

PENILAIAN STATUS VITAMIN A SECARA BIOKIMIA

Dewi Permaesih

Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi dan Makanan, Depkes RI

ABSTRACT

VITAMIN A ASSESSMENT BY BIOCHEMICAL METHODS

Vitamin A has an important preventive effects on maternal and child mortality. Vitamin A deficiency (VAD) is one of the most devastating dietary deficiencies. Several methods are available to assess VAD. Traditionally, clinical signs and symptoms of xerophthalmia were used to identify the severity of population with vitamin A deficiency. Biochemical assessment methods available which include serum retinol, serum retinol binding protein, serum retinyl ester, serum carotenoids, dose response test, the deuterated retinol isotope dilution test and breast milk retinol concentrations. The determination of retinol in blood (serum retinol concentrations) is one of the most frequently used methods, have been used extensively to identify populations at risk of vitamin A deficiency. However, this method has several limitations. The major drawback of serum retinol is taking blood samples are required. Beside that, serum retinol is decreased only in severe VAD, when liver stores are nearly exhausted. Because the majority of vitamin A in the body is stored in the liver, then the tests to measure vitamin A stores should be developed in order to know the vitamin A status. Vitamin A concentration in breast milk is a prospective indicator of VAD. Breast milk collection is less invasive and usually easier than blood drawing, do not have to be further processed at the field station, thus shortening sample preparation. For the future indicator of vitamin A, methods that are in development include using isotope dilution.

Keywords: breast milk retinol, serum retinol, vitamin A analysis

PENDAHULUAN

Kurang vitamin A (KVA) adalah salah satu masalah gizi yang mengganggu kondisi kesehatan akibat kurangnya konsumsi makanan, terutama makanan sumber vitamin A. Kondisi ini menyebabkan peningkatan yang bermakna terhadap morbiditas dan mortalitas pada anak-anak serta ibu hamil. Penentuan status vitamin A penting untuk melihat kadar vitamin A di dalam tubuh seseorang¹.

Secara tradisional, pemeriksaan KVA di lapangan dilakukan berdasarkan kemampuan penglihatan yang terjadi setelah mengalami KVA dalam waktu lama, melalui tanda-tanda klinis dan gejala xerofthalmia. Pemeriksaan ini direkomendasikan oleh International Vitamin A Consultative Group (IVACG) pada tahun 1976.² Seiring dengan perkembangan pengetahuan, status vitamin A seseorang dapat diketahui lebih awal

dengan pemeriksaan, histopatologis, biologis dan biokimia.

Secara biologis, fungsi dan histologi, status vitamin A dapat diperiksa melalui tanda-tanda xerofthalmia, buta senja, conjunctival impression cytology (CIC) dan penyesuaian di kamar gelap¹. Secara biokimia dilakukan pemeriksaan pada darah atau serum.

Sebagian besar vitamin A di dalam tubuh disimpan dalam bentuk retinyl ester dalam hati. Karena itu pengukuran cadangan vitamin A di dalam hati merupakan indeks terbaik untuk mengetahui status vitamin A. Namun, pengukuran dengan cara biopsi tidak mungkin dilakukan pada penelitian di lapangan. Total serum vitamin A atau yang lebih baru lagi konsentrasi serum retinol lebih sering digunakan. Namun, serum atau plasma hanya mengandung sekitar 1 persen dari total cadangan vitamin A dan konsentrasinya tidak menggambarkan

cadangan tubuh hingga terjadinya kekurangan yang berat atau kelebihan yang tinggi. Konsekuensinya, yang paling baik untuk menentukan status vitamin A, selain kadar serum retinol, juga menggunakan fungsi fisiologi lainnya³. Setiap metode analisis mempunyai kekuatan dan kelemahan dalam menghasilkan informasi.

Artikel ini bertujuan untuk menginformasikan beberapa analisis yang dapat dilakukan pada sampel serum maupun Air Susu Ibu. Beberapa cara penentuan status vitamin A secara biokimia dengan sampel darah disajikan berikut ini:

Analisis Darah

Analisis vitamin A dapat dilakukan pada sampel makanan, darah dan juga Air Susu Ibu. Ada banyak cara analisis vitamin A yang menggunakan sampel darah. Berikut disampaikan analisis vitamin A dengan sampel darah.

Serum retinol

Kadar serum retinol menggambarkan status vitamin A hanya ketika cadangan vitamin A dalam hati kekurangan dalam tingkat berat ($<0,07 \mu\text{mol/g}$ hati) atau berlebihan sekali ($>1,05 \mu\text{mol/g}$ hati). Bila konsentrasi cadangan vitamin A dalam hati berada dalam batas ini, tidak menggambarkan total cadangan tubuh, menggambarkan konsentrasi status vitamin A perseorangan terutama ketika cadangan vitamin A tubuh terbatas, karena konsentrasi serum retinol terkontrol secara homeostasis dan tidak akan turun hingga cadangan tubuh benar-benar menurun. Konsentrasi serum retinol juga dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi pengeluaran holo-RBP.

Faktor yang berpengaruh pada kadar serum retinol antara lain umur, jenis kelamin dan ras. Diperlukan kriteria khusus umur untuk menginterpretasikan kadar serum retinol. Faktor lain adalah asupan lemak yang rendah dalam makanan, misalnya asupan $< 5-10 \text{ g/hari}$, akan mengganggu absorpsi dari provitamin A karoten dan pada jangka panjang menurunkan konsentrasi plasma retinol. Selain dari asupan lemak

faktor gizi lainnya adalah defisiensi zat gizi lain. Kurang energi protein menurunkan apo-RBP, kurang zinc menurunkan kadar retinol karena perannya dalam sintesa hepatic atau sekresi RBP. Penyakit mungkin berpengaruh pada kadar serum retinol, penyakit ginjal kronis meningkatkan konsentrasi retinol, sedangkan penyakit hati menurunkan kadar serum retinol. Penyakit infeksi termasuk HIV, campak, infeksi parasit berhubungan dengan rendahnya kadar serum retinol.² Namun, serum retinol merupakan indikator yang sering digunakan untuk penentuan tingkat KVA pada populasi karena banyak laboratorium yang mampu menganalisisnya dan ini merupakan indikator biokimia status vitamin A terbaik^{3,4}.

Serum retinol biasanya ditentukan dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau dengan spektrofotometri. Walaupun spektrofotometri lebih sederhana dan lebih murah, akurasi kurang. Karena itu HPLC lebih sering digunakan. Dari beberapa metode yang tersedia untuk analisis total serum vitamin A atau retinol, hanya HPLC yang dapat membedakan retinol dari retinyl ester, sedangkan metode lain mengukur total serum vitamin A^{3,4}.

Serum Retinol Binding Protein (RBP)

RBP adalah protein transpor spesifik vitamin A, dinamakan *holo* RBP ketika berikatan dengan retinol, sedangkan bila tidak ada ikatan dinamakan *apo*-RBP. Bila cadangan hati menurun, yang timbul pada tingkat akhir defisiensi vitamin A, RBP berakumulasi dalam hati menjadi *apo*-RBP dan kadar serum retinol dan RBP menurun³.

Serum RBP terjadi pada 1:1:1 M complex dengan retinol and *transthyretin*. Karena 1:1 complex, konsentrasi serum RBP dapat menggambarkan konsentrasi serum retinol dan karena itu mungkin dapat digunakan untuk indikator status vitamin A. Penentuan RBP lebih mudah dibandingkan dengan penentuan serum retinol. Pertama karena RBP adalah protein, yang dapat dideteksi dengan penentuan imunologi, yang lebih sederhana dan lebih murah dibandingkan dengan analisis serum retinol

HPLC. Penentuan RBP dapat menggunakan prosedur radioimmunoassay (RIA) yang spesifik dan sensitive di mana RBP berikatan dengan *radioactively labeled antibodies*. Alternatif lain, menggunakan tes secara cepat yang baru yaitu Enzyme immunoassay (EIA). Hasil uji menunjukkan RBP EIA berhubungan secara bermakna dengan serum retinol yang dianalisis dengan HPLC. Kedua penanganan serum lebih mudah karena RBP lebih stabil dibandingkan dengan retinol, tidak sensitif terhadap cahaya dan kurang sensitif terhadap temperatur, lebih stabil selama dalam kotak pendingin. Ketiga, analisis RBP memerlukan amat sedikit serum 10-20 μ L darah vena yang dapat diambil dari jari.^{2,3} Penentuan RBP umumnya digunakan pada populasi di mana sumber daya manusia dan tehnik pendukung terbatas, pengumpulan sampel lebih mudah dan prosedur analisis lebih mudah dan murah dibandingkan dengan serum retinol. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengonfirmasi hubungan positif antara serum retinol dan serum RBP. Namun, berbagai variasi faktor mungkin mempengaruhi ikatan RBP pada retinol. Faktor tersebut adalah kurang energi protein, penyakit hati, gagal ginjal kronik. Untuk melihat faktor perancu ini digunakan perhitungan rasio serum RBP dan transhyretin. Transhyretin tidak terpengaruh oleh status vitamin A. Namun, seperti halnya RBP dan serum retinol, transhyretin menurun ketika terjadi infeksi dan adanya luka^{2,3,4}.

Serum retinyl ester

Pada orang yang sehat, kandungan retinyl ester kurang dari 5 persen dari total vitamin A pada serum orang berpuasa. Pada kondisi kapasitas penyimpanan vitamin A berlebih, misalnya setelah mengasupkan vitamin A dalam jumlah besar (Hypervitaminosis) atau pada penyakit hati, vitamin A dalam sirkulasi darah berupa retinyl ester dan kemudian meningkatkan kadar retinyl ester dari darah yang diperiksa. Batas untuk menggambarkan hypervitaminosis adalah bila retinyl ester >10 persen dari total vitamin A. Untuk menentukan kadar retinyl ester diperlukan

darah saat berpuasa karena konsentrasi retinyl ester naik setelah mendapat asupan vitamin A. Pengukuran konsentrasi retinyl ester dalam serum yang paling baik adalah dengan fase normal dari HPLC, saat di mana kadar rendah serum puasa dapat diukur bersamaan dengan kadar serum retinol³.

Serum karotenoid

Komponen utama dari serum karoten adalah β -karoten (β -carotene), likopen (lycopene) dan beberapa karotenoid. Diketahui beberapa faktor non-gizi berpengaruh pada konsentrasi serum karoten, faktor tersebut adalah umur, jenis kelamin, asupan alkohol, status fisiologis, indeks massa tubuh dan musim. Merokok juga mungkin mempengaruhi hubungan antara asupan β -karoten dan kadar serum β -karoten³.

Metode stable isotope dan cadangan total vitamin A

Prosedur *isotop dilution* hanyalah metode yang mengukur secara kuantitatif cadangan vitamin A di dalam hati. Yang dilakukan adalah memberi secara oral *tetradeuterated* vitamin A. Pemberian isotop memungkinkan untuk seimbang dengan cadangan vitamin A di dalam tubuh, kemudian dilakukan pengambilan darah dan rasio dari komponen *deurated* dan *non-deuterated* diukur dengan spektrofotometri³.

Konsentrasi vitamin A dalam hati dipertimbangkan sebagai indikator yang terbaik untuk indikator status vitamin A tubuh, bagaimanapun melakukan biopsi langsung pada hati untuk penentuan status vitamin A adalah metode yang tidak mungkin dilakukan pada orang yang sehat. Metode penentuan secara tidak langsung yang seringkali dilakukan adalah konsentrasi serum retinol dan *relative dose response*. Namun, bagaimanapun tehnik ini tidak mampu menyediakan estimasi kuantitatif cadangan vitamin A. Tehnik larutan isotop untuk pendugaan estimasi kuantitatif cadangan vitamin A telah divalidasi pada hewan percobaan dengan menggunakan *radiolabeled vitamin A* yang disuntikan secara intravenous atau diminumkan. *The*

deuterated-retinol-dilution (DRD) tehnik yang telah diperkenalkan adalah suatu metode secara tidak langsung untuk menduga secara kuantitatif cadangan vitamin A dalam hati manusia. Secara singkat Teknik DRD melakukan pemberian dengan cara diminumkan *stable isotope-labeled vitamin A* seperti $[2H4]retinyl\ acetate$ pada seseorang, dan setelah masa ekuilibrasi dilakukan pengambilan sampel darah untuk menentukan rasio isotop terhadap $[2H4]retinol$ dalam plasma.

Cadangan vitamin A dalam hati dihitung berdasarkan prinsip dari larutan isotop dan asumsi yang pada awal dijelaskan oleh Bausch and Rietz dan kemudian dilanjutkan oleh Furr *et al.*^{5,6}. Lamanya DRD test menurut Furr *et al* memerlukan masa ekuilibrasi pemberian secara oral larutan vitamin A dengan cadangan vitamin A tubuh prosesnya memerlukan waktu 20 hari.^{5,7} Waktu yang lebih pendek, tiga hari juga dianjurkan pada pemeriksaan DRD ini. Tiga hari test DRD tidak memerlukan ekuilibrasi vitamin A isotop dengan cadangan vitamin A. Hasil penelitian pada orang dewasa, rasio dari *deuterated* terhadap *nondeuterated* retinol serum pada hari ke tiga setelah pemberian *retinyl acetate deuterated* berhubungan secara bermakna dengan nilai perhitungan cadangan total vitamin A tubuh pada hari ke duapuluh⁷.

Relative dose response (RDR)

Konsentrasi vitamin A dalam hati merupakan indikator terbaik untuk status vitamin A tubuh. Namun, untuk menentukan vitamin A dengan biopsi langsung pada orang sehat adalah hal yang tidak mungkin dilakukan. Metode RDR dapat digunakan untuk menduga cadangan vitamin A dalam hati karena itu dapat mengidentifikasi seseorang dengan defisiensi vitamin A marginal. Tes ini didasarkan pada observasi bahwa selama terjadi kekurangan vitamin A, cadangan dalam hati menurun, RBP berakumulasi dalam hati sebagai apo-RBP. Setelah pemberian vitamin A *test dose*, sebagian vitamin A mengikat kelebihan apo-RBP dalam hati. Kemudian keluar sebagai holo-RBP (RBP berikatan dengan retinol) ke

dalam aliran darah. Konsekuensinya pada orang yang mengalami KVA menjadi lebih cepat terjadi peningkatan serum retinol setelah pemberian vitamin A *test dose* dibandingkan dengan orang yang mempunyai cadangan vitamin A normal di mana peningkatannya hanya sedikit atau malah tidak ada^{1,8,9}. Relative Dose Response (RDR) test, dikembangkan oleh Underwood *et al.*¹⁰, telah dibuktikan sebagai indikator yang baik untuk menentukan status vitamin A. Setelah diberi vitamin A yang dilarutkan dalam minyak, konsentrasi dari retinol plasma (R) meningkat setelah lima jam pada tingkat yang paling tinggi pada anak yang mempunyai status vitamin A kurang atau marginal dibandingkan dengan mereka yang status vitamin A nya cukup. Prosedur ini telah divalidasi dengan menghitung nilai persentase RDR pada cadangan vitamin A dalam hati yang ditentukan dengan biopsi. Kelemahan utama dari penggunaan prosedur ini dalam penggunaan di lapangan adalah memerlukan pengambilan darah dua kali, dengan interval waktu 5 jam.

MRDR (Modified Relative Dose Response)

Penentuan MRDR didasarkan pada prinsip yang benar-benar sama dengan RDR. Prinsip MRDR: selama terjadi penurunan vitamin A apo-RBP berakumulasi dalam hati. Dengan pemberian *test dose*, 3,4 didehidroretinyl acetate (vitamin A2) akan muncul setelah 4-6 jam dalam serum terikat pada RBP sebagai 3,4 didehidroretinol (DR). Menurut Tanumihardjo 1999¹¹, MRDR test akan menghasilkan perbedaan yang lebih jelas dibandingkan dengan konsentrasi serum retinol saja dan hasil secara statistik lebih kuat dan lebih baik dalam menjelaskan penjelasan status vitamin A pada populasi.

MRDR tes hanya memerlukan satu pengambilan darah Sebagai ganti dari pemberian *retinyl acetate*, digunakan pemberian sejumlah kecil 3,4-didehidroretinyl acetate. Setelah tiga hingga delapan jam setelah pemberian 3,4-didehidroretinyl acetate sebagai *test dose*, rasio dari didehidroretinol (DR) pada Retinol (R) dalam plasma secara proporsional

kebalikannya terhadap cadangan vitamin A dalam hati yang berada pada batas kekurangan dan marginal (kurang dari 0.07 micromol/g hati). Penentuan dengan MRDR telah divalidasi pertama kali pada tikus dan manusia dan yang terbaru telah diaplikasikan pada anak prasekolah di Amerika Serikat dan Jawa Barat Indonesia. MRDR hanya memerlukan satu pengambilan darah namun untuk analisis diperlukan alat High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Menurut Rice (2000)¹², MRDR rasio memberi gambaran status vitamin lebih baik dibandingkan dengan serum retinol. Validasi yang dilakukan oleh Verhoef (2005) menyimpulkan, hasil tes dari RDR dan MRDR menunjukkan indikasi batas marginal atau penurunan cadangan vitamin A dalam hati sama dengan yang ditunjukkan oleh konsentrasi serum retinol¹³.

Perkembangan analisis vitamin A dimasa mendatang

Metode yang sedang dikembangkan antara lain *dried blood spot retinol determination* (penentuan vitamin A dengan spot darah kering), retinol binding protein concentrations dan retinol binding protein to transthyretin ratios (RBP:TTR), retinol α -glucuronide (RAG) hydrolysis test dan deteksi¹³ C-retinol isotope dilution assay menggunakan gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrophotometry (GCCIRMS)^{1,16}.

Analisis Air Susu Ibu

Air Susu Ibu dipilih karena antara lain tidak menyakitkan, pengambilannya lebih mudah dibandingkan dengan pengambilan darah, di lapangan tidak memerlukan proses lebih lanjut, waktu yang diperlukan untuk penanganan sampel di lapangan sangat sedikit dibandingkan dengan penanganan sampel darah.

Konsentrasi retinol Air Susu Ibu

Konsentrasi retinol dalam air susu ibu dapat menjadi indikasi saat status vitamin A ibu suboptimal, ibu menyusui memproduksi ASI dengan kadar retinol yang menurun. Kondisi ini menggambarkan ketidakcukupan

pada asupan makanan saat kehamilan dan ketidakcukupan cadangan vitamin A tubuh. Konsentrasi retinol ASI juga dapat digunakan untuk indikator tidak langsung status vitamin A bayi yang disusui³.

Pada ASI selain kadar retinol juga dapat dilakukan analisis kadar β -karoten, vitamin E. Hasil analisis retinol dalam ASI selain menunjukkan status vitamin A ibu menyusui juga dapat memprediksi status bayi yang dilahirkan.^{12,14} Oleh karena itu bila status vitamin A ibu menyusui di masyarakat marginal, maka peluang terjadinya KVA pada anak-anak di komunitas tersebut menjadi tinggi^{8,9,12,14}.

Penilaian status vitamin A pada perseorangan dan populasi memerlukan metode penentuan yang canggih dan memerlukan sumber daya manusia maupun peralatan. Konsentrasi serum retinol seringkali digunakan, tetapi tidak selalu memberi respons pada suatu intervensi. Pengembangan metode yang kurang menyakitkan namun lebih memberi respon pada status vitamin A ibu menyusui akan membantu dalam penentuan risiko KVA pada kelompok².

Penentuan vitamin A pada air susu bayi betina yang dibandingkan dengan darah dengan metode MRDR menunjukkan bahwa nilai rasio dari DR: R air susu (didehidroretinol: retinol) merupakan alternatif yang potensial untuk penentuan status vitamin A pada ibu menyusui. Saat ini sedang dikembangkan penentuan vitamin A pada ASI dengan metode MRDR¹⁵.

RUJUKAN

1. Tanumihardjo, S.A. *Assessing vitamin A Status: Past, Present and Future. The Journal of Nutrition* [terhubung berkala]. www.jn.nutrition.org. 2004. 29 Oktober 2007.
2. WHO/UNICEF/IVACG. Task Force. *Vitamin A supplement: a guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency*

- and Xerofthalmia. Geneva, WHO. 1997.
3. Gibson, R.S. *Principles of Nutritional Assessment*, Second Edition. New York: Oxford Press. 2005.
 4. Saskia de Pee and Dary O. *Biochemical Indicators of Vitamin A Deficiency: Serum Retinol and Serum Retinol Binding Protein*. J. Nutr. 2002. 132: 2895S–2901S.
 5. Haskell M, J, Garry J Handelman, Janet M Peerson, A Daniel Jones, M Atai Rabbi, MA Awal, etal. *Assessment of vitamin A status by the deuterated-retinoldilution technique and comparison with hepatic vitamin A concentration in Bangladeshi surgical patients*. Am J Clin Nutr. 1997: 66:67-74.
 6. Haskell, M.J., Judy D. Ribaya-Mercado. *Handbook on Vitamin A Tracer Dilution Methods to Assess Status and Evaluate Intervention Programs*. The Harvest Plus. 2005.
 7. Ribaya-Mercado, J.D., Mazariegos, M, Tang, G., Romero-Abal, M.E., Mena, I., Solomons, n. W. & Russel, R.M. *Assessment of total body stores of vitamin A in Guatemalan elderly by the deuterated-retinol-dilution methods*. Am. J. Clin. Nutr. 1999. 69:278-284.
 8. Sherry Tanumihardjo, S. A., Muherdiyantiningsih, D., Permaesih, A. M., Dahro, Muhilal, Karyadi, D., Olson, J. A. *Assessment of the vitamin A status in lactating and nonlactating, nonpregnant Indonesian women by use of the modified-relative-dose-response (MRDR) test*. Am. J. Clin. Nutr. 1994; 60:142-147.
 9. Tanumihardjo, S. A., Permaesih, D., Muherdiyantiningsih, Rustan, E., Rusmil, K., Fatah, A. C., etal. *Vitamin A status of Indonesian children infected with Ascaris lumbricoides after dosing with vitamin A supplements and albendazole*. J. Nutr. 1996; 126: 451–457.
 10. Underwood, B.A. *Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood*. American Journal Clinical Nutrition. 1994; 59 (suppl):517S-24S.
 11. Tanumihardjo, S.A. and Kristina L.Penniston. *Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations*. Journal of Lipid Research, vol.43,350-355
terhubung berkala] www.jlr.org at Univ of Wisconsin-Madison Health Science Library. 2002. 27 Juli 2007.
 12. Rice, A.L. et al. *Evaluation of serum retinol, the modified relative dose response ratio and breast milk vitamin A as indicators of response to postpartum maternal vitamin A supplementation*. AJCN. 2000. vol 71 no 3 March :799-806.
 13. Verhoef, Hans and Clive E West. *Validity of relative-dose-response test and the modified-relative-dose-response test as indicators of vitamin A stores liver*. A. J. Clin. Nutr. 2005; 81: 835-9.
 14. Rice, A.L. *Postpartum vitamin A supplementation: evaluating the evidence for Action. A to Z project* [terhubung berkala] www.a2zproject.org. 2007. 29 Oktober 2007.
 15. Surles R.L, Jialing Li and Sherry A Tanumihardjo. *The Modified Dose Response Values in Serum and Milk are Positively Correlated over Time in Lactating Sows with Adequate Vitamin A Status*. J. Nutr. 2006. 136:939-945.
 16. Craft, N.E, Tom Haitema, Lisa K. Brindle, Sedigheh Yamini, Jean H. Humphrey and Keith P. West, Jr. *Retinol Analysis in Dried Blood*

Spots by HPLC J. Nutr. 2000. 130:
882–885.