

DISERTASI

**PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT (PIF) DALAM
ASI DAN HUBUNGAN KADAR PIF ASI DENGAN
KADAR ASAM FOLAT BAYI ASI EKSKLUSIF**



**SUBANDRATE
04013682025005**

**PROGRAM STUDI SAINS BIOMEDIK
PROGRAM DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2024**

DISERTASI

**PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT (PIF) DALAM
ASI DAN HUBUNGAN KADAR PIF ASI DENGAN
KADAR ASAM FOLAT BAYI ASI EKSKLUSIF**

**Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memeroleh Gelar
Doktor Ilmu Sains Biomedik pada UNIVERSITAS SRIWIJAYA**



**SUBANDRATE
04013682025005**

**PROGRAM STUDI SAINS BIOMEDIK
PROGRAM DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

DISERTASI

**PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT (PIF) DALAM ASI DAN
HUBUNGAN KADAR PIF ASI DENGAN KADAR
ASAM FOLAT BAYI ASI EKSKLUSIF**

Diajukan untuk Melengkapi Salah Satu Syarat Memeroleh Gelar
Doktor Ilmu Sains Biomedik pada UNIVERSITAS SRIWIJAYA

Oleh:

SUBANDRATE
04013682025005

Palembang, 23 Desember 2024

Promotor



Prof. Dr. dr. Mgs. Irsan Saleh, M.Biomed
NIP. 19660929 199601 1 001

Kopromotor I



Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS
NIP. 19610123 198910 2 001

Kopromotor II



Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., PhD
NIP. 19711119 199702 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya



di Syarif Husin, M.S
NIP. 19611209 199203 1 003

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya ilmiah berupa Disertasi ini dengan judul “Purifikasi Protein Ikat Folat (PIF) dalam ASI dan Hubungan Kadar PIF ASI dengan Kadar Asam Folat Bayi ASI Eksklusif” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran/Program Pascasarjana Universitas Sriwijaya pada tanggal 23 Desember 2024.

Palembang, 23 Desember 2024

Tim Penguji Karya Ilmiah Disertasi

Ketua:

1. Prof. Dr. dr. Mgs. Irsan Saleh, M.Biomed
NIP. 19660929 199601 1 001


(.....)

Anggota:

2. Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS
NIP. 19610123 198910 2 001
3. Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., PhD
NIP. 19711119 199702 1 001
4. Dr. dr. Zen Hafy, M.Biomed
NIP. 19721229 199803 1 002
5. Dr. dr. Yudianita Kesuma, SpA(K), M.Kes
NIP. 19700317 200912 2 001
6. Prof. dr. Mohamad Sadikin, D.Sc
NIP. 19481106 197503 1 001


(.....)


(.....)


(.....)


(.....)


(.....)

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Sriwijaya



dr. Syarif Husin, M.S
NIP. 19611209 199203 1 003

Wakil Dekan Bidang Akademik



Prof. Dr. dr. Irfannuddin, SpKO, M.PdKed
NIP. 19730613 199903 1 001

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Subandrate

Nim : 04013682025005

Judul : Purifikasi Protein Ikat Folat (PIF) dalam ASI dan Hubungan Kadar PIF ASI dengan Kadar Asam Folat Bayi ASI Eksklusif

Menyatakan bahwa Disertasi saya merupakan hasil karya sendiri didampingi tim Promotor dan Ko-Promotor dan bukan hasil penjiplakan/*plagiat*. Apabila ditemukan unsur penjiplakan/*plagiat* dalam Disertasi ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku. Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.



Palembang, 23 Desember 2024



Subandrate
NIM 04013682025005

ABSTRAK

Pendahuluan: Asam folat memiliki peran yang penting dalam pertumbuhan dan perkembangan bayi. Asam folat dibutuhkan dalam jumlah optimal. Defisiensi asam folat berkaitan dengan *neural tube defect*, sementara itu kelebihan asam folat juga menimbulkan risiko keganasan. Untuk mengetahui kadar asam folat serum dapat dilakukan dengan teknik pemeriksaan *enzyme protein binding assay* (EPBA). Salah satu sumber protein dalam EPBA adalah protein ikat folat (PIF). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik protein ikat folat dari ASI dan hubungannya dengan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dilanjutkan dengan penelitian analisis korelatif. Karakteristik PIF dari ASI diidentifikasi dengan *salting out*, kromatografi, *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), *western blot*, dan *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry* (LC-MS/MS). Kadar PIF dalam ASI dan kadar asam folat serum bayi diukur dengan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Hasil: Protein ikat folat dapat diisolasi dari ASI dengan metode *salting out* bertingkat mulai dari 45%, 75%, sampai 95%. Pemurnian PIF dapat dilakukan dengan kromatografi pertukaran ion dan kromatografi afinitas. SDS-PAGE dan *western blot* menunjukkan bahwa PIF dari ASI memiliki satu pita yang hampir sejajar dengan marker 37 kDa. Berdasarkan hasil LC-MS/MS, PIF dari ASI memiliki sekuens sekitar 257 asam amino. Uji korelasi antara kadar PIF dalam ASI dan kadar asam folat serum bayi menunjukkan nilai $p=0,230$ dan $r=0,222$.

Simpulan: Protein ikat folat dari ASI memiliki berat molekul sekitar 37 kDa dengan sekuens 257 asam amino. Protein ikat folat dalam ASI tidak berkorelasi dengan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

Kata kunci: Asam folat, ASI, protein ikat folat.

ABSTRACT

Introduction: Folic acid plays a crucial role in the growth and development of infants and needs to be present in optimal amounts. Folic acid deficiency is associated with neural tube defects, while excess folic acid can also increase cancer risk. Serum folate levels can be measured using the enzyme protein binding assay (EPBA), which utilizes folate binding protein (FBP) as a source of protein. This study aims to investigate the characteristics of folate binding protein from breast milk and its relationship with serum folate levels in exclusively breastfed infants.

Methods: This research was an experimental laboratory study followed by correlational analysis. The characteristics of FBP from breast milk were identified using salting out, chromatography, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), western blot, and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS). The FBP levels in breast milk and serum folate levels in infants were measured using the ELISA method.

Results: Folate-binding protein was isolated from breast milk using a tiered salting-out method starting from 45%, 75%, to 95%. The purification of FBP was achieved through ion exchange chromatography and affinity chromatography. SDS-PAGE and western blot analyses showed that FBP from breast milk had a single band that nearly aligned with the 37 kDa marker. Based on LC-MS/MS results, FBP from breast milk had a sequence of approximately 257 amino acids. Spearman correlation tests between the levels of FBP in breast milk and the serum folate levels in infants showed a p-value of 0.230 and an r-value of 0.222.

Conclusion: The folate-binding protein from breast milk has a molecular weight of approximately 37 kDa and consists of 257 amino acids. Additionally, this folate-binding protein from breast milk does not correlate with the serum folate levels of exclusively breastfed infants.

Keywords: Breast milk, folate, folate binding protein.

RINGKASAN

PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT (PIF) DALAM ASI DAN HUBUNGAN KADAR PIF ASI DENGAN KADAR ASAM FOLAT BAYI ASI EKSKLUSIF

Karya tulis ilmiah berupa Disertasi, Desember 2024

Subandrate; Dibimbing oleh Mgs. Irsan Saleh, Dwirini Retno Gunarti, Hermansyah

Program Studi Sains Biomedik Program Doktor, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya

xxiii + 188 halaman, 30 gambar, 18 tabel, 22 lampiran

Asam folat memiliki peran untuk pertumbuhan dan perkembangan. Peran utama asam folat dalam tubuh adalah sebagai koenzim yang terlibat dalam metabolisme nukleotida dan asam amino, yang sangat penting untuk pertumbuhan dan perkembangan, terutama pada otak dan sistem saraf bayi. Defisiensi asam folat berhubungan dengan berbagai masalah kesehatan seperti cacat tabung saraf, anemia megaloblastik, dan beberapa kelainan kongenital. Sementara itu, ada juga risiko kesehatan yang terkait dengan kelebihan asam folat. Oleh karena itu, kadar asam folat harus berada dalam jumlah yang optimal. Salah satu metode pengukuran asam folat serum yang menawarkan potensi efisien dan tepat adalah *enzyme binding protein assay* (EPBA). Metode ini menggunakan protein ikat folat (PIF). Salah satu sumber protein ikat folat adalah ASI. Protein ikat folat dalam ASI diduga berperan dalam transportasi asam folat dan membantu penyerapan asam folat pada bayi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik protein ikat folat dari ASI dan hubungannya dengan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk mengisolasi, memurnikan, dan menentukan karakteristik protein ikat folat dari ASI. Penelitian ini juga melakukan pengembangan metode pengukuran kadar asam folat serum dengan PIF yang diisolasi dari ASI. Penelitian analisis komparatif digunakan untuk mengetahui perbedaan kadar asam folat yang diukur dengan metode EPBA dan ELISA. Penelitian analisis korelatif digunakan untuk menilai hubungan antara kadar PIF dalam ASI dan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Kimia Dasar Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, dari Maret 2023 – Oktober 2024.

Isolasi dan purifikasi PIF dilakukan dari sampel ASI 1000 mL. Dalam penelitian, PIF dapat diisolasi dengan metode *salting out* secara bertingkat menggunakan amonium sulfat konsentrasi 45%, 75% sampai 95%. Purifikasi PIF dengan kromatografi pertukaran ion mendapatkan adanya tiga puncak, yakni puncak Puncak I, II dan III DEAE Endapan II. Protein ikat folat diduga ada pada puncak II. Purifikasi PIF dengan kromatografi afinitas mendapatkan adanya dua puncak

yakni Puncak I.2 AF Endapan II dan Puncak II AF Endapan II. Puncak kedua ini adalah protein ikat folat.

Kemurnian PIF hasil isolasi dikonfirmasi dengan adanya satu pita pada *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *western blot*. Pada SDS-PAGE dan *western blot*, PIF menunjukkan pita yang hampir sejajar dengan pita 37 kDa pada marker. Hasil uji *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry* (LC-MS/MS) terhadap pita tersebut menunjukkan adanya sekuens dengan panjang sekitar 257 asam amino. Protein ikat folat dari ASI dapat mengikat asam folat secara *in vitro* dengan perbandingan 1:1 mol. Pengikatan asam folat oleh PIF dipengaruhi oleh derajat keasaman dan asetilasi atau reduksi terhadap asam amino tertentu, tetapi tidak dipengaruhi keberadaan ion kalsium.

Protein ikat folat dari ASI dapat digunakan dalam metode EPBA untuk mengukur kadar asam folat serum. Uji presisi metode tersebut menunjukkan nilai standar deviasi relatif 4,17 dan 9,81 (<10%), dan uji akurasinya menunjukkan nilai 83,4%-106,9% (80-120%). Metode EPBA mampu mengukur kadar asam folat serum dengan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan ELISA ($p < 0,05$).

Dalam penelitian ini, dari 30 subjek penelitian didapatkan rerata kadar PIF ASI adalah $32,74 \pm 15,9$ ng/mL dan rerata kadar asam folat serum bayi adalah $10,3 \pm 6,6$ ng/mL. Hasil uji korelasi Spearman antara kadar PIF ASI dan kadar asam folat serum bayi menunjukkan nilai $p = 0,230$ ($p > 0,05$) dan nilai $r = 0,226$. Nilai tersebut memperlihatkan bahwa korelasi antara kadar PIF ASI dan kadar asam folat serum bayi tidak bermakna.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa PIF dapat diisolasi dan purifikasi dari ASI dengan metode *salting out* bertingkat, kromatografi pertukaran ion, dan kromatografi afinitas. Protein ikat folat dari ASI memiliki berat molekul sekitar 37 kDa, dan mampu mengikat asam folat dengan perbandingan 1:1 mol. Protein ikat folat dari ASI dapat digunakan dalam metode EPBA untuk mengukur kadar asam folat serum. Namun, tidak ada korelasi antara kadar PIF ASI dan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

Kata kunci: Asam folat, ASI, protein ikat folat.

Kepustakaan: 162 (2012-2024)

SUMMARY

PURIFICATION OF FOLATE BINDING PROTEIN (FBP) IN BREAST MILK AND THE RELATIONSHIP BETWEEN FBP LEVELS IN BREAST MILK AND FOLATE LEVELS IN EXCLUSIVELY BREASTFED INFANTS

Scientific Thesis in the form of a Dissertation, December 2024

Subandrate; Supervised by Mgs. Irsan Saleh, Dwirini Retno Gunarti, Hermansyah

Doctoral Program of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universitas Sriwijaya

xxiii + 188 pages, 30 figures, 18 tables, 22 appendices

Folate plays a critical role in growth and development. Its primary function in the body is as a coenzyme involved in nucleotide and amino acid metabolism, which is particularly important for the growth and development of the brain and nervous system in infants. Folate deficiency is associated with various health issues such as neural tube defects, megaloblastic anemia, and several congenital disorders. Conversely, excessive folate intake also poses health risks. Therefore, maintaining optimal levels of folate is essential. One method for measuring serum folate that offers efficient and accurate potential is the enzyme binding protein assay (EPBA). This method utilizes folate-binding protein, one source of which is breast milk. Folate-binding protein in breast milk is believed to facilitate the transport and absorption of folate in infants. This study aims to determine the characteristics of folate-binding protein from breast milk and its relationship with serum folate levels in exclusively breastfed infants.

This research was a laboratory experimental study aimed at isolating, purifying, and characterizing folate-binding protein from breast milk. The study also involved the development of a serum folate measurement method using FBP isolated from breast milk. A comparative analysis was conducted to determine differences in serum folate levels measured by the enzyme protein binding assay and ELISA. A correlational analysis was performed to assess the relationship between FBP levels in breast milk and serum folate levels in exclusively breastfed infants. The study was conducted at the Biotechnology Laboratory, and Basic Medical Chemistry Laboratory, Faculty of Medicine, Universitas Sriwijaya, from March 2023 to October 2024.

Isolation and purification of FBP were performed from a 1000 mL sample of breast milk. The FBP was isolated using a stepwise salting out method with ammonium sulfate concentrations of 45%, 75%, and 95%. Purification via ion exchange chromatography revealed three peaks: Peaks I, II, and III DEAE Pellet II. Folate-binding protein is suspected to be present at Peak II. Affinity chromatography

purification produced two peaks: Peak I.2 of AF Pellet II and Peak II of AF Pellet II, with the second peak being the FBP.

The purity of the isolated FBP was confirmed by the presence of a single band in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis. The FBP exhibited a band nearly aligning with the 37 kDa marker. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of this band revealed a sequence of approximately 257 amino acids. The folate-binding protein from breast milk can bind folate *in vitro* at a molar ratio of 1:1. Folate binding by FBP is influenced by pH and acetylation or reduction of specific amino acids but is not affected by the presence of calcium ions.

The folate-binding protein from breast milk can be utilized in the EPBA method for measuring serum folate levels. Precision testing of this method showed relative standard deviation values of 4.17 and 9.81 (<10%), and accuracy testing yielded values of 83.4%-106.9% (80-120%). The EPBA method demonstrated higher serum folate measurements compared to ELISA ($p < 0.05$).

In this study, among 30 subjects, the average FBP level in breast milk was 32.74 ± 15.9 ng/mL, and the average serum folate level in infants was 10.3 ± 6.6 ng/mL. Spearman correlation testing between FBP levels in breast milk and serum folate levels in infants yielded a p-value of 0.230 ($p > 0.05$) and an r-value of 0.226 (weak). This indicates that the correlation between FBP levels in breast milk and serum folate levels in exclusively breastfed infants is not statistically significant.

In conclusion, FBP can be isolated and purified from breast milk using stepwise salting out, ion exchange chromatography, and affinity chromatography methods. The folate-binding protein from breast milk has a molecular weight of approximately 37 kDa and is capable of binding folate at a 1:1 molar ratio. Folate-binding protein from breast milk can be used in the EPBA method to measure serum folate levels. However, no correlation was found between FBP levels in breast milk and serum folate levels in exclusively breastfed infants.

Keywords: Breast milk, folate, folate binding protein.

Citation: 162 (2012-2024)

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis haturkan ke hadirat Allah Swt. atas rahmat, berkah, hidayah, dan inayah-Nya yang melimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi yang berjudul "Purifikasi Protein Ikat Folat (PIF) dalam ASI dan Hubungan Kadar PIF ASI dengan Kadar Asam Folat Bayi ASI Eksklusif". Penulis juga menyampaikan salam dan selawat ke baginda Rasulullah saw, yang telah memberikan teladan sehingga penulis tetap berusaha, bersabar, dan bertawakal dalam melakukan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Disertasi ini merupakan salah satu syarat yang diajukan untuk melengkapi syarat memperoleh gelar Doktor Ilmu Sains Biomedik di Program Studi Sains Biomedik Program Doktor, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya. Disertasi ini berisi mengenai cara mengisolasi dan memurnikan protein ikat folat dari ASI, karakteristik protein ikat folat dari ASI yang meliputi berat molekul, rantai asam amino, dan daya ikat, penggunaan protein ikat folat dari ASI dalam metode EPBA untuk mengukur asam folat serum, dan hubungan antara kadar PIF ASI dan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

Penelitian dan penulisan disertasi ini bukanlah tanpa hambatan dan rintangan. Namun, dukungan dari semua pihak telah mendorong penulis untuk menyelesaikan disertasi ini dengan baik. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada Prof. Dr. dr. Mgs Irsan Saleh, M.Biomed selaku promotor, Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS dan Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., PhD selaku kopromotor, Dr. dr. Zen Hafy, M.Biomed, Dr. dr. Yudianita Kesuma, SpA(K), M.Kes, dan Prof. dr. Mohamad Sadikin, D.Sc selaku penguji, yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam penelitian dan penulisan disertasi ini mulai dari ide penelitian, metode, pengumpulan sampel sampai kesimpulan akhir penelitian. Semoga Allah Swt. memberikan balasan yang berlipat ganda atas kebaikan mereka semua.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Rektorat Universitas Sriwijaya, Dekanat Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Program Studi Sains Biomedis Program Doktor, Bagian Biokimia dan Kimia Medik,

Laboratorium Kimia Dasar Kedokteran, dan Laboratorium Bioteknologi yang telah memberikan dukungan baik moril, materil, waktu maupun tenaga sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Penulis mengucapkan terima kasih kepada dr. Arif Budiman, para bidan, analis, para mahasiswa, dan para sukarelawan yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu per satu, yang telah membantu pengumpulan sampel penelitian. Mereka semua berhak mendapat sebaik-baik balasan dari Allah Swt.

Penulis berharap disertasi ini dapat bermanfaat secara teoritis untuk pengembangan ilmu pengetahuan, dan secara aplikatif untuk peningkatan pemberian ASI eksklusif pada bayi. Akhir kata, tak ada gading yang tak retak. Disertasi ini tentu banyak kekurangan. Saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang.

Palembang, 23 Desember 2024

Penulis

Subandrate

HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Subandrate
Nim : 04013682025005
Judul : Purifikasi Protein Ikat Folat (PIF) dalam ASI dan Hubungan Kadar PIF ASI dengan Kadar Asam Folat Bayi ASI Eksklusif

Memberikan izin kepada ~~Pembimbing~~/Promotor* dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya untuk kepentingan akademik apabila dalam waktu 1 (satu) tahun tidak mempublikasikan karya penelitian saya. Dalam kasus ini saya setuju untuk menempatkan ~~Pembimbing~~/Promotor* sebagai penulis korespondensi (*Corresponding author*).

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.

Palembang, 23 Desember 2024



Subandrate
NIM 04013682025005

*Pilih salah satu yang sesuai

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
RINGKASAN.....	vii
SUMMARY.....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR TABEL.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxi
DAFTAR SINGKATAN.....	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Hipotesis Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
1.5.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.5.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Asam Folat.....	6
2.1.1 Definisi Asam Folat.....	6
2.1.2 Sifat Kimia dan Fisika Asam Folat.....	7

2.1.3	Struktur Asam Folat	8
2.1.4	Sumber Asam Folat.....	11
2.1.5	Kadar Asam Folat.....	11
2.1.6	Pencernaan dan Penyerapan Asam Folat.....	13
2.1.7	Fungsi Biokimia Asam Folat.....	14
2.1.8	Kekurangan Asam Folat.....	16
2.1.9	Kelebihan Asam Folat.....	19
2.2	Pengukuran Kadar Asam Folat	22
2.2.1	Metode Mikrobiologi	22
2.2.2	Metode Kromatografi.....	24
2.2.3	Metode Biospesifik	25
2.3	Air Susu Ibu	29
2.4	Protein Ikat Folat.....	31
2.4.1	Sejarah Protein Ikat Folat.....	32
2.4.2	Penentuan Kadar Protein Ikat Folat	33
2.4.3	Berat Molekul Protein Ikat Folat.....	34
2.4.4	Struktur Protein Ikat Folat.....	35
2.4.5	Peran Protein Ikat Folat.....	36
2.5	Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Folat	39
2.5.1	<i>Salting Out</i> dan Dialisis.....	40
2.5.2	Kromatografi	41
2.5.3	Elektroforesis	43
2.5.4	Pengukuran Kadar Protein	45
2.5.5	Determinasi Interaksi Protein dan Ligan.....	47
2.5.6	<i>Enzyme Protein Binding Assay</i>	49
2.6	Kerangka Teori.....	51
2.7	Kerangka Konsep	52
BAB 3 METODE PENELITIAN.....		53
3.1	Jenis Penelitian.....	53
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian	53
3.3	Populasi dan Sampel	53
3.3.1	Populasi	53

3.3.2	Sampel.....	53
3.3.3	Besar Sampel.....	53
3.3.4	Cara Pengambilan Sampel	55
3.3.5	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	56
3.4	Variabel Penelitian	56
3.5	Definisi Operasional.....	57
3.6	Bahan dan Cara Kerja	59
3.6.1	Persiapan Sampel	59
3.6.2	<i>Salting Out</i>	59
3.6.3	Dialisis.....	60
3.6.4	Kromatografi Pertukaran Ion.....	61
3.6.5	Kromatografi Afinitas	63
3.6.6	Elektroforesis SDS-PAGE	64
3.6.7	<i>Western Blot</i>	65
3.6.8	<i>Protein Sequencing</i>	67
3.6.9	Uji Daya Ikat PIF	69
3.6.10	Penentuan Faktor yang Berpengaruh Terhadap Daya Ikat PIF.....	70
3.6.11	Pengembangan Uji Kadar Folat Serum	71
3.6.12	Uji kadar PIF ASI.....	72
3.7	Cara Pengolahan dan Analisis Data	74
3.9	Alur Kerja.....	75
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....		76
4.1	Hasil Penelitian	76
4.1.1	Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Folat dari ASI	77
4.1.2	Karakterisasi Protein Ikat Folat.....	84
4.1.3	Pengembangan Metode EPBA	93
4.1.4	Hubungan Kadar Protein Ikat Folat ASI dan Asam Folat Serum	97
4.2	Pembahasan.....	99
4.2.1	Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Folat	99
4.2.2	Karakteristik Protein Ikat Folat	103
4.2.3	Presisi dan Akurasi Metode EPBA	107
4.2.4	Hubungan Kadar PIF ASI dan Asam Folat Serum	111

4.3	Keterbatasan Penelitian	113
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN		114
5.1	Kesimpulan.....	114
5.1	Saran.....	114
DAFTAR PUSTAKA		116
Lampiran-lampiran.....		129
Biodata		188

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Bubuk Asam Folat.....	7
Gambar 2.2. Struktur Asam Folat.....	8
Gambar 2.3. Struktur Tetrahidrofolat dengan Gugus di N ₅ dan N ₁₀	9
Gambar 2.4. Struktur Tetrahidrofolat dengan Gugus di N ₅ atau N ₁₀	10
Gambar 2.5. Reduksi Asam Folat Menjadi Tetrahidrofolat.....	14
Gambar 2.6. Siklus Folat Intraseluler dalam Sintesis Nukleotida dan Metionin..	15
Gambar 2.7. Peran Asam Folat dalam Siklus Metionin-Homosistein.....	18
Gambar 2.8. Saturasi Amonium Sulfat.....	40
Gambar 2.9. Contoh Kromatogram Kromatografi Kolom.....	41
Gambar 2.10. Dialisis dan Kurva Keseimbangan.....	48
Gambar 2.11. Model Pemeriksaan Asam Folat dengan PIF.....	50
Gambar 2.12. Kerangka Teori.....	51
Gambar 2.13. Kerangka Konsep.....	52
Gambar 3.1. Alur Kerja Penelitian.....	75
Gambar 4.1. Isolasi dan Purifikasi PIF dari ASI.....	77
Gambar 4.2. Tahap Isolasi PIF dari ASI.....	78
Gambar 4.3. Fraksi DEAE Chromatography Endapan I.....	80
Gambar 4.4. Fraksi DEAE-Chromatography Endapan II.....	80
Gambar 4.5. Fraksi Kromatografi Afinitas Puncak I DEAE Endapan I.....	81
Gambar 4.6. Fraksi Kromatografi Afinitas Puncak I DEAE Endapan II.....	82
Gambar 4.7. Fraksi Kromatografi Afinitas Puncak II DEAE Endapan II.....	83
Gambar 4.8. Kurva Standar Protein.....	83
Gambar 4.9. Hasil SDS-PAGE Isolat Protein.....	85
Gambar 4.10. Hasil Western Blot Isolat Protein.....	85
Gambar 4.11. Uji Penyelarasan Asam Amino PIF.....	87
Gambar 4.12. Panjang Gelombang Maksimum Asam Folat.....	88
Gambar 4.13. Uji Dialisis Keseimbangan.....	89
Gambar 4.14. Struktur Protein Ikat Folat dan Reseptor Folat Alfa.....	91

Gambar 4.15. Faktor yang Berpengaruh Terhadap Daya Ikat PIF	92
Gambar 4.16. Korelasi antara Kadar PIF ASI dan Kadar Asam Folat Serum	99

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Sumber Asam Folat dalam Makanan	11
Tabel 2.2. Kebutuhan Asam Folat per Hari	12
Tabel 2.3. Prevalensi NTD Sebelum dan Sesudah Fortifikasi	20
Tabel 2.4. Perbandingan Metode Pemeriksaan Asam Folat	28
Tabel 2.5. Jenis dan Peran Beberapa Protein dalam ASI.....	30
Tabel 2.6. Perbandingan Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Folat	44
Tabel 2.7. Contoh Tabel Purifikasi Protein.....	46
Tabel 3.1. Komposisi Larutan Gel Pemisah dan Penumpuk SDS-PAGE	65
Tabel 4.1. Karakteristik Subjek Penelitian.....	76
Tabel 4.2. Isolasi dan Purifikasi Protein	84
Tabel 4.3. Daya Ikat Protein Ikat Folat terhadap Asam Folat.....	90
Tabel 4.4. Nilai Presisi Metode EPBA dalam Pengukuran Asam Folat Serum....	93
Tabel 4.5. Kadar Asam Folat Menurut Metode EPBA	94
Tabel 4.6. Akurasi Kadar Asam Folat Menurut Metode EPBA	95
Tabel 4.7. Akurasi Kadar PIF Menurut Metode EPBA	96
Tabel 4.8. Kadar Asam Folat Menurut Metode ELISA dan EPBA.....	97
Tabel 4.9. Kadar PIF Menurut Metode ELISA dan EPBA.....	97
Tabel 4.10. Kadar PIF ASI dan Asam Folat Serum Bayi	98

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Lembar Penjelasan Isolasi dan Purifikasi PIF	129
Lampiran 2. Lembar Persetujuan Isolasi dan Purifikasi PIF	130
Lampiran 3. Biodata Subjek Penelitian Isolasi dan Purifikasi PIF	132
Lampiran 4. Lembar Penjelasan Pengukuran Kadar PIF dan Asam Folat.....	133
Lampiran 5. Lembar Persetujuan Pengukuran Kadar PIF dan Asam Folat.....	134
Lampiran 6. Biodata Subjek Penelitian Kadar PIF dan Asam Folat.....	138
Lampiran 7. Fraksi Kromatografi DEAE Endapan I	139
Lampiran 8. Fraksi Kromatografi DEAE Endapan II	141
Lampiran 9. Fraksi Kromatografi Afinitas Puncak I DEAE Endapan I	142
Lampiran 10. Fraksi Kromatografi Afinitas Puncak I DEAE Endapan II	143
Lampiran 11. Fraksi Kromatografi Afinitas Puncak I DEAE Endapan II	144
Lampiran 12. Absorbansi Standar BSA dan Absorbansi Protein	145
Lampiran 13. Absorbansi Standar Asam Folat dan Kurva Standar	146
Lampiran 14. Absorbansi Dialisis Kesetimbangan.....	147
Lampiran 15. Daya Ikat PIF dan Faktor yang Berpengaruh	148
Lampiran 16. Pengembangan Metode EPBA dan Analisis Statistik	149
Lampiran 17. Analisis Statistik Hubungan PIF dan Asam Folat	155
Lampiran 18. Data Responden Penelitian.....	157
Lampiran 19. Foto Hasil Penelitian	158
Lampiran 20. Sertifikat Etik.....	162
Lampiran 21. Surat Izin dan Selesai Penelitian	163
Lampiran 22. Hasil LC-MS/MS.....	167

DAFTAR SINGKATAN

AIMI	Asosiasi Ibu Menyusui Indonesia
AKG	Angka Kecukupan Gizi
ARA	Asam arakidonat
ASI	Air susu ibu
CM	<i>Carboxymethyl</i>
CNBr	<i>Cyanogen Bromide</i>
DEAE	<i>Diethylaminoethyl</i>
DHA	Asam dokosaheksaenoat
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat reduktase
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELPLBA	<i>Enzyme labelled protein ligand binding assay</i>
EPBA	<i>Enzyme protein binding assay</i>
FBP	<i>Folate binding protein</i>
FR	<i>Folate receptor</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
KDa	Kilodalton
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Tandem Mass Spectrometry</i>
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i>
MTHFD	Metilen tetrahidrofolat dehidrogenase
MTHFR	Metilen tetrahidrofolat reduktase
MTHFSH	Metenil tetrahidrofolat siklohidrolase
Native-PAGE	<i>Native polyacrylamide gel electrophoresis</i>

NTD	<i>Neural tube defect</i>
PABA	p-aminobenzoat
PIF	Protein ikat folat
PIR	Protein ikat riboflavin
QAE	<i>Quaterner aminoethyl</i>
RBP	<i>Riboflavin binding protein</i>
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHMT	Serin hidroksimetiltransferase
SP	<i>Sulphopropyl</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
THF	Tetrahidrofolat

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam folat merupakan salah satu jenis vitamin B. Sumber asam folat adalah sayur-sayuran hijau, kacang-kacangan, biji-bijian, tanaman polong-polongan, sari jeruk, susu, dan hati.¹⁻³ Peran asam folat dalam tubuh adalah sebagai koenzim dalam metabolisme. Dalam metabolisme nukleotida dan asam amino, tetrahidrofolat (THF) mendonorkan gugus metenil atau formil dan gugus metil. Pada bayi keberadaan asam folat penting untuk pertumbuhan dan perkembangan terutama pada otak dan sistem saraf.³⁻⁵

Prevalensi defisiensi asam folat di dunia masih cukup tinggi. Pada negara maju prevalensi defisiensi asam folat kurang dari 5%, tetapi pada negara berkembang lebih dari 20%.⁶ Penelitian di Meksiko pada tahun 2012 menunjukkan bahwa prevalensi defisiensi asam folat pada anak berumur 1-6 tahun adalah sekitar 3,2%.⁷ Sementara penelitian tahun 2022 di Guatemala memperlihatkan bahwa prevalensi defisiensi asam folat pada anak-anak prasekolah adalah 33,5%.⁸ Di Indonesia, belum ditemukan data prevalensi defisiensi asam folat pada anak-anak.

Defisiensi asam folat telah dikaitkan dengan berbagai penyakit seperti *neural tube defect*, anemia megaloblastik, beberapa kelainan kongenital, atau penyakit kardiovaskuler.^{2,9,10} Sementara itu, kelebihan asam folat juga menimbulkan masalah kesehatan. Fortifikasi asam folat berhasil mengurangi *neural tube defect* atau anemia megaloblastik.^{2,10-13} Namun, data dari *Scientific Advisory Committee on Nutrition* (SACN) menunjukkan bahwa fortifikasi asam folat menimbulkan dampak buruk seperti meningkatkan risiko keguguran, risiko kanker prostat, risiko penurunan fungsi kognitif dan risiko kerusakan hepar.^{4,12,14,15}

Menurut WHO kadar asam folat normal dalam serum adalah 6-20 ng/mL.¹⁶ Untuk menjaga kadar asam folat dalam darah diperlukan diet atau suplementasi asam folat yang tepat.^{2,9,17,18} Asam folat dibutuhkan dalam jumlah yang optimal.¹⁷ Kekurangan dan kelebihan asam folat telah diduga dan diketahui berkaitan dengan

beberapa gangguan kesehatan.^{12,17} Oleh karena itu, perlu diketahui cara yang efektif, efisien, dan akurat dalam menentukan kadar asam folat serum.

Saat ini pengukuran asam folat serum dengan metode mikrobiologi masih menjadi baku emas.¹⁹⁻²¹ Metode lain pengukuran asam folat adalah *radioassay*, *high performance liquid chromatography* (HPLC), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau menggunakan *enzyme binding protein assay* (EPBA).^{18,22,23} Metode EPBA merupakan metode baru dalam pemeriksaan asam folat. Pada metode ini digunakan protein ikat folat (PIF) sebagai pendeteksi asam folat dalam sampel.^{18,24,25}

Metode EPBA telah digunakan dalam analisis kadar folat dalam makanan, tetapi belum digunakan untuk mengukur kadar folat serum. Ada perbedaan bentuk folat dalam makanan dan serum. Dalam makanan, bentuk folat adalah poliglutamat, sedangkan dalam serum bentuk folat adalah monoglutamat dengan berbagai bentuk reduksinya. Oleh karena itu, pemanfaatan metode ini dalam pengukuran asam folat serum merupakan tantangan baru.^{18,24,25} Metode pemeriksaan EPBA diharapkan memiliki keunggulan metode pemeriksaan meliputi kemudahan proses pemeriksaan, murah, waktu yang cepat, tidak berbahaya, spesifik dan sensitif serta cocok untuk semua bentuk folat.^{18,24,25}

Pada umumnya, metode EPBA menggunakan PIF dari susu sapi. Pada tahun 2008, Sadikin *et al.* menggunakan PIF belum murni dari susu sapi dan pada tahun 2019, Budiman *et al.* menggunakan PIF murni dari susu sapi untuk mengukur kadar asam folat serum. Belum ada laporan penggunaan PIF dari ASI untuk pengukuran asam folat serum. Padahal, kemiripan PIF dari ASI dan susu sapi diduga hanya di bawah 80%.²⁶ Oleh karena itu, penggunaan PIF dari ASI diharapkan memberikan hasil yang lebih baik dalam pengukuran kadar asam folat serum.

Protein ikat folat merupakan salah satu protein yang terdapat dalam ASI. Rerata Kadar PIF dalam ASI adalah sekitar 180-250 nmol/L. Kadar PIF dalam ASI diperkirakan menurun seiring dengan peningkatan usia menyusui.^{3,19,27-29} Karakteristik, berat molekul dan struktur, PIF dari ASI belum dibahas secara terperinci. Para peneliti hanya menyebut beberapa perannya. Keberadaan PIF dalam ASI penting untuk menjamin ketersediaan asam folat dalam tubuh. Sebagian besar

PIF berperan untuk transportasi folat di membran sel, dan sebagian kecilnya sebagai pengangkut folat serum.^{19,30-32}

Pada bayi, keberadaan PIF dalam ASI dibutuhkan untuk membantu penyerapan asam folat di intestinum. Bayi ASI eksklusif hanya mendapatkan asam folat dari ASI sehingga keberadaan PIF dalam ASI sangat dibutuhkan.^{19,30-32} Belum ditemukan data yang memperlihatkan hubungan langsung antara kadar PIF dalam ASI dengan kadar asam folat serum bayi. Beberapa penelitian hanya menunjukkan rata-rata kadar asam folat serum bayi di beberapa negara seperti di Pantai Gading 2,6 ng/mL, di Vietnam 7,7 ng/mL, di Uzbekistan 5,2 ng/mL,⁶ di Indonesia³³ 19,05 ng/mL dan di Jerman³⁴ 17,7 ng/mL. Seperti kadar PIF, kadar asam folat bayi mengalami penurunan berangsur-angsur setelah fase menyusui.³⁴

Karakteristik PIF ASI sampai saat ini belum dilaporkan, sehingga metode EPBA menggunakan PIF ASI belum pernah dikembangkan untuk pengukuran kadar asam folat serum. Adanya dugaan bahwa PIF berperan dalam membantu penyerapan asam folat di intestinum bayi, dan belum adanya penelitian yang melihat hubungan PIF ASI dengan asam folat serum bayi. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian tentang purifikasi PIF dalam ASI dan hubungan kadar PIF ASI dengan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

1. Bagaimana cara mengisolasi dan memurnikan PIF dari ASI?
2. Bagaimana karakteristik PIF dari ASI?
3. Bagaimana mengembangkan metode pengukuran kadar asam folat serum dan PIF ASI?
4. Bagaimana hubungan kadar PIF dalam ASI dengan kadar asam folat serum bayi yang diberi ASI eksklusif?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik protein ikat folat dari ASI dan hubungannya dengan kadar asam folat serum bayi ASI eksklusif.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah,

1. Mengisolasi dan memurnikan PIF dari ASI.
2. Menentukan karakteristik PIF dari ASI.
3. Mengembangkan metode pengukuran asam folat dan PIF.
4. Menganalisis hubungan antara kadar PIF dalam ASI dan kadar asam folat serum pada bayi.

1.4 Hipotesis Penelitian

Penelitian mengenai eksplorasi protein ikat folat dalam ASI merupakan penelitian deskriptif sehingga tidak memerlukan hipotesis penelitian. Sedangkan penelitian mengenai hubungan antara kadar PIF dalam ASI dan kadar folat serum pada bayi merupakan penelitian analitik, sehingga memiliki hipotesis yakni terdapat korelasi antara kadar antara PIF dalam ASI dengan kadar folat serum pada bayi ASI eksklusif.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi teoritis mengenai karakteristik PIF dari ASI meliputi berat molekul, daya ikat, rantai asam amino, kadar dan kemampuan mengukur asam folat serum. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi rujukan dalam isolasi dan purifikasi PIF khususnya dan protein umumnya. Penelitian ini juga dapat memberikan informasi awal mengenai hubungan PIF ASI dan kadar asam folat bayi.

1.5.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan salah satu alternatif metode pengukuran asam folat dan PIF dalam ASI/serum. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat dikembangkan menjadi pengukuran asam folat dan PIF serum dengan cara yang mudah, murah, akurat dan sensitivitas yang tinggi sehingga dapat digunakan dalam keperluan yang lebih luas dalam pelayanan kesehatan masyarakat. Selain itu, hasil penelitian ini juga diharapkan memberi informasi pada masyarakat mengenai manfaat pemberian ASI bagi kadar asam folat bayi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hansen DK, Inselman AL. Folic Acid. In: Encyclopedia of Toxicology [Internet]. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 616–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543007314>
2. Liew S-C. Folic acid and diseases - Supplement it or not? *Rev Assoc Med Bras*. 2016;62(1):90–100.
3. Subandrate S, Gunarti DR, Sadikin M. Characteristics and Role of Folate Binding Protein (FBP). *J Heal Med* [Internet]. 2016;3(1):341–6. Available from: <https://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jkk/article/view/2849>
4. SACN. Update on folic acid [Internet]. Scientific Advisory Committee on Nutrition. London; 2017. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/637111/SACN_Update_on_folic_acid.pdf
5. Bender D. Micronutrients: Vitamins & Minerals. In: Harper's Illustrated Biochemistry. 31st ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018. p. 1289–319.
6. Rogers LM, Cordero AM, Pfeiffer CM, Hausman DB, Tsang BL, De-Regil LM, et al. Global folate status in women of reproductive age: a systematic review with emphasis on methodological issues. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2018/09/21. 2018 Nov;1431(1):35–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30239016>
7. Cuevas-Nasu L, Mundo-Rosas V, Shamah-Levy T, Méndez-Gómez Humaran I, Antonio Ávila-Arcos M, del Rosario Rebollar-Campos M, et al. Prevalence of folate and vitamin B12 deficiency in Mexican children aged 1 to 6 years in a population-based survey. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2012 [cited 2022 Oct 11];54(2):116–24. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342012000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=en
8. Wong E, Molina-Cruz R, Rose C, Bailey L, Kauwell GPA, Rosenthal J. Prevalence and Disparities in Folate and Vitamin B12 Deficiency Among Preschool Children in Guatemala. *Matern Child Health J* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Oct 11];26(1):156–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/354770614/>
9. 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>
10. Taulikar V, Arulkumaran S. Folic acid in pregnancy. *Obstet Gynaecol Reprod Med*. 2013;23(9):286–8.
11. 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>
12. 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.
13. Pfeiffer CM, Stenberg MR, Zhang M, Fazili Z, Storandt RJ, Crider KS, et al. Folate status in the US population 20 y after the introduction of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Oct 11];110(5):1088–97. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/110/5/1088/5555582>
 14. U.S. Department of Health and Human Services. *NTP Monograph: Identifying Research Needs for Assessing Safe Use of High Intakes of Folic Acid*. US Department of Health and Human Services. Washington; 2015.
 15. Christensen KE, Mikael LG, Leung K-Y, Ai 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.
 16. 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>
 17. Department of Nutrition for Health and Development. *Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations for Assessing Folate Status in Populations*. World Health Organization. Geneva; 2015.
 18. Arcot J, Shrestha A. Folate: Methods of analysis. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16:253–66.
 19. Nygren-Babol L, Jägerstad M. Folate-Binding Protein in Milk: A Review of Biochemistry, Physiology, and Analytical Methods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(5):410–25.
 20. Bisseling TM, Steegers EAP, van den Heuvel JJM, Siero HLM, van de Water FM, Walker AJ, et al. Placental folate transport and binding are not impaired in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Placenta*. 2004;25(6):588–93.
 21. Luka Z. Methyltetrahydrofolate in Folate-Binding Protein Glycine N-Methyltransferase. *Vitam Horm*. 2008;79:325–45.
 22. 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
 23. 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):1782–8.
 24. 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):4878–86. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111607>
 25. 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.

26. 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.
27. Subandrate, Gunarti DR, Sadikin M. Properties of Folate Binding Protein Purified from Cow's Milk. *HAYATI J Biosci* [Internet]. 2012;19(3):105–9. Available from: <https://doi.org/10.4308/hjb.19.3.105>
28. Van Der Heijden JW, Oerlemans R, Dijkmans BAC, Qi H, Van Der Laken CJ, Lems WF, et al. Folate receptor β as a potential delivery route for novel folate antagonists to macrophages in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*. 2009;60(1):12-21.
29. Puthusseri B, Divya P, Lokesh V, Kumar G, Savanur MA, Neelwarne B. Novel Folate Binding Protein in Arabidopsis Expressed during Salicylic Acid-Induced Folate Accumulation. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2018 Jan 17 [cited 2022 Jun 9];66(2):505–11. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.7b04236>
30. Washington RW, Knecht DA. Actin binding domains direct actin-binding proteins to different cytoskeletal locations. *BMC Cell Biol*. 2008;9(10):1–16.
31. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica*. 2014;44(5):480–8.
32. Merzel RL, Frey C, Chen J, Garn R, Van Dongen M, Dougherty CA, et al. Conjugation Dependent Interaction of Folic Acid with Folate Binding Protein. *Bioconjug Chem*. 2017;28(9):2350–60.
33. Ernawati T, Bardosono S, Sekartini R. Serum folate levels among healthy infants aged 6-8 months: relation to infants' nutritional status indicators and maternal knowledge-attitude-practice. *Med J Indones* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2022 Nov 2];20(2):138–42. Available from: <https://mji.ui.ac.id/journal/index.php/mji/article/view/443>
34. Kreusler P, Vogel M, Willenberg A, Baber R, Dietz Y, Körner A, et al. Folate and Cobalamin Serum Levels in Healthy Children and Adolescents and Their Association with Age, Sex, BMI and Socioeconomic Status. *Nutrients* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Nov 2];13(2):1–16. Available from: [/pmc/articles/PMC7915137/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34791513/)
35. Hoffbrand A V., Weir DG. The history of folic acid. *Br J Haematol* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2022 Jan 11];113(3):579–89. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2141.2001.02822.x>
36. Mandal A. Folic Acid Biology [Internet]. 2019 [cited 2022 Jan 11]. Available from: <https://www.news-medical.net/health/Folic-Acid-Biology.aspx>
37. Rosenberg IH. A History of the Isolation and Identification of Folic Acid (Folate). *Ann Nutr Metab* [Internet]. 2012;61(3):231–5. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000343112>
38. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Jan 11];42(4):673–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jimd.12009>
39. 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>
40. NCBI. Folic acid | C19H19N7O6 - PubChem [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2022 [cited 2022 Jan 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Folic-acid#section=Vapor-Pressure>
 41. INCHEM. Folic Acid (PIM 238) [Internet]. International Peer Review Chemical Safety Information. [cited 2022 Jan 12]. Available from: <https://inchem.org/documents/pims/pharm/folicaci.htm>
 42. Subandrate S, Athiah M, Safyudin S, Amalia E, Saleh I, Hermansyah H, et al. Asam Folat : Peran dalam Metabolisme dan Metode Pemeriksaan. *Maj Kedokt Andalas*. 2022;45(1):51–62.
 43. NIH. Folate - Health Professional Fact Sheet [Internet]. U.S National Institutes of Health. 2021 [cited 2022 Jan 12]. Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/>
 44. 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>
 45. Castellanos-Sinco HB, Ramos-Peñafiel CO, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Martínez-Murillo C, Montaña-Figueroa E, et al. Megaloblastic anaemia: Folic acid and vitamin B12 metabolism. *Rev Médica del Hosp Gen México* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Jan 25];78(3):135–43. Available from: <https://www.elsevier.es/en-revista-revista-medica-del-hospital-general-325-articulo-megaloblastic-anaemia-folic-acid-vitamin-S0185106315000426>
 46. Mahmood L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *J Heal Res Rev*. 2014;1(1):5–9.
 47. 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>
 48. Valarmathi MT. Intestinal Absorption of Dietary Foliates [Internet]. *Fratnow*. 2023 [cited 2024 Nov 26]. Available from: <https://autism.fratnow.com/blog/intestinal-absorption-of-dietary-foliates/>
 49. Zheng Y, Cantley LC. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *J Exp Med* [Internet]. 2019 Feb 4 [cited 2022 Feb 16];216(2):253–66. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20181965>
 50. 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>
 51. Khan KM, Jialal I. Folic Acid Deficiency. *StatPearls* [Internet]. 2021 Sep 28 [cited 2022 Jan 25]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535377/>
 52. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):4352–89.

53. Lyon P, Strippoli V, Fang B, Cimmino L. B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. *Nutrients*. 2020;12(9):2867–72.
54. Li B, Zhang X, Peng X, Zhang S, Wang X, Zhu C. Folic Acid and Risk of Preterm Birth: A Meta-Analysis. *Front Neurosci* [Internet]. 2019 Nov 28;13:1284–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31849592>
55. Gaskins AJ, Rich-Edwards JW, Hauser R, Williams PL, Gillman MW, Ginsburg ES, et al. Maternal Prepregnancy Folate Intake and Risk of Spontaneous Abortion and Stillbirth. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jan 27];124(1):23–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2486728/>
56. Malek E, Sacher RA. Megaloblastic Anemia. *Pathobiol Hum Dis A Dyn Encycl Dis Mech* [Internet]. 2021 Oct 11 [cited 2022 Jan 25];1499–505. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537254/>
57. McNulty H, Strain JJ, Hughes CF, Pentieva K, Ward M. Evidence of a Role for One-Carbon Metabolism in Blood Pressure: Can B Vitamin Intervention Address the Genetic Risk of Hypertension Owing to a Common Folate Polymorphism? *Curr Dev Nutr* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jan 26];4(1):1–23. Available from: <https://academic.oup.com/cdn/article/4/1/nzz102/5570580>
58. Ducker GS, Rabinowitz JD. Cell Metabolism Review One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jan 26];25:27–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
59. Epstein-Peterson ZD, Soff GA, Fenelus M, Korenstein D. Folate Testing and Deficiency in Hospitalized Cancer Patients. *Blood* [Internet]. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):5814. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-117073>
60. Tomita LY. Folate and Cancer: Is There Any Association? *J Inborn Errors Metab Screen* [Internet]. 2019 May 30 [cited 2022 Jan 26];4:1–7. Available from: <http://www.scielo.br/j/jiems/a/jvX6ppm37PfcjMMtQ9WZMJ/?lang=en>
61. Pieroth R, Paver S, Day S, Lammersfeld C. Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2022 Jan 26];7(3):70–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3132377/>
62. Aune D, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Acosta G, Mendilaharsu M, et al. Dietary folate intake and the risk of 11 types of cancer: a case-control study in Uruguay. *Ann Oncol* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2022 Jan 26];22(2):444–51. Available from: <http://www.annalsofncology.org/article/S0923753419386582/fulltext>
63. Zhang X, Bao G, Liu D, Yang Y, Li X, Cai G, et al. The Association Between Folate and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurosci*. 2021 Apr 14;15(385):1–13.
64. Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency. *Handb Clin Neurol*. 2014;120:927–43.
65. Yoshizawa T. Treatable Dementia due to Vitamin B12 and Folate Deficiency. *Brain Nerve* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Jan 26];68(4):407–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27056859/>
66. Maruvada P, Stover PJ, Mason JB, Bailey RL, Davis CD, Field MS, et al. Knowledge

156. McStay CL, Prescott SL, Bower C, Palmer DJ. Maternal Folic Acid Supplementation during Pregnancy and Childhood Allergic Disease Outcomes: A Question of Timing? *Nutrients* [Internet]. 2017 Feb 9 [cited 2024 Sep 23];9(123):1–14. Available from: [/pmc/articles/PMC5331554/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/331554/)
157. Yang F, Zhu J, Wang Z, Wang L, Tan T, Sun L. Relationship between maternal folic acid supplementation during pregnancy and risk of childhood asthma: Systematic review and dose-response meta-analysis. *Front Pediatr* [Internet]. 2022 Nov 17 [cited 2024 Sep 23];10(1000532):1–14. Available from: <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>
158. Obeid R, Warnke I, Wittke A, Bendik I, Troesch B, Schoop R, et al. Infant blood concentrations of folate markers and catabolites are modified by 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and dietary folate source. *Am J Clin Nutr*. 2023 Mar 1;117(3):509–17.
159. Ridefelt P, Saldeen J, Vogel M, Ceglarek U, Kiess W, Larsson A. Pediatric reference intervals for serum folate and cobalamin based on a European population without exposure to folic acid fortification. *Scand J Clin Lab Invest* [Internet]. 2024 [cited 2024 Sep 23];84(2):104–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00365513.2024.2330918>
160. Silva LLS, Fawzi WW, Cardoso MA. Serum folate and vitamin B12 status in young Brazilian children. *Public Health Nutr* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Sep 23];22(7):1223–31. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/public-health-nutrition/article/serum-folate-and-vitamin-b12-status-in-young-brazilian-children/3A793CC92D89A7F8053BF465C0293667>
161. Bationo F, Songré-Ouattara LT, Hama-Ba F, Baye K, Hemery YM, Parkouda C, et al. Folate Status of Women and Children in Africa – Current Situation and Improvement Strategies. *Food Rev Int* [Internet]. 2020 Jan 2 [cited 2024 Sep 23];36(1):1–14. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2019.1608558>
162. Castaño E, Caviades L, Hirsch S, Llanos M, Iñiguez G, Ronco AM. Folate Transporters in Placentas from Preterm Newborns and Their Relation to Cord Blood Folate and Vitamin B12 Levels. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 Sep 24];12(1):1–14. Available from: [/pmc/articles/PMC5245900/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/245900/)