

---

---

**PENGEMBANGAN PROSES SAPONIFIKASI DAN KONDISI REVERSED PHASE-HPLC-MWD PADA ANALISIS KOLESTEROL TELUR DARI METODE STANDAR AOAC 994.10:2012**

***The Development of Saponification Process and Reversed Phase-HPLC-MWD Condition for The Determination of Cholesterol Content Using Standard Method of AOAC 994.10:2012 in Chicken Egg***

**Didah Nur Faridah, Yulina Lailatul Maslukhah, Ririn Anggraeni dan Hanifah Nuryani Lioe**

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, PO Box 220 16002 Bogor, Jawa Barat, Indonesia  
e-mail: didah\_nf17@yahoo.com

Diterima: 2 Agustus 2019, Direvisi: 15 Oktober 2019, Disetujui: 17 Juli 2020

**Abstrak**

Penentuan komposisi fase gerak, efisiensi waktu analisis, kromatogram yang bagus dan kehandalan instrumen perlu dipertimbangkan sebelum pengembangan metode analisis kolesterol menggunakan *Reversed Phase-HPLC-Multiwavelength Detector* (MWD). Konsentrasi KOH dan waktu saponifikasi diketahui berpengaruh terhadap kadar kolesterol yang diperoleh. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengembangkan metode kondisi RP-HPLC-MWD sebelum digunakan untuk analisis kolesterol, menguji kehandalan instrumennya, serta mengembangkan metode analisis kolesterol dalam telur ayam broiler dengan mengkombinasikan konsentrasi KOH dan waktu saponifikasi, pada suhu 80°C. Kombinasi acetonitril:metanol sebagai fase gerak (80:20, 20:80, 10:90, 0:100 v/v) dengan laju alir 1.2 mL/menit dan fase gerak 0:100 dengan laju alir 1.0 dan 0.8 mL/menit pada  $\lambda = 200, 205, 210$  nm. Konsentrasi KOH dan waktu saponifikasi yang digunakan untuk pengembangan metode analisis kolesterol telur ayam yaitu 5 dan 10 % selama 15, 30, 45 menit. Kondisi RP-HPLC-MWD yang terpilih yaitu komposisi fase gerak metanol 100%, dengan laju alir fase gerak 1.0 mL/menit,  $\lambda = 205$  nm. Instrumen ini mempunyai linieritas yang bagus,  $R^2 = 0.9991$ . Limit deteksi dan kuantifikasi instrumen ini secara berurutan yaitu 5 dan 10  $\mu\text{g/mL}$ . Konsentrasi KOH sebesar 10% (b/v) dan waktu saponifikasi selama 15 menit menghasilkan kadar kolesterol tertinggi dengan presisi yang bagus.

**Kata kunci:** *detector multiwavelength*, kehandalan instrumen, kriteria kromatografi.

**Abstract**

*Determination of mobile phase composition, efficiency of time analysis, good characteristic of chromatogram, and performance instrument have to be considered before development of cholesterol analysis by Reversed Phase-HPLC-Multiwavelength detector (MWD). KOH concentration and saponification time significantly influenced in cholesterol content in food matrices. The aims of this research were to determine RP-HPLC-MWD condition, to evaluate the instrument performance, and to develop an cholesterol analytical method in chicken egg sample preparation by combining KOH concentration with saponification time, at 80°C. acetonitrile:methanol as mobile phase (80:20, 20:80, 10:90, 0:100 v/v) using 1.2 mL/min as flow-rate, and acetonitrile:methanol (0:100 v/v) using 1.0 and 0.8 mL/min as flow-rate at  $\lambda = 200, 205, 210$  nm were evaluated to obtain the best RP-HPLC-MWD condition. The development of cholesterol analytical method used KOH concentration at 5% and 10% (w/v) combined to 15, 30, 45 min of saponification time. The chosen RP-HPLC-MWD condition was 100% methanol as mobile phase, flow-rate at 1.0 mL/min, detection at 205 nm. This instrument have good linearity,  $R^2 = 0.9991$ . The detection and quantification limit of instrument were 5 and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The used of KOH concentration at 10 % (w/v) and 15 min saponification time obtained the highest cholesterol content in chicken egg with good precision.*

**Keywords:** *chromatography criteria, instrumental performance, multiwavelength detector.*

## 1. PENDAHULUAN

Telur merupakan salah satu pangan sumber kolesterol. Kadar kolesterol telur ayam bervariasi yaitu 0.56–4.37 mg/g (Lioe *et al.* 2013; Naviglio *et al.* 2012; Exler *et al.* 2013; Albuquerque *et al.* 2014). Kolesterol merupakan molekul dalam makanan hewani yang tersusun dari struktur steroid, rantai hidrokarbon, dan gugus hidroksil. Seperempat total kolesterol dalam tubuh berasal dari makanan yang dikonsumsi (Diana, 2013). Kadar kolesterol yang lebih rendah dari nilai sebenarnya dalam matriks pangan dapat disebabkan penentuan kondisi saat analisis kolesterol yang kurang tepat.

Saat ini, teknik kromatografi baik liquid maupun gas banyak dikembangkan untuk analisis kolesterol dalam matriks pangan. Gas chromatography (GC) diketahui lebih sensitif dalam menganalisis kolesterol dalam matriks pangan (Ahn *et al.* 2012; Bavisetty dan Narayan 2015; Park *et al.* 2013; Souza *et al.* 2016; Stroher *et al.* 2012). Walaupun demikian, analisis kolesterol menggunakan GC mempunyai beberapa kekurangan jika dibandingkan dengan HPLC. GC membutuhkan biaya operasional yang lebih mahal, persiapan sampel lebih lama, dan suhu kuantifikasi lebih tinggi dibandingkan suhu HPLC (Albuquerque *et al.* 2014; Chen *et al.* 2015). Suhu kuantifikasi yang terlalu tinggi dapat memicu terbentuknya produk hasil oksidasi kolesterol (Min *et al.* 2015). Oleh karena itu, HPLC lebih menguntungkan dan lebih cocok untuk analisis kolesterol dalam produk pangan.

Beberapa detektor HPLC yang digunakan untuk analisis kolesterol antara lain UV, *evaporative light-scattering detector* (ELSD), *fluorescence detector*, *refractive index (RI) detector* dan *diode array detector* (DAD) (Ahn *et al.* 2012; Albuquerque *et al.* 2014; Bavisetty dan Narayan 2015; Lioe *et al.* 2013; Stroher *et al.* 2012).

Metode standar analisis kolesterol AOAC/*Association of Official Analytical Chemists* 994.10 (AOAC 2012a) menggunakan instrumen *Gas Chromatography*, dalam penelitian ini dilakukan pengembangan metode dengan menggunakan RP-HPLC-MWD dan proses saponifikasinya, sehingga dapat lebih efisien.

Dalam pengembangan metode analisis kolesterol dengan RP-HPLC-MWD diperlukan evaluasi penentuan komposisi fase gerak, efisiensi waktu analisis, laju alir, panjang gelombang dan beberapa parameter kromatografi yang dihasilkan seperti faktor kapasitas, nilai piringan teoritis, kesimetrisan puncak, resolusi,

sehingga menghasilkan kondisi RP-HPLC-MWD dengan kriteria yang baik (Bonfilio *et al.* 2009; Li *et al.* 2010).

Acetonitril dan metanol merupakan fase gerak yang dapat digunakan untuk analisis kolesterol menggunakan RP-HPLC pada panjang gelombang (195–210 nm), laju alir 1–1.5 mL/menit (Ahn *et al.* 2012; Albuquerque *et al.* 2014; Bavisetty and Narayan 2015; Lin *et al.* 2007; Stroher *et al.* 2012). Jenis RP-HPLC pada beberapa literatur tersebut menggunakan detektor jenis *fixed wavelength detector* dan DAD (*Diode Array Detector*), keduanya merupakan detektor UV yang panjang gelombangnya digunakan sebagai acuan dalam penelitian ini. Adapun perbedaan penelitian ini dengan literature tersebut adalah pada penggunaan jenis detektornya yaitu jenis detektor UV *Multiwavelength Detector* (MWD) atau RP-HPLC-MWD

Untuk memperoleh kehandalan instrumen yang baik, waktu analisis lebih cepat, biaya analisis rendah dengan bentuk kromatogram yang ideal menggunakan fase gerak yang efektif maka perlu dilakukan pengembangan metode penentuan kondisi RP-HPLC-MWD menggunakan fase gerak acetonitril dan metanol dengan komposisi, panjang gelombang, dan laju alir yang bervariasi.

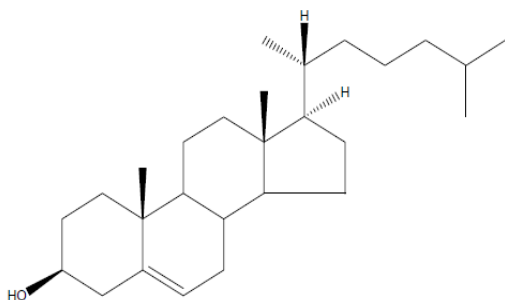
Proses saponifikasi merupakan tahap awal dan kritis untuk pengujian kolesterol dengan menggunakan GC maupun RP-HPLC-MWD, yang bertujuan untuk melepaskan kolesterol dari komponen lain dalam matriks pangan (Ahn *et al.* 2012; Park *et al.* 2013). Metode standar AOAC 994.10 (AOAC 2012a) untuk analisis kolesterol pada produk pangan menggunakan jumlah sampel cukup banyak sehingga membutuhkan bahan kimia lebih banyak dan waktu saponifikasi lebih lama. Pada metode standar, konsentrasi KOH yang digunakan yaitu 50% (b/v). Salimon *et al.* (2012) dan Souza *et al.* (2016) melaporkan bahwa konsentrasi KOH dan lama waktu saponifikasi berpengaruh terhadap jumlah analit yang terekstrak.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk pengembangan metode proses saponifikasi dari metode AOAC 994.10:2012 supaya lebih efisien, dan pengembangan kondisi analisis kolesterol dengan menggunakan RP-HPLC-MWD

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kolesterol

Kolesterol ( $5\alpha$ -cholest-5-en- $3\beta$ -ol) merupakan alkohol steroid yang mempunyai rumus molekul  $C_{27}H_{46}O$ . Steroid sebagai komponen dari kolesterol merupakan kelas lipid yang tidak tersabunkan (Acimovic dan Rozman 2013). Struktur molekul kolesterol ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Struktur kimia kolesterol (Acimovic dan Rozman 2013).

Pada matriks pangan, kolesterol terdapat dalam bentuk kolesterol bebas dan kolesterol teresterifikasi dengan asam lemak (Dinh *et al.* 2008). Sterol teresterifikasi yaitu sterol dengan gugus hidroksil pada atom karbon nomor 3 yang berikatan dengan asam lemak jenuh ataupun tidak jenuh (Damodaran dan Parkin 2017).

### 2.2 Kolesterol dalam Matriks Pangan

Kolesterol dalam matriks pangan terdapat dalam bentuk bebas dan dalam bentuk ester. Kandungan kolesterol pada matriks pangan bisa berbeda tergantung komponen penyusun lainnya, kandungan gizi telur ayam disajikan pada Tabel 1. Pada matriks pangan, kolesterol dalam membran terikat oleh komponen lain seperti fosfolipid, glikolipid, dan protein. Semakin banyak interaksi kolesterol dengan molekul dalam membrane maka interaksi dengan molekul di luar membran semakin kecil (Harris, 2010).

Dalam membran, kolesterol berikatan dengan fosfolipid melalui ikatan hidrogen yaitu antara gugus hidroksil kolesterol yang bersifat polar dengan kepala fosfolipid yang polar pula, selain itu cincin steroid dan rantai hidrokarbon yang non polar berikatan dengan asil fosfolipid melalui interaksi *Van der Waals* (Rozner dan Garti 2006; Ohvo-Rekila *et al.* 2002). Selain berikatan dengan lipid, kolesterol membentuk ikatan hidrogen dengan molekul protein (Song *et al.* 2014). Untuk melepaskan ikatan kolesterol dengan komponen dalam matriks pangan lainnya perlu dilakukan persiapan sampel sebagai tahap

kritis analisis kolesterol. Supaya komponen lain yang mengikat analit dalam matriks sampel dapat terlepas dan diperoleh analit murni (Sahu *et al.* 2017).

Tabel 1 Kandungan gizi telur ayam.

Kandungan Gizi	Telur Ayam
Kadar air (%)	76.15
Kadar Abu (g/100g)	0.55
Protein (g/100g)	12.56
Lemak (g/100g)	9.51
Karbohidrat (g/100g)	0.72
Kolesterol (mg/g)	3.72

Sumber: USDA (2016).

### 2.3 Metode Analisis Kolesterol pada Matriks Pangan

Instrumen yang umum digunakan analisis kolesterol adalah HPLC dan GC. Tahap analisis kolesterol ini dibagi menjadi tahap persiapan sampel dan tahap kuantifikasi pada instrumen. Stohr *et al.* (2012) melaporkan hasil validasi metode analisis kolesterol menggunakan instrumen GC dan HPLC secara statistik tidak berbeda nyata. Walaupun demikian jika ditinjau dari beberapa pertimbangan lain pada Tabel 2, HPLC lebih sesuai digunakan untuk analisis kolesterol dalam makanan dibandingkan instrumen GC.

Tahap persiapan sampel pada analisis kolesterol menggunakan instrumen HPLC meliputi tahap saponifikasi dan ekstraksi. Saponifikasi atau reaksi penyabunan dilakukan dengan menggunakan KOH untuk menghidrolisis asil gliserida menjadi gliserol dan garam asam lemak (Park *et al.* 2013). Gliserida (asil gliserol) yang berikatan dengan kolesterol bersifat sebagai pengganggu pada analisis kolesterol, sehingga tahap penyabunan sangat efektif untuk melepaskan ikatan ester tersebut (Ahn *et al.* 2012). Souza *et al.* (2016) melaporkan bahwa konsentrasi KOH dan waktu pemanasan saat saponifikasi berpengaruh terhadap kadar kolesterol yang terukur. Rata-rata suhu yang digunakan antara 25–80 °C. (Derewiaka *et al.* 2015).

Tabel 2 Perbedaan instrumen HPLC dan GC.

Perbedaan	HPLC	GC
Derivatisasi	Tidak dibutuhkan	Dibutuhkan
Waktu persiapan sampel	Lebih singkat	Lebih lama
Standar internal (SI)	Tidak dibutuhkan	Dibutuhkan

Perbedaan	HPLC	GC
Uji unjuk kerja SI	Tidak dibutuhkan	Dibutuhkan
Biaya operasional	Lebih murah	Lebih mahal
Suhu	Lebih rendah (20 - 50 °C)	Lebih tinggi (280 °C)

Hasil kromatogram yang bersih dari pengganggu tidak hanya ditentukan oleh hasil saponifikasi, tapi juga dipengaruhi oleh ekstraksi dan pemurnian. Sifat molekul kolesterol yang non polar umumnya diekstraksi dengan pelarut yang non polar atau menggunakan pelarut dengan kepolaran rendah (Dinh *et al.* 2008). Dari beberapa pelarut yang digunakan untuk ekstraksi kolesterol dalam matriks pangan, heksana merupakan pelarut yang lebih banyak digunakan untuk ekstraksi kolesterol (Albuquerque *et al.* 2014; Chen *et al.* 2015; Souza *et al.* 2016; Stroher *et al.* 2012; Lioe *et al.* 2013; Mariutti *et al.* 2008).

Setelah tahap persiapan sampel dilanjutkan dengan tahap kuantifikasi kolesterol pada instrumen HPLC. Dalam sistem NP-HPLC (*Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography*), fase gerak bersifat non polar dan fase diam bersifat polar, dan sebaliknya untuk sistem RP-HPLC (*Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*). Pada sistem RP-HPLC, fase gerak yang dapat digunakan yaitu acetonitril:isopropanol (70:30) ataupun acetonitril 100% (Stroher *et al.* 2012; Bavisetty dan Narayan 2015; Albuquerque *et al.* 2014), namun waktu retensi analit yang menggunakan acetonitril:isopropanol (70:30) lebih singkat dari pada hanya menggunakan acetonitril 100%.

Deteksi komponen yang dianalisis berdasarkan interaksi antara komponen analit dengan fase diam menyebabkan waktu retensi yang berbeda. Waktu retensi analisis kolesterol menggunakan metode NP-HPLC yaitu 1.51 hingga 4.75 menit dan waktu retensi metode RP-HPLC adalah 6.45 hingga 10.957 menit (Lioe *et al.* 2013; Mariutti *et al.* 2008; Stroher *et al.* 2012; Bavisetty dan Narayan 2015). Waktu retensi terlalu singkat tidak ideal karena dimungkinkan dapat mengakibatkan tumpang tindih antara puncak analit yang dianalisis dengan fase gerak yang digunakan, karena puncak fase gerak muncul di menit awal sehingga pemisahan sampel tidak maksimal.

Kolesterol dalam matriks pangan yang dianalisis menggunakan instrumen HPLC dengan detektor UV baik UV Vis maupun DAD umumnya dapat dideteksi pada panjang gelombang  $\leq 210$  nm (Stroher *et al.* 2012; Ahn *et al.* 2012; Albuquerque *et al.* 2014; Mariutti *et al.* 2008).

Detektor UV-Vis merupakan detektor yang umumnya digunakan untuk analisis berbagai komponen dalam campuran. Detektor UV-Vis dibagi menjadi tiga jenis yaitu detektor dengan panjang gelombang tetap, detektor dengan panjang gelombang yang dapat diubah, dan *multiwavelength detector* (MWD) (Swartz 2010). Detektor ini diketahui selektif dari pada detektor UV-Vis jenis *Fix Wavelength Detector* dan detektor lain seperti ELSD dan RI (Mariutti *et al.* 2008; Wolfender 2009).

## 2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis didefinisikan sebagai proses untuk mengkonfirmasi suatu metode analisis melalui bukti - bukti yang objektif berdasarkan kemampuannya yang konsisten sesuai dengan tujuan penggunaannya. Validasi metode analisis biasanya diterapkan pada metode analisis yang tidak standar, metode yang dikembangkan oleh suatu laboratorium tertentu, metode standar yang digunakan di luar lingkupnya, serta modifikasi metode standar EURACHEM (2014).

Sebelum validasi metode analisis dilakukan, pengujian kehandalan suatu sistem yang akan divalidasi merupakan hal penting yang harus dilakukan. Tahap ini dikenal dengan istilah uji kesesuaian sistem (Haky 2005; Tiryaki *et al.* 2009). Untuk penggunaan instrumen HPLC, beberapa parameter yang harus dipenuhi meliputi nilai resolusi, kapasitas faktor, efisiensi kolom, faktor asimetris (Haky 2005; Shabir 2003). Setelah uji kesesuaian sistem dapat terpenuhi selanjutnya tahap validasi metode analisis dapat dikerjakan. Parameter yang umumnya digunakan untuk validasi metode antara lain selektivitas, presisi, akurasi, rekovery, limit deteksi metode, linearitas metode, reproduibilitas intralab, ketidakpastian pengukuran (Kruve *et al.* 2015). Bukti – bukti objektif yang mendukung validasi metode harus sesuai dengan kriteria keberterimaan menurut EURACHEM (2014), AOAC (2016), dan AOAC (2012a, 2012c).

## 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur ayam broiler (*Gallus sp.*). Telur ayam diperoleh dari toko Agro Lestari, Dramaga, Bogor. Pereaksi yang digunakan antara lain metanol; KOH; heksana; isopropanol pro-analisis, acetonitril dan metanol *grade* HPLC dari Merck, Germany. Standar kolesterol kemurnian 95% (Sigma Chemical Inc, USA), gas N<sub>2</sub> teknis, *aqua*

demineralisasi, serta Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>anhydrous. Alat yang digunakan untuk persiapan sampel meliputi peralatan gelas, pipet mikro (Biohit Proline) 10–100 µL dan 100–1000 µL, kertas saring dan membran filter PVDF 0.45 µm. Alat yang digunakan dalam sistem kromatografi antara lain HPLC series *Agilent Technologies 1200 Infinity* (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), MWD (*Multiwavelength Detector*) G1365D series.

*Agilent Technologies 1200 Infinity* (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), kolom *reversed phase ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>* (15 cm x i.d. 4.6 cm, 5 µm) dan *syringe* 50 µL (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), neraca analitik (Kern & Sohn, Jerman), Injektor 20 µL Rheodyne (IDEX Health & Science, Oak Harbor, USA), *vortex*, *waterbath*, sonikator.

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Penentuan kondisi dan uji kehandalan instrumen HPLC-MWD

Tahap penentuan kondisi RP-HPLC-MWD menggunakan sampel standar kolesterol 200 µg/mL yang diinjeksi pada kondisi RP-HPLC-MWD yang berbeda (Tabel 3). Kriteria kromatografi yang dievaluasi meliputi lebar; tinggi; dan luas area puncak, nilai k (faktor kapasitas), nilai N (piringan teoritis), dan nilai kesimetrisan puncak. Semua nilai kriteria kromatografi diperoleh secara langsung dari kromatogram, kecuali nilai k. Perhitungan nilai k mengikuti rumus dalam Cabo-calvet *et al.* (2014). Penilaian masing-masing parameter dilakukan dengan pembobotan (Tabel 4). Kondisi RP-HPLC-MWD yang terpilih digunakan untuk pengembangan metode analisis kolesterol.

Tabel 3 Perlakuan penentuan kondisi RP-HPLC-MWD untuk analisis kolesterol.

Perlakuan	Komposisi fase gerak (ACN:MeOH) v/v	Deteksi UV (nm)	Laju alir fase gerak (mL/menit)
1	80 : 20	200	1.2
2	80 : 20	205	1.2
3	80 : 20	210	1.2
4	20 : 80	200	1.2
5	20 : 80	205	1.2
6	20 : 80	210	1.2
7	10 : 90	200	1.2
8	10 : 90	205	1.2
9	10 : 90	210	1.2
10	0:100	200	1.2
11	0:100	205	1.2
12	0:100	210	1.2
13	0:100	200	1.0
14	0:100	205	1.0
15	0:100	210	1.0
16	0:100	200	0.8

Perlakuan	Komposisi fase gerak (ACN:MeOH) v/v	Deteksi UV (nm)	Laju alir fase gerak (mL/menit)
17	0:100	205	0.8
18	0:100	210	0.8

#### 3.2.2 Kondisi RP-HPLC-MWD

Kondisi RP-HPLC-MWD diperoleh dari hasil penentuan kondisi HPLC terbaik yaitu menggunakan metanol 100% sebagai fase gerak. Kolom C<sub>18</sub> (15 cm x i.d. 4.6 cm, 5 µm), laju alir 1.0 mL/menit, waktu analisis 15 menit, pada suhu ruang, dengan volume injeksi 20 µL. Analit kolesterol dideteksi pada panjang gelombang 205 nm.

#### 3.2.3 Sampling dan uji homogenitas

Telur ayam broiler sebanyak 16 butir dikocok hingga kuning dan putih telur tercampur merata. ±5 gram telur tersebut dimasukkan ke dalam plastik kecil lalu plastik direkatkan dengan *sealer*. Kemudian sampel disimpan di lemari pembeku suhu -18 °C. Uji homogenitas sampel bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang akan diuji sudah homogen. Pengujian ini menggunakan metode Sunanti *et al.* (2013). Parameter yang diuji adalah kadar air sebanyak 8 kantong telur, masing-masing dua ulangan. Analisis kadar air menggunakan metode AOAC 925.30 (AOAC 2012b).

#### 3.2.4 Pengembangan Metode Analisis Kolesterol

Pengembangan metode pada penelitian ini dilakukan pada tahap persiapan sampel. Sampel telur ayam disaponifikasi dengan mengombinasikan konsentrasi KOH 5 % dan 10 % (b/v) pada waktu saponifikasi 15, 30, dan 45 menit, masing-masing kombinasi perlakuan dianalisis tiga ulangan. Evaluasi perlakuan terbaik yaitu perlakuan yang menghasilkan kadar kolesterol tertinggi dan mempunyai presisi bagus (RSD analisis < 2/3 RSD Horwitz). Modifikasi metode AOAC 994.10 ini juga mengganti pelarut untuk ekstraksi kolesterol dari toluen menjadi heksana. Penggunaan toluen dalam analisis kolesterol matriks pangan kompleks seperti telur dapat membentuk emulsi (Albuquerque *et al.* 2014). Emulsi tersebut dapat mengganggu tahap ekstraksi kolesterol dalam telur. Pengembangan metode selanjutnya yaitu menentukan faktor pengenceran larutan analitik kolesterol sebelum diinjeksikan ke HPLC-MWD. Faktor pengenceran yang dianalisis yaitu lima dan sepuluh kali pengenceran.

### 3.2.5 Persiapan Sampel Telur Ayam (Modifikasi AOAC 994.10, 2012a)

Telur ayam sebanyak  $\pm 1$  gram telur dalam tabung reaksi 50 mL ditambahkan 10 mL KOH 10 % (b/v) lalu divortex selama 20 detik. Campuran tersebut kemudian dihembuskan gas N<sub>2</sub> selama 10 detik lalu dipanaskan dalam waterbath selama 15 menit. Selanjutnya sampel didinginkan pada suhu ruang. Hasil saponifikasi diekstraksi menggunakan heksana (3 x 10 mL), setiap penambahan heksana 10 mL, campuran divortex selama 20 detik lalu didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Fase heksana (lapisan atas) dipindahkan ke tabung reaksi, lalu fase air (lapisan bawah) diekstraksi lagi dengan cara yang sama sehingga diperoleh  $\pm 25$  mL ekstrak kolesterol dalam heksana. Ekstrak kolesterol ini kemudian dipindahkan ke labu pemisah 100 mL, tabung reaksi dibilas dengan 2 x 1 mL heksana. Hasil bilasan digabungkan dengan larutan dalam labu pemisah, lalu larutan tersebut dibilas dengan air demineral (3 x 10 mL). Pada tahap akhir pembilasan, air sisa bilasan ditetesi dengan *phenolphthalein* 1% (b/v) hingga pHnya netral.

Fase heksana yang telah dibilas disaring menggunakan kertas saring yang ditambahkan 5 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat. Selanjutnya analit kolesterol tersebut dipekatkan dengan gas N<sub>2</sub>. Analit kolesterol kering kemudian dilarutkan dengan heksana 0.5 mL lalu ditambahkan metanol (fase gerak HPLC) hingga volum total larutan adalah 5.0 mL. Setelah itu, larutan ini disaring menggunakan membran PVDF 0.45  $\mu$ m dan kemudian diencerkan sebanyak 5 kali pengenceran. Sebanyak 20  $\mu$ L larutan analit ini diinjeksi ke HPLC-MWD.

### 3.2.6 Perhitungan Kadar Kolesterol

$$\mu\text{g kolesterol/g sampel} = \frac{[\text{kolesterol dari kurva } (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})] \times \text{volume larutan sampel (mL)} \times \text{Fp}}{\text{berat sampel (g)}}$$

Keterangan: [ ] = konsentrasi, Fp = faktor pengenceran dari larutan analitik kolesterol

### 3.2.7 Analisis Data

Perhitungan kadar kolesterol dan statistika deskriptif menggunakan program *Microsoft Excel* 2013. Perlakuan pada pengembangan metode analisis kolesterol dianalisis dengan uji ANOVA-*Oneway* menggunakan program SPSS IBM 22 dengan signifikansi pada  $p < 0.05$ , uji beda menggunakan uji DUNCAN. Perbandingan hasil pengenceran dianalisis dengan uji t.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penentuan Kondisi RP-HPLC-MWD untuk Analisis Kolesterol

Kondisi kromatografi yang baik dari hasil kombinasi komposisi fase gerak, laju alir, panjang gelombang yang bervariasi akan berpengaruh terhadap hasil analisis kolesterol menggunakan RP-HPLC-MWD. Hasil optimasi kondisi RP-HPLC-MWD saat menggunakan laju alir 1.2 mL/menit (Tabel 5) menunjukkan bahwasemakin banyak komposisi metanol yang digunakan maka waktu retensi akan lebih cepat dan kapasitas faktor menjadi lebih kecil.

Albuquerque *et al.* (2014) melaporkan bahwa hasil optimasi kondisi HPLC-DAD menggunakan fase gerak acetoniril 100% untuk analisis kolesterol dalam matriks pangan mempunyai waktu retensi yang lebih lama dibandingkan komposisi fase gerak acetonitril:isopropanol (70:30). Sensitivitas analit meningkat ketika menggunakan campuran metanol yang lebih tinggi pada optimasi kondisi HPLC-MS/MS untuk analisis produk oksidasi kolesterol dalam susu bubuk (Gorassini *et al.* 2017). Pada sistem *reversed-phase* HPLC interaksi antara fase diam dengan fase gerak adalah ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Molekul hidrofobik seperti kolesterol akan tertahan lebih lama dengan fase diam yang bersifat non polar, sehingga membutuhkan fase gerak yang sedikit polar dengan konsentrasi yang lebih besar untuk mengelusinya, seperti halnya metanol. Metanol mempunyai indeks polaritas lebih kecil (5.1) daripada acetonitril (5.8) (Niazi 2016; Studzinska *et al.* 2014; Gad 2008).

Tabel 4 Penentuan skor penilaian hasil penentuan kondisi RP-HPLC-MWD.

Parameter puncak kromatogram yang diamati						
Tinggi (mAU) <sup>a</sup>	Luas area (mAU*s) <sup>a</sup>	Lebar (menit) <sup>a</sup>	Kesimetrisan <sup>b</sup>	Piringan teoritis (N) <sup>c</sup>	Faktor kapasitas (k) <sup>d</sup>	Skor
50–95	1200 – 1850	0.3 – 0.5	$\geq 1.05$	3000 $\leq$ N < 6000	> 20 atau < 2	1
96–120	1850 – 2500	0.28 – 0.3	0.89 $\pm$ 0.05	6000 $\leq$ N < 9000	10 – 20	2
121–180	2500 – 4000	0.2 – 0.28	1.00 $\pm$ 0.05	$\geq 9000$	2 $\leq$ k $\leq$ 10	3

<sup>a</sup>Rentang nilai dari hasil pengamatan seluruh perlakuan, <sup>b</sup>Diadaptasi dari Smith (2000) dan Badawy (2018); <sup>c</sup>Bonfilio *et al.* (2009); <sup>d</sup>Cabo-calvet *et al.* (2014)

Kriteria kromatogram lain yang dievaluasi pada penelitian ini yaitu kesimetrisan puncak, lempeng teoritis dan faktor kapasitas. Penentuan nilai masing-masing kriteria kromatografi berdasarkan Tabel 4. Hasil pengujian semua kriteria kromatografi pada penelitian ini sudah

memenuhi syarat keberterimaan puncak yang ideal (Tabel 6). Nilai kesimetrisan puncak, nilai piringan teoritis diperoleh dari output kromatogram. Puncak yang tidak simetris menunjukkan kesesuaian sistem yang kurang bagus (JECFA 2006).

Tabel 5 Hasil pengujian karakteristik kromatografi. pada berbagai kondisi RP-HPLC-MWD.

Per-lakuan <sup>a</sup>	t <sub>0</sub> (menit) <sup>b</sup>	t <sub>r</sub> (menit) <sup>c</sup>	Karakteristik Puncak			N	k	Skor	
			Kesimetris-an	Tinggi (mAU)	Lebar (menit)				Luas Area (mAU*s)
1	0.950	20.086	0.96	119.50	0.48	3730.44	9701	20.14	14
2	0.950	20.086	1.02	98.40	0.47	3172.13	9975	20.14	14
3	0.950	20.085	1.07	53.53	0.48	1817.61	9700	20.14	10
4	0.980	10.763	0.95	93.50	0.29	1796.93	7630	9.98	15
5	0.980	10.765	0.96	112.83	0.29	2147.62	7812	9.98	16
6	0.980	10.765	0.95	62.11	0.29	1223.99	7813	9.98	14
7	0.978	9.710	0.98	103.39	0.27	1876.44	7164	8.93	18
8	0.980	9.709	0.99	136.13	0.26	2420.27	7530	8.91	20
9	0.899	9.708	1.01	74.95	0.27	1357.80	7343	9.80	16
10	1.343	8.717	0.97	119.67	0.26	2054.80	6070	5.49	18
11	1.359	8.716	0.99	163.41	0.25	2748.45	6558	5.41	20
12	1.358	8.716	0.99	90.61	0.26	1563.47	6389	5.42	16
13	1.213	10.413	0.99	122.53	0.29	2408.52	6825	7.58	17
14	1.213	10.413	0.99	170.83	0.29	3248.41	7310	7.58	18
15	1.213	10.413	1.02	93.94	0.29	1795.60	7309	7.58	14
16	1.015	12.941	0.97	122.75	0.35	2815.42	7573	11.75	16
17	1.014	12.943	1.00	178.13	0.34	3980.55	8188	11.76	16
18	1.013	12.943	1.02	98.48	0.33	2195.33	8352	11.78	12

<sup>a</sup>Perlakuan merujuk pada Tabel 1, <sup>b</sup>Waktu retensi zat terlarut yang tidak berinteraksi dengan fase stasioner, <sup>c</sup>Waktu retensi puncak sampel.

Nilai piringan teoritis (N) menunjukkan tingkat efisiensi kolom, nilai N yang bagus yaitu lebih dari 2000 (Bonfilio *et al.* 2009). Semakin tinggi nilai N maka menunjukkan kolom yang digunakan semakin efisien. Pada Tabel 5 juga menunjukkan waktu retensi yang semakin singkat dapat menurunkan nilai N, namun nilai N yang diperoleh dari penelitian ini masih lebih dari 2000. Kriteria kromatografi selanjutnya yaitu faktor kapasitas (k). Faktor kapasitas atau faktor retensi merupakan rasio waktu saat terjadi interaksi antara analit terhadap fase stasioner selama pemisahan dalam sistem kromatografi (Poole dan Poole 2009). Semakin besar nilai k menunjukkan waktu elusi analit dalam kolom semakin lama, namun waktu retensi yang terlalu lama atau terlalu cepat tidak ideal untuk analisis. Kapasitas faktor dari bentuk puncak kromatogram yang ideal yaitu  $2 \leq k \leq 10$ . Pada Tabel 5 menunjukkan nilai k semakin besar mempunyai lebar puncak yang semakin lebar, sehingga puncak kurang ideal. Walaupun beberapa kriteria lain sudah memenuhi syarat puncak yang ideal, namun dalam penentuan puncak yang ideal ditinjau dari berbagai aspek melalui tahap pembobotan (Tabel 4).

Berdasarkan hasil pembobotan (Tabel 4), kondisi kromatografi dengan skor tertinggi yaitu pada perlakuan ke-8 dan ke-11. Walaupun kedua perlakuan tersebut mempunyai waktu retensi lebih singkat, namun penggunaan laju alir 1.2 mL/menit kurang ideal. Penggunaan laju alir yang terlalu tinggi dapat membahayakan proses interaksi antara analit dengan fase gerak dan fase stasioner (Bonfilio *et al.* 2009). Oleh karena itu, dalam penelitian ini kondisi RP-HPLC-MWD yang terpilih yaitu ketika menggunakan fase gerak metanol 100%, dengan laju alir sedang (1.0 mL/menit), deteksi UV pada 205 nm. Walaupun pada kondisi ini waktu retensi lebih lama, namun menghasilkan kromatogram dengan tinggi puncak tertinggi, lebar puncak yang cukup kecil, dan luas area yang lebih lebar jika dibandingkan dengan kondisi HPLC dengan waktu retensi yang lebih cepat. Selain itu, kriteria kromatografi lain dalam kondisi terpilih masih memenuhi kriteria kromatografi ideal. Kondisi RP-HPLC-MWD ini selanjutnya digunakan untuk uji kehandalan instrumen hingga analisis metode kolesterol dalam telur.

Tabel 6 Perbandingan kromatogram ideal dengan hasil penelitian.

Kriteria kromatografi	Nilai ideal	Hasil penelitian	
		Rentang	Kondisi terpilih
Waktu retensi (menit)	Sedang	8.716–20.086	10.413
Luas area (mAU*s)	Besar	1223.99–3730.44	3248.41
Lebar puncak (menit)	Kecil	0.25–0.48	0.29
Tinggi puncak (mAU)	Semakin tinggi	53.53–178.13	170.83
Nilai k (faktor kapasitas)	2 – 10 <sup>a</sup>	5.41–20.14	7.58
Nilai N (piringan teoritis)	> 2000 <sup>b</sup>	6070–9975	7310
Nilai kesimetrisan puncak	0.95–1 atau mendekati 1 <sup>c</sup>	0.95–1.02	0.99

Sumber: <sup>a</sup>Cabo-calvet *et al.* (2014), <sup>b</sup>Bonfilio *et al.* (2009), <sup>c</sup>Smith (2000); Badawy (2018).

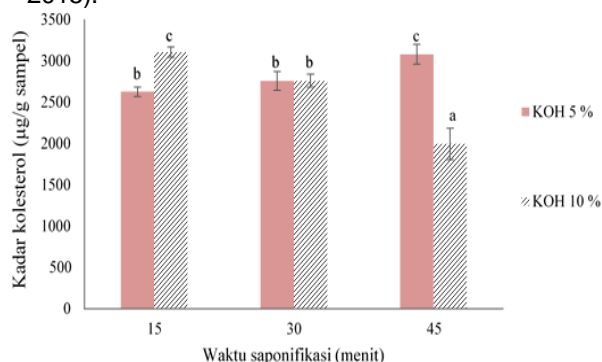
Instrumen HPLC-MWD dengan kondisi yang terpilih tersebut sudah terbukti mempunyai kehandalan instrumen yang bagus. Maslukhah (2019) melaporkan bahwa kondisi HPLC-MWD yang terpilih tersebut mempunyai linieritas  $R^2=0.9991$ , nilai limit deteksi dan kuantifikasi instrumen secara berurutan yaitu 5 dan 10  $\mu\text{g/mL}$ . Jika dibandingkan dengan nilai limit deteksi maupun kuantifikasi hasil penelitian sebelumnya, instrumen RP-HPLC-MWD ini mempunyai tingkat sensitivitas yang tidak jauh berbeda dengan HPLC-DAD dan lebih sensitif dibandingkan dengan HPLC-*fixed wavelength detector*. HPLC-DAD mempunyai limit deteksi instrumen yaitu 1–3  $\mu\text{g/mL}$ , dan limit kuantifikasi instrumen sebesar 11  $\mu\text{g/mL}$  (Bavisetty dan Narayan 2015; Albuquerque *et al.* 2014). Stroher *et al.* (2012) telah melaporkan limit deteksi dan kuantifikasi instrumen HPLC-*fixed wavelength detector* secara berturut-turut yaitu 5 dan 16  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.2 Pengembangan Metode Analisis Kolesterol

Penurunan jumlah sampel dari 6 gram menjadi 1 gram dapat menurunkan jumlah bahan kimia dan waktu pemanasan saat saponifikasi. Saponifikasi merupakan tahap kritis untuk menghidrolisis komponen pengganggu seperti asam lemak dan asil gliserida dalam matriks pangan (Ahn *et al.* 2012; Park *et al.* 2013). Pada penelitian ini konsentrasi KOH dengan waktu pemanasan saat saponifikasi secara statistik berpengaruh nyata terhadap kadar kolesterol yang dihasilkan, dan antara kedua faktor tersebut menunjukkan adanya interaksi ( $p < 0.05$ ).

Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin lama waktu saponifikasi menggunakan konsentrasi KOH 5% dapat meningkatkan kadar kolesterol telur ayam, namun penggunaan KOH 10% menyebabkan kadar kolesterol semakin menurun seiring meningkatnya waktu saponifikasi. Hasil penelitian ini menunjukkan

bahwa dengan menggunakan KOH yang lebih pekat membutuhkan waktu saponifikasi lebih singkat. Hal ini sesuai dengan literatur, penggunaan KOH dengan konsentrasi yang lebih tinggi membutuhkan waktu saponifikasi lebih singkat, dan sebaliknya (Albuquerque *et al.* 2014; Souza *et al.* 2016). Optimasi metode analisis kadar kolesterol menggunakan suhu 80 °C, KOH 2 M terjadi penurunan setelah pemanasan saponifikasi 15 menit (Fletouris *et al.* 1998). Penurunan kadar kolesterol akibat semakin lama waktu pemanasan saat saponifikasi diduga kolesterol yang terekstrak dalam matriks pangan sudah mengalami kerusakan. Proses pemanasan pada suhu tinggi dan waktu yang lama dapat menyebabkan kolesterol teroksidasi (Min *et al.* 2015).

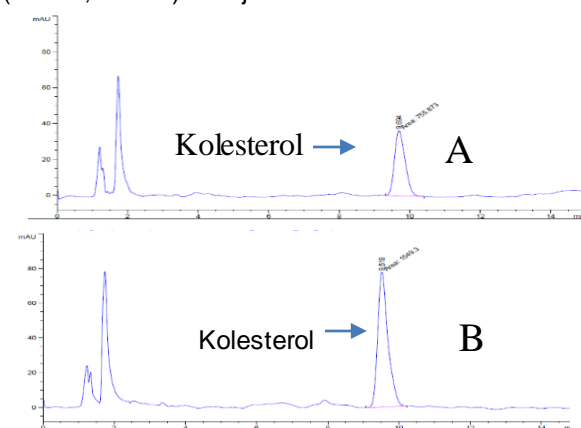


Gambar 2 Kadar kolesterol telur ayam dari kombinasi perlakuan konsentrasi KOH dengan waktu saponifikasi.

Kadar kolesterol tertinggi diperoleh dari hasil saponifikasi menggunakan KOH 5% selama waktu pemanasan 45 menit dan pada perlakuan KOH 10% dengan waktu pemanasan 15 menit secara berurutan yaitu  $3105.48 \pm 62.40$  dan  $3077.80 \pm 118.98 \mu\text{g/g}$  sampel. Kedua perlakuan tersebut secara statistik menghasilkan konsentrasi kolesterol yang tidak berbeda secara signifikan. Saponifikasi menggunakan KOH 10%



selama 15 menit mempunyai presisi yang lebih baik dengan RSD (2.01%) <  $\frac{2}{3}$  RSD Horwitz (3.17%), sedangkan perlakuan KOH 5% dengan waktu pemanasan 45 menit mempunyai RSD (4.78%) >  $\frac{2}{3}$  RSD Horwitz (3.20%). Oleh karena itu, pada penelitian ini metode analisis kolesterol menggunakan KOH 10% dengan waktu pemanasan selama 15 menit dipilih sebagai metode terbaik. Waktu pemanasan saponifikasi yang singkat dapat meningkatkan efisiensi metode analisis kolesterol. Hasil pengembangan metode pada penelitian ini dapat menurunkan waktu saponifikasi dari 70 menit (AOAC 2012a) menjadi 15 menit dengan jumlah sampel yang lebih sedikit. Penggunaan KOH pada penelitian ini dapat menurunkan konsentrasi dari 50% (AOAC, 2012a) menjadi 10%.



Gambar 3 Kromatogram sampel dengan pengenceran sepuluh kali (A), dengan pengenceran lima kali (B).

Pengembangan metode analisis selanjutnya yaitu menentukan faktor pengenceran larutan analitik kolesterol. Tahap ini dilakukan dengan menggunakan metode analisis kolesterol yang terpilih pada dua pengenceran yaitu 5 dan 10 kali pengenceran. Perbedaan kromatogram dari pengenceran berbedaditunjukkan pada Gambar 3. Luas area larutan analitik menggunakan pengenceran 5 dan 10 kali berturut-turut yaitu  $1519.13 \pm 45.90$  dan  $743.00 \pm 27.22$ , sehingga diperoleh kadar kolesterol secara berurutan yaitu  $3224.88 \pm 118.180$  dan  $3150.28 \pm 91.457 \mu\text{g/g}$ . Larutan analitik dengan pengenceran 5 kali menghasilkan kadar kolesterol lebih besar dibandingkan pengenceran 10 kali. Hasil uji beda (uji t) menunjukkan bahwa kadar kolesterol dari dua pengenceran tersebut tidak berbeda nyata ( $p > 0.05$ ). Metode termodifikasi ini selanjutnya perlu divalidasi untuk membuktikan bahwa hasil analisis metode ini akurat dan terpercaya. Berdasarkan hasil pengembangan metode ini, sebaiknya larutan analitik kolesterol yang

digunakan pada tahap validasi metode menggunakan pengenceran lima kali sebelum diinjeksi ke HPLC-MWD.

## 5. KESIMPULAN

Kondisi RP-HPLC-MWD yang memenuhi kriteria kromatografi ideal yaitu fase gerak metanol 100%, deteksi UV pada 205 nm, dengan laju alir 1.0 mL/menit, dan waktu retensi 10.413 menit. Berdasarkan parameter linieritas, limit deteksi dan kuantifikasi instrumen, serta presisi waktu retensi dan luas area, instrumen HPLC-MWD diketahui mempunyai kehandalan yang bagus. Pengembangan metode analisis kolesterol dalam telur ayam menghasilkan kadar kolesterol tertinggi dengan presisi bagus pada perlakuan KOH 10% (b/v) dengan pemanasan 15 menit, suhu 80 °C. Faktor pengenceran lima kali pada larutan analitik kolesterol sebelum diinjeksi ke HPLC-MWD dapat digunakan untuk tahap validasi metode. Metode termodifikasi ini dapat menurunkan jumlah sampel, penggunaan bahan kimia dan waktu saponifikasi serta waktu analisis menggunakan RP-HPLC-MWD.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan dana dan fasilitas untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acimovic J, Rozman, D. (2013). Steroidal Triterpenes of Cholesterol Synthesis. *Molecules*. 18: 4002-4017. doi:10.3390/molecules18044002.
- Ahn, J.H., Jeong, I.S., Kwak, B.M., Leem, D., Yoon, T., Yoon, C., Jeong, J., Park, J.M., Kim, J.M. (2012). Rapid Determination of Cholesterol in Milk Containing Emulsified Foods. *Food Chem*, 135, 2411–2417. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.060.
- Albuquerque, T.G., Oliveira, M.B.P.P., Sanches-Silva, A., Costa, H.S. (2014). Cholesterol Determination in Foods: Comparison Between High Performance and Ultra-High Performance Liquid Chromatography. *Food Chem*. 193, 18–25. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.109.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. (2012a). AOAC Official Method 994.10 Cholesterol in Foods. Volum 1.

- Journal of AOAC International*. Maryland (USA).
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. (2012b). AOAC Official Method 925.30 Solids (Total) in Eggs, Vacuum Method. Volum 1. *Journal of AOAC International*. Maryland (USA).
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. (2012c). Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanical. *Journal AOAC International*. Maryland (USA).
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2016. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. *J. AOAC Int.* 2: 1–18
- Badawy, M.E.T.I. (2018). Development and Validation of HPLC Methods for Analysis of Chlorantraniliprole Insecticide in Technical and Commercial Formulations. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 1-12.  
doi:10.1080/03601234.2018.1438829.
- Bavissety, S.C.B., Narayan, B. (2015). An Improved RP-HPLC Method for Simultaneous Analyses of Squalene and Cholesterol Especially in Aquatic Foods. *J. Food Sci. Technol.* 52: 6083–6089.  
doi:10.1007/s13197-015-1793-4.
- Bonfilio, R., Ricardo, C., Tarley, T., Ribeiro, G., Regina, H., Salgado, N., Benjamim, M., Araújo, D. (2009). Multivariate Optimization and Validation of An Analytical Methodology by RP-HPLC for The Determination of Losartan Potassium in Capsules. *Talanta*. 80: 236–241.  
doi:10.1016/j.talanta.2009.06.060.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. (2017). Rata-rata Konsumsi Per Kapita Seminggu Beberapa Macam Bahan Makanan Penting, 2007-2016. [Internet]. Retrieved November 28, 2017  
from: <https://www.bps.go.id/linkTabelStatis/view/id/950>.
- Cabo-calvet, E., Ortiz-bolsico, C., Baeza-baeza, J.J., García-alvarez-coque, M.C. (2014). Columns in Isocratic and Gradient Elution Using Mobile Phase Composition and Flow Rate as Factors. *Chromatography*. 194–210.  
doi:10.3390/chromatography1040194.
- Chen, Y.Z., Kao, S.Y., Jian, H.C., Yu, Y.M., Li, J.Y., Wang, W.H., Tsai, C.W. (2015). Determination of Cholesterol and Four Phytosterols in Foods without Derivatization by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Food Drug Anal.* 23: 636–644.  
doi:10.1016/j.jfda.2015.01.010.
- Damodaran S, Parkin KL. (2017). Fennema's Food Chemistry. 5th edition. CRC Press. Boca Raton: USA.
- Derewiaka D, Molinska E. (2015). Cholesterol transformations during heat treatment. *Food Chemistry*. 171: 233-240. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.117.
- Diana, R. (2013). *Healthy Joints for Life: An Orthopedic Surgeon's Plan to Reduce Pain and Inflammation, Avoid Surgery and Get Moving Again*. USA: Harlequin.
- Dinh, T.T.N., Blanton, J.R., Brooks, J.C., Miller, M.F., Thompson, L.D. (2008). A Simplified Method for Cholesterol Determination in Meat and Meat Products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 306 – 314.
- EURACHEM. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd Ed. Tersedia di : [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- Exler, J., Philips, K.M., Patterson, K.Y., Holden, J.M. (2013). Cholesterol and Vitamin D of Eggs in The U.S. Retail Market. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29: 110-116. doi:10.1016/j.jfca.2012.11.001
- Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A., Psomas, I.E. (1998). Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography. *J. Dairy Sci.* 81: 2833–2840. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75842-4.
- Gad, S.C. (2008). *Preclinical Development Handbook: Adme Biopharmaceutical Properties*. John Willey and Sons. Hoboken, New Jersey.
- Gulati S, Liu Y, Munkasci AB, Wilcox L, Sturley SL. (2010). Sterols and Sphingolipids: Dynamic Duo or Partners in Crime?. *Prog Lipid Res.* 49 (4): 353-365. doi:10.1016/j.plipres.2010.03.003.
- Gorassini, A., Verardo, G., Fregolent, S., Bortolomeazzi, R. (2017). Rapid Determination of Cholesterol Oxidation Products in Milk Powder Based Products by Reversed Phase SPE and HPLC-APCI-MS/MS. *Food Chem.*  
doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.080.
- Haky JE. (2005). Resolution in HPLC: Selectivity, Efficiency, and Capacity. Di dalam: Cazes

- J, editor. *Encyclopedia of Chromatography*. 2nd Edition. Taylor & Francis Group. USA. Hlmn1434-1436.
- Harris JR. (2010). *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: Structure and Function in Health and Disease*. Berlin (Germany): Springer Science & Business Media.
- [JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2006). *Combined Compendium of Food Additive Specifications: Analytical Methods, Test Procedures and Laboratory Solutions Used by and Referenced in The Food Additive Specifications*. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- Krueve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: part II. *Analytica Chimica Acta*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>.
- Li, S., Tian, M., Row, K.H. (2010). Effect of Mobile Phase Additives on The Resolution of Four Bioactive Compounds by RP-HPLC. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2229-2240. doi:10.3390/ijms11052229.
- Lin, Y., Wu, S., Wu, H. (2007). Highly Sensitive Analysis of Cholesterol and Sitosterol in Foods and Human Biosamples by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr.* 1156: 280-287. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.091.
- Lioe, H.N., Setianingrum, T., Anggraeni, R. (2013). Validasi Metode Analisis Kolesterol dalam Telur dengan HPLC-ELSD. *JlPI*. 18 (3): 178-185.
- Mariutti, L.R.B., Nogueira, C., Bragagnolo, N. (2008). Optimization and Validation of Analytical Conditions for Cholesterol and Cholesterol Oxides Extraction in Chicken Meat Using Response Surface Methodology. *J. Agric Food Chem.* 56: 2913-2918. doi: 10.1021/jf0735432.
- Marquardt D, Kucerka N, Wassal SR, Harroun TA, Katsaras J. (2016). Cholesterol's Location in Lipid Bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.04.001.
- Maslukhah, Y.L. (2019). Validasi Analisis Kolesterol Telur Ayam Broiler Menggunakan HPLC-MWD dan Aplikasinya pada Pangan dengan Matriks yang Sama. Unpublished master's thesis, Institut Pertanian Bogor, Bogor (ID).
- Min, J., Lee, S., Khan, M.I., Yim, D.G., Seol, K., Lee, M., Jo, C. (2015). Monitoring The Formation of Cholesterol Oxidation Products in Model Systems Using Response Surface Methodology. *Lipids Health Dis.* 14:77 (1-9). doi:10.1186/s12944-015-0074-6.
- Naviglio, D., Gallo, M., Laura, L.G., Scala, C., Ferrara, C., Santini, A. (2012). Determination of Cholesterol in Italian Chicken Eggs. *Food Chemistry*. 132: 701-708. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.002.
- Niazi, S.K. (2016). *Biosimilar and Interchangeable Biologics: Tactical Element*. Boca Raton (Florida). CRC Press.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki P, Slote JP. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*. 41: 66-97.
- Park, J., Jeong, I., Kwak, B., Ahn, J., Leem, D., Jeong, J., Kim, J. (2013). Application of Rapid Sample Preparation Method and Monitoring for Cholesterol Content in Chicken Egg and Egg powder. *Korean J. Food Sci. An.* 33: 672-677.
- Poole, C.F., Poole, S.K. (2009). Foundations of Retention in Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1216: 1530-1550. doi:10.1016/j.chroma.2008.10.092.
- Rozner, S., Garti, N. (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 282-283: 435-456. doi: 10.1016/j.colsurfa.2005.12.032.
- Sahu, P.K., Rao, R.N., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C.S., Panda, J. (2017). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. doi: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.
- Salimon J., Abdullah, B.M., Salih, N. (2011). Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. *Chem. Cent. J.* 5:67. doi:10.1186/1752-153X-5-67.
- Shabir, G.A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography*

- A. 987: 57 - 66.
- Song Y, Kenworthy AK, Sanders CR. (2014). Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins. *The Protein Society*. 23: 1-22. doi: 10.1002/pro.2385.
- Souza, H.A.L., Mariutti, L.R.B., Bragagnolo, N. (2016). Microwave Assisted Direct Saponification for The Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Shrimp. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jsbmb.2016.03.027.
- Stroher, G.L., Rodrigues, A.C., Dias, L.F., Pedrão, M.R., De Paula, L.N., Visentainer, J.V., De Souza, N.E. (2012). Comparative Analysis and Validation Methodologies of GC and HPLC for Analysis of Cholesterol in Meat Products. *AJAC*. 3: 306–311.
- Studzinska, S., Pietrzak, L., Buszewski, B. (2014). The Effects of Stationary Phases on Retention and Selectivity of Oligonucleotides in IP-RP-HPLC. *Chromatographia*. 77: 1589–1596. doi:10.1007/s10337-014-2766-x.
- Smith, R.M. (2000). *Handbook of Analytical Separations*. Valko K, editor. Volume 1. Amsterdam: Elsevier Science BV.
- Sunanti, S.T., Samin, Supriyanto, C. (2013). Penetapan Nilai Kandidat *In-House Reference Material* (RM) ZrO<sub>2</sub>. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia*. 14 (1): 23-36.
- Swartz, M. (2010). HPLC Detectors: A Brief Review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33:113–1150. doi: 10.1080/10826076.2010.484356.
- Tiryaki O, Baysoyu D, Aydin G, Secer E. (2009). Setting system suitability parameters for performance optimization of GC-NPD detection for pesticide residue analysis. *GU Journal of Science*. 22 (3): 149 - 155.
- [USDA] United State Departement Agriculture. (2016). National Nutrient Database for Standars Reference Release 28: 01123, Egg, Whole, Raw, Fresh. [Internet]. [diunduh 2017 September 2]. Tersedia pada: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list/>.
- Wolfender, J.L. (2009). HPLC in natural product analysis: The detection issue. *Planta Med*. 75: 719-734. doi: 10.1055/s-0028-1088393.