



Metode Evaluasi Nilai Biologis Karbohidrat dan Lemak

E Prangdimurti, NS Palupi dan FR Zakaria

Tujuan Instruksional Khusus

Setelah menyelesaikan topik 12 ini, mahasiswa diharapkan mampu menjelaskan prinsip dan memilih metode evaluasi karbohidrat dan lemak yang sesuai dengan kebutuhan

Pendahuluan

Suatu bahan makanan dikatakan memiliki nilai gizi karbohidrat yang tinggi apabila dapat diserap dan dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi sel-sel tubuh. Namun, suatu bahan makanan yang memiliki nilai gizi karbohidrat yang rendah, yang dikarenakan tidak dapat diserap oleh tubuh, tidak selalu berarti memiliki nilai biologis yang rendah. Hal ini karena adanya manfaat biologis yang diperankan antara lain oleh serat makanan. Serat makanan merupakan karbohidrat yang tidak dapat diserap tubuh, namun memiliki manfaat biologis dalam hal menurunkan kadar kolesterol darah (hipokolesterolemik) atau menahan kecepatan peningkatan gula darah (hipoglikemik).

Nilai biologis bahan pangan berkorelasi dengan manfaatnya bagi tubuh. Nilai biologis bersifat relatif bagi setiap individu, tergantung pada kondisi fisiologisnya. Sebagai contoh, nasi yang memiliki indeks glikemik yang rendah memiliki nilai biologis yang tinggi bagi para penderita diabetes, namun bagi anak-anak atau olahragawan yang membutuhkan energi yang tinggi nasi tersebut memiliki nilai biologis yang rendah. Pada modul ini akan dipaparkan hal-hal yang terkait dengan nilai biologis karbohidrat dan lemak.

A. KARBOHIDRAT

FAO/WHO merekomendasikan pengelompokan karbohidrat berdasarkan :

1. Panjang rantai, yang terdiri dari monosakarida (gula sederhana), oligosakarida (rantai pendek), dan polisakarida (rantai panjang).
2. Glikemik dan non-glikemik berdasarkan dapat atau tidaknya suatu karbohidrat dicerna menghasilkan glukosa di usus halus. Karbohidrat yang non glikemik akan lolos hingga mencapai usus besar, dan kemudian terbagi dua kelompok berdasarkan kemampuannya difermentasi oleh bakteri usus.
3. Dapat difermentasi atau tidak dapat difermentasi. Karbohidrat yang tidak dapat dicerna (non-glikemik) dibagi menjadi 2 kelompok yaitu yang dapat difermentasi dan yang tidak dapat difermentasi oleh bakteri di usus besar (kolon).

Karbohidrat glikemik mempunyai fungsi sebagai sumber energi (kalori) bagi tubuh, sedangkan karbohidrat non glikemik meskipun tidak menghasilkan energi yang signifikan, namun memberi andil dalam pencegahan beberapa penyakit degeneratif.

Selain faktor tersebut di atas, nilai biologis karbohidrat dipengaruhi oleh keberadaan senyawa antiamilase yang ada dalam bahan pangan. Antiamilase menghambat kerja enzim amylase dalam mencerna pati. Pada beberapa jenis kacang-kacangan senyawa antiamilase berupa protein, sedangkan dalam sagu berupa senyawa tannin.

Beberapa hal yang menjadi bahan pertimbangan dalam mengevaluasi nilai biologis karbohidrat, antara lain:

- indeks glikemiknya (potensinya sebagai sumber energi)
- potensi prebiotiknya (memperbaiki kesehatan usus), antara lain dengan melihat kandungan serat makanannya, kadar pati resisten, dan sebagainya.

Oligosakarida

Oligosakarida terdiri dari 2 sampai 10 unit sakarida. Oligosakarida yang tidak dapat dicerna mengandung ikatan yang tidak dapat dipecah oleh enzim yang terdapat dalam saluran pencernaan, misalnya ikatan alfa-galaktosida. Jenisnya antara lain rafinosa, stakiosa dan verbaskosa, yang mempunyai ikatan alfa-galaktoglukosa dan alfa-galaktogalaktosa, dan banyak ditemukan pada kacang-kacangan. Karena tidak dapat dicerna, oligosakarida ini mengalami fermentasi di usus besar dan menyebabkan flatulensi (menumpuknya gas di saluran pencernaan).

Usaha yang dapat dilakukan untuk mengurangi kadar oligosakarida yaitu dengan merendam kacang-kacangan kemudian diikuti dengan perkecambahan atau fermentasi. Melalui proses tersebut maka ikatan alfa-galaktosida dipecah oleh enzim alfa-galaktosidase, yang terdapat secara endogen dalam bahan pangan tersebut atau dihasilkan oleh mikroba. Beberapa jenis oligosakarida digunakan sebagai pemanis non nutritif, yaitu pemanis yang tidak memberi nilai kalori atau berkalori rendah, atau dengan kata lain memiliki indeks glikemik yang rendah (Tabel 13.1).

Gula Alkohol

Gula alkohol merupakan monosakarida atau disakarida yang memiliki banyak gugus hidroksil. Gula alkohol terdapat di alam, tapi lebih banyak produk hidrogenasi dari mono-disakarida, contohnya sorbitol dari glukosa, maltitol dari maltosa. Gula jenis ini tidak mengandung grup karbonil pereduksi sehingga kurang reaktif.

Gula alkohol dikembangkan sebagai pengganti pemanis sukrosa, tetapi memiliki efek yang baik terutama untuk kesehatan gigi dan mencegah obesitas karena memiliki indeks glikemik yang rendah. Ada 2 golongan gula alkohol berdasarkan metabolismenya dalam tubuh yaitu: (1) sedikit dapat diserap tapi dapat dimetabolisme, dan (2) dapat diserap tapi tidak dapat dimetabolisme.

Tabel 13.1. Tingkat kemanisan relatif pemanis non nutritif

	Kemanisan (% terhadap sukrosa)
OLIGOSAKARIDA	
Neosugar (Frukto- oligosakarida)	30-60
Galakto-oligosakarida	20-40
Xylo- oligosakarida	50
Isomalto- oligosakarida	50
Soybean oligosakarida	70
Laktosukrosa	35-60
Laktulosa	60-70
Coupling sugar	50-60
Palatinosa	37-45
DISAKARIDA ALKOHOL	
Maltitol	80-95
Laktitol	30-40
Palatinit (sorbitol dan manitol, 1:1)	30-40
MONOSAKARIDA ALKOHOL	
Erythritol (tetrosa alkohol)	75-85
Sorbitol (heksosa alkohol)	60-70
Manitol (heksosa alkohol)	50

Fungsi Fisiologis Oligosakarida dan Gula Alkohol

1. Menghasilkan energi yang rendah (indeks glikemik rendah)

Hal ini dikarenakan : (1) tidak dapat dicerna (contoh oligosakarida dan disakarida alcohol), (2) dapat diserap tapi tidak dimetabolisme (contoh monosakarida erythritol), atau (3) hanya sedikit dapat diserap tapi dapat dimetabolisme (contoh monosakarida sorbitol dan manitol).

2. Tidak memiliki efek terhadap sekresi insulin pancreas

Transpor membran gula alkohol tidak tergantung insulin

3. Memperbaiki mikroflora intestine (potensi prebiotik)

Oligosakarida yang tidak dapat dicerna atau monosakarida yang tidak dapat diserap usus halus dapat digunakan oleh bakteri intestin (terutama berada di usus besar) , akibatnya diproduksi sejumlah SCFA → pH lumen usus besar menurun → bakteri yang menguntungkan (*Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*) meningkat (tahan asam), sedangkan jumlah mikroba yang berbahaya (*Clostridium*) menurun karena sensitif terhadap asam. Dengan kondisi seperti ini kesehatan saluran pencernaan lebih baik.

Bakteri yang hidup di saluran pencernaan dan memberi manfaat bagi kesehatan disebut probiotik, sedangkan kelompok karbohidrat yang menjadi 'makanan' (dapat difermentasi) probiotik disebut prebiotik.

4. Melindungi karies gigi

Ada 2 tipe pemanis non kariogenik:

- a. Oligosakarida yang dapat dicerna (normal energy) : coupling sugar, palatinosa. Pemanis ini meningkatkan level gula darah dan menstimulir sekresi insulin. Baik untuk anak-anak karena aman untuk gigi, tapi mengandung tinggi energi.
- b. Mono- atau oligosakarida yang menghasilkan energi yang lebih rendah (tidak dicerna atau sedikit diserap): neosugar , sorbitol, erythritol, maltitol, laktitol dan palatinin.

Serat Makanan (Dietary Fiber)

Serat makanan adalah polisakarida tanaman yang tahan hidrolisis enzim pencernaan, sedangkan serat kasar adalah bagian dari makanan yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam sulfat encer-panas (H_2SO_4 1.25%) dan natrium hidroksida encer-panas (NaOH 1.25%). Oleh karena itu kadar serat kasar nilainya lebih rendah dibandingkan serat makanan, karena kemampuan senyawa kimia tersebut menghidrolisis komponen makanan lebih kuat dibandingkan enzim pencernaan. Serat kasar sekitar 1/5 bagian dari serat makanan. Yang termasuk serat makanan yaitu :

- materi dinding sel tanaman : selulosa, hemiselulosa, substansi pektat dan lignin
- mucilages, gum, polisakarida alga , polisakarida sintetik

Efek positif serat makanan bagi kesehatan antara lain mencegah konstipasi, obesitas, hiperkolesterolemia (aterosklerosis, batu empedu), diabetes melitus dan kanker kolon. Namun jika dikonsumsi berlebihan serat makanan dapat mengakibatkan diare dan flatulensi. Berdasarkan kelarutannya, serat makanan dibagi ke dalam 2 kelompok yaitu SDF (*water soluble*) dan IDF (*water insoluble*).

SDF dapat difermentasi oleh bakteri usus menghasilkan gas hidrogen, metan dan CO_2 , serta SCFA. SCFA diserap usus dan menghasilkan energi (2 kkal/g serat (kisaran: 0 – 3 kkal/g serat). Macam SCFA yang dihasilkan : asam format, asetat, asam butirat, asam propionat. SCFA penting bagi kesehatan usus karena merupakan sumber energi utama bagi sel kolon, memiliki efek terhadap penurunan kadar kolesterol darah, serta fungsi lainnya

Tabel 13.2. Perbedaan antara serat larut air dan serat tidak larut air

Larut air (SDF)	Tidak larut air (IDF)
Pektin, gum, dan mucilage	Selulosa, hemiselulosa dan lignin (penyusun dinding sel tanaman)
Tidak termasuk serat kasar	Termasuk serat kasar
Berperan utama dalam menurunkan kolesterol darah dan konstipasi (sulit buang air besar)	Kontribusi terhadap volume feses dan waktu transit di usus → mencegah konstipasi dan hemoroid (wasir)
Umumnya dapat difermentasi oleh bakteri usus	Umumnya tidak dapat difermentasi oleh bakteri usus
Sumber : buah, sayur, oat bran, barley, flaxseed, psyllium, kacang-kacangan, susu kedelai dan produk kedelai	Sumber : wheat bran, corn bran, rice bran, kulit buah dan sayur, biji-bijian.

Fungsi Fisiologis Serat Makanan

Serat makanan berpengaruh terhadap kecepatan dan efektifitas penyerapan zat gizi :

- Adanya efek barier/penghalang dari serat makanan sehingga enzim-enzim hidrolitik (amilase) tidak dapat kontak dengan substrat
- Serat makanan dapat mengikat dan menyerap air, enzim-enzim, kation dan mikronutrien anorganik sehingga tidak dapat dicerna/diserap
- Beberapa serat makanan dapat menahan reabsorpsi garam empedu
- Serat makanan mempengaruhi kecepatan pengosongan lambung dan waktu transit di intestin
 - SDF menurunkan kecepatan pengosongan lambung dan meningkatkan waktu transit di intestin.
 - IDF menurunkan waktu transit intestin, meningkatkan berat dan volume feses, meningkatkan frekuensi buang air besar (BAB), melunakkan feses.
- SDF meningkatkan viskositas di intestin mengakibatkan :
 - kecepatan transport nutrien menurun
 - akses nutrien thd permukaan mukosa berkurang
 - gerakan peristaltic terbatas sehingga kontak enzim-substrat dan pembentukan misel berkurang dan penyerapan diperlambat.

Efek Serat Makanan terhadap penyakit Diabetes Melitus

SDF dapat menurunkan kenaikan kadar gula darah yang abnormal setelah makan dan memperbaiki kerja insulin. Guar gum, pectin, polisakarida kedelai, baik untuk penderita diabetes. Mekanisme yang diduga adalah : (1) Adanya peningkatan viskositas di lambung maupun intestin menyebabkan penurunan jumlah karbohidrat yang dapat dicerna (barier terhadap enzim) dan gula sederhana yang dapat diserap (akses nutrien terhadap mukosa usus), (2) Serat makanan menyebabkan perubahan level hormon di saluran pencernaan, seperti Gastric inhibitory polipeptida (GIP), glukagon dan somatostatin yang berpengaruh pada motilitas saluran pencernaan, penyerapan zat gizi dan sekresi insulin, (3) Serat makanan membantu meningkatkan sensitivitas insulin, menstabilkan level gula darah sehingga melindungi komplikasi akibat diabetik

Efek Serat Makanan terhadap penyakit Hiperkolesterol (Aterosklerosis; Kardiovaskular; Batu Empedu)

Serat larut air (SDF) memiliki kemampuan hipokolesterolemik atau menurunkan kadar kolesterol darah, contohnya guar gum, pectin dan oat bran. Mekanismenya yang utama adalah kemampuan menahan reabsorpsi garam empedu dari usus ke dalam darah, sehingga garam empedu banyak yang diekskresi. Garam empedu disintesis dari kolesterol darah oleh hati. Kondisi ini semakin lama akan menurunkan kadar kolesterol darah. Mekanisme lainnya yaitu penurunan absorpsi lemak dan kolesterol, penurunan laju insulin serum sehingga menurunkan rangsangan sintesis kolesterol dan lipoprotein, penghambatan sintesis kolesterol oleh asam lemak rantai pendek yang dihasilkan dari fermentasi serat larut di dalam kolon.

Selain itu adanya peningkatan viscositas di lambung maupun intestin oleh SDF, dapat menjadi penghalang bagi kerja enzim pemecah lipid makanan. Defisien garam empedu dapat berakibat pembentukan misel lipid terhambat dan absorpsi lipid berkurang. Adanya kemampuan asam propionat (salah satu produk fermentasi SDF) menghambat sintesa kolesterol di hati

Kolesterol densitas rendah (LDL) yang tinggi dalam darah apabila teroksidasi dapat terakumulasi pada dinding pembuluh darah dan kemudian membentuk plak. Kondisi ini mengakibatkan penyempitan pembuluh darah (aterosklerosis), sehingga kerja jantung berat dan berakibat timbulnya PJK. Kadar kolesterol yang tinggi dalam darah berakibat pada ketidakseimbangan kecepatan perubahan kolesterol hati menjadi asam empedu. Hal ini menyebabkan penumpukan kolesterol sehingga terbentuk batu empedu.

Efek Serat Makanan terhadap Gangguan Gastrointestinal (konstipasi, irritable bowel syndrome (IBS), divertikulosis)

Divertikulosis merupakan gejala ketidaknormalan usus besar yang dicirikan oleh timbulnya benjolan mukosa dan luka-luka pada usus. Hal ini akibat feses yang kecil dan keras sehingga perlu tekanan yang besar untuk memompa feses keluar. Apabila serat makanan dikonsumsi dalam jumlah cukup, maka konsistensi feses berubah menjadi besar dan lunak karena kemampuan serat untuk menyerap air, sehingga waktu transit dikurangi.

Diet cukup serat memerlukan waktu transit rata-rata 33 jam; diet rendah serat bisa mencapai 70 jam. Sebagai contoh wheat bran digunakan untuk mengatasi konstipasi. Psyllium memiliki sifat laxative (pencabar).

Efek Serat Makanan terhadap Kanker Kolon

IDF melindungi perkembangan kanker kolon. Mekanisme yang diduga yaitu IDF meningkatkan volume feses sehingga mengencerkan konsentrasi senyawa karsinogen, dan menurunkan kesempatan senyawa karsinogen/ tumor-promoter berinteraksi dengan mukosa intestinal. IDF juga menurunkan waktu transit di intestinal sehingga membatasi lamanya kesempatan sel mukosa intestinal terekspos oleh karsinogen.

Enzim-enzim yang dihasilkan oleh bakteri fekal usus berperan mempromosi karsinogenesis (mengkonversi prokarsinogen menjadi karsinogen): β - glucuronidase, azoreductase, nitroreductase. Fermentasi serat oleh bakteri usus yang menguntungkan (BAL) mengakibatkan terjadinya penurunan pH dan menekan perkembangan kanker kolon.

Pati Resisten (Resistant Starch/RS)

Pati resisten (*resistant starch* atau RS) didefinisikan sebagai fraksi pati atau produk degradasi pati yang tidak terabsorpsi dalam usus halus individu yang sehat, karena masih diperoleh setelah melewati degradasi enzim secara sempurna. Sebutan pati resisten awalnya dikemukakan oleh untuk menjelaskan sejumlah kecil fraksi yang bersifat resisten terhadap perlakuan hidrolisis oleh enzim α -amilase lengkap dan pullulanase secara *in vitro*.

Seperti halnya serat pangan, pati resisten juga mengalami fermentasi oleh mikroflora pada dinding kolon, menghasilkan asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid* atau SCFA). Profil SCFA yang diperoleh dari RS lebih banyak mengandung butirir dan lebih sedikit mengandung asetat dibandingkan dengan serat pangan

konvensional. Dengan sifat-sifat yang dimilikinya, RS dikategorikan sebagai bagian dari serat pangan. Pati resisten memiliki efek fisiologis yang bermanfaat bagi kesehatan seperti pencegahan kanker kolon, memiliki efek hipoglikemik (menurunkan kadar gula darah setelah makan), berperan sebagai prebiotik, mengurangi resiko pembentukan batu empedu, memiliki efek hipokolesterolemik, menghambat akumulasi lemak dan meningkatkan absorpsi mineral.

Pati resisten dibagi menjadi empat golongan yaitu RS_1 , RS_2 , RS_3 , dan RS_4 . RS_1 merupakan pati yang resisten secara fisik karena enkapsulasi dalam matriks alaminya seperti dalam biji-bijian yang tidak digiling sempurna. RS_2 merupakan pati dengan bentuk granular tertentu dan secara alami lebih resisten terhadap pencernaan enzim, seperti yang ditemukan pada pisang yang belum matang dan pada pati kentang mentah. RS_3 merupakan fraksi pati yang paling resisten, terutama berupa amilosa teretrogradasi yang terbentuk selama pendinginan pati tergelatinisasi. RS_3 benar-benar resisten terhadap pencernaan oleh amilase pankreas. RS_4 adalah pati resisten yang memiliki ikatan kimia baru selain α -(1-4) dan β -(1-6) akibat perlakuan kimia seperti dengan garam trimetaphosfat yang membentuk jembatan ester fosfat di antara dua molekul pati.

Metode Evaluasi Nilai Biologis Karbohidrat

Daya Cerna Pati/ Sumber Karbohidrat secara *in vitro*

Dalam metode ini pati atau sumber karbohidrat dihidrolisis oleh enzim alfa amilase pada suhu 37°C dan pH 7.0 selama 30 menit menyerupai kondisi dalam tubuh. Maltosa hasil hidrolisis pati kemudian diukur jumlahnya menggunakan spektrofotometer setelah direaksikan dengan asam dinitrosalisilat sehingga dapat diukur pada 520 nm. Kadar maltosa diukur dengan menggunakan kurva standar maltosa murni. Semakin banyak maltosa yang dihasilkan menunjukkan semakin banyak pati yang dapat dihidrolisis, atau dengan kata lain daya cernanya tinggi. Daya cerna pati/sumber karbohidrat dihitung sebagai persentase relatif terhadap pati murni.

Aktivitas Antiamilase dari Suatu Sumber Karbohidrat

Dalam metode ini aktivitas anti-amilase ditetapkan berdasarkan daya penghambatan terhadap aktivitas enzim alfa-amilase dalam menghidrolisis pati. Mula-mula dilakukan inkubasi enzim alfa-amilase bersama-sama dengan ekstrak yang akan diuji (mengandung antiamilase). Setelah itu aktivitas enzim amilase diukur dengan cara mengukur kemampuan hidrolisis suspensi pati murni. Semakin rendah jumlah maltosa yang terbentuk dari hidrolisis pati, berarti semakin tinggi aktivitas antiamilase ekstrak uji.

Analisis Kadar Oligosakarida

Oligosakarida diekstrak dari tepung sampel dengan menggunakan etanol 70%, kemudian dielusi menggunakan kromatografi kertas. Penentuan secara kuantitatif dilakukan dengan membuat kurva standar dari oligosakarida standar.

Indeks Glikemik (IG)

Indeks glikemik (IG) pangan merupakan tingkatan pangan menurut efeknya (immediate effect) terhadap kadar gula darah. Pangan dengan IG tinggi dapat

menaikkan gula darah dengan cepat, dan sebaliknya pangan dengan IG rendah akan lambat menaikkan gula darah. Sebagai pembanding adalah IG glukosa murni (nilai 100). Nilai IG suatu sumber karbohidrat sangat berguna bagi para penderita diabetes.

Penghitungan Indeks glikemik dilakukan dengan menghitung rasio antara luas kurva respon glukosa makanan yang mengandung karbohidrat total setara 50 gram gula terhadap luas kurva respon glukosa setelah memakan 50 gram glukosa murni, pada orang yang sama di hari yang berbeda. Pengambilan sampel darah untuk pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada beberapa titik setelah puasa 10 jam yaitu menit ke-0, 30, 60, 90, dan 120 setelah mengkonsumsi karbohidrat yang diuji. Pada waktu yang berbeda dilakukan hal yang sama, tetapi karbohidrat yang dimakan adalah glukosa murni.

Bahan pangan termasuk kelompok yang memiliki IG rendah, sedang dan tinggi jika nilai IG-nya berturut-turut adalah kurang dari 55, 55-69, dan lebih dari 70.

Pengukuran Kadar Serat Makanan (*Dietary Fiber*)

Salah satu metode yang sering digunakan dengan metode enzimatik-gravimetrik. Enzim yang digunakan adalah enzim-enzim tahan panas α -amilase, protease dan amiloglukosidase. Setelah inkubasi oleh enzim, residu yang tidak terhidrolisis (berisi serat makanan) dipisahkan dengan menggunakan etanol untuk melarutkan gula-gula. Setelah disaring dan dicuci dengan etanol dan aseton, residu hasil saringan dikeringkan dan ditimbang beratnya (sebagai berat total serat makanan atau TDF). Untuk menghitung SDF (serat larut air) dan IDF (serat tidak larut air), dilakukan inkubasi dengan enzim-enzim yang sama. Akan tetapi setelah selesai inkubasi oleh enzim tersebut, dilakukan penyaringan dengan crucible yang mengandung celite. Residu penyaringan dicuci dengan etanol dan aseton, dan setelah kering ditimbang sebagai IDF. Sedangkan filtrat hasil penyaringan ditambah etanol untuk melarutkan gula. Selanjutnya disaring untuk mendapatkan residu yang berisi SDF.

Pengukuran kadar pati resisten

Prinsipnya pati sesiten adalah pati yang tidak terhidrolisis oleh α -amilase. Pengukuran pati resisten dilakukan dengan terlebih dahulu menghilangkan pati yang dapat dicerna dengan menggunakan α -amilase pankreas (amiloglukosidase ditambahkan jika diperkirakan produk digesti dapat menghambat enzim). Kadangkala dilakukan pula proteolisis menggunakan pepsin dan tripsin agar menyerupai kondisi di lambung dan usus halus. Pati resisten dapat dihitung langsung pada residu, atau dengan menggunakan selisih antara kadar pati total dan pati yang tercerna yang keduanya dikerjakan terpisah.

Prosedur yang lebih baru dan lebih sederhana adalah hanya menggunakan enzim α -amilase (dengan atau tanpa penambahan amiloglukosidase). Setelah dihidrolisis enzimatis, gula hasil hidrolisis diekstrak dengan etanol 80% dan dibuang. Residu (berisi pati resisten) dilarutkan dengan 2 N KOH dan dihidrolisis dengan amiloglukosidase. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar gula hasil hidrolisis.

B. LEMAK

Lemak merupakan sumber energi yang besar, mensuplai sekitar 9 kalori per gram, dibandingkan dengan 4 kalori per gram dari protein dan karbohidrat.

Meskipun lemak merupakan pensuplai energi, namun energi dapat pula diperoleh dari karbohidrat dan protein. Monomer lemak antara lain adalah asam-asam lemak.

Asam lemak (Fatty Acid)

Ada 3 kelas berdasarkan ketidakjenuhannya atau jumlah ikatan rangkapnya :

- Saturated Fatty Acid (SFA) atau asam lemak jenuh – tanpa ikatan rangkap
- Mono Unsaturated Fatty Acid (MUFA) – memiliki 1 ikatan rangkap
- Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA) – memiliki 2-7 ikatan rangkap

Asam lemak esensial

Asam lemak esensial adalah asam lemak yang tidak dapat disintesis oleh tubuh sehingga diperlukan asupan dari luar (pangan/suplemen). Yang termasuk dalam asam lemak esensial adalah asam linoleat (LA) dan asam linolenat (LNA). Asam-asam lemak tidak jenuh tersebut disebut esensial karena diperlukan untuk mencegah beberapa abnormalitas pada kulit serta dalam pertumbuhan dan reproduksi. Asam lemak esensial diperlukan untuk memelihara permeabilitas dan fragilitas kapiler yang normal pada tikus. Pengurangan asam lemak esensial dalam ransum menyebabkan perubahan morfologis dan metabolis pada banyak organ dari berbagai jenis hewan.

Minyak jagung, minyak biji bunga matahari dan minyak biji kapas kaya akan asam linoleat. Minyak kedelai, flaxseed oil, dan canola oil kaya akan asam linolenat. Asam linoleat termasuk omega-3, sedangkan asam linolenat termasuk omega 6. Kandungan LNA dari ASI ibu vegetarian 2 kali lebih banyak dibandingkan ibu nonvegetarian

Asam lemak omega

Asam lemak omega adalah asam lemak tidak jenuh atau asam lemak yang memiliki ikatan rangkap. Simbol omega ω , kadangkala diganti dengan simbol 'N'. Berdasarkan posisi ikatan rangkap pertama yang dihitung dari ujung metil ($-\text{CH}_3$), maka asam lemak omega dikelompokkan menjadi :

- asam lemak omega 3, jika ikatan rangkap berada pada atom C no.3 dari ujung metil
- asam lemak omega 6, jika ikatan rangkap berada pada atom C no.6 dari ujung metil
- asam lemak omega 3, jika ikatan rangkap berada pada atom C no.9 dari ujung metil

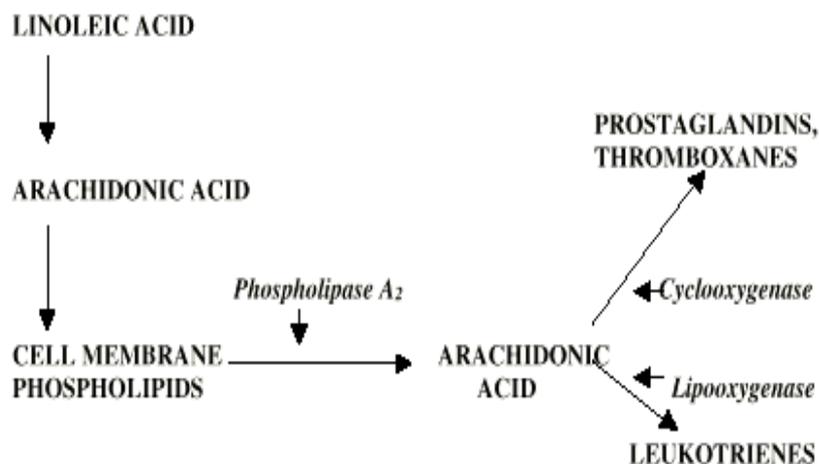
DHA dan EPA (omega 3)

Health Claims :

FDA menyetujui health claims EPA dan DHA terhadap resiko CHD (coronary heart disease)

- Ikan laut dan produk perikanan : herring, mackerel, salmon, trout, minyak ikan dan minyak hati ikan cod. Berasal dari phytoplankton dan algae.
- Kandungan DHA ibu vegetarian hanya $\frac{1}{2}$ dari ibu nonvegetarian

- Dapat dibentuk dari LNA, meski lambat dan sedikit. Konversi LNA ke DHA dan EPA hanya 5%
- Konsumsi EPA menurunkan eikosanoid dari ARA, dimana eikosanoid yang dihasilkan ARA umumnya memberi efek buruk pada kelancaran aliran darah.
- Pengaruh konsumsi EPA dan DHA dari ikan atau minyak ikan terhadap eikosanoid yang dihasilkan : :
- menurunkan produksi prostaglandin E2 (PGE2) metabolites
- penurunan tromboksan A2 (TXA2), suatu agregator platelet dan vasokonstriktor (menyempitkan pembuluh darah).
- Penurunan pembentukan leukotriene B4, suatu penginduksi reaksi inflamasi, menginduksi kemotaksis leukosit dan pelekatan
- Peningkatan prostasiklin (PGI3), suatu vasodilator (melebarkan pembuluh darah) yang aktif dan penghambat agregasi platelet.



Gambar 13.1. Metabolisme asam arahidonat menghasilkan berbagai eikosanoid

Asam lemak trans

Asam lemak trans dibentuk jika minyak nabati dihidrogenasi untuk mengubahnya dari cair menjadi semi padat agar lebih menyerupai lemak hewani sehingga penerimaan konsumen meningkat dan juga untuk menurunkan kerentanan teroksidasi. Asam elaidat, asam lemak trans C18 dengan satu ikatan rangkap pada C9 (9 trans-18:1), dan isomernya merupakan asam lemak trans terbanyak pada produk pangan.

Asam lemak trans dilaporkan memberi efek negatif pada lipoprotein plasma, yaitu meningkatkan kolesterol LDL, menurunkan kolesterol HDL, dan meningkatkan lipoprotein(a). Lipoprotein(a) adalah partikel seperti LDL dengan tambahan apolipoprotein(a) yang menempel. Peningkatan konsentrasi Lp(a) (>30 mg/dL untuk partikel total atau > 10 mg/dL untuk kolesterol Lp(a) erat kaitannya dengan PJK dini.

Lp(a) berperan dalam lisis clot, juga dapat dideposit dalam dinding arteri seperti halnya LDL.

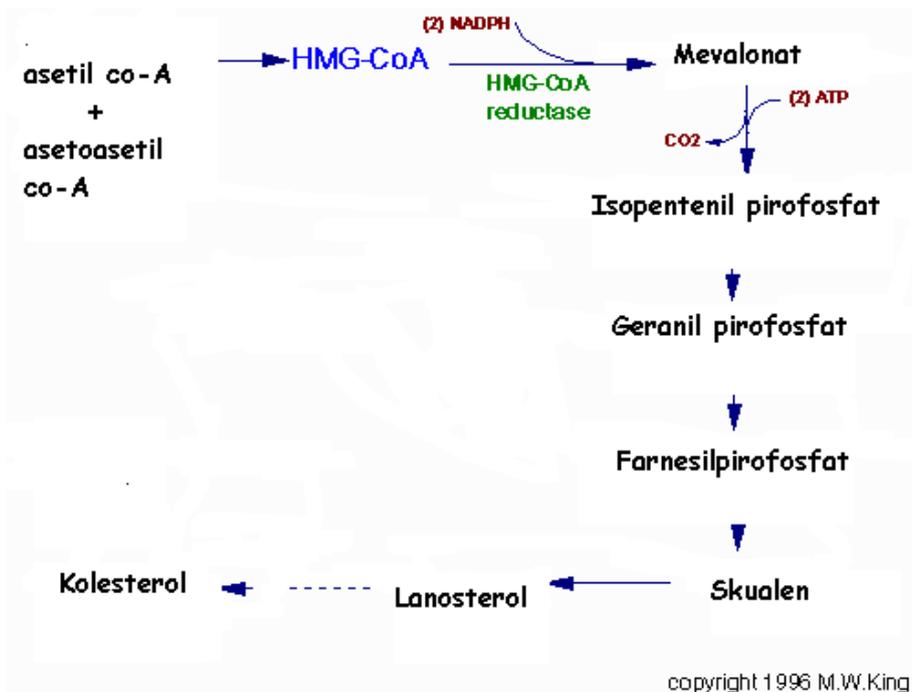
Beberapa hal yang menjadi bahan pertimbangan dalam mengevaluasi nilai biologis lemak suatu bahan pangan, antara lain:

1. kandungan asam lemak esensial yang dapat dimanfaatkan tubuh
2. potensinya memperbaiki profil lipid darah
3. potensi aterogeniknya (pemicu terjadinya aterosklerosis)

Kolesterol

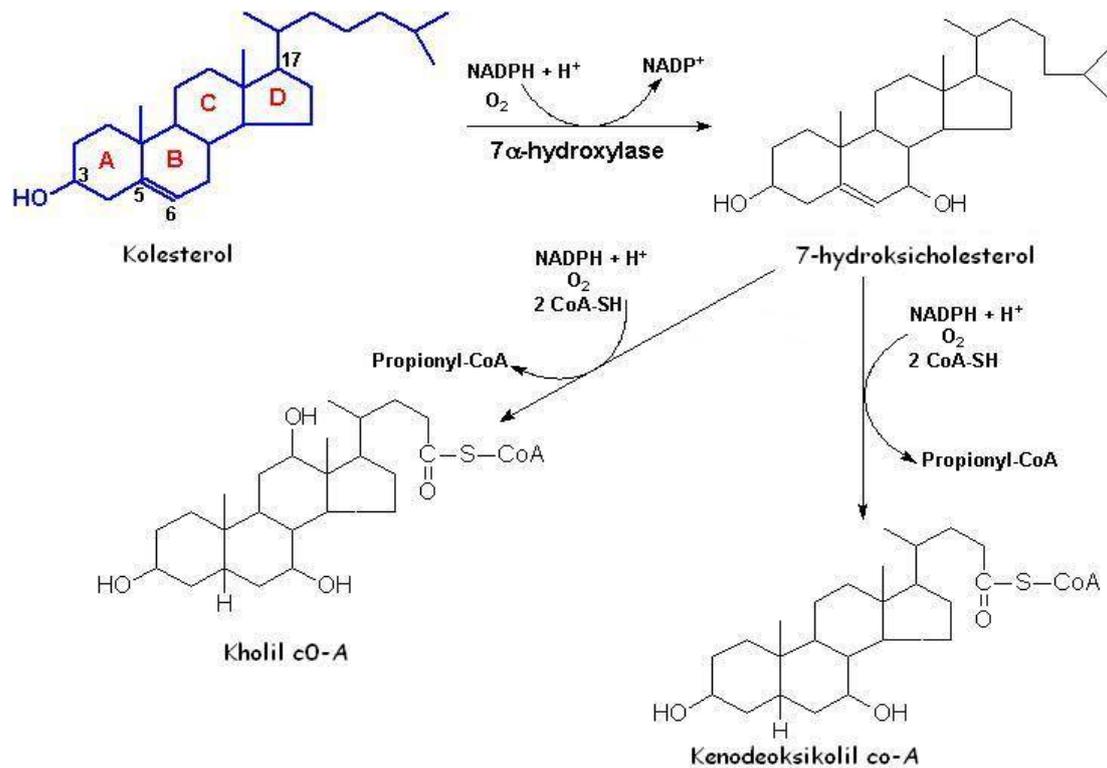
Kolesterol di dalam tubuh manusia dapat berasal dari dua sumber yaitu dari makanan dan biosintesis *de novo*. Kolesterol yang bersumber dari makanan berasal dari bahan pangan hewani. Biosintesis *de novo* kolesterol terjadi hampir pada semua sel yang mengandung nukleus, tetapi yang terbesar terjadi pada hati, usus, korteks adrenal dan jaringan reproduktif. Jumlah laju sintesis kolesterol *de novo* berhubungan dengan jumlah kolesterol yang berasal dari makanan, jika jumlah kolesterol di dalam makanan meningkat maka sintesis kolesterol dalam hati dan usus akan menurun, sebaliknya jika jumlah kolesterol dari makanan berkurang maka sintesis kolesterol di dalam hati dan usus akan meningkat. Kolesterol diperlukan oleh tubuh antara lain untuk: (a) sintesis asam/garam empedu yang diperlukan untuk proses pencernaan lemak atau minyak, (b) sintesis vitamin D dan hormon steroid, (c) sebagai komponen membran sel.

Orang dewasa rata-rata membutuhkan 1.1 gram kolesterol untuk kebutuhan tubuhnya. Dari jumlah itu, 25-40% atau 200-300 mg secara normal berasal dari makanan dan selebihnya dari endogen (biosintesis) terutama oleh hati kemudian oleh usus kecil. Kadar kolesterol normal dalam plasma pada orang dewasa normal sebesar 3.1 sampai 5.7 mmol/l (120-220 mg/dl). Biasanya kadar kolesterol yang melebihi batas ini dianggap sebagai hiperkolesterolemia.



Gambar 13.2. Biosintesis kolesterol
(<http://www.web.indstate.edu/theme/mwking/cholesterol.html>)

Sintesis asam empedu merupakan salah satu mekanisme ekskresi kolesterol tubuh. Asam empedu yang paling banyak terdapat dalam cairan empedu manusia adalah asam kenodeoksikolat (45%) dan asam kolat (31%). Keduanya disebut sebagai asam empedu primer. Pada Gambar 13.3 dapat dilihat sintesis asam empedu primer dari kolesterol terjadi di dalam hati. Di dalam usus, asam empedu primer dikonversi oleh bakteri menjadi asam empedu sekunder yaitu asam kolat menjadi asam deoksikolat dan asam kenodeoksikolat menjadi asam litokolat. Asam empedu primer maupun sekunder keduanya direabsorpsi oleh usus dan kembali ke hati melalui siklus enterohepatik.



Gambar 13.3. Sintesis asam empedu primer (asam kolat dan asam kenodeoksikolat)

(<http://www.web.indstate.edu/theme/mwking/cholesterol.html>)

Apabila reabsorpsi asam empedu dihambat, misalnya oleh serat makanan, maka jumlah asam empedu yang kembali ke hati menjadi lebih rendah. Hal ini berakibat pada peningkatan sintesis asam empedu untuk memenuhi kebutuhan tubuh. Oleh karena asam empedu disintesis oleh kolesterol, maka peningkatan sintesis asam empedu mengakibatkan penurunan kadar kolesterol darah.

Kolesterol yang terkandung di dalam hati akan diangkut ke seluruh tubuh melalui jalur endogen. Lipoprotein yang berperan dalam pengangkutan tersebut terdiri atas lipoprotein berdensitas sangat rendah (VLDL), lipoprotein berdensitas rendah (LDL), lipoprotein berdensitas tinggi (HDL). Diantara ketiganya, LDL dianggap sebagai lipoprotein yang paling aterogenik karena peningkatan kadar LDL akan meningkatkan resiko aterosklerosis yang dapat menyebabkan penyakit jantung koroner (PJK). Sebaliknya kadar HDL berkorelasi negatif dengan resiko terkena PJK. Oleh sebab itu distribusi kolesterol dalam lipoprotein perlu diketahui karena kadar total kolesterol (TK) yang tinggi belum tentu aterogenik bila diimbangi dengan peningkatan kadar HDL.

Hiperkolesterolemia merupakan suatu kondisi dimana kolesterol dalam darah meningkat melebihi ambang batas normal yang ditandai dengan meningkatnya kadar

LDL dan total kolesterol. Konsentrasi kolesterol yang diinginkan untuk menurunkan resiko terjadinya aterosklerosis pada manusia adalah TK < 200 mg/dL, LDL < 130 mg/dL, serta HDL 50-60 mg/dL. Kisaran kadar TK 200-239 mg/dL dan LDL 130-159 mg/dL adalah batas antara keadaan beresiko rendah dan tinggi untuk terbentuknya aterosklerosis. Rasio kadar LDL/HDL merupakan indikator resiko aterosklerosis, yaitu beresiko tinggi terkena PJK jika ≥ 5 pada pria dan ≥ 4.4 pada wanita.

Fitosterol

Cukup banyak fitokimia yang berperan menghambat reabsorpsi asam empedu sekaligus juga menghambat absorpsi kolesterol. Hal ini karena asam empedu berguna untuk emulsifikasi lipid sehingga jika terikat maka lipid, termasuk kolesterol, menjadi tidak tercerna oleh enzim pencernaan. Untuk membedakan mekanisme yang terjadi dapat dilakukan melalui uji pengikatan asam empedu secara *in vitro*. Beberapa bahan kimia yang diindikasikan memiliki potensi hipokolesterolemik tersebut antara lain fitosterol, saponin, flavonoid, tanin, dan serat pangan yang larut air (SDF).

Fitosterol merupakan sterol yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan. Mekanisme fitosterol dalam menurunkan kolesterol darah yaitu dengan menurunkan kelarutan kolesterol dalam fase minyak, dan menahan reabsorpsi asam empedu. Sitostanol lebih efisien dalam mengurangi penyerapan kolesterol dari pada sitosterol. Sebanyak 1.5 g/hari sitostanol meningkatkan ekskresi feses dan asam steroid lebih efisien (88%) dibandingkan dengan sitosterol sebanyak 6 g/hari (45%). Ester sitostanol pada level 2-3 g/hari dapat mengurangi LDL kolesterol sebesar 10-15%.

Peran Lipoprotein dalam Aterogenesis

Aterogenesis merupakan kelanjutan dari kondisi hiperkolesterolemia. Pengambilan kolesterol LDL oleh reseptor LDL secara normal tidak menyebabkan aterosklerosis meskipun dilakukan oleh reseptor LDL pada sel makrofag. Reseptor LDL merupakan regulator keseimbangan profil kolesterol dalam plasma. Ketika sel makrofag membutuhkan kolesterol untuk pembentukan membran sel, sel mensintesis reseptor LDL. Pengikatan LDL oleh reseptornya mengakibatkan endositosis sehingga LDL masuk ke dalam sel. LDL kemudian didegradasi dalam lisosom. Kolesterol ester (EC) dari LDL dihidrolisis menjadi kolesterol bebas (FC) dan dilepaskan ke sitoplasma untuk sintesis membran sel. Bila kolesterol yang dibutuhkan sudah cukup, kolesterol bebas menekan aktivitas enzim HMG co-A reduktase sehingga sintesis kolesterol menurun, dan tidak mengakibatkan akumulasi kolesterol ester pada makrofag.

Proses pengambilan kolesterol seperti di atas akan berbeda apabila LDL teroksidasi, baik oleh ROS atau senyawa kimia seperti asetil. LDL teroksidasi dapat dikenali oleh reseptor scavenger pada sel makrofag sehingga dapat masuk ke dalam sel. Berbeda dengan reseptor LDL, reseptor ini jumlahnya tetap konstan meskipun makrofag telah mengakumulasi sejumlah besar kolesterol, atau dengan kata lain tidak ada mekanisme regulasi. Akibatnya, akumulasi kolesterol dalam sel makrofag yang berlanjut akan membentuk sel busa.

Oksidasi LDL diawali dengan abstraksi H dari ikatan rangkap asam lemak tidak jenuh ganda (ALTJ) dari LDL. Selanjutnya akan terjadi pengaturan molekular yang menyebabkan pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi yang merupakan dien terkonjugasi. Pada tahap awal terjadi laju oksidasi yang tergantung antioksidan endogen. Fase ini merupakan fase lag dari oksidasi. Karena itu panjangnya masa lag menunjukkan banyaknya antioksidan dalam sistem tersebut. Fase lag kemudian diikuti dengan fase propagasi yang terjadi setelah penurunan jumlah antioksidan endogen. Pada fase propagasi terjadi peningkatan abstraksi H dari ALTJ, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi diena terkonjugasi. Fase propagasi kemudian diikuti dengan fase dekomposisi. Pada fase terakhir ini terbentuk aldehid seperti malondialdehid (MDA), 4 hidroksinonenal (HNE), dan heksanal. Pencegahan

pembentukan sel busa dapat dilakukan dengan meningkatkan status antioksidan tubuh.

Proses aterosklerosis dapat ditekan, dihentikan, atau bahkan dibalikkan/regresi oleh kolesterol HDL. Hal ini antara lain karena HDL berperan dalam aktivasi reverse cholesterol transport dan aktivitas antioksidan. Dalam hal aktivasi reverse cholesterol transport, HDL mempunyai efek: meningkatkan mobilisasi/ penarikan kolesterol dari sel, menekan pertumbuhan plak aterosklerosis yang baru, stabilisasi plak aterosklerosis, dan menurunkan kemungkinan ruptur dari plak. Adapun aktivitas antioksidan HDL adalah: menurunkan oksidasi LDL (jumlah ox-LDL menurun), menekan ekspresi VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) dan MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*), dan menjaga integritas endotel. Keuntungan aspek molekuler lainnya adalah antiagregasi platelet, antifibrinogenesis, antiinflamasi dan antiapoptosis.

Metode Evaluasi Nilai Biologis Lemak

Parameter yang digunakan untuk mengevaluasi nilai biologis lemak, antara lain:

1. Bilangan peroksida
2. Bilangan TBA
3. Bilangan iod
4. Kadar asam lemak trans dan asam lemak esensial
5. Profil lipid darah (total kolesterol, trigliserida, HDL, LDL)
6. Kadar TBARS → menunjukkan tingkat oksidasi lemak
7. Pengujian daya hipokolesterolemik in vitro
8. Pengujian kapasitas pengikatan asam empedu atau kolesterol in vitro
9. Kadar asam empedu sekum

Bilangan iod

Bilangan iod menggambarkan derajat ketidakjenuhan lemak/minyak. Asam-asam lemak tidak jenuh pada minyak/lemak mempunyai kemampuan mengabsorpsi sejumlah iod, terutama bila dibantu dengan suatu 'carrier' seperti iodin klorida atau iodin bromida, membentuk suatu senyawa yang jenuh. Jumlah iod yang diabsorpsi menunjukkan ketidak-jenuhan lemak/minyak.

Ke dalam sejumlah sampel minyak/lemak ditambahkan iod berlebih. Kelebihan iod dititrasi dengan natrium tiosulfat sehingga iod yang diabsorpsi oleh minyak/lemak dapat diketahui jumlahnya. Bilangan iod didefinisikan sebagai jumlah gram iod yang diserap oleh 100 gram minyak/lemak.

Bilangan Peroksida

Penentuan bilangan peroksida biasanya didasarkan pada pengukuran sejumlah iod yang dibebaskan dari kalium iodida melalui reaksi oksidasi oleh peroksida pada suhu ruang di dalam medium asam asetat/kloroform

Bilangan TBA

Asam 2-tiobarbiturat (TBA) bereaksi dengan malonaldehid membentuk warna merah. Malonaldehid adalah produk degradasi lipid teroksidasi

Kadar asam lemak trans dan asam lemak esensial

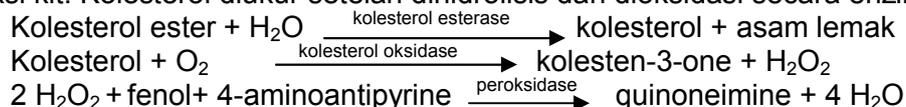
Pengukuran kadar keduanya dapat dilakukan dengan metode HPLC

Profil lipid darah

Lipid darah meliputi kadar trigliserida (TG), kadar total kolesterol (TK), kadar HDL dan kadar LDL. Kadar TG, TK dan HDL pada plasma/serum dapat diukur dengan menggunakan kit reagen komersial. Kit komersial berisi sejumlah enzim-enzim spesifik yang mengubah substrat menjadi kromofor, sehingga kadarnya dapat diukur dengan spektrofotometri.

Analisis Kadar Total Kolesterol (TK)

Kadar kolesterol total diukur dengan metode CHOD-PAP dan menggunakan pereaksi kit. Kolesterol diukur setelah dihidrolisis dan dioksidasi secara enzimatik.



Prosedur analisis yaitu sampel atau standar diambil sebanyak 100 µl dan dicampurkan dengan 1000 µl pereaksi kit (mengandung kolesterol esterase, kolesterol oksidase, fenol, 4-aminoantipyrine, peroksidase dan bufer) kemudian dimasukkan ke dalam tabung lalu dicampurkan sampai homogen. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, dan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Perhitungan kadar kolesterol total dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar kolesterol (mg/dl)}: \frac{[\text{absorbansi sampel}]}{[\text{absorbansi standar}]} \times 200 \text{ mg/dl}$$

Analisis Kadar HDL

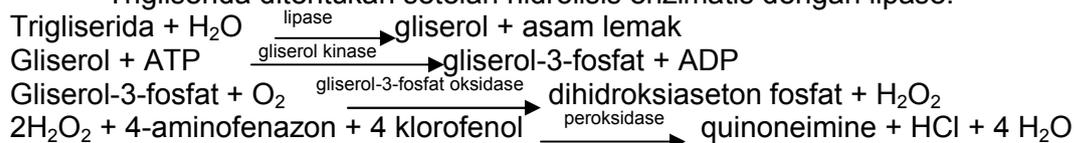
Pengukuran HDL dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan presipitasi terhadap lipoprotein densitas rendah (LDL dan VLDL) dan kilomikron. Presipitasi dilakukan dengan penambahan asam fosfotungstat dan kehadiran ion magnesium (MgCl₂). Setelah sentrifugasi, HDL dalam supernatan diukur menggunakan pereaksi kit yang sama dengan pengukuran total kolesterol (CHOD-PAP).

Prosedur presipitasi adalah sbb : sebanyak 200 µl serum darah dicampurkan dengan 500 µl pereaksi presipitasi yang telah diencerkan dengan akuabides (rasio 4+1), kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah sentrifugasi pada 1074g (4000 rpm) selama 10 menit, dihasilkan supernatan yang siap untuk dianalisis sama seperti analisis total kolesterol di atas.

$$\text{Kadar HDL (mg/dl)}: \frac{[\text{absorbansi sampel}]}{[\text{absorbansi standar}]} \times 200 \text{ mg/dl}$$

Analisis Kadar Trigliserida (TG)

Trigliserida ditentukan setelah hidrolisis enzimatik dengan lipase.



Sampel atau standar diambil sebanyak 10 µl dan dicampurkan dengan 1000 µl pereaksi kit, kemudian dimasukkan ke dalam tabung lalu dicampurkan sampai homogen. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit, dan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Perhitungan kadar trigliserida dilakukan dengan menggunakan rumus :

Kadar trigliserida (mg/dl): $\frac{[\text{absorbansi sampel}] \times 200 \text{ mg/dl}}{[\text{absorbansi standar}]}$

Perhitungan Kadar LDL

Teknik yang paling banyak digunakan oleh lab klinik untuk mengukur kadar LDL pasien yaitu dengan menggunakan formula Friedewald sebagai berikut :

$$\text{Kadar LDL} = \text{Total kolesterol} - \text{HDL} - \text{TG}/5$$

Diasumsikan bahwa TG/5 merupakan kadar VLDL

Perhitungan Indeks Aterogenik (IA)

Indeks aterogenik mengindikasikan besarnya potensi terjadinya aterosklerosis.

$$\text{Rumus Indeks Aterogenik (IA)} = \frac{\text{Total kolesterol} - \text{HDL}}{\text{HDL}}$$

Pengujian Daya Hipokolesterolemik Secara *in vivo*

Sebelum diperlakukan, hewan percobaan dibuat hiperkolesterolemia terlebih dahulu dengan cara pemberian kolesterol dalam ransum dan dicekok PTU (Propil Tiourasil) sebanyak 2 mg/kg BB/hari. Kondisi hiperkolesterolemia juga dapat dicapai dengan pemberian asam kolat atau turunannya di dalam ransum bersamaan dengan kolesterol (tanpa PTU). Pemantauan kadar kolesterol serum dilakukan dengan mengambil sampel darah dari ujung ekor tikus. Setelah kondisi hiperkolesterolemia tercapai, hewan percobaan dikelompokkan untuk diberi perlakuan.

Pemberian perlakuan (sampel uji) dilakukan hingga kadar kolesterol serum salah satu kelompok mencapai nilai seperti semula atau normal yaitu sekitar 60-70 mg/dL. Sebagai kelompok kontrol positif adalah kelompok hiperkolesterolemia yang tidak diberi sampel uji. Di akhir perlakuan, tikus dieutanasi untuk dianalisis profil lipida darahnya menggunakan kit, yang meliputi kadar total kolesterol (TK), *High Density Lipoprotein* (HDL), dan trigliserida (TG), serta penghitungan *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan indeks aterogenik (IA).

Pengujian daya hipokolesterolemik juga dapat dilakukan tanpa membuat kondisi hiperkolesterolemia terlebih dahulu. Model pengujian seperti ini digunakan untuk mengevaluasi kemampuan hipokolesterolemik melalui kemampuan menahan penyerapan kolesterol. Dalam model ini, sampel uji diberikan bersamaan dengan pemberian kolesterol, kemudian dilakukan pengukuran kadar lipid darah selama perlakuan.

Pengujian Kapasitas Pengikatan Asam Empedu atau Kolesterol Secara *in vitro*

Untuk melihat adanya kapasitas pengikatan asam empedu atau kolesterol, maka sampel uji diinkubasi bersamaan dengan sejumlah asam empedu atau kolesterol. Selama inkubasi dilakukan penambahan enzim-enzim pencernaan (pepsin, tripsin, pankreatin dan lipase) sehingga menyerupai kondisi pencernaan. Di akhir proses inkubasi, dilakukan sentrifugasi dan selanjutnya pengukuran kadar asam empedu atau kolesterol pada bagian supernatan. Rendahnya kadar asam empedu atau kolesterol pada supernatan menunjukkan kemampuan sampel uji mengikat asam empedu atau kolesterol. Kadar asam empedu atau kolesterol dapat diukur dengan menggunakan kit pereaksi. Sebagai kontrol untuk dapat digunakan kolestiramin (pengikat asam empedu) dan serat oat (pengikat kolesterol).

Analisis Kadar Kolesterol dengan metode Liebermann-Buchards

Ke dalam tabung sentrifus 15 ml diisi 12 ml campuran alkohol-eter, kemudian dimasukkan 0.01 g sampel padat, diaduk perlahan sampai homogen. Tabung ditutup rapat dan dikocok kuat selama 1 menit dengan vortex. Tabung

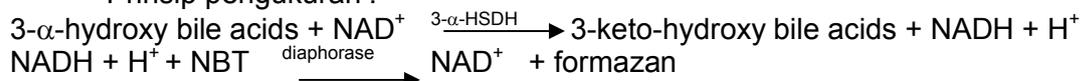
disentrifugasi selama 3 menit dan supernatannya dipindahkan ke dalam gelas piala ukuran 50 ml lalu diuapkan di atas penangas mendidih hingga kering.

Residu kering ditambahkan kloroform 2-2,5 ml dan dikocok perlahan agar larut. Ekstrak dipindahkan secara kuantitatif dan ditepatkan menjadi 5 ml dengan kloroform. Kemudian ditambahkan 2 ml asetat anhidrida dan 0.1 ml asam sulfat pekat, dan dikocok. Tabung disimpan di ruang gelap selama 15 menit dan diukur absorbansinya pada 420 nm.

Analisis Kadar Asam Empedu Sekum (Bagian Awal Kolon)

Sebelum pengukuran, dilakukan preparasi sampel sebagai berikut. Sebanyak 0,2 g isi sekum dihomogenisasi dengan 2 ml KOH-etanol (0,5 mol/L) dan disonikasi 60-70°C selama 90 menit. Homogenat disentrifugasi pada 1074g (4000 rpm) selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan jernih. Kadar asam empedu supernatan diukur dengan menggunakan pereaksi kit *Bile Acids*.

Prinsip pengukuran :



Kit terdiri dari 2 pereaksi yaitu pereaksi untuk sampel yang berisi *3-α-hydroxysteroid dehydrogenase (3-α-HSDH)*, *diaphorase*, *NAD⁺* dan *NBT (nitroblue tetrazolium)* dan pereaksi untuk blanko yang berisi *diaphorase*, *NAD⁺* dan *NBT (nitroblue tetrazolium)*. Kit juga dilengkapi dengan larutan standar dengan 3 konsentrasi (5.0, 25 dan 100 μmol/L) untuk digunakan dalam kurva standar.

Prosedur :

	Blanko sampel	Sampel	Blanko standar	Standar
Sampel	200 μl	200 μl	-	-
Standar	-	-	200 μl	200 μl
Pereaksi sampel	-	500 μl	-	500 μl
Pereaksi blanko	500 μl	-	500 μl	-

Setelah tercampur dengan baik kemudian diinkubasi selama 20 menit pada 25°C atau 15 menit pada 37°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan *stop buffer* masing-masing 500 μl. Setelah dicampur, absorbansi diukur pada 540 nm. Kurva standar dibuat dengan memplotkan nilai selisih nilai absorbansi standar (A standar – A blanko standar) terhadap konsentrasi standar. Konsentrasi asam empedu sampel dihitung setelah memplotkan selisih nilai absorbansi sampel (A sampel – A blanko sampel) terhadap kurva standar.