

**PERSIAPAN UNTUK MEMPELAJARI METABOLISME NUTRIEN ANORGANIK
DALAM TUBUH MANUSIA :
APLIKASI ICP-MS PADA PENENTUAN PERBANDINGAN ISOTOP STABIL Fe DAN Zn**

Rukihati, Sumardjo

Pusat Penelitian Dan Pengembangan Ilmu Pengetahuan Dan Teknologi Bahan-BATAN

ABSTRAK

PERSIAPAN UNTUK MEMPELAJARI METABOLISME NUTRIEN ANORGANIK DALAM TUBUH MANUSIA : APLIKASI ICP-MS PADA PENENTUAN PERBANDINGAN ISOTOP STABIL Fe DAN Zn. Disajikan metoda untuk menentukan perbandingan isotop stabil Fe dan Zn, yaitu : $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ menggunakan *ICP-MS (inductively coupled plasma – mass spectrometry)*. Spektrometer massa dioperasikan pada mode resolusi rendah untuk memperoleh kepekaan maksimal. Kondisi operasi sistem *ICP-MS* : daya plasma 0,85 kW, daya terpantul < 5 W, kecepatan argon pendingin 12 L/menit, kecepatan argon pendukung 0,8 L/menit, kecepatan argon pengabut 0,5 L/menit, waktu pencacahan per isotop 60 mdetik, waktu pengukuran 5 detik pengukuran 3 kali ulangan. Kedapatulangan dan ketepatan metoda ini dievaluasi dengan menentukan perbandingan isotop Fe dan Zn dari bahan standar isotop stabil yang diproduksi *ORNL (Oak Ridge National Laboratory, USA)*. Standar deviasi relatif (RSD) untuk semua perbandingan isotop adalah < 2 %. Hasil perbandingan isotop stabil Fe dan Zn, yaitu $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ yang ditentukan dengan *ICP-MS* menunjukkan hasil yang sesuai dengan *TIMS (thermal ionization mass spectrometry)*. Metoda ini dipersiapkan untuk mempelajari absorpsi dan/atau metabolisme nutrisi anorganik di dalam tubuh manusia.

ABSTRACT

A PRESTUDY FOR STUDYING INORGANIC NUTRIENT METABOLISM IN HUMANS : THE APPLICATION OF ICP-MS FOR DETERMINATION OF STABLE ISOTOPE RATIO OF Fe AND Zn. A method is described for the determination of isotope ratio of Fe and Zn by means of inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS). The mass spectrometer was operated in low resolution mode to provide maximal sensitivity. Typical conditions for operations were : plasma power 0.85 kW, reflected power < 5 W, coolant argon-flow rate 12 L/min, auxiliary flow rate 0.8L/min, nebulizer flow rate 0.5 L/min, dwell time 60 msec, measuring time 5 sec, 3 repeats per integration. The repeatability and accuracy of the method was evaluated by analyzing standard stable isotope of Fe and Zn produced by *ORNL (Oak Ridge National Laboratory, USA)*. The relative standard deviation (RSD) for all of the isotopic ratios was < 2 %. The results of the stable isotope ratio of $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ measured by *ICP-MS* showed a good level of agreement with *TIMS (thermal ionization mass spectrometry)*. This method was prepared for studying the absorption and/or metabolism of inorganic nutrients in humans.

PENDAHULUAN

Penelitian modern di bidang nutrisi, biokimia dan fisiologi adalah berdasarkan penggunaan perunut isotop (*isotope tracer*) untuk memperoleh informasi kuantitatif mengenai absorpsi dan/atau metabolisme unsur-unsur nutrisi seperti Fe (besi) dan Zn (seng) di dalam tubuh manusia.^[1-5]

Fe dan Zn adalah unsur-unsur yang sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan dan untuk menjaga fungsi tubuh manusia. Telah diketahui defisiensi (kekurangan) unsur nutrisi Fe dapat menyebabkan anemia, sedangkan defisiensi Zn antara lain dapat memperlambat pertumbuhan dan mengurangi ketebalan (*impaired immunity*) tubuh.^[6]

Karena kandungan unsur-unsur nutrisi di dalam tubuh manusia adalah sangat kecil, sebagai contoh kandungan Fe dan Zn di dalam serum darah manusia dewasa adalah < 2 µg/mL, kandungan total Fe berkisar antara 0,1 – 4 g, sedangkan Zn berada pada kisaran 1,5 – 2,5 g^[2,7], maka untuk penentuan unsur-unsur nutrisi yang keluar dari tubuh manusia diperlukan metoda analisis yang mempunyai kepekaan (*sensitivity*) dan ketelitian (*precision*) yang tinggi.

Setelah diketahui keberadaan isotop stabil di alam,⁽⁸⁾ dan penentuan perbandingan isotop dengan spektrometer massa terus dikembangkan serta telah diperoleh teknologi pengkayaan isotop stabil oleh negara maju (seperti Amerika), banyak

penelitian di bidang nutrisi yang memanfaatkan teknik perbandingan isotop stabil untuk menentukan unsur-unsur nutrisi yang diabsorpsi atau yang dikeluarkan oleh tubuh manusia.⁽⁹⁻¹³⁾

Sebagai persiapan untuk melaksanakan penelitian di bidang nutrisi, berikut ini disajikan teknik penentuan perbandingan isotop stabil Fe dan Zn dengan menggunakan *ICP-MS*. Hasil penentuan dengan *ICP-MS* dibandingkan dengan hasil *TIMS*.

ICP-MS dan *TIMS* adalah dua metoda berdasarkan fungsi spektrometer massa untuk menentukan unsur dan isotop. Perbedaan yang nyata dari kedua metoda ini yaitu pada proses ionisasi. *ICP-MS* menggunakan nyala plasma (biasanya plasma argon) yang dapat menghasilkan energi panas 4000 – 8000 K sebagai media ionisasi, sedangkan *TIMS* menggunakan energi termal yang dihasilkan dari filamen yang diberi tegangan listrik sebagai media ionisasi unsur. *TIMS* digunakan lebih

Gas Argon produksi lokal berkualitas UHP (*ultra high pure*)

Isotop stabil Fe dan Zn dalam bentuk logam dengan masing-masing pengkayaan : 85,11 % ⁵⁴Fe dan 85,03 % ⁶⁷Zn produksi *ORNL*. (*Oak Ridge National Laboratory*), USA

Larutan isotop stabil Fe dan Zn (diperkaya) dalam HNO₃ 1 %, konsentrasi Fe dan Zn masing-masing 2 µg/mL

Alat

Seperangkat *ICP-MS Sciex Elan Model 250*, Ontario, Canada, dilengkapi nebulizer Meinhard dari quartz, pompa peristaltik Gilson II untuk memasukkan larutan cuplikan ke dalam nyala plasma dan dirangkai dengan komputer yang menggunakan IBM PS/2 dengan sistem operasi Xenix. Pemurnian air menggunakan demineralizer *Barnstead NANO pure II*, USA.

Table Data kelimpahan isotop stabil Fe dan Zn di alam dan diperkaya

Isotop stabil	Kelimpahan isotop (%)	
	Di alam*	Diperkaya
⁵⁴ Fe	5,82	85,11
⁵⁶ Fe	91,66	3,01
⁵⁷ Fe	2,19	8,06
⁵⁸ Fe	0,33	3,82
⁶⁴ Zn	48,89	5,23
⁶⁶ Zn	27,81	3,78
⁶⁷ Zn	4,11	85,03
⁷⁰ Zn		4,65

* Berdasarkan *Relative Abundance of the Natural Isotope*, Perkin Elmer-Sciex.

** Produksi *ORNL* (*Oak Ridge National Laboratory*), USA.

dahulu dari pada *ICP-MS*, kepekaan dan kedapatulangan *TIMS* umumnya lebih tinggi dari pada *ICP-MS* tetapi waktu analisis lebih lama (*time consuming*).

TATA KERJA.

Bahan

HNO₃ *supra pure*

Air demineralisasi-distilasi

Larutan HNO₃ 1%

Larutan standar Fe dan Zn (*spex pure*), masing-masing konsentrasi 2 µg/mL dalam HNO₃ 1 %

Preparasi larutan cuplikan untuk *ICP-MS*

Semua pereaksi yang digunakan dalam kegiatan ini berkualitas *supra pure*. Untuk pelarutan dan pengenceran digunakan air destilasi-demineralisasi. Larutan standar Fe dan Zn dibuat dengan melarutkan sejumlah unsur standar Fe dan Zn dalam asam nitrat. Konsentrasi akhir unsur Fe dan Zn masing-masing 2 µg/mL dalam HNO₃ 1 %. Konsentrasi tersebut dipilih berdasarkan kuantitas unsur-unsur tersebut yang diserap dan diperlukan agar tubuh berfungsi normal.⁽⁷⁾ Jenis larutan yang dianalisis adalah : 1). Larutan blanko, HNO₃ 1 %. 2). Larutan standar isotop alam Fe, Zn (produksi *Spex*

Incl.). 3) Larutan isotop Fe dan Zn yang diperkaya (produksi ORNL). Kelimpahan isotop alam (*natural isotope abundance*) dan isotop diperkaya tercantum dalam Tabel 1.

Instrumentasi, optimasi dan penentuan perbandingan isotop stabil Fe dan Zn

Sistem ICP-MS : lensa ion, kecepatan alir larutan cuplikan dan daya plasma yang dipasok dari generator RF (*radio frequency*) dioptimalkan dengan memasukkan larutan standar ke dalam nyala plasma argon. Semua pengukuran dilakukan pada kondisi kevakuman yang disyaratkan yaitu $\pm 2 \times 10^{-5}$ torr, menggunakan *isotop ratio mode* untuk perbandingan isotop $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$. Spektrometer massa mengumpulkan data pada setiap posisi massa dalam selang waktu yang disebut *dwell time* dalam orde milidetik. Setelah selang waktu tersebut, secara cepat, data dikumpulkan dari posisi massa berikutnya, demikian seterusnya hingga data terkumpul dari semua massa isotop (dalam kegiatan ini massa isotop ^{54}Fe hingga ^{70}Zn). Siklus pengumpulan data dari semua posisi massa ini dapat diulang dan total waktu untuk setiap massa isotop disebut *measuring time* dalam orde detik. Ulangan *measuring time* disebut *repeat per integration*. Parameter *dwell time* dan *measuring time* sangat menentukan kedapatulngan pengukuran ICP-MS. Dalam kegiatan ini pada kondisi sistem ICP-MS yang telah dioptimalkan, *dwell time* dan *measuring time* divariasi untuk memperoleh kedapatulngan yang baik, yaitu ditandai dengan harga RSD yang paling kecil. Parameter pencacahan *dwell time* 60 milidetik dan *measuring time* 5 detik menghasilkan intensitas pencacahan yang tinggi dan % RSD yang rendah. Pada Gambar 1 dapat dilihat pola dasar penentuan unsur dan/atau isotop menggunakan ICP-MS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebagaimana diketahui bahwa sebagian besar unsur-unsur kimia di alam mempunyai beberapa isotop, disamping ada unsur yang mempunyai isotop tunggal (mono isotop). Kelimpahan isotop alam (*natural isotope abundance*) kuantitasnya tertentu (dinyatakan dalam %). Dengan teknik pemisahan isotop, kelimpahan

isotop alam dapat diperkaya yang tadinya kurang dari 1 % dapat diperkaya menjadi puluhan %.

Pada Tabel 2 dapat dilihat hasil penentuan perbandingan isotop stabil Fe dan Zn di alam, yaitu : $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$. Hasil perbandingan isotop stabil tersebut dituliskan $x \pm SD$, x adalah harga rata-rata dari 6 ulangan dan SD adalah *standard deviation*, rumus umum $SD = \{\sum(x_i - x)^2/(n - 1)\}^{1/2}$, x_i adalah hasil pengukuran ulangan ke i dan n adalah jumlah ulangan. $RSD = SD/x \times 100$ %. Baik SD maupun RSD adalah sebagai ukuran ketelitian (*precision*) pengukuran. Pada perbandingan isotop tersebut RSD berkisar antara 0,55 % - 1,11 % atau < 2 %. Pada Tabel 2 tersebut dicantumkan juga diskriminasi massa. Diskriminasi massa sebagai ukuran seberapa jauh penyimpangan hasil pengukuran terhadap perbandingan isotop alam. Terlihat bahwa harga diskriminasi massa untuk perbandingan isotop $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ berkisar antara 0,9888 - 1,0461 atau angka-angka tersebut mendekati harga 1, ini berarti ketepatan (*accuracy*) penentuan perbandingan isotop dengan ICP-MS adalah cukup memuaskan. Pada Gambar 2 disajikan hasil penentuan perbandingan isotop stabil Fe dan Zn yang diperkaya (produksi ORNL). Terlihat bahwa hasil ICP-MS tidak berbeda jauh dengan hasil TIMS. Perbedaan hasil ICP-MS dan TIMS berkisar antara 0,36 % - 2,90 %.

Tabel 2. Hasil penentuan perbandingan isotop stabil Fe dan Zn menggunakan ICP-MS*

Perbandingan isotop	ICP-MS	*Diskriminasi massa
$^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$	$15,9274 \pm 0,0876$	0,9888
	^a (0,55%)	
	^b 15,7491	
$^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$	$0,3698 \pm 0,0041$	1,0175
	^a (1,11%)	
	^b 0,3763	
$^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$	$0,0542 \pm 0,0006$	1,0461
	^a (1,11%)	
	^b 0,0567	
$^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$	$11,8279 \pm 0,0937$	1,0057
	^a (0,79%)	
	^b 11,8954	
$^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$	$6,8109 \pm 0,0525$	0,9934
	^a (0,77%)	
	^b 6,7664	
$^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$	$4,4987 \pm 0,0375$	1,0043
	^a (0,83%)	
	^b 4,5182	
$^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$	$0,1491 \pm 0,0011$	1,0120
	^a (0,74%)	
	^b 0,1509	

* Jumlah ulangan = n = 6.

^a Harga dalam kurung adalah RSD (% relative standard deviation).

^b Harga perbandingan isotop di alam.

^c Diskriminasi massa = A/B.

A = Perbandingan isotop di alam.

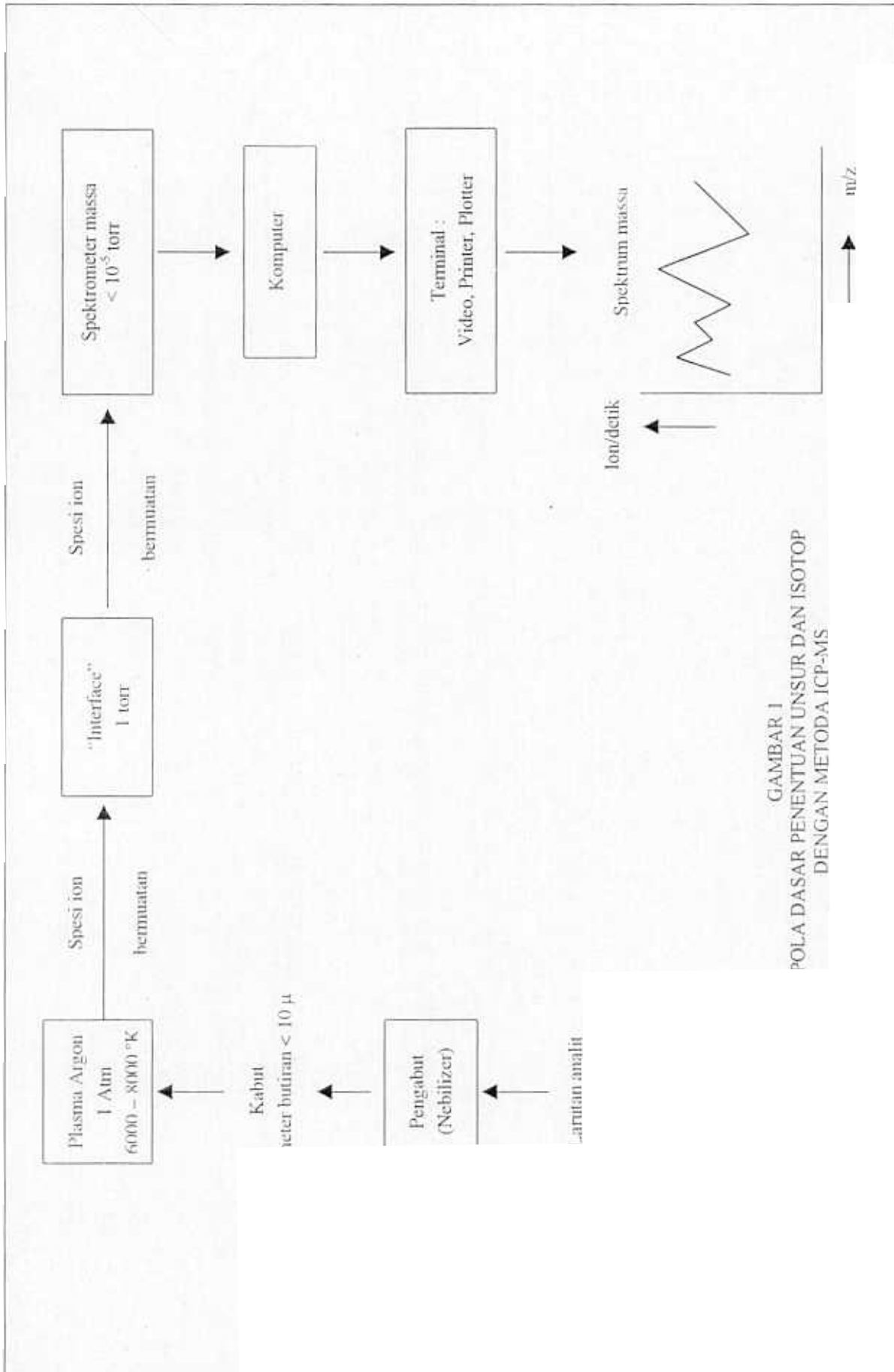
B = Perbandingan isotop hasil ICP-MS.

A/B adalah faktor koreksi untuk penentuan perbandingan isotop menggunakan ICP-MS.

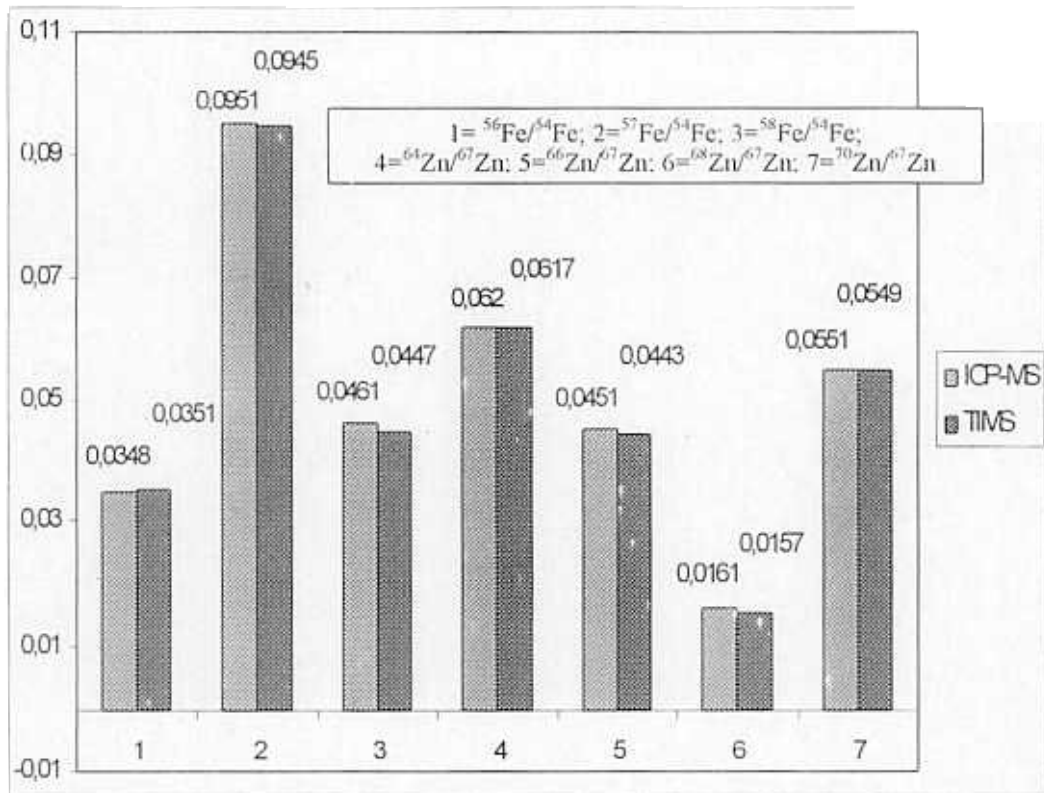
KESIMPULAN

Perbandingan isotop stabil $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$, $^{58}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ dan $^{64}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{66}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{68}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$, $^{70}\text{Zn}/^{67}\text{Zn}$ menggunakan ICP-MS mempunyai ketelitian (*precision*) yang cukup baik, yaitu < 2 % pada kondisi alat optimal.

Metoda ICP-MS siap dilibatkan dalam penelitian di bidang nutrisi, biokimia dan fisiologi yang memanfaatkan teknik perbandingan isotop.



GAMBAR 1
POLA DASAR PENENTUAN UNSUR DAN ISOTOP
DENGAN METODA ICP-MS



Gambar 2. Perbandingan isotop stabil Fe dan Zn yang diperkaya (buatan ORNL) ditentukan dengan ICP-MS dan TIMS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DR. Wuryanto, APU selaku Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan - BATAN yang telah memberi peluang kepada penulis untuk mengikuti *On the job training* di *Houston, USA* dalam bidang aplikasi ICP-MS untuk penelitian di bidang nutrisi dan biokimia. Penulis juga ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada staff Bidang Keselamatan Kerja dan Instrumentasi – P3IB atas kerja sama memelihara peralatan *ICP-MS* yang memang selalu membutuhkan perhatian mengingat usianya dan hanya satu-satunya yang ada di negeri ini.

DAFTAR PUSTAKA

DAVID L. HACHEY, WILLIAM W. WONG, THOMAS W. BOUTTON, AND PETER D. KLEIN, Isotope Ratio Measurements in Nutrition and Biomedical Research, Mass Spectrometry Reviews, John Wiley & Sons, Inc., 1987.

FRED MELLON and BRITTMARIE SANDSTROM, Stable Isotope in Human Nutrition, Academic Press Ltd., 1996.

WASTNEY M. E., GOKMEN I.G., AARMODT R.L., RUMBLE W.F., GORDON G.E., and HENKIN R. I. , Kinetic Analysis of Zinc Methabolism in Humans and Simultaneous Administration of ^{65}Zn and ^{70}Zn , Am. J., Physiol., 260, 1991.

WHITTAKER P.G., LIND T., WILLIAMS J. G., Iron Absorption During Normal Human Pregnancy : A Study Using Stable Isotopes, Br. J. Nutr. 65, 1991.

WHITTAKER P.G., BARRETT J. F. R., and WILLIAMS J. G., Preliminary Determination of Iron Isotope Ratios in Whole Blood Using ICP – MS, J. Anal. At. Spectrom., 7, 1992.

ANANDA S. PRASAD, Review Article, Zinc and Fe Deficiency in Women, Infants and Children, Journal of the American College of Nutrition, 15, 2, 1996.

PARR R.M., CRAWLEY H., ABDULLA M., IYENGAR G.V., and KUMPULAINEN J., Human Dietary Intakes of Trace Elements. A Global Literature Survey Mainly for Period 1970

– 1991. Data Listing and Sources of Information. IAEA, NAHRES – 12, Vienna, 1992.

8. ASTON F. W., Proc. R., Soc. London, A114, 1927.
9. JAMES K. FRIEL, VERNON L. NAAKE Jr., LELAND V. MILLER, PAUL V. FENNESSEY, and K. MICHAEL HAMBIDGE, The Analysis of Stable Isotopes in Urine to Determine the Fractional Absorption of Zinc, American Journal for Clinical Nutrition, 55, 1992.
10. PAUL R. DIXON, RICHARD E. PERIN, DONAL J. ROKOP, REINHOLD MAECK, DAVID R. JANECK, and JOSEPH P. BANAR, Measurement of Iron Isotopes in Submicrogram Quantities of Iron, Anal. Chem., 65, 1993.
11. WASTNEY M. E., ANGELUS P., BARNES R.M., and SUBRAMANIAN K. N., Zinc Kinetics in Preterm Infants : A Compartment Model Based on Stable Isotope Data, The American Physiological Society, 1996.
12. STEVEN A. ABRAMS, KIMBERLY O. O'BRIEN, JIANPING WEN, LILY K. LIANG, and JANICE E. STUFF, Absorption by 1 – Year – Old Children of an Iron Supplement Given with Cow's Milk or Juice, Pediatric Research, 39, 1, 1996.
13. KUMBERLY O. O' BRIEN, NELLY ZAVALETA, LAURA E. CAULFIELD, DONG – XIAO YANG, and STEVEN A. ABRAMS, Influence of Prenatal Iron and Zinc Supplementats on Supplemental Iron Absorption, and Iron Status in Pregnant Peruvian Women, American Journal for Clinical Nutrition, 69, 1999.

DISKUSI

Muslihudin- PPBL BAPEDAL

Bagaimana menghitung keterkaitan metabolisme nutrien anorganik dalam tubuh manusia dan keterkaitannya dengan hasil pengukuran sampel

Rukihati-P3IB

Secara garis besar penelitian absorpsi / metabolisme nutrien anorganik dalam tubuh manusia

Pra penelitian terhadap orang-orang subjek yang akan diteliti, secara medis.