



PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

**TEKNIK PENGUKURAN BILIRUBIN BEBAS
PADA PENYAKIT BAYI KUNING (KERNIKTERUS)**

**BIDANG KEGIATAN:
PKM Artikel Ilmiah**

Diusulkan oleh:

LELI NURFITRIYANI (G84070046/2007)

AGENG WIYATNO (G84070047/2007)

REZA WISNU KUSUMA (G84080060/2008)

**INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2011**





LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Kegiatan : Teknik Pengukuran Bilirubin Bebas pada Penyakit Kernikterus
2. Bidang Kegiatan : PKM-AI
3. Bidang Ilmu : Kesehatan
4. Ketua Pelaksana Kegiatan :

5. Anggota Pelaksana Kegiatan/ Penulis : 2 orang
6. Dosen Pembimbing

Bogor, 1 Maret 2011

Menyetujui,
Ketua Departemen Biokimia

Ketua Pelaksana Kegiatan

Dr. I Made Artika, M.App. Sc
NIP 19630117 198903 1 000

Leli Nurfitriyani
NIM G84070046

Wakil Rektor
Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

Dosen Pendamping

Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS
NIP 19581228 198503 1 003

Dimas Andrianto, S.Si, M.Si
NIP 19831119 200912 1 003



PERNYATAAN SUMBER PENULISAN ILMIAH PKM-AI

1. Judul yang diajukan : Teknik Pengukuran Bilirubin pada penyakit Bayi Kuning (Kernikterus).
2. Sumber penulisan : Kegiatan Praktik Lapangan di Laboratorium Energi Transduksi dan Keanekaragaman Genetik Lembaga Biologi Molekuler Eijkman.

Keterangan ini kami buat dengan sebenarnya.

Mengetahui,
Ketua Departemen Biokimia

Bogor, 1 Maret 2011
Ketua Pelaksana kegiatan

Dr. I Made Artika, M.App. Sc
NIP 19630117 198903 1 000

Leli Nurfitriyani



TEKNIK PENGUKURAN BILIRUBIN BEBAS PADA BAYI KUNING (KERNIKTERUS)

Leli Nurfitriyani, Ageng Wiyatno, Reza Wisnu Kusuma
Institut Pertanian Bogor

Abstrak

Bilirubin merupakan senyawa biomolekul yang menarik untuk dipelajari. Kadar bilirubin yang tinggi dapat menimbulkan pengendapan kristal bilirubin di jaringan otak yang dikenal sebagai ABE (Acute Bilirubin Encephalopathy) (1). ABE menyebabkan gangguan pendengaran dan keterbelakangan mental terutama pada bayi kuning. Penyebab utama gangguan tersebut adalah bilirubin bebas yang dapat diukur dengan metode peroksidase. Metode ini menghasilkan korelasi yang lebih baik dengan ABE daripada metode konvensional. Oleh karena itu, pengukuran kadar bilirubin bebas diusulkan untuk mengganti metode konvensional. Hasil pengukuran bilirubin bebas yang diperoleh untuk konsentrasi bilirubin:BSA 0,8 dan 0,9 sebesar 202,6 nM dan 251,2 nM. Namun perlu pengukuran lebih lanjut untuk menurunkan deviasi yang tinggi.

Kata kunci : bilirubin, bayi kuning, metode peroksidase

Abstract

Bilirubin is very interesting object to study. High levels of bilirubin concentration causing precipitation of crystals bilirubin in brain tissue, known as ABE (Acute Bilirubin Encephalopathy) (1). It leads to hearing loss and mental retardation in infants. The main cause of this disorder is free bilirubin in the blood that can be measure with peroxidase method. This method associated better with ABE than conventional method. Therefore, measurement of free bilirubin levels are proposed to replace the conventional method. Data results from this measurement is 202,6nM and 251,2 nM for bilirubin:BSA ratio 0.8 and 0.9. However, further analysis is needed to reduce high level of standard deviation.

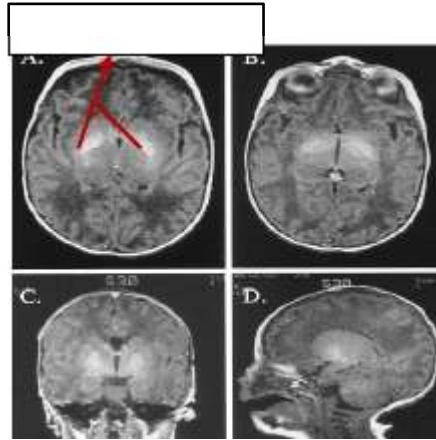
Keywords: bilirubin, jaundice, peroxidase method

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penelitian tentang bilirubin telah dilakukan satu abad yang lalu. Namun beberapa aspek terkait bilirubin belum banyak diketahui dan masih kontroversial, diantaranya struktur molekul bilirubin dalam lingkungan fisiologis, toksisitas, dan pencegahan bayi kuning (kernikterus) (1).

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Gambar 1 Kristal bilirubin di dalam jaringan otak bayi *Acute Bilirubin Encephalopathy* (2)

Bilirubin merupakan produk utama dari degradasi hemoglobin melalui pembukaan cincin heme pada ikatan karbon alfa (2). Bilirubin yang lipofilik dapat menembus membran sel dan mengganggu aktivitas sel, sehingga bilirubin bersifat toksik. Batas konsentrasi bilirubin dalam darah adalah 50 mg/dL, konsentrasi lebih tinggi dapat merusak jaringan otak dan neuroglial (3). Dokter dan ilmuwan akhirnya menemukan fakta bahwa yang bersifat toksik terhadap sel dan jaringan (terutama otak) adalah bilirubin bebas (Bf), yaitu pada konsentrasi di atas 50 mg/dL, namun mekanisme toksisitasnya belum diketahui (4).

Bilirubin bebas menjadi parameter penting bagi toksisitas bilirubin (5). Pada penanganan Kernikterus, dokter selalu mengukur kadar Bt pada sirkulasi darah. Padahal Bt tidak berkorelasi baik dengan kelainan akibat bilirubin. Pengukuran Bf memungkinkan pendugaan yang lebih akurat terhadap efek bilirubin, lebih baik dalam penanganan dan terapi. Meskipun, sudah cukup jelas bahwa bilirubin total tidak spesifik sebagai alat prediksi ABE, usulan untuk mengganti metode klinis yang umum membutuhkan bukti yang kuat. Bukti tersebut untuk menunjukkan bahwa penggantian metode dapat mengurangi perlakuan yang tidak dibutuhkan sehingga dapat memperbaiki penanganan ABE. Pengukuran Bf berpotensi untuk menjadi parameter yang lebih baik.

Tujuan

Kegiatan ini bertujuan menguji keakuratan metode peroksidase dalam mengukur kadar bilirubin bebas pada konsentrasi 200 dan 300 nM dan membuktikan bahwa metode peroksidase layak digunakan untuk pengukuran bilirubin bebas.

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Praktik dilakukan selama dua bulan dari tanggal 1 Juli hingga 30 Agustus 2010. Kegiatan praktik ini dilakukan di Laboratorium Energi Transduksi dan Keanekaragaman Genetik Lembaga Biologi Molekuler Eijkman.



Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam praktik ini, diantaranya tabung Eppendorf™, tabung Falcon™ 25 dan 15 mL, alumunium foil, *plastic wrap*, gunting, tips (biru, kuning dan putih), *marker*, mikropipet, transfer pipet, tabung kaca 3 mL and 10 mL, *ice box*, Parafilm™, Hamilton™ *syringe*, *waterbath*, gas nitrogen, pH meter, spektrofotometer UV/Vis *Double Beam* (Perkin Elmer™), magnetik stirer Cimarec™ 2, *glass cuvette*, komputer (*software*:Lambda 25) *freezer*, kertas tisu, neraca Sartorius™. Sementara, bahan yang digunakan adalah bilirubin tak terkonjugasi (UCB) (Sigma Chemical Co.-Aldrich) yang telah dipurifikasi menggunakan metode McDonagh and Asisi, *horse radish peroxidase (Type 1 HRP, EC.1.11.1.7)*, dan Bovine Serum Albumin (BSA) fraksi V (bebas asam lemak) keduanya dari Sigma Aldrich. Reagen yang digunakan adalah hidrogen peroksida (H₂O₂, 30% b/v), kloroform, bufer fosfat, ketiganya dari Merck, aquades dan NaOH Kristal dari BDH.

Prosedur Kerja

Tahap pertama percobaan adalah persiapan assay. Sebelum digunakan, bilirubin harus dialiquot terlebih dahulu dari stok bilirubin. Prosedur yang digunakan dalam membuat aliquot bilirubin dilakukan berdasarkan metode manipulasi bilirubin (6). Larutan bilirubin kemudian dibagi ke dalam beberapa tabung kaca sesuai dengan jumlah bobot bilirubin yang diinginkan. Kloroform pada tiap tabung diuapkan dengan inkubasi di atas *waterbath* dengan suhu 60°C.

Stok HRP 1 mg/mL dibuat dengan melarutkan kristal HRP sebanyak 1 mg ke dalam bufer fosfat. Aliquot HRP dibuat dengan konsentrasi 1 mg/mL tiap tabung, aliquot disimpan dalam *freezer* -80 °C. Hal ini dilakukan agar efektivitas dan aktivitas enzim tetap terjaga. Tahap kedua, dilakukan pengukuran Kp. Kristal bilirubin sebanyak 50 µg dilarutkan dengan sempurna menggunakan NaOH 0.01 N dan ditambahkan air sebanyak 2,84 mL. Enzim disiapkan dari aliquot 1 mg/mL dan dipindahkan sebanyak 5 uL ke dalam tabung lain yang berisi 995 uL aquades, sehingga konsentrasinya menjadi 5 µg/mL.

Peroksida diperbaharui setiap harinya dengan mengencerkan 33,3 uL H₂O₂ 30% ke dalam 967 uL bufer fosfat, pH 7,4 sehingga konsentrasinya menjadi 1%. Pengukuran dilakukan dengan membaca serapan bilirubin pada panjang gelombang 440 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

Absorbansi awal menunjukkan konsentrasi bilirubin total yang terdapat di dalam campuran. Peroksida ditambahkan ke dalam campuran di tengah proses pembacaan, sehingga serapannya akan berkurang karena bilirubin teroksidasi. Nilai Kp dianalisis berdasarkan grafik yang dihasilkan di layar komputer menggunakan Δ absorbansi/menit.

Laju awal oksidasi digambarkan dengan kemiringan awal (paling curam) setelah penambahan peroksida. Garis datar pada grafik sebelum penambahan peroksida adalah absorbansi bilirubin total (Bt). Konsentrasi Bt di awal pengukuran Kp dipertahankan sebanyak 2 µM berdasarkan metode pengukuran bilirubin bebas pada serum bayi baru lahir (7). Nilai tersebut digunakan untuk menghitung Bf. Nilai Kp HRP diukur dengan mengamati laju awal oksidasi bilirubin bebas. Bilirubin total diukur dengan menggunakan rumus:



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

$$Bt \text{ (nM)} = \text{Initial Abs} / 47500$$

Setelah Kp diperoleh, pengukuran Bf mulai dilakukan. Pengukuran Bf ini menggunakan konsentrasi BSA 30 mM, untuk perbandingan [UCB/BSA] 0,8 dan 20 mM untuk perbandingan [UCB/BSA] 0,9. Larutan bilirubin-BSA dibuat dengan mencampurkan kristal BSA sebanyak 6,8 g untuk perbandingan [UCB/BSA] 0,8 dan 4,5 gram untuk perbandingan [UCB/BSA] 0,9. Pada pengukuran Bf, digunakan aliquot 200 μ M stok bilirubin yang dilarutkan pada dimetil sulfoksida (DMSO) 1:0,3(b/v). Konsentrasi total bilirubin dihitung dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 453 nm menggunakan rumus :

$$\text{Absorbansi} \times 49000 = [\text{Bt}] \text{ nM}$$

Konsentrasi stok HRP untuk pengukuran Bf adalah 0.75 mg/mL yang dibuat dengan mencampurkan 750 μ L HRP dari tabung HRP 1 mg/ml dengan 250 mL bufer fosfat. Campuran untuk pengukuran Bf adalah 992 μ L bufer-bilirubin-BSA, 3,3 μ L HRP 0,75 mg/mL dan 5 μ L H₂O₂ 1%, tabung kemudian dibalik 2 kali tanpa berbuih. Konsentrasi akhir HRP dalam campuran adalah 2,475 mg/mL. Langkah selanjutnya adalah mengukur Bf menggunakan persamaan :

$$Bf = \Delta \text{abs/min} / (K_p \times [\text{HRP}])$$

Konsentrasi bilirubin bebas dapat dihitung dari perbandingan [BSA]/[UCB].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi bilirubin pada bayi kernikterus dapat mencapai 500 nM. Penelitian sebelumnya telah menguji bilirubin bebas pada konsentrasi 20-150 nM. Namun, untuk menghasilkan data yang lebih valid, perlu digunakan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 200 dan 300 nM.

Konsentrasi bilirubin bebas diukur menggunakan metode peroksidase berdasarkan prinsip oksidasi bilirubin bebas menjadi senyawa yang tidak berwarna, sedangkan bilirubin yang terikat albumin tidak teroksidasi. Penurunan absorbansi digunakan sebagai acuan dalam mengukur oksidasi bilirubin.

Reaksi oksidasi bilirubin dikatalisis dengan bantuan enzim peroksidase. Oleh karena itu, pengukuran nilai Bf harus diawali dengan standardisasi enzim. Nilai standar aktivitas enzim peroksidase dilambangkan dengan Kp. Nilai Kp adalah laju oksidasi awal bilirubin dengan jumlah substrat yang mencukupi. Nilai Kp sangat ditentukan oleh aktivitas enzim. Jika aktivitas enzim berkurang, maka nilai Kp akan menjadi kecil dan tidak dapat digunakan untuk mengukur Bf.

Konsentrasi bilirubin total yang diperoleh pada pengukuran Kp harus dipertahankan sebanyak 2,0 μ M (7). Namun, pada kenyataannya hal ini belum dapat diperoleh, karena terjadinya pembentukan mikroagregat pada beberapa ulangan. Mikroagregat menghalangi transmisi cahaya yang melewati sampel, akibatnya intensitas cahaya yang diterima oleh reseptor spektrofotometer berubah-ubah. Hal itu membuat hasil pengukuran menjadi tidak konsisten. Konsentrasi bilirubin total yang diperoleh ditampilkan pada Tabel 1.



Tabel 1 Pengukuran rata-rata total bilirubin pada awal pengukuran Kp

Ulangan	Nilai rata-rata Bt (μM)	Ulangan	Nilai rata-rata Bt (μM)
1	1,6	6	1,4
2	1,8	7	1,8
3	2,0	8	1,5
4	1,8	9	1,6
5	1,8		

Tabel 2 Hasil pengukuran Kp

Ulangan	Rata-rata Bt(μM)	Kp	Standar deviasi	% Standar Deviasi
1	1,9	0,6460	0,3485	54,4025
2	1,8	0,7631	0,9718	127,3516
3	2,0	0,2694	0,0865	32,1180
4	1,9	0,3761	0,1050	27,9978
5	1,8	0,3747	0,0459	12,2498
6	2,0	0,4309	0,0712	16,5235
7	1,8	0,4659	0,0405	8,6928
8	1,9	0,3849	0,0315	8,1922
9	2,0	0,4339	0,1004	23,1393
Rata-rata	1,7	0,4599	0,2002	34,5186

Tabel 3 Hasil pengukuran Bf r=0.8

Ulangan	Bf (nM)	Standar deviasi	% Standar Deviasi
1	24,0366	10,3128	42,9048
2	206,0634	12,3037	5,9708
3	375,5760	155,5191	41,4082
4	155,5684	42,0919	27,0568
Rata-rata	202,6245	60,2748	29,9097

Tabel 4 Hasil pengukuran n Bf r=0.9

Ulangan	Bf (nM)	Standar deviasi	% Standar Deviasi
1	251,1977	81,1533	32

Pengukuran Kp (Tabel 2) bervariasi dari 0,269 hingga 0,763 dengan rata-rata 0,4599 dan standar deviasi sebesar 34,5%. Nilai Kp cukup baik diperoleh dari percobaan pada ulangan ke-7 dan ke-8 karena standar deviasinya rendah ($SD < 10\%$) dengan nilai Kp sesuai dengan nilai prediksi. Pada ulangan ke-1 dan ke-2, nilai Kp yang diperoleh sangat tinggi, yaitu 0,646 dan 0,763. Sebaliknya, pengukuran pada ulangan ke-3 sangat rendah, yaitu sebesar 0,269. Tingginya nilai deviasi menunjukkan adanya keragaman yang tinggi pada tiap pengulangan. Keragaman yang tinggi dapat disebabkan oleh pembentukan mikroagregat karena pelarutan bilirubin yang tidak sempurna. Selain itu, berkurangnya aktivitas enzim juga dapat menyebabkan rendahnya nilai Kp.



Pengukuran Bf pada perbandingan 0,8 menghasilkan nilai standar deviasi sekitar 30% dengan nilai rata-rata Bt sebesar 202,6 nM sesuai dengan nilai prediksi (Tabel 3). Pengukuran Bf pada ratio 0,9 dilakukan satu kali ulangan (Tabel 4). Nilai Bf yang diperoleh adalah 251,2 dengan nilai standar deviasi 32%.

Pengukuran konsentrasi bilirubin bebas perlu memperhatikan banyak hal karena bilirubin sensitif terhadap cahaya dan mudah teroksidasi, sehingga peneliti harus bekerja di bawah cahaya yang redup dan bekerja dengan cepat sebelum bilirubin terpapar oksigen. Hal itu dilakukan agar bilirubin tidak rusak. Bukan hanya bilirubin saja yang mudah rusak, tapi juga peroksida dan enzim HRP pun perlu diperlakukan dengan hati-hati. Harus digunakan peroksida baru setiap kali memulai *assay*, karena peroksida mudah dioksidasi oleh oksigen yang masuk ketika membuka-tutup tabung.

KESIMPULAN

Hasil pengukuran bilirubin bebas telah menunjukkan nilai yang cukup signifikan. Namun, nilai deviasi yang diperoleh masih tinggi, artinya keragamannya masih tinggi dan tidak konsisten. Oleh karena itu, nilai tersebut perlu dikonfirmasi ulang melalui percobaan selanjutnya dengan memperhatikan faktor-faktor yang menimbulkan tingginya keragaman tersebut. Hasil pengukuran tersebut memperkuat bukti bahwa pengukuran Bf ini bisa digunakan sebagai parameter yang lebih baik dalam pengukuran bilirubin pada penyakit kernikterus.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) McDonagh AF. Seminars in fetal and neonatal medicine. *J Elsevier*. 2009;141-147.
- (2) Fevery Johan. *Bilirubin in Clinical Practice:A Review*. Laboratory of Hepatology, University Hospital Gathuisberg : Belgium; 2007.
- (3) Shapiro SM, Conlee JW. Brainstem auditory evoked potentials correlate with morphological changes in Gunn rat pups. *Hear Res*. 1991; 57(1):16-22.
- (4) Ahlfors CE, *et al*. Unbound (Free) Bilirubin (Bf) improving the paradigm for evaluating neonatal jaundice. *Clin Chem*. 2009;55:1288-1299
- (5) Roca L, Calligaris S, Wennberg RP, Ahlfors CE, Malik SG, Ostrow JD, Tiribelli C. Factors affecting the binding of bilirubin to serum albumins: validation and application of the peroxidase method. *Pediatric Res*. 2006; 60:724-728
- (6) Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH, Shapiro SM. Toward understanding kernicterus: A Challenge to Improve Management of Jaundiced Newborns. *Pediatrics* 2006;117:474-485.
- (7) Jacobsen J, Wennberg R.P. Determination of unbound bilirubin in the serum of newborn. *Clin-chem*. 1974;20: 783-784.



- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang**
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
 2. Dilarang mengumutkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.