

### Kertas Asli/Original Articles

## Julat Rujukan Bagi Jumlah Homosisteina Dalam Plasma Di Kalangan Kanak-Kanak Di Malaysia

(Reference range for plasma total homocysteine among Malaysian's children)

AFFANDI OMAR\*, SITI ROZILAH ABDUL KADIR, SALINA ABDUL RAHMAN, FATIMAH DIANA AMIN NORDIN, BALQIS KAMARUDIN, NUR JANNAIM MUHAMAD, ROSNANI MOHAMED, MARLEENA MAMAT, NOORNATISHA SALLEH, ZABEDAH MD YUNUS & JULAINA ABDUL JALIL

#### ABSTRAK

*Homosisteinemia merupakan salah satu penyakit kepincangan metabolisme terwaris (IEM) yang menyebabkan peningkatan paras homosisteina. Homosisteina adalah salah satu asid amino mengandungi sulfur yang mempunyai kumpulan thiol yang dibentuk hasil daripada proses demetilasi asid amino methionina. Dalam penyakit kepincangan metabolisme terwaris (inborn errors of metabolism – IEM), terdapat tujuh jenis penyakit berpunca daripada kekurangan enzim yang terlibat dalam metabolisme homosisteina. Paras jumlah homosisteina adalah berbeza mengikut jenis penyakit akibat kekurangan enzim ini. Maka, terdapat keperluan bagi mewujudkan suatu julat rujukan untuk membezakan antara populasi normal dengan populasi berpenyakit. Kajian ini menerangkan penemuan berkenaan julat rujukan bagi jumlah homosisteina di kalangan kanak-kanak di Malaysia. Sebanyak 3 ml darah telah diambil daripada 86 individu normal (52 orang kanak-kanak lelaki dan 34 orang kanak-kanak perempuan) dan seterusnya diproses serta dianalisis menggunakan kaedah kromatografi cecair berprestasi tinggi jenis fasa penukar ion (HPLC-IEC). Hasil kajian mendapati min jumlah homosisteina bagi keseluruhan populasi rujukan ialah sebanyak  $8.1 \pm 3.89 \mu\text{M}$  (95% selang keyakinan 7.3-8.9  $\mu\text{M}$ ). Julat rujukan sedia ada bagi populasi rujukan adalah sebanyak 2.5 – 16.2  $\mu\text{M}$  dengan had pemutus terendah (lower cut-off) dan had pemutus teratas (upper cut-off) masing-masing adalah 1.0  $\mu\text{M}$  dan 21.0  $\mu\text{M}$ . Julat tersebut didapati agak tinggi berbanding dengan penyelidikan luar. Penemuan julat rujukan bagi jumlah homosisteina untuk populasi kanak-kanak di Malaysia yang terbaru ini dapat mengurangkan jumlah kadar positif palsu semasa proses diagnosis penyakit dilakukan.*

*Kata kunci: Homosisteinemia; jumlah homosisteina; julat rujukan; kromatografi cecair berprestasi tinggi*

#### ABSTRACT

*Homocysteinemia is an Inborn Errors of Metabolism (IEM) which can occur due to accumulation of homocysteine. Homocysteine is one of the sulfur-containing amino acid with thiol group that is formed by demethylation of methionine. Deficiency of enzymes involves in homocysteine metabolism can give rise to seven types of homocystinemia subject to total homocysteine level. Therefore reference ranges are needed to differentiate between normal and abnormal population as well as the type of homocystinemia depending on the enzymes defect in the pathway. Hence, homocysteine reference ranges in children for the Malaysian population were postulated. 3 mL of blood was collected from 86 normal individuals (52 boys and 34 girls) and then subsequently processed and analysed using High Performance Liquid Chromatography – Ion Exchange Chromatography (HPLC-IEC). The calculated mean total homocysteine for the population was  $8.1 \pm 3.89 \mu\text{M}$  (95% confidence interval, 7.3-8.9  $\mu\text{M}$ ). Reference range was 2.5 – 16.2  $\mu\text{M}$  with lower and upper cut-off were 1.0  $\mu\text{M}$  dan 21.0  $\mu\text{M}$ , respectively. The newly developed reference range of total homocysteine for Malaysian children is able to reduce false negative cases in the laboratory.*

*Keywords: Homocysteine; reference range; total homocysteine; high performance liquid chromatography*

## PENGENALAN

Asid amino homosisteina yang mempunyai kumpulan berfungsi thiol adalah salah satu daripada asid amino bersulfur selain sistationina, sistina dan taurina (Filkelstein 2006). Ia merupakan terbitan daripada asid amino metionina melalui s-adenosil metionina (Wiley et al. 1988). Jumlah homosisteina adalah terdiri daripada homosisteina bebas, homosistina (gabungan dua molekul homosisteina) dan homosisteina-terikat protein. Majoriti jumlah homosisteina terdiri daripada homosisteina-terikat protein dan selebihnya terdiri daripada homosisteina bebas dan homosistina (Wiley et al. 1988).

Paras penghasilan homosisteina bergantung kepada dua proses iaitu proses sintesis yang melibatkan enzim-enzim sintesis seperti metionina adenosiltransferase (MAT), metiltransferase s-adenosilmetionina-sandaran, metionina sintase reduktase, kofaktor-kofaktor seperti vitamin B12 dan 5-metiltetrahidrofolat yang dihasilkan oleh metilenetetrahidrofolat reduktase (MTHFR) atau betainemetiltransferase; ataupun proses degradasi melalui transulfur yang melibatkan enzim sistationina  $\beta$ -sintase (CBS). Selain menjadi asid amino penting dalam proses homeostasis sel, homosisteina juga dikaitkan dengan peranan penting dalam metabolisme folat dan proses katabolisme kolin (Fowler 2005).

Penyakit kepincangan metabolisme terwaris (inborn errors of metabolism – IEM) merupakan penyakit genetik jarang jumpa yang berpunca daripada kekurangan enzim dalam sesuatu tapak jalan metabolisme. Terdapat tujuh jenis penyakit IEM yang terlibat dalam kepincangan metabolisme homosisteina iaitu penyakit kekurangan MTHFR, penyakit kekurangan metionina sintase (MS), penyakit kekurangan CBS, penyakit kekurangan sistationase, penyakit kekurangan MAT, penyakit kekurangan glisina N-metiltransferase dan penyakit kekurangan S-adenosilhomosisteina hidrolase (SAHH).

Kadar penghasilan jumlah homosisteina adalah berbeza mengikut jenis penyakit akibat kekurangan enzim tertentu yang telah dinyatakan (Finkelstein 2006). Sebagai contoh, dalam penyakit kekurangan MS, paras homosisteina adalah tinggi manakala paras metionina adalah rendah. Keadaan ini berbeza dalam penyakit kekurangan CBS yang mana kedua-dua asid amino tersebut adalah tinggi. Oleh yang demikian, terdapat keperluan untuk mewujudkan satu julat rujukan bagi membezakan antara populasi normal dengan populasi berpenyakit yang berkaitan dengan kepincangan homosisteina (Ubbink & Delport 2000).

Pengesanan penyakit IEM di Malaysia telah dijalankan di Institut Penyelidikan Perubatan (IMR). Ujian penentuan jumlah homosisteina adalah menggunakan kaedah kromatografi cecair berprestasi tinggi jenis fasa penukar

ion (HPLC-IEC) dan menyasarkan golongan bayi dan kanak-kanak (Kementerian Kesihatan Malaysia 2013). Ini berbeza dengan pengesanan penyakit berkaitan kardiovaskular, kanser dan penyakit kemerosotan saraf, yang mana ujian penentuan jumlah homosisteina adalah menggunakan kit komersil immunoasai serta tertumpu kepada golongan sasaran dewasa dan warga emas (Molero et al. 2006). Justeru, satu julat rujukan khas untuk golongan bayi dan kanak-kanak bagi penentuan jumlah homosisteina di kalangan kanak-kanak di Malaysia perlu diwujudkan.

## METODOLOGI

### SAMPEL

Sebanyak 3 ml darah telah diambil daripada 86 orang kanak-kanak yang berusia di bawah 12 tahun dengan menggunakan tiub pengumpulan darah yang mengandungi asid etilendiaminatetraasetik (Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA). Setiap kanak-kanak ini telah disaring sejarah perubatannya dan telah mendapat kebenaran termaklum bertulis (informed consent) yang diperolehi daripada ibubapa dan/atau penjaga individu yang terbabit. Antara kriteria penerimaan dalam kajian ini adalah setiap subjek adalah bebas daripada menghidapi penyakit IEM, bebas daripada mengambil suplemen dan asid folik dan sampel dalam keadaan baik tanpa hemolisis. Subjek yang menghidapi penyakit IEM atau mempunyai sejarah penyakit IEM di kalangan keluarga terdekat atau mengambil suplemen dan asid folik atau sampel yang hemolisis atau menarik diri akan dikeluarkan daripada kajian ini. Kajian ini dijalankan selaras dengan Deklarasi Helsinki 2003 (nombor kelulusan etika: KKM/NIHSEC/P20-2073(4)).

### PENENTUAN JUMLAH HOMOSISTEINA DALAM PLASMA

Jumlah homosisteina dalam plasma ditentukan menggunakan kaedah yang dinyatakan oleh Pernet et al. (2005). Secara ringkasnya, sebanyak 20  $\mu$ l dithioerythritol (DTE) ditambahkan ke dalam 200  $\mu$ l sampel plasma dan dieram selama lima minit pada suhu bilik. Kemudian, 100  $\mu$ l 10% asid sulfosalisalik (SSA) ditambah kepada campuran tersebut dan dieram selama 30 minit pada suhu 4°C. Tiub diempar pada kelajuan 10,000 rpm selama lima minit. Supernatan yang diperolehi dipindahkan ke dalam tiub khas (insert) di dalam vial dan dianalisis menggunakan instrumen HPLC-IEC. Sampel telah disuntik ke dalam fasa pegun yang mengandungi resin penukar ion. Dalam fasa ini, analit-analit ini bergabung dengan ninhidrin yang berfungsi sebagai agen terbitan di dalam ruangan tindak

balas dan menghasilkan sebatian berwarna yang dikesan oleh pengesanan pada jarak gelombang 570 nm.

### UJIAN STATISTIK

Min, sisihan piawai, median dan ralat piawai diperolehi dengan menggunakan perisian IBM SPSS Statistics, versi 14 (SPSS Inc, Chicago, Amerika Syarikat). Parameter umur dan kepekatan jumlah homosisteina dianalisis menggunakan kaedah bukan parametrik disebabkan data yang diperolehi menunjukkan taburan tidak normal. Untuk menilai perbezaan min populasi rujukan bagi kanak-kanak lelaki dan perempuan, ujian Mann-Whitney U telah digunakan. Untuk membandingkan jumlah homosisteina di antara kumpulan umur dalam populasi rujukan pula, ujian Kruskal-Wallis telah digunakan. Nilai  $p < 0.05$  dianggap sebagai signifikan secara statistik. Pewujudan julat rujukan adalah menggunakan kaedah persentil disebabkan taburan data yang diperolehi adalah tidak normal.

## HASIL KAJIAN

### DEMOGRAFIK POPULASI RUJUKAN

Seramai 86 orang kanak-kanak yang bebas penyakit IEM yang berumur dari empat hari sehingga 12 tahun telah mengambil bahagian dalam kajian ini. Daripada itu, 52 orang adalah kanak-kanak lelaki manakala 34 orang pula adalah kanak-kanak perempuan. Berdasarkan Jadual 1, median bagi umur keseluruhan populasi rujukan ini ialah 1.25 tahun. Jika diambil kira faktor jantina, populasi rujukan perempuan mencatatkan umur median yang lebih tinggi berbanding populasi rujukan lelaki iaitu masing-masing 2.0 tahun dan 1.0 tahun. Untuk kepekatan jumlah homosisteina, min bagi keseluruhan populasi rujukan ialah  $8.10 \pm 3.89 \mu\text{M}$ . Manakala min bagi populasi rujukan lelaki pula mencatatkan jumlah homosisteina yang tinggi berbanding dengan populasi rujukan perempuan iaitu masing-masing  $8.26 \pm 4.4 \mu\text{M}$  dan  $7.86 \pm 2.9 \mu\text{M}$ .

JADUAL 1. Data demografik populasi rujukan

	n	Min (Sisihan Piawai)	Median (Ralat Piawai)	Selang Data (Nilai Minimum - Nilai Maksimum)
Umur (Tahun)				
Lelaki	52	2.27 (2.90)	1.00 (0.40)	0.01 – 12
Perempuan	34	3.15 (3.07)	2.0 (0.53)	0.02 – 11
Keseluruhan	86	2.62 (2.98)	1.25 (0.32)	0.01 – 12
Jumlah Homosisteina ( $\mu\text{M}$ )				
Lelaki	52	8.26 (4.41)	7.05 (0.61)	1.0 - 21.0
Perempuan	34	7.86 (2.94)	7.75 (0.50)	3.3 - 16.4
Keseluruhan	86	8.10 (3.89)	7.2 (0.42)	1.0 - 21.0

### TABURAN JUMLAH HOMOSISTEINA

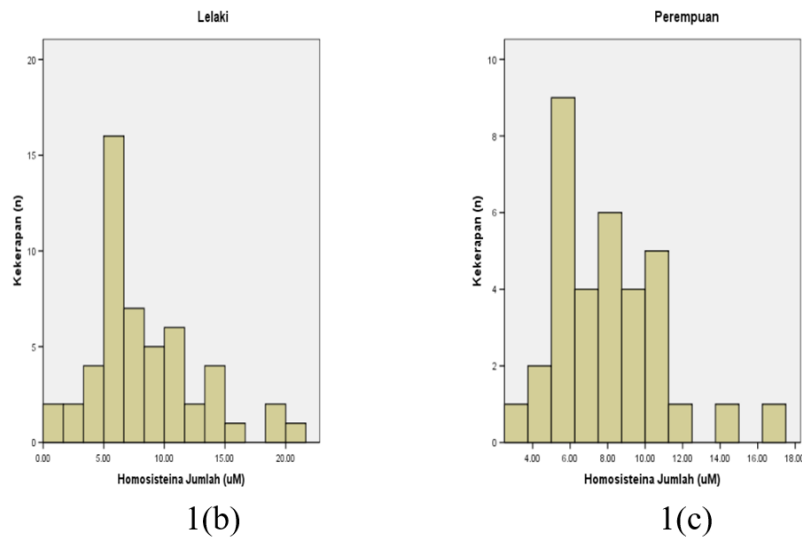
Secara keseluruhannya, data jumlah homosisteina mempunyai taburan secara tidak normal (non-Gaussian distribution) disebabkan terdapat dua nilai yang tersesar (outliers) iaitu data ke-12 (kepekatan jumlah homosisteina,  $18.5 \mu\text{M}$ ) dan data ke-48 (kepekatan jumlah homosisteina,  $21 \mu\text{M}$ ) (Rajah 1a). Ini disokong dengan nilai kepencongan positif (positive skewness) dan nilai kurtosis positif yang diperolehi iaitu masing-masing  $0.999 \pm 0.260$  dan  $1.253 \pm 0.514$ . Ujian kenormalan Shapiro-Wilk turut menunjukkan populasi rujukan keseluruhan ini mempunyai taburan secara bukan normal ( $p < 0.05$ ).

Sekiranya populasi rujukan diasingkan mengikut jantina, didapati taburan data dari kedua-dua populasi rujukan ini bersifat Gaussian walaupun terdapat satu atau dua data yang tersesar pada histogram kedua-dua populasi (Rajah 1b & 1c). Data tersesar bagi populasi rujukan lelaki

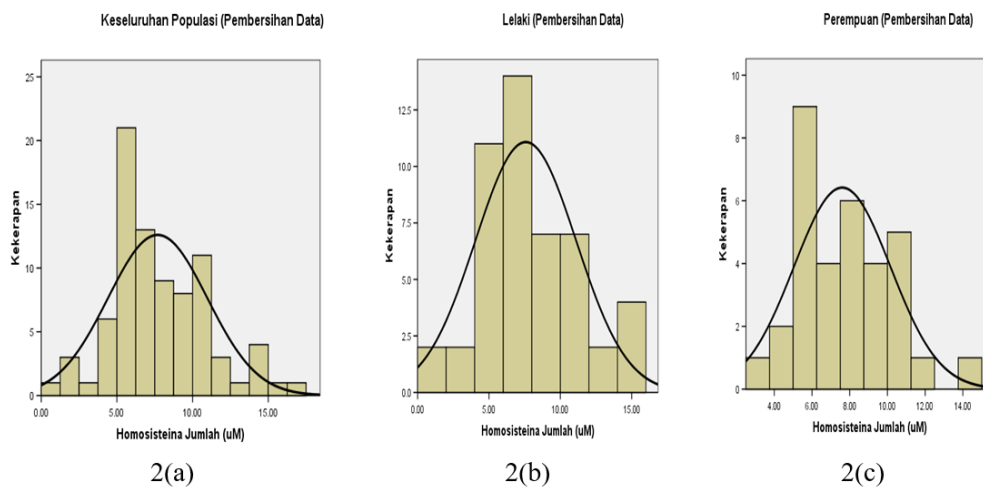
adalah pada data ke-12 (kepekatan jumlah homosisteina,  $18.5 \mu\text{M}$ ) dan pada data ke-48 (kepekatan jumlah homosisteina,  $21 \mu\text{M}$ ) manakala bagi populasi rujukan perempuan pula adalah pada data ke-18 (kepekatan jumlah homosisteina,  $16.4 \mu\text{M}$ ).

Populasi rujukan lelaki menunjukkan nilai kepencongan positif sebanyak  $0.923 \pm 0.33$  dan nilai kurtosis positif sebanyak  $0.744 \pm 0.65$ . Manakala, bagi nilai kepencongan positif dan nilai kurtosis positif bagi populasi rujukan perempuan pula masing-masing ialah  $0.894 \pm 0.403$  dan  $1.090 \pm 0.788$ . Ujian kenormalan bagi populasi rujukan lelaki didapati tidak normal ( $p < 0.05$ ) manakala populasi rujukan perempuan pula adalah normal ( $p > 0.05$ ).

Sekiranya data-data tersesar ini dikeluarkan dari populasi rujukan masing-masing, didapati kesemua data mempunyai taburan secara normal dengan nilai kepencongan pada  $\pm 1.0$ , nilai kurtosis pada  $\pm 1.0$  dan ujian kenormalan menunjukkan keputusan yang normal ( $p > 0.05$ ).



RAJAH 1(b) & (c). Taburan jumlah homosisteina bagi populasi lelaki (b) dan populasi perempuan (c)



RAJAH 2. Taburan homosisteina jumlah selepas pembersihan data bagi keseluruhan populasi (a), populasi lelaki (b) dan populasi perempuan (c)

(Rajah 2a, 2b dan 2c). Walaubagaimanapun, tiada data dalam kajian ini yang dikeluarkan bagi menjamin integriti data. Perbandingan di antara data populasi rujukan lelaki dan perempuan menunjukkan bahawa tiada perbezaan secara signifikan antara kedua-dua min data ini ( $p > 0.05$ ).

Analisis untuk membandingkan sekiranya terdapat perbezaan min jumlah homosisteina dalam kalangan kumpulan umur yang berbeza juga telah dijalankan. Untuk melihat sekiranya terdapat perbezaan umur bagi jumlah homosisteina, pengelasan kumpulan umur dilakukan berdasarkan kaedah Lahti A et al. (2004). Populasi rujukan dibahagikan kepada empat kumpulan umur iaitu 0-3 tahun, 4-6 tahun, 7-9 tahun dan 10-12 tahun. Didapati bahawa tiada perbezaan signifikan bagi jumlah homosisteina di

kalangan kesemua kumpulan umur tersebut ( $p > 0.05$ ). Oleh itu, pewujudan julat rujukan bagi jumlah homosisteina adalah pada populasi rujukan secara keseluruhan dan tanpa stratifikasi kumpulan umur.

#### PEWUJUDAN JULAT RUJUKAN JUMLAH HOMOSISTEINA

Kaedah bukan parametrik diterimapakai untuk pewujudan julat rujukan jumlah homosisteina yang tepat disebabkan data keseluruhan menunjukkan taburan secara tidak normal. Oleh yang demikian, julat rujukan yang diwujudkan untuk populasi rujukan adalah pada 2.5 – 16.2  $\mu\text{M}$  (Jadual 2). Daripada data tersebut juga, had pemutus terendah

JADUAL 2. Taburan jumlah homosisteina mengikut persentil serta julat rujukan dan perbandingan berdasarkan penyelidik lain

Populasi Rujukan	Kajian Semasa	Kajian Osganian et al. 1999		Kajian Papandreou et al. 2006		Kajian Greenlund et al. 1999	
	Kanak-kanak Malaysia	Keseluruhan <sup>1</sup>	Kanak-kanak Asia <sup>2</sup>	Kanak-kanak Greek		Bandar Bogalusa, Louisiana, Amerika Syarikat	
Umur Populasi Rujukan (Tahun)	0 - 12	11 - 14	11 - 14	6 - 9	10 - 12	5 - 8	9 - 11
Bilangan sampel, n	86	3524	63	111	143	343	285
	Homosisteina Jumlah ( $\mu\text{M}$ )						
Persentil 10	4.1	-	-	-	-	3.7	3.6
Persentil 25	5.2	4.1	4.0	5.6	6.3	4.5	4.6
Persentil 50	7.2	4.9	5.2	6.4	7.2	5.4	5.5
Persentil 75	10	6.0	6.2	7.3	8.3	6.9	6.3
Persentil 90	14.1	-	-	-	-	9.4	7.6
Julat rujukan (95% selang keyakinan)	2.5 - 16.2	3.2 - 8.5	3.1 - 8.7	Had pemutus teratas < 9.98	Had pemutus teratas < 10.62	3.3 - 12.1	3.1 - 8.9

<sup>1</sup>Keseluruhan merangkumi kanak-kanak termasuk kulit putih, hitam, Hispanik, Orang Asli Amerika dan Asia; yang terlibat dalam kajian CATCH dari negeri California, Louisiana, Minnesota dan Texas

<sup>2</sup>Kanak-kanak berketurunan dari Asia yang terlibat dalam kajian CATCH dari negeri California, Louisiana, Minnesota dan Texas

(lower cut-off) dan had pemutus teratas (upper cut-off) iaitu masing-masing sebanyak 1.0  $\mu\text{M}$  dan 21.0  $\mu\text{M}$  telah berjaya menentukan.

## PERBINCANGAN

Sehingga kini, ini adalah merupakan satu-satunya kajian yang menerangkan mengenai pewujudan suatu julat rujukan jumlah homosisteina di kalangan kanak-kanak di Malaysia. Berdasarkan data demografik populasi rujukan yang diperolehi, didapati bahawa bilangan sampel lelaki dan perempuan adalah tidak seimbang. Walau bagaimanapun, min bagi kedua-dua populasi rujukan berasaskan jantina tidak mempunyai perbezaan yang signifikan sekaligus membuktikan bahawa jantina tidak mempengaruhi paras kepekatan jumlah homosisteina. Kajian para penyelidik lain turut menyokong penemuan ini dan melaporkan bahawa jantina bukanlah faktor terkait (associated factor) paras jumlah homosisteina di kalangan kanak-kanak (Osganian et al. 1999; Greenlund et al. 1999; Papandreou et al. 2014)

Sebagaimana yang dinyatakan dalam bahagian hasil kajian, taburan data jumlah homosisteina secara keseluruhannya adalah tidak normal. Terdapat dua data yang tersesar dalam populasi rujukan ini iaitu 18.5  $\mu\text{M}$  dan 21.0  $\mu\text{M}$ . Perbandingan telah dibuat di antara data keseluruhan tanpa dibuang dengan data nilai tersesar yang telah dibuang. Didapati bahawa min bagi kedua-duanya

menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan. Oleh yang demikian, keputusan untuk tidak membuang data ini telah diambil disebabkan nilainya adalah tidak terlalu ekstrem dan bilangan sampel (n) dalam populasi rujukan tidak sebanyak populasi rujukan kajian penyelidik lain. Kajian Aguinis et al. (2013) berpendapat bahawa sesuatu data daripada populasi yang dianggap normal hendaklah dikekalkan sedaya upaya yang mungkin.

Jika dilihat dari segi taburan jumlah homosisteina di kalangan umur populasi rujukan, tiada perbezaan signifikan di antara pengkelasan umur di dalam populasi rujukan ini (0-12 tahun). Ini menerangkan bahawa hanya satu julat rujukan bagi populasi rujukan ini yang perlu diwujudkan. Senario ini adalah berbeza jika dibandingkan dengan penyelidik lain. Kajian oleh Greenlund et al. (1999) mempunyai dua julat rujukan yang berbeza di kalangan dua kelompok umur iaitu 5-8 tahun dan 9-11 tahun. Ini turut dilapor oleh Papandreou et al. (2006) yang mana mempunyai dua julat yang berbeza bagi kumpulan umur yang berbeza.

Selang persentil 5-95 mewakili 95% taburan pensampelan sebagaimana yang dilakukan di dalam pensampelan komuniti (Tabachnick et al. 2001). Oleh yang demikian, julat rujukan yang berjaya diwujudkan adalah pada 2.5-16.2  $\mu\text{M}$ . Julat ini agak tinggi berbanding dengan penyelidik-penyelidik lain. Osganian et al. (1999) dalam kajian mereka iaitu Child and Adolescent Trial for Cardiovascular Health (CATCH) misalnya, mempunyai julat rujukan bagi jumlah homosisteina sekitar 3.2-8.5  $\mu\text{M}$ , sekali ganda rendah berbanding julat rujukan kajian terkini.



Dalam kajian Osganian et al. (1999) berkenaan dengan taburan jumlah homosisteina, mereka turut melibatkan populasi rujukan daripada kanak-kanak Asia yang telah bermastautin di negeri California, Louisiana, Minnesota dan Texas di Amerika Syarikat. Julat rujukan bagi masyarakat Asia di negeri-negeri tersebut didapati rendah berbanding julat rujukan kajian terkini dan menyamai dengan julat rujukan bagi keseluruhan populasi yang merangkumi kanak-kanak berkulit putih, kulit hitam, berketurunan Hispanik, orang asli Amerika dan masyarakat yang berasal dari Asia. Mereka menyatakan bahawa pengambilan multivitamin atau suplemen asid folik secara mandatori telah mempengaruhi aras homosisteina jumlah di kalangan kanak-kanak bagi keempat-empat negeri ini (Osganian et al. 1999). Julat rujukan yang lebih tinggi di kalangan kanak-kanak Malaysia mungkin disebabkan kanak-kanak di Malaysia tidak digalakkan untuk mengambil suplemen vitamin dan mineral sekiranya mereka tidak menunjukkan tanda-tanda kekurangan zat makanan. Penilaian ini berdasarkan nasihat daripada professional perubatan (Majlis Keselamatan Makanan dan Pemakanan Kebangsaan, 2014).

Julat rujukan yang agak tinggi memberikan kelebihan dalam diagnosis penyakit IEM. Julat rujukan yang rendah ataupun penggunaan julat rujukan dari negara luar boleh menyebabkan diagnosis yang salah. Oleh yang demikian, pewujudan julat rujukan berdasarkan komuniti setempat dapat mengurangkan kadar positif palsu dalam diagnosis penyakit. Ini menunjukkan bahawa julat rujukan yang diwujudkan telah memberi manfaat kepada pakar genetik dan pakar patologi kimia dalam diagnosis penyakit IEM.

Julat rujukan diwujudkan spesifik kepada sesuatu populasi yang kebiasaannya bersifat setempat. Ini berbeza dengan konsep had pemutus teratas yang mana ia merupakan nilai ambang dalam penentuan had bagi sesuatu interpretasi klinikal sesuatu penyakit (Ozarda 2016). Dalam kajian ini, had pemutus teratas iaitu  $21 \mu\text{M}$  telah ditentukan. Mana-mana individu yang mempunyai kepekatan jumlah homosisteina melebihi nilai pemutus teratas ini berkemungkinan berisiko mempunyai penyakit IEM berkaitan metabolisme homosisteina.

Penggunaan julat rujukan berdasarkan populasi rujukan orang dewasa adalah tidak sesuai untuk diguna pakai bagi populasi kanak-kanak. Sebagaimana yang diketahui, aras jumlah homosisteina berbeza dengan peningkatan usia (Ganji & Kafai 2006). Dalam kajian yang dilakukan oleh Ganji & Kafai (2006), mereka mendapati bahawa terdapat peningkatan kepekatan jumlah homosisteina di kalangan individu berumur lebih daripada 50 tahun berbanding dengan individu berumur 19-50 tahun. Peningkatan ini mungkin disebabkan oleh pengurangan enzim CBS yang penting dalam proses transulfur homosisteina kepada sistationina (Ganji & Kafai 2006).

Penggunaan julat rujukan orang dewasa bagi diagnosis penyakit IEM berkaitan metabolisme homosisteina di kalangan kanak-kanak boleh menyebabkan diagnosis yang salah kerana kemungkinan akan berlakunya negatif palsu (Katayev et al. 2010; Ozarda 2016). Ini disebabkan julat rujukan orang dewasa adalah lebih tinggi berbanding kanak-kanak. Julat rujukan khusus untuk kanak-kanak adalah amat diperlukan bagi mengurangkan kesilapan diagnosis sebegini.

Antara kekangan kajian ini adalah dari segi bilangan sampel. Jika dibandingkan dengan hasil kajian beberapa penyelidik (Osganian et al. 1999; Greenlund et al. 1999; Lahiri et al. 2014; Papandreou et al. 2014), bilangan sampel dalam kajian ini adalah kurang daripada seratus individu. Perekrutan individu normal berserta persetujuan kebenaran daripada peserta memerlukan kos yang tinggi, mengambil masa yang panjang serta berdasarkan keperluan kerana melibatkan golongan sensitif seperti kanak-kanak (Katayev et al. 2010). Salah satu cara untuk mengatasi masalah bilangan sampel yang kurang ini adalah dengan mengadakan kajian julat rujukan berbilang tempat (multicentre reference interval studies) sebagaimana dicadangkan oleh penyelidik Ozarda et al. (2016). Ini sekaligus dapat mengurangkan beban kewangan dan masa yang diperlukan untuk mencari individu sukarela. Walaubagaimanapun, untuk kajian ini, ia masih boleh diterima berdasarkan garis panduan yang dikeluarkan oleh Persatuan Kimia Klinikal Amerika yang menyatakan bilangan sampel yang relatif (dalam 50-100 individu) adalah mencukupi bagi kajian yang melibatkan golongan sensitif seperti kanak-kanak (Soldin et al. 2007).

## KESIMPULAN

Secara kesimpulannya, suatu julat rujukan bagi jumlah homosisteina telah diwujudkan yang mengambil kira kepelbagaian peringkat umur mengikut jantina dalam populasi kanak-kanak di Malaysia. Kewujudan julat rujukan yang khusus ini adalah lebih tepat dan penting dalam diagnosis penyakit IEM yang berkaitan dengan metabolisme homosisteina.

## PENGHARGAAN

Penghargaan ditujukan kepada Ketua Pengarah Kesihatan Malaysia, Kementerian Kesihatan Malaysia kerana memberi kebenaran untuk menerbitkan kertas penulisan saintifik ini. Pengarang juga ingin merakamkan penghargaan kepada kakitangan makmal Unit Biokimia, Pusat Diagnostik Khas di atas pengurusan sampel dan penyediaan bahan kimia.

## RUJUKAN

- Aguinis, H., Gottfredson, R.K. & Joo, H. 2013. Best-practice recommendations for defining, identifying and handling outliers. *Organizational Research Methods*. 00(0): 1-32.
- Filkelstein, J.D. 2006. Inborn errors of sulfur-containing amino acid metabolism. *The Journal of Nutrition*. 136(6): 1750S-1754S.
- Fowler, B. 2005. Homocysteine: Overview of Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Seminars in Vascular Medicine*. 8(2): 77-86.
- Ganji, V & Kafai, M.R. 2006. Population reference values for plasma total homocysteine concentrations in US adults after the fortification of cereals with folic acid. *American Journal of Clinical Nutrition*. 84: 989-994.
- Greenlund, K.J., Srinivasan, S.R., Xu, J-H, Dalferes Jr, E., Myers, L., Pickoff, A. & Berenson, G.S. 1999. Plasma homocysteine distribution and its association with parental history of coronary artery disease in Black and White children: *The Bogalusa Heart Study*. *Circulation*. 16: 2144-2149.
- Katayev, A., Balciza, C. & Seccombe, D.W. 2010. Establishing reference intervals for clinical laboratory test results. *American Journal of Clinical Pathology*. 133: 180-186.
- Kementerian Kesihatan Malaysia. 2013. Annual Report Ministry of Health 2013. Retrieved from <https://myhdw.moh.gov.my/publicdocuments/20186/150089/Annual+Report+2013.pdf/e233790c-83eb-4352-935a-d910a95fa4b0>
- Majlis Keselamatan Makanan dan Pemakanan Kebangsaan. 2014. Malaysian Dietary Guidelines for Children and Adolescents. Retrieved from [http://nutrition.moh.gov.my/wp-content/uploads/penerbitan/buku/MDG\\_Children\\_adolescent\\_2014.pdf](http://nutrition.moh.gov.my/wp-content/uploads/penerbitan/buku/MDG_Children_adolescent_2014.pdf)
- Lahiri, K.D., Datta, H. & Das, H.N. 2014. Reference interval determination of total plasma homocysteine in an Indian population. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 29(1): 74-78.
- Lahti, A., Petersen P.H., Boyd, J.C., Rustad, P., Laake, P. & Solberg, H.E. 2004. Partitioning of Nongaussian-Distributed Biochemical Reference Data into Subgroups. *Clinical Chemistry*. 50(5): 891-900.
- Molero, A.E., Altimari, C.C., Duran, D.A., Garcia, E., Pino-Ramirez, G & Maestre, G.E. 2006. Total plasma homocysteine values among elderly subjects: Findings from the Maracaobo Aging Study. *Clinical Biochemistry*. 39: 1007-1015
- Osganian, S.K., Stampfer, M.J., Spiegelman, D., Rimm, E., Cutler, J.A., Feldman, H.A., Montgomery, D.H., Webber, L.S., Lytle, L.A., Bausserman, L. & Nader, P.R. 1999. Distribution of and factor associated with serum homocysteine levels in children: Child and adolescent trial for cardiovascular health. *Journal of American Medical Association*. 281(13): 1189-1196.
- Ozarda, Y. 2016. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia Medica*. 26(1): 5-16.
- Papandreou, D., Mavromichalis, I., Makedou, A., Rousso, I. & Arvanitidou, M. 2006. Reference range of total serum homocysteine level and dietary indexes in health Greek schoolchildren aged 6-15 years. *British Journal of Nutrition*. 96: 719-724.
- Pernet, P., Cuzon, G., Lim, S-K., Labau, N., Laghzal, A. & Vaubourdoles, M. 2005. Plasma Homocysteine Measurement with Ion Exchange Chromatography (Jeol Aminotic 500): A Comparison with the Abbott IMx Assay. *Medical Principles and Practice*, 15: 149-152
- Soldin, S.J., Brugnara, C. & Wong, E.C. 2007. *Pediatric Reference Intervals*. 6th ed. Washington, D.C: AACC Press.
- Tabachnick, B.G. & Fidell, L.S. 2001. *Using multivariate statistics*. 4th ed. Boston: Allyn & Bacon.
- Ubbink, J.B. & Delpport, R. 2000. Reference ranges for homocysteine concentration. Dlm Robinson, K. (Ed.). *Homocysteine and Vascular Disease*. 47(6). Ms 41-57. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Wiley, V.C., Dudman, N.P., & Wilcken, D.E.L. 1988. Free Homocysteine. *Metabolism*. 37: 191.

Affandi Omar\*  
 Salina Abdul Rahman  
 Fatimah Diana Amin Nordin  
 Balqis Kamarudin  
 Nur Jannaim Muhamad  
 Rosnani Mohamed  
 Zabedah Md Yunus  
 Julaina Abdul Jalil  
 Unit Metabolisme Terwaris, Pusat Penyelidikan Pemakanan, Metabolisme dan Kardiovaskular, Institut Penyelidikan Perubatan Kompleks Institut Kesihatan Negara, Kementerian Kesihatan Malaysia  
 Jalan Setia Murni U13/52, Bandar Setia Alam  
 40170 Shah Alam, Selangor  
 Malaysia

Siti Rozilah Abdul Kadir  
 Marleena Mamat  
 Noornatisha Salleh  
 Unit Biokimia, Pusat Diagnostik Khas Institut Penyelidikan Perubatan Kementerian Kesihatan Malaysia  
 Jalan Pahang, 50588 Kuala Lumpur  
 Malaysia

Pengarang koresponding: Affandi Omar  
 Emel: fendi.omar@moh.gov.my