

Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kolesterol Ayam Broiler dengan Metode Lieberman- Burchard

Sahriawati¹, Sumarlin², Sri Wahyuni³

^{1,2,3}Jurusan Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan, Program Studi Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan,

Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Indonesia

Jl. Poros Makassar-Parepare, Sulawesi Selatan (Times New Roman, 10)

Article History:

doi:

Keywords:

Akurasi, Ayam Broiler, Linearitas, Presisi

***Corresponding Author:**

sahriawati@gmail.com

Abstrak: Analisis kadar kolesterol pada daging ayam broiler merupakan parameter penting yang harus dilakukan karena kandungan lemak dan kolesterol dalam daging ayam broiler relatif tinggi dapat menimbulkan masalah kesehatan. Metode Liebermann-Burchard merupakan metode tidak baku dalam penentuan kolesterol. Untuk menghindari ketidaksesuaian data hasil pengukuran yang dapat menyebabkan adanya kekeliruan, maka laboratorium harus memvalidasi metode tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan, dan penegasan serta modifikasi dari metode baku atau dengan kata lain validasi metode bertujuan untuk membuktikan bahwa semua cara atau prosedur pengujian yang digunakan senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten atau terus menerus. Dalam validasi metode analisis, terdapat beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan antara lain meliputi ketepatan (akurasi), ketelitian (presisi), spesifitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode Liebermann-Burchard serta menganalisis kadar kolesterol ayam broiler berdasarkan kriteria hasil validasi sehingga data yang diperoleh akurat. Kadar kolesterol ayam broiler dianalisis pada bagian yang berbeda yaitu daging bagian paha dan daging bagian dada. Analisis dilakukan dengan spektrofotometer UV visible HACH DR 5000, diperoleh panjang gelombang maksimum 625 nm. Hasil validasi penetapan kadar kolesterol metode Lieberman-Burchard diperoleh adanya hubungan yang linear antara absorbansi dengan kadar kolesterol dengan persamaan $y = 0,009x + 0,004$ dengan nilai $r^2 = 0,998$. Hasil penetapan akurasi diperoleh %PK sebesar 97,037-108,519% menunjukkan metode ini memiliki ketepatan dan ketelitian yang baik. Hasil penetapan presisi didapatkan nilai KV sebesar 0,506 yang menunjukkan metode tersebut memiliki nilai keterulangan yang baik. Penetapan batas deteksi sebesar 0,511 ppm dan batas kuantitas sebesar 1,703 ppm. Kadar kolesterol daging ayam broiler bagian paha atas diperoleh 59 mg% dan bagian dada dengan kadar kolesterol 65 mg%.

Abstract: Analysis of cholesterol levels in broiler chicken meat is an important parameter that must be done because of the fat and cholesterol content in broiler chicken meat relatively high can cause health problems. The Liebermann-Burchard method is a non-standard method for determining cholesterol. To avoid mismatch of measurement data that can cause errors, the laboratory must validate non-standard methods, methods designed or laboratory developed,

standard methods used outside the intended scope, and confirmation and modification of standard methods or in other words Method validation aims to prove that all testing methods or procedures used consistently achieve the desired results or continuously. In the validation of the analytical method, there are several parameters of analysis that must be considered including the accuracy (accuracy), accuracy (precision), specificity, linearity, detection limit, quantization limit. This study aims to validate the Liebermann-Burchard method and analyze the cholesterol levels of broiler chickens based on the results of the validation criteria so that the data obtained is accurate. Broiler chicken cholesterol levels were analyzed in different parts, namely the meat of the thigh and breast meat. The analysis was carried out with UV visible HACH DR 5000 spectrophotometer, obtained a maximum wavelength of 625 nm. The results of the content determination validation Lieberman-Burchard cholesterol method obtained a linear relationship between absorbance with cholesterol levels with the equation $y = 0.009x + 0.004$, with value of $r^2 = 0.998$. The result of determining the accuracy obtained by PK% of 97.037-108.519% shows this method has good accuracy and accuracy. Determination results precision obtained a KV value of 0.506 which indicates that the method has a good repeatability value. Determination of the detection limit of 0.511 ppm and the quantity limit of 1.703 ppm. Cholesterol levels of broiler chicken meat were obtained.59 mg% and chest parts with cholesterol levels of 65 mg%.

PENDAHULUAN

Analisis kadar kolesterol pada daging ayam broiler merupakan parameter penting yang harus dilakukan karena kandungan lemak dan kolesterol dalam daging ayam broiler relatif tinggi dapat menimbulkan masalah kesehatan bagi konsumen seperti obesitas dan aterosklerosis. Menurut Jabatan Dietetik dan Katering CGH (2005) kolesterol merupakan bahan seperti lemak, berlipid yang ada dalam semua sel hewan termasuk juga sel manusia. Kolesterol dibawa di dalam tubuh oleh lipoprotein. Kolesterol dibagi menjadi dua, yaitu low density lipoprotein (LDL) atau disebut juga dengan kolesterol jahat dan high density lipoprotein (HDL) atau biasa juga disebut kolesterol baik. LDL dalam jumlah yang berlebihan dapat meningkatkan risiko serangan penyakit jantung, sedangkan HDL dalam jumlah yang besar dapat mengurangi risiko serangan penyakit jantung. Kolesterol dibutuhkan oleh tubuh untuk tumbuh besar dan memperbaiki sel-sel yang rusak, menghasilkan asam empedu yang membantu dalam penyerapan lemak dan untuk menghasilkan hormon, umumnya semua jaringan terutama hati menghasilkan kolesterol. Kolesterol dalam makan perlu kita waspadai mengingat tren penyakit jantung cukup tinggi di Indonesia. Seiring dengan peningkatan sumber daya Manusia, masyarakat mulai mengerti arti penting dari bahan pangan yang sehat, sehingga permintaan protein hewani yang berkualitas dan sehat juga semakin meningkat

Seorang peneliti harus menentukan metode analisis yang akan digunakan. Penentuan kadar kolesterol dalam pangan sangat dipengaruhi oleh metode yang digunakan dalam melakukan analisis, baik pada saat ekstraksi maupun saat penentuan kuantitatifnya. Untuk menghindari ketidaksesuaian data hasil pengukuran yang dapat menyebabkan adanya kekeliruan, maka laboratorium harus memvalidasi metode tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan, dan penegasan serta modifikasi dari metode baku (Hadi 2007). Validasi metode adalah suatu proses untuk mengkonfirmasi

bahwa prosedur analisis yang dilakukan untuk pengujian tertentu sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Huber 2001). Penyimpangan dari hasil metode dapat dihindari pada kondisi normal, dapat melakukan analisis dengan tingkat kepercayaan yang tinggi, mengevaluasi unjuk kerja suatu metode analisis pada lingkup parameter tertentu, dan melakukan analisis sesuai dengan persyaratan metode yang baik sehingga dapat digunakan untuk analisis rutin atau dengan kata lain validasi metode bertujuan untuk membuktikan bahwa semua cara atau prosedur pengujian yang digunakan senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten atau terus menerus.

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode antara lain ketepatan (akurasi), ketelitian (presisi), spesifitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi, ketangguhan dan rentang. Proses ini bukan suatu proses tunggal, namun merupakan salah satu bagian dari prosedur analisis yang tidak dapat dipisahkan. Parameter yang akan ditentukan dalam penelitian ini meliputi linearitas, akurasi, presisi, limit deteksi (LOD), limit kuantitasi (LOQ).

METODE

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ayam broiler umur 6 minggu. Bahan kimia yang digunakan adalah kolesterol(pa-Merck), n-heksan (pa-Merck), etanol (pa-Merck), asam sulfat (pa-Merck), asam asetat anhidrat (pa-Merck), kloroform (pa-Merck).

Beberapa peralatan yang dibutuhkan adalah Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah labu ukur 25 mL, labu ukur 10 mL, labu ukur 5 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 1 mL, corong pisah, alluminium foil, corong, gelas ukur 1000 mL, gelas ukur 100 mL, kertas saring, kaca arloji, pipet tetes, blender, magnetic stirer, beaker glass 1000 mL, cawan penguap, ball pipet, timbangan analitik (Sartorius TE 214S), stopwatch, kuvet (Quartz Square), Spektrofotometer UV-Visibel (HACH DR 5000).

Analisis Kadar Kolesterol Secara Kolorimetri (Saptarini dkk, 2016). Pertama, larutan pereaksi Liebermann-Burchard. Asam asetat anhidrat didinginkan selama 30 menit, kemudian asam asetat anhidrat ditambahkan dengan asam sulfat pekat dengan perbandingan 10:1. Pereaksi dibuat segar.

Kedua, larutan standar. Sebanyak 10 mg standar kolesterol powder ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Kemudian dilarutkan dengan kloroform hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan standar kolesterol 1000 ppm, digunakan sebagai larutan standar stok.

Penentuan panjang gelombang maksimum kolesterol dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Sebanyak 0,375 mL standar 1000 ppm ditambah 2 mL pereaksi Liebermann-Burchard dalam labu 5 mL, digenapkan hingga tanda batas dengan kloroform. Campuran diinkubasi selama 5 menit. Absorbansi diukur pada rentang panjang gelombang 400-700 nm menggunakan spektrofotometer visibel dan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Penetapan waktu kestabilan warna yang terbentuk antara kolesterol dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Sebanyak 0,375 mL standar 1000 ppm ditambah 2 mL pereaksi Liebermann-Burchard dalam labu 5 mL, digenapkan hingga tanda batas dengan kloroform. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum setiap 5 menit selama 60 menit dan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Validasi metode. Penentuan linearitas. Sebanyak 0, 075, 0,150, 0,225, 0,300, dan 0,375 mL larutan standar 1000 ppm, masing-masing ditambah 2 mL pereaksi

Liebermann-Burchard dalam labu 5 mL, digenapkan hingga tanda batas dengan kloroform. Campuran diinkubasi selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak tiga kali ulangan, kemudian dibuat persamaan linearnya dengan metode regresi linier ($y = ax + b$). Linearitas kurva kalibrasi dilihat dari nilai koefisien korelasi (r) (Gandjar dan Rohman, 2013).

Penentuan akurasi. Sebanyak 0,075, 0,225, dan 0,375 mL standar 1000 ppm, masing-masing ditambah 2 mL pereaksi Liebermann-Burchard dalam labu 5 mL, digenapkan hingga tanda batas dengan kloroform. Campuran diinkubasi selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak tiga kali ulangan. Absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi. Konsentrasi perolehan kembali (PK) dibandingkan dengan nilai yang seharusnya (Gandjar dan Rohman, 2012).

$$PK (\%) = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

a = konsentrasi perolehan kembali

b = konsentrasi standar

Penentuan presisi. Sebanyak 0,150 mL standar 1000 ppm ditambah 2 mL pereaksi Liebermann-Burchard dalam labu 5 mL, digenapkan hingga tanda batas dengan kloroform. Campuran diinkubasi selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Larutan ini dibuat sebanyak enam kali ulangan. Penentuan presisi dinyatakan dengan koefisien variasi atau KV (%) (Gandjar dan Rohman, 2013).

Keterangan:

KV = Koefisien variasi

S = Standar deviasi

x = Rata-rata

Penentuan batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) (Gandjar dan Rohman, 2013)

Penetapan Kadar Kolesterol Ayam Broiler dengan Metode Eksternal. Sebanyak 50 mg ekstrak daging ayam broiler masing-masing bagian paha dan bagian dada, dimasukkan dalam labu 25 mL dan dilarutkan dengan kloroform hingga tanda batas. Sebanyak 1 mL larutan sampel ditambah 2 mL pereaksi Liebermann-Burchard dalam labu 5 mL, digenapkan hingga tanda batas dengan kloroform. Masing-masing campuran diinkubasi selama 5 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum, Larutan dibuat sebanyak tiga kali ulangan. Kadar kolesterol dihitung dengan rumus sebagai berikut:

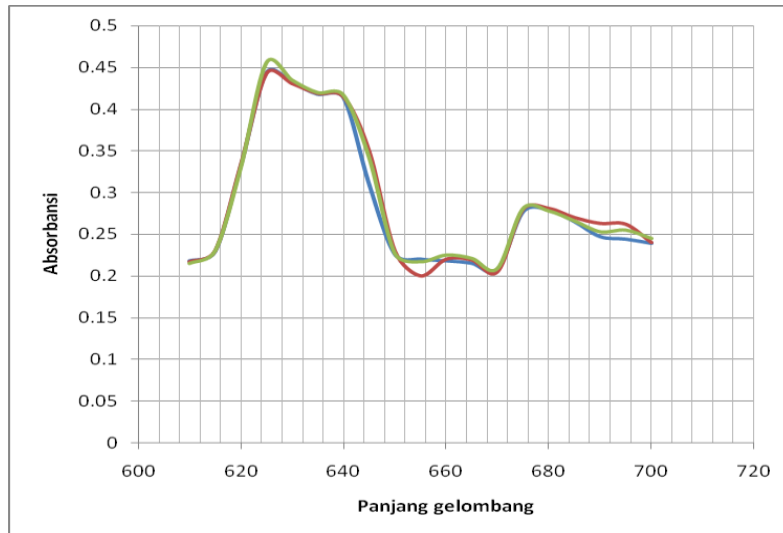
Kadar kolesterol (mg%) =

$$\frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standar}} \times \frac{\text{Konsentrasi standar}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Panjang Gelombang Maksimum dan Operating Time

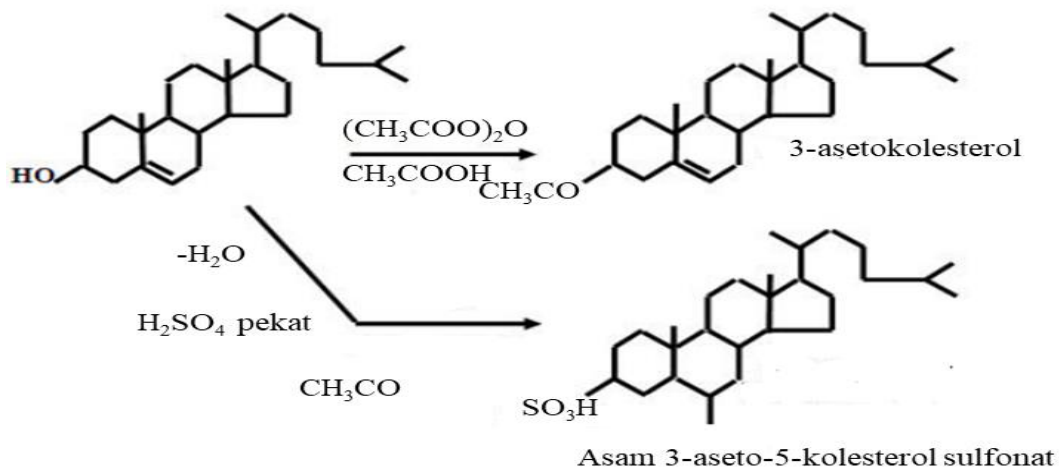
Panjang gelombang yang digunakan adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimum. Berdasarkan hasil penelitian pengukuran absorbansi larutan kolesterol setelah direaksikan dengan pereaksi Liebermann Burchard setelah lima menit yang dilakukan pada rentang panjang gelombang sinar tampak 400-700 nm yang dilakukan sebanyak minimal tiga kali, diperoleh panjang gelombang maksimum (λ) 625,00 nm pada absorbansi rata-rata 0,448.



Gambar 1. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

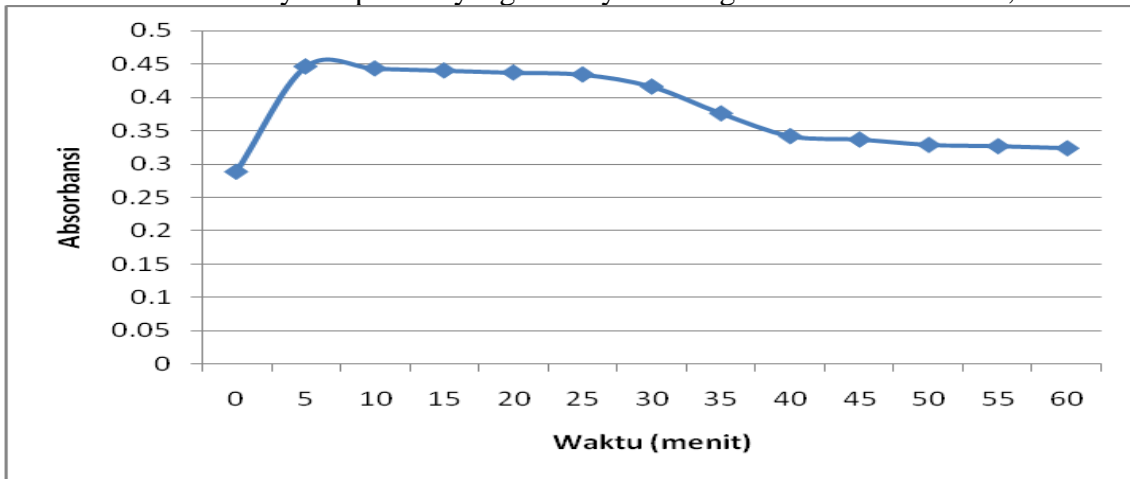
Prinsip uji *Lieberman Burchard* untuk mengidentifikasi senyawa golongan steroid salah satunya adalah kolesterol. Pereaksi *Lieberman Burchard* merupakan campuran antara asam setat anhidrat dan asam sulfat pekat. Asam asetat anhidrat digunakan untuk mengekstraksi kolesterol, memastikan media bebas air dan membentuk turunan asetil dari steroid, asam sulfat pekat ditetesi melewati dinding akan menghasilkan warna hijau untuk senyawa steroid termasuk kolesterol. Penambahan kloroform untuk melarutkan kolesterol, karena 1 bagian kolesterol yang bersifat non polar larut dalam pelarut non polar yaitu 4,5 bagian kloroform sesuai dengan prinsip “like dissolve like” maka senyawa non polar akan larut non polar (Lehninger 1988). Mekanisme yang terjadi dalam uji ini ketika asam sulfat ditambahkan ke dalam campuran yang berisi kolesterol, maka molekul air berpindah dari gugus C3 kolesterol, kolesterol kemudian teroksidasi membentuk 3,5-kolestadiena. Produk ini dikonversi menjadi polimer yang mengandung kromofor yang menghasilkan warna hijau. Warna ini disebabkan karena adanya gugus hidroksi (-OH) dari kolesterol bereaksi dengan pereaksi Lieberman Burchard dan meningkatkan konjugasi dari ikatan tak jenuh dalam cincin yang berdekatan. Warna hijau ini menandakan hasil yang positif.

Reaksi yang terjadi pada uji Lieberman Burchard ini adalah sebagai berikut :



Gambar 2. Reaksi Pembentukan Warna Hijau antara Kolesterol dengan Pereaksi Lieberman Burchard

Penetapan waktu kestabilan warna (*operating time*), merupakan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi hingga terbentuk senyawa produk yang stabil. Pada penelitian ini waktu kestabilan warna diperoleh pada waktu 5 menit, pada menit ke 5 mulai terbentuk senyawa produk yang stabil yaitu dengan nilai absorbansi 0,446.

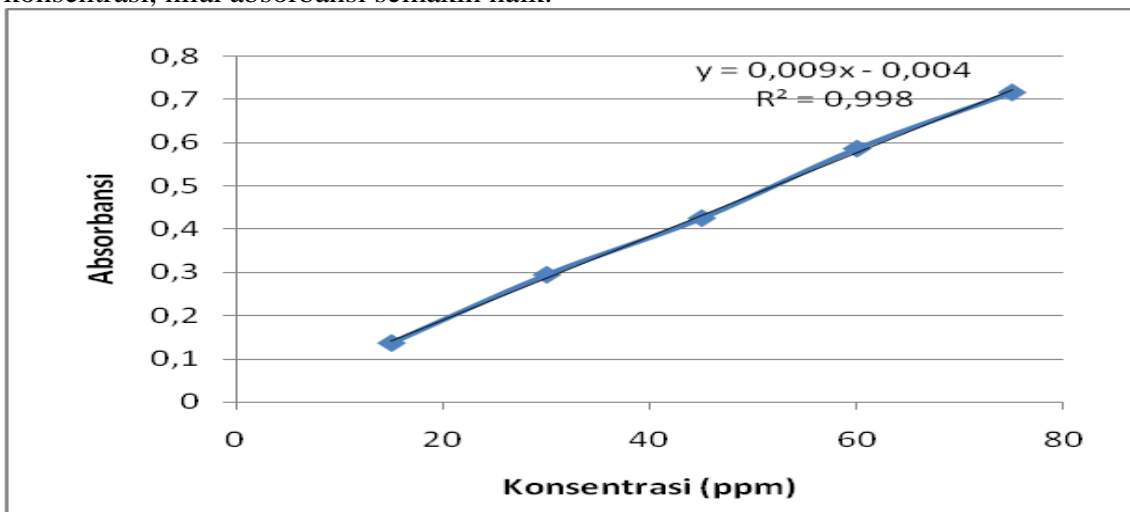


Gambar 4. Grafik Absorbansi Kolesterol Liebermann Burchard Terhadap Waktu Reaksi

Validasi Metode

Validasi metode merupakan suatu cara dalam menguji suatu metode analisis untuk mengetahui apakah sesuai dengan tujuan yang diharapkan. Tujuan validasi metode yaitu membuktikan bahwa hasil percobaan yang diperoleh dapat diterima dan menunjukkan bahwa metode akan bekerja sebagaimana mestinya dibawah kondisi yang akan digunakan. Parameter validasi yang diuji adalah linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitas.

Pertama, hasil penetapan linearitas. Hasil persamaan linear yang diperoleh berdasarkan data konsentrasi larutan standar dengan absorbansi larutan diperoleh $y = 0,009x + 0,004$ dengan nilai $r^2 = 0,998$. Hasil ini menunjukkan ada hubungan yang linear antara absorbansi dengan kadar kolesterol, sehingga sesuai dengan hukum Lambert Beer, dan sesuai syarat linearitas, yaitu lebih besar dari 0,990 (ICH, 1994). Persamaan tersebut nilai b positif, hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, nilai absorbansi semakin naik.



Gambar 5. Grafik Linearitas Konsentrasi terhadap Absorbansi

Kedua, hasil penetapan akurasi. Uji akurasi ini dilakukan untuk melihat ketelitian alat dan analisis dalam membuat konsentrasi larutan yang sesuai dengan kadar yang sebenarnya. Pengujian akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku. Parameter uji akurasi dilakukan dengan pengukuran 3 konsentrasi standar yaitu 15, 45 dan 75 ppm dengan 3 kali pengulangan. Parameter yang dilihat adalah nilai perolehan kembali (%PK). Hasil penetapan dan perhitungan akurasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Parameter Akurasi

konsentrasi (ppm)	Absorban	Konsentrasi perolehan kembali (%)	% Perolehan kembali
15	0,135	14,5556	97,037
15	0,136	14,7778	98,519
15	0,137	14,8889	99,259
30	0,295	32,4444	108,148
30	0,292	32,1111	107,037
30	0,296	32,5556	108,519
45	0,425	46,8889	104,198
45	0,424	46,7778	103,951
45	0,427	47,1111	104,691
60	0,586	64,7778	107,963
60	0,585	64,6667	107,778
60	0,588	65,0000	108,333
75	0,716	79,2222	105,630
75	0,718	79,4444	105,926
75	0,715	79,1111	105,481

Dari data didapatkan %PK sebesar 97,037-108,519%, hasil ini memenuhi batas penerimaan %PK yaitu 80-110% (ICH, 1994). Hal ini menunjukkan metode yang digunakan memiliki nilai ketepatan dan ketelitian yang baik.

Ketiga, hasil penetapan presisi. Presisi adalah ukuran menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui hasil individual rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel yang diambil pada campuran homogen. Parameter uji presisi dilakukan dengan pengukuran pada satu konsentrasi yaitu 30 ppm sebanyak 6 kali pengulangan. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Parameter Presisi

No	Absorbansi	% Perolehan kembali
1	0,295	32,4444
2	0,292	32,1111
3	0,296	32,5556
4	0,295	32,4444

5	0,294	32,3333
6	0,293	32,2222
	\bar{X}	32,3519
	SD	0,1636
	KV	0,506

Didapatkan nilai KV sebesar 0,506, memenuhi syarat nilai keseksamaan yang diterima adalah < 2% (Harmita, 2004). Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode tersebut memiliki nilai keterulangan yang baik.

Keempat, hasil penetapan batas deteksi dan batas kuantitasi. Batas deteksi menunjukkan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan sedangkan batas kuantifikasi menunjukkan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (ICH, 1994). Hasil perhitungan didapatkan Batas deteksi sebesar 0,511 ppm dan batas kuantitasi sebesar 1,703 ppm.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Batas Deteksi dan Batas Kuantitas

Parameter	SD	Slope	Hasil Perhitungan
Batas Deteksi (BD) $\frac{3 \times SD}{slope}$	0,001533	0,009	0,511
Batas Kuantitas (BK) $\frac{10 \times SD}{slope}$	0,001533	0,009	1,703

Penetapan Kadar Kolesterol Ayam Broiler Metode Eksternal

Penetapan kadar kolesterol daging ayam broiler bagian paha atas dan dada dengan penambahan pereaksi Lieberman-Burchard menggunakan spektrofotometri Visible HACH DR 5000 dengan panjang gelombang 625 nm yang telah dilakukan optimasi dan validasi sehingga memenuhi syarat atau kriteria parameter-parameter validasi.

Kadar kolesterol daging ayam broiler bagian paha atas diperoleh 59 mg% dan dada dengan kadar kolesterol 65 mg%. Hal ini sesuai dengan penelitian Suharti et al (2008) bahwa perbandingan rataan bobot karkas bagian dada sebesar $24,01 \pm 6,63$ % dan bobot karkas bagian paha atas ayam broiler dengan umur yang sama yaitu 5 minggu sebesar $17,84 \pm 1,02$ %. Salah satu faktor yang mempengaruhi persentase berat karkas adalah komposisi lemak tubuh. Nuun (2016) mengemukakan bahwa kadar kolesterol tertinggi dari daging ayam broiler tanpa perlakuan berbanding lurus dengan rataan lemak abdominal, diperoleh kadar kolesterol sebesar 123,2 mg/dg rataan lemak abdominal sebesar 2,2%. Sutarpa (2005) menjelaskan lemak yang tinggi di dalam tubuh mengakibatkan terjadinya kenaikan kadar LDL di dalam darah yang merupakan lipoprotein kaya akan kolesterol.

KESIMPULAN

Hasil validasi penetapan kadar kolesterol metode Lieberman-Burchard diperoleh adanya hubungan yang linear antara absorbansi dengan kadar kolesterol dengan persamaan $y = 0,009x + 0,004$, dengan nilai $r^2 = 0,998$. Penetapan akurasi diperoleh %PK sebesar 97,037-108,519%. Penetapan presisi didapatkan nilai KV sebesar 0,506, batas deteksi sebesar 0,511 ppm dan batas kuantitas sebesar 1,703 ppm. Kadar kolesterol daging ayam broiler bagian paha atas diperoleh 59 mg% dan dada dengan kadar kolesterol 65 mg%.

REFERENSI

- Ansel, H.C., 1989, Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah, Edisi keempat, 255-271, 607-608, 700, Jakarta, UI Press
- Arifin MB. 2005. Kandungan Lemak, Kolesterol Daging serta Penampilan Ayam Broiler Umur 3 Minggu sampai 8 Minggu yang diberi Makan Daun Katuk (*Sauropus androgynus*) dalam Ransumnya [skripsi]. Bogor: Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.
- Bender AE., Bender DA. 2001. Food Tables & Labeling. London: Oxford. de Almeida JC, Perassolo MS, Camargo JI, Bragagnolo N, Gross JL. 2006. Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat in southern Brazil. *Rev Bras Cienc Farm.* 42(1): 109-117.
- Departemen Kesehatan, 2000, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Cetakan I,10, 17-19, Jakarta, Dirjen POM, Depkes RI.
- EMA The European Agency for the Evaluation of Medical Products. 1995. ICH. Topic 2B. *Validation of Analytical Procedures: Methodology.* <http://www.Pharmacontract.ch/support/pdf-support/Q2a.pdf> [2 November 2010]
- Freeman W. Mason & Junge Christine, 2008, Kolesterol Rendah Jantung Sehat. Bhuana Ilmu Populer, Jakarta.
- Gandjar, I. G. & Rohman, A., 2012, *Analisis Obat secara Spektroskopi dan Kromatografi*, 315-317, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerbit ITB. Bandung.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3): 117-135.
- Heinrich, et al. 2004. *Fundamental of pharmacognosy and phytotherapi.* Hungary. Elsevier.
- Marliyati, Sri Anna, et al. 2005. Ekstraksi dan Analisis Fitosterol Lembaga Gandum (*Triticum sp.*). *Jurnal Teknol dan Industri Pangan*, Vol. XVI No. 1 Tahun 2005.
- Murtidjo, B.A., 1987. Pedoman Beternak Ayam Broiler. Kanisius. Yogyakarta.
- Murtidjo, B. A. 1992. Pedoman Beternak Ayam Broiler. Kanisius. Yogyakarta.
- Osman H., Chin YK. 2006. Comparative Sensitivities of Cholesterol Analysis using GC, HPLC and Spectrophotometric Methods. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 10 (2): 205210.
- Rasyaf, M. 1997. *Beternak Ayam Petelur.* Edisi ke X. Penebar Swadaya: Jakarta
- Schunack, Walter; Mayer, Klaus and Haake; Manfred. 1990. *Senyawa Obat, Buku Pelajaran Kimia Farmasi.* Edisi kedua. (Terjm. Joke R. Wattimena dan Sriwoelan Soebito). Yogyakarta : GMU-Press.

- Sulistyowati, Y., 2006. Pengaruh Pemberian Likopen terhadap Status Antioksidan (Vitamin C, Vitamin E dan Gluthathion Peroksidase) Tikus (*Rattus norvegicus* galur Sprague Dawley) Hiperkolesterolemik. Tesis. Program Studi Magister Ilmu Biomedik. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Wardiny, Tuty M., 2006. Kandungan Vitamin A, C dan Kolesterol Telur Ayam yang Diberi Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Dalam Ransum. Institut Pertanian Bogor. Tesis.