



Optimasi Volume Sampel Serum Darah Dalam Pengukuran Kadar Asam Laktat Secara Enzimatis Menggunakan Nanofotometer

Yefma Junita, Ramadhan Sumarmin, Siska Alicia Farma

Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Padang

Email: junitayefma@gmail.com

ABSTRAK

Latihan fisik merupakan suatu kegiatan yang dilakukan secara berulang-ulang dan berkelanjutan. Latihan fisik yang dilakukan secara berlebihan akan mengakibatkan terjadinya peningkatan metabolisme dalam tubuh. Peningkatan metabolisme yang terjadi di dalam tubuh akan mengakibatkan terbentuknya asam laktat. Metode pengukuran asam laktat, dapat dilakukan dengan cara enzimatis. Pengukuran secara enzimatis memiliki ciri khas tertentu yaitu memerlukan enzim pada reaksinya, dengan adanya enzim dapat mempercepat reaksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui volume sampel serum darah optimum pada optimasi asam laktat secara enzimatis menggunakan nanofotometer. Penelitian dilaksanakan pada Maret – Juni 2020 di laboratorium Bioteknologi dan Fisiologi Hewan Jurusan Biologi, Fakultas matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Kolam Renang Universitas Negeri Padang. Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif, untuk mengamati volume sampel optimum asam laktat secara enzimatis menggunakan nanofotometer. Dengan respondens 2 orang laki-laki dan 2 orang perempuan mahasiswa/i Fakultas Ilmu Keolaragaan (FIK) Universitas Negeri Padang. Hasil penelitian menunjukan bahwa volume sampel serum darah yang optimum dalam pengukuran kadar asam laktat secara enzimatis menggunakan nanofotometer adalah volume sampel 1.5 μ L.

Kata kunci: Optimasi, Optimum, Asam Laktat, Enzimatis, Nanofotometer

PENDAHULUAN

Latihan fisik merupakan suatu kegiatan yang dilakukan secara berulang-ulang dan berkelanjutan. Latihan fisik yang dilakukan secara berlebihan akan mengakibatkan terjadinya peningkatan metabolisme dalam tubuh. Peningkatan metabolisme yang terjadi di dalam tubuh akan mengakibatkan terbentuknya asam laktat. Terbentuknya asam laktat secara berlebihan akan terjadi penumpukan asam laktat di dalam darah maupun di dalam otot, yang akan mengakibatkan kelelahan tubuh. Asam Laktat merupakan produk akhir dari salah satu jalur energi dalam tubuh yang dikenal sebagai glikolisis (Sinaga & Martua Sihombing, 2019). Agrawal et al,(2004) menyatakan kadar laktat dapat diukur dalam plasma, serum atau darah.

Metode pengukuran asam laktat, dapat dilakukan dengan cara enzimatis. Pengukuran secara enzimatis memiliki ciri khas tertentu yaitu memerlukan enzim pada reaksinya, dengan adanya enzim dapat mempercepat reaksi. Enzim juga bekerja secara spesifik, dan pada pengukuran enzimatis hanya asam laktat yang terukur. Pada pengukuran secara enzimatis terlebih dahulu dilakukan optimasi jumlah sampel dengan tujuan untuk mendapatkan data yang valid dan dapat dipertanggung jawabkan. Sampel



standar yang bisa dipakai sekitar 0,5-10 μL per pengujian. Banyak faktor yang harus dipertimbangkan selama optimalisasi uji enzim yaitu pilihan buffer dan komposisinya, jenis enzim dan konsentrasinya, serta jenis substrat dan konsentrasi, kondisi reaksi, dan teknologi pengujian yang sesuai (Onyeogaziri, 2019).

Menurut Sudjarwo (2001) di dalam sampel biologis, kadar analit pada umumnya sangat rendah dan sampel biologis sendiri mengandung banyak komponen atau kompleks. 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. Dan optimasi juga bertujuan untuk menentukan volume sampel optimum dalam pengukuran asam laktat secara enzimatis.

Optimasi asam laktat secara enzimatis ini menggunakan nanofotometer. Nanofotometer ini prinsip kerjanya sama dengan spektrofotometer. Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet (Vallvey, 1997). Salah satu kelemahan spektrofotometer adalah volume akhir reaksi cukup besar jika dibandingkan dengan nanofotometer yang hanya membutuhkan sekitar 2-3 μL volume. Berdasarkan prosedur pengukuran lactate assay kit volume akhir reaksi hanya 100 μL . Oleh karena itu dilakukan variasi volume reaksi dalam penggunaan nanofotometer.

Berdasarkan uraian diatas maka dilakukan penelitian yang akan mengoptimasi volume sampel serum darah dalam pengukuran asam laktat secara enzimatis menggunakan nanofotometer.

METODE PENELITIAN

Sebelum penelitian ini dilaksanakan, dilakukan pengurusan surat izin ke Fakultas Ilmu Keolahragaan Universitas Negeri Padang. Peserta yang mengikuti penelitian adalah mahasiswa yang mengambil matakuliah renang. Pesertanya berjenis kelamin laki-laki dan perempuan berumur sekitas 20-21 tahun. Subjek yang mengikuti penelitian, diberi arahan dan penjelasan mengenai latihan renang yang akan dilakukan. Selanjutnya, peserta dipandu untuk melakukan prosedur yang telah ditentukan. Setelah itu, dilakukan latihan renang sprinter bolak-balik sepanjang 200 m. Kemudian dilakukan pengambilan darah sebanyak 5 mL dan dipindahkan kedalam tabung *vacutainer* dan disimpan sementara di *ice box* dan peserta juga melakukan pemeriksaan kapasitas paru-paru setelah melakukan latihan fisik. Darah yang telah diambil kemudian disentrifuge untuk memisahkan serum darah lalu serum tersebut di pindahkan kedalam *microtube* 1,5 mL.

Persiapan Standar Laktat

Mengencerkan 10 μL standar dengan menambahkan 990 mL *Lactate Assay Buffer* untuk menghasilkan 1000 μL larutan standar. Lalu mengambil masing-masing 0,



2, 4, 6, 8, dan 10 μL dari standar memasukkan ke dalam 96 well plate. kemudian menambahkan *Buffer Assay Laktat* ke setiap sumur untuk menjadikan volume 50 μL .

Persiapan Master Mix

Pembuatan master mix dengan mencampurkan lactate assay buffer, lactate probe, dan campuran enzim laktat. Untuk reaksi penuh memasukkan kedalam mikrotube 46 μL *lactate assay buffer*, 2 μL *lactate probe*, 2 μL campuran enzim laktat untuk setiap sumur. Kedua, untuk setengah reaksi memasukkan kedalam mikrotube 23 μL *lactate assay buffer*, 1 μL *lactate probe*, 1 μL campuran enzim laktat untuk setiap sumur. Ketiga, untuk seperempat reaksi memasukkan kedalam mikrotube 11,5 μL *lactate assay buffer*, 0,5 μL *lactate probe*, 0,5 μL enzim laktat untuk setiap sumur.

Persiapan Sampel

Dalam penelitian ini kami menyelidiki volume sampel yang optimal. Sampel serum (0,5-10 μL / pengujian) dapat diuji secara langsung dengan menambahkan mix master ke 96 pelat sumur berdasarkan instruksi kit manual. Kami menggunakan gradien volume serum menjadi 0,5; 1; 2; 3 μL . Kemudian menambahkan *master mix* ke setiap sumur untuk menjadikan volume 50 μL untuk reaksi penuh, menjadi 25 μL untuk setengah reaksi, dan 12,5 μL untuk $\frac{1}{4}$ reaksi.

Reaksi uji laktat

Pertama, untuk reaksi penuh memasukan 50 μL standar laktat (0, 2, 4, 6, 8, dan 10 nmole / μL) ke dalam plat sumur 96, kemudian memasukan kedalam plat sumur 96 yang lainnya 0.5 μL , 1 μL , 1.5 μL , dan μL sampel serum sampel serum dan menambahkan master mix reaksi untuk mencapai volume 50 μL ke masing-masing sumur.

Untuk setengah reaksi memasukkan 25 μL standar laktat (0, 2, 4, 6, 8, dan 10 nmole / μL) ke dalam 96 well plate, kemudian memasukan kedalam plat sumur 96 yang lainnya lainnya 0.5 μL , 1 μL , 1.5 μL , dan 2 μL sampel serum dan menambahkan master mix reaksi untuk mencapai volume 25 μL ke masing-masing sumur.

Untuk seperempat reaksi memasukan 12,5 μL standar laktat (0, 2, 4, 6, 8, dan 10 nmole / μL) ke dalam 96 well plate, kemudian memasukan kedalam plat sumur 96 yang lainnya lainnya 0.5 μL , 1 μL , 1.5 μL dan 2 μL sampel serum dan menambahkan master mix reaksi untuk mencapai volume 12,5 μL ke masing-masing sumur.

Mencampurkan semuanya dengan menggunakan pengocok horizontal dan menginkubasi reaksi selama 30 menit pada suhu kamar. Dan mengukur absorbansi pada 570 nm (A570). Mengukur absorbansi dengan menggunakan Implen N60 UV-Vis Nanophotometer. Volume sampel digunakan dalam 1-3 μL . Semua sampel dan standar diperoleh dalam duplo.

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif, untuk mengamati volume sampel optimum asam laktat secara enzimatik menggunakan nanofotometer. Dengan



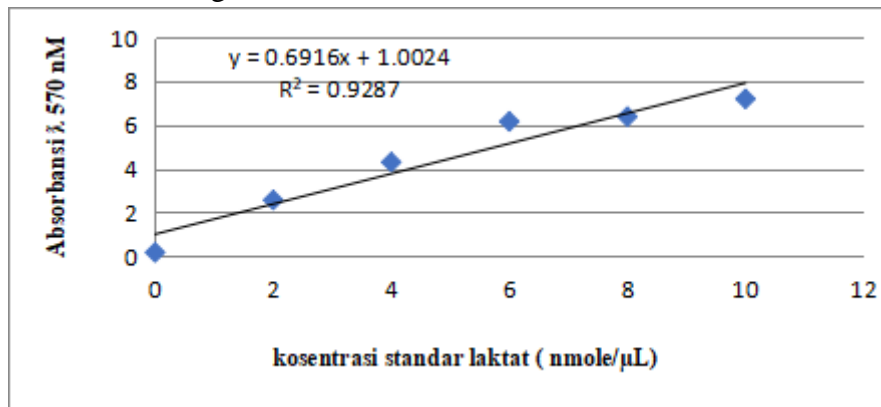
respondens 2 orang laki-laki dan 2 orang perempuan mahasiswa/i Fakultas Ilmu Keolaragaan (FIK) Universitas Negeri Padang.

Analisis Data

Penelitian ini dianalisis secara deskripsif dengan mengamati volume sampel darah dalam pengukuran asam laktat secara enzimatik menggunakan nanofotometer. Proses optimasi sampel asam laktat berupa volume sampel optimum asam laktat. Jumlah sampel optimum dilihat dari kurva standar laktat (0, 2, 4, 6, 8, dan 10 nmole/μL. Nilai yang diperoleh dari standar laktat yang sesuai untuk kurva standar digunakan untuk menentukan jumlah sampel laktat yang ada dalam sampel. Data hasil optimasi dinyatakan dalam bentuk tabel.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dari optimasi volume sampel serum darah dalam pengukuran kadar asam laktat secara enzimatik menggunakan nanofotometer, , maka diperoleh hasil sebagai berikut:



Gambar 1. Kurva standar laktat

Berdasarkan kurva standar diperoleh nilai regresi linier (R^2) adalah 0.9287 dengan persamaan garis $Y = 0.6916x + 1.0024$. Dari persamaan ini kadar laktat dalam darah (S_a) dapat ditentukan. Kemudian kadar laktat dalam sampel dihitung berdasarkan rumus :

$$C = \frac{S_a}{S_v}$$

Keterangan : C = konsentrasi laktat dalam sampel
 S_a = jumlah asam laktat dalam sampel yang diketajui dari kurva standar
 S_v = volume sampel

(Manual lactate assay kit (MAK064))

Volume akhir reaksi terdiri dari tiga variasi yaitu reaksi penuh (50 μL) ,setengah



reaksi (25 μL), dan seperempat reaksi (12.5 μL). Optimasi pengukuran kadar laktat dilakukan dengan membuat variasi volume akhir dan volume sampel yang digunakan. Volume sampel terdiri dari 0.5 μL , 1 μL , 1.5 μL , 2 μL . Kadar laktat dalam darah dapat dilihat dari tabel 2, 3, dan 4 .

Tabel 2. Kadar laktat pada volume reaksi penuh

Volume sampel	kode subjek	A Rata-rata	Kadar laktat ($y=0.6916x+1.0024$)	Konsentrasi laktat (nmole/ μL)
0.5 μL	A1	3.289	3.306	6.612
1 μL		3.969	4.289	4.289
1.5 μL		5.309	6.227	4.151
2 μL		4.983	5.756	2.878
0.5 μL	A2	2.200	1.732	3.463
1 μL		4.119	4.506	4.506
1.5 μL		5.916	7.105	4.736
2 μL		5.974	7.189	3.594
0.5 μL	A3	3.245	3.243	6.485
1 μL		4.341	4.827	4.827
1.5 μL		3.904	4.195	2.797
2 μL		5.463	6.450	3.225
0.5 μL	A4	0.974	-0.041	-0.082
1 μL		4.543	5.119	5.119
1.5 μL		3.529	3.653	2.436
2 μL		5.699	6.791	3.395

Tabel 3. Kadar laktat pada volume setengah reaksi

Volume sampel	kode subjek	A Rata-rata	Kadar laktat ($y=0.6916x+1.0024$)	Konsentrasi laktat (nmole/ μL)
0.5 μL	A1	0.955	-0.069	-0.137
1 μL		5.045	5.845	5.845
1.5 μL		5.459	6.444	4.296
2 μL		4.064	4.427	2.213
0.5 μL	A2	1.130	0.184	0.369
1 μL		5.873	7.043	7.043
1.5 μL		5.808	6.949	4.632
2 μL		5.069	5.880	2.940
0.5 μL	A3	3.713	3.919	7.839
1 μL		3.901	4.191	4.191



1.5 µL		4.478	5.025	3.350
2 µL		6.184	7.492	3.746
0.5 µL	A4	4.691	5.333	10.667
1 µL		4.809	5.504	5.504
1.5 µL		4.120	4.508	3.005
2 µL		4.664	5.294	2.647

Tabel 4. Kadar laktat pada volume seperempat reaksi

Volume sampel	kode subjek	A Rata-rata	Kadar laktat ($y=0.6916x+1.0024$)	Konsentrasi laktat (nmole/µL)
0.5 µL	A1	0.670	-0.481	-0.961
1 µL		3.133	3.081	3.081
1.5 µL		5.470	6.460	4.307
2 µL		4.199	4.622	2.311
0.5 µL	A2	0.624	-0.547	-1.094
1 µL		3.883	4.165	4.165
1.5 µL		5.804	6.943	4.628
2 µL		7.071	8.775	4.387
0.5 µL	A3	3.512	3.629	7.257
1 µL		4.328	4.809	4.809
1.5 µL		4.404	4.918	3.279
2 µL		4.524	5.092	2.546
0.5 µL	A4	6.143	7.433	14.866
1 µL		4.006	4.343	4.343
1.5 µL		4.830	5.534	3.690
2 µL		4.976	5.746	2.873

Berdasarkan (Tabel 2) pengukuran reaksi penuh diperoleh hasil pada volume sampel 0.5 µL, 1 µL dan 2 µL absorbansi yang didapatkan tidak stabil sedangkan pada volume sampel 1.5 µL absorbansi yang didapatkan stabil. Dan pada pengukuran kadar laktat dalam sampel pengukuran reaksi penuh terdapat hasil yang menunjukkan negatif (-) pada volume 0.5 µL dan pada volume sampel 1µL, 1.5 µL dan 2µL terdapat hasil yang rendah. Rendahnya hasil kadar laktat dalam sampel pada pengukuran reaksi penuh diakibatkan oleh rendahnya volume sampel yang dimasukan sedangkan volume akhir reaksinya besar yaitu 50 µL.

Berdasarkan (Tabel 3) pengukuran setengah reaksi diperoleh hasil pada volume sampel 0.5 µL, 1 µL dan 2 µL absorbansi yang didapatkan tidak stabil sedangkan pada volume sampel 1.5 µL absorbansi yang didapatkan stabil. Dan pada pengukuran kadar laktat dalam sampel pada pengukuran setengah reaksi masih terdapat hasil yang negatif



(-) pada volume sampel 0.5 μL dan pada volume sampel 1 μL , 1.5 μL dan 2 μL hasil yang rendah tetapi sudah mengalami peningkatan dari pada pengukuran reaksi penuh. Hal ini diakibatkan oleh pengurangan volume akhir menjadi 25 μL .

Berdasarkan (Tabel 4) pengukuran seperempat reaksi diperoleh hasil pada volume sampel 0.5 μL , 1 μL dan 2 μL absorbansi yang didapatkan tidak stabil sedangkan pada volume sampel 1.5 μL absorbansi yang didapatkan stabil. Dan pada pengukuran kadar asam laktat dalam sampel pada pengukuran seperempat reaksi masih terdapat hasil yang negatif (-) pada volume sampel 0.5 μL dan pada volume sampel 1 μL , 1.5 μL dan 2 μL hasil yang didapat sudah mengalami peningkatan dari pada pengukuran setengah reaksi. Hal ini diakibatkan oleh pengurangan volume akhir menjadi 12,5 μL . Menurut (Flora, 2015) menunjukkan bahwa aktivitas fisik anaerobik mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar laktat di plasma. Toleransi kadar asam laktat pada manusia diperkirakan mencapai di atas 20 mM/l darah dan 25 mM/l kg berat otot basah, dan bahkan bisa mencapai di atas 30 mM/l pada latihan dinamis dengan intensitas tinggi (Purnomo, 2011). Sejalan dengan Nikseresht, et al, (2017) hasil penelitiannya menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam laktat darah setelah tes, dan menurun hingga di bawah garis dasar 24 jam setelah tes.

Berdasarkan tabel (2, 3, 4) dapat diketahui bahwa optimum pada pengukuran kadar asam laktat dalam sampel adalah volume sampel 1,5 μL . Hal tersebut diakibatkan karena disetiap pengukuran reaksi penuh, pengukuran setengah reaksi, dan pengukuran seperempat reaksi hasil yang didapatkan pada volume sampel 1.5 μL tetap stabil/konstan.

PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dijelaskan dapat disimpulkan bahwa volume sampel serum darah yang optimum dalam pengukuran kadar asam laktat secara enzimatik menggunakan nanofotometer adalah volume sampel 1.5 μL .

REFERENSI

- Agrawal S, Sachadev A, Gupta D, et al, 2004, Role of Lactate in Critically Ill Children, *J Crit Care Med*, Indian.
- F.C. Onyeogaziri, C. Papaneophytou, A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach, *SLAS Discov*, 24(5) (2019) 587-596.
- Flora, R. (2015). Pengaruh Latihan Fisik Anaerobik Terhadap Kadar Laktat Plasma dan Kadar Laktat Jaringan Otot Jantung Tikus Wistar. *Biomedical Journal of Indonesia*.
- Mochamad Purnomo. 2011. "Asam Laktat Dan Aktivitas SOD Eritrosit Pada Fase Pemulihan Setelah Latihan Submaksimal". *Jurnal Media Ilmu Keolahragaan Indonesia* Volume 1, Edisi 2. Semarang: UNNES .



- Nikseresht, A., Yabande, I., Rahmanian, K., & Jahromi, A. S. (2017). Blood lactate level in Elite boy swimmers after lactate tolerance exercise test. *Biomedical Research and Therapy*. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v4i05.170>.
- Sinaga, F. A., & Martua Sihombing, N. N. (2019). Perbedaan Pengaruh Pemulihan Aktif (Jogging) Dan Pemulihan Pasif (Duduk) Terhadap Penurunan Kadar Asam Laktat. *Sains Olahraga: Jurnal Ilmiah Ilmu Keolahragaan*. <https://doi.org/10.24114/so.v2i1.12873>
- Sudjarwo. 2001. Optimasi Metode Spektrofourometri Pada Penetapan Kadar Malondialdehid Di Dalam Sperma Manusia. *Majalah Farmasi Indonesia*, 12(3), 152-158.