

Stabilitas Sampel SOD-Eritrosit dan GPx-Blood dalam Masa Penyimpanan Tujuh Hari

Miswar Fattah¹, Sra R. Anggraeni², Sofa D. Alfian², Jutti Levita², Ajeng Diantini²

¹Laboratorium Klinik Prodia, Jakarta, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

Abstrak

Telah dilakukan penelitian mengenai aktivitas SOD eritrosit pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7 dengan sentrifugasi pada suhu ruangan (22,5 °C) dan pada suhu penyimpanan -80 °C, aktivitas SOD pada hari ke-0 dengan sentrifugasi pada suhu 4 °C, dan aktivitas SOD dengan inkubasi sampel *whole blood* selama satu hari pada suhu 2–8 °C serta aktivitas GPx hari ke-0, 1, 3, 5, 7 pada suhu penyimpanan 2–8 °C. Penelitian ini menggunakan reagen dari *Randox Laboratories* yang diukur pada panjang gelombang 505 nm untuk SOD dan 340 nm untuk GPx menggunakan alat Hitachi 917 dari *Boehringer Mannheim*. Data yang dianalisis menggunakan metode *t-test* menunjukkan bahwa aktivitas SOD pada hari ke-0, 1, 3, 5, dan 7 dengan sentrifugasi pada suhu ruangan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sedangkan pada hari ke-0 dengan sentrifugasi pada suhu 4 °C dan inkubasi sampel *whole blood* selama 1 hari pada suhu 2–8 °C berbeda secara signifikan. Aktivitas GPx pada hari ke-3 tidak berbeda secara signifikan, sementara aktivitas pada hari ke-0, 1, 5 dan 7 terdapat perbedaan yang signifikan.

Kata kunci: Stabilitas enzim, *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidase* (GPx)

Stability of Seven Days Sample Storage of Erythrocyte's SOD and Blood's GPx

Abstract

The research was about SOD erythrocyte activities at day 0, 1, 3, 5, and 7 which centrifuged at room temperature (22.5 °C) and storage temperature (-80 °C), SOD activities at day-0 which centrifuged at 4 °C, SOD whole blood activities with one day incubated at 2-8 °C and GPx activities at day 0, 1, 3, 5, and 7 with 2–8 °C storage temperature. Laboratory analysis were performed by using reagent from *Randox Laboratories*, and Hitachi 917 analyzer from *Boehringer Mannheim*. SOD activities were measured at 505 nm absorbance meanwhile 340 nm absorbance is used to measure GPx. Data was analyzed by using *t-test* method and showed that SOD activities at day 0, 1, 3, 5, and 7 with room temperature centrifuged had no significant differences. Significant differences are found at day-0 with centrifuged at 4 °C and one day incubated whole blood at 2–8 °C. GPx activities at day- 3 had no significant differences. Significant differences are found at day-0,1, 5 and 7 after storage.

Key words: Enzyme stability, *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidase* (GPx)

Korespondensi: Sofa D. Alfian, S.Farm., Apt., Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia, *email:* sofadewialfian@gmail.com

Pendahuluan

Pemeriksaan laboratorium dilakukan untuk memastikan atau menunjang diagnosis suatu penyakit, memantau perjalanan penyakit, memantau efektivitas pengobatan, dan melakukan uji saring. Hasil pemeriksaan yang baik akan diperoleh jika memperhatikan prinsip-prinsip dasar laboratorium yang meliputi penyiapan pasien, penanganan dan analisis sampel, serta penanganan hasil sehingga hasil pemeriksaan laboratorium dapat digunakan sesuai dengan tujuannya. Pemeriksaan laboratorium secara tidak langsung juga dapat berpartisipasi dalam usaha meningkatkan derajat kesehatan masyarakat Indonesia menuju visi Indonesia Sehat.

Stres oksidatif (*oxidative stress*) adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas (prooksidan) dan antioksidan yang dipicu oleh dua kondisi umum, yaitu kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas.² *Oxidative stress* yang berperan dalam patogenesis beberapa penyakit dapat terjadi akibat bertambahnya radikal bebas atau akibat gangguan antioksidan sebagai pertahanan. Efek biologis dari senyawa yang sangat reaktif ini dikendalikan secara *in vivo* oleh mekanisme antioksidan, diantaranya enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) dan *Glutathione Peroxidase* (GPx) sebagai antioksidan endogen.¹ Berbagai penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas mencakup lebih dari 50 penyakit, diantaranya struk, asma, diabetes melitus, berbagai penyakit radang usus, aterosklerosis, Parkinson, hingga AIDS.³

SOD adalah enzim yang berperan untuk melindungi sel terhadap toksisitas oksigen dengan mengubah anion superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Enzim ini terdapat dalam mitokondria yaitu SOD yang pada sisi aktifnya terikat pada mangan (Mn), dan di sitosol terdapat SOD yang berikatan dengan tembaga (Cu) dan seng (Zn).^{4,5} Aktivitas SOD bergantung pada logam yang teri-

kat pada sisi aktifnya. Kekurangan salah satu dari ketiga logam tersebut dapat dihubungkan dengan penurunan kemampuan yang dimiliki oleh SOD.⁶ GPx berperan melalui mekanisme pembersihan hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh SOD dalam sitosol dan mitokondria, sebelum bereaksi dengan ion-ion metal sehingga tidak terbentuk radikal hidroksil yang sangat reaktif.⁴

Pengumpulan sampel yang berkualitas merupakan elemen yang penting dalam pemeriksaan laboratorium klinik, oleh karena itu perlu diperhatikan peralatan, prosedur dan penanganan spesimen.⁷ Hasil yang akurat merupakan salah satu prinsip laboratorium klinik sehingga diperlukan perbaikan metode untuk menjaminkannya.

Beberapa faktor yang dapat memengaruhi stabilitas enzim diantaranya adalah faktor lingkungan seperti pH dan suhu.⁸ Selama ini stabilitas enzim SOD dan GPx pada spesimen dalam masa simpan yang lama belum diketahui dengan jelas. Masa simpan sampel untuk pemeriksaan SOD dan GPx adalah lima hari pada suhu 2–8 °C dan 1 bulan pada suhu -70 °C. Kendala yang pada umumnya terjadi adalah ketersediaan reagen dan kendala yang paling utama adalah tidak setiap laboratorium memiliki alat untuk pemeriksaan SOD dan GPx. Penelitian mengenai stabilitas sampel untuk pemeriksaan SOD dan GPx belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan untuk meneliti aktivitas kedua enzim tersebut selama masa simpan tujuh hari setelah perlakuan tertentu.

Metode

a. Alat

Satu set alat untuk pengambilan darah, alat Hitachi 917 (*Bohringer Mannheim*), alat sentrifugasi (*Sigma*).

b. Bahan

Reagen pemeriksaan SOD dan GPx dari *Randox Laboratories Ltd*, yaitu *Ransod kit*

(Cat. No. SD 125), *diluting agent*, sampel *diluent Ransod* (Cat. No. SD 124), *Ransod Control* (Cat. No. SD 126), sampel darah, aquabidestilata, larutan natrium klorida 0,9% *Ransel Control* (Cat. No. SC 692), Pereaksi *Double Strength Drabkin* (Cat. No. MS 181).

c. Metode Penelitian

1. Pengumpulan sampel

Sampel untuk penelitian ini adalah darah (*whole blood*) dari 20 pasien di Laboratorium Klinik Prodia, Jl. Kramat Raya No.53 A, Jakarta Pusat.

2. Penanganan sampel SOD

Sebanyak 500 μ l darah disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3500 rpm pada suhu ruang, plasma yang terbentuk dibuang lalu ditambahkan 3 ml NaCl 0,9%, campurkan bolak balik, dan sentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan 3500 rpm, buang larutan NaCl yang ada, langkah ini dilakukan sebanyak 4 kali. Setelah pencucian terakhir tambahkan aquabidestilata dingin sampai 2 ml dan simpan pada suhu 4 °C selama 15 menit. *Lysat* kemudian dibagi ke dalam 5 *cup* masing-masing 250 μ l. Sebanyak 500 μ l darah disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm pada suhu 40 °C, buang plasma yang terbentuk, tambahkan 3 ml NaCl 0,9%, campurkan bolak balik, dan sentrifugasi kembali selama 10 menit pada kecepatan 3500 rpm, buang larutan NaCl yang ada. Langkah kedua ini dilakukan sebanyak 4 kali. Setelah pencucian terakhir tambahkan aquabidestilata dingin sampai 2 ml dan simpan pada suhu 40 °C selama 15 menit.

3. Penetapan aktivitas SOD

Dilakukan kalibrasi kontrol dan pemeriksaan sampel: Pipet 100 μ l larutan *lysat* yang sudah diinkubasi dan diencerkan dengan 2400 μ l sampel *diluent*. Serapan

yang terjadi diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 505 nm pada suhu 37 °C, dilakukan perhitungan aktivitas SOD dalam hemoglobin dan pengolahan data secara statistik.

4. Penanganan sampel GPx

Sebanyak 2 ml darah dibagi dalam 5 *cup* masing-masing berisi 200 μ l, 4 *cup* disimpan pada suhu 2–8°C.

5. Penetapan Aktivitas GPx

Melakukan kalibrasi kontrol dan pemeriksaan sampel: Sebanyak 50 μ l sampel dilarutkan dengan 1 ml pelarut dan didiamkan selama 5 menit, setelah itu ditambahkan 1 ml larutan *Drabkin* dan diaduk hingga homogen. Dilakukan perhitungan kadar GPx dalam hemoglobin dan pengolahan data secara statistik.

Hasil

Penelitian ini menggunakan 20 sampel darah dengan kadar hemoglobin yang telah diketahui. Faktor jenis kelamin serta gaya hidup seperti merokok, konsumsi alkohol, stres, dan pola makan dari para pasien diabaikan.

Tabel 1 Demografi pasien untuk pengukuran aktivitas enzim SOD dan GPx

Jumlah sampel (n)	20
Umur (tahun)	22–40
Jenis kelamin	
Pria	4 (20%)
Wanita	16 (80%)

Pengukuran aktivitas enzim SOD dalam eritrosit hari ke-0, 1, 3, 5, 7 menggunakan sentrifugasi pada suhu ruangan, hari ke-0 menggunakan sentrifugasi pada suhu 4 °C, dan inkubasi sampel darah selama 1 hari pada suhu 2–8 °C ditunjukkan pada Tabel 2. Pengukuran aktivitas enzim GPx dalam darah pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 2 Pengukuran aktivitas enzim SOD

No	SOD (U/g Hb)						
	t=0		t=1	t=3	t=5	t=7	
	22,5 °C	4 °C	22,5 °C	22,5 °C, inkubasi 1 hari	22,5 °C	22,5 °C	22,5 °C
1	816	792	912	1432	824	1344	1336
2	1133	1070	1126	1294	1343	951	1084
3	1171	853	1178	1147	1116	899	938
4	1036	1021	964	1121	993	779	800
5	599	790	1413	895	1300	853	825
6	1147	819	1491	1698	1241	948	1172
7	1132	796	1323	1293	1138	1084	1216
8	2078	1196	1775	1480	1569	1176	1255
9	714	771	1021	1486	1186	864	1150
10	1938	1259	2247	1642	1691	1728	1481
11	833	-	1040	1381	849	1056	1198
12	719	-	836	1493	993	986	1212
13	1096	1430	-	-	1459	1163	1111
14	1371	1447	-	-	1303	1583	1197
15	1333	992	-	-	1318	1242	1015
16	1732	1220	-	-	1569	1130	1171
17	1944	986	-	-	1479	1275	1127
18	1936	1397	-	-	1333	1436	1346
19	1387	766	-	-	1444	1411	1323
20	1129	955	-	-	1424	1144	1121

Keterangan : t = hari

Tabel 3 Pengukuran aktivitas GPx

No	GPx(U/g Hb)				
	t=0	t=1	t=3	t=5	t=7
1	38,4	40,7	34,8	74,5	68,6
2	47,3	47	39,3	52,5	72,3
3	48,9	56,3	49,6	68,3	73,4
4	51,3	47,2	34	64,7	63,6
5	36,7	35,6	40	47,3	38,4
6	37,1	43,8	34,3	55,8	55,1
7	32,7	28,2	27	30	30,2
8	98,1	115	84,4	127,8	135,1
9	36,6	40,1	35,7	55,9	35,1
10	51,1	56,7	44,5	66,8	69,3
11	68,9	63,1	66,1	47,8	72,9
12	53,3	64,6	54,8	71	62,3
13	33,7	44,0	43,1	44	48,3
14	32,6	45,7	44,7	37,6	53,1
15	40,7	53,1	45,7	61,2	56,6
16	28,0	33,7	31	53,3	45
17	30,9	33,5	41,6	50	44,2
18	42,1	55,7	70,4	82	77,8
19	31,7	42,7	39	48,9	58,2
20	46,6	65,5	66,8	62,1	55,6

Analisis data secara statistik dimulai dengan uji kenormalan data menggunakan metode *Kolmogorov-Smirnov* dengan *Software SPSS* 14. Simpulan dari uji normalitas ini adalah pengukuran aktivitas superoksida dismutase dan glutathion peroksidase mengikuti distribusi normal. Analisis selanjutnya menggunakan *t-test*. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Hasil analisis data SOD aktivitas SOD yang dibandingkan

Aktivitas SOD yang dibandingkan	Simpulan	Keterangan
Hari ke-0 dan ke-1	0,05<0,059	Ho diterima
Hari ke-0 dan ke-3	0,05<0,823	Ho diterima
Hari ke-0 dan ke-5	0,05<0,187	Ho diterima
Hari ke-0 dan ke-7	0,05<0,247	Ho diterima
Hari ke-0 sentrifugasi pada suhu ruang dan 4°C	0,05>0,004	Ho ditolak
Hari ke-0 dan inkubasi 1 hari pada suhu 2–8°C	0,05>0,001	Ho ditolak

Hasil analisis data GPx dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 Hasil analisis data GPx

Aktivitas GPx yang dibandingkan	Simpulan	Keterangan
Hari ke-0 dan ke-1	0,05>0,001	Ho ditolak
Hari ke-0 dan ke-3	0,05<0,419	Ho diterima
Hari ke-0 dan ke-5	0,05>0,000	Ho ditolak
Hari ke-0 dan ke-7	0,05>0,000	Ho ditolak

Analisis dari efek penyimpanan enzim SOD dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 Analisis efek penyimpanan enzim SOD

Kondisi Penyimpanan	n	Rata-rata ± SD
t=0;TR	20	1262,20 ± 451,01
t=0;4 °C	18	1031,11 ± 239,73
t=1;TR;-80 °C	12	1277,17 ± 408,7
t=1;TR inkubasi 2–8 °C	12	1363,50 ± 228,59
t=3;TR;-80 °C	20	1278,60 ± 238,44
t=5;TR;-80 °C	20	1152,60 ± 254,00
t=7;TR;-80 °C	20	1153,90 ± 167,87

Keterangan : TR= Temperatur Ruangan (22,5 °C)

Analisis dari efek penyimpanan enzim GPx dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7 Analisis efek penyimpanan enzim *Glutathion peroxidase*

Kondisi Penyimpanan	n	Rata-rata ± SD
tt=0	20	44,34 ± 16,09
tt=1	20	50,61 ± 18,55
tt=3	20	46,34 ± 14,96
tt=5	20	60,08 ± 20,37
tt=7	20	60,76 ± 22,14

Pembahasan

Pengukuran enzim *Superoxide Dismutase* pada $t=0$, pada waktu pengukuran tidak lebih dari 4 jam setelah pengumpulan sampel, dilakukan dua penanganan sampel yang berbeda, yaitu sentrifugasi pada suhu ruangan dan sentrifugasi pada suhu 4 °C bertujuan untuk memisahkan plasma dan enzim EC-SOD. Penanganan sampel menggunakan sentrifugasi pada 4 °C hanya bisa dilakukan pada 18 sampel karena jumlah alat dan waktu yang terbatas. Pada $t=1$, yaitu ketika waktu pengukuran setelah penanganan sampel dan disimpan selama 1 hari pada suhu -80 °C dan inkubasi sampel *whole blood* selama 1 hari pada suhu 2–8 °C untuk SOD dan suhu 2–8 °C untuk enzim GPx. Pengukuran aktivitas SOD hanya dilakukan pada 12 sampel karena nilai kontrol yang tidak memenuhi syarat sehingga secara prosedur pengukuran tidak dapat dilakukan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas SOD tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada penyimpanan hari ke-0, 1, 3, 5, 7 dengan sentrifugasi pada suhu ruangan sehingga sampel dapat disimpan selama 7 hari. Sampel yang dapat dipertahankan selama beberapa hari ini akan memberikan keuntungan bagi pasien dan pengelola laboratorium agar

pasien yang spesimennya tidak dapat diantar ke laboratorium rujukan dalam waktu 4 jam tetap dapat melakukan pemeriksaan enzim SOD dan GPx dengan hasil pemeriksaan yang benar dan dapat dipercaya. Bagi pengelola laboratorium, pelayanan yang diberikan kepada pasien akan tetap memuaskan ketika reagen datang terlambat atau alat rusak. Keuntungan lainnya pengelola laboratorium tidak perlu menyediakan alat di setiap cabang laboratorium sehingga biaya yang dibebankan pada pasien lebih ringan dan berpartisipasi dalam usaha meningkatkan derajat kesehatan masyarakat Indonesia menuju visi Indonesia Sehat.

Terdapat perbedaan aktivitas untuk sampel yang ditangani pada pemeriksaan aktivitas SOD dengan sentrifugasi pada temperatur ruangan (22,5 °C) dan sentrifugasi pada suhu 4 °C, serta perbedaan aktivitas SOD antara sampel *whole blood* yang diinkubasi selama 1 hari pada suhu 2–8 °C dengan sampel pada $t=0$ (*fresh*) menunjukkan bahwa penanganan sampel dapat berpengaruh terhadap stabilitas enzim SOD.

Aktivitas GPx pada hari ke-3 tidak berbeda signifikan, sedangkan aktivitas pada hari ke-0, 1, 5 dan 7 terdapat perbedaan yang signifikan. Perbedaan aktivitas GPx ini mungkin disebabkan oleh faktor lingkungan, seperti suhu dan paparan udara. Pemeriksaan enzim

SOD dan GPx sangat penting dalam memantau perjalanan suatu penyakit dan efektivitas pengobatan.⁹ Aktivasinya dalam tubuh selain dipengaruhi oleh jumlah radikal bebas juga dipengaruhi oleh kofaktor kedua enzim tersebut, yaitu untuk SOD dipengaruhi oleh Cu, Zn, dan Mn. Cu dan Mn yang berkaitan dengan aktivitas enzim sedangkan Zn berperan dalam stabilitas struktur protein. Aktivitas GPx sangat dipengaruhi oleh Se yang terikat pada sisi aktif enzim tersebut, yaitu pada asam amino sistein dan dipengaruhi oleh glutathione (GSH) sebagai substrat dalam mekanisme reaksi antioksidannya.¹⁰

Faktor kritis yang harus diperhatikan dalam pengukuran aktivitas enzim SOD dan GPx, yaitu penanganan sampel saat penambahan aquabidestilata dingin sampai 2 ml dan disimpan pada suhu 4°C selama 15 menit. Setelah proses tersebut sampel harus langsung diproses lebih lanjut dan diukur karena setelah penambahan aquabidestilata dingin tersebut sel darah merah mengalami lisis yang akan menurunkan konsentrasi SOD yang sebenarnya.

Simpulan

Aktivitas SOD pada hari ke-0, 1, 3, 5, dan 7 dengan sentrifugasi pada suhu ruangan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan sementara aktivitas GPx pada hari ke-3 tidak berbeda secara signifikan, sedangkan aktivitas GPx pada hari ke-0, 1, 5 dan 7 terdapat perbedaan yang signifikan. Terdapat perbedaan aktivitas untuk penanganan sampel pemeriksaan aktivitas SOD dengan sentrifugasi pada suhu ruangan (22,5 °C) dan sentrifugasi pada suhu 4 °C. Terdapat perbedaan aktivitas SOD antara sampel *whole blood* yang diinkubasi selama 1 hari pada suhu 2–8 °C dengan sampel pada *t=0 (fresh)*.

Daftar Pustaka

1. Marjani A, Moradi A, Ghourcaie AB. Alterations in plasma lipid peroxidation and erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities during storage of blood. *Asian Journal of Biochemistry*, 2007, 2: 118–123.
2. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal Biomed Science*, 2008, 49(2): 89–96.
3. Moreno-Otero R, Trapero-Marugan M. Antioxidant agents in the prevention of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer Prevention*, 2012, 21(4): 323–325.
4. Mahantesh SP, Gangawane AK, Patil CS. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines in human health: Future prospects. *World Research Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2012, 1(1): 6–10.
5. Carbone MC, Tatone C, Monache SD, Marci R, Caserta D, Colonna R., et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age dependent changes. *Molecular Human Reproduction*, 2003, 9(11): 639–643.
6. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Intervention Aging*, 2007, 2(2): 219–236.
7. Padovan E. Diagnostic samples: from the patient to the laboratory The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. *European Journal of Immunology*, 2009, 40(4): 922.
8. Poedjiadi A, Titin S. *Dasar-dasar biokimia*. Jakarta: UI Press. 2006.
9. Casey WM, Brodie T, Yoon L, Ni H, Jordan HL, Cariello NF. Correlation analysis of gene expression and clinical chemistry to identify biomarkers of skeletal myopathy in mice treated with PPAR agonist GW610742X. *Glaxo Smith Kline Journal*, 2008, 13 (4): 346–376.
10. Landmesser U, Drexler H. Toward understanding of extracellular superoxide

dismutase regulation in atherosclerosis,
a novel role of uric acid. *Arteriosclerosis*

Thrombus and Vascular Biology, 2002,
22(9): 1367–1370.