

PRESISI DAN KETELITIAN ANALISIS PENGAKTIFAN NETRON SELENIUM DAN SENG DALAM SERUM DARAH MANUSIA NORMAL DAN PENDERITA KARDIOVASKULAR

*Harjoto Djojosebroto, **Benjamin Widjajakusuma, *Daniel Santoso,
*Dadang Supriatna
*Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional
**Fakultas Kedokteran - Universitas Padjadjaran

ABSTRAK

PRESISI DAN KETELITIAN ANALISIS PENGAKTIFAN NETRON SELENIUM DAN SENG DALAM SERUM DARAH MANUSIA NORMAL DAN PENDERITA KARDIOVASKULAR. Analisis pengaktifan netron selenium dan seng dalam serum darah manusia normal dan penderita kardiovaskular. Unsur runutan yang esensial (essential trace elements) seperti halnya selenium, seng dan krom mempunyai peran yang penting dalam proses metabolisme. Defisiensi atau intoksikasi unsur runutan esensial tersebut dapat menimbulkan gangguan pada kesehatan manusia. Pada percobaan ini ditentukan presisi dan ketelitian analisis pengaktifan netron selenium dan seng dalam serum darah manusia normal dan penderita kardiovaskular. Cuplikan serum darah manusia dikeringkan dengan alat pengering beku dan disiapkan sedemikian sehingga dapat menghindari kemungkinan terjadinya kontaminasi. Sekitar 0,1 g serum darah kering, cuplikan acuan standar A-13 dari IAEA dan standar disinari dalam fluks netron 10^{12} n cm⁻² detik⁻¹ selama 50-60 jam, kemudian didinginkan selama 2 minggu. Kadar selenium dan seng ditentukan berdasarkan nilai intensitas relatif keradioaktifan imbas yang dipancarkan oleh ⁷⁶Se dan ⁶⁵Zn. Pengaruh penentuan intensitas relatif pada presisi dan ketelitian hasil analisis diuji dengan menentukan kadar kedua unsur tersebut dalam cuplikan acuan standar A-13 dari International Atomic Energy Agency. Evaluasi hasil penentuan kadar selenium dan seng dalam cuplikan acuan standar disimpulkan bahwa presisi dan ketelitian tertinggi untuk analisis selenium dicapai dengan menghaluskan spektrum menggunakan 7 titik data. Presisi dan ketelitian analisis seng tidak menjadi lebih tinggi dengan proses penghalusan. Di sini diamati adanya kesalahan yang bersifat sistematis. Rata-rata kandungan selenium dan seng dalam serum darah kasus (72 ng cm⁻³ Se dan 0,45 µg cm⁻³ Zn) lebih rendah daripada dalam serum darah manusia normal (90 ng cm⁻³ Se dan 0,53 µg cm⁻³ Zn).

ABSTRACT

PRECISION AND ACCURACY OF NEUTRON ACTIVATION ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF SELENIUM AND ZINC SERUM LEVELS IN NORMAL MAN AND IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE. Essential trace elements, such as selenium, zinc, and chromium play an important role in metabolism processes. Deficiencies in or intoxication due to these essential trace elements can be detrimental to health. In the present study precision and accuracy were determined for neutron activation analysis of selenium and zinc in normal human serum and in serum of patients with cardiovascular disease. Samples of blood serum were dried under special precaution to avoid contamination. Approximately 0.1 g of the dried serum samples, IAEA reference standard A-13 and in house standard, accurately weighed, were irradiated under a neutron flux of 10^{12} n cm⁻² sec⁻¹ for 50-60 hours and cooled for a period of 2 weeks. The selenium and zinc concentration levels were determined from the relative intensity values of induced radioactivity of ⁷⁶Se and ⁶⁵Zn. The influence of the relative intensity measurements on the precision and the accuracy of the analytical results was studied by determining the concentration of the two elements in reference standard A-13 samples obtained from IAEA. It can be concluded from the results obtained that best precision and accuracy for selenium were found by smoothing the spectrum using 7 data points, which was not the case with zinc. In the latter case a systematic error was found to occur. On the average serum selenium and zinc levels in case studies (72 ng cm⁻³ Se and 0.45 µg cm⁻³ Zn) were found to be lower than those in the control (90 ng cm⁻³ Se and 0.53 µg cm⁻³ Zn).

PENDAHULUAN

Kadar berbagai unsur runutan dalam serum darah, misalnya selenium dan seng umumnya sangat rendah. Walaupun demikian unsur runutan tertentu, yang dikenal sebagai unsur esensial, ternyata mempunyai peran penting dalam proses metabolisme. Defisiensi atau intoksikasi unsur runutan esensial tersebut dapat menimbulkan gangguan pada kesehatan manusia. Hal ini misalnya ditunjukkan oleh fakta bahwa di suatu daerah yang airnya menunjukkan kadar selenium sangat rendah ditemukan gejala penyakit kanker payudara dengan frekuensi kejadian yang secara statistik cukup tinggi [1]. Akan tetapi selenium bersifat sangat toksik walaupun kadarnya relatif rendah. Srikumar mengamati bahwa kandungan tembaga dalam plasma, dan timbal dalam rambut penderita hipertensi lebih tinggi daripada manusia normal [2]. Salonen dkk. mendapatkan bahwa bila kadar selenium dalam serum kurang dari 35 ng cm^{-3} maka risiko kematian pada penderita penyakit kardiovaskular 7 kali lebih tinggi daripada penderita dengan kadar selenium di atas 45 ng cm^{-3} [3]. Uraian singkat ini menunjukkan bahwa kandungan berbagai unsur runutan dalam serum darah, jaringan tubuh dan matriks yang lain ternyata ada kaitannya dengan gejala kesehatan manusia. Kaitan ini akan terungkap dengan jelas bila didukung oleh hasil analisis yang sah. Hal terakhir ini hanya dapat dicapai bila seluruh tahap dilaksanakan secara cermat, agar dicapai hasil analisis dengan tingkat ketelitian yang tinggi.

Ketelitian hasil analisis pada umumnya makin berkurang bila kadar analit makin rendah, lebih-lebih bila makin dekat dengan batas deteksi. Di samping itu mengingat bahwa jumlah cuplikan serum darah yang dapat disiapkan untuk analisis sangat terbatas, maka untuk analisis unsur runutan harus dipilih teknik analisis dengan kepekaan tinggi dan batas deteksi yang sangat rendah. Analisis pengaktifan neutron adalah teknik analisis unsur yang sangat peka. Batas deteksi untuk banyak unsur mencapai orde nanogram, bahkan untuk unsur tertentu ada yang mencapai femtogram. Berbeda dengan teknik analisis kadar mikro yang lain, pada analisis pengaktifan neutron kontaminasi yang relatif tinggi dan masuk ke dalam cuplikan setelah iradiasi neutron berlangsung tidak akan mengganggu ketelitian hasil analisis.

Pada percobaan ini diteliti presisi dan ketelitian analisis pengaktifan neutron tak merusak

untuk seng dan selenium dalam cuplikan darah. Untuk memperbaiki presisi dilakukan penghalusan spektrum. Uji ketelitian dilaksanakan dengan menerapkan tatakerja analisis untuk menentukan kandungan kedua unsur tersebut pada cuplikan acuan standar A-13 dari International Atomic Energy Agency, dan membandingkan nilai hasil analisis dengan nilai sertifikat. Dengan menggunakan metode penghalusan spektrum yang memberikan presisi dan ketelitian tertinggi dilakukan pula analisis pengaktifan neutron runutan seng dan selenium dalam serum darah manusia normal dan penderita penyakit kardiovaskular. Dari percobaan ini diamati bahwa pada penentuan selenium, penghalusan spektrum berdasarkan pendekatan kuadrat terkecil menggunakan 7 titik data dicapai presisi dan ketelitian analisis yang tertinggi. Akan tetapi penghalusan tidak memperbaiki presisi dan ketelitian analisis pada penentuan seng. Di samping itu diamati fakta bahwa kadar selenium dan seng dalam serum darah manusia pasien kardiovaskular umumnya cenderung lebih rendah daripada dalam serum darah manusia normal.

TATAKERJA

Penyiapan cuplikan serum darah untuk analisis pengaktifan neutron dilaksanakan seluruhnya dalam ruang bebas debu. Untuk mencegah kontaminasi unsur logam maka sejauh mungkin dihindari penggunaan peralatan yang terbuat dari logam. Wadah dan peralatan yang akan digunakan harus disiapkan dengan cermat dan diperlakukan sedemikian agar kontaminasi tidak masuk ke dalam cuplikan sebelum iradiasi neutron berakhir. Cuplikan darah, dari setiap manusia normal dan penderita penyakit kardiovaskular, diambil dengan kateter (Intranule®) [4] dan dimasukkan ke dalam 2 tabung polietilen bersih. Masing-masing tabung diisi darah sekitar 10 cm^3 . Tabung yang berisi fraksi 10 cm^3 darah yang pertama dan kedua masing-masing ditandai sebagai Tabung A dan B. Semua darah dalam Tabung A tidak dipakai untuk analisis unsur karena tingkat kontaminasi dari jarum kateter masih tinggi. Setelah serum darah dalam Tabung B dipisahkan dari fraksi yang lain dengan sentrifuga pada kecepatan 3000 putaran/menit selama 20 menit dan dibekukan dengan nitrogen cair, kemudian dikeringkan dengan perangkat pengering beku. Penentuan kandungan unsur runutan dalam serum darah kering dilaksanakan dengan teknik analisis pengaktifan neutron tak merusak.

Sekitar 0,1 gram cuplikan dimasukkan ke dalam ampul kuarsa biasa, akan tetapi selanjutnya digunakan ampul kuarsa dengan tingkat kemurnian tinggi (Suprasil® - Heraeus Quarzschmelze). Sebelum digunakan tabung kuarsa ini dibersihkan dengan campuran asam nitrat dan sulfat pekat (Suprapur® buatan E. Merck) dengan perbandingan volume 1:1 [5], kemudian dibilas dengan air dengan daya hantar sekitar 1 μ mho. Air tersebut telah dimurnikan dengan osmosis balik, penukaran ion dan dialirkan lewat karbon aktif. Tabung yang berisi cuplikan ini ditutup dengan peleburan menggunakan pembakar terbuat dari kuarsa tingkat kemurnian tinggi. Sebagai gas pembakar digunakan campuran gas hidrogen dan oksigen kemurnian tinggi yang telah dialirkan melalui pencuci gas berisi air dengan daya hantar sekitar 1 μ mho. Cuplikan dalam tabung kuarsa ini disinari bersama dengan standar dan cuplikan acuan baku A-13, yaitu darah hewan kering buatan International Atomic Energy Agency, dalam fluks neutron sekitar 10^{12} n cm⁻² detik⁻¹ selama 50-60 jam. Setelah didinginkan selama dua minggu cuplikan yang telah diiradiasi dipindahkan ke dalam tabung plastik bersih. Keradioaktifan imbas pada cuplikan dicacah dengan spektrometer- γ multi saluran yang dilengkapi detektor Germanium murni. Umumnya cuplikan ini dicacah selama 2000 detik. Daya pisah sistem spektrometer- γ ini ialah sekitar 2 keV pada puncak 1332,4 keV yang dipancarkan oleh ⁶⁰Co dan perbandingan puncak terhadap Compton pada energi sinar- γ tersebut adalah sekitar 35. Kadar selenium dan seng dalam cuplikan dihitung berdasarkan nilai keaktifan relatif, masing-masing pada energi 264 dan 1115 keV yang dipancarkan oleh radionuklida ⁷⁵Se, ⁶⁵Zn. Keaktifan relatif dihitung dengan cara Coval. Pada cuplikan yang dicacah selama 2000 detik dilakukan penghalusan spektrum. Perhitungan penghalusan spektrum ini dilaksanakan dengan menentukan rata-rata dari 3 saluran yang berdekatan (satu saluran sebelum dan satu sesudah saluran yang dimaksud) menggunakan perangkat lunak PCA II dari Nucleus [6]. Hasil analisis untuk cuplikan acuan dibandingkan dengan hasil penghalusan menggunakan metode kuadrat terkecil [7]:

$$Y_m(i) = \frac{1}{K_m} \sum_{k=-m}^{k=+m} c_{k,m} y(i+k) \quad (1)$$

$Y_m(i)$ ialah jumlah cacah dalam saluran nomor i yang dihaluskan menggunakan $(2m + 1)$ titik data, $y(i + k)$ jumlah cacah hasil pengukuran yang terkumpul pada saluran nomor $(i + k)$ K_m dan $c_{k,m}$ tetapan yang nilainya bergantung pada m .

Dari hasil analisis selanjutnya diprakirakan risiko relatif untuk penyakit kardiovaskular akibat defisiensi selenium. Prakiraan risiko ini dihitung dengan *odds ratio* [8].

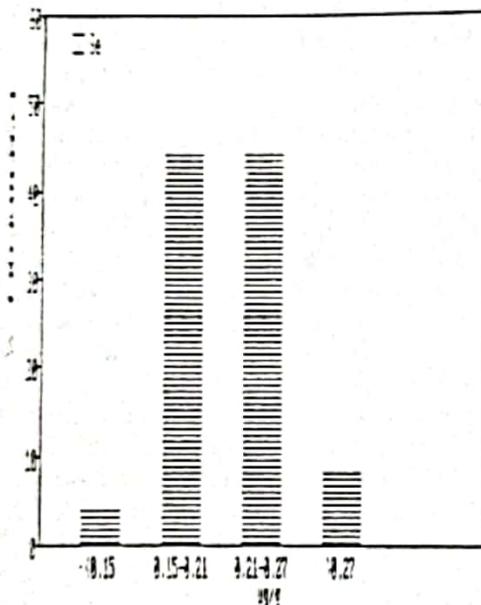
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penentuan selenium dan seng dalam cuplikan acuan standar A-13 tertera pada Tabel 1. Nilai rata-rata dan jangkauan nilai kandungan kedua unsur dalam cuplikan darah hewan yang dicantumkan pada Tabel 1 adalah hasil dari 25 ulangan. Dari Tabel ini terlihat bahwa, untuk penentuan selenium, penghalusan dengan menggunakan 7 titik data ternyata menghasilkan presisi yang tertinggi. Demikian pula nilai hasil analisis selenium paling dekat dengan nilai pada sertifikat. Nilai yang tertera dalam sertifikat menjangkau daerah konsentrasi yang cukup lebar. Rupanya konsentrasi tersebut sudah mendekati batas deteksi berbagai metode penentuan selenium. Itulah sebabnya, walaupun kesalahan statistik nilai hasil analisis yang diperoleh pada percobaan ini jauh di atas 10%, ketelitian analisis pada tingkat konsentrasi serendah ini dianggap cukup. Pada Gambar 1 terlihat bahwa dari penentuan ini kadar selenium dalam cuplikan acuan standar A-13 mungkin sekali terletak di daerah antara 0,23 - 0,28 μ g g⁻¹, yang berada di sekitar nilai yang paling direkomendasikan dalam sertifikat, yaitu 0,24 μ g g⁻¹.

Berbeda dengan analisis selenium, penghalusan spektrum pada penentuan seng tidak memperbaiki presisi hasil analisis. Hal ini disebabkan keaktifan ⁶⁵Zn hasil iradiasi neutron tidak terlalu rendah dan energi sinar- γ yang dipancarkan oleh radionuklida seng relatif tinggi. Latar belakang di daerah energi tinggi adalah rendah. Kedua faktor tersebut mengakibatkan statistik pencacahan pada pengukuran keaktifan radioseng tidak menjadi lebih baik dengan menghaluskan spektrum. Sebaliknya hasil analisis seng ini menunjukkan adanya kesalahan yang bersifat sistematis. Secara umum nilai hasil analisis secara sistematis sekitar 20 - 30% nilai sertifikat. Ada dua faktor yang menyebabkan kesalahan sistematis ini. Faktor pertama adalah kesalahan dalam pembuatan standar. Selama ini seluruh standar dibuat dengan

Tabel 1. Presisi hasil penghalusan spektrum pada penentuan selenium dan seng dalam cuplikan acuan standar A-13

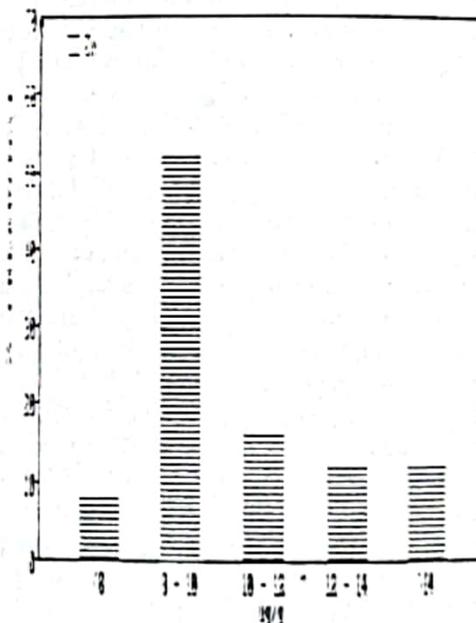
Kandungan Se dan Zn menurut perhitungan	Rata-rata $\mu\text{g/g}$		Jangkauan $\mu\text{g/g}$	
	Se	Zn	Se	Zn
Penghalusan alat	0,23	10	0,02 - 0,60	7 - 15
Penghalusan 9 saluran	0,23	10	0,11 - 0,38	7 - 16
Penghalusan 7 saluran	0,22	10	0,13 - 0,28	7 - 16
Sertifikat	0,24	13	0,16 - 0,31	12 - 14



Gambar 1. Distribusi selenium dalam cuplikan acuan standar A-13 dari IAEA (Freeze dried animal blood)

mengencerkan larutan Titrisol[®] buatan E. Merck, yaitu senyawa seng yang biasa digunakan sebagai standar pada analisis spektrometri serapan atom. Ulangan pada pembuatan standar didasarkan atas senyawa asal yang dimaksudkan sebagai standar dalam analisis spektrometri serapan atom tersebut. Faktor kedua adalah berasal dari akibat gangguan skandium yang terdapat sebagai pengotor skandium pada ampul kuarsa, di samping yang memang terkandung dalam serum. Akan tetapi jumlah yang terkandung dalam ampul kuarsa jauh lebih tinggi daripada yang berada dalam cuplikan. Pada awalnya, seluruh iradiasi dilaksanakan menggunakan ampul kuarsa biasa. Penggunaan ampul Suprasil[®] dimaksudkan untuk mengatasi gangguan ini. Dengan mengingat hal ini maka perbandingan kadar seng dalam

serum darah manusia dan kasus hanyalah menunjukkan kecenderungan relatif, sedang kadar yang sesungguhnya dari percobaan ini adalah sekitar 20-30% lebih rendah. Hal terakhir ini lebih jelas dilukiskan pada Gambar 2.



Gambar 2. Distribusi seng dalam cuplikan acuan standar A-13 dari IAEA (Freeze dried animal blood)

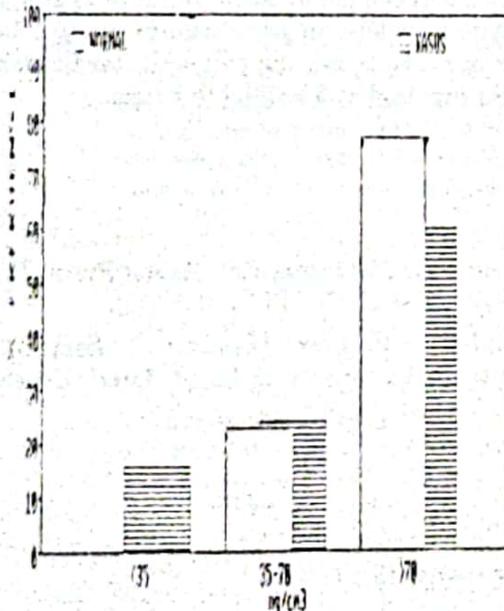
Kandungan selenium dan seng dalam serum darah penderita kardiovaskular (kasus) dan manusia normal dicantumkan pada Tabel 2. Perlu dikemukakan bahwa, untuk menyesuaikan dengan kebiasaan yang digunakan dalam evaluasi kadar unsur runtuhan dalam serum darah manusia, pada Tabel 2 kadar selenium dan seng masing-masing dinyatakan dalam satuan g cm^{-3} .

Pada Tabel ini terlihat bahwa rata-rata kandungan selenium dan seng dalam serum darah kasus (25 cuplikan) lebih rendah

Tabel 2. Kandungan selenium dan seng dalam serum darah manusia normal dan kasus

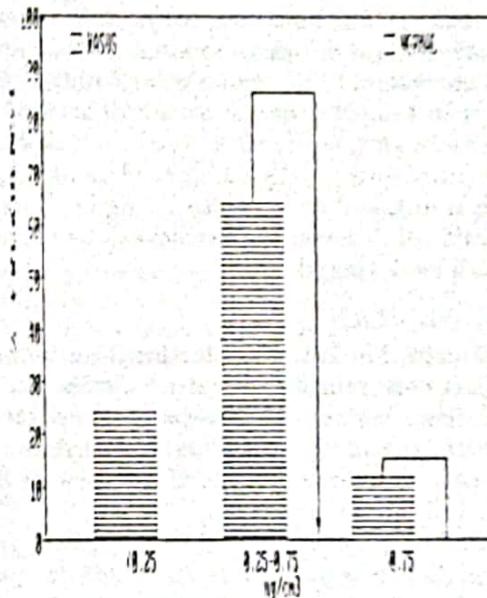
Cuplikan	Selenium ng cm^{-3}		Seng $\mu\text{g cm}^{-3}$	
	Rata-rata	Jangkauan	Rata-rata	Jangkauan
Normal	90	40 - 200	0,53	0,25 - 1,02
Kasus	72	20 - 190	0,45	0,13 - 0,84

daripada manusia normal (39 cuplikan). Bila kadar kedua unsur tersebut dikaitkan dengan jenis kelamin dapat diungkapkan hal-hal berikut. Untuk manusia normal maka rata-rata kadar selenium untuk wanita adalah 80 ng cm^{-3} , sedang untuk pria adalah 100 ng cm^{-3} . Kadar rata-rata selenium untuk wanita normal ini berbeda nyata dengan kasus yang besarnya 50 ng cm^{-3} , sedang untuk pria tidak berbeda nyata (kasus pada pria 80 ng cm^{-3}). Kaitan antara kadar selenium dan seng dengan frekuensi populasi cuplikan masing-masing ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4. Dari Gambar 3 diamati fakta berikut. Dari 26 kasus, 16% (4 kasus) menunjukkan kadar selenium di bawah 35 ng cm^{-3} .



Gambar 3. Distribusi selenium dalam cuplikan serum darah manusia normal dan kardiovaskular

Hal ini tidak diamati pada normal, yang menunjukkan frekuensi tertinggi pada daerah kadar selenium antara $75 - 140 \text{ ng cm}^{-3}$. Pada kasus frekuensi tertinggi diamati pada daerah $35 - 75 \text{ ng cm}^{-3}$. Walaupun diamati pula adanya



Gambar 4. Distribusi seng dalam cuplikan serum darah manusia normal dan kardiovaskular

serum darah manusia normal yang mengandung selenium di daerah ini, frekuensi relatif fenomena ini lebih rendah daripada kasus. Di samping itu dapat pula dikemukakan di sini bahwa 2 kematian pada kasus semuanya adalah wanita, satu diantaranya yang memiliki serum darah dengan kadar selenium di bawah 35 ng cm^{-3} dan yang lain 60 ng cm^{-3} . Kecenderungan bahwa kasus menunjukkan kadar seng yang rendah terlihat pada Gambar 4. Pada Gambar 3 dan 4 terlihat adanya kecenderungan distribusi frekuensi yang sistematis pada kasus dan normal. Di daerah konsentrasi relatif rendah yang menonjol adalah kasus sedang daerah konsentrasi relatif tinggi yang menonjol adalah normal. Pada kedua gambar tersebut dapat diamati pula bahwa di daerah rendah (di bawah 40 ng cm^{-3} untuk Se dan di bawah $20 \mu\text{g cm}^{-3}$ untuk Zn) seluruh populasinya adalah kasus. Fenomena ini menunjukkan bahwa risiko untuk menderita penyakit

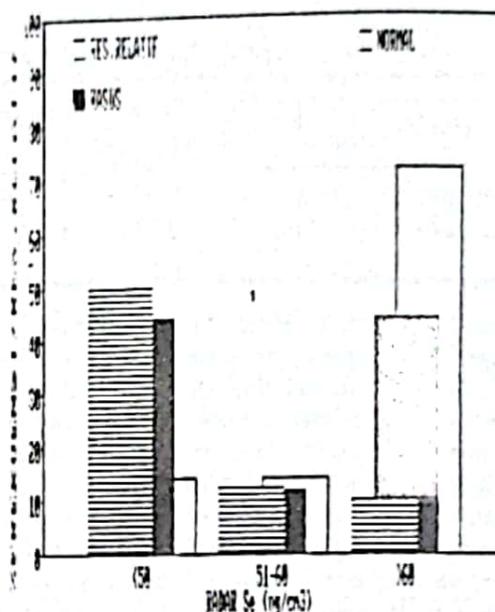
kardiovaskular bila kandungan kedua unsur tersebut sangat rendah relatif adalah tinggi. Sebagai telah dikemukakan pada uraian terdahulu rata-rata kadar seng untuk kasus dan normal tidak berbeda nyata, baik secara umum atau dengan memperhatikan jenis kelamin. Oleh sebab itu risiko relatif akibat defisiensi seng tidak banyak berbeda. Lain halnya dengan defisiensi selenium, terutama bagi wanita. Pada Gambar 5 tercantum hubungan antara risiko relatif terserang penyakit kardiovaskular dan kandungan selenium dalam serum darah wanita. Bila risiko relatif untuk kandungan selenium dalam serum di atas 60 ng cm⁻³ adalah 1, maka risiko relatif untuk kadar selenium antara 50 - 60 ng cm⁻³ adalah 1,25; dan untuk kadar di bawah 50 ng cm⁻³ risiko relatif untuk terserang kardiovaskular adalah 5 kali lebih tinggi!

KESIMPULAN

1. Presisi dan ketelitian tertinggi untuk analisis selenium dalam serum darah dicapai dengan melakukan penghalusan spektrum menggunakan 7 titik data. Penghalusan spektrum tidak mempertinggi presisi dan ketelitian analisis seng.
2. Kadar selenium dalam serum darah penderita kardiovaskular lebih rendah daripada dalam serum darah manusia normal.
3. Kadar seng pada serum darah kasus cenderung lebih rendah daripada normal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Schrauzer, G.N., Trace Metals in Health and Disease, N. Kharasch, Ed., Raven Press, N.Y., 1979, 255.
2. Srikumar, T.S., Assessment of trace element status in different population, Dissertation, Department of Applied Nutrition and Food Chemistry, University of Lund, Lund, Sweden, (1993).
3. Salonen, J.T., et al., The Lancet, July 24, (1982), 175.
4. Versieck, J. et al., Clinical Chemistry, 1988, (1659), 34,.
5. Versieck, J. et al., Clinical Chemistry, 13, (1977), 1301.
6. Nucleus Personal Computer Analyzer II, Operating Instruction (1989).
7. Quittner, P. Gamma-Ray Spectroscopy, with Particular Reference to Detector and Computer Evaluation Techniques, Adam Hilger, (1972).
8. Schlesselman, J.J., and Stolley, P.D., Case-Control Studies, Design, Conduct, Analysis, Oxford University Press, (1982), 45-49.



Gambar 5. Hubungan risiko relatif terkena penyakit kardiovaskular dengan distribusi frekuensi Se dalam serum darah wanita

4. Berdasarkan populasi cuplikan yang ada, defisiensi selenium pada wanita mengakibatkan risiko terserang penyakit kardiovaskular meningkat 5 kali lebih tinggi.