

EFEK PEMBERIAN ANTIOKSIDAN TOKOFEROL ALFA TERHADAP MEMBRAN SEL DARAH MERAH TALASEMIA

Gultom, FP *, Adhiyanto, C **

*Departemen Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

**Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Gultom FP, Adhiyanto. Efek pemberian antioksidan tokoferol alfa terhadap membran sel darah merah talasemia. Indonesian Journal of Dentistry 2004; 11(2): 71-75

Abstract

Talasemia is blood disorder which is characterised by anemia due to inherited haemoglobine disorder. The anemia is caused by a decreased flexibility of the erythrocyte results in decreased capability of required deformability to be able to across through capillary blood vessels. Free radicals with one or more unpaired electron on potential in destroying all the molecule exist in the body of living things like protein, carbohydrate and fat. Tocoferol or vitamin E is an antioxidan essential in eliminating free radicals in the cell membrane by inhibiting the peroxidation process of the cell membrane lipid. The objective of this study is to investigate the severity of the erythrocyte destruction either those with or without oxidative load from the environment. The results of this study showed that the level of malondialdehyd in the control erythrocyte was $1,85 \pm 1.37$ nmol in talasemia and $1,02 \pm 0.64$ nmol in normal ($p < 0.05$). The addition of 2mM t-BHP resulted in increased malondialdehyd level up to $19,59 \pm 6.82$ nmol in talasemia and $11,42 \pm 3.49$ nmol in normal erythrocytes ($P < 0.05$). Oxidated erythrocyte with vitamin E supplement beforehand showed lower level of malondialdehyd composed to those without vitamin E supplement ($p < 0.05$). Conclusion: Additional vitamin E (tocoferol) leads to decreased level of malondialdehyd both in the normal and thalasemia erythrocytes.

Keyword: haemoglobine disorder, erythrocyte destruction, malondialdehyd level

Pendahuluan

Penyakit talasemia merupakan penyakit kelainan darah yang banyak ditemukan, terutama pada orang yang berasal dari Laut Tengah, Timur Tengah dan Asia. Penyakit ini merupakan penyakit

yang diakibatkan oleh kelainan hemoglobin yang bersifat diturunkan. Kelainan ini diakibatkan oleh adanya gangguan sintesis globin.^{1, 2, 3} Salah satu ciri dari penyakit talasemia adalah destruksi sel darah merah yang lebih cepat daripada sel darah merah normal.

Para ahli biomedik telah banyak melakukan penelitian sebagai usaha untuk melakukan penelitian pengobatan penderita penyakit talasemia. Dalam rangka mencari penyebab cepatnya kematian sel darah merah talasemia, salah satu penelitian yang telah dilakukan

adalah melihat daya tahan sel darah merah talasemia, terhadap beban oksidatif.^{4,5} Diduga cepatnya kematian sel darah merah talasemia, tidak hanya disebabkan oleh kelainan globin, namun adanya oto-oksidasi di membran sel darah merah dapat memperpendek usia sel darah merah talasemia.^{6,7}

Dari segi kelenturan, membran sel darah merah penderita talasemia ternyata berbeda dengan membran sel darah merah normal. Membran sel darah merah penderita talasemia lebih "rigid" (agak kaku) dan lebih sukar dilisis bila dilarutkan dalam suatu larutan hipotonik. Adanya beban oksidatif dalam sel, menyebabkan terjadinya ikatan lintas silang ("cross-link") pada komponen protein membran sel darah merah. Sel darah merah penderita talasemia juga lebih peka terhadap pembebanan oksidatif dari luar, karena enzim antioksidan dan antioksidan yang ada dalam sel darah merah, telah banyak digunakan untuk perlindungan terhadap oto-oksidasi.^{4,8}

Penelitian mengenai talasemia kebanyakan dilakukan dari segi genetik. Padahal, penyakit ini menampilkan gejala pada tingkat produk ekspresi genetik, yaitu hemoglobin, dengan segala akibatnya di sebelah hilir dari hemoglobin. Informasi tentang berbagai gejala akibat gangguan hemoglobin tersebut masih sedikit dan yang adapun masih terpaku kepada masalah penumpukan besi dengan segala akibatnya. Penelitian dalam bidang biomembran diharapkan dapat menambah informasi untuk menurunkan laju kematian sel darah merah talasemia.⁴

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai suatu molekul atau atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Molekul radikal merupa-

kan molekul yang sangat reaktif karena molekul ini memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbit luarnya, sehingga mudah bereaksi dengan molekul lain dengan cara mengikat elektron terluar dari molekul tersebut.^{9,10,11} Semua molekul yang ada dalam tubuh makhluk hidup, seperti protein, lemak, asam nukleat dan karbohidrat berpotensi sebagai sasaran pengrusakan oksidatif oleh senyawa radikal bebas.¹¹

Dalam sistem biologi, oksidasi yang bersifat biradikal akan direduksi untuk menghasilkan energi dan air melalui proses yang sangat rumit.¹² Dalam mekanisme mereduksi oksigen, dapat dihasilkan senyawa radikal reaktif. Senyawa radikal ini, dapat diubah menjadi senyawa yang tidak berbahaya dengan bantuan enzim antioksidan seperti katalase maupun antioksidan seperti tokoferol dalam tubuh makhluk hidup.^{13,14,15}

Tokoferol atau vitamin E merupakan antioksidan yang paling penting karena vitamin E merupakan "scavenger" utama untuk menyingkirkan radikal bebas yang ada dalam membran sel dengan jalan menghambat proses peroksidasi lipid membran sel.^{11,15} Bentuk tokoferol yang paling efektif adalah d- α tokoferol, karena bentuk ini yang mudah diserap oleh usus dan dapat bertahan lama dalam jaringan.¹¹

Penyakit talasemia merupakan salah satu penyakit akibat kelainan hemoglobin yang bersifat diturunkan. Kelainan ini diakibatkan oleh adanya gangguan sintesis globin.^{2,3} Penyakit talasemia merupakan salah satu penyakit kelainan darah yang menjadi masalah dalam kesehatan dunia. Salah satu cirinya adalah destruksi sel darah merah yang lebih cepat daripada sel darah merah normal.

Para ahli biomedik telah banyak melakukan penelitian sebagai usaha untuk pengobatan penderita penyakit talasemia. Dalam rangka mencari penyebab cepatnya kematian sel darah merah talasemia, salah satu penelitian yang telah dilakukan adalah melihat adanya daya tahan sel darah merah talasemia terhadap pembebanan oksidatif.^{4,5} Diduga, cepatnya kematian sel darah merah talasemia, tidak hanya disebabkan oleh kelainan globin. Adanya oto-oksidasi di membran sel darah merah dapat memperpendek usia sel darah.^{6,7} Sel darah merah penderita talasemia juga lebih peka terhadap pembebanan oksidatif dari luar, karena enzim antioksidan dan antioksidan yang ada dalam sel darah merah, telah banyak digunakan untuk perlindungan terhadap oto-oksidasi.^{5,15}

Tujuan Penelitian :

Sel darah merah talasemia lebih peka terhadap beban oksidatif bila dibandingkan dengan sel darah merah normal. Karena itu, perlu dipelajari berbagai usaha untuk menanggulangi permasalahan destruksi sel darah merah talasemia yang diakibatkan oleh beban oksidatif, baik yang berasal dari luar maupun dari dalam tubuh, dengan pendekatan dari segi biomembran. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui seberapa besar kerusakan sel darah merah talasemia, baik yang tidak diberi beban oksidatif maupun yang diberi beban oksidatif dari luar.

Metode Penelitian

1. Pembuatan spektrum absorpsi malondialdehid kurva standar.

Sebelum penetapan kadar malondialdehid (MDA) sel darah

merah, terlebih dahulu dibuat spektrum absorpsi MDA, dengan menggunakan tetrametoksipropion sebagai prekursor malondialdehid. Dari spektrum ini dapat diketahui panjang gelombang pada absorpsi maksimum yang akan digunakan selanjutnya untuk penetapan kadar malondialdehid sel darah merah.

2. Preparasi sel darah merah

Sel darah merah disiapkan menurut cara Trotta.¹⁴ Darah diambil sebanyak 3 mL, ditampung dan disimpan dalam tabung EDTA Grainner dalam suhu 4^o C hingga saat pemeriksaan. Pada awal penyiapan sel darah merah, darah disentrifus selama 5 menit, kemudian sel darah merah dipisahkan dari serum. Sel darah merah dicuci dua kali dengan PBS sebanyak 2 mL, dan disentrifus kembali selama 5 menit, supernatan dibuang. Sel darah merah yang telah dicuci kemudian ditambahi PBS sehingga didapat suspensi 20% dalam PBS. Kemudian suspensi dalam sel darah merah PBS diambil sebanyak 500 uL untuk pengujian peroksidasi lipid. Untuk melihat efek antioksidan, sebelumnya sel darah merah-PBS diberi perlakuan dengan beban oksidatif, yaitu 500 uL sel darah merah-PBS dicampur dengan 1 mL t-BHP 2 mM dan 500 uL bufer KRP. Selanjutnya campuran ini diperlukan untuk pengujian peroksidasi lipid. Pada uji sel darah merah-PBS yang diberi oksidan dan beban oksidatif, 500 uL sel darah merah-PBS ditambahi tokoferol setelah inkubasi pada suhu 37^o C selama 30 menit, dicuci dengan KBS dan disentrifus selama 5 menit. Supernatan dibuang. Sedimen sel darah merah ditambahi 1 mL t-BHP 2 mM dan 500 uL buffer KRP. Dan selanjutnya campuran ini diperlukan untuk pengujian peroksidasi lipid.

3. Pengukuran malondialdehid darah merah

500 uL sel darah merah-PBS ditambahi buffer KRP sebanyak 1,5 mL. Campuran ini diinkubasi pada penangas air 37^o C selama 30 menit, setelah didinginkan, disentrifus selama 5 menit dan supernatan diambil. Ke dalam supernatan ditambahkan 1 mL TCA 30% dan disentrifus kembali selama 5 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung yang telah berisi TBA 1 mL, dipanaskan selama 10 menit dalam penangas suhu 80^o C. setelah itu larutan didinginkan dalam air mengalir dan absorban diukur pada panjang gelombang yang menunjukkan absorpsi maksimum.

Hasil Penelitian

Kadar malondialdehid dinyatakan sebagai nmol MDA/g Hb dalam SDM talasemia dan normal. Kadar malondialdehid dalam SDM yang tidak mendapat per-

lakuan apapun (kontrol), rata-rata adalah 1,85 ± 1,37 nmol untuk talasemia dan 1,02 ± 0,64 nmol untuk normal (p < 0.05). Pemberian t-BHP sebanyak 2mM menyebabkan kadar tersebut melonjak sampai 19,59 ± 6,82 nmol untuk SDM talasemia dan 11,42 ± 3,39 nmol untuk SDM normal (p < 0.05). Bila SDM yang akan dioksidasi dengan t-BHP diberi vitamin E sebelumnya, maka kadar malondialdehid SDM lebih rendah dibandingkan tanpa pemberian vitamin E (p < 0.05).

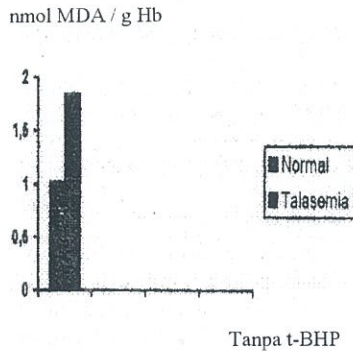
Pembahasan

Kadar malondialdehid sel darah merah tanpa pembebanan oksidatif

Kadar malondialdehid SDM normal tanpa pembebanan oksidatif adalah 1,02 ± 0,64 nmol / g Hb sedang untuk talasemia adalah 1,85 ± 1,37 nmol / g Hb (p < 0.05) (Gambar 1).

Tabel 1. Tabel induk hasil penelitian

No.	Normal T.P	Talasemia T.P	Normal P	Talasemia P	Normal Vit E	Talasemia Vit E
1	0.40	3.68	7.40	11.52	7.00	11.05
2	1.10	2.65	8.70	14.40	7.20	12.79
3	1.50	2.71	9.00	10.58	8.50	10.49
4	0.80	2.57	12.60	15.41	8.80	12.96
5	2.10	3.86	16.40	12.85	6.60	10.01
6	1.50	1.70	10.00	31.50	7.70	12.10
7	2.50	5.70	18.60	2.45	10.90	18.60
8	1.10	0.60	8.00	15.01	7.80	8.10
9	1.50	0.20	10.00	15.80	7.70	7.60
10	1.33	2.00	14.30	29.60	9.40	11.30
11	1.10	1.20	6.28	16.00	4.42	14.40
12	1.80	1.80	9.73	14.80	7.63	6.40
13	1.71	0.70	10.06	22.70	8.24	6.40
14	0.50	0.50	10.00	25.80	5.70	7.96
15	0.25	1.30	11.00	34.32	2.00	12.67
16	0.20	0.40	11.60	26.22	3.00	9.60
17	0.22	3.02	9.90	15.13	2.60	6.52
18	0.65	2.09	16.63	14.23	3.10	5.77
19	0.30	1.17	11.11	23.29	2.00	3.16
20	0.25	0.10	8.17	23.16	2.24	7.16
21	0.65	0.60	10.36	14.50	2.00	6.82
	1.02 ± 0.46	1.85 ± 1.37	11.42 ± 3.39	19.59 6.82	5.94 ± 2.27	9.56 ± 3.49



Gambar 1. Kadar malondialdehid sel darah merah tanpa t-BHP

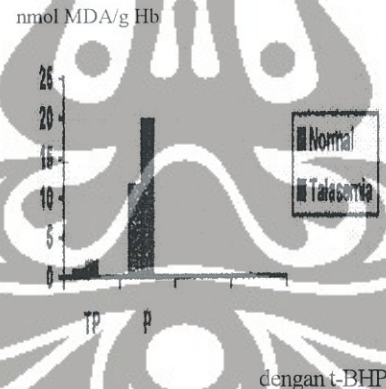
Jelas bahwa kadar malondialdehid SDM talasemia, sekalipun tanpa beban oksidatif, lebih tinggi daripada kadar malondialdehid SDM talasemia, sekalipun tanpa beban oksidatif, lebih tinggi daripada kadar malondialdehid SDM normal. Hal ini menunjukkan, bahwa dalam keadaan biasa saja, produksi peroksida lipid SDM normal. Stocks, seperti yang dikutip oleh Rachmilewitz menyatakan bahwa membran sel darah merah talasemia jauh lebih mudah mengalami oto-oksidasi dibandingkan dengan membran sel darah merah normal.⁵ Oto-oksidasi sendiri merupakan peristiwa biasa yang terjadi pada sel dengan metabolisme aerob.¹⁴ Rachmilewitz⁵ juga menyatakan bahwa pada sel darah merah talasemia terjadi ketidakseimbangan antara radikal yang dihasilkan saat hemoglobin teroksidasi dengan mekanisme pertahanan terhadap radikal. Akibatnya radikal tersebut akan menyerang lipid membran dan meningkatkan produk peroksidasi lipid.

Kadar malondialdehid sel darah merah yang diberi beban oksidatif.

Kadar malondialdehid SDM dengan beban oksidatif

berupa 2mM t-butyl hidroperoksida (t-BHP) adalah 11.42 ± 3.39 nmol/g Hb pada sel darah merah normal dan 19.59 ± 6.82 nmol/g Hb pada sel darah talasemia ($p < 0.05$) (Gambar 2). Ini menunjukkan bahwa kemampuan SDM talasemia untuk menahan beban oksidatif berupa t-BHP, lebih rendah dibandingkan SDM normal sehingga peningkatan kadar malondialdehid (MDA) SDM talasemia lebih besar daripada sel darah merah normal.

Kadar rata-rata malondialdehid untuk sel darah merah talasemia, hampir dua kali kadar malondialdehid untuk sel darah merah normal. Hal ini menunjukkan, sel darah merah talasemia (khususnya lipid membran SDM) telah banyak mengalami peroksidasi lipid, sebelum diberi oksidator dari luar. Pemberian oksidator dari luar akan memperparah kerusakan dari membran sel darah merah talasemia.



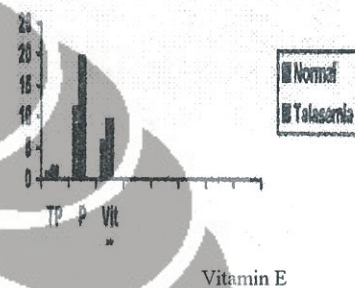
Gambar 2. Kadar malondialdehid sel darah yang diberi t-BHP.

Efek pemberian vitamin E terhadap kadar MDA SDM yang dibebani t-BHP

Berdasarkan uji yang menggunakan vitamin E terhadap kemampuan sel darah merah untuk menahan beban oksidatif, pemberian vitamin E sebelum pem-

berian beban oksidatif, menurunkan kadar malondialdehid pada kedua sampel darah uji. Ini berarti, vitamin E bereaksi dengan radikal t-BHP, sehingga radikal tersebut tidak sempat merusak dwilapis lipid membran, khususnya lipid yang tak jenuh jamak. Dengan sendirinya, peroksidasi lipid yang menghasilkan malondialdehid berkurang.

nmol MDA/g Hb



Gambar 3. Pemberian vitamin E sebagai antioksidan

Kesimpulan

Pemberian vitamin E atau tokoferol dapat menurunkan kadar malondialdehid dalam sel darah merah talasemia dan normal dengan beban oksidatif.

Daftar Pustaka

1. Wahidayat I. *Penelitian Thalassemia di Jakarta*. Jakarta, 1979.
2. Shinae E, Shalev O, Rachmilewitz EA, Schier SL. Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe β Thalassemia. *Blood* 1987; 70 (1) : 158-64.
3. Olivieri FN. *Reactivation of fetal hemoglobin in patients with β thalassemia*. Seminars in Hematology, 1996; 30 (1) : 24-42
4. Kahane I, Rachmilewitz EA, Shifer A. Cross-linking of red blood cell membrane proteins induced by oxidative stress in β

- thalasemia. *FEBS Lett* 1978; 85 (2) : 267-70.
5. Rachmilewitz EA, Lubin BH, Shohet SB. Lipid membrane peroxidation in β thalassemia major. *Blood* 1976; 47 (7) : 495-505.
 6. Subowo. *Biologi sel*. Bandung: Pn Angkasa, 1985.
 7. Lehninger. *Dasar-dasar biokimia* (terjm). Jakarta: Pn Erlangga, 1982.
 8. Rachmilewitz EA, Shifter A, Kahane I. Vitamin E deviciency in β thalassemia major. Changes in hematological and biochemical parameters after a therapeutic trial with α tocopherol. *Am J of Clin Nutr* 1979; 32 : 1850-8.
 9. Yayasan *Thalassemia Indonesia*. *Thalassemia, apakah itu, mengapa terjadi, bagaimana mencegahnya*. Jakarta : Bumi prakarsa cipta, 1987: 1-14.
 10. Slater TF. Review article : Free-radical mechanisms in tissue injure. *Biochem J* 1984; 222 : 1-15.
 11. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioksidans in nutritions, health and disease*. Oxford: Oxford Univ. press, 1994.
 12. Caprari P, etc. Membrane alteration in G6PD and PK deficient erythrocytes to oxidizing agents. *Biochem Med and Metabolic Biol* 1991; 45: 16-27.
 13. Marks DB, Marks AD, Smith CM. *Oxygen metabolism and oxygen toxicity in : Basic Medical Biochemistry*. A clinical approach. Maryland : Willians-wiliams comp. 1996.
 14. Trotta RJ, Sullivan SG, Strem A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxida. *Biochem J* 1983; 212: 759-72.
 15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free-radicals in biology and medicine*. New York : Clearendo press Oxford, 1985.

