

GAMBARAN KADAR ALBUMIN MURNI SKALA MIKROGRAM YANG DIUKUR SECARA SPEKTROFOTOMETER UV SETELAH DIADSORPSI MAGNETIT (Fe_3O_4)

Muhamad Rifky Fauzi^{1*} · Ayi Furqon² · Ellsie Viendra Permana³

¹Teknologi Laboratorium Medis (D3), Fakultas Ilmu dan Teknologi Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Cimahi, Jawa Barat, Indonesia

e-Mail: rifqi2650@gmail.Com

No Tlp WA: 085524692306

Abstract

Urinalysis is one type of examination to asses kidney function abnormalities, one of which is proteinuria. Analytical methods for protein diagnosis should cover the presece of protein in urine ranging from 0,01 mg/dL to 10 mg/dL. Before the validation of the magnetite adsorbent-based protein quantification methode in patient urine, research was first carried out on pure analytes, albumin. This study aims to determine the level of albumin by UV spectrophorometer method after adsorption of magnetite (Fe_3O_4). The research method used is a descriptive method with the sample used being albumin dissolved in TRIS Buffer pH 7,4 0,05 M with a concentration of 5 - 40 mg/dL. The results of measuring albumin levels in the range of 5 - 40 mg/dL with a wavelength of 280 nm using the UV spectrophotometer method obtained linear curve results as evidenced by the coefficient (R^2) $y = 0,0188x + 0,0131$ and adsorption by magnetite (Fe_3O_4) with an average amount of adsorption of 17,5%. Based on the results of measuring albumin levels in the range of 5 - 40 mg/dL with a wavelength of 280 nm using the UV spectrophotometer, a linear curve and adsorption by magnetite (Fe_3O_4) with an average adsorption of 17,5% were obtained.

Keywords: Albumin, Magnetite, Proteinuria

Abstrak

Urinalisis adalah salah satu jenis pemeriksaan untuk menilai kelainan fungsi ginjal salah satunya adalah proteinuria. Metode analitik diagnosis protein harus mencakup keberadaan protein dalam urin mulai dari 0,01 mg/dL hingga 10 mg/dL. Sebelum validasi metode kuantifikasi protein berbasis adsorben magnetit pada urin pasien, terlebih dahulu dilakukan penelitian pada analit murni yaitu albumin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar albumin dengan metode spektrofotometer UV setelah diadsorpsi magnetit (Fe_3O_4). Metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif dengan sampel yang digunakan adalah albumin yang dilarutkan dalam buffer TRIS pH 7,4 0,05 M dengan konsentrasi 5 - 40 mg/dL. Hasil pengukuran kadar albumin pada rentang 5 - 40 mg/dL dengan panjang gelombang 280 nm menggunakan metode spektrofotometer UV diperoleh hasil kurva linear yang dibuktikan dengan koefisien (R^2) $y=0,0188x + 0,0131$ serta adsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4) dengan besaran rata-rata adsorpsi 17,5%. Berdasarkan hasil pengukuran kadar albumin pada rentang 5 - 40 mg/dL dengan panjang gelombang 280 nm menggunakan metode spektrofotometer UV diperoleh hasil kurva linear serta adsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4) dengan besaran rata-rata adsorpsi 17,5%.

Kata Kunci: Albumin, Magnetit, Proteinuria

PENDAHULUAN

Urin adalah cairan di dalam tubuh yang dapat digunakan untuk diagnosis medis pasien. Urinalisis adalah salah satu jenis pemeriksaan bagi pasien untuk menilai kelainan fungsi ginjal, karena penelitian medis telah menunjukkan bahwa orang dengan konsentrasi protein tinggi dalam urinnnya menderita berbagai jenis penyakit ginjal yang dikenal sebagai proteinuria (Aitekenov dkk., 2020).

Beberapa peneliti sulit menganalisis urin karena mengandung campuran kompleks komponen anorganik dan organik, mulai dari molekul dengan massa molar kecil hingga polimer (Barratt & Topham, 2013). Metode analitik untuk diagnosis proteinuria harus mencakup keberadaan protein dalam urin mulai dari 0,01 mg/dL hingga 10 mg/dL (Huang dkk., 2020).

Terdapat dua metode dalam pemeriksaan proteinuria, yaitu metode kualitatif dan metode kuantitatif. Keberadaan protein dalam urin secara sederhana dengan menggunakan metode kualitatif dapat dilakukan dengan cara carik celup, tetapi metode ini hanya bisa mendeteksi keberadaan protein secara kualitatif atau juga semi kuantitatif (-, +1, +2, atau +3) (Untari, 2022). Sehingga, dibutuhkan metode kuantitatif dalam pemeriksaan protein urin untuk mengetahui kadar protein dalam urin tersebut, deteksi kadar protein dalam urin yang umum dipakai adalah menggunakan Pyrogallol Red (Yalamati dkk., 2015). Tetapi, metode Pyrogallol red memiliki limit deteksi yaitu 1 mg/dL.

Partikel nano magnetit (Fe_3O_4) atau *Black Iron Oxide* yang dikenal sebagai oksida besi hitam, adalah oksida logam paling magnetit dan merupakan bahan magnetit dengan ukuran kurang dari 100 nanometer (Kurniawan dkk., 2017). Partikel nano magnetit (Fe_3O_4) yang direkayasa untuk aplikasi biomedis dirancang untuk mengikat protein, protein ini teradsorpsi pada permukaan partikel nano magnetit (Fe_3O_4) dengan membentuk lapisan yang disebut "Protein Corona" (Calatayud dkk., 2014).

Spektrofotometri UV-Vis adalah teknik analitik yang menggunakan panjang gelombang UV dan Visible (sinar tampak) sebagai daerah serapan untuk mengidentifikasi suatu senyawa, pemeriksaan yang dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis relatif cepat dibandingkan metode lainnya (Handoyo Sahumena dkk., 2020).

Berdasarkan penelitian (Rahdar, dkk., 2019) mengatakan bahwa *Bovine Serum Albumin* (BSA) murni dapat diikat oleh adsorben magnetit dengan ukuran <100 nm dalam waktu 120 menit. Sedangkan pada penelitian (Furqon & Puspa Kania, 2022) mengatakan bahwa partikel magnetit dengan ukuran *submicron* dapat menangkap molekul protein serum secara cepat.

Namun, sebelum validasi metode kuantifikasi protein berbasis adsorben magnetit pada urin pasien, terlebih dahulu dilakukan penelitian pendahuluan adsorpsi pada analit murni. Penelitian ini menggunakan albumin murni sebagai analit murni.

Terdapat tujuan dalam penelitian ini meliputi tujuan umum yaitu untuk mengetahui kadar albumin dengan metode spektrofotometer UV setelah diadsorpsi magnetit (Fe_3O_4) dan tujuan khusus yaitu menentukan kurva linearitas pengukuran albumin murni rentang 5 - 40 mg/dL pada pengukuran panjang gelombang 280 nm serta menghitung persentase adsorpsi albumin murni oleh adsorben magnetit dalam waktu 15 menit.

BAHAN DAN METODE

Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif dengan langkah-langkah penelitian dimulai dengan pelarutan albumin dalam buffer TRIS pH 7,4 0,05 M, kemudian penambahan magnetit (Fe_3O_4) submicron ukuran (<10.000 nm), selanjutnya proses adsorpsi albumin oleh magnetit (Fe_3O_4) dibantu oleh rotator, dilanjutkan dengan proses pemisahan magnetit menggunakan magnet *neodymium* dengan membuang supernatan dan menyisakan *pellet* berupa magnetit (Fe_3O_4) yang sudah mengadsorpsi albumin, setelah itu dilakukan elusi menggunakan NaCl 1 M,

kemudian dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm, dan terakhir dilakukan linearitas pengujian.

Populasi dalam penelitian ini adalah larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang dilarutkan dalam buffer TRIS pH 7,4 0,05 M. Sedangkan untuk sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) dalam buffer TRIS pH 7,4 0,05 M dengan konsentrasi 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL, 20 mg/dL, 25 mg/dL, 30 mg/dL, 35 mg/dL, dan 40 mg/dL.

Data pada penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh dari pengukuran albumin menggunakan alat spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 280 nm yang kemudian hasil absorbansi masing-masing variasi konsentrasi dicatat dan diolah menggunakan Uji Regresi Linear serta disajikan dalam bentuk kurva garis lurus (*XY Scatter*). Apabila nilai koefisien (R^2) > 0,9 menunjukkan linearitas pengukuran yang baik.

HASIL

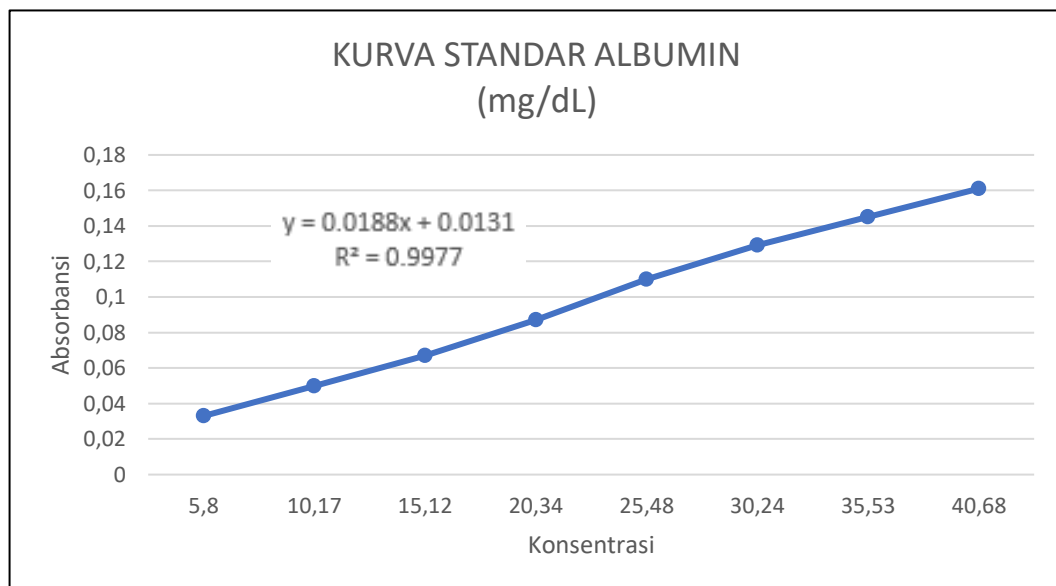
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan albumin sebagai sampel dalam penelitian ini kemudian dilarutkan dalam buffer TRIS pH 7,4 0,05 M dengan konsentrasi albumin terdiri dari 5 - 40 mg/dL.

Larutan albumin dibuat dalam larutan stok dengan konsentrasi 40 mg/dL kemudian dilakukan pengenceran gradual sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan. Selanjutnya, dilakukan pengukuran pada albumin tersebut dengan menggunakan alat spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm sebelum diadsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4). Hasil absorbansi pengukuran albumin sebelum teradsorpsi dengan magnetit (Fe_3O_4) disajikan dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 1. Absorbansi Pengukuran Albumin Sebelum Diadsorpsi
Magnetit (Fe_3O_4)

Konsentrasi Albumin (mg/dL)	Pengukuran Ke-1	Pengukuran Ke-2	Rata-Rata Absorbansi
5,8	0,026	0,039	0,033
10,17	0,041	0,059	0,050
15,12	0,065	0,068	0,067
20,34	0,083	0,090	0,087
25,48	0,109	0,110	0,110
30,24	0,127	0,130	0,129
35,53	0,145	0,145	0,145
40,68	0,159	0,163	0,161

Hasil pengukuran albumin murni tersebut dibuat menjadi kurva linearitas dan diperoleh persamaan garis linear. Kurva linearitas dan persamaan garis linear disajikan dalam bentuk gambar tersebut:



Gambar 1. Kurva Standar Albumin

Berdasarkan kurva tersebut, maka diperoleh persamaan garis yaitu $y=0,0188x + 0,0131$ serta kurva linearitas diperoleh hasil yang linear dengan nilai koefisien (R^2) sebesar 0,9977. Setelah itu, kurva standar dan persamaan tersebut digunakan untuk menentukan kadar albumin yang

teradsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4). Hasil kadar albumin setelah bereaksi dengan magnetit (Fe_3O_4) disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil Adsorpsi Albumin Oleh Magnetit (Fe_3O_4)

Kadar Albumin Sebelum Adsorpsi (mg/dL)	Kadar Albumin yang Teradsorpsi (mg/dL)	% Albumin yang Teradsorpsi	<i>p-value</i>
5,8	0,6	11,1	0,001
10,17	1,7	17,2	
15,12	2,4	16,3	
20,34	3,4	17,0	
25,48	5,2	20,6	
30,24	6,0	19,8	
35,53	6,8	19,3	
40,68	7,4	18,5	

DISKUSI

Albumin adalah protein paling melimpah dalam sirkulasi darah dan merupakan komponen utama yang bertanggung jawab untuk adsorpsi asam lemak, anion, ion logam, antioksidan, dan molekul kecil serta partikel nano lainnya yang bersirkulasi (Jahanban Esfahlan dkk., 2019). Salah satu jenis albumin yang berasal dari hewan adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan ketersediaannya yang melimpah, biaya rendah, dan penggunaan umum yang memudahkan hasil standarisasi oleh seorang peneliti (Elsadek & Kratz, 2013).

Pada penelitian kadar albumin skala mikrogram sampel yang digunakan berupa *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang kemudian dilarutkan dalam Buffer TRIS pH 7,4 0,05 M. Protein seperti albumin memiliki lingkungan yang optimal salah satunya adalah pH, buffer TRIS dengan pH 7,4 dalam molekul yang kompleks seperti albumin tetap stabil dibandingkan dengan larutan buffer yang lain serta penggunaan pH 7,4 juga

dapat memberikan kondisi pada parikel menjadi netral (Rahdar dkk., 2019).

Berdasarkan metode dari Warburg-Christian bahwa uji protein dapat dilakukan dengan menggunakan alat Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm (Gunarti dkk., 2020). Metode ini hanya dapat membaca protein yang mengandung triptofan, sehingga metode ini memiliki kelemahan yaitu, ketika terdapat protein yang kandungan triptofannya sedikit, maka kadar protein keseluruhan akan terbaca lebih rendah dibanding kadar sebenarnya. Albumin mengandung asam amino jenis triptofan sebesar 60%, triptofan mengandung molekul yang berbentuk cincin sehingga sinar polikromatis yang ditembakkan diserap oleh cincin aromatis yang terdapat dalam larutan (Wahjuni, 2014).

Hasil dari rata-rata pengukuran albumin dibuat dalam kurva standar sehingga diperoleh persamaan garis. Berdasarkan hasil pembuatan kurva standar diperoleh persamaan garis $y=0,0188x + 0,00131$ dan diperoleh hasil yang linear dengan nilai koefisien (R^2) sebesar 0,9977. Hasil nilai koefisien (R^2) yang mendekati 1 menunjukkan adanya hubungan yang baik antara konsentrasi dengan absorbansi pada rentang tersebut (Sugiyono, 2017). Kurva standar dan persamaan garis yang diperoleh tersebut digunakan untuk menentukan kadar albumin yang teradsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4) dengan nilai y adalah absorbansi yang terukur setelah diadsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4) dan nilai x adalah kadar albumin setelah diadsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4).

Larutan albumin yang telah ditambahkan magnetit (Fe_3O_4) sebanyak 0,1 gram selanjutnya dilakukan proses *shaking* dengan rotator selama 15 menit. Magnetit (Fe_3O_4) yang direkayasa dalam aplikasi biomedis dirancang untuk mengikat protein, protein tersebut akan teradsorpsi pada permukaan magnetit (Fe_3O_4) dengan membentuk lapisan pada dinding magnetit (Fe_3O_4) membentuk lapisan yang disebut dengan "*Protein Corona*" (Calatayud dkk., 2014). Penggunaan magnetit (Fe_3O_4) dalam penelitian ini karena magnetit merupakan anorganik yang awet, protein seperti albumin dapat diadsorpsi sekaligus dipisahkan dengan mudah.

Penggunaan magnetit yang berukuran submicron juga berguna agar albumin lebih cepat diikat karena memiliki permukaan yang lebih luas dibanding dengan ukuran yang lebih kecil seperti nano.

Proses *shaking* dengan menggunakan rotator selama 15 menit diperoleh hasil adsorpsi yang signifikan dengan besaran adsorpsi rata-rata sebesar 17,5%. Waktu pada saat proses *shaking* dengan menggunakan rotator sangat berpengaruh terhadap albumin yang teradsorpsi pada magnetit (Fe_3O_4), hal ini dibuktikan oleh penelitian (Rahdar dkk., 2019) diperoleh hasil adsorpsi yang signifikan sebesar 90% pada konsentrasi 50 mg/dL dengan waktu reaksi antara albumin dan magnetit (Fe_3O_4) selama 120 menit.

Setelah dilakukan proses *shaking* dengan menggunakan rotator, ditempelkan magnet pada bagian luar tabung reaksi dan supernatan pada larutan tersebut dibuang kemudian dilakukan elusi dengan menggunakan NaCl 1 M serta diukur dengan spektrofotometer UV. Proses pengerjaan seharusnya dilakukan pengukuran pada supernatan yang telah dilakukan *shaking* karena hal tersebut akan memperoleh hasil yang lebih optimal.

Ikatan yang terjadi pada albumin dengan magnetit (Fe_3O_4) merupakan ikatan hidrogen. OH^- pada magnetit (Fe_3O_4) akan berikatan dengan albumin sehingga menjadi Fe_3O_4 -Albumin (Nguyen dkk., 2021). Penggunaan NaCl 1 M pada proses elusi karena NaCl merupakan larutan garam yang memiliki ikatan ionik paling kuat serta dapat mengganggu ikatan antara magnetit (Fe_3O_4) dengan albumin, sehingga pada proses elusi ion klorida pada NaCl akan berikatan magnetit (Fe_3O_4) sehingga albumin akan dilepas di dalam larutan tersebut (Calatayud dkk., 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengukuran kadar albumin pada rentang 5 mg/dL - 40 mg/dL dengan pengukuran pada panjang gelombang 280 nm menggunakan metode spektrofotometer UV diperoleh hasil kurva linear serta adsorpsi oleh magnetit (Fe_3O_4) dengan besaran rata-rata 17,5%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada seluruh pihak yang membantu penulis dalam penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan

REFERENSI

- Aitekenov, S., Gaipov, A., & Bukasov, R. (2020). Review: Detection and quantification of proteins in human urine. *Journal of Talanta* (Vol. 223).
- Barratt, J., & Topham, P. (2013). Urine proteomics: The present and future of measuring urinary protein components in disease. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* (Vol. 177, No.4, 361-368).
- Calatayud, M. P., Sanz, B., Raffa, V., Riggio, C., Ibarra, M. R., & Goya, G. F. (2014). The Effect of Surface Charge of Functionalized Fe₃O₄ Nanoparticles On Protein Adsorption and Cell Uptake. *Biomaterials* (Vol.35, NO.24, 6389-6399).
- Elsadek, B., & Kratz, F. (2013). Impact of albumin on drug delivery - New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release* (Vol.157, No.1, 4-28).
- Furqon, A., & Puspa Kania, P. (2022). Magnetite Beads Binding to Human Serum Protein. *KnE Medicine* (Vol.2, No.2, 343-350).
- Gunarti, D. R., Kartika, M., & Sadikin, M. (2020). Properties of a Thiamine Binding Protein Purified From Mung Bean. *Pharmacognosy Journal* (Vol.12, No.2, 266-270).
- Handoyo Sahumena, M., Ruslin, R., Asriyanti, A., & Nurrohwiata Djuwarno, E. (2020). Identifikasi Jamu Yang Beredar Di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research* (Vol.2, No.2, 65-72).
- Huang, Y., Yang, X., Zhang, Y., Yue, S., Mei, X., Bi, L., Zhai, W., Ren, X., Ding, Y., Zhang, S., Deng, Z., & Sun, Y. (2020). Correlation of Urine Protein/Creatinine Ratios To 24-h Urinary Protein For Quantitating Proteinuria in Children. *Pediatric Nephrology* (Vol.35 No,3, 463-468).
- Jahanban Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol.138, 602-617).

-
- Kurniawan, R. A., Astuti, A., & Muldarisnur, M. (2017). Pengaruh Penambahan Asam Laurat Terhadap Sifat Fisis dan Magnetik Nanopartikel Fe₃O₄. *Jurnal Fisika Unand*, (Vol.6, No.4, 362-367).
- Nguyen, M. D., Tran, H., Xu, S., & Lee, T. R. (2021). Fe₃O₄ Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications. *Applied Science*.
- Rahdar, S., Rahdar, A., Ahmadi, S., & Trant, J. F. (2019). Adsorption of Bovine Serum Albumin (BSA) by Bare Magnetite Nanoparticles With Surface Oxidative Impurities That Prevent Aggregation. *NRC Research Press*.
- Sugiyono. (2017). *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, R & D*. Bandung: Alfabeta.
- Untari, J. (2022). Analisis Pemeriksaan Protein Bence Jones pada Urin Lansia dengan Metode Osgood Untari. *Penelitian Kesehatan Suara Forikes* (Vol.13, 362-364).
- Wahjuni, S. (2014). *Dasar-Dasar Biokimia Edisi Pertama*. Denpasar: Udayana University Press.
- Yalamati, P., Bhongir, A. V., Karra, M., & Beedu, S. R. (2015). Comparative Analysis of Urinary Total Proteins by Bicinchoninic Acid and Pyrogallol.
-