

LAPORAN TEKNIS 2015

23.a/AIR 4/OT 02 02/01/2016

**PENGEMBANGAN PERUNUT ISOTOP STABIL
RETINIL ASETAT UNTUK MENGETAHUI STATUS GIZI ANAK**

Ermin Katrin, Susanto, dan Hendig Winarno



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2016**

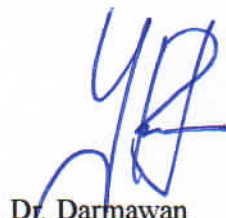
23.a/AIR 4/OT 02 02/01/2016

**PENGEMBANGAN PERUNUT ISOTOP STABIL
RETINIL ASETAT UNTUK MENGETAHUI STATUS GIZI ANAK**

Ermin Katrin, Susanto, dan Hendig Winarno

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Proses Radiasi



Dr. Darmawan
NIP. 1910108 198803 1 002

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Dr. Hendig Winarno, M.Sc
NIP. 19600524 198801 1 001

PENGEMBANGAN PERUNUT ISOTOP STABIL RETINIL ASETAT UNTUK MENGETAHUI STATUS GIZI ANAK

Ermin Katrin, Susanto, dan Hendig Winarno

ABSTRAK

Kadar vitamin A di hati merupakan indikator terbaik untuk menentukan status vitamin A seseorang karena vitamin A terutama disimpan dalam jaringan ini, namun pemeriksaannya sulit dilakukan. Pada prakteknya sulit untuk memperoleh sampel hati dari subyek manusia dan dapat diperoleh hanya dengan biopsi dengan menjalani operasi perut atau otopsi setelah kematian. Kadar retinol serum sebagai indikator status vitamin A mempunyai kelemahan karena kadarnya dipengaruhi beberapa faktor seperti adanya infeksi dan defisiensi zat besi. Teknik lain yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan *stable isotope dilution technique*. Dengan teknik ini dapat diukur perubahan kadar vitamin A di jaringan penyimpan vitamin A (hati). Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan kadar vitamin A dalam serum 40 responden anak balita usia 18-59 bulan di PKM Sindang Barang. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui status vitamin A secara akurat pada anak-anak usia 18-59 bulan, tidak hanya dalam serum, tetapi juga vitamin A yang tersimpan dalam tubuh (hati) anak dengan metode pengenceran isotop sampai selama 21 hari setelah pemberian isotop stabil vitamin A ^{13}C retinil asetat. Selain itu untuk mengetahui pada hari ke berapa yang layak sampling darah untuk menentukan kadar vitamin A yang tepat pada responden anak balita setelah pemberian isotop stabil retinil asetat. Pada penelitian ini dilakukan perhitungan menggunakan model berbasis analisis kompartemen untuk mengembangkan model seluruh tubuh untuk metabolisme vitamin A pada anak balita, sehingga dapat dikembangkan persamaan baru yang memadai untuk kelompok usia ini. Anak-anak dikelompokkan dalam 8 kelompok. Sampling darah anak dilakukan pada waktu tertentu. Hasil analisis vitamin A yang dilakukan dengan alat LC/MS/MS di PT AnglerBioChemLab di Surabaya menunjukkan bahwa kadar retinol dalam serum darah 40 anak berkisar antara 74,9 sampai 234 ng/mL.

Kata kunci : isotop stabil, ^{13}C -retinyl asetat, status gizi anak

PENDAHULUAN

Vitamin A sangat penting untuk pertumbuhan, fungsi reproduksi, fungsi immunitas dan penglihatan. KVA berkaitan dengan peningkatan risiko kematian pada Balita, mengingat fungsi vitamin A pada sistem immunitas dan integritas jaringan epitel. Selain itu, suplementasi vitamin A terbukti dapat menurunkan risiko kematian anak maupun ibu (1). Saat ini Indonesia masih berada di peringkat kelima negara dengan tingkat kekurangan gizi di dunia. Ini berimplikasi pada penurunan kualitas hidup dan kualitas sumber daya manusia Indonesia, karena kesehatan gizi anak-anak sangatlah penting sebagai generasi penerus bangsa Indonesia. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Departemen Kesehatan Republik Indonesia 2013 mencatat tingkat gizi buruk dan kurang pada balita di Indonesia sebesar 19,6 persen (2). Padahal tahun 2007 dan 2010 masing-masing 18,4 persen dan 17,9 persen. Angka ini jauh dari target *Millenium Development Goals* (MDGs) berupa penurunan tingkat gizi buruk dan kurang sebesar 15,5 persen pada tahun 2015, atau setengah dari kondisi di tahun 1990 sebesar 31 persen. Kekurangan vitamin A (KVA) merupakan masalah gizi kedua setelah anemia defisiensi besi yang sering terjadi di negara berkembang. Herman dkk. dalam penelitiannya melaporkan bahwa 14,6% anak balita di Indonesia mengalami kekurangan vitamin A yang ditandai dengan kadar serum retinol $< 20 \mu\text{g/dl}$. Secara nasional, terjadi peningkatan prevalensi berat kurang pada tahun 2011 adalah 17,9% yang terdiri dari 4,9% gizi buruk dan 13 % gizi kurang (2). Herman dkk. dalam penelitiannya melaporkan bahwa 14,6% anak balita di Indonesia mengalami kekurangan vitamin A yang ditandai dengan kadar serum retinol $< 20 \mu\text{g/dL}$ (1).

Penilaian status vitamin A yang akurat sangat diperlukan untuk memberikan informasi pada pengambilan keputusan program intervensi. Menurut Olson bahwa status vitamin A didefinisikan dan disarankan bahwa vitamin A dalam hati dikatakan memadai $> 0,07 \text{ umol/g}$ hati (20 $\mu\text{g/g}$), marjinal antara 0,035-0,07 umol/g hati (10 - 20 $\mu\text{g/g}$ hati), dan defisiensi bila $< 0,035 \text{ umol/g}$ (10 $\mu\text{g/g}$ hati) (3). Kadar vitamin A di hati merupakan indikator terbaik status vitamin A seseorang karena vitamin A terutama disimpan di jaringan ini, namun pemeriksaannya sulit dilakukan. Pada prakteknya sulit untuk memperoleh sampel hati dari subyek manusia dan dapat diperoleh hanya dengan biopsi dengan menjalani operasi perut atau otopsi setelah

kematian. Teknik biokimia yaitu dengan mengukur kadar retinol serum atau dengan *relative dose response* (RDR) test merupakan teknik pengukuran status vitamin A secara tidak langsung. Kadar retinol serum sebagai indikator status vitamin A mempunyai kelemahan karena kadarnya dipengaruhi beberapa faktor seperti adanya infeksi dan defisiensi zat besi. Teknik lain yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan *stable isotope dilution technique*. Dengan teknik ini dapat diukur perubahan kadar vitamin A di jaringan penyimpan vitamin A (hati) (4).

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR) - Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) sedang mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi (iptek) nuklir yang mendukung penelitian di bidang kesehatan dengan mempromosikan penggunaan isotop stabil untuk mengetahui status vitamin A secara dini dan akurat. Balita usia 18-59 bulan dipilih karena pada usia ini merupakan fondasi dasar status gizi anak yang baik bagi pertumbuhan fisik dan kecerdasan anak kelak menjadi remaja sampai dewasa. Apabila pada usia tersebut anak balita dalam keadaan sehat dengan status gizi yang baik (asupan vitamin A dan mikro mineral yang cukup) maka anak balita akan dapat bertahan melawan penyakit yang menyerangnya dan indra penglihatannya juga baik. Berdasarkan hal inilah maka pengukuran kadar retinol dalam darah balita sangat penting untuk dipelajari seberapa besar penyerapan retinol asetat oleh anak sehingga akhirnya tubuh anak dapat mengubahnya menjadi vitamin A.

Pada tahun 2013 penelitian pendahuluan telah dilakukan penentuan kadar retinol dan beta karoten dalam serum darah anak balita. Metode analisis yang digunakan yaitu dengan metode KCKT (kromatografi Cair Kinerja Tinggi). Pada penelitian tersebut ikut serta 120 relawan anak balita usia 12 – 59 bulan dengan status gizi normal dan gizi buruk (menurut BB/U) dari 4 (empat) PKM yaitu Cikande (Serang), Sindang Barang (Bogor), Babakan Sari (Bandung) dan Pasir Nangka (Tangerang). Berdasarkan data 120 anak balita yang telah dianalisis menunjukkan bahwa terdapat 58 anak dengan status gizi baik dan 62 anak dengan status gizi kurang dan buruk berdasarkan berat badan/umur. Analisis kadar retinol dan beta karoten dalam serum ditentukan dengan KCKT untuk mendapatkan *data base*. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat 81 serum anak yang kadar retinolnya ≥ 20 $\mu\text{g/dL}$ dan 39 anak ≤ 20 $\mu\text{g/dL}$ (5). Berdasarkan data hasil analisis tersebut belum dapat diketahui kadar cadangan vitamin A dalam hati anak. Pada tahun 2014 telah

penelitian dilanjutkan menggunakan isotop stabil beta karoten dan retinol untuk mengetahui kadar vitamin A di dalam hati 30 anak balita 15 anak balita (12-59 bulan) sehat dan 15 yang kurang gizi di PKM Pasir Nangka. Hasilnya dilaporkan bahwa pada hari ke-3 setelah pemberian isotop stabil vitamin A hasil analisis kadar vitamin A yang tersimpan dalam hati anak adalah 0,036 – 0,351 $\mu\text{mol/g}$ hati dan pada hari ke-14 0,036 - 0,351 $\mu\text{mol/g}$ hati 0,092 - 0,950 $\mu\text{mol/g}$ hati (6). Cadangan vitamin A pada 30 orang anak di Puskesmas Pasir Nangka masuk kategori baik, karena $> 0,02 \mu\text{mol/g}$ hati. Perhitungan cadangan vitamin A dalam hati anak masih menggunakan persamaan Olson yang digunakan pada orang dewasa. Pada tahun 2015 dilanjutkan penelitian pengembangan teknik perunut isotop stabil ^{13}C retinil asetat untuk mengetahui pola kadar retinol dalam serum darah anak balita (18-59 bulan) sampai hari ke-20 (9 titik waktu) dan untuk memperoleh persamaan baru yang memadai untuk memperkirakan dengan tepat total cadangan vitamin A dalam tubuh (TBS) kelompok anak usia balita di Indonesia. Analisis isotop stabil vitamin A dilakukan dengan alat LC/MS/MS (7).

Metode pengenceran isotop menggunakan persamaan Olson dapat digunakan untuk mengukur vitamin A dalam tubuh dengan model berbasis kompartemen. Namun metode pengenceran isotop ini tidak dapat digunakan pada anak balita karena persamaan Olson memerlukan informasi tentang tingkat katabolik pecahan, yang belum diketahui untuk anak-anak (8). Persamaan Olson memberikan perkiraan yang tepat total vitamin A dalam tubuh (TBS) untuk sekelompok orang dewasa di Inggris. Persamaan untuk memprediksi vitamin A dalam tubuh (TBS) didasarkan pada pengukuran aktivitas spesifik retinol plasma (SA) dari ^{13}C -Vitamin A dalam plasma pada hari ke-20 setelah pemberian oral ^{13}C -vitamin A. Tim peneliti Prof. Michael Green dan Dr. Georg Lietz mampu mengembangkan persamaan baru yang disederhanakan untuk mengukur TBS pada 3 hari setelah pemberian oral ^{13}C -vitamin A dengan kompartemen model prediksi TBS (9). Namun masih perlu dipelajari apakah aktivitas spesifik retinol dalam serum dan tubuh membentuk kesetimbangan dalam tubuh anak balita pada hari ke-3 seperti halnya pada orang dewasa Inggris.

Di Indonesia belum diketahui persamaan mana yang cocok baik untuk dewasa dan anak-anak, karena sampai saat ini hanya dapat diketahui berapa jumlah vitamin A dalam serum menggunakan alat HPLC (3). Penelitian pada tahun 2015 ini

dilakukan pada 30 responden anak balita (18-59 bulan) di PKM Sindang Barang. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui status vitamin A secara akurat pada anak-anak (18-59 bulan) tidak hanya dalam serum, tetapi juga vitamin A yang tersimpan dalam tubuh anak dengan metode pengenceran isotop sampai selama 20 hari setelah pemberian isotop stabil vitamin A ^{13}C retinil asetat. Selain itu untuk mengetahui pada hari ke berapa yang layak sampling darah untuk menentukan kadar vitamin A yang tepat pada responden anak balita setelah pemberian isotop stabil retinil asetat. Pada penelitian ini akan dilakukan perhitungan menggunakan model berbasis analisis kompartemen untuk mengembangkan model seluruh tubuh untuk metabolisme vitamin A pada anak balita, sehingga dapat dikembangkan persamaan baru yang memadai untuk kelompok usia ini. Penelitian ini akan melibatkan PAIR- BATAN bekerjasama dengan Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik (PT₂KEK)-Kemenkes, dan Pemerintah Daerah terkait.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Isotop stabil $^{13}\text{C}_{10}$ - retinyl asetat, isotop stabil $^{13}\text{C}_{10}$ -retinol, D₄-retinyl palmitat, etil asetat, etanol, amonium asetat, methanol, isopropanol, gas nitrogen dan sarapan untuk anak berupa mie goreng, cake dan susu kotak. Darah yang diambil dari anak-anak usia 18-59 bulan di Puskesmas Sindang Barang, Bogor.

Desain

Anak-anak usia 18 – 59 bulan sebanyak 40 anak di Puskesmas Sindang Barang, Bogor dikelompokkan dalam 8 kelompok (A sampai H). Setelah bangun tidur anak-anak tidak diberi makan dan minum selama 1 jam sampai diberikan isotop stabil $^{13}\text{C}_{10}$ - retinyl asetat. Isotop stabil $^{13}\text{C}_{10}$ -retinyl asetat sebanyak 0,4 mg dalam minyak biji matahari diberikan kepada 7 kelompok anak, darah anak diambil 2 kali setelah pemberian isotop stabil. pada waktu tertentu sesuai jadwal. Setelah anak-anak menerima isotop stabil, anak-anak diberi sarapan makanan berlemak dan minum susu. Anak-anak di kelompok A diambil darah I sebelum diberikan isotop stabil, kemudian sampling darah ke-II pada hari ke-3 setelah pemberian isotop stabil. Sampling darah dilakukan sebelum pemberian isotop stabil (hari ke-0), 7, 9, 13 jam, 1, 3, 7, 14, dan 21 hari setelah pemberian isotop stabil kepada anak.

Peralatan

Pada penelitian ini digunakan jarum suntik kecil khusus untuk anak balita, tabung (10 ml) EDTA Vacutainer, tourniquet, kapas steril, handiplast, sentrifuge, cool box, gel ice, pipet tetes, tabung cryo untuk menyimpan serum, sentrifuge, neraca, berpendingin, vortex, dan LC/MS/MS.

Metode

Preparasi serum

Darah disentrifuge langsung di lokasi sampling. Serum disimpan dalam tabung cryo ditutup aluminium foil dan disimpan dalam cool box berisi gel ice selama perjalanan ke laboratorium. Di laboratorium, serum disimpan dalam freezer bersuhu -40°C sampai analisis dilakukan. Ekstraksi isotop stabil dan retinol dilakukan di ruang berlampu kuning.

1. Ke dalam 1,0 ml sampel serum ditambahkan 20 μl (50 pmol) [$^{13}\text{C}_{10}$]-retinyl acetate (sebagai internal standar), lalu diekstraksi dengan campuran 5 ml etanol dan 5 ml etil asetat (etanol : etil asetat = 1/1).
2. Campuran di vortex selama 1 menit.
3. Campuran tersebut disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm suhu 4°C , selama 30 menit.
4. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi kecil, lalu dikeringkan dengan gas nitrogen/argon.
5. Residu dilarutkan dengan 100 μl etil asetat, divortex sehingga residu larut homogen.
6. Sampel ditaruh dalam tabung kecil siap dianalisis dengan LC/MS/MS.

Analisis dengan LC/MS/MS (7)

1. Analisis dengan LC menggunakan pre kolom (4 x 3 mm) kolom C_{18} (3 μm ; 50 mm x 2 mm i.d.) pada suhu 30°C . Fase gerak ammonium asetat 0,1M pH 5 (A) dan 50:50 (w/w) metanol/isopropanol (B). Fase gerak menggunakan sistem gradien terdiri 80% to 99% B selama 1 menit, dipertahankan 99% B selama 3 menit, kemudian kembali menjadi 80% B selama 3 menit. Kecepatan alir 1,0 ml/menit, dan injeksi sampel dengan volume 10 μl .

- LC dihubungkan dengan API4000 triple quadrupole LC/MS/MS (Applied Biosystems) untuk analisis menggunakan APCI (atmospheric pressure chemical ionisation).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pengukuran kadar vitamin A dalam serum anak balita di Puskesmas Sindang Barang, anak-anak berpuasa sejak bangun tidur sampai diberi isotop stabil vitamin A sebanyak 0,4 mg yang telah dilarutkan dalam minyak biji matahari. Anak-anak dibagi menjadi 8 kelompok (A sampai H) dengan 4 sampai 7 anak per kelompok. Setiap anak diambil darahnya 2 kali pada waktu tertentu (Tabel 1). Anak-anak kelompok A adalah anak-anak yang diambil darahnya sebelum diberi isotop stabil vitamin A dan hari ke-3 setelah diberi isotop stabil.

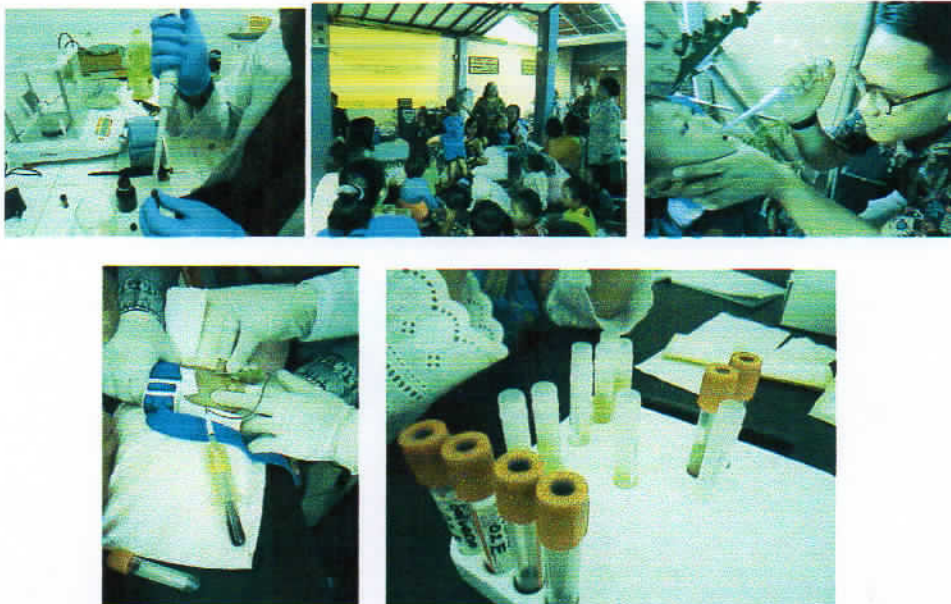
Tabel 1. Jadwal sampling kelompok responden anak balita di Sindang Barang

Group	ID anak	Tgl		Sampling darah ke-I	Sampling darah ke-II	
A	A-1	19 Okt '15	<i>Base line</i>	19 Oct '15 7:00 Sebelum pemberian 13C vit A	Hari ke-3	22 Okt '15
	A-2					
	A-3					
	A-4					
B	B-1	19 Okt '15		14:00 7 hours setelah pemberian 13C- vitamin A	Hari ke-3	22 Okt '15
	B-2					
	B-3					
	B-4					
C	C-1	19 Okt '15		16:00 9 jam setelah pemberian 13C- Vitamin A	Hari ke-3	22 Okt '15
	C-2					
	C-3					
	C-4					
D	D-1	19 Okt '15		20:00 13 jam setelah pemberian 13C vitamin A	Hari ke-3	22 Okt '15
	D-2					
	D-3					
	D-4					
E	E-1			Hari ke-1	Hari ke-3	23 Okt '15
	E-2			20 Okt '15		
	E-3					
	E-4					
	E-5					
F	F-1	20 Okt '15		Hari ke-3	Hari ke-7	27 Okt '15
	F-2			23 Okt '15		
	F-3					

	F-4 F-5 F-6 F-7					
G	G-1 G-2 G-3 G-4 G-5 G-6 G-7	20 Okt '15		Hari ke-3 23 Okt '15	Hari ke-14	3 Nov '15
H	H-1 H-2 H-3 H-4 H-5	20 Okt '15		Hari ke-3 23 Okt '15	Hari ke-21	10 Nov '15

Baseline = sebelum diberi isotop stabil retinyl A

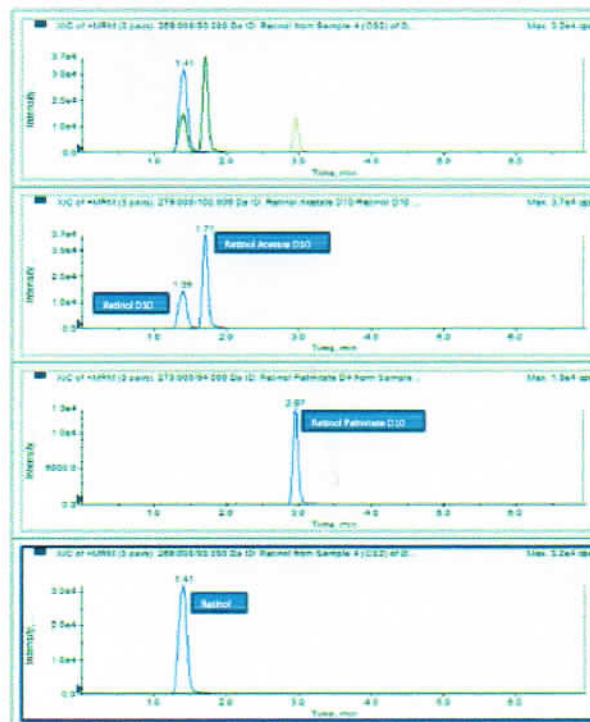
Kelompok B adalah anak-anak diambil darahnya pada 7 jam dan 3 hari setelah pemberian isotop stabil. Kelompok C adalah anak-anak yang diambil darahnya pada 9 jam dan hari ke-3 setelah pemberian isotop stabil. Kelompok D adalah anak-anak yang diambil darahnya 13 jam dan hari ke-3 setelah pemberian isotop stabil.



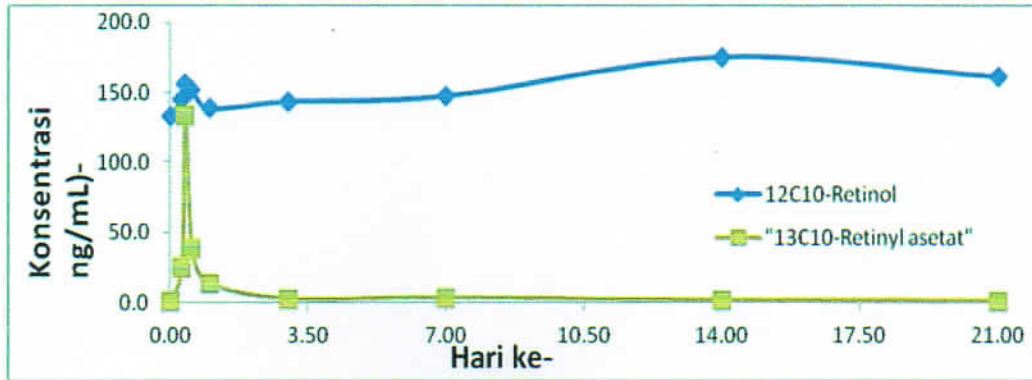
Gambar 1. Preparasi isotop stabil vitamin A, sosialisasi penelitian kepada para orangtua, pemberian isotop stabil vitamin A sampling darah responden anak usia balita, dan preparasi serum di Puskesmas Sindang Barang, Bogor

Kelompok E adalah anak-anak yang diambil darahnya pada hari ke-1 dan ke-3 setelah pemberian isotop stabil. Kelompok F adalah anak-anak yang diambil darahnya pada hari ke-3 dan ke-7 setelah pemberian isotop stabil. Kelompok G adalah anak-anak yang diambil darahnya pada hari ke-3 dan hari ke-14 setelah pemberian isotop stabil. Kelompok H adalah anak-anak yang diambil darahnya pada hari ke-3 dan hari ke-21 setelah pemberian isotop stabil. Pada Gambar 1 ditunjukkan kegiatan preparasi isotop stabil vitamin A, sosialisasi penelitian, sampling darah anak, pemberian isotop stabil vitamin A, preparasi serum.

Kondisi HPLC untuk analisis vitamin A dalam serum telah diperoleh, sehingga setiap puncak kromatogram vitamin A dapat dipisahkan (Gambar 2). Kadar retinol dalam serum darah 40 anak berkisar antara 74,9 sampai 234 ng/mL. Kadar vitamin A dalam serum anak-anak Sindang Barang, Bogor sedang dalam proses perhitungan. Hasil perhitungan kadar retinol dan isotop stabil-retinol ditunjukkan pada Gambar 3. Terlihat peningkatan retinol dalam serum anak terjadi pada waktu 9 jam setelah pemberian isotop stabil $^{13}\text{C}_{10}$ -retinyl asetat kepada anak. Tiga belas jam setelah pemberian isotop, retinol mengalami penurunan, karena dipakai pada proses metabolisme tubuh anak.



Gambar 2. Kromatogram senyawa standar vitamin A dan serum



Gambar 3. Kadar retinol dan isotop stabil retinol dalam serum anak 0, 7, 9, 13 jam, 1, 3, 7, 14 dan 21 hari setelah pemberian isotop stabil kepada anak

KESIMPULAN SEMENTARA

Kadar retinol dalam serum darah 40 anak di Puskesmas Sindang Barang, Bogor berkisar antara 74,9 sampai 234 ng/mL. Terjadi kenaikan retinol dalam serum anak secara signifikan pada 9 jam setelah pemberian isotop stabil $^{13}\text{C}_{10}$ - retinyl asetat. Evaluasi dan pengolahan data sedang dilakukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada pemerintah RI yang telah mendukung dana penelitian ini, dr. Utami Sulistyarningsih (Kepala Puskesmas Sindang Barang) yang telah mengizinkan kami melakukan penelitian di Puskesmas Sindang Barang, dan kepada Fitri Rizki Mulya, SP dan para staf Puskesmas Sindang Barang. Terima kasih juga diucapkan kepada para staf Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik, Balitbangkes Bogor yang telah membantu penelitian ini, sehingga berlangsung dengan baik, kepada pemerintah RI yang telah memberikan dukungan dana penelitian. Terimakasih juga disampaikan kepada Dr. Georg Lietz (Universitas Newcastle, UK) yang telah memberikan saran kepada para penulis dalam melakukan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Herman S. *Studi Masalah Gizi Mikro di Indonesia, Perhatian Khusus pada Kurang Vitamin A (KVA), Anemia dan Seng*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi dan Makanan, 2007.
2. Kemenkes RI, Riset Penelitian Dasar 2013, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta, Kemenkes RI.
3. Olson, J.A., New approaches to methods for the assessment of nutritional status of the individual. *Am J Clin Nutr* 35,1982,1166-1168.
4. Haskell MJ, Ribaya-Mercado JD and Vitamin A Tracer Task Force. *Tracer Dilution Methods to Assess Status and Evaluate Intervention Programs*. Washington DC: Harvest Plus, 2005.
5. Winarno, H., Winarno, E.K., Susanto, Retinol dalam serum darah anak balita di Cikande, Sindang Barang, Babakan Sari dan Pasir Nangka, Laporan Teknis, PAIR-BATAN, Jakarta, 2013.
6. Winarno, H., Winarno, E.K., Susanto, Pengembangan teknik perunut isotop stabil untuk mengetahui statu gizi anak balita di Pasir Nangka, Laporan Teknis, PAIR-BATAN, Jakarta, 2014.
7. Oxley, A, Berry, P, Taylor, GA, Cowell, J, Hall, MJ, Hesketh, J, Lietz, G, and Boddy, AV, An LC/MS/MS method for stable isotope dilution studies of β -carotene bioavailability, bioconversion and vitamin A status in humans, *Journal of Lipid Research*, 2014.
8. Furr, H.C., James A Olson Memorial Lecture - Isotope Dilution Assessment of Vitamin A Status, CARIG Workshop at Experimental Biology 2011, p. 24-31. Tgl. 21 Mei 2015, (http://www.sightandlife.org/fileadmin/data/Magazine/2011/25_2_2011/)
9. Green, Lietz, G., et al., Naskah sedang disusun di Inggris, 2015).
10. World Health Organization: Control of vitamin A deficiency xerophthalmia. Report of a Joint WHO/UNICEF/USAID/Helen Keller International IVAGC Meeting 1982, WHO Technical Report Series, Report No: 672.
11. Vitamin A Tracer Task Force. *Appropriate uses of Vitamin A Tracer (stable isotope) Methodology*. Washington DC: International Lifesciences Institute Report, 2004.
12. Tanumihardjo SA, Vitamin A status assessment in rats with $^{13}\text{C}_4$ -retinyl acetate and gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *J Nutr* 2000; 130: 2844-9.
13. Lieshout, M, West, CE, Muhilal, Permaesih, D, and Sun, Y, Bioefficacy of β -carotene dissolved in oil studied in children in Indonesia, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 73: 949-958.
14. Lieshout, M, West, CE, Bovenkamp, P, Wang, Y, Sun, Y, Breemen, RB, Permaesih, D, Verhoeven, MA, Creemers, AFL, and Lugtenburg, J, Extraction of carotemoids from feces, enabling the bioavailability of β -carotene to be studied in Indonesia children, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5123-5130.
15. Madiyono B, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto SH. Perkiraan Besar Sampel. In: Prof. DR. Dr. Sudigdo Sastroasmoro SPA (K) dan Prof. DR. Dr. Sofyan Ismael, SpA (K), editor. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis, Edisi 3*. Jakarta: Sagung Seto, 2008.