
Analisis Kuantitatif 15-F2t-isoprostan dari Plasma Pasien *Obstructive Sleep Apnea* (OSA) dengan Metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) menggunakan Teknik Ekstraksi Imunoafinitas

Bertha Rusdi¹, Tutus Gusdinar², Miswar Fattah³

¹Jurusan Farmasi, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia, ²Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia, ³PT. Prodia Widyahusada, Jakarta, Indonesia

Abstrak

15-F2t-isoprostan merupakan penanda stres oksidatif yang kadarnya dalam cairan biologis relatif rendah serta memiliki banyak isomer sehingga diperlukan ekstraksi sampel sebelum dilakukan pengukuran kadar. Metode ekstraksi yang digunakan diantaranya ekstraksi fase solid/*Solid Phase Extraction* (SPE) serta ekstraksi imunoafinitas. Perbaikan teknik ekstraksi SPE dan teknik ekstraksi imunoafinitas dilakukan untuk membandingkan hasil perolehan kembalinya. Pengukuran dilakukan dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Penilaian efektivitas proses ekstraksi diamati melalui hasil perolehan kembali dari kedua teknik ekstraksi. Teknik ekstraksi dengan perolehan kembali tertinggi digunakan untuk mengukur kadar 15-F2t-isoprostan dari penderita *Obstructive Sleep Apnea* (OSA). Teknik ekstraksi imunoafinitas menghasilkan perolehan kembali 15-F2t-isoprostan yang cukup baik. Pada penderita OSA kadar 15-F2t-isoprostan dalam plasma cenderung tinggi sehingga memiliki risiko untuk menderita penyakit yang berhubungan dengan aktivitas biologis 15-F2t-isoprostan seperti arteriosklerosis.

Kata kunci: 15-F2t-isoprostan, *Solid Phase Extraction* (SPE), ekstraksi imunoafinitas, *Obstructive Sleep Apnea* (OSA)

Quantitative Analysis of Free 15-F2t-Isoprostane from Plasma of Obstructive Sleep Apnea Patients Using Enzyme Linked Immunosorbent Assay Method with Immunoaffinity Extraction Technique

Abstract

15-F2t-isoprostane is a biomarker in assessment of oxidative stress status that due to its relatively low concentration in biological fluid and also has many isomers, the 15-F2t-isoprostane sample need to be extracted prior to the quantifying processes. Extraction techniques commonly used to extract 15-F2t-isoprostane are solid phase extraction (SPE) and immunoaffinity extraction. Improvements to the SPE and immunoaffinity extraction techniques had been conducted, and the recovery results was then compared. The quantification of 15-F2t-isoprostane then was conducted using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Then followed by the examination of the plasma recovery results. Extraction technique which had the highest recovery then was used to quantify 15-F2t-isoprostane from plasma of Obstructive Sleep Apnea (OSA) patients. Immunoaffinity extraction technique has a good recovery result. OSA patients have the tendency to have high 15-F2t-isoprostane concentrations in the plasma, therefore have a potential risk to get diseases related to the biological activities of 15-F2t-isoprostane, such as arteriosclerosis.

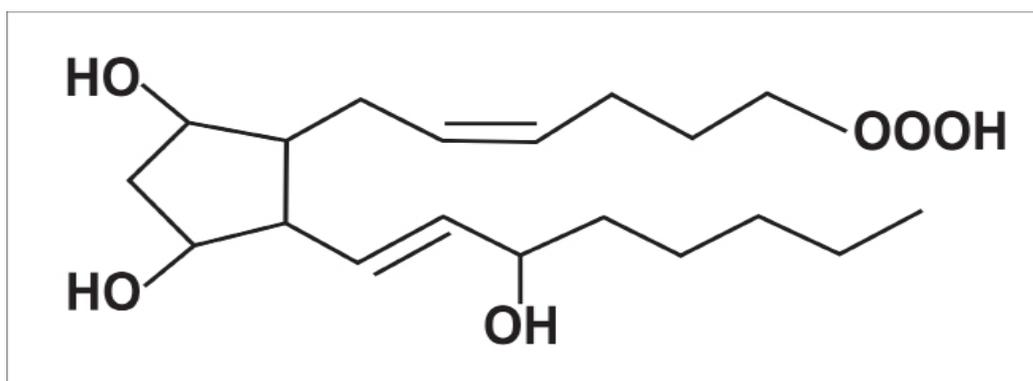
Key words: 15-F2t-isoprostane, Solid Phase Extraction (SPE), immunoaffinity extraction, Obstructive Sleep Apnea

Korespondensi: Bertha Rusdi, M.Si., Apt., Jurusan Farmasi, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia. *email:* bertha_rusdi@yahoo.com

Pendahuluan

Isoprostan merupakan suatu kelompok senyawa mirip prostaglandin dan merupakan produk autooksidasi, terkandung dalam cairan biologis yang berasal dari hasil oksidasi nonenzimatik asam arakhidonat yang dikatalis oleh

radikal bebas dan merupakan petanda untuk peroksidasi lipid dan stress oksidatif *in vivo*. Stress oksidatif didefinisikan sebagai gangguan dalam keseimbangan prooksidan atau antioksidan yaitu jumlah prooksidan lebih banyak jika dibandingkan dengan jumlah antioksidan, yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan.¹



Gambar 1 Struktur 15 F2t-Isoprostan

Isoprostan mirip dengan prostanoid normal, dan yang paling banyak ditemukan merupakan analog dari prostaglandin F2 α , namun analog lain yaitu PGD2 dan PGE2 juga ditemukan. Isoprostan dan prostanoid berbeda dalam aspek stereokimianya. Sebagian besar rantai samping isoprostan berada dalam posisi *cis* terhadap cincin siklopentana, meskipun ada juga yang berada dalam posisi *trans*. Ada empat regioisomer yang mungkin dari isoprostan seri F, D dan E, setiap regio isomer akan menghasilkan delapan bentuk diastereoisomer, dalam hal ini terdapat 64 isomer berbeda yang dapat dibentuk dari satu seri isoprostan. Untuk membedakan dengan prostaglandin normal, maka dibuat singkatan “isoP”, dengan awalan yang ditentukan oleh tempat ikatan gugus hidroksil pada rantai samping (5,8,12 atau 15) yang akan menunjukkan bentuk strukturnya. 5- dan 15-F2-isoprostan paling banyak ditemukan, ini karena 8- dan 12-F2-isoprostan dapat mengalami oksidasi lebih lanjut. Dalam plasma, F2-isoprostan ditransportasikan dalam bentuk esternya. 15-F2-isoprostan

(8-isoprostan, 8-epi PGF2 α) menarik banyak perhatian karena memiliki aktivitas biologis. 8-isoprostan bersirkulasi dalam bentuk terikat dengan fosfolipid *in situ* dan diubah menjadi bentuk bebas oleh enzim fosfolipase A2.¹

Obstructive Sleep Apnea (OSA) dikarakterisasi oleh adanya periode *collapse* saluran napas atas yang berulang dan menimbulkan terjadinya siklus hipoksia/reoksigenasi yang menyebabkan peningkatan pembentukan spesies oksigen oleh stress oksidatif.² Radikal bebas oksigen yang terbentuk akan mengkatalis peroksidasi lipid yang akan menghasilkan isoprostan. Carpagnano dkk, telah mendemonstrasikan bahwa 8-isoprostan dalam darah perifer dan kondensat hembusan napas dari pasien dengan OSA mengalami peningkatan.³

Pengukuran 15-F2t-isoprostan dalam sampel biologi mendapatkan banyak tantangan. Dikarenakan kadar isoprostan, metabolit isoprostan, dan konjugat *in vivo* dalam jumlah besar, serta potensi terbentuknya senyawa ini secara *ex vivo* dari asam arakhidonat dan perbedaan protokol untuk proses GC/MS dan

immunoassay dari biomarker ini, sehingga tidak mengejutkan jika muncul perbedaan pendapat terhadap nilai kadar yang dihasilkan masing-masing metode. Masalah lainnya yaitu, 15-F2t-isoprostan merupakan salah satu isomer dari 64 isomer isoprostan. Untuk memastikan bahwa hanya 15-F2t-isoprostan saja yang terukur, maka sampel perlu dimurnikan terlebih dahulu, teknik *solid phase extraction* dan ekstraksi dengan kolom imunoafinitas merupakan teknik yang banyak digunakan untuk memurnikan sampel dari senyawa pengotor seperti isomer isoprostan yang akan mengganggu analisis.^{4,5}

Metoda analisis juga harus sensitif sebab kadar 15-F2t-isoprostan dalam sampel biologis sangat rendah. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) merupakan *gold standart* untuk pengukuran 15-F2t-isoprostan.¹ Metode GC-MS sangat sensitif namun mahal, memerlukan alat khusus dan memerlukan tenaga ahli untuk mengerjakannya sehingga metode lain yang dapat dijadikan sebagai metode pengukuran alternatif yaitu *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA). Metode ini memiliki kekurangan yaitu terjadinya reaksi silang 15-F2t-isoprostan dan metabolitnya dalam sampel dengan antibodi 15-F2t-isoprostan. Proses ekstraksi sampel merupakan upaya untuk menangani kelemahan ELISA sehingga metoda ini dapat digunakan untuk pengukuran 15-F2t-isoprostan yang dapat diandalkan dan dapat diulang untuk eksperimen stres oksidatif pada subjek manusia atau hewan.

Berdasarkan pengalaman di lapangan, diketahui bahwa hasil ekstraksi 15-F2t-isoprostan dengan teknik SPE menghasilkan perolehan kembali yang tidak memuaskan. Maka pada penelitian ini akan dilakukan perbaikan nilai perolehan kembali 15-F2t-isoprostan bebas dari teknik ekstraksi *Solid Phase Extraction* (SPE) dengan memodifikasi teknik SPE untuk ekstraksi 15 F2t isoprostan bebas yang dikembangkan oleh Morrow dkk⁶, sedangkan untuk perbaikan perolehan kembali

15-F2t-isoprostan bebas dengan ekstraksi imunoafinitas dilakukan modifikasi prosedur ekstraksi yang dianjurkan oleh produsen sorben imunoafinitas 15-F2t-isoprostan.⁷⁻⁸ Selanjutnya dibandingkan dari kedua teknik tersebut, teknik yang memberikan nilai perolehan kembali yang tertinggi dan selanjutnya teknik tersebut digunakan untuk mengekstraksi 15-F2t-isoprostan bebas dari plasma pasien OSA. Untuk kuantifikasi isoprostan digunakan metode ELISA.

Metode

- a. Bahan Percobaan
Solid phase extraction C18 Sep Pak Cartridges dan silika Sep-pak Cartridge (Waters Associates, Milford, MA), zat-zat kimia seperti :Etil asetat p.a, n-Heptana p.a, Aseton p.a, kalium hidroksida p.a, asam hidroklorida p.a, aseton p.a, metanol p.a , etanol p.a (Merck), aquadest, Sorben afinitas 8-isoprostan (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), Buffer fosfat (Roche), Pelat KLT C-18 RP(Merck), 8-Isoprostan EIA kit (Oxford Chemical, Ann Arbor, MI), pelat C-18 RP (Merck), gas nitrogen grade analitis.
- b. Alat Percobaan
Sentrifugator(Eppendorfsentrifugator 5415 C), Neraca analitis (Explorer OHAUS), Pompa Vakum, Rak kolom ekstraksi 12 lubang (Supelco VisiprepTM), Vortex mixer (VM-2000 digiSystem), evaporator (TurboVap® concentration workstation), BioRad Model 680 microplate ELISA reader.
- c. Penetapan Rasio Eluen untuk SPE
Kolom C18 sep pak dipasang pada vakum manifold dan diaktivasi dengan 5 mL etanol dilanjutkan 5 mL air deionisasi dengan pH 3, standar 15-F2t-isoprostan (5 ng dalam 1 mL buffer EIA) dengan pH 3, agar dapat diretensi dalam kolom, dimasukkan ke dalam kolom dengan laju alir 1 mL/me-

- nit. Cuci kolom dengan 10 mL air deionisasi dengan pH 3 dan dilanjutkan 10 mL heksana untuk menghilangkan sisa air pH 3 dan menghilangkan matriks yang diretensi dalam kolom. Elusi sampel dari kolom dengan eluen etil asetat: heksana 10 ml dengan 3 variasi rasio yaitu 55:45, 58:42 dan 60:40. Siapkan kolom silika sep pak pada vakum manifold, dan diaktivasi dengan 5 mL metanol dilanjutkan dengan 5 mL etil asetat. Masukkan tampungan hasil elusi dari kolom C18 sep pak ke dalam kolom silika sep pak dengan laju alir 1 mL/menit. Cuci kolom dengan 5 mL metanol dan 5 mL etil asetat untuk menghilangkan matriks yang diretensi dalam kolom. Elusi sampel dari kolom dengan 5 mL etil asetat:isopropanol (1:1) hingga kolom kering, tampung eluen keringkan dibawah aliran N₂ hingga tersisa residu berminyak. Sebelum dilakukan analisis dengan ELISA, sampel disimpan pada suhu -20°C. Larutkan sampel dengan bufer pengencer kemudian dianalisis dengan ELISA.
- d. Penetapan Volume dan Jenis Eluen pada Teknik Ekstraksi Imunoafinitas
Masukkan 200 µL sorben ke dalam sampel *cup* 1,5 mL, kemudian dicuci sebanyak 2 kali dengan 2–4 kali volume dapar fosfat. Masukkan standar 15-F2t-isoprostan (300 pg dalam 1 mL etanol), kemudian kocok perlahan selama 30–60 menit agar standar 15 F2t-isoprostan berikatan dengan antibodi pada sorben. Selanjutnya dicuci dengan 1 mL dapar fosfat dan dilanjutkan dengan 1 mL aquadest. Elusi dengan larutan elusi yang divariasikan menjadi dua yaitu 95% etanol dan 95% aseton, dengan variasi volume elusi yaitu: 1 x 1 mL, 2 x 0,5 mL, 3 x 0,5 mL. Eluat dikumpulkan kemudian dikeringkan dengan aliran gas N₂. Sebelum dilakukan analisis dengan ELISA, sampel disimpan pada suhu -20°C. Sampel siap dianalisis dengan ELISA, larutkan sampel dengan bufer pengencer kemudian dianalisis dengan ELISA.
- e. Pengukuran Konsentrasi 15-F2t-isoprostan Bebas dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)
Pengukuran ini menggunakan reagen kit komersil, yaitu 8-Isoprostan EIA kit (Oxford Chemical, Ann Arbor, MI), serapan dibaca pada panjang gelombang 450 nm.
- f. Penetapan Perolehan Kembali dari Plasma Sebanyak 1 mL sampel plasma ditambahkan dengan standar 15-F2t-isoprostan sebanyak 100, 300, 600, 1200 dan 2400 pg. Kemudian diekstraksi dengan SPE dan imunoafinitas dilanjutkan dengan pengukuran konsentrasi 15-F2t-isoprostan dilakukan menggunakan metode ELISA dengan prosedur seperti yang telah disebutkan diatas. Larutan hasil pencucian (etil asetat, heptana dan metanol) sampel pada SPE juga diukur konsentrasinya untuk mengetahui kemungkinan analit terbuang pada saat pencucian.
- g. Pengukuran 15-F2t-isoprostan Bebas pada Sampel Plasma Pasien *Obstructive Sleep Apnea* (OSA)
Pengukuran kadar 15-F2t-isoprostan bebas dilakukan terhadap plasma 42 pasien yang tidur mendengkur dilakukan penghitungan Apnea Hypopnea Index (AHI) untuk menentukan apakah pasien tersebut termasuk kategori OSA atau nonOSA. Jika nilai AHI ≥ 15 maka pasien dikelompokkan ke dalam kategori OSA.⁹ Dari hasil pengelompokan terdapat 20 pasien termasuk kategori OSA dan 22 pasien termasuk kategori nonOSA. Sebanyak 1 mL sampel plasma diekstraksi dengan sorben imunoafinitas dengan prosedur sama seperti yang telah disebutkan di atas. Eluen yang digunakan yaitu aseton 95% dengan volume eluen 3 x 0,5 mL. Selanjutnya pengukuran 15-F2t-isoprostan dilakukan dengan menggunakan metode

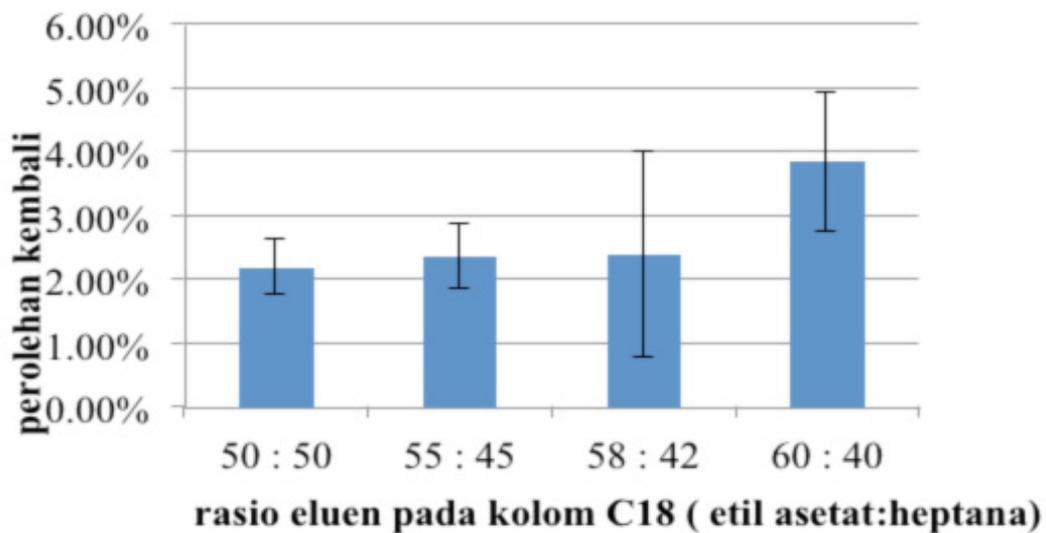
ELISA sesuai prosedur yang telah disebutkan di atas.

Hasil

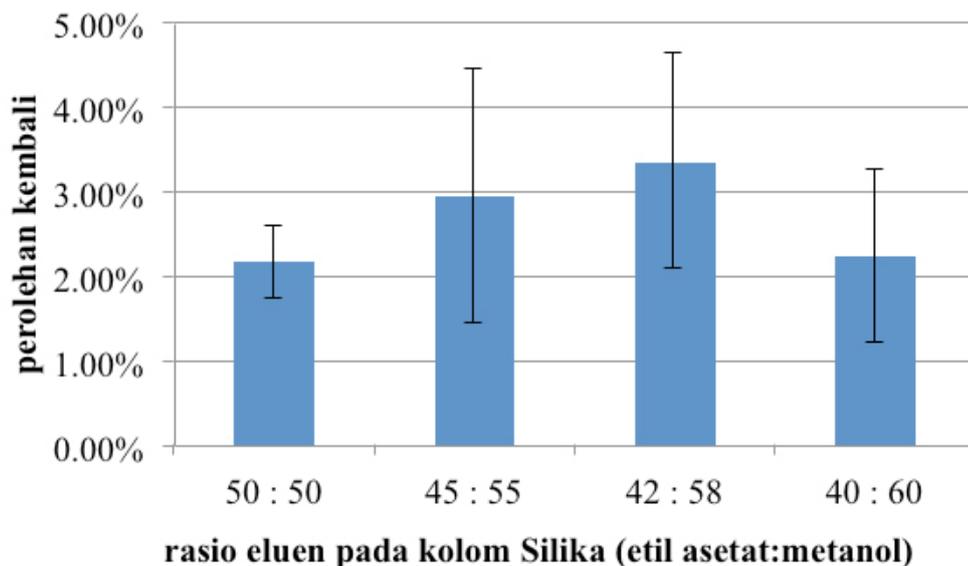
SPE

Persentase perolehan kembali standar 15-F2t-

isoprostan bebas yang dielusi dengan etil asetat:heptana dan etil asetat:metanol dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3. Hasil pengujian perbandingan rata-rata menggunakan ANOVA dan uji rentang Duncan ($p < 0,05$) diketahui bahwa interaksi antara faktor variasi eluen pada kolom C18 dengan variasi pada kolom



Gambar 2 Persentase perolehan kembali 15-F2t-isoprostan bebas terhadap variasi rasio eluen pada kolom C18 pada ekstraksi dengan teknik SPE (n = 5, rata-rata±SD)



Gambar 3 Persentase perolehan kembali 15-F2t-isoprostan bebas terhadap variasi rasio eluen pada kolom silika pada ekstraksi dengan teknik SPE (n = 5, rata-rata±SD)

silika tidak signifikan. Namun faktor variasi eluen pada kolom C18 berbeda signifikan, rasio etil asetat:heptana 60:40, v/v memiliki rata-rata tertinggi yang berbeda signifikan dengan rasio etil asetat:heptana 55:45, v/v dan 58:42, v/v.

Faktor variasi eluen pada kolom silika, rasio etil asetat:metanol 42:58, v/v memiliki rata-rata tertinggi yang berbeda signifikan dengan rasio etil asetat:metanol 40:60, v/v namun tidak berbeda signifikan dengan rasio etil asetat:metanol 45:55, v/v.

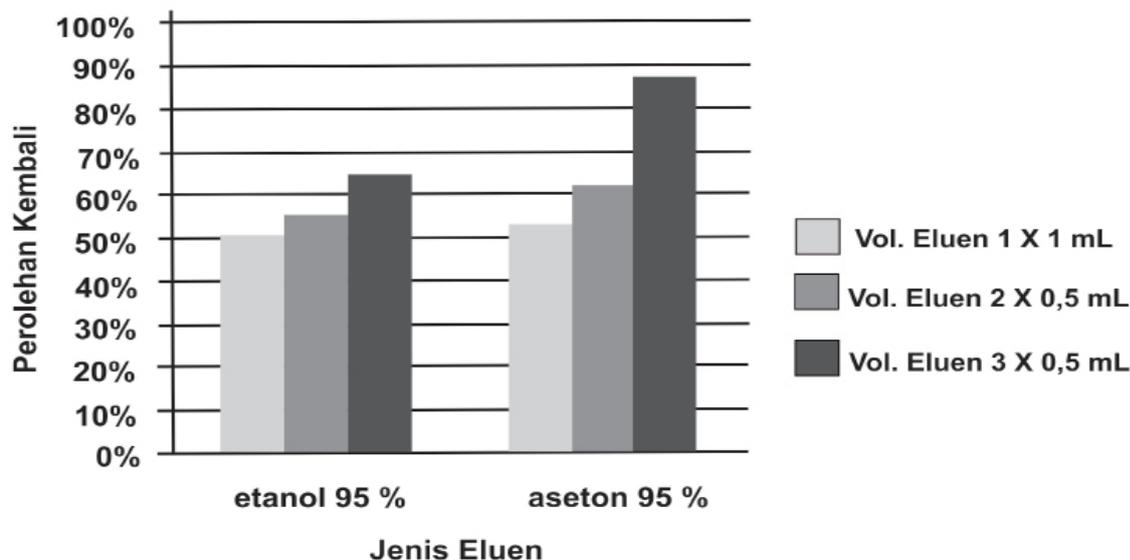
Jika dibandingkan dengan rasio eluen yang digunakan pada teknik yang digunakan Morrow dkk⁶, yaitu etil asetat:heptana, 50:50 v/v, maka etil asetat:heptana 60:40 v/v memberikan perolehan kembali yang lebih besar dan etil asetat:metanol 42:58 v/v juga memberikan perolehan kembali yang lebih besar dibandingkan dengan etil asetat:metanol 50:50 v/v.

Secara keseluruhan, teknik ekstraksi ini memberikan nilai perolehan kembali sangat kecil, yaitu hanya 2–3%. Ketika pada hasil tumpang proses pencucian dilakukan kegiatan pengukuran kadar 15-F2t-isoprostan,

maka diketahui bahwa proses pencucian dengan metanol pada ekstraksi dengan menggunakan kolom silika analit banyak tercuci yaitu sekitar 90%.

Ekstraksi Imunoafinitas

Prosedur ekstraksi yang digunakan berdasarkan prosedur yang dianjurkan oleh produsen sorben (Cayman). Produsen menganjurkan menggunakan eluen etanol 95% dan volume eluen 2 x 0,5 mL. Pada penelitian ini dicoba dua jenis eluen yaitu etanol 95% dan eluen yang lebih polar yaitu aseton 95%, jenis eluen ini digunakan pada pengembangan teknik ekstraksi imunoafinitas yang telah dilakukan oleh Bachi dkk⁸, sedangkan volume eluen yang digunakan ada tiga variasi, yaitu 1 x 1 mL, 2 x 0,5 mL dan 3 x 0,5 mL, volume eluen yang terakhir juga digunakan pada teknik ekstraksi imunoafinitas yang dikembangkan oleh Bachi dkk.¹⁰ Persentase perolehan kembali hasil ekstraksi imunoafinitas dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan hasil pengujian perbandingan nilai rata-rata dengan ANOVA dan uji rentang Duncan (Tabel 1), diketahui interaksi antara



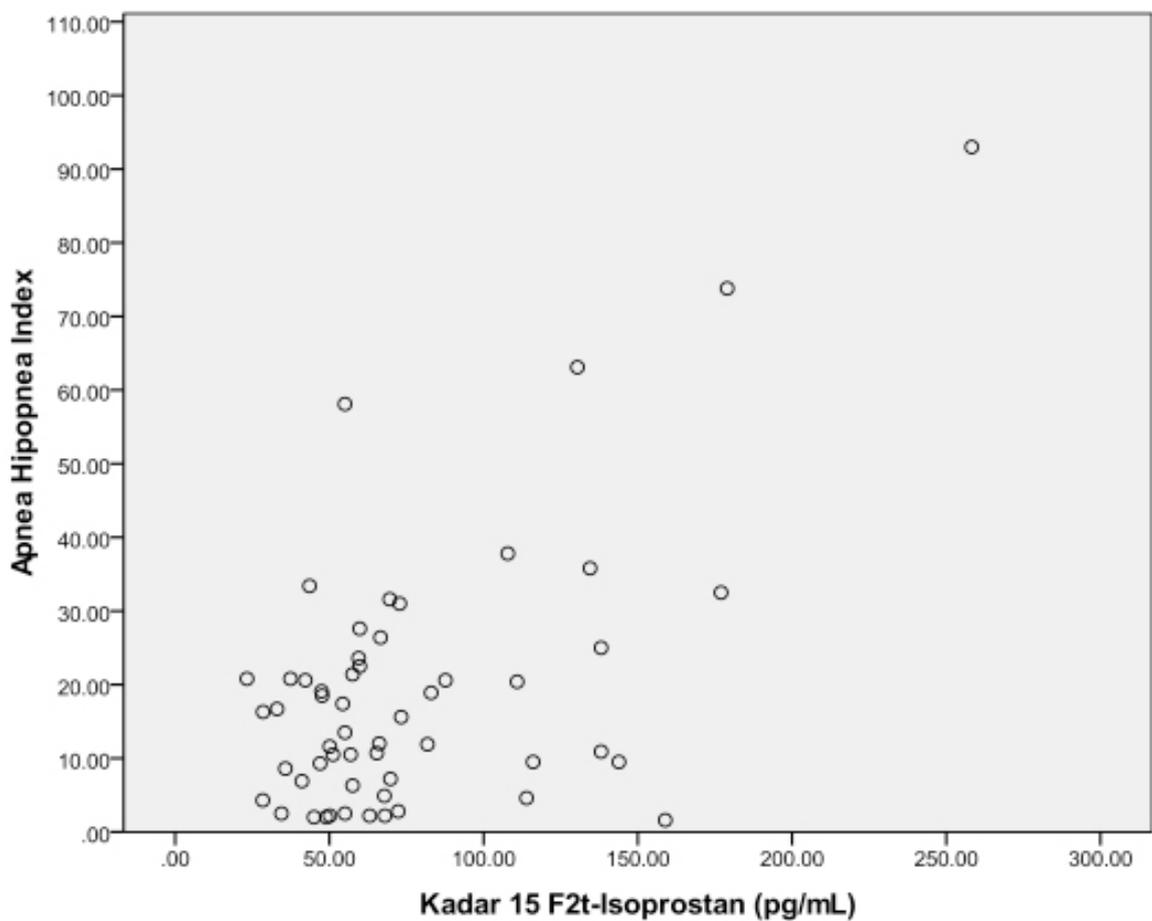
Gambar 4 Persentase perolehan kembali 15 F2t-isoprostan terhadap variasi jenis eluen dan volume eluen pada ekstraksi dengan imunoafinitas (n=5, rata-rata ± SD)

faktor jenis eluen dengan volume eluen signifikan. Eluen aseton 95% dengan volume eluen 3x0,5 mL memberikan nilai rata-rata

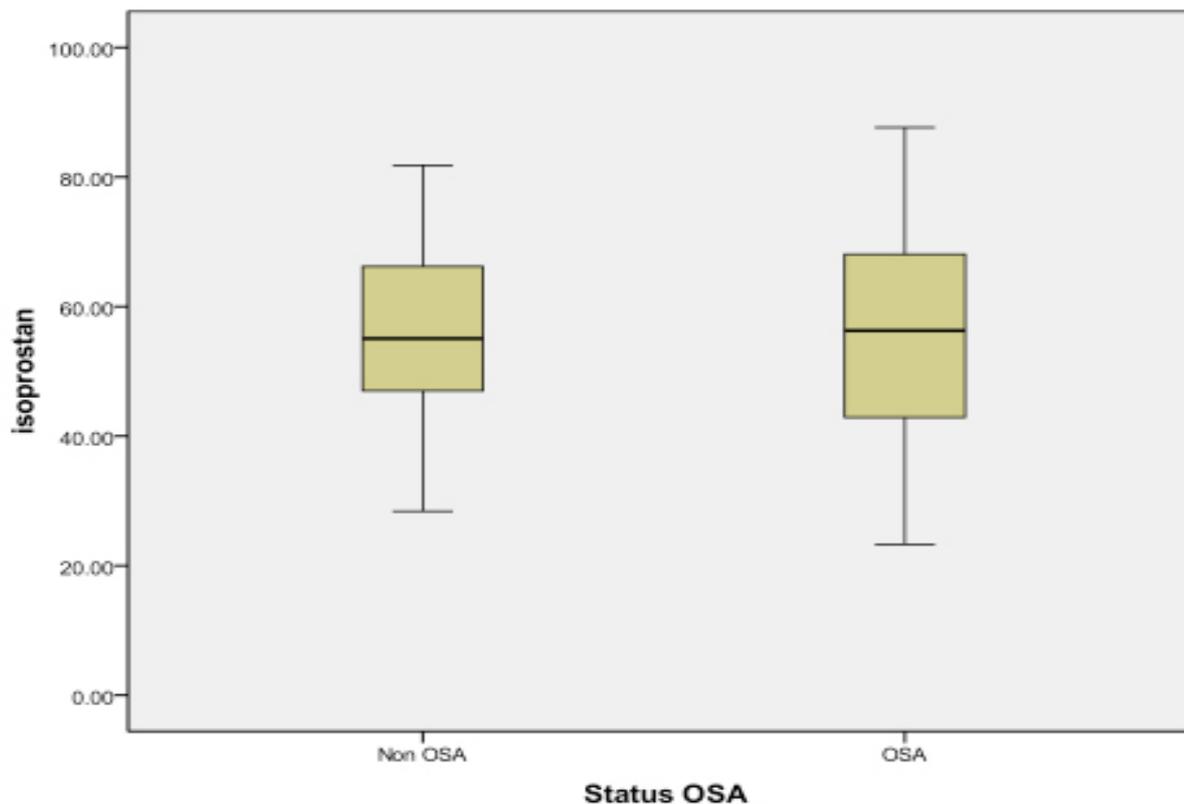
tertinggi dan berbeda secara signifikan dengan interaksi faktor jenis eluen dan volume eluen yang lainnya.

Tabel 1 Rata-rata persentase perolehan kembali hasil ekstraksi 15-F2t-isoprostan Bebas± simpangan baku yang diuji dengan uji rentang Duncan, *) harga rata-rata yang diikuti dengan huruf beda menunjukkan ada perbedaan yang bermakna berdasarkan uji rentang Duncan

Eluen	Volume Eluen		
	1 x 1 mL	2 x 0,5 mL	3 x 0,5 mL
Etanol 95%	50,84 (4,89) (c)*	55,44 (2,48) (bc)*	64,98 (15,36) (b)*
Aseton 95%	52,65 (6,05) (c)*	61,89 (9,18) (bc)*	87,55 (6,18) (b)*



Gambar 5 Hubungan kadar 15-F2t-isoprostan bebas dengan nilai *Apnea Hipopnea Index* (AHI) pada sampel plasma orang yang mendengkur



Gambar 6 Hasil pengukuran 15-F2t-isoprostan bebas pada pasien OSA dan non OSA (n=42)

Linieritas

Hubungan antara standar 15-F2t-isoprostan yang dimasukkan dan perolehan kembalinya diuji dengan cara menambahkan (spiking) 100 pg, 300 pg, 600 pg, 1,2 ng dan 2,4 ng standar 15-F2t-isoprostan dan kemudian diekstraksi dengan prosedur yang sama dengan prosedur yang digunakan untuk menentukan perolehan kembali dari plasma di atas⁵. Terdapat korelasi yang baik antara standar 15-F2t-isoprostan yang ditambahkan dengan 15-F2t-isoprostan yang terukur, untuk teknik SPE memenuhi persamaan $y=0,056x+25,71$ dengan $R^2=0,968$ dan untuk teknik imunoafinitas memenuhi persamaan $y=0,905x+51,51$ dengan $R^2=0,999$.

Pengukuran kadar 15-F2t-Isoprostan pada pasien OSA

Hubungan AHI dengan kadar 15-F2t-isoprostan dapat dilihat pada Gambar 5. Hasil uji statistik *t-student* tidak menunjuk-

kan adanya perbedaan yang signifikan, hal ini kemungkinan disebabkan kurangnya jumlah sampel. Penelitian yang dilakukan oleh Fattah dkk⁹, terhadap 63 pasien yang mendengkur menunjukkan perbedaan kadar 15-F2t-isoprostan pada penderita OSA dan non OSA. Namun dari nilai rata-rata tampak ada kecenderungan tingginya kadar 15-F2t-isoprostan bebas pada pasien OSA. Grafik hasil pengukuran kadar 15-F2t-isoprostan dapat dilihat pada Gambar 6.

Pembahasan

Ekstraksi dengan SPE menggunakan dua jenis kolom, yaitu kolom C18 dan kolom silika. Kolom C18 digunakan untuk menarik lipid dari sampel biologis (plasma), sedangkan kolom silika digunakan untuk memisahkan analit (15-F2t-isoprostan bebas) dari golongan senyawa lipid lainnya.⁴

Eluen yang digunakan mengacu pada

metode yang dikembangkan Morrwo dkk⁶, yaitu campuran etil asetat:heptana untuk kolom C18 dan campuran etil asetat:metanol untuk kolom silika. Pada penelitian ini rasio eluen divariasikan dengan tujuan untuk meningkatkan kekuatan eluen dalam menarik analit. Sebelum sampel dielusi, dilakukan proses pencucian dengan heptana dengan tujuan untuk menarik matriks dan sisa air yang terikat pada fase diam. pada kolom C18, jumlah heptana dikurangi sedangkan jumlah etil asetat ditambah agar lipid yang bersifat semi polar dapat tertarik sempurna. Pada proses ekstraksi dengan kolom silika, jumlah metanol ditambah dengan tujuan untuk meningkatkan kepolaran sehingga dapat mengekstraksi senyawa 15-F2t-isoprostan bebas yang relatif polar.⁵ Hasil menunjukkan bahwa eluen etil asetat:metanol (42 : 58) dapat mengelusi lebih banyak 15-F2t-isoprostan hal ini kemungkinan disebabkan kepolaran eluen yang sesuai dengan kepolaran analit.

Ketika dilakukan pengukuran konsentrasi 15-F2t-isoprostan bebas pada tampungan pelarut hasil pencucian, dalam tampungan pelarut metanol banyak terkandung 15-F2t-isoprostan, hal ini kemungkinan disebabkan polaritas metanol yang dapat mendesorpsi analit yang terikat pada fasa diam silika. Dengan demikian, pada penelitian selanjutnya perlu dicari jenis pelarut yang selektif menarik matriks yang tersorpsi oleh sorben tanpa ikut menarik analit.

Pada ekstraksi imunoafinitas, aseton 95% dapat mengelusi 15-F2t-isoprostan lebih baik dapat disebabkan karena 15-F2t-isoprostan bebas lebih larut dalam aseton 95% dibandingkan dalam etanol 95%.¹⁰ Pengelusan yang dilakukan beberapa kali dapat menarik analit lebih banyak dibandingkan pengelusan hanya satu kali saja.

Hasil ekstraksi dengan sorben imunoafinitas menghasilkan perolehan kembali yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan SPE. Pada teknik SPE, perolehan kembali tergan-

tung pada efisiensi proses sorpsi dan desorpsi analit yang terjadi berdasarkan sifat fisiko-kimia, sehingga kurang selektif dibandingkan dengan teknik ekstraksi imunoafinitas. Pemilihan eluen yang kuat adalah salah satu cara untuk meningkatkan efisiensi desorpsi, namun desorpsi juga ditentukan oleh volume eluen yang digunakan⁴, pada proses pencucian juga memungkinkan terjadinya desorpsi analit dari sorben yang seharusnya tidak terjadi. Massa dari sorben juga menentukan efisiensi dari proses sorpsi analit. Pada penelitian ini hanya diamati pengaruh eluen terhadap perolehan kembali analit yang diekstraksi dan tidak dilakukan perbaikan untuk faktor lain yang juga mempengaruhi nilai perolehan kembali seperti yang telah disebutkan diatas, hal tersebut mungkin menyebabkan rendahnya perolehan kembali dari ekstraksi 15-F2t-isoprostan dengan SPE.

Meskipun teknik ekstraksi SPE memberikan perolehan kembali yang sangat kecil, namun dengan adanya korelasi yang baik antara jumlah standar 15-F2t-isoprostan yang ditambahkan dan kadar 15-F2t-isoprostan yang terukur, maka teknik ekstraksi SPE masih dapat digunakan untuk pengukuran 15-F2t-isoprostan sebagai petanda status oksidatif stress mengamati perkembangan penyakit yang berkaitan dengan oksidatif stres setelah dilakukan terapi. Akan tetapi teknik ekstraksi ini tidak dapat digunakan untuk mengukur kadar 15-F2t-isoprostan yang menggunakan nilai *cut off*.

Hasil pengukuran 15-F2t-isoprostan pada pasien mendengkur yang diklasifikasi menjadi pasien OSA dan non OSA berdasarkan nilai indeks AHI perbedaannya tidak signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan jumlah sampel yang terlalu kecil.

Selain sebagai petanda dari status oksidatif, 15-F2t-isoprostan juga mempunyai efek biologis diantaranya meningkatkan aktivasi platelet dan vasokonstriksi.¹¹⁻¹³ Kecenderungan tingginya kadar 15-F2t-isoprostan yang

tinggi pada penderita OSA menjelaskan risiko atas penderita OSA terhadap beberapa penyakit seperti penyakit kardiovaskular.⁹

Simpulan

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi eluen pada teknik ekstraksi 15-F2t-isoprostan bebas dari sampel plasma, yaitu teknik SPE dan imunoafinitas untuk meningkatkan efektifitas ekstraksi yang dinilai dengan melihat persentase perolehan kembali. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa rasio eluen etil asetat:heptana (60:40) pada kolom C18 dan etil asetat:metanol (42:58) pada kolom silika memberikan perolehan kembali yang sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan rasio eluen yang digunakan pada teknik SPE yang dikembangkan oleh Morrow, dkk. Sedangkan pada ekstraksi 15-F2t-isoprostan dengan teknik imunoafinitas yang memberikan perolehan kembali tertinggi yaitu aseton 95% dengan volume eluen yang digunakan 3 x 0,5 mL.

Selanjutnya dari pengamatan mengenai perolehan kembali analit dari sampel plasma diketahui bahwa ada pengaruh matriks terhadap perolehan kembali 15-F2t-isoprostan dimana rata-rata perolehan kembali 15-F2t-isoprostan setelah diekstraksi dengan teknik SPE sangat rendah yaitu 3,92%, yang kemudian diketahui bahwa hal tersebut disebabkan analit banyak terbuang pada proses pencucian dengan metanol. Teknik ekstraksi imunoafinitas rata-rata perolehan kembalinya yaitu 73,18%. Korelasi antara input standar 15 F2t isoprostan dengan perolehan kembali 15-F2t-isoprostan dari plasma cukup baik (kemiringan berturut-turut 0,056 dan 0,905 untuk teknik SPE dan imunoafinitas, R² berturut-turut 0,968 dan 0,999 untuk teknik SPE dan imunoafinitas).

Hasil Pengukuran 15-F2t-isoprostan bebas pada orang-orang yang mengalami tidur mendengkur kemudian dikelompokkan menjadi OSA dan non OSA berdasarkan nilai AHI (*Apnea Hypopnea Index*). Pada penderita OSA

kadar 15-F2t-isoprostan bebas cenderung lebih tinggi dibandingkan penderita nonOSA meskipun setelah dilakukan uji statistik perbedaannya tidak signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan kurangnya jumlah sampel. Penelitian yang dilakukan oleh Fattah dkk⁷ terhadap 63 pasien yang mendengkur menunjukkan perbedaan kadar 15-F2t-isoprostan pada penderita OSA dan nonOSA. Terdapat kecenderungan tingginya konsentrasi 15-F2t-isoprostan menjelaskan hubungan risiko penderita OSA terhadap penyakit tertentu seperti arteriosklerosis.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Prodia Widyahusada atas peralatan dan fasilitas penelitian yang diberikan.

Daftar Pustaka

1. Nourooz-Zadeh J. Key issues in F2-isoprostan analysis. *Biochemical Society Transactions*, 2008, 36(5): 1060–1065.
2. Minoguchi K, Yokoe T, Tanaka A, Ohta S, Hirano T, Yoshino G, O'Donnell CP, Adachi M. Association between lipid peroxidation and inflammation in obstructive sleep apnea. *European Respiratory Journal*, 2006, 28(2): 378–385.
3. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostan and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest*, 2002, 122(4): 1162–1167.
4. Christie WW. Solid-Phase Extraction columns in the analysis of lipid. In: *advances in lipid methodology*. Ed: Christie WW. The Oily Press: Skotlandia. 1992. 1–17.
5. Welsh TN, Hubbard S, Mitchell CM, Mesiano S, Zarzycki PK, Zakar T. Optimization of solid phase extraction procedure for prostaglandin E₂, F_{2α} and their tissue

- metabolites. *Prostaglandin and Other Lipid Mediator*, 2007, 83(10): 304–310.
6. Morrow JD, Roberts LJ 2nd. Mass spectrometric quantification of F2-Isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods in Enzymology*, 1999, 300: 3–12.
 7. Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson RL, Morrow J. *Methods in Enzymology*. 2007, 422: 133–126.
 8. Liu W, Morrow JD, Yin H. Quantification of F2-Isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) method. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009, 37(4): 349–352.
 9. Fattah M. Mekanisme molekular hubungan antara obstructive sleep apnea dengan disfungsi endotel dan kematian sel (disertasi) Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. 2012.
 10. Bachi A, Zuccato E, Baraldi M, Fanelli R, Chiabrando C. Measurement of urinary 8-Epi-Prostaglandin F2 α , a novel index of lipid peroxidation in vivo, by immuno-affinity extraction/gas chromatography-mass spectrometry. Basal Levels in Smokers and Nonsmoker. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20(4): 619–624.
 11. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd. Isoprostane: marker and mediators of oxidative stress. *FASEB Journal*, 2004, 18(15): 1791–1800.
 12. Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J, Namieśnik J. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010, 11: 4631–4659.
 13. Scholza H, Yndestada A, Damåsa JK, Wæhrea T, Tonstadd S, Aukrusta P., et al. 8-Isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovascular Research*, 2003, 54(9): 945–954.