serum samples obtained purposely from in-patients and then total protein measurement was performed with three methods for each serum sample. Materials for examination were a series of cupric sulphate of various densities starting from 1.100 ; 159.0 grams of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ was solved in 1000 ml of water for Flying-drops method, Hand Refractometer device for Refractometer method, and Biuret kit with normal control serum (Precinorm U from BM) with Automatic Analyzer Hitachi 902 for Biuret method. Data obtained were analyzed by SPSS-PC using Anova statistical test.

This reseach shows There were significant differences between Flying-drops with Biuret method ($p=0.000$), between Refractometer with Biuret method ($p=0.000$), and between Flying-drops with Refractometer ($p=0.000$).

This reseach shows (statistically), there were significant differences between the three methods ($p = 0.000$). Furthermore, it is necessary to consider replacing Biuret method with Flying-drops method or Refractometer.

Key words: Serum total protein, flying-drops, refractometer, Biuret.

Abstrak

Pemeriksaan protein total serum sering diperlukan untuk menilai adanya hipoproteinemia atau hiperproteinemia dalam berbagai kasus, dan metoda pemeriksaan yang sering digunakan pada umumnya secara fotometrik (biuret) atau otomatisasi. Mengingat tidak semua daerah bisa mengadakan peralatan ini, metoda pemeriksaan dengan alat Refraktometer dan metoda Tetes layang dapat merupakan alternatif untuk pemeriksaan protein total serum di daerah-daerah atau di banyak Puskesmas dan Rumah sakit kecil.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan hasil pengukuran protein serum antara metoda Tetes layang dengan Biuret, Refraktometer dengan Biuret dan Tetes layang dengan Refraktometer.

Bahan penelitian adalah 50 serum pasien rawat inap diambil secara purposif dan dilakukan pemeriksaan protein total dengan tiga metoda untuk setiap serum. Bahan pemeriksaan satu seri larutan kupri sulfat dari berbagai berat jenis berasal dari b.j 1,100 ; 159,0 g kritel $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 1000 ml air untuk metoda Tetes layang, alat *Hand Refractometer* untuk metoda Refraktometer dan kit Biuret dengan serum kontrol normal (Precinorm U dari BM) dengan alat *Automatic analyzer* Hitachi 902 untuk metoda Biuret. Data yang diperoleh dianalisis dengan SPSS-PC menggunakan uji statistik Anova.

Penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara metode Tetes layang dengan Biuret ($p=0,000$), antara Refraktometer dengan Biuret ($0,000$) dan antara Tetes layang dengan Refraktometer ($p=0,000$).

Penelitian ini menyimpulkan terdapat perbedaan bermakna secara uji statistik dari tiga metode tersebut ($p=0,000$). Perlu pertimbangan lebih jauh untuk menggantikan pemeriksaan protein total metoda Biuret dengan metoda Tetes layang atau refraktometer.

Kata kunci: Protein total serum, tetes layang, refraktometer, biuret

Pendahuluan

Pemeriksaan protein total serum (PT) termasuk kelompok tes kimia klinik yang banyak diminta oleh para dokter klinik untuk menilai adanya hiperproteinemia atau hipoproteinemia berbagai kasus. Hiperproteinemia dapat disebabkan oleh keadaan dehidrasi berat dan penyakit seperti Multiple Mieloma. Hipoproteinemia dapat disebabkan oleh perdarahan yang masif, sprue, sindrom nefrotik, luka bakar yang berat, sindrom retensi NaCl dan kwashiorkor (*acute protein deficiency*) (Mc Pherson, 1984; Siverman LM, Christenson, 1996)

Pemeriksaan PT yang sekarang sering digunakan adalah cara fotometrik (Biuret) yang dapat diotomatisasi dengan upaya untuk meningkatkan kemampuan laboratorium dalam kuantitas pemeriksaan, sedangkan beberapa cara lama seperti tetes layang dan refraktometer dianggap usang dan ditinggalkan.

Pada tetes layang pengukuran PT berdasarkan gumpalan kupri proteinat yang terbentuk akan terapung, melayang atau tenggelam ke dasar larutan kupri sulfat (Mc Pherson, 1984; Lewandrawski EL, 1994). Pengamatan gumpalan melayang sangat cepat (15 – 20 detik). Metoda ini sangat sederhana, selain itu dapat juga digunakan dalam skrining pemeriksaan kadar hemoglobin (Mc Pherson, 1984; Dawiesah, 1988). Metoda refraktometer berdasarkan indeks refraksi, yang terjadi dengan cepat sehingga pembacaan harus cepat. Kadar protein yang dapat diukur menggunakan refraktometer antara 3,5 – 10 g/dl, apabila pengukuran pada konsentrasi protein kurang dari 3,5 g/dl hasilnya kurang akurat (Siverman, 1984; Lewandrawski, 1994). Temperatur tera dalam pengukuran antara 17 – 37 °C . Adanya azotemia, hiperglikemia, hiperbilirubinemia dan lipemia dapat mempengaruhi hasil pembacaan refraktometer. (Mc Pherson, 1984; Siverman, 1996; Lewandrawski, 1994)

Metoda Biuret dengan teknik kolorimetrik sangat spesifik untuk pengukuran protein dan peptida. Ion kupri dalam suasana alkalis akan membentuk senyawa kompleks yang berwarna ungu dan intensitas warnanya diukur dengan fotometer, menggunakan panjang gelombang 540 – 560 nm (Lewandrawski, 1994; Dawiesah, 1988; Brosur, 1999). Pengaruh hemoglobin dan bilirubin sangat kecil pada metoda ini, dan batas pengukuran metoda ini antara 0,2 – 15 g/dl (Brosur, 1999).

Namun penggunaan dengan alat otomatis kadang menyulitkan untuk melacak adanya penyimpangan-penyimpangan reaksi seperti non-linearitas atau kesalahan panjang gelombang fotometer (Silman & Suhendra, 1995). Selain itu tidak semua daerah bisa mengadakan peralatan tersebut. Alat refraktometer dan metoda Tetes layang merupakan cara sederhana dan mudah serta dengan biaya murah yang dapat dilakukan di daerah-daerah atau di banyak Puskesmas dan Rumah Sakit kecil. Apakah cara lama dapat merupakan alternatif untuk pemeriksaan protein total di daerah?

Dari latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan pengukuran protein total serum antara metoda Tetes layang dengan metoda Biuret, Refraktometer dengan metoda Biuret dan Tetes layang dengan Refraktometer.

Bahan dan Cara Penelitian

Penelitian dilakukan di RSUD Muhammadiyah Yogyakarta periode September 2000, diambil 50 sampel serum pasien rawat inap secara purposif dengan kriteria inklusi hasil pemeriksaan PT dengan metoda Biuret lebih atau sama dengan 4 g/dl dan sampel darah tidak hemolisis. Kemudian sampel serum dilakukan pengukuran dengan metoda Tetes layang dan Refraktometer.

Metode Biuret : menggunakan kit reagen Biuret dari Boehringer Mannheim (BM) dengan Lot / Ch-B. 60500501 dan serum kontrol normal (Precinorm U dari BM). Pemeriksaan menggunakan alat *Automatic Analyzer* HITACHI 902.

Metoda Tetes Layang : menggunakan satu seri larutan kupri sulfat dari berbagai berat jenis dibuat dari larutan pokok kupri sulfat berat jenis 1.100; 159,0 g kristal $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 1000 ml air suling. Berat jenis terendah 1,017 dan tertinggi 1,0295 dengan perbedaan setiap larutan 0,0005 sehingga diperlukan 26 botol. Teteskan satu tetes serum kepada larutan kupri sulfat dalam salah satu botol dengan jarak 1 cm di atas permukaan larutan. Perhatikan pada botol mana tetesan melayang yang terjadi sangat cepat (15-20 detik). Untuk menghitung protein total dari berat jenis ini digunakan cara menurut H. Hoch dan J. Marrack dengan rumus : $\text{Protein} = 364 \times (\text{b.j} - 1,006)$.

Metoda Refraktometer : menggunakan alat *Hand Refractometer* SPR-N (ATAGO). Sebelum digunakan refraktometer dikalibrasi dahulu dengan air biasa sampai menunjukkan batas indeks refraksi pada skala 0 (nol). Teteskan satu tetes serum pada permukaan refraktometer dan segera dibaca. Pengukuran protein total cara Tetes layang dan refraktometer dilakukan dalam waktu yang sama.

Perbedaan hasil pengukuran PT ketiga metoda tersebut, data-datanya dianalisis dengan SPSS-PC menggunakan uji statistik ANOVA (Pratiknya, 1992; Sastroasmoro, 1995)

Hasil dan Pembahasan

Telah dilakukan pengukuran kadar PT dari 50 sampel serum dengan nilai terendah 5,0 g/dl dan nilai tertinggi 7,1 g/dl. Pengukuran menggunakan metoda Biuret sebagai nilai baku emas.

A. Perbandingan hasil pengukuran PT antara metoda Tetes layang dengan metoda Biuret.

Tabel.1: Perbandingan Hasil Pengukuran Protein Total Antara Metoda Tetes Layang dengan Metode Biuret

	Tetes layang	Biuret	Keterangan
n	50	50	
Mean	7,4396	6,1880	p= 0,000
S.D.	0,5245	0,5001	bermakna

Dari tabel 1 didapat rerata pengukuran PT metoda Tetes layang adalah 7,4396 SD = 0,5245 dan metoda Biuret rerata 6,1880 SD = 0,5001. Terdapat perbedaan bermakna antara kedua metoda (p = 0,000)

- B. Perbandingan hasil pengukuran PT antara metoda Refraktometer dengan metoda Biuret.

Tabel. 2: Perbandingan Hasil Pengukuran Protein Total Antara Metoda Refraktometer dengan Metode Biuret

	Refraktometer	Biuret	Keterangan
n	50	50	
Mean	6,9520	6,1880	p= 0,000
S.D.	0,5578	0,5001	bermakna

Dari tabel 2 didapat rerata pengukuran PT metoda Refraktometer adalah 6,9520 SD = 0,5578 dan metoda Biuret rerata 6,1880 SD = 0,5001. Terdapat perbedaan bermakna antara kedua metoda (p = 0,000)

- C. Perbandingan hasil pengukuran PT antara metoda Tetes layang dengan Refraktometer.

Tabel.3 : Perbandingan Hasil Pengukuran Protein Total Antara Metoda Tetes Layang dengan Refraktometer

	Tetes layang	Refraktometer	Keterangan
n	50	50	
Mean	7,4396	6,9520	p= 0,000
S.D.	0,5245	0,5578	bermakna

Dari tabel 3 didapat rerata pengukuran PT metoda Tetes layang adalah 7,4396 SD = 0,5245 dan metoda Refraktometer 6,9520 SD = 0,5578. Terdapat perbedaan bermakna antara kedua metoda (p = 0,000)

Didapatkan perbedaan yang signifikan pada ke tiga metoda tersebut dengan tingkat kemaknaan p < 0,05.

Pada penelitian ini dilakukan lebih dahulu pengukuran PT serum dengan *autoanalyzer* dari beberapa sampel serum yang diambil secara purposif, didapatkan hasil PT kadar terendah 5 g/dl dan tertinggi 7,1 g/dl, digunakan sebagai nilai baku emas. Kriteria inklusi lebih atau sama dengan 4g/dl berdasarkan atas pengukuran dengan alat refraktometer dimana nilai dibawah 3,5 g/dl akurasiya berkurang ⁽²⁾, ada pula yang menyatakan batas terendah 2,5 g/dl ⁽¹⁾, dan darah hemolisis akan meningkatkan kadar protein ⁽⁹⁾.

Pada Tetes layang dibuat berbagai berat jenis larutan kupri sulfat berasal dari pengenceran larutan kupri sulfat berat jenis 1,1 dengan berat jenis terendah 1,017 setara dengan kadar protein 4 g/dl dan berat jenis tertinggi 1,0295 setara dengan kadar protein 8,55 g/dl. Pengamatan dengan Tetes layang memerlukan kecermatan dan ketelitian serta membutuhkan jumlah serum cukup banyak karena harus ditetaskan setiap botol larutan kupri sulfat.

Hasil pengukuran PT adalah Tetes layang > Biuret (tabel.1), Refraktometer > Biuret (tabel.2), dan Tetes layang > Refraktometer (tabel.3). Perbedaan ini disebabkan pada metoda Tetes layang dan refraktometer sampel serum tidak dilakukan perlakuan (reaksi kimia) sehingga adanya fraksi-fraksi lain yang terlarut di dalam serum akan mempengaruhi hasil pembacaan, seperti : azotemia, hiperbilirubinemia, hiperglikemia dan lipemia.

Penentuan dengan berat jenis kupri sulfat dalam penelitian ini hasilnya masih kasar karena mempunyai perbedaan berat jenis dalam setiap ukuran 0,0005, sehingga perhitungan menggunakan cara H. Hoch dan J. Marrack berdasarkan gumpalan kupri proteinat yang melayang pada berat jenis yang ditentukan, atau dengan memperhatikan laju gerak gumpalan relatif antara dua larutan kupri sulfat yang berurutan berat jenisnya ke atas lebih cepat dari ke bawah atau sebaliknya, berat jenis sampel dihitung dengan interpolasi antara dua harga berat jenis larutan kupri sulfat tersebut, dan harga ini tidak harus harga tengah diantara keduanya tetapi dapat lebih dekat dengan salah satunya. Adanya gelembung udara walaupun kecil dapat meringankan tetesan. Pada penentuan pemeriksaan PT dengan alat refraktometer mempunyai skala minimum 0,2 g/dl dan akurasiya $\pm 0,0002$.

Simpulan

1. Terdapat perbedaan bermakna antara metoda Tetes layang dengan Biuret ($p = 0,000$)
2. Terdapat perbedaan bermakna antara metoda Refraktometer dengan Biuret ($p = 0,000$)
3. Terdapat perbedaan bermakna antara metoda Tetes layang dengan Refraktometer ($p = 0,000$)
4. Tetes layang dan refraktometer memberikan hasil pengukuran PT yang signifikan lebih tinggi dari metoda standard baku emas biuret.