

TINJAUAN PUSTAKA

Asam Folat: Peran dalam Metabolisme dan Metode Pemeriksaan

Subandrate^{1,6}, Medina Athiah¹, Safyudin¹, Ella Amalia², Irsan Saleh³, Hermansyah⁴, Dwirini Retno Gunarti⁵

1. *Bagian Biokimia dan Kimia Medik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*; 2. *Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*; 3. *Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*; 4. *Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya*; 5. *Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*; 6. *Program Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya*

Korespondensi: Subandrate; Email: subandrate@unsri.ac.id; HP: 085832434722

Abstrak

Tujuan: Untuk mengetahui peran asam folat dalam metabolisme dan metode pemeriksaan asam folat serum. **Metode:** Artikel ini dibuat dengan mengumpulkan sumber rujukan dari Sinta, Google Scholar, Pubmed, dan ScienceDirect. Artikel-artikel yang berisi mengenai asam folat (folic acid) atau folat (folate) dan metode pemeriksaan asam folat (folate detection method, folate analysis method) tahun 2005-2020 dikumpulkan kemudian dibahas dan ditarik kesimpulan secara umum. **Hasil:** Bentuk aktif asam folat, tetrahidrofolat, berperan dalam metabolisme purin, pirimidin (timin), dan metionin dengan cara mendonorkan unit satu karbon (metil, metilen, metenil, formimino atau formil). Kadar asam folat serum normal adalah 6-20 ng/ml. Beberapa metode digunakan untuk memeriksa kadar asam folat serum yakni mikrobiologi, HPLC dan protein binding assay. Metode mikrobiologi merupakan baku emas, tetapi membutuhkan waktu yang lama, mudah terkontaminasi dan perlu tenaga mikrobiologi khusus. Metode HPLC memberikan hasil yang lebih cepat, tetapi mahal dan kurang sensitif. Metode protein binding assay merupakan metode baru yang menggunakan protein ikat folat. Metode ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang baik. Kekurangan pada metode ini adalah penyimpanan reagen dan kalibrasi. **Kesimpulan:** Asam folat dibutuhkan dalam metabolisme nukleotida dan asam amino. Metode pemeriksaan asam folat diharapkan dapat dikembangkan untuk pemeriksaan asam folat yang lebih sederhana, murah dan cepat.

Kata kunci: Asam folat; HPLC; metabolisme; mikrobiologi; protein binding assay

Abstract

Objective: To determine the role of folic acid in metabolism and the method of examination of serum folic acid. **Method:** This article was created by collecting reference sources from Sinta, Google Scholar, PubMed, and ScienceDirect. Articles containing "folic acid", "folate", "folate detection method", and "folate analysis method" for 2005-2020 were collected, discussed and concluded. **Result:** The active form of folic acid, tetrahydrofolate, plays a role in the metabolism of purines, pyrimidines (thymine), and methionine by donating one carbon unit. Normal serum folic acid level is 6-20 ng/ml. Several methods are used to examine serum folic acid levels, namely microbiology, HPLC and protein binding assay. Microbiological method is the gold standard, but it takes a long time, is easily contaminated and requires specialized microbiologists. HPLC provides faster results, but is expensive and less sensitive. The protein binding assay method is a new method that uses folate binding protein. This method has good sensitivity and specificity. Disadvantages of this method are reagent storage and calibration. **Conclusion:** Folic acid is needed in the metabolism of nucleotides and amino acids. It is hoped that the folic acid test method can be developed for a simpler, cheaper

and faster folic acid test.

Keywords: *Folic acid; HPLC; metabolism; microbiology; protein binding assay*

PENDAHULUAN

Asam folat atau folat merupakan salah satu jenis vitamin B. Asam folat dikenal juga dengan nama vitamin B₉. Asam folat terutama terdapat pada dalam tumbuh-tumbuhan seperti tanaman polong-polongan, sayur-sayuran hijau, kacang-kacangan, biji-bijian, dan sari jeruk. Sumber asam folat hewani terutama dalam hati dan susu.¹⁻³

Sebagaimana vitamin B yang lain, peran asam folat dalam tubuh terutama sebagai koenzim. Di dalam tubuh asam folat diaktifkan menjadi tetrahidrofolat (THF). THF berperan sebagai pembawa unit satu karbon dalam berbagai metabolisme. Dalam metabolisme nukleotida, THF medonorkan gugus metenil atau formil. Dalam metabolisme asam amino, THF medonorkan gugus metil.³⁻⁵ Asam folat telah diketahui berperan dalam mencegah terjadinya *neural tube defect*. Selain itu, asam folat digunakan untuk pencegahan dan pengobatan anemia megaloblastik dan beberapa keganasan.^{2,5,6}

Defisiensi asam folat telah dikaitkan dengan berbagai penyakit seperti *neural tube defect*, anemia megaloblastik, beberapa kelainan kongenital, atau penyakit kardiovaskuler.^{2,6,7} Oleh karena itu, berbagai negara melakukan suplementasi atau fortifikasi asam folat dalam makanan. Dampak suplementasi atau fortifikasi asam folat pada berbagai negara telah berhasil mengurangi kejadian *neural tube defect* atau anemia megaloblastik.^{2,6,8,9}

Namun, dampak buruk suplementasi atau fortifikasi asam folat belum pernah dievaluasi.⁷ Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa suplementasi asam folat (360-4000 µg) meningkatkan kasus keguguran.⁹ Data dari *Scientific Advisory Committee on Nutrition*

(SACN) menunjukkan bahwa fortifikasi asam folat berpotensi menimbulkan dampak buruk.^{4,10} Risiko kanker prostat lebih tinggi pada orang yang memiliki kadar asam folat serum tinggi. Terapi dosis tinggi asam folat diduga dapat memicu timbulnya penurunan fungsi kognitif terkait defisiensi vitamin B₁₂.⁴ Pada hewan coba, diet tinggi asam folat telah memicu penurunan kadar enzim metilentetrahidrofolat reduktase dan menyebabkan kerusakan pada hepar.¹¹

Kadar asam folat di dalam darah berkisar antara 5-15 ng/ml. WHO menyatakan kadar asam folat normal dalam serum adalah 6-20 ng/ml. Untuk menjaga kadar asam folat dalam darah diperlukan diet atau suplementasi asam folat yang cukup.^{2,7,12,13} Bila kadar asam folat serum <6 ng/mL, maka kemungkinan mengalami defisiensi asam folat dan bila kadar asam folat serum <3 ng/mL maka dipastikan mengalami defisiensi asam folat. Kadar asam folat serum dikategorikan meningkat bila melebihi 20 ng/mL.¹²

Saat ini telah tersedia berbagai macam pengukuran kadar asam folat. Metode pengukuran asam folat yang tersedia saat ini seperti metode mikrobiologi, *radioassay*, *high performance liquid chromatography* (HPLC) atau menggunakan *enzyme binding protein assay*.¹³⁻¹⁵ Setiap metode pemeriksaan memiliki keunggulan dan keterbatasan masing-masing. Keunggulan metode pemeriksaan meliputi kemudahan proses pemeriksaan, waktu yang cepat, spesifik, dan sensitif. Sedangkan keterbatasan metode pemeriksaan meliputi proses yang rumit, biaya yang mahal, adanya bahaya limbah, adanya faktor pengganggu dan ketidakcocokan pada bentuk folat tertentu.^{13,16,17}

Asam folat dibutuhkan tubuh dalam jumlah yang optimal.¹² Defisiensi

dan kelebihan asam folat telah diduga dan diketahui berkaitan dengan beberapa gangguan kesehatan.^{9,12} Oleh karena itu, perlu diketahui cara yang efektif dalam menentukan kadar asam folat serum. Ulasan artikel berikut ini akan membahas mengenai asam folat serum dan metode pemeriksaan yang dapat digunakan.

METODE

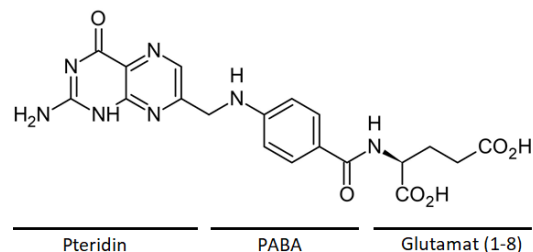
Ulasan artikel ini dibuat dengan mengumpulkan sumber-sumber rujukan dari dalam dan luar negeri seperti Sinta, Google Scholar, Pubmed, dan ScienceDirect. Artikel-artikel yang berisi mengenai asam folat (*folic acid*) atau folat (*folate*) dan metode pemeriksaan asam folat (*folate detection method*, *folate analysis method*) dari sumber-sumber tersebut dikumpulkan. Artikel-artikel yang diambil adalah artikel dari tahun 2005 sampai tahun 2020. Artikel-artikel tersebut kemudian dibahas dan ditarik kesimpulan secara umum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Asam Folat

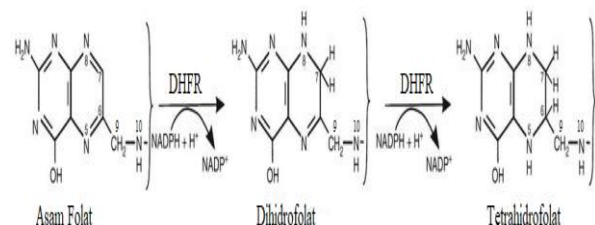
Asam folat merupakan bentuk sintetik vitamin B₉ (folat). Selain asam folat, bentuk folat yang lain adalah tetrahidrofolat.^{1,3,18} Asam folat tersusun dari tiga komponen yang berbeda yaitu derivat pteridin, p-aminobenzoat (PABA) dan glutamat (Gambar 1). Glutamat yang terdapat dalam folat dapat berjumlah satu sampai delapan residu.^{3,18} Asam folat memiliki satu residu glutamat sehingga dikenal sebagai *pteroylmonoglutamate*.^{3,4} Folat dalam makanan berada dalam bentuk *pteroylpolyglutamate*. Asam folat diserap dalam bentuk *pteroylmonoglutamate*. Folat bentuk *pteroylpolyglutamate* dihidrolisis di mukosa

usus menjadi *pteroylmonoglutamate* oleh enzim folat konjugase. Folat diserap melalui difusi pasif pada diet tinggi folat. Secara umum folat diserap melalui protein transporter yakni *proton-coupled folate transporter*, *folate receptor*, dan *reduced folate carrier*. Setelah diserap, *pteroylmonoglutamate* diubah lagi menjadi *pteroylpolyglutamate* di jaringan.^{18,19}



Gambar 1. Struktur asam folat. Asam folat terdiri dari tiga bagian yakni derivat pteridin, PABA dan 1-8 residu glutamat.^{4,18}

Asam folat merupakan bentuk tidak aktif sehingga tidak dapat menjalankan fungsi sebagai koenzim. Untuk menjalankan fungsi dalam metabolisme, asam folat direduksi menjadi dihidrofolat (DHF) dan tetrahidrofolat (THF) oleh enzim dihidrofolat reduktase (Gambar 2). THF merupakan bentuk aktif folat.^{3,18,19} THF dapat membawa unit satu karbon seperti metil, formil, formimino, metilen, dan metenil yang berperan penting dalam metabolisme. Unit satu karbon terikat pada posisi N₅ atau N₁₀.^{5,18}



Gambar 2. Reduksi asam folat menjadi dihidrofolat dan tetrahidrofolat. DHFR: Dihidrofolat Reduktase; } : unit PABA dan residu glutamat; Unit satu karbon terikat pada posisi N₅ atau N₁₀.^{5,19}

Kadar Asam Folat

Asam folat terutama terdapat dalam serum dan sel darah merah. Asam folat juga terdapat pada ASI (air susu ibu) dan cairan serebrospinal. Asam folat dalam tubuh berasal dari makanan. Kadar asam folat dalam serum berkisar antara 5-15 ng/ml. WHO menyatakan kadar asam folat normal dalam serum adalah 6-20 ng/ml, sedangkan pada anak-anak berkisar antara 5-21 ng/ml. Di dalam cairan serebrospinal, kadar asam folat adalah 16-21 ng/ml. Kadar asam folat dalam tubuh terutama ditunjukkan oleh kadar asam folat dalam sel darah merah. Dalam sel darah merah, kadar asam folat berkisar antara 175-316 ng/ml. Kadar asam folat dalam sel darah merah yang kurang dari 140 ng/ml menunjukkan kekurangan asam folat.^{2,16,20} Sementara itu, WHO menyebutkan untuk semua usia, bila kadar asam folat serum kurang dari 3 ng/ml atau kadar asam folat sel darah merah kurang dari 100 ng/ml, maka dapat dikatakan sebagai defisiensi asam folat.¹² Kadar asam folat dalam sel darah merah ibu hamil yang dianggap mampu mencegah kejadian *neural tube defect* pada bayi adalah di atas 400 ng/ml.¹²

Kebutuhan asam folat pada laki-laki dan wanita tidak dibedakan, tetapi tergantung pada usia. Kebutuhan asam folat per hari pada bayi di bawah satu tahun adalah 80 µg, pada anak usia 1-7 tahun adalah 160-200 µg, pada usia 7-9 tahun adalah 300 µg dan pada usia 10 tahun sampai usia tua adalah 400 µg. Pada ibu hamil kebutuhan asam folat per hari adalah 600 µg dan pada ibu menyusui adalah 500 µg.^{21,22} Untuk mencegah kejadian *neural tube defect* pada bayi dilakukan fortifikasi asam folat dalam makanan. Fortifikasi asam folat dianjurkan oleh WHO sejak tahun 1996 dan

diimplementasikan pertama kali tahun 1998.^{7,23}

Peran Asam Folat dalam Metabolisme

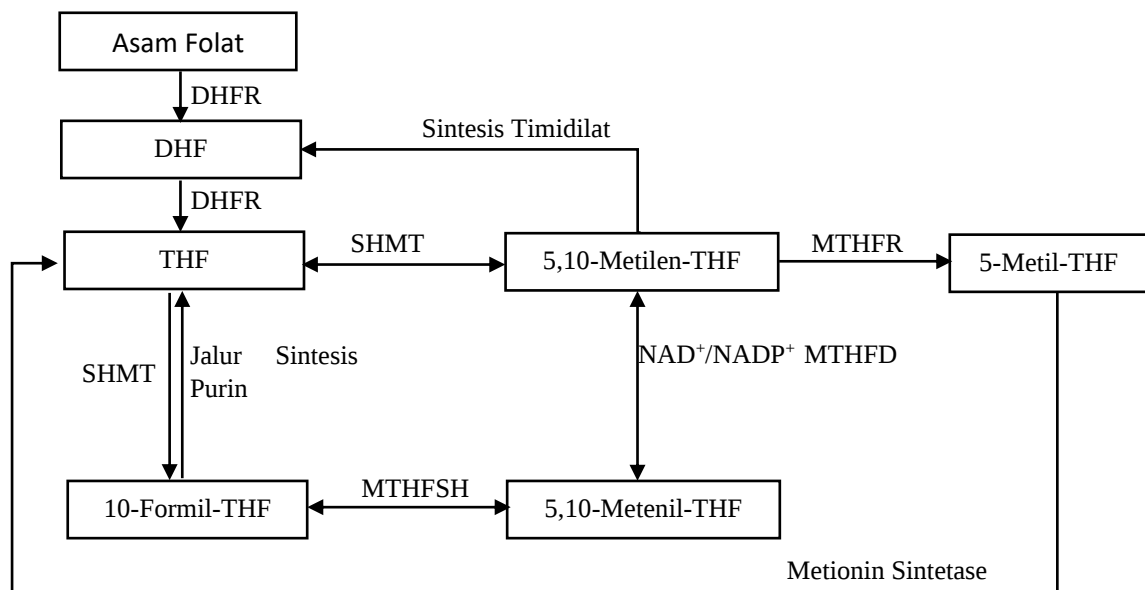
Asam folat memiliki peran penting untuk fungsi otak, kesehatan mental dan emosional. Asam folat membantu produksi DNA, RNA dan asam amino, terutama ketika sel dan jaringan tumbuh dengan cepat, seperti selama masa bayi, remaja, dan kehamilan.²² Peran asam folat adalah dengan cara mendonorkan unit satu karbon dalam sintesis DNA, RNA atau asam amino.

Karena secara biokimia tidak aktif, asam folat diubah oleh DHFR menjadi asam tetrahidrofolat dan metiltetrahidrofolat. Asam folat ini masuk ke dalam sel secara endositosis untuk mempertahankan eritropoiesis normal, interkonversi asam amino, metilasi tRNA, menghasilkan dan menggunakan unit satu karbon, serta mensintesis asam nukleat purin dan timidilat. THF kemudian dimetabolisme oleh enzim serin hidroksimetiltransferase (SHMT) untuk menghasilkan glisin dan 5,10-metilen-THF. Selanjutnya, 5,10-metilen-THF diubah menjadi L-5-metil-THF (bentuk folat utama yang ditemukan dalam plasma) oleh enzim metilentetrahidrofolat reduktase (MTHFR) yang bergantung pada vitamin B₁₂. THF yang dihasilkan dapat diubah menjadi 10-formil-THF dan kemudian menjadi 5,10-metilen-THF oleh enzim metilen tetrahidrofolat dehidrogenase (MTHFD). Proses deaminasi histidin mengubah 5,10-metilen-THF menjadi 5-formimino-THF yang berperan dalam proses pembentukan formiminoglutamat.^{5,18,22}

Metabolisme folat intraseluler merupakan dua siklus metabolisme utama yang saling terkait yakni sintesis asam amino (metionin) dan sintesis DNA/RNA (timidilat dan purin) (Gambar 3). Dalam

sintesis asam amino metionin, 5-Metil-THF bertindak sebagai donor metil untuk remetilasi homosistein menjadi metionin yang dikatalisis oleh enzim metionin sintase yang bergantung pada vitamin B₁₂. Metionin lalu dimetabolisme menjadi S-adenosil metionin (SAM), yang bertindak sebagai donor metil utama dalam banyak

reaksi, termasuk metilasi DNA, histon dan protein lainnya. Siklus metionin sangat sensitif terhadap status folat yang tidak memadai. Ketika status folat buruk, kemampuan sel untuk meremetilasi homosistein seluler terganggu dan ini menyebabkan peningkatan kadar homosistein plasma.^{5,18}



Gambar 3. Siklus Asam Folat. Siklus folat intraseluler meliputi sintesis DNA/RNA (purin dan pirimidin/timidilat) dan sintesis metionin. DHF: Dihydrofolate; DHFR: DHF reduktase; THF: Tetrahydrofolat; SHMT: Serin hidroksimetiltransferase. Reaksi perubahan THF menjadi 5,10-Metilen-THF bersifat bolak-balik dan dikatalisis oleh enzim SHMT; MTHFR: Metilen THF reduktase; MTHFD: Metilen THF dehidrogenase. Reaksi perubahan 5,10-metilen-THF menjadi 5-10-metenil-THF bersifat bolak-balik dan dikatalisis enzim MTHFD; MTHFSH: Metenil THF siklohidrolase. Reaksi perubahan 10-formil-THF menjadi 5,10-Metenil-THF bersifat bolak-balik dan dikatalisis oleh enzim MTHFSH.^{5,18,19,22} Reaksi dengan tanda $\rightleftharpoons$ atau $\leftrightarrow$ adalah reaksi bolak-balik dikatalisis oleh enzim yang sama.

Dalam sintesis pirimidin, 5,10-Metilen-THF berfungsi sebagai kofaktor untuk konversi dUMP (deoksiuridin monofosfat) menjadi dTMP (deoksitimidin monofosfat) yang dikatalisis oleh enzim timidilat sintase. Dalam biosintesis purin, 5,10-metenil-THF dan 10-formil-THF berfungsi sebagai donor gugus satu karbon dalam pembentukan formilglisinamid ribosil 5 fosfat dan inosin monofosfat. DHF, yang terbentuk sebagai produk sampingan

dari reaksi ini, kemudian diubah menjadi THF oleh DHFR. Siklus ini diselesaikan dengan THF menerima unit satu-karbon lain dan meregenerasi 5,10-metilen-THF dengan aksi SHMT. Dalam siklus metabolisme ini, reaksi yang dikatalisis oleh enzim MTHFR sangat penting untuk regulasi tersedia 5-metil-THF, yang diperlukan untuk sintesis metionin. Polimorfisme pada gen MTHFR dapat mempengaruhi aktivitas enzim dan

ketersediaan 5-metil-THF dalam darah.^{5,18,22,24}

Defisiensi dan Kelebihan Asam Folat

Upaya dunia kesehatan untuk mengurangi defisiensi asam folat tampaknya menunjukkan keberhasilan. Suplementasi asam folat berhasil mengurangi defisiensi asam folat hingga 16-0,5%.^{16,23} Pada tahun 2018, hasil penelitian Diaz dkk di Amerika Serikat menyebutkan angka kejadian defisiensi asam folat hanya sekitar 2%. Pada penelitian tersebut nilai ambang batas defisiensi asam folat adalah 4 ng/ml.¹⁶

Defisiensi asam folat telah terbukti terkait dengan berbagai kelainan. Kekurangan asam folat pada ibu hamil menyebabkan peningkatan risiko cacat genetik pada bayi baru lahir seperti *neural tube defect*. Selain itu, pada ibu hamil defisiensi asam folat dapat meningkatkan risiko kelahiran bayi kurang bulan. Defisiensi asam folat atau vitamin B₁₂ juga menyebabkan anemia megaloblastik.^{6,7} Data-data dari metaanalisis terakhir menunjukkan bahwa kekurangan asam folat berkaitan dengan hiperhomosisteinemia, hipertensi, kelainan kardiovaskuler, dan kelainan serebrovaskuler.^{2,10} Selain itu, peningkatan risiko kejadian kanker seperti kanker payudara, kanker pankreas, dan kanker prostat juga berkaitan dengan kekurangan asam folat. Bahkan, defisiensi asam folat terkait dengan kelainan neurologi seperti penurunan fungsi kognitif, demensia, dan penyakit Alzheimer.^{2,7,10}

Defisiensi asam folat dan dampaknya telah mendorong negara-negara di Amerika dan Eropa untuk melakukan suplementasi atau fortifikasi asam folat.²³ Fortifikasi asam folat dianjurkan sampai 1000 µg per hari untuk populasi penduduk secara umum.² Untuk kondisi khusus seperti kehamilan, bahkan

pernah dianjurkan hingga dosis 4000 µg per hari terutama pada wanita yang memiliki riwayat melahirkan bayi dengan *neural tube defect*.²³

Suplementasi atau fortifikasi asam folat telah terbukti mengurangi angka kejadian *neural tube defect* pada bayi baru lahir. Namun, ada beberapa laporan terkait dampak kelebihan asam folat. WHO menyebutkan bahwa kadar asam folat serum dikatakan meningkat bila kadarnya lebih dari 20 ng/ml. Suplementasi asam folat sampai dosis 5000 µg per hari dilaporkan menyamarkan anemia yang disebabkan defisiensi vitamin B₁₂. Diet tinggi folat juga dilaporkan meningkatkan kejadian keguguran hingga 1,1 kali dibandingkan tanpa suplementasi. Diet tinggi folat dikhawatirkan mempengaruhi epigenetik sehingga mendorong pertumbuhan tumor atau kanker. Pendapat yang kontroversi adalah mengenai kanker kolorektal. Suplementasi asam folat dianggap tidak menurunkan kejadian adenoma kolorektal, tetapi kadar asam folat serum yang tinggi berkaitan dengan perubahan lesi pra-neoplasma menjadi neoplasma.^{2,7,10,23} Selain itu, fortifikasi juga menyebabkan peningkatan asam folat yang tidak dimetabolisme. Hal tersebut diduga terkait dengan terjadinya defisiensi palsu enzim MTHF reduktase. Konsumsi asam folat secara intravena lebih dari 200 µg per hari menyebabkan terbentuknya *unmetabolized folic acid* yang berkaitan dengan penurunan fungsi kognitif.^{11,23}

Metode Pengukuran Asam Folat Serum

Asam folat baik di dalam sel, serum ataupun cairan tubuh lain dapat ditentukan kadarnya dengan berbagai metode pemeriksaan. Secara umum metode pemeriksaan asam folat dibagi menjadi beberapa metode yakni metode

biologi, metode kimia, metode mikrobiologi, metode biospesifik, dan metode kromatografi. Metode biologi dan kimia sudah jarang digunakan karena kurang praktis dan sensitif dibandingkan metode lain.^{13,14}

Metode pemeriksaan asam folat secara mikrobiologi merupakan metode standar yang digunakan dalam pemeriksaan asam folat. Metode ini biasanya menggunakan bakteri *Lactobacillus rhamnosus* dan media berbasis kasein. Dengan metode ini, berbagai macam turunan folat, termasuk 5-metil-THF, bentuk folat dominan dalam plasma, sel darah merah dan hati, dan turunan formil dapat diidentifikasi.^{13,14}

Prinsip dalam pemeriksaan asam folat secara mikrobiologi adalah tingkat pertumbuhan bakteri karena tersedianya asam folat. Standar asam folat dan sampel dicampur dengan media kasein dan *Lactobacillus rhamnosus* dalam sebuah tabung. Setelah beberapa hari dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer. Kadar asam folat dalam sampel ditentukan dengan menggunakan kurva standar asam folat.^{13,14}

Pemeriksaan asam folat secara mikrobiologi dipengaruhi oleh beberapa hal seperti keahlian, pH dan kontaminan. Metode pemeriksaan asam folat secara mikrobiologi membutuhkan analisis berkeahlian khusus dalam bidang mikrobiologi. Pemeriksaan dengan metode ini akan optimal pada pH 6,7. Adanya beberapa kontaminan, mikroorganisme lain, menyebabkan proses pemeriksaan membutuhkan teknik pemanasan. Teknik pemanasan sering menyebabkan kerusakan asam folat yang diperiksa.^{13,14}

Metode pemeriksaan asam folat secara mikrobiologi terus mengalami perkembangan. Pertama kali metode ini dilakukan pada tahun 1943, kemudian

pada tahun 1986 mengalami perkembangan dengan pengukuran secara semiotomatis. Pada awalnya metode ini relatif sulit dilakukan dan membutuhkan waktu yang lama, yakni sampai 4 hari. Selain itu, penambahan antibiotik khusus dapat mencegah kontaminan dan mencegah hilangnya folat akibat pemanasan. Metode ini kemudian berkembang dengan menggunakan 96-plate well dan dibaca secara otomatis menggunakan spektrofotometer. Metode baru ini dapat meningkatkan sensitifitas pemeriksaan asam folat dari 100 fmol menjadi 10 fmol. Selain itu, lama pengerjaan sampel dapat dipersingkat menjadi 18 jam dan kuantitas pengerjaan sampel dapat diperbanyak hingga 600 sampel.^{13,14}

Secara kromatografi, pengukuran asam folat yang digunakan saat ini adalah HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Metode HPLC pada awalnya dikembangkan dari kromatografi pertukaran ion. Kromatografi pertukaran ion merupakan teknik yang paling populer dalam memisahkan folat. Selain itu, dapat juga digunakan metode kromatografi afinitas. Kromatografi afinitas menggunakan protein ikat folat sebagai fase diam. Kedua teknik kromatografi tersebut dapat dipergunakan secara bersama-sama.^{13,14}

Pada metode HPLC selain teknik pemisahan, hal yang penting juga adalah deteksi asam folat dalam fraksi. Teknik deteksi asam folat yang umumnya digunakan yakni menggunakan teknik ultraviolet (280 nm) dan fluoresensi. Teknik ultraviolet (UV) merespon semua folat dan memiliki korelasi yang baik dengan pemeriksaan secara mikrobiologi. Namun, teknik UV memiliki sensitivitas yang rendah terhadap sampel yang memiliki kadar asam folat yang rendah.

Teknik deteksi yang lebih baik dari teknik UV adalah fluoresensi. Deteksi fluoresensi dapat memberikan spesifisitas dan sensitivitas yang lebih baik daripada teknik UV. Asam folat (DHF atau THF) dalam fraksi diubah menjadi pterin fluoresen dengan melibatkan hipoklorit sehingga dapat dideteksi kromatogram.^{13,14}

Metode HPLC telah dilaporkan memiliki korelasi yang baik dengan metode mikrobiologi. Namun, metode HPLC memiliki sensitivitas yang rendah dibandingkan metode mikrobiologi. Kadar asam folat yang dideteksi dengan HPLC lebih rendah 30-50% dibandingkan metode mikrobiologi. Selain itu, prosedur metode HPLC relatif lebih sulit karena terkait dengan perawatan rutin peralatan dan relatif lebih mahal.^{13,14} Untuk mengatasi hal tersebut dikembangkan metode LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometric*). Metode LC-MS memberikan harapan untuk pemisahan

yang akurat dari beberapa bentuk folat. Namun saat ini metode LC-MS belum digunakan untuk mengukur kadar asam folat serum.^{13,14}

Sebagai alternatif metode yang sensitif, spesifik dan cepat dalam metode pengukuran asam folat maka dikembangkan metode biospesifik. Saat ini ada dua teknik biospesifik yaitu menggunakan protein pengikat vitamin dan menggunakan antibodi. Masing-masing kedua teknik tersebut dibagi lagi menjadi dua kelompok berdasarkan cara deteksi asam folat yakni kelompok yang menggunakan radiolabel (*radio-labelled protein binding assay* atau *radioimmunoassay*) dan kelompok yang menggunakan enzim (*enzyme protein binding assay* atau *enzyme linked immunosorbent assay*). Metode biospesifik membutuhkan waktu pemeriksaan beberapa jam saja (1-3 jam).^{13,14}

Tabel 1. Perbandingan metode mikrobiologi, HPLC dan *protein binding assay*^{13,14,16,17}

Metode	Mikrobiologi	HPLC	Protein binding assay
Prinsip	Kadar folat sebanding dengan pertumbuhan mikroorganisme	Pemisahan secara kromatografi dan deteksi folat berdasarkan standar	Adanya ikatan folat dengan protein ikat folat
Tahapan prosedur	Lebih sederhana	Lebih panjang	Lebih panjang
Kelebihan	Standar baku, biaya peralatan murah, sensitif, spesifik	Sangat spesifik, minimal gangguan	Cepat (1–3 jam), biaya relatif murah, tidak diperlukan keahlian, mudah dilakukan, spesifisitas tinggi
Kekurangan	Lama (1-3 hari), kontaminan, membutuhkan keahlian mikrobiologi, masalah media tumbuh dan pemeliharaan yang tepat	Biaya mahal, perlu standar untuk semua bentuk folat, sensitivitas rendah, hanya untuk monoglutamat	Sensitivitas tiap kit berbeda, masa pakai kit sangat pendek, hanya untuk monoglutamat

Penggunaan radiolabel atau *radioassay* memang dianggap memberikan hasil yang baik dalam mengukur kadar asam folat

serum atau sel darah merah. Namun, korelasi antara metode *radioassay* dan metode mikrobiologi masih kontroversi.

Sebagian hasil penelitian menunjukkan korelasi yang baik antara metode *radioassay* dan metode mikrobiologi, tetapi sebagian lagi menunjukkan perbedaan hasil antara metode *radioassay* dan metode mikrobiologi. Selain itu, permasalahan pada metode *radioassay* adalah adanya limbah radioaktif sehingga tidak disarankan pada pemeriksaan rutin.¹³⁻¹⁵

Enzyme protein binding assay (EPBA) atau *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang lebih baik dalam menentukan kadar asam folat. Perbedaan kedua metode ini terletak pada protein atau antibodi yang digunakan. ELISA menggunakan antibodi dan sudah umum digunakan. EPBA menggunakan protein ikat folat dalam susu sapi. Teknik ini banyak dikembangkan untuk pengukuran folat dalam makanan dan menunjukkan hasil yang sangat baik. Korelasi antara EPBA dan metode mikrobiologi sangat tinggi. Di Indonesia teknik ini pertama kali dikembangkan tahun 2008 lalu diteruskan secara murni pada tahun 2018. Metode ini menawarkan potensi spesifisitas yang luas dan sensitivitas yang cukup baik. Analisis terhadap metode ini (kit komersial) yang memeriksa folat dalam makanan menunjukkan nilai yang lebih sensitif dibandingkan metode mikrobiologi. Permasalahan dalam metode ini adalah terkait dengan reagen atau kalibrasi yang membutuhkan penyimpanan atau penanganan yang tepat.^{3,13,14,25}

Setiap metode pemeriksaan asam folat memiliki permasalahan tersendiri. Tabel 1 memperlihatkan perbandingan antara kelebihan dan kekurangan masing-masing metode pemeriksaan asam folat. Saat ini biaya pemeriksaan asam folat masih mahal dan terbatas pada laboratorium tertentu. Pemeriksaan

dengan metode biospesifik masih dianggap baru dan memiliki potensi untuk menjadi metode yang lebih baik dalam memeriksa kadar asam folat serum. Oleh karena itu, pengembangan metode ini dengan berbagai teknik deteksi diperlukan untuk mendapatkan metode yang lebih baik, murah dan sederhana dalam pengukuran kadar asam folat serum.^{13,14,16,17}

SIMPULAN

Asam folat dan turunannya memiliki peran penting dalam metabolisme dengan mendonorkan unit satu karbon. Metabolisme nukleotida (DNA/RNA) dan asam amino (metionin) mutlak membutuhkan folat. Kekurangan asam folat telah terbukti menimbulkan berbagai penyakit. Begitu pun dengan kelebihan asam folat, berpotensi menimbulkan gangguan kesehatan bagi manusia. Oleh karena itu, kadar asam folat di dalam tubuh harus dijaga dalam jumlah yang optimal. Metode pemeriksaan asam folat yang masih menjadi standar adalah metode mikrobiologi. Pemeriksaan secara biospesifik dengan antibodi (ELISA) atau protein pengikat (EPBA) memberikan hasil yang lebih baik. Pengembangan teknik pengukuran asam folat secara biospesifik dengan berbagai teknik deteksi yang lebih baik diperlukan untuk mengatasi permasalahan metode pemeriksaan sebelumnya.

DUKUNGAN FINANSIAL

Hibah sains, teknologi dan seni Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya tahun 2021

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada dr. Dwi Indira Setyorini, SpPD yang membantu memberikan sumber literatur dan

menyunting tulisan akhir sebelum diserahkan ke editor.

KONFLIK KEPENTINGAN

Setiap penulis tidak memiliki konflik kepentingan dalam penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hansen DK, Inselman AL. Folic Acid. In: Encyclopedia of Toxicology [Internet]. Elsevier; 2014. p. 616–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612620017>
2. Liew SC. Folic acid and diseases - Supplement it or not? Revista da Associacao Medica Brasileira. 2016.
3. Subandrate S, Gunarti DR, Sadikin M. Karakteristik dan Peran Protein Ikat Folat (PIF). J Kedokt dan Kesehat. 2016;
4. SACN. Update on folic acid [Internet]. Scientific Advisory Committee on Nutrition. 2017. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/637111/SACN_Update_on_folic_acid.pdf
5. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. Biokimia Harper. 27th ed. Jakarta: EGC; 2013.
6. Talaulikar V, Arulkumaran S. Folic acid in pregnancy. Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine. 2013.
7. Field MS, Stover PJ. Safety of folic acid. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2018 Feb;1414(1):59–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.13499>
8. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. Lancet [Internet]. 2013 Mar;381(9871):1029–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673612620017>
9. De-Regil LM, Peña-Rosas JP, Fernández-Gaxiola AC, Rayco-Solon P. Effects and safety of periconceptional oral folate supplementation for preventing birth defects. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015.
10. NTP. NTP Monograph: Identifying Research Needs for Assessing Safe Use of High Intakes of Folic Acid. US Departement of Health and Human Services. 2015.
11. Christensen KE, Mikael LG, Leung K-Y, Al E. High folic acid consumption leads to pseudo-MTHFR deficiency, altered lipid metabolism, and liver injury in mice. Am J Clin Nutr. 2015;101:646–858.
12. World Health Organization. Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations for Assessing Folate Status in Populations. Vitam Miner Nutr Inf Syst. 2015;1–7.
13. Arcot J, Shrestha A. Folate: Methods of analysis. Trends Food Sci Technol. 2005;16(253–266).
14. Iyer R, Tomar SK. Determination of folate/folic acid level in milk by microbiological assay, immuno assay and high performance liquid chromatography. J Dairy Res [Internet]. 2013 May 18;80(2):233–9. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022029913000149/type/journal_article

15. Arppe R, Mattsson L, Korpi K, Blom S, Wang Q, Riuttamäki T, et al. Homogeneous assay for whole blood folate using photon upconversion. *Anal Chem.* 2015;87(3):1782–1788.
16. Diaz K, Na Z, Gupta S, Arya V, Martinez L, Dhaliwal S, et al. Prevalence of Folic Acid Deficiency and Cost Effectiveness of Folic Acid Testing: A Single Center Experience. *Blood* [Internet]. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):4878. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111607>
17. Theisen-Toupal J, Horowitz GL, Breu AC. Utility, charge, and cost of inpatient and emergency department serum folate testing. *J Hosp Med.* 2013;8(2):91–5.
18. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica.* 2014;44(5):480–8.
19. Alpers DH. Absorption and blood/cellular transport of folate and cobalamin: Pharmacokinetic and physiological considerations. *Biochimie* [Internet]. 2016 Jul;126:52–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908415003533>
20. Homayouni Rad A, Yari Khosroushahi A, Khalili M, Jafarzadeh S. Folate bio-fortification of yoghurt and fermented milk: a review. *Dairy Sci Technol* [Internet]. 2016;96(4):427–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13594-016-0286-1>
21. Kementerian Kesehatan. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2019 tentang Angka Kecukupan Gizi yang Dianjurkan Untuk Masyarakat Indonesia [Internet]. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2019. Available from: <https://peraturan.bpk.go.id/Home/Details/138621/permenkes-no-28-tahun-2019>
22. Mahmood L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *J Heal Res Rev.* 2014;
23. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ. Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. *Nutrients* [Internet]. 2011 Mar 15;3(3):370–84. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/3/3/370>
24. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto)* [Internet]. 2017/07/20. 2017 Sep;57(5):142–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28598562>
25. Budiman M, Sadikin M, Prijanti A. Human Serum Folate can be Measured Using Folate Binding Protein Linked to Enzyme-Labeled Protein Ligand Binding Assay (ELPLBA) as well as ELISA. *Acta Biochim Indones.* 2018;1(2):59–67.