

Pengembangan Metode Analisis Kreatinin Secara Spektrofotometri Dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Visible

The Development of Analysis Methods of Creatinine by Spectrophotometry Using Spectrophotometer UV-Visible.

Taufik Abdillah Natsir, Dwi Siswanta, Roto

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Gadjah Mada, Sekip utara Yogyakarta 55281

*Penulis korespondensi. No. Telp. +62 81329079961

email : tanatsir@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode analisis kreatinin. Metode yang sering digunakan untuk analisis kreatinin secara spektrofotometri adalah dengan menggunakan Jaffe reaction yaitu mereaksikan kreatinin dengan asam pikrat sehingga menghasilkan senyawa kompleks yang dapat dianalisis dengan menggunakan spektrofotometri UV Vis dalam pelarut air. Pengembangan metode analisis kreatinin dilakukan dengan menambahkan *Tri octylmethylammoniumchloride* (TOMAC) dalam pelarut kloroform sehingga membentuk pasangan ion asam pikrat-kreatinin-TOMA. Larutan organik kemudian dipisahkan dari larutan sampel dan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji validasi metode analisis kreatinin dengan menggunakan TOMA memiliki kelinearitas 98%, limit deteksi 1.089 ppm, SENS_{Scal} 0.0107, SENS_{Anal} 1.089, dan presisi 0.3705.

Kata kunci: kreatinine, reaksi Jaffe, ekstraksi, TOMA.

Abstract

This research has been conducted to develop an analysis method of creatinine. The Jaffe reaction is a common method used to analyze creatinine by spectrophotometry. In this method, creatinine is reacted with the picric acid in aqueous solution to produce a complex compound which can be analyzed by spectrophotometer UV-Vis. The method development of creatinine analysis was conducted by adding *Tri octyl methylammonium chloride* (TOMAC) in chloroform to produce the ion pair of picric acid-creatinine-TOMA. The chloroform was extracted from the solution and then analyzed by spectrophotometer UV-Vis. The result showed that the method validation of creatinine analysis using TOMA as a co ionic-pair had the linearity of 98%, detection limit of 1,089 ppm, SENS_{Scal} 0,0107, SENS_{Anal} 1,089 and precision 0,3705.

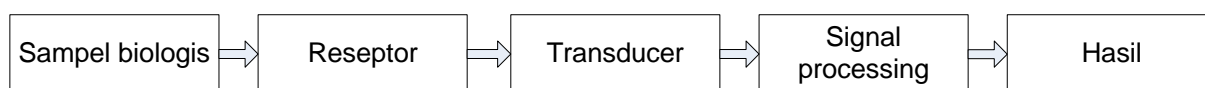
Keyword: creatinine, Jaffe reaction, extraction, TOMA

1. Pendahuluan

Ginjal (*renal*) merupakan salah satu bagian organ manusia yang penting karena fungsi dari ginjal adalah menyaring limbah hasil metabolisme tubuh dan nantinya akan dibuang bersamaan dengan urine. Salah satu asam organik yang ditemukan dalam jaringan otot adalah kreatin (BM = 113,12 g/mol) dan salah satu hasil metabolismenya adalah kreatinin.

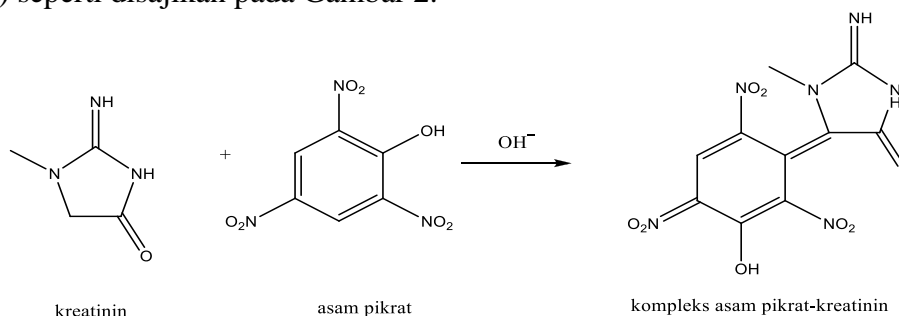
Konsentrasi kreatinin dalam air seni (*urine*) dan serum salah satu indikator yang penting dalam fungsi ginjal, oleh karena itu metode yang cepat secara klinis untuk analisis kreatinin menjadi penting (Bianchi *et al.*, 2007)

Prinsip analisis analit yang dihasilkan dari hasil metabolisme atau bioanalit secara umum disajikan pada Gambar 1. Sampel biologis bereaksi dengan reseptor yang dapat berupa antibodi, enzim, sel, atau *Molecular Imprinted Polymer* (MIP) dan jaringan tumbuhan atau hewan. Transducer merupakan proses untuk mengetahui interaksi antara reseptor dengan bionaliti. Teknik yang biasa digunakan mengetahui interaksi reseptor dan bioanalit adalah dengan menggunakan perubahan sifat kimia, optik atau fisika (Mohabbati-Kalejahi *et al.*, 2012).



Gambar 1 Tipikal analisis bioanalit

Metode analisis kreatinin dengan menggunakan reaksi Jaffe merupakan metode standar yang banyak digunakan untuk analisis kreatinin secara spektrofotometri. Kreatinin direaksikan dengan asam pikrat dalam suasana basa sehingga menghasilkan kompleks yang berwarna orange yang kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis (Mitchell, 1975; Narayanan and Appleton, 1980). Reaksi yang terjadi antara asam pikrat dan kreatinin mengikuti mekanisme reaksi Jaffe (de Arujo *et al.*, 2012 dan Sergeyeva *et al.*, 2013) seperti disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2 Skema reaksi Jaffe

Namun demikian, metode ini banyak memiliki kelemahan karena sangat dipengaruhi oleh senyawa lain seperti kratin, bilirubin, hemoglobin, cefoxitin, cephalothin (Kroll and Elin, 1983), dan streptomycin (Syal *et al.*, 2013).

Triethyl methyl ammonium chloride (TOMAC) adalah garam ammonium kuartener yang biasa digunakan sebagai katalis transfer fasa. TOMAC banyak digunakan dalam ekstraksi logam berat dan asam (Uslu, 2008, dan Goyal *et al.*, 2011). Pelarut polar dan donor proton seperti alkohol cocok digunakan untuk pelarut amine karena memberikan koefisien distribusi tertinggi akibat adanya ikatan hidrogen antara pelarut dengan kompleks amin (Uslu, 2008). Pelarut organik dapat digunakan sebagai pelarut TOMAC seperti yang dilakukan oleh Goyal *et al.* (2011) untuk mengekstraksi kromium dalam limbah cair dan Assaker dan Dhabbi (2011) yang menggunakan TOMAC untuk mengekstraksi Cu secara elektrodposisi. Dari uraian tersebut, dapat diketahui bahwa TOMAC memiliki muatan positif yang diharapkan akan bereaksi dengan kompleks pikrat-kreatinin yang memiliki muatan parsial negatif menjadi pasangan ion TOMA-pikrat-kreatinin. Pasangan ion TOMA-

pikrat kreatinin kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV Vis. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis kreatinin secara spektrofotometri dengan menggunakan pengompleks TOMA-pikrat dan menguji validitas metode pengembangan analisis kreatinin secara spektrofotometri

2. Metode Penelitian

2.1 Bahan dan Alat

Bahan penelitian yang digunakan antara lain kreatinin, asam pikrat, *Tri Octylmethylammonium chloride* (TOMAC), kloroform, dan NaOH, yang masing-masing berasal dari MERCK. Sedaangkan peralatan yang digunakan berupa spektrofotometer UV-Vis GBC Cintra 2020.

2.2 Prosedur

2.3.1 Penentuan Waktu Optimum

a. Tanpa TOMA

Larutan kreatinin 100 ppm sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam botol kaca, kemudian ditambahkan larutan pikrat 100 ppm sebanyak 1 mL dan NaOH 0,5 M sebanyak 1 mL. Larutan didiamkan selama 15, 30, 45, 60, dan 90 menit. Larutan kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-600 nm.

b. Dengan TOMA

Larutan kreatinin 100 ppm sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam botol kaca, kemudian ditambahkan larutan pikrat 100 ppm sebanyak 2 ml dan NaOH 0,5 M sebanyak 1 mL. Larutan didiamkan selama 15, 30, 45, 60, dan 90 menit. Ke dalam botol dimasukkan kloroform sebanyak 5 mL dan TOMA sebanyak 200 μ L. Botol dikocok dan kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-600 nm.

2.3.2 Penentuan Konsentrasi Pikrat Optimum.

a. Tanpa TOMA

Larutan kreatinin 100 ppm sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam botol, kemudian ditambahkan larutan pikrat 37, 75, 100, 150, dan 200 ppm sebanyak 1 mL dan NaOH 0,5 M sebanyak 1 mL. Larutan didiamkan selama 15, 30, 45, 60, dan 90 menit. Larutan kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-600 nm.

b. Dengan TOMA

Larutan kreatinin 100 ppm sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam botol kaca, kemudian ditambahkan larutan pikrat 37, 75, 100, 150, dan 200 ppm sebanyak 2 ml dan NaOH 0,5 M sebanyak 1 mL. Larutan kemudian didiamkan selama 15, 30, 45, 60, dan 90 menit dan ditambah kloroform sebanyak 5 mL dan TOMA sebanyak 200 μ L. Botol dikocok dan kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-600 nm.

2.3.3 Menguji validitas metode

Penentuan validitas metode dilakukan sesuai dengan penelitian Jurado et.al (2006). Linearitas kurva kalibrasi dilakukan dengan cara melakukan pengukuran beberapa rentang konsentrasi dari terendah sampai tertinggi, pengukuran diulang minimal 2 kali kemudian

diukur *slope* (b), *intersep*(a), *correlation determination* (R), dan *correlation coefficient* (r). Standar deviasi regression (Sr), standar deviasi slope (Sb), linearitas (LIN_{ol}(%)) dihitung dengan cara = 100(1-Sb/b). Presisi metode dihitung dengan menggunakan persamaan

$$S_c = \sqrt{\left(\frac{S_r}{b}\right)^2 \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right) + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 (c - \bar{c})} \quad (1)$$

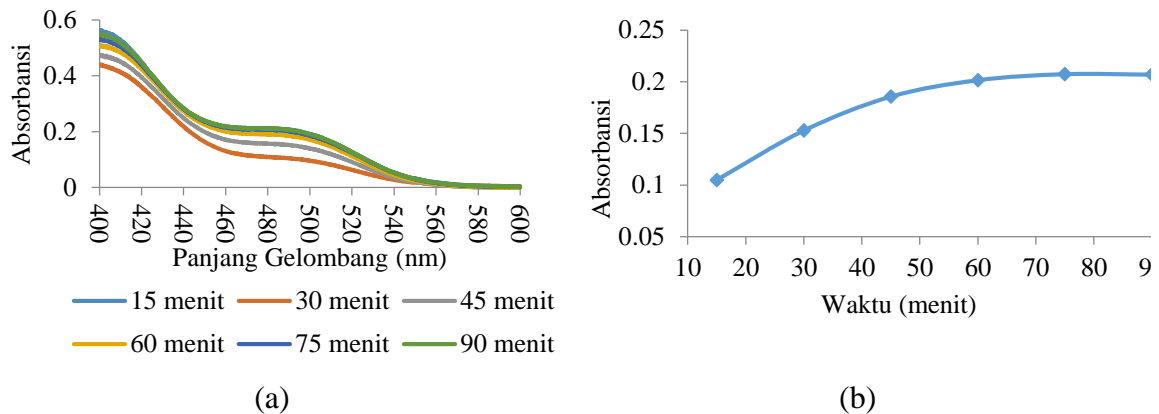
Dimana: m = jumlah data, n = jumlah pengulangan, c = konsentrasi, \bar{c} = konsentrasi rata-rata. *Detection Limit* (DL) ditentukan dengan cara $S_{co} \times 3$. Sensitivitas metode dilakukan dengan cara $SENS_{cal} = \text{slope}$ dan $SENS_{anal} = Sr/b$.

3. Hasil dan Pembahasan

Analisis kreatinin dalam sampel dilakukan dengan membandingkan 2 metode, yaitu metode standar yang menggunakan reaksi Jaffe dan pengembangan metode reaksi Jaffe, yaitu dengan menggunakan TOMA dengan pelarut kloroform. TOMA digunakan sebagai pasangan ion untuk menarik kompleks asam pikrat dan kreatinin ke dalam pelarut kloroform. Penentuan pertama dalam pengembangan metode adalah menentukan kondisi optimum dalam analisis kreatinin yang meliputi penentuan panjang gelombang optimum, penentuan waktu optimum, penentuan konsentrasi pikrat optimum. Selanjutnya penentuan validasi metode yang meliputi uji kelinearitas, limit deteksi, presisi, dan sensitivitas.

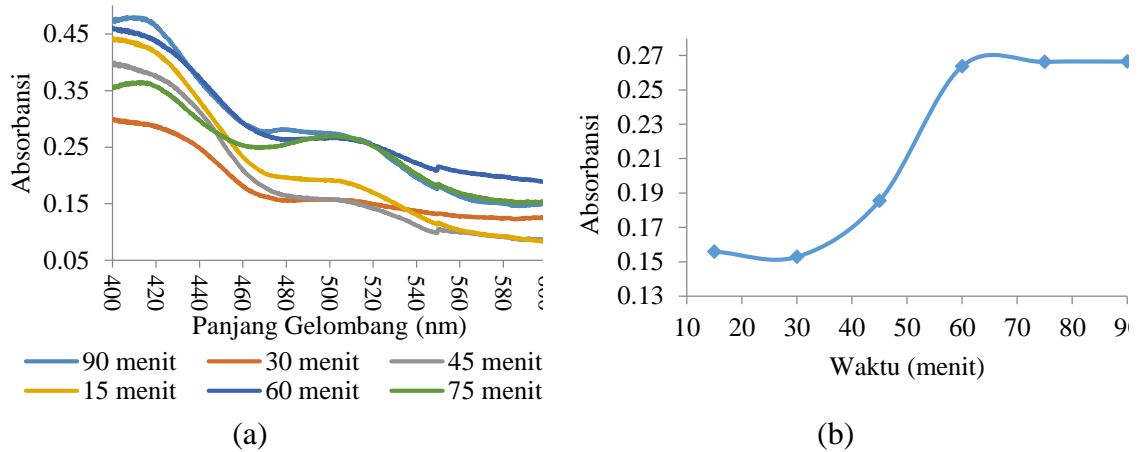
3.1 Penentuan panjang gelombang dan waktu optimum

Gambar 3 (A) menunjukkan bahwa panjang gelombang optimum analisis kreatinin tanpa TOMA pada 490 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Owen et al, 1954 bahwa panjang gelombang maksimum untuk analisis kreatinin dengan menggunakan reaksi Jaffe adalah 490 nm. Kompleks pikrat dan kreatinine membentuk warna merah, sehingga warna yang diserap adalah biru-kehijauan. Waktu kestabilan kompleks pikrat-kreatinin diperoleh pada 60 menit seperti yang terlihat pada Gambar 3 (B).



Gambar 3 Kurva a) Perbandingan Variasi Waktu Pikrat-Kreatini Tanpa TOMA dan b) Grafik Variasi Waktu Pikrat-Kreatinin pada $\lambda = 490$ nm

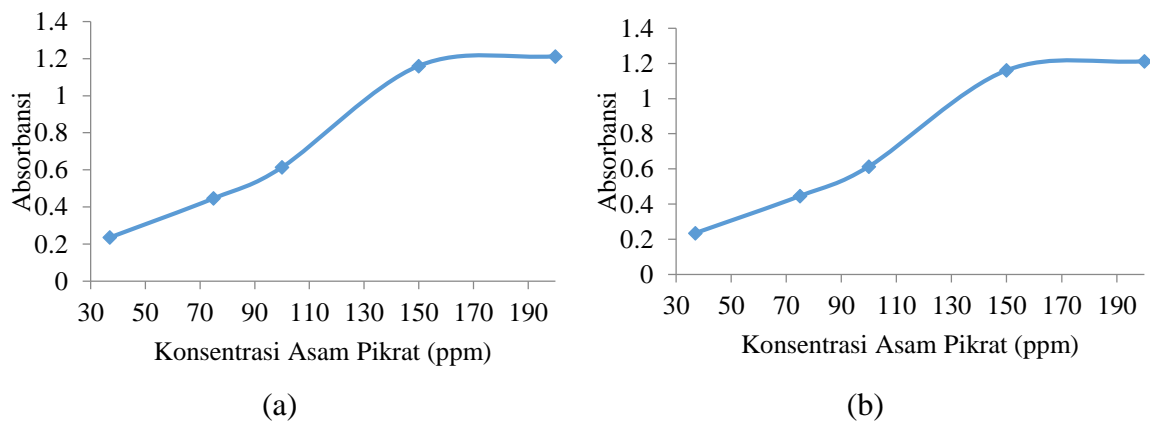
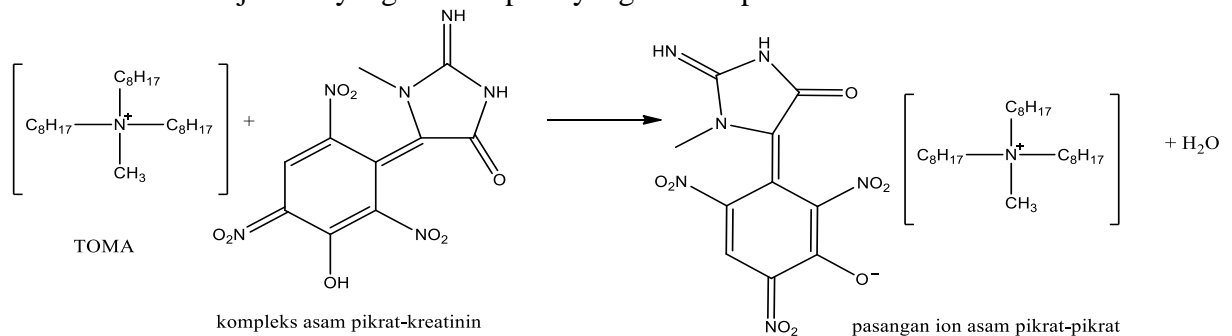
Modifikasi reaksi Jaffe dilakukan dengan menggunakan TOMA pada pelarut kloroform sebagai pasangan ion. Hasil yang sama juga didapatkan waktu optimum sebesar 60 menit seperti yang terlihat pada Gambar 4 (A). Terjadi pergeseran panjang gelombang maksimum, yaitu pada 510 nm. Hal ini kemungkinan disebabkan karena penambahan senyawa TOMA sebagai pasangan ion menambah delokalisasi elektron sehingga menurunkan perbedaan energi dari orbital π ke orbital π^* .



Gambar 4 Kurva Perbandingan Variasi Waktu Pikrat-Kreatini Dengan TOMA dan b) Variasi Waktu Pikrat-Kreatinin pada $\lambda = 510 \text{ nm}$

3.2 Penentuan Konsentrasi Asam Pikrat

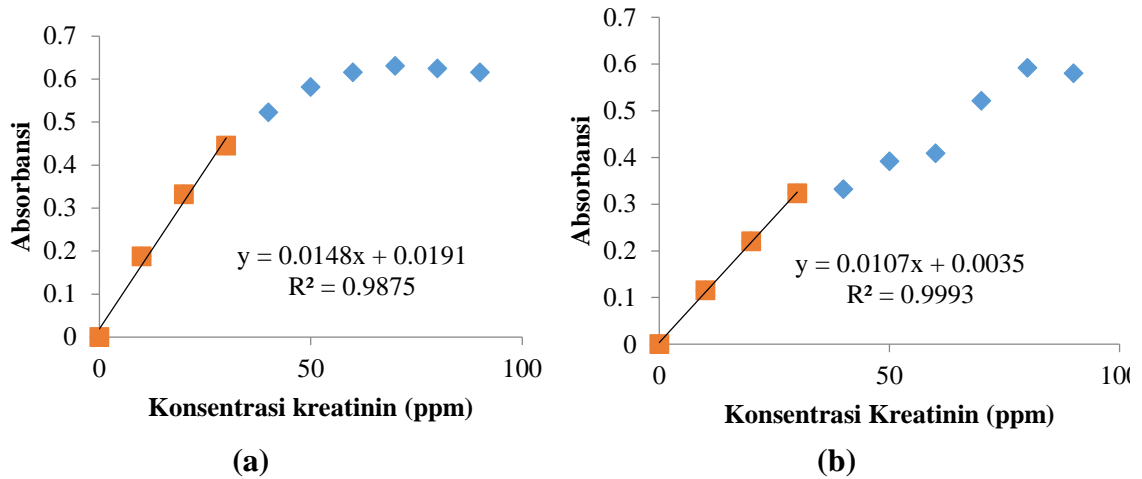
Penentuan konsentrasi pikrat sebagai pengompleks kreatinin diperoleh nilai optimum pada 150 ppm baik metode standar tanpa TOMA dan pengembangan metode standar dengan menggunakan TOMA (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa mol pikrat yang bereaksi dengan kreatinin pada metode standar tanpa TOMA dan dengan penambahan TOMA memiliki jumlah yang sama seperti yang terlihat pada reaksi berikut:



Gambar 5. Kurva Perbandingan Variasi Konsentrasi Pikrat-Kreatinin a) tanpa TOMA dan b) dengan TOMA

3.3 Penentuan Validasi Metode

Penentuan validasi metode dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi kreatinin dari 0 – 90 ppm. Gambar 6 menunjukkan kondisi dimana pada konsentrasi 0-30 ppm memiliki kelinearitas yang tinggi baik untuk metode standar tanpa TOMA maupun metode standar dengan penambahan TOMA.



Gambar 6. Kelinearitas a) Konsentrasi Kreatinin Tanpa TOMA dan b) Konsentrasi Kreatinin Dengan TOMA

Tabel 1 Ringkasan Validasi metode

Metode	Linearitas	R ²	Limit deteksi	Limit kuantifikasi	Sensitivitas	
					SENS _{cal}	SENS _{anal}
Metode standar tanpa TOMA	92,050%	0,987	4,073	13,577	0,0148	1,778
Metode standar dengan TOMA	98,086%	0,999	1,089	3,630	0,0107	1,089

Tabel 2 Perbandingan presesi 2 metode

Konsentrasi	Presisi (Sc)	
	Tanpa TOMA	Dengan TOMA
0	1,3223	0,3630
10	1,3460	0,3680
20	1,3692	0,3730
30	1,3921	0,3779
Rata-rata	1,3570	0,3705

Tabel 1 menunjukkan bahwa kelinearitas pengembangan metode standar dengan penambahan TOMA lebih baik dari metode standar tanpa TOMA, yaitu memiliki kelinearitas sebesar 98%, sedangkan metode standar tanpa TOMA hanya memiliki kelinearitas 92%. Linearitas mengindikasikan dispersi data disekitar garis kalibrasi lebih baik atau kurang baik dan menentukan linearitas dari rentang kalibrasi. Kelinearitas ini menunjukkan bahwa pada pada rentang konsentrasi 0 – 30 ppm, pengembangan metode

standar dengan penambahan TOMA lebih baik dalam analisis kreatinin. Limit deteksi merupakan konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi oleh suatu prosedur analitik. Limit deteksi pengembangan metode standar dengan TOMA sebesar 1,089 ppm yang berarti bahwa metode ini mampu mendeteksi konsentrasi kreatinin terkecil hingga 1,089 ppm, lebih baik dari metode standar tanpa TOMA yang hanya mampu mendeteksi kreatinin terkecil hingga 4,073 ppm. Limit kuantifikasi adalah konsentrasi minimum yang dapat diukur oleh suatu metode analisis dengan besar presisi dan akurasi yang dapat diterima. Terlihat pada Tabel 1 bahwa limit kuantifikasi metode standar tanpa TOMA sebesar 13,577 ppm lebih besar dari metode standar dengan TOMA sebesar 3,630 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa modifikasi metode standar mampu memberikan hasil yang lebih baik karena mampu mendeteksi kreatinin hingga 3,630 ppm dengan presisi dan akurat.

Metode standar tanpa TOMA mampu memberikan perubahan absorbansi 1,778 setiap perubahan 1 ppm kreatinin, dan metode ini mampu membedakan perubahan konsentrasi kreatinin sebesar 0,0148 ppm. Untuk pengembangan metode standar dengan TOMA mampu memberikan perubahan absorbansi 1,089 setiap perubahan 1 ppm kreatinin, dan mampu membedakan perubahan konsentrasi kreatinin setiap perubahan 0,0107 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa sensitivitas pengembangan metode standar dengan penambahan TOMA lebih baik daripada metode standar tanpa TOMA.

Tabel 2 menunjukkan bahwa presisi kedua metode memiliki nilai yang hampir konstan yang menunjukkan bahwa ke dua metode ini memiliki presisi yang cukup tinggi. Namun demikian, pengembangan metode dengan penambahan TOMA memiliki nilai presisi yang lebih kecil dari metode standar tanpa TOMA, sehingga presisi pengembangan metode dengan penambahan TOMA lebih baik daripada metode standar tanpa penambahan TOMA.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa, pengembangan metode analisis kreatinin dengan menggunakan TOMA sebagai pasangan ion kompleks pikrat-kreatinin dalam pelarut organik sebagai alternatif dalam analisis kreatinin dalam sampel. Pengembangan metode standar memberikan uji validasi metode yaitu kelinearitas, limit deteksi, sensitivitas dan presisi yang lebih baik daripada metode standar tanpa penambahan TOMA.

Daftar Pustaka

- Assaker, I.B. and Dhahbi, M., 2011, Electrochemical Study and Electrodeposition of Copper in The hydrophobic Tri-n-octylmethylammonium chloride ionic liquid media, *j.mol.liq.* 161, 1, 13-18
- Bianchi, M.C., Tosetti, M., Battini, R., Leuzzi, V., Alessandri, M.G., Carducci, C., Antonozzi, and I., Cioni, G., 2007, Treatment Monitoring of Brain Creatine Deficiency Syndromes: A ¹H- and ³¹P-MR Spectroscopy Study, *AJR Am J.Neuradiol* 28, 3, 548-554
- de Arujo, W.R., Salles, M.O., and Paixo, T.R.L.C, 2012, Development of An Enzymeless electroanalytical Method for The Indirect Detection of Creatinine in Urine Samples, *Sensor and Actuators B* 173, 847-851
- Goyal, R.R., Jayakumar, N.S., and Hashim, M.A., 2011, Chromium removal by emulsion liquid membrane using [BMIM] +[NTf₂] – as stabilizer and TOMAC as extractant, *Desalination*, 278, 50-56
- Jurado, E., Fernandez-Serrano, M., Nunez-Olea, J., Luzon, G., and Lechuga, M., 2006, Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants:

- Applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests, *Chemosphere*, 65, 278–285
- Kroll, M.H. and Elin, R.J., 1983, Mechanism of Cefoxitin and Cephalothin Interference With The Jaffé Reaction Method for Creatinine, *Clin.Chem.*, Vol. 29, . No.12, 2044-2048
- Mitchell, R.J., 1973, Improved Method for Specific Determination of Creatinine in Serum and Urine, *Clin. Chem.*, Vol. 19, No. 4, 408-410.
- Mohabbati-Kalejahi, E., Azimirad, V., Bahrami, M., and Ganbari, A., 2012, A Review on Creatinine Measurement Techniques, *Talanta* 97, 1-8.
- Narayanan, S. and Appleton, H.D., 1980, Creatinine: A Review, *Clin. Chem.*, Vol.26, . No. 8, 1119-1126
- Owen, J.A., Iggo, B., Scandrett, F.J.,and Stewart, C.P., 1954, The determination of creatinine in plasma or serum and in urine: A critical examination. *Biochem. J.* 58, 426
- Sergeyeva, T.A., Gorbach, L.A., Piletska, S.A., Brovko, O.O., Honcharova, L.A., Lutsyk, O.D., Sergeeva, L.M., Zinchenko, O.A., and El'skaya, A.V., 2013, Colorimetric Test System for Creatinine Detection Based on Composite Molecularly Imprinted Polymer Membranes, *Anal. Chim. Acta.* 770, 161-168
- Syal, K., Srinivasan, A., and Banrjee, D., 2013, Case report: Sterptomycin Interference in Jaffe Reaction – Possible False Positive Creatinine Estimation in Excessive Dose Exposure, *Clin. Chem.*, Vol. 46, 177-179.
- Uslu, 2008, Extraction of citric acid in 2-octanol and 2-propanol solutions containing tomac: an equilibria and a LSER model, *Braz. J. Chem. Eng.*, 25, 3, 553-,561