

PENENTUAN KREATININ DALAM URIN SECARA KOLORIMETRI DENGAN SEQUENTIAL INJECTION-FLOW REVERSAL MIXING (SI-FRM)

Colorimetric Determination of Creatinine in Urin with Sequential Injection-Flow Reversal Mixing (SI-FRM)

Hermin Sulistyarti¹, Akhmad Sabarudin¹, Yudha Ikoma Istanti¹, Eka Ratri Noor Wulandari¹

¹ Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia
sulistyarti@yahoo.com

ABSTRAK

Sequential injection analysis (SIA), generasi kedua dari sistem injeksi alir telah dikembangkan untuk penentuan kreatinin sebagai indeks medis kegagalan ginjal kronis. Pendeteksian kreatinin didasarkan pada reaksi Jaffe yang terjadi antara kreatinin dan asam pikrat dalam medium basa untuk membentuk senyawa berwarna merah-oranye. Absorbansi dari senyawa yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 530 nm. Dalam penelitian ini, suatu konsep baru dari SIA yang disebut "lab-at-valve" dikembangkan dengan menambahkan suatu *Valve Mixing* sebagai tempat untuk memaksimalkan pembentukan senyawa antara kreatinin dan alkali-pikrat. Parameter-parameter yang mempengaruhi metode ini antara lain laju alir produk, waktu *delay*, volume sampel, volume reagen, konsentrasi reagen dan senyawa pengganggu telah dipelajari secara rinci. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa kondisi optimum akan tercapai pada laju alir 20 $\mu\text{L}/\text{detik}$, waktu *delay* 5 detik, komposisi penggunaan 100 μL sampel dengan 300 μL reagen (asam pikrat 0,03 M dan NaOH 3 %) sehingga limit deteksi pada penentuan kreatinin yang dihasilkan sebesar 3,01 $\mu\text{g}/\text{g}$. Aplikasi dari metode ini ditujukan untuk penentuan kreatinin dalam sampel urin.

Kata kunci : Kreatinin, reaksi Jaffe, SI-VM, RGB kolorimetri, urin

ABSTRACT

Sequential injection analysis (SIA), a second-generation of Flow Injection system has been developed for the determination of creatinine as an index of chronic renal failure. Creatinine detection was measured by Jaffe's reaction between creatinine and picrate in alkaline medium to form a colored product (red-orange). The absorbance was measured at wavelength of 530 nm. In this system, a new concept of SIA, called "lab-at-valve (LAV)", has been developed by designing of a valve mixing to maximize formation of creatinine-alkaline picrate compound. The influence of variables such as effect of rate flow of product, delay time, sample volume, reagent volume, reagent concentration, and interference was investigated. The results showed that optimum conditions was obtained at flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{s}$, delay time of 5 s, the composition of 100 μL sample volume with 300 μL reagent volume (0.03 M picrate acid and 3 % NaOH) and detection limit of creatinine is 3.01 $\mu\text{g}/\text{g}$. Application of the proposed method was successfully applied to the determination of creatinine in urine samples.

Keywords : Creatinine, Jaffe's reaction, SI-VM, RGB colorimetry, urine

PENDAHULUAN

Dewasa ini, tingginya tingkat kematian merupakan masalah utama bagi kesehatan manusia. Penyakit ginjal memang belum mencapai sepuluh penyebab utama kematian di Indonesia, akan tetapi kelompok penyakit ini semakin banyak ditemukan pada berbagai jenis pelayanan kesehatan. Pola penyakit ini sering cepat berubah, sejalan dengan perubahan kondisi sosial-ekonomi-budaya. Dikemudian hari, diduga di Indonesia penyakit ginjal akan meningkat dalam jumlah dan kepentingan.

Kreatinin adalah zat racun dalam darah, terdapat pada seseorang yang ginjalnya sudah tidak berfungsi dengan normal. Senyawa ini dihasilkan ketika terjadi kontraksi pada otot. Dalam darah, kreatinin dihilangkan dengan proses filtrasi melalui glomerulus ginjal dan disekresikan dalam bentuk urin. Ginjal yang sehat menghilangkan kreatinin dari darah dan memasukkannya pada urin untuk dikeluarkan dari tubuh (Anonim, 2009). Analisis kadar kreatinin dalam tubuh merupakan indeks medis yang penting untuk mengetahui kondisi laju filtrasi glomerulus, keadaan ginjal, dan berfungsinya kerja otot (Spiritia, 2009)

Metode yang sering digunakan untuk penentuan kreatinin adalah metode analisis secara kolorimetri melalui reaksi Jaffe. Reaksi Jaffe merupakan reaksi yang sederhana dan mudah. Metode ini didasarkan pada pembentukan senyawa berwarna merah-oranye yang terjadi

antara asam pikrat dengan kreatinin dalam suasana basa (Siangproh *et al.*, 2009). Dalam aplikasinya, reaksi Jaffe umumnya dilakukan dengan menggunakan metode *batch*. Metode *batch* sering digunakan untuk menyempurnakan reaksi Jaffe yaitu dengan cara mereaksikan kreatinin dengan asam pikrat dalam suatu penangas listrik, namun dikarenakan jumlah sampel yang dibutuhkan besar maka dibutuhkan jumlah reagen yang banyak dengan konsentrasi yang tinggi sehingga mengakibatkan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai kesempurnaan reaksi memerlukan waktu yang lama yaitu sekitar 30 menit (Faria & Pasquini, 1992). Untuk mengatasi kelemahan pada metode *batch* maka diperkenalkan metode analisis berbasis teknik alir dengan menggunakan sistem *sequential injection analysis* (SIA). Penggunaan SIA ditujukan untuk mempercepat proses analisis, mengefisienkan penggunaan reagen, analisis secara otomatis dan memperkecil larutan yang dibuang sehingga menghemat pemakaian reagen yang harganya mahal dan berbahaya (Christian, 2005). Siangproh *et al.* (2009), melakukan penentuan kreatinin yang didasarkan pada reaksi Jaffe dengan menggunakan metode SIA. Parameter yang diteliti yaitu konsentrasi Na-pikrat dan NaOH, volume sampel serta reagen, dan jumlah *flow reversal*. Akan tetapi dalam aplikasinya kurang efektif karena

proses analisis menggunakan laju alir yang lambat yaitu 50 $\mu\text{L}/\text{menit}$ selain itu tidak adanya tempat untuk bercampurnya sampel dan reagen sehingga dimungkinkan reaksi pembentukan senyawa kreatinin-pikrat tidak berjalan dengan sempurna.

Untuk itulah dikembangkan suatu konsep terbaru dari SIA yaitu *Lab-at-Valve* (LAV) yang merupakan suatu teknik analisis *on-line* yang sederhana dan ekonomis. Komponen pada SIA-LAV disusun hampir sama dengan teknik SIA sebelumnya, hanya saja ditambahkan suatu *separating chamber* yang diletakkan di *port* 1 pada *selection valve* sebagai tempat terjadinya reaksi antara reagen dan sampel. Spektrofotometer akan mendeteksi secara langsung pada *separating chamber* sehingga proses yang terjadi di dalamnya dapat langsung diketahui (Burakham *et al.*, 2005)

Pengembangan metode SIA-LAV ini telah dilakukan pada penelitian yang dilakukan oleh Wulandari (2010), hanya saja sebagai tempat terjadinya reaksi antara reagen dan sampel dibuat suatu *mixing coil* dan pada prosesnya untuk menyempurnakan reaksi pembentukan senyawa kreatinin-pikrat dilakukan pembentukan segmen antara sampel dan reagen di *holding coil* yang selanjutnya dilakukan proses *flow reversal* pada *mixing coil*. Pada pengaplikasiannya metode ini cukup efektif dimana proses analisis berlangsung cepat yaitu 12 sampel/jam, penggunaan sedikit reagen

dan sensitifitas tinggi (limit deteksi 5,69 $\mu\text{g}/\text{g}$).

Berdasarkan uraian diatas, maka pada penelitian ini digunakan suatu metode pengaplikasian dari metode SIA-LAV yang disebut dengan *Sequential Injection-Valve Mixing* (SI-VM). Metode ini merupakan metode alternatif dari metode SI-FRM yang telah dilakukan oleh Wulandari (2010)^[7]. Sebagai tempat untuk terjadinya reaksi antara asam pikrat dan kreatinin dibuat suatu *valve mixing* dimana untuk penyempurnaan reaksi pembentukan senyawa kreatinin-pikrat dilakukan dengan pendiaman sampel dan reagen dalam *valve mixing* selama jangka waktu tertentu. Proses yang lebih sederhana dari penelitian Wulandari (2010) ini diharapkan akan lebih mempercepat proses analisis yang dilakukan tetapi tetap mempertahankan sensitifitas yang tinggi. Untuk meningkatkan absorbansi dari kreatinin dilakukan optimasi parameter yang meliputi laju alir produk, volume sampel dan reagen yang dipakai, waktu *delay* dan konsentrasi asam pikrat serta NaOH yang digunakan. Sebelum dilakukan aplikasi penentuan kreatinin dalam sampel urin, dilakukan terlebih dahulu penelitian mengenai pengaruh senyawa-senyawa yang terdapat pada sampel urin yang dapat mengganggu terhadap pengukuran kadar kreatinin. Senyawa pengganggu yang diuji dalam penelitian ini yaitu kreatin. Kemudian dilakukan aplikasi metode SI-VM untuk penentuan kadar

kreatinin pada sampel urin. Hasil dari reaksi antara asam pikrat dan kreatinin dalam suasana basa tersebut akan dideteksi secara *on-line* menggunakan RGB kolorimeter.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: peralatan gelas, oven, neraca analitis Mettler, botol semprot, pipet mikro 1 mL dan 5 mL, seperangkat alat SI-VM yang terdiri dari *syringe pump* (SP; Hamilton, Reno, Nevada, USA) dengan kapasitas volume 2,5 mL, delapan *selection valve* (SL; Hamilton, Reno, Nevada, USA), pompa dan detektor berupa RGB kolorimeter yang dikontrol melalui komputer.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bahan kimia pro analisis (p.a) yaitu padatan kreatinin (Sigma-Aldrich, Co., Jerman), kreatin (Sigma-Aldrich, Co., Jerman), asam pikrat (Sigma-Aldrich, Co., Jerman), natrium

hidroksida (SAP Kemika), asam nitrat 65 % (Merck KGaA, Jerman), kecuali etanol *technical grade* (SAP Kemika), sampel urin dan akuades yang bukan merupakan bahan kimia pro analisis.

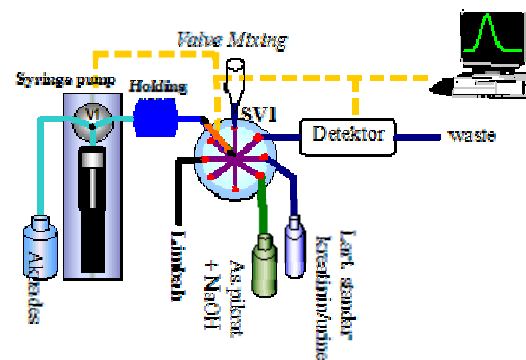
Penentuan Parameter Optimum secara *on line*

Penentuan laju alir optimum produk dilakukan menggunakan cara *on-line*, yaitu dengan alat SI-VM yang dirangkai dengan komputer. Adapun gambar dari alat tersebut ditunjukkan pada Gambar 1.

Penentuan laju alir optimum produk dilakukan melalui 4 tahap berikut ini:

Tahap 1: Pencucian line dan detektor

Pada tahap ini dilakukan pengkondisian alat dengan cara: *switching valve* (SV) berada pada posisi mengisi dan *syringe pump* (SP) mengambil 2100 μL Akuades untuk dialirkan menuju *holding coil* (HC) melalui *port 2* dengan laju alir 30 $\mu\text{L}/\text{detik}$, *port 3* dengan laju alir 50 $\mu\text{L}/\text{detik}$ dan melalui *port 4* dengan laju alir 50 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Tahap ini dilakukan sebanyak tiga kali agar dihasilkan kondisi alat yang benar-benar bersih saat digunakan



Gambar 1 Rangkaian Alat SI-VM

Tahap 2: Pengisian Line dengan larutan

Pada tahap ini dilakukan pengisian line-line yang akan digunakan dengan cara: SV berada pada posisi "OUT" dan SP mengambil 500 μL larutan standar kreatinin dan 500 μL reagen dari *port* 3 dan 4 yang akan dikeluarkan melalui *port* 7 dengan laju 50 $\mu\text{L}/\text{detik}$.

Tahap 3: Pendeteksian kreatinin

Pada tahap ini dilakukan absorbansi larutan standar kreatinin dideteksi dengan cara: SV berada pada posisi "OUT" dan SP mengambil masing-masing 150 μL larutan standar kreatinin dan larutan asam pikrat-NaOH untuk dialirkan menuju *port* 1 dengan laju alir 5 $\mu\text{L}/\text{detik}$, kemudian dilakukan *delay* yang dilanjutkan dengan mengalirkan larutan campuran ini menuju detektor. Langkah berikutnya yaitu mengalirkan akuades kedalam detektor untuk membawa sisa-sisa larutan yang masih tertinggal. Nilai Absorbansi yang diperoleh akan terbaca oleh komputer.

Penentuan Kreatinin dalam Urin secara on line

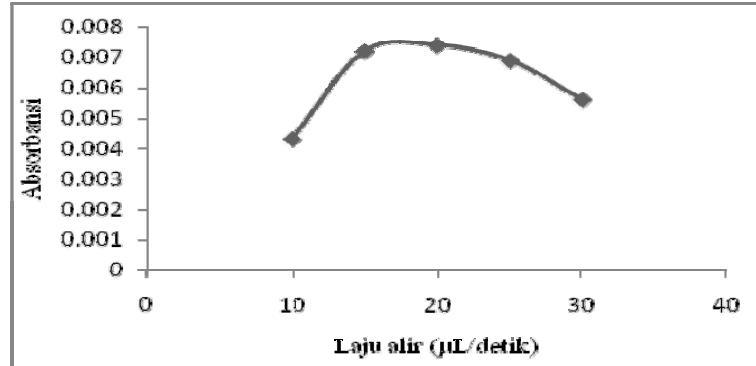
Pada penentuan kadar kreatinin dalam urin dilakukan prosedur seperti pada penentuan optimasi parameter dengan menggunakan seluruh kondisi optimum dari parameter yang digunakan. Sebelum digunakan urin diencerkan 30 kali dengan akuades. kemudian dilakukan prosedur seperti di atas. Nilai absorbansi diplotkan ke dalam kurva baku untuk mengetahui kadar kreatinin dalam sampel urin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Parameter

Parameter Fisik

Penentuan laju alir optimum produk dilakukan dengan cara memvariasi kecepatan laju alir menuju ke detektor sehingga akan dihasilkan nilai absorbansi kreatinin yang berbeda pada berbagai tingkatan laju alir. Besarnya laju alir produk yang melalui detektor dapat mempengaruhi absorbansi kreatinin yang diperoleh, dikarenakan laju alir akan mempengaruhi proses pembentukan senyawa kreatinin-pikrat, cepat lambatnya analisis serapan senyawa kreatinin-pikrat yang mampu dibaca oleh detektor dan proses dispersi yang terjadi antara senyawa kreatinin-pikrat dengan *carrier* (akuades). Sesuai dengan Gambar 2 maka laju alir 20 $\mu\text{L}/\text{s}$ dipilih sebagai laju alir optimum ke detektor karena diperoleh sensitivitas yang paling tinggi. Waktu *delay* dapat mempengaruhi proses pembentukan senyawa kreatinin-pikrat yang terjadi karena berpengaruh terhadap lamanya waktu kontak antara sampel dan reagen. Semakin lama waktu kontak antara sampel dan reagen maka senyawa kreatinin-pikrat yang terbentuk akan semakin stabil, sehingga absorbansi yang diperoleh akan semakin tinggi. Namun waktu kontak yang terlalu lamapun dapat menurunkan absorbansi.

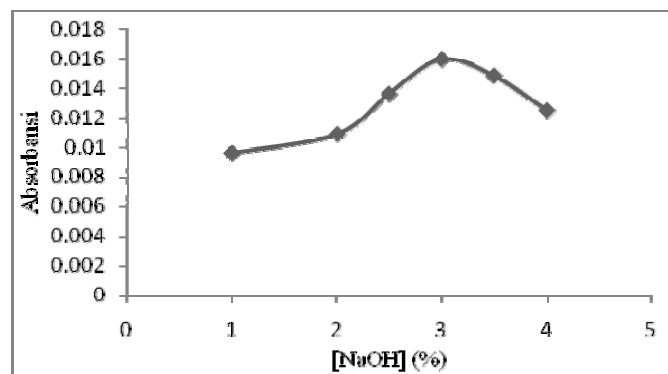


Gambar 2 Grafik Penentuan Laju Alir Optimum Produk

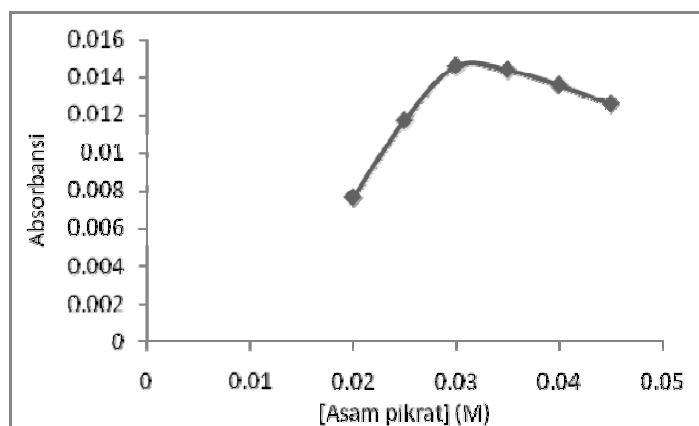
Hal ini dikarenakan senyawa kreatinin-pikrat yang tadinya telah terbentuk dapat terdispersi ke dalam *carrier* (akuades) sehingga terjadi penurunan absorbansi yang diperoleh. Waktu delay optimum yaitu 5 detik.

Volume reagen (larutan Na-pikrat) yang digunakan dalam penelitian ini juga perlu diteliti karena berpengaruh terhadap jumlah volume sampel yang mampu untuk membentuk senyawa dengan sejumlah volume reagen tertentu. Perlunya untuk menentukan volume reagen optimum, karena apabila reagen yang digunakan

dalam jumlah yang sedikit maka tidak akan mampu untuk membentuk senyawa kreatinin-pikrat dengan seluruh kreatinin yang ada. Sedangkan apabila volume reagen yang digunakan terlalu banyak maka selain pemborosan penggunaan reagen konsentrasi larutan sampel juga akan mengalami pengenceran dan besarnya pengenceran yang terjadi harus diperhitungkan kembali. Variasi volume reagen yang digunakan yaitu 150, 300, 450, 600, dan 750 µL. Volume reagen optimum yaitu 300 µL.



Gambar 3 Grafik Penentuan Konsentrasi NaOH Optimum



Gambar 4 Grafik Penentuan Konsentrasi Asam Pikrat Optimum

Optimasi volume sampel ditentukan untuk meminimumkan penggunaan sampel tetapi tetap mempertahankan sensitifitas yang tinggi dengan tingkat ketelitian yang besar (Siangproh *et al.*, 2009).

Absorbansi yang diperoleh berbanding lurus dengan volume sampel yang digunakan, absorbansi akan terus meningkat sejalan dengan bertambahnya volume sampel yang digunakan hingga keadaan *steady state* tercapai (Ruzicka & Hansen, 1988).

Volume sampel optimum yang dipilih adalah 100 μL dikarenakan pada penggunaan volume sampel 100 μL seluruh kreatinin yang ada tepat berikatan dengan sejumlah reagen yang telah disediakan.

Parameter Kimia

Pengaruh konsentrasi NaOH sebagai reagen untuk pembentuk suasana basa dalam pembentukan senyawa kreatinin-pikrat perlu diteliti karena konsentrasi NaOH yang digunakan akan

mempengaruhi pembentukan senyawa kreatinin-pikrat (Siangproh *et al.*, 2009).

Sesuai Gambar 3 maka konsentrasi NaOH optimum yaitu 3% karena pada konsentrasi tersebut sensitifitas pengukuran lebih tinggi.

Pengaruh konsentrasi asam pikrat yaitu sebagai reagen untuk pembentuk senyawa dengan kreatinin. Berdasarkan Gambar 4 maka dapat diketahui bahwa absorbansi semakin meningkat dengan semakin bertambahnya konsentrasi asam pikrat, dan absorbansi akan mulai berkurang pada konsentrasi 0,035 M dan seterusnya. Konsentrasi asam pikrat 0,03 M dipilih sebagai konsentrasi optimum dikarenakan asam pikrat pada konsentrasi lebih tinggi dari konsentrasi tersebut tidak meningkatkan sensitifitas. Konsentrasi asam pikrat yang tinggi menyebabkan jumlah asam pikrat semakin banyak sehingga kelebihan asam pikrat yang tidak bereaksi dengan kreatinin akan bereaksi dengan ion Na^+ dari NaOH dan dihasilkan endapan Na-pikrat.

Tabel 1. Penentuan kadar kreatinin dalam sampel urin

No	Sampel	Konsentrasi Sampel ($\mu\text{g/g}$)
1	Urin 1	759,37 \pm 3,213
2	Urin 2	853,12 \pm 0,643
3	Urin 3	1415,6 \pm 1,928

Aplikasi SI-VM untuk Pengukuran Kreatinin dalam Urin

Aplikasi SI-VM pada penentuan kreatinin dalam sampel urin dilakukan pada beberapa sampel urin yang telah diperoleh. Seluruh sampel urin yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan pengenceran sebanyak 30 kali dengan menggunakan akuades.

Dari hasil uji analisa kadar kreatinin dalam urin diperoleh nilai absorbansi yang kemudian diplotkan dengan menggunakan kurva baku kreatinin dengan persamaan garis lurus yang diperoleh yaitu $y = 0,00016x + 0,00670$, sehingga akan diperoleh besarnya konsentrasi kreatinin yang terdapat dalam masing-masing urin.

Berdasarkan hasil uji sampel urin pada kondisi optimumnya diperoleh hasil analisa yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa konsentrasi kreatinin yang terdapat pada masing-masing urin berbeda-beda pada

berbagai individu tergantung dari berbagai faktor seperti jenis kelamin, berat badan, kebiasaan hidup sehari-hari misalnya banyaknya konsumsi air putih serta macam makanan yang berbeda-beda yang dikonsumsi pada setiap individu.

KESIMPULAN

Metode SI-VM dapat direkomendasikan sebagai metode penentuan kadar kreatinin, hal ini dikarenakan metode yang digunakan memiliki sensitifitas yang tinggi dengan limit deteksi sebesar 3,01 $\mu\text{g/g}$ dan waktu analisis selama ± 2 menit. Kondisi optimum penentuan kreatinin dengan menggunakan metode SI-VM berlangsung pada kondisi laju alir produk 20 $\mu\text{L/detik}$, waktu *delay* 5 detik, volume sampel/larutan standar 100 μL dan volume reagen (asam pikrat 0,03 M dan NaOH 3%) 300 μL .

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2009, *Urin Test*, http://kidshealth.org/parent/general/body_basics/kidneys_urinary.html
- Burakham, R., J. Jakmunee, and K. Grudpan, 2005, *Development of Sequential Injection Lab at Valve (SI-LAV) Micro Extraction Instrumentation for the Spectrophotometric Determination of an Anionic Surfactant*, Thailand
- Christian, S., 2005, *FIA/SIA Principles*, <http://www.flowinjection.com/method2.aspx>
- Faria, L.C. and C. Pasquini, 1992, Spectrophotometric Determination Of Creatinine by Monosegmented Continuous-Flow Analysis, *Journal of Automatic Chemistry*, 14(3): 97-100
- Ruzicka, J., and E.H. Hansen, 1988, *Flow Injection Analysis 2nd Edition*, John Willey & Sons, Inc, New York, USA ISBN 0-471-81355-9
- Siangproh, W., N. Teshima, T. Sakai, S. Katoh, O. Chailapakul, 2009, Alternative Method for Measurement of Albumin/Creatinine Ratio Using Spectrophotometric Sequential Injection Analysis, *Talanta*, 79:1111-1117
- Wulandari, E.R.N, 2010, *Penentuan Kreatinin dalam Urin Secara Kolorimetri dengan Sequential Injection-Flow Reversal Mixing (SI-FRM)*, Skripsi Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- Yayasan Spiritia, (2009), *HIV dan Penyakit Ginjal*, <http://spiritia.or.id/>