Majalah Farmasi Indonesia, 12(3), 152-158, 2001

OPTIMASI METODE SPEKTROFLOUROMETRI PADA PENETAPAN KADAR MALONDIALDEHID DI DALAM SPERMA MANUSIA

THE OPTIMATION OF SPECTROFLOUROMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF MALONIC DIALDEHYDE IN HUMAN SPERM

Sudjarwo
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. E-mail : sdjarwo@yahoo.com.

ABSTRAK

Optimasi suatu metode adalah langkah awal yang harus dilakukan setiap peneliti yang akan melakukan penelitian. Tujuan optimasi adalah untuk mendapatkan data yang dapat dipertanggung jawabkan. Optimasi adalah usaha untuk mendapatkan kondisi yang optimal yang dilakukan dengan suatu metode tertentu, seperti cara preparasi, bahan-bahan kimia yang dipakai dan keahlian dari peneliti. Di dalam sampel biologis, kadar analit pada umumnya sangat rendah. Pada penentuan kadar yang sangat rendah di dalam sampel biologis, akan diperoleh kesalahan yang besar. Untuk mengurangi kesalahan-kesalahan yang ditimbulkan, maka diperlukan langkah optimasi.

Malondialdehid (MDA) adalah hasil dari peroksidasi lipid, dimana lipid tersebut merupakan komponen utama dari membran sel. Pada penelitian ini, optimasi yang dilakukan adalah pemilihan panjang gelombang, serapan maksimum jumlah penambahan natrium thiobarbiturat, pH, waktu inkubasi, linieritas, batas terkecil pengamatan, batas kuantitasi pengamatan, akurasi dan presisi.

Kondisi optimal dengan metode Spektroflourometri diperoleh pada MDA dengan konsentrasi tertentu, dilakukan pada panjang gelombang eksitasi maksimum 522 nm, panjang gelombang emisi maksimum 575 nm, diperlukan 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1%, dilakukan pada pH = 1 dengan HCl 1N, diinkubasi dengan penangas air selama 135 menit.

Pada kondisi tersebut di atas, diperoleh koeffisien korelasi pada uji linieritas adalah 0,9993, batas terkecil pengamatan 3,5146. 10^{-4} µg/ml, batas kuantitasi pengamatan 1,0544. 10^{-3}µg/ml, akurasi yang dilakukan dengan tehnik adisi diperoleh rata-rata perolehan kembali 85,01% dan presisi diperoleh koeffisien variasi (K.V) = 1,83%.

Kata kunci : Optimasi, Spektroflourometri, Sperma, MDA.

ABSTRACT

Optimation of a method is an obligatory step in order one to obtain a valid and accountable data, especially when one deal with biological samples. Biological samples usually contain minute substances which sometime elicit great errors when someone try to determine its concentration. Therefore, in order to reduce those errors, optimation of a method is mandatory to be carried out.

The aim of this experiment was to determine malonic dialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. The optimation carried out in this experiment include the selection of wavelength of maximum absorbance, the amount of sodium thiobarbiturate, pH, the incubation period, standard curve linearity, limit of detection and quantification, accuracy and precision.

The result showed that the optimum conditions of spectrofluorometric method of MDA were as follow: the excitation and emission wavelengths was 522 and 575 nm, respectively, pH of 1 and incubation period of 135 minutes. These conditions yielded correlation coefficient of standard curve of 0.9993, limit

detection and quantification of 3.5146 x 10-4 mg/ml and 1.0544 x 10-3 mg/ml, respectively, an average recovery of 85.01 % and variation coefficient of 1.84 %.

Key words: optimation, spectrofluorometric, sperm, malonic dialdehyde, MDA

PENDAHULUAN

Optimasi suatu metode adalah langkah awal yang harus dilakukan setiap peneliti yang akan melakukan penelitian. Tujuan optimasi adalah untuk mendapatkan data yang dapat dipertanggung jawabkan. Optimasi adalah usaha untuk mendapatkan kondisi yang optimal, yang dilakukan dengan suatu metode tertentu. Optimasi meliputi optimasi alatnya, bahan-bahan kimia yang dipakai, proses preparasi dan keahlian dari penelitinya. (Indrayanto, 1994)

Di dalam sampel biologis, kadar analit pada umumnya sangat rendah dan sampel biologis sendiri mengandung banyak komponen atau komplek. Pada penentuan kadar yang sangat rendah, akan mempunyai kesalahan yang besar. Apalagi di dalam sampel biologis yang banyak mengandung komponen. Untuk mengurangi kesalahan yang terjadi, maka diperlukan langkah optimasi. (Indrayanto, 1994).

Optimasi metode untuk penentuan kadar di dalam sampel biologis, menurut USP XXIX (Anonim, 1997) yang dilakukan adalah pemilihan panjang gelombang, serapan maksimum, linieritas kurva regresi baku, batas pengamatan terkecil, batas kuantitasi pengamatan, akurasi dan presisi.

Malondiladehid (MDA) adalah suatu senyawa hasil dari oksidasi lipid yang menjadi peroksida, lipid tersebut merupakan komponen utama dari membran sel. Akibat adanya oksidasi lipid tersebut, maka integritas sel akan menurun dan akhirnya terjadi penurunan fungsi sel (Iwasaki and Gagnon, 1992; Aitken, *et al*., 1993; Suleiman, *et al.*, 1996). Reaksi MDA dengan natrium thiobarbiturat diperlukan kondisi tertentu, karena reaksi berlangsung lambat diperlukan pada pH tertentu. Untuk itu diperlukan kondisi tertentu dimana reaksi MDA dengan natrium thiobarbiturat dapat berlangsung sempurna.

Reaksi MDA dengan natrium thiobarbiturat akan memberikan senyawa yang berwarna merah ungu, yang dapat diamati dengan Spektrofotometer, Luminometer dan Spektroflourometer. Pada penelitian ini dilakukan dengan Spektroflourometer, karena mempunyai ketepatan dan ketelitian yang tinggi. (Rice-Evans *et al*., 1991)

METODOLOGI

Penentuan panjang gelombang eksitasi dan emisi

Larutan MDA konsentrasi tertentu, dtambahkan 0,1 ml asam trikloro asetat 20%, 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1% dan HCl 1 N sampai 10 ml pada labu takar. Kemudian dipanaskan dengan penangas air selama 135 menit. Larutan berwarna yang terbentuk sebanyak 3,0 ml diekstraksi dengan 5,0 ml isobutanol. Fase isobutanol digunakan untuk menentukan panjang gelombang eksitasi dan emisi. (Rice-Evans et al., 1991)

Pemilihan pH

Larutan MDA (0,294 μg/ml) + 100 μl asam trikloro asetat 20% + 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1% + HCl 1N dan diatur pH nya dari 1 sampai 7, selanjutnya ditambahkan lagi sampai volume 10,0 ml di labu takar. Kemudian di inkubasi dengan penangas air selama 135 menit. Larutan berwarna yang terjadi sebanyak 3,0 ml diekstraksi dengan 5,0 ml isobutanol. Fase isobutanol diamati flouroresensinya pada panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum yang terpilih.

Jumlah penambahan natrium thiobarbiturat

Larutan MDA (2,94 μg/ml) + 100 μl asam trikloro asetat 20% + berbagai volume natrium thiobarbiturat 1% + HCl 1N sampai volume 10,0 ml dengan labu takar. Kemudian di inkubasi dengan penangas air selama 135 menit. Larutan berwarna yang terjadi sebanyak 3,0 ml diekstraksi dengan 5,0 ml

isobutanol. Fase isobutanol diamati fluoresensinya pada panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum terpilih.

Waktu inkubasi

Larutan MDA (2,94 μg/ml) + 100 μl asam trikloro asetat 20% + 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1% + HCl 1N sampai volume 10,0 ml dengan labu takar. Kemudian di inkubasi diatas penangas air dengan berbagai waktu, sampai diperoleh warna yang stabil. Larutan berwarna yang terjadi sebanyak 3,0 ml diekstraksi dengan 5,0 ml isobutanol. Fase isobutanol diamati flouroresensinya pada panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum terpilih.

Uji linieritas

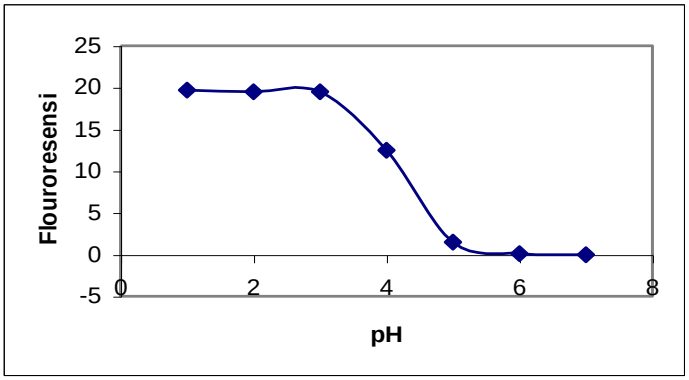
Berbagai konsentrasi MDA yang meningkat, ditambahkan 0,1 ml asam trikloro asetat 20%; 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1% dan HCl 1 N sampai volume 10,0 ml dengan labu takar. Kemudian dipanaskan diatas penangas air selama 135 menit. Larutan berwarna yang terjadi sebanyak 3,0 ml diekstraksi dengan 5,0 ml isobutanol. Fase isobutanol diamati flouroresensinya pada panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum terpilih. Cara seperti ini dilakukan untuk kadar MDA yang berbeda-beda, sehingga dapat dibuat kurva regresi linier normal yang menyatakan hubungan antara intensitas flourosensi dan kadar MDA.

Kuantitasi pengamatan

Dalam uji kuantitatif, perlu dilakukan analisis tentang akurasi dan presisinya. Untuk membuktikan hasil akurasi dan presisi dilakukan pengamatan sampai sepuluh (10) kali. Dengan pengamatan ini dapat diuji akurasinya dan presisinya. Sedangkan metode penyiapan sampel menggunakan cara yang telah ditemukan pada optimasi (lihat uji linieritas).

HASIL DAN PEMBAHASAN

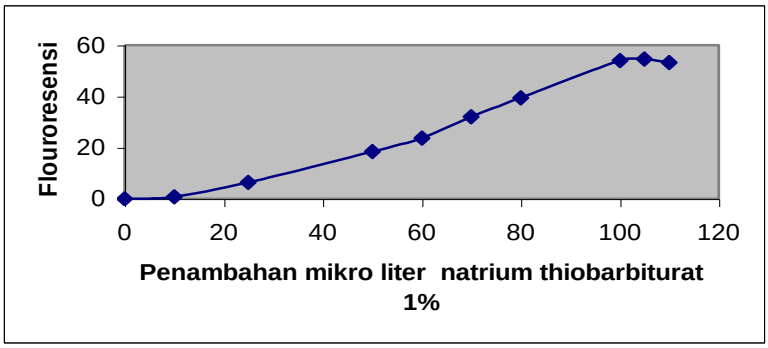
Pada pemilihan panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum terpilih, yang dilakukan pada larutan MDA 2,94 μg/ml, diperoleh panjang pada 522 nm dan 575 nm. Selanjutnya pada panjang gelombang tersebut, digunakan untuk analisis MDA.



Gambar 1 : Pengaruh pH pada reaksi MDA dengan natrium thiobarbiturat 1%

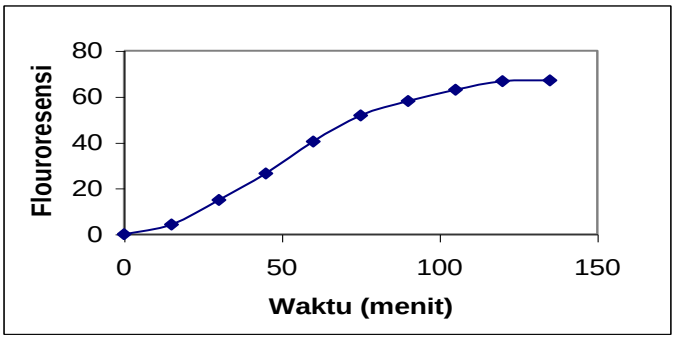
Pada pembentukan senyawa berwarna antara MDA dengan natrium thiobarbiturat, dipengaruhi oleh pH. Reaksi antara MDA dengan natrium thiobarbiturat dapat terjadi pada suasana asam, (Gambar 1). Pada percobaan yang dilakukan pada pH 1 sampai 7 pada kadar MDA yang sama, senyawa berwarna yang terjadi stabil pada pH = 1. Pada pH diatas 2 terjadi penurunan intensitas flouroresensi. Sehingga pada analisis selanjutnya dilakukan pada pH = 1.

Jumlah natrium thiobarbiturat 1% yang diperlukan pada MDA (2,94 µg/ml) untuk memperoleh senya wa yang berwarna dan stabil adalah 0,1 ml yang dilakukan pada pH = 1 (gambar 2).



Gambar 2 : Optimasi penambahan (ml) natrium thiobarbiturat 1% pada MDA (2,94 µg/ml).

Inkubasi dengan cara pemanasan diatas penangas air bertujuan mempercepat reaksi, dimana reaksi MDA dengan natrium thiobarbiturat berlangsung lambat. Diharapkan pada waktu yang optimal, MDA bereaksi cepat dan sempurna dengan natrium thiobarbiturat. Sehingga waktu pemanasan atau inkubasi untuk percobaan ini penting sekali, karena bila MDA belum sempurna bereaksi dengan natrium thiobarbiturat, maka pada pengamatan flouroresensinya tidak stabil. Pada penelitian ini dilakukan dengan berbagai waktu pemanasan, diperoleh waktu yang optimal selama 135 menit untuk MDA (2,94 µg/ml) bereaksi sempurna dengan 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1% (gambar 3)

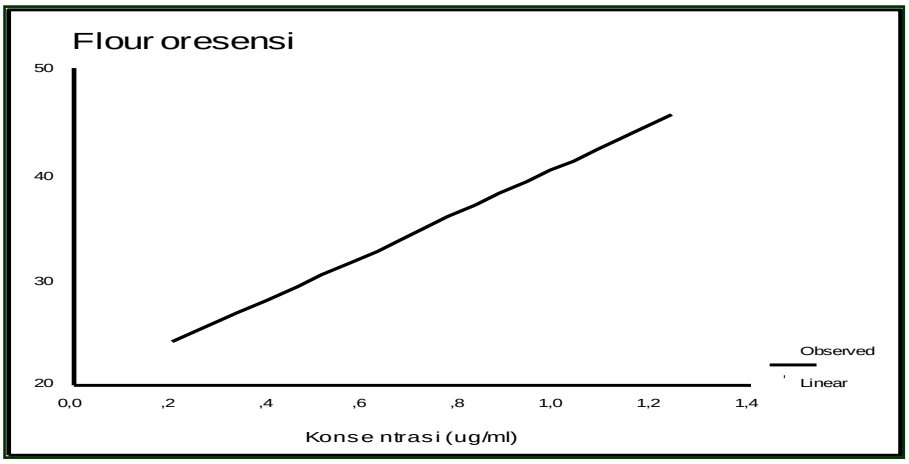


Gambar 3 : Optimasi waktu inkubasi pada reaksi MDA dengan natrium thiobarbiturat 1%.

Sehingga untuk penentuan kadar MDA diperoleh kondisi pada panjang gelombang eksitasi 522 nm, dan panjang gelombang emisi 575 nm, dilakukan pada pH = 1 dengan HCl 1N, jumlah penambahan natrium thiobarbiturat 1% sebanyak 0,1 ml untuk MDA (2,94 µg/ml) dan lama pemanasan 135 menit diatas penangas air.

Selanjutnya pada kondisi tersebut diatas, digunakan untuk optimasi metode Spektroflourometri.

Pada uji linieritas hubungan intensitas flurosensi dengan kadar MDA, diperoleh koeffisien korelasi (r) = 0,9993, adanya hubungan yang linier antara konsentrasi dengan flouroresensinya (gambar 4). maka uji linieritas memenuhi persyaratan optimasi.



Gambar 4 : Hubungan konsentrasi MDA dan intensitas flourosensinya

Pada penentuan batas terkecil dan kuantitasi pengamatan MDA, diperoleh hasil $3{,}5146.10^{-4}$ µg/ml dan $1{,}0544.\ 10^{-3}$ µg/ml. Sehingga untuk penentuan kadar MDA dengan metode Spektroflourometri kadar yang dapat ditentukan dengan ketelitian dan kepekaan yang tinggi adalah lebih besar sama atau l dengan $1{,}0544.\ 10^{-3}$ µg/ml.

Tabel I : Batas terkecil dan kuantitasi pengamatan

Konsentrasi (µg/ml)	Flouroresensi (522;575 nm)
$5{,}1650.\ 10^{-5}$	0,095
$1{,}0330.\ 10^{-4}$	0,099
$2{,}0660.\ 10^{-4}$	0,104
$2{,}5825.\ 10^{-4}$	0,108
$3{,}0990.\ 10^{-4}$	0,121
$3{,}6155.\ 10^{-4}$	0,150
Batas terkecil pengamatan	$= 3{,}5146.\ 10^{-4}$ µg/ml
Batas kuantitasi pengamatan	$= 1{,}0544.\ 10^{-3}$ µg/ml

Tujuan akurasi adalah menguji proses preparasi pada penentuan kadar MDA dengan berbagai gangguan yang ada di dalam sampel sperma. Seperti diketahui di dalam sampel biologis (sperma) mengandung banyak komponen. Dari sekian banyak komponen, tidak diketahui komponen mana yang mengganggu dalam analisis MDA tersebut. Pada uji akurasi dianjurkan membuat simulasi penentuan kadar MDA dengan komposisi seperti yang terkandung di dalam sperma.

Untuk membuat matriks sama atau mirip seperti sampel sperma adalah sulit atau bahkan tidak memungkinkan. Untuk mengatasi hal ini, maka untuk uji akurasi MDA dilakukan dengan cara adisi yaitu dengan menambahkan sejumlah tertentu MDA ke dalam sampel sperma. Dengan demikian semua gangguan yang ada dalam analisis MDA di dalam sampel sperma dapat diantisipasi.

Berbagai konsentrasi MDA yang diketahui ditambahkan ke dalam sampel sperma, kemudian dipre-parasi dan diamati. Selanjutnya ditentukan (%) perolehan kadar kembali MDA.

Tabel II : Akurasi MDA di dalam sampel sperma.

MDA yg ditambahkan (μg/ml)	Perolehan kadar kembali MDA (%)
2,0660	97,8219
2,5825	78,2575
3,0990	92,3911
3,6155	93,7491
4,1320	79,2836
4,6485	78,2618
5,1650	75,3146
Rata-rata perolehan kadar kembali MDA = (85, 0114 ± 9,2459)%	

Menurut USP XXIX (1997), akurasi adalah ukuran yang menunjukkan ketepatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Sebagai parameternya adalah *(%) "recovery"* atau (%) perolehan kadar kembali. (%) *Recovery* diperoleh dengan cara membuat sampel plasebo (eksepien obat, cairan biologis), kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu. Dari kadar analit yang diperkirakan, kemudian dianalisis dengan cara yang sama. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo, karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obat paten atau analitnya merupakan senyawa endogen, maka dapat dipakai cara adisi.

Dari uji akurasi yang ditentukan dengan cara adisi, diperoleh hasil rata-rata perolehan kadar kembali MDA = 85,0114%.(Tabel 2). Hasil akurasi tersebut, telah memenuhi persyaratan akurasi di dalam sampel biologis, dimana syarat minimal 80%. *(Carr, GP and Wahlich, 1990).*

Pada presisi yang telah dilakukan terhadap larutan MDA kon-sentrasi 3,0990 μg/ml, kemudian dengan preparasi yang sama diamati flouroresensinya sebanyak 10 kali. Dari uji presisi yang dilakukan dipe - roleh K.V (Koeffisien Variasi) = 1,8357%. (Tabel I). Dipersyaratkan untuk uji presisi adalah nilai K.V. lebih kecil dari 2%. (Indrayanto, 1994). Sehingga uji presisi yang dilakukan telah memenuhi persyaratan.

Tabel III : Uji presisi MDA (3,0990 μg/ml)

Pengamatan ke	Flouroresensi (522;575 nm)
1	2,8632
2	2,8510
3	2,7114
4	2,7593
5	2,7325
6	2,7639
7	2,7820
8	2,7938
9	2,7876
10	2,8477
Rata-rata : 2,7892	
Koeffisien Variasi (K.V) : 1,8357%	

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, kondisi optimal penentuan kadar MDA di dalam sperma dengan metode Spektroflourometri dapat disimpulkan :

Panjang gelombang eksitasi 522 nm dan panjang gelombang emisi 575 nm.Reaksi MDA (2,9400 μg/ml) diperlukan 0,1 ml natrium thiobarbiturat 1% dan dilakukan pada pH = 1 dan waktu inkubasi yang dilakukan diatas penangas air, selama 135 menit.Pada uji linieritas diperoleh koeffisien korelasi (r) = 0,9993, dengan . Batas terkecil dan kuantitasi pengamatan diperoleh hasil 3,5146. 10^{-4} μ g/ml dan 1,0544. 10^{-3} μg/mlPada uji akurasi diperoleh rata-rata perolehan kadar kembali MDA 85,0114% uji presisi diperoleh Koeffisien Variasi (K.V) = 1,8357%.

SARAN

Dari penelitian ini dapat disarankan untuk dapat diterapkan kondisi optimal ini untuk penetapan kadar MDA di dalam sampel sperma.

DAFTAR PUSTAKA

Aitken, R.J., Harkiss D., Buckingham D.W., 1993, *Analysis of Lipid Peroxidation Mechanisms in Hu-man Spermatozoa*, Molecular Reproduction and Develop-ment, 35, 302-315.

Anonim, 1997, United States of Pharmacopeia (USP) XXIX. United States Pharmacopeial Convention, Twin Brook, Parkway, Rock Ville.

Carr, G.P. and Wahlich, 1990, A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 8*; 612-618.

Indrayanto G, 1994, Metode Validasi Pada Analisis Kimia, Prosiding Pendidikan Berkelanjutan Apoteker, *Pensahihan Analisis KCKT dan Densito-meter KLT*, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga- Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia, 42-52

Iwasaki A dan Gagnon C, 1992, Formation of reactive oxygen speci-es in spermatozoa of infertile patients, *Fertil. Steril.*, 57: 409-416.

Rice-Evans, C.A., Diplock A.T., and Symons M.C.R., 1991, Techniques in free ra-dical research, Laboratory Techniques, Elsevier, Tokyo.

Suleiman S.A., Elamin Ali M., Zaki, Z.M.S., El-Malik E.M.A., Nasr M.A., 1996, Lipid peroxidation and human sperm motility Protective role of vitamin E, *Journal of Andrology*, Vol. 17, No. 5: 530-537