

PENETAPAN KADAR PROTEIN TOTAL SERUM SECARA REFRAKTOMETRIK

Oleh: Pramono Sidhi

Bagian Kliniko-Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PENDAHULUAN

Protein dalam serum dapat ditetapkan kadarnya berdasarkan atas sifat fisis dan kimianya.

A. Berdasarkan sifat fisisnya kita mengenal penetapan secara:

1. Densitometrik: a. tetes jatuh,
b. tetes melayang.
2. Refraktometrik

B. Berdasarkan sifat kimianya, dikenal penetapan dengan:

1. penetapan zat nitrogen: metoda micro Kjeldahl.
2. adanya ikatan peptide : metoda biuret.
3. adanya ikatan tyrosine : metoda Folin & Ciocalteau.
4. dengan indikator : methyl merah,
congo merah,
5. kebanyakan adanya gugusan amino: titrimetrik.

Di kebanyakan laboratorium rumah sakit untuk penetapan kuantitatif kadar protein total biasanya dipakai metoda biuret. Meskipun metoda ini sederhana, akan tetapi masih memerlukan perlengkapan yang banyak. Untuk menyederhanakannya lagi beberapa penyelidik telah mencoba dengan metoda yang lain, yaitu dengan refraktometer. Metoda ini didasarkan atas sifat fisis serum, khususnya sifat refraktipnya. Dengan menetapkan indeks refraktip suatu serum, kita dapat menetapkan kadar protein total serum yang bersangkutan.

BAHAN

1. Aqua dest. untuk kalibrasi dan mencuci.
2. Gelas pengaduk/pipet untuk meneteskan aqua dest./serum pada refraktometer.
3. Kertas saring untuk membersihkan dan mengeringkan refraktometer.
4. Refraktometer Zeiss Abbe.

CARA KERJA

1. Kami mengambil 15 contoh dari serum yang berbeda-beda, kemudian ditetapkan perbedaan indeks refraktipnya antara serum-serum tersebut dengan aqua dest. Nilai ini kita sebut R, penetapan pada temperatur kamar.
2. Sekaligus pada 15 contoh serum tersebut ditetapkan kadar protein totalnya dengan metoda biuret. Nilai ini kita sebut P.
3. Dari data di atas (R dan P) dibuat *scattergram* dalam bentuk logarithmis.
4. Dengan metoda *least square*, hubungan R dan P adalah sebagai berikut :

$$\log.P = N.a + b.\log. 100R$$

$$(\log.P) (\log. 100R) = a \log. 100R + b(\log. 100R)^2;$$

Di sini a dan b adalah konstan, N adalah jumlah contoh serum, P adalah protein total serum dengan metoda biuret dan R adalah perbedaan indeks refraktip antara serum dan aqua dest.

Untuk membandingkan dan memperlengkap penetapan di sini, kami ambilkan penetapan-penetapan yang telah dikumpulkan oleh Drickman dan McKeon.

Penetapan-penetapan yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. mengambil 61 contoh serum yang berbeda-beda, ditetapkan perbedaan indeks refraktipnya antara serum tersebut dengan aqua dest (R).
- b. terhadap 15 contoh serum yang abnormal dari pasien-pasien dysproteinosis atau gangguan-gangguan yang menyertainya atau kedua-duanya, ditetapkan kadar proteinnya dengan metoda biuret dan refraktometer.
- c. juga terhadap 12 contoh serum normal, dilakukan pemeriksaan duplo, dengan metoda biuret dan refraktometer. Ditetapkan sebelum dan sesudah makan.
- d. penetapan perbedaan indeks refraktipnya, dilakukan pada temperatur kamar dan 37°C.
- e. juga terhadap sejumlah serum yang telah ditambah dengan glukosa dan urea, ditetapkan kadar proteinnya dengan metoda biuret dan refraktometer.

HASIL

Dengan menggunakan metoda *least square*, 15 contoh serum yang diperiksa di laboratorium kami, didapatkan persamaan:

$$\log.P = 0.655 + 0.794 \log. 100R.$$

Dengan menggunakan persamaan ini, kita dapat menetapkan kadar protein serumnya, apabila indeks refraktipnya telah ditentukan dengan menggunakan refraktometer. Persamaan logarithmis tersebut di atas didapat sebagai berikut:

No.	R	log.100R	(log.100R) ²	P	log.P	(log.P) (log.100R).
1.	0.0149	0.1732	0.0300	6,2	0,7924	0.1372
2.	0.0168	0.2253	0.0507	6,8	0.8325	0.1875
3.	0.0156	0.1931	0.0373	6,5	0.8129	0.1570
4.	0.0158	0.1987	0.0391	6,4	0.8062	0.1602
5.	0.0163	0.2122	0.0450	7,0	0.8451	0.1793
6.	0.0138	0.1399	0.0196	5,8	0.7634	0.1068
7.	0.0160	0.2014	0.0417	6,4	0.8062	0.1645
8.	0.0143	0.1553	0.0241	5,8	0.7634	0.1186
9.	0.0140	0.1461	0.0214	6,0	0.7782	0.1137
10.	0.0136	0.1335	0.0178	6,0	0.7782	0.1039
11.	0.0159	0.2014	0.0406	6,8	0.8325	0.1677
12.	0.0157	0.1959	0.0384	6,4	0.8062	0.1579
13.	0.0164	0.2148	0.0461	6,2	0.7924	0.1702
14.	0.0146	0.1644	0.0270	6,0	0.7782	0.1279
15.	0.0166	0.2201	0.0485	6,8	0.8325	0.1832

2.7780 0.5270 12.0200 2.2360

Persamaan $\Sigma \log.P = N.a + \Sigma \log.100R.$ b.
 $\Sigma(\log.P) (\log.100R) = a \Sigma \log.100R + b \Sigma(\log.100R)^2$
 12.0200 = 15a + 2.778b. (1). (2) 33.540 = 41.678 + 7.905b
 2.2360 = 2.778a + 0.527b (2). (1) 33.390 = 41.678 + 7.716b

$$\begin{aligned} 0.150 &= & 0.189b \\ b &= 0.794. \\ a &= 0.655. \end{aligned}$$

b = 0.794 dimasukkan ke persamaan (2), didapat
 Kemudian a dan b dimasukkan ke persamaan aslinya,
 $\log.P = a + b \log.100R. \rightarrow \log.P. = 0.655 + 0.794 \log.100R$

Ketelitian

Mengenai ketelitian pada penggunaan refraktometer ini, kami telah menetapkan sebanyak 10 kali pengamatan terhadap satu contoh serum pada temperatur kamar, hasilnya adalah sebagai berikut:

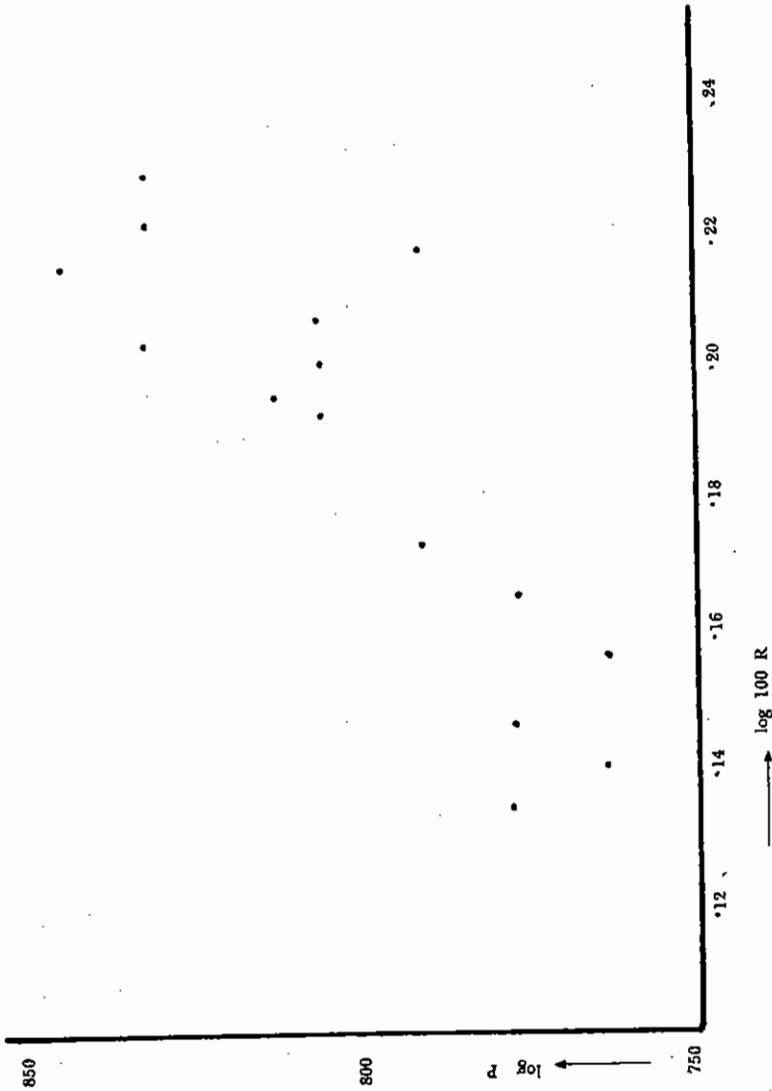
Adapun hasil-hasil yang telah dikemukakan oleh Drickman & McKeon (1962) adalah sebagai berikut:

Dari 61 contoh serum yang berbeda-beda, setelah ditetapkan perbedaan indeks refraktipnya antara serum-serum tersebut dengan aqua dest. dan ditetapkan kadar total proteinnya dengan metoda biuret, yang masing-masing disebut R dan P, kemudian dengan menggunakan metoda *least square* didapat hubungan antara keduanya sebagai berikut:

$$\log.P = 0.631 + 0.862 \log.100R.$$

Ternyata bahwa apabila kita melihat hasil tersebut, maka hasil penetapan dari 15 contoh serum yang kami selidiki, adalah tidak jauh berbeda; dan

Scattergram logaritmis



*Scattergram dari 15 contoh serum
P = kadar protein metoda biuret
R = perbedaan indeks bias serum-aqua dest.
Scattergram logaritmis

Tanggal	No.	R	P	P rata-rata	d	d ²	
11-2-72	1.	0.0169	6,7	6,67	0.03	0.0009	
	2.	0.0168	6,7		0.03	0.0009	
	3.	0.0168	6,7		0.03	0.0009	
	4.	0.0.71	6,8		0.13	0.0169	
	5.	0.0168	6,7		0.03	0.0003	
12-2-72	6.	0.0166	6,6	0.07	0.0049	SD. = $\frac{0.0410}{9}$ =0.014 jadi cukup baik	
	7.	0.0165	6,6	0.07	0.0049		
	8.	0.0166	6,6	0.07	0.0049		
	9.	0.0169	6,7	0.03	0.0009		
	10.	0.0166	6,6	0.07	0.0049		
				66.7	0.0410		

Perbandingan penetapan kadar protein dengan metoda biuret dan refraktometrik pada 15 contoh serum yang kami periksa.

No.	R.	Refraktometer		Biuret
		a	b	
1.	0.0149	6.2	6.0	6.2
2.	0.0168	6.8	6.7	6.8
3.	0.0156	6.4	6.3	6.5
4.	0.0158	6.5	6.4	6.4
5.	0.0163	6.7	6.5	7.0
6.	0.0138	5.8	5.7	5.8
7.	0.0160	6.5	6.	6.4
8.	0.0143	6.0	5.9	5.8
9.	0.0136	5.8	5.6	6.0
10.	0.0140	5.9	5.8	6.0
11.	0.0159	6.5	6.4	6.8
12.	0.0157	6.5	6.3	6.4
13.	0.0164	6.7	6.6	6.2
14.	0.0146	6.0	6.0	6.0
15.	0.0166	6.8	6.6	6.8

Keterangan:

- R = perbedaan indeks refraksi serum-aqua dest.
a = ditetapkan dengan rumus $\log P = 0.655 + \log 100R$
b = penetapan dengan rumus $P = 340R + 1.(\text{hal } 4).$

apabila kedua hubungan logaritmis tersebut kita pakai untuk menetapkan kadar protein total suatu serum, memberikan hasil-hasil yang hampir sama.

Adapun hasil-hasil penyelidikannya terhadap berbagai contoh serum adalah seperti berikut: Kadar protein 12 orang percobaan pada saat sebelum dan sesudah makan (1 à 2 jam sesudah makan lemak), tidak menunjukkan perubahan, baik dengan metoda biuret maupun dengan refraktometer; namun demikian standar kesalahan dari duplo berkurang (hasilnya lebih mendekati), apabila kita menggunakan refraktometer. Hal ini dapat dimaklumi; karena dengan menggunakan refraktometer kita tak melakukan banyak tindakan, berlainan dengan metoda biuret.

Adapun hasil-hasilnya adalah sebagai berikut:

Nomor	Puasa				Setelah makan			
	Biuret		Refraktometer		Biuret		Refraktometer	
1.	6.6	6.4	6.7	6.7	6.6	6.3	6.4	6.4
2.	7.0	6.8	6.9	6.7	6.6	6.2	6.4	6.5
3.	7.0	7.3	6.6	6.7	6.6	6.9	6.6	6.7
4.	7.1	7.2	6.6	6.7	7.1	7.0	6.5	6.6
5.	6.5	7.0	6.6	6.9	6.2	6.2	6.3	6.3
6.	6.8	7.2	6.7	6.7	6.4	6.3	6.4	6.2
7.	6.8	6.8	6.8	6.7	7.1	7.3	6.8	6.8
8.	6.8	7.0	6.7	6.6	7.0	7.1	6.5	6.6
9.	7.6	6.9	6.9	6.9	6.6	6.7	6.7	6.7
10.	7.6	6.9	7.1	7.1	6.8	7.2	7.0	7.0
11.	6.2	7.4	6.5	7.0	7.2	7.3	6.9	7.1
12.	7.2	6.8	7.3	6.8	7.0	7.3	7.0	6.8

Juga pada serum-serum yang tidak normal hasil-hasil penetapan dengan refraktometer sesuai dengan apabila dipakai metode biuret, terkecuali pada keadaan-keadaan hypercholesterolemia dan hyperlipemia, seperti terlihat di bawah ini:

Nomor	Tingkatan Penyakit	Biuret	Refraktometer
1.	<i>Obstructive icterus</i>	7.2	7.7
2.	<i>Cryoglobulinemia</i>	7.9	7.8
3.	<i>Hypogammaglobulinemia</i>	5.5	6.1
4.	<i>Familial hyperlipemia</i>	9.7	8.9
5.	<i>Hypercholesterolemia</i>	8.8	7.8
6.	<i>Hypercholesterolemia</i>	9.0	7.7
7.	<i>Hypercholesterolemia</i>	5.6	6.1
7.	<i>Hypercholesterolemia</i>	5.6	6.1
8.	<i>Macroglobulinemia of Waldenstrom</i>	8.2	8.4
9.	<i>Multiple myeloma</i>	6.0	6.6
10.	<i>Multiple myeloma</i>	7.2	7.4
11.	<i>Uremia</i>	5.2	5.4
12.	<i>Uremia</i>	5.5	6.0
13.	<i>Uremia</i>	6.3	6.7
14.	<i>Uremia</i>	5.3	6.0
15.	<i>Hypogammaglobulinemia</i>	5.0	5.4

Perbedaan indeks refraksi antara serum dan aqua dest. (R) pada temperatur kamar dan 37°C adalah sama.

Setelah pemberian glukosa dan urea pada larutan protein, penetapan dengan refraktometer menunjukkan tak banyak perbedaan dengan metoda biuret, seperti terlihat pada daftar berikut:

Perbandingan kadar total protein serum (gr%), setelah penambahan urea dan glukosa.

Nomor	Biuret gr%	Refraktometer	Urea N mg%	Gula
1.	6.0	5.9	10	32
2.	6.1	5.7	120	32
3.	6.1	6.0	172	32
4.	6.1	6.0	280	32
5.	6.2	6.0	340	32
6.	6.1	5.8	10	256
7.	6.2	6.0	11	500
8.	6.1	6.0	9	824
9.	6.1	6.1	9	1060

PEMBICARAAN

Penetapan protein serum kuantitatif secara refraktometrik mempunyai ciri-ciri:

1. cepat dan sederhana
2. suatu metoda mikro, hanya menggunakan setetes serum
3. tak menggunakan zat-zat kimia dan listrik
4. membutuhkan sedikit/tanpa pemeliharaan perlengkapan
5. menggunakan ruang kerja yang kecil
6. alat dapat dipindah-pindahkan.

Hal yang kurang menguntungkan pada metoda ini adalah harga refraktometer yang peka, yang relatif mahal. Juga pada hypercholesterolemia dan hyperlipemia penggunaan refraktometer kurang begitu cocok.

Sayangnya pada saat dilakukannya penyelidikan ini serum-serum pasien dengan syndrom neprotik dan dysproteinosis yang tertentu tak tersedia. Penyelidikan lebih lanjut perlu dilakukan dengan serum-serum abnormal untuk menilai secara lengkap penggunaan metoda ini secara universal.

Pada penyelidikan ini tak ada alat-alat lain yang digunakan, tapi para penyelidik percaya bahwa suatu refraktometer yang baik dengan kepekaan yang tinggi dapat digunakan untuk menetapkan kadar protein serum yang dapat dipercaya.

Dengan meningkatnya permintaan untuk elektroforese protein-protein, penetapan dengan refraktometer merupakan metoda yang cepat dan mudah untuk penetapan protein serum. Dengan penetapan secara refraktometrik dan elektroforese bersama-sama, kita dapat menetapkan protein total dengan fraksi-fraksinya, albumin, α_1 , α_2 , β , dan γ globulin, secara teliti dan cepat dengan ruang kerja yang kecil dan tanpa proses kimia yang sulit.

Untuk kadar protein, yang terletak antara 4 - 10 gr%, dapat digunakan rumus ini: $P = 340R + 1$, di mana P = kadar protein total, dan R =

perbedaan indeks refraksi antara serum dan aqua dest. Persamaan ini mendekati persamaan logaritmis aslinya, dengan perbedaan yang kecil. Oleh karena itu, pada kasus-kasus kecelakaan besar atau kejadian-kejadian yang mendadak, penggunaan refraktometer merupakan cara yang praktis untuk menetapkan kadar protein serum dalam keadaan *shock* dan kebakaran. Hal ini dapat dikerjakan di lapangan, dalam mobil-mobil Unit Rumah Sakit, tanpa menggunakan bahan-bahan kimia dan fotometer (listrik).

KESIMPULAN

Berdasarkan sifat refraktip serum, penetapan kuantitatif total protein serum dengan menggunakan refraktometer merupakan metoda yang sederhana, cepat dan teliti, tanpa menggunakan bahan-bahan kimia. Metoda ini dapat digunakan untuk mengerjakan sejumlah besar *sample* pada keadaan yang mendadak.

KEPUSTAKAAN

- Noyos, E.C. 1949 *Chemie en Kliniek*, deel 1. Van Holkema en Warensdorf N.V., Amsterdam.
- Drickman, Athur, & McKeon; Francis A. Jr. 1962 Determination of total serum protein by means, of the refractive index of serum. *Am. J. Clin. Path.* 38 (4): 392-6.
-