

# PROFIL LEMAK PLASMA DAN NILAI HEMATOLOGI TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* DENGAN SUPLEMENTASI AMIDA MINYAK IKAN

## *Plasma Lipid Profile and Hematological Status of Sprague Dawley Rat by Supplementing Fish Oil Amide*

Sitti Wajizah<sup>1</sup>, Komang G. Wiryawan<sup>2</sup>, Wasmen Manalu<sup>3</sup>, dan Dwi Setyaningsih<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>4</sup>Departemen Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: [alwajiz@yahoo.com](mailto:alwajiz@yahoo.com)

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas amida minyak ikan dalam menurunkan konsentrasi kolesterol dan trigliserida plasma dan pengaruhnya terhadap nilai hematologi darah. Tiga puluh lima ekor tikus jantan, galur *Sprague Dawley*, umur 7 minggu dibagi secara acak ke dalam lima kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (A) mendapat ransum *semi purified* yang mengandung 8% minyak jagung. Kelompok perlakuan masing-masing disuplementasi 4,5% minyak ikan (B), 3% minyak ikan+1,5% amida (C), 1,5% minyak ikan+3% amida (D), dan 4,5% amida (E). Ransum perlakuan diberikan selama 6 minggu. Pada akhir penelitian dilakukan pengambilan sampel darah untuk menganalisis nilai hematologi dan profil lemak plasma. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi amida minyak ikan dapat mempertahankan jumlah eritrosit dan Hb, namun nilai hematokrit mulai menurun pada suplementasi amida 3% (D), dibandingkan suplementasi minyak ikan (B) dan suplementasi amida 1,5% (C). Jumlah leukosit pada kelompok yang mendapat suplementasi 4,5% amida (E) secara nyata ( $P<0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diberi minyak ikan (B). Suplementasi amida minyak ikan tidak berpengaruh terhadap konsentrasi kolesterol total dan HDL plasma, namun pada suplementasi 3% amida mulai meningkatkan konsentrasi trigliserida dan LDL plasma secara nyata ( $P<0,05$ ). Disimpulkan bahwa suplementasi amida sebesar 3% mulai memperlihatkan pengaruh negatif terhadap nilai hematologi dan profil lemak plasma.

Kata kunci: minyak ikan, amida, profil lemak plasma, nilai hematologi

### ABSTRACT

*This experiment was conducted to study the effectivity of fish oil amide in decreasing plasma cholesterol and triglyceride concentration, and its effect on blood hematological status. Thirty five male Sprague Dawley rats of 7 old days were randomly divided into 5(five) treatment groups. Control group (A) was fed with semipurified diet consisting 8% corn oil. Treatment groups were supplemented with 4.5% fish oil (B), 3% fish oil+1.5% amide(C), 1.5% fish oil+3% amide (D), and 4.5% amide (E) respectively. Treatment diets were fed for 6 (six) weeks, and at the end of treatment, blood samples were taken to analyze hematological status and plasma lipid profile. The result shows that fish oil amide supplementation could maintain the number of erythrocytes and hemoglobin, while hematocrit value began decrease with 3% amide supplementation compared to fish oil supplementation (B) and 1.5% amide supplementation (C). The number of leucocytes in group with 4.5% amide supplementation significantly increased ( $P<0.05$ ) compared to the group supplementing fish oil (B). Fish oil amide supplementation had no effect to plasma cholesterol and HDL concentration, but began markedly increased ( $P<0.05$ ) plasma triglyceride and LDL concentration at 3% amide supplementation. It was concluded that at 3% amide supplementation, seem to give the negative impact on hematological status and plasma lipid profile.*

Key words: fish oil, amides, plasma lipid profile, hematological status

### PENDAHULUAN

Domba merupakan salah satu sumber daging yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Karakteristik daging domba didominasi oleh kandungan asam lemak jenuh atau *saturated fatty acids (SFA)* yang tinggi, dan memiliki rasio asam tak lemak jenuh ganda atau *polyunsaturated fatty acids (PUFA)* : SFA yang rendah (Cooper *et al.*, 2004). Asam lemak jenuh terutama C14:0 dan C16:0 yang berlebihan mengakibatkan otot rentan terhadap resistensi insulin sehingga timbul hiperinsulinemia, atau peningkatan produksi kolesterol oleh hati yang meningkatkan faktor risiko aterosklerosis kronis (Moibi dan Christopherson, 2001).

Ponnampalan *et al.* (2002) melaporkan sejak pertengahan 1990-an, peran tipe lemak diet dalam mempertahankan kesehatan manusia terfokus pada PUFA  $\omega$ -3 dalam diet. Salah satu sumber PUFA  $\omega$ -3 yang potensial adalah minyak ikan laut yang

mengandung asam eikosapentanoat (EPA; 20:5) dan asam dokosaheksanoat (DHA; 22:6). Kecukupan EPA dan DHA dapat mencegah terjadinya aterosklerosis dan penyakit jantung pada manusia dewasa. Minyak ikan mengandung PUFA  $\omega$ -3 seperti EPA dan DHA dalam jumlah yang berlimpah, tetapi jarang terdapat pada lemak hewan (Irie dan Sakimoto, 1992). Beberapa studi epidemiologis memperlihatkan penurunan infeksi pada populasi yang mengkonsumsi PUFA  $\omega$ -3 yang mengindikasikan peranannya dalam sistem imun (Kelley *et al.*, 1988).

Penelitian terakhir menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi asam  $\alpha$ -linolenat dan khususnya asam lemak dengan rantai yang lebih panjang yaitu EPA dan DHA dapat memperbaiki kandungan PUFA  $\omega$ -3 dalam jaringan daging domba untuk memenuhi standar kesehatan yang optimal bagi diet manusia. Namun demikian, pada ruminansia, diet asam lemak mengalami hidrogenasi yang ekstensif oleh mikroorganisme rumen

sehingga penyerapan didominasi oleh asam lemak jenuh yang mengarah pada pembentukan lipoprotein berdensitas sangat rendah atau *very low density lipoprotein (VLDL)*. *Trans*-asam lemak tak jenuh tunggal atau *monounsaturated fatty acids (MUFA)* dan SFA yang merupakan bagian dari VLDL selanjutnya bergabung ke dalam lemak otot yang berimplikasi pada rendahnya rasio PUFA : SFA pada daging domba (Jenkins, 1993; Cooper *et al.*, 2004).

Biohidrogenasi asam lemak dalam rumen dapat diatasi dengan pemberian minyak yang tinggi asam lemak tidak jenuh yang dilapisi dengan suatu material yang tidak dapat dimetabolisme oleh mikroorganisme rumen tetapi dapat dicerna dalam usus halus (Ekeren *et al.*, 1992). Penggunaan formaldehid dan mineral terutama Ca sudah banyak digunakan meskipun hasilnya belum konsisten. Alternatif lain yang dapat dilakukan dalam melindungi asam lemak, terutama PUFA  $\omega$ -3 adalah dalam bentuk amida. Jenkins dan Adams (2002) mendapatkan bahwa meskipun perlindungannya belum sempurna, ternyata linolamid dapat bertahan dari biohidrogenasi dalam rumen jauh lebih baik dari asam linoleat. Namun demikian perlindungan dalam bentuk amida dari EPA dan DHA dalam minyak ikan masih jarang dilakukan. Berdasarkan pernyataan di atas, perlu dikaji efektivitas amida minyak ikan dalam meningkatkan aliran EPA dan DHA pasca rumen, dan pengaruhnya terhadap profil lemak darah dan nilai hematologi tikus *Sprague Dawley* sebagai hewan model pada sistem pasca rumen domba.

## MATERI DAN METODE

### Suplemen Amida

Minyak ikan yang digunakan untuk pembuatan amida diperoleh dari Desa Muncar Banyuwangi, Jawa Timur. Berdasarkan analisis yang dilakukan di Laboratorium Terpadu Institut Pertanian Bogor (IPB), komposisi asam lemak minyak ikan terutama terdiri atas 11,74% asam miristat, 17,94% asam palmitat, 14,26% asam palmitoleat, 3,3% asam stearat, 4,89% asam oleat, 4,04% asam arakidonat, 16,06% EPA, dan 12,79% DHA.

Proses amidasi menggunakan n-butilamin mengikuti metoda Feairheller *et al.* (1994). Pembuatan amida minyak ikan dilakukan dengan mereaksikan minyak ikan dan n-butilamin dengan rasio molar 1 : 8, atau 200 ml : 157 ml (v/v). Ke dalam bahan juga ditambahkan *N-ethylenediaminetetraacetic acid* (Na-EDTA) sebanyak 0,9 g (0,5% (w/w) dan *butylated hidroxytoluene* (BHT) sebanyak 0,09 g (0,05% (w/w)), sebagai antioksidan selama proses amidasi berlangsung. Berdasarkan analisis menggunakan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS) diketahui bahwa amida yang terbentuk dari proses tersebut sebesar 88%.

### Hewan Percobaan

Sebanyak 35 ekor tikus jantan galur *Sprague Dawley* umur tujuh minggu dengan bobot badan berkisar 120-160 g digunakan dalam penelitian ini. Ransum tikus diformulasi berdasarkan metode AOAC (1990) berupa

ransum *semi purified* sebagai ransum standar, dengan suplementasi minyak ikan dan amida minyak ikan menurut perlakuan. Kelompok kontrol (A) mendapat sumber lemak dari minyak jagung, sedangkan kelompok perlakuan masing-masing mendapat suplementasi 4,5% minyak ikan (B), 3% minyak ikan+1,5% amida (C), 1,5% minyak ikan+3% amida (D), dan 4,5% amida (E). Masa adaptasi dilakukan selama 7 hari dengan pemberian ransum standar. Tikus dibagi secara acak atas lima perlakuan dengan jumlah masing-masing perlakuan sebanyak tujuh ekor. Ransum percobaan dan air minum diberikan secara *ad libitum* selama enam minggu.

### Pengambilan Sampel Darah dan Analisis Darah

Proses pengambilan darah dilakukan melalui jantung menggunakan alat suntik setelah tikus dibius dengan eter, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan EDTA. Sampel darah dibagi menjadi dua yaitu untuk analisis hematologi dan untuk analisis profil lemak darah.

### Analisis hematologi

Pemeriksaan jumlah sel darah merah (eritrosit) menggunakan larutan pengencer Hayem kemudian dihitung menggunakan hemositometer Neubauer di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x. Hal yang sama juga dilakukan untuk menghitung jumlah sel darah putih (leukosit) dengan larutan pengencer Turk. Diferensiasi leukosit dilakukan dengan sediaan apus darah yang diwarnai dengan pewarna Giemsa. Pengamatan dan penghitungan persentase jenis sel dilakukan menggunakan mikroskop. Kadar hematokrit ditentukan ke dalam tabung mikrohematokrit lalu disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 11.500 rpm, dan angka hematokrit dicatat (Sastradipraja *et al.*, 1989). Pengukuran kadar hemoglobin (Hb) dilakukan dengan metoda *cyanmethemoglobin*.

### Analisis profil lemak plasma

Sampel darah yang akan digunakan disentrifus untuk mendapatkan plasma. Pemeriksaan kolesterol total dan kolesterol *high density lipoprotein* (HDL) dilakukan dengan metoda CHOD-PAP, sedangkan pemeriksaan trigliserida dengan metoda GPO-PAP menggunakan *human kit*. Pemeriksaan *low density lipoprotein* (LDL) dilakukan secara langsung dengan metoda *enzymatic calorimetric* (Sekisuidiagnostics, 2012).

### Analisis Data

Data dianalisis menggunakan ANCOVA dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil atau *least significant difference* (LSD).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Rataan nilai hematologis darah tikus hasil penelitian disajikan pada Tabel 1. Jumlah eritrosit pada semua kelompok perlakuan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) dan masih berada dalam kisaran normal, yaitu  $7 \times 10^6 - 9,7 \times 10^6 / \text{mm}^3$  (Schermer, 1967 yang disitasi Ringler dan Dabich, 1979). Nilai hematokrit dari semua perlakuan

kira-kira tiga kali lipat dari nilai hemoglobin (Ringler dan Dabich, 1979). Kelompok tikus perlakuan B memperlihatkan nilai hematokrit yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) dibandingkan kelompok tikus perlakuan D. Pada kelompok tikus ini, nilai hematokrit yang rendah sangat dipengaruhi oleh kadar hemoglobin yang rendah. Kadar hemoglobin tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan. Namun demikian nilai rata-rata kadar hemoglobin pada kelompok tikus yang mendapat perlakuan D dan E berada di bawah kisaran normal, yaitu 11,4-19,2 g/dl. Hal ini mungkin terjadi karena sifat toksik dari amida yang merusak membran plasma sehingga hemoglobin keluar dari sel ke dalam plasma yang disebut juga hemolisis (Leeson *et al.*, 1990).

Hensyl (1990) mendefinisikan imunitas sebagai status atau kualitas ketahanan suatu organisme terhadap infeksi. Leukosit merupakan bagian dari sistem ketahanan tubuh yang terpenting. Sistem imun menggunakan sistem limfatik dan peredaran darah sebagai lalu lintas ke seluruh tubuh. Hal ini meliputi produksi antibodi yang spesifik yang mengenali organisme penginfeksi atau material asing lainnya (antigen) atau aktivasi jaringan proteksi dari sel khusus yang disebut limfosit (Sherman dan Hallquist, 1990; Gurr, 1992).

Jumlah leukosit pada kelompok tikus perlakuan B nyata lebih rendah ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok tikus perlakuan E. Hal ini karena pemberian PUFA  $\omega$ -3 dalam jumlah moderat dapat mengatur fungsi imun, dan menekan kejadian infeksi (McCowen dan Bistrrian, 2003). Sebaliknya, pada kelompok tikus perlakuan E jumlah leukosit meningkat nyata seiring dengan meningkatnya limfosit. Namun jumlah leukosit tidak dapat memberi informasi yang spesifik, dan diperlukan jumlah deferensiasi leukosit untuk menjabarkannya (Aboderin dan Oyetao, 2006).

Jumlah diferensiasi leukosit tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan. Namun pada kelompok tikus perlakuan E menunjukkan peningkatan pada jumlah limfosit dan monosit sebagai respons perlawanan tubuh terhadap sifat toksin dari amida. Kresno (1996) menjelaskan bahwa bila sistem imun terpapar pada zat yang dianggap asing, sel-sel radang seperti neutrofil, eosinofil, monosit, dan makrofag akan menghancurkannya secara fagositosis dengan memproduksi superoksida dan jenis oksigen reaktif. Monosit dan makrofag juga menghasilkan sitokin,

yang menghubungkan sel-sel radang dengan imunitas spesifik karena dapat merangsang limfosit T dan B. Limfosit T berfungsi sebagai perlindungan terhadap infeksi virus dan merusak beberapa sel kanker, sedangkan limfosit B berperan dalam pembentukan antibodi (Kew *et al.*, 2003; Medicaastrore, 2012).

Lipoprotein merupakan kompleks protein-lipida dalam darah, yang terdiri atas tiga tipe: lipoprotein berdensitas rendah atau LDL yang molekulnya terdiri atas 46% kolesterol; lipoprotein berdensitas tinggi atau HDL yang mengandung 20% kolesterol, dan VLDL yang mengandung 8% kolesterol. Tingginya kandungan kolesterol dalam LDL merupakan penyebab utama timbulnya penyakit jantung koroner, sebaliknya HDL berperan sebagai pelindung (Bender, 1992). Rataan konsentrasi lemak lasma tikus penelitian disajikan pada Tabel 2.

Total kolesterol plasma dan HDL tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) pada semua kelompok perlakuan. Hal ini kemungkinan karena ransum kontrol mengandung minyak jagung yang kaya asam linoleat. Dari beberapa studi metabolik melaporkan bahwa asam linoleat berpengaruh kuat dalam menurunkan kolesterol plasma (Hu *et al.*, 2001). Salah satu fungsi HDL adalah mengangkut kolesterol dari jaringan perifer kembali ke hati, selanjutnya digunakan untuk sintesis asam empedu yang disekresikan ke dalam jaringan usus (Starr, 1994).

Konsentrasi LDL plasma meningkat nyata ( $P < 0,05$ ) pada kelompok tikus perlakuan D dan E. Hal ini diduga karena asam-asam lemak ikatan rangkap terikat kuat dalam kompleks amida, sehingga yang terserap oleh pencernaan hanya asam-asam lemak jenuh. Amida merupakan ikatan yang kuat, yang hanya terhidrolisis dalam larutan asam dan basa kuat (Wilbraham dan Matta, 1992). Minyak ikan yang digunakan dalam proses amidasi mengandung asam miristat (C14) dan asam palmitat (C16) yang relatif tinggi, masing-masing 11,74% dan 17,94%. Asam lemak jenuh dengan 12-16 jumlah karbon cenderung meningkatkan konsentrasi kolesterol total dan LDL plasma. Cara kerjanya diduga dengan menekan reseptor terikat yang membersihkan kolesterol LDL dari peredaran dan dengan meningkatkan sekresi VLDL kolesterol oleh hati (Ginsberg dan Karmally, 2000). Dibandingkan asam laurat (C12) dan asam palmitat, asam miristat lebih berpotensi dalam meningkatkan kadar kolesterol plasma (Hu *et al.*, 2001).

**Tabel 1.** Nilai rata-rata hematologi darah tikus yang mendapat perlakuan ransum *semi purified* yang mengandung 8% minyak jagung (A), 4,5% minyak ikan (B), 3% minyak ikan+1,5% amida (C), 1,5% minyak ikan+3% amida (D), dan 4,5% amida (E)

Peubah	Perlakuan				
	A	B	C	D	E
Eritrosit ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	8,566	7,666	8,008	8,392	7,897
Hematokrit (%)	35,918 <sup>ab</sup>	37,464 <sup>a</sup>	36,958 <sup>a</sup>	32,924 <sup>b</sup>	34,815 <sup>ab</sup>
Hb (g/dL)	12,135	12,038	11,973	10,941	11,317
Leukosit ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	13,011 <sup>ab</sup>	10,661 <sup>b</sup>	14,799 <sup>ab</sup>	14,690 <sup>ab</sup>	17,996 <sup>a</sup>
Neutrofil ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	3,380	2,419	2,610	4,675	3,992
Limfosit ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	8,902	7,724	11,192	9,278	13,037
Monosit ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	4,98	2,93	6,34	4,31	7,51
Eosinofil ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	2,30	2,40	3,64	3,07	2,16

<sup>a, ab, b</sup> Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

**Tabel 2.** Rataan konsentrasi lemak darah (mg/dl) tikus perlakuan yang mendapat perlakuan ransum *semi-purified* yang mengandung 8% minyak jagung (A), 4,5% minyak ikan (B), 3% minyak ikan+1,5% amida (C), 1,5% minyak ikan+3% amida (D), dan 4,5% amida (E)

Peubah	Perlakuan				
	A	B	C	D	E
Kolesterol total (mg/dl)	48,886	40,951	42,864	54,098	47,915
Trigliserida (mg/dl)	50,036 <sup>b</sup>	50,730 <sup>b</sup>	64,256 <sup>b</sup>	122,233 <sup>a</sup>	94,556 <sup>ab</sup>
HDL (mg/dl)	29,514	21,806	19,694	20,685	24,058
LDL (mg/dl)	8,147 <sup>b</sup>	8,329 <sup>b</sup>	8,305 <sup>b</sup>	11,645 <sup>a</sup>	11,431 <sup>a</sup>

<sup>a, ab, b</sup> Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Kelompok tikus perlakuan D memperlihatkan konsentrasi trigliserida plasma yang nyata lebih tinggi ( $P < 0,05$ ), dibandingkan kelompok tikus perlakuan A, B, dan C, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok tikus perlakuan E. Diduga, ikatan amida yang kuat hanya asam-asam lemak jenuh yang tercerna yang berimplikasi pada meningkatnya trigliserida plasma sedangkan pemberian PUFA dapat menurunkan trigliserida plasma melalui mekanisme penurunan produksi endogenus lipoprotein yang kaya trigliserida (medium transpor trigliserida dalam darah), meningkatkan eliminasi lipoprotein yang kaya trigliserida, atau meningkatkan aktivitas lipase lipoprotein (Djoussé *et al.*, 2003).

## KESIMPULAN

Suplementasi amida minyak ikan dalam ransum 4,5% meningkatkan jumlah leukosit dibandingkan pemberian minyak ikan. Suplementasi amida minyak ikan dalam ransum tidak mempengaruhi kadar kolesterol plasma tetapi mulai pemberian 3% meningkatkan LDL dan trigliserida plasma.

## DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington D.C.
- Aboderin, F.I., dan V.O. Oyetayo, 2006. Haematological studies of rats fed different doses of probiotic, *Lactobacillus plantarum*, isolated from fermenting corn slurry. **Pakistan J. Nutr.** 5(2):102-105.
- Bender, A. 1992. **Meat and Meat Products in Human Nutrition in Developing Countries**. FAO, Roma.
- Cooper, S.L., L.A. Sinclair, R.G. Wilkinson, K.G. Hallet, M. Enser, and J.D. Wood. 2004. Manipulation of the N-3 polyunsaturated fatty acid content of muscle and adipose tissue in lamb. **J. Anim. Sci.** 82:1461-1470
- Djoussé, L., S.C. Hunt, D.K. Arnett, M.A. Province, J.H. Eckfeld, and R.C. Ellison. 2003. Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: The national heart, lung, and blood institute family heart study. **Am. J. Clin. Nutr.** 78(6):1098-1102
- Ekeren, P.A., D.R. Smith, D.K. Lunt, and S.B. Smith. 1992. Ruminant biohydrogenation of fatty acids from high-oleate sun flower seeds. **J. Anim. Sci.** 70:2574-2580.
- Feairheller, S.H., R.G. Bistlin Jr, A. Bilyk, R.L. Dudley, M.F. Kozempel, and M.J. Hass. 1994. A novel technique for the preparation of secondary fatty amides. III. Alkanolamides, diamides and arakylamides. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 71:863-866.
- Ginsberg, H.N. and W. Karmally. 2000. Nutrition, Lipids, and Cardiovascular Disease. In **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition**, Stipanuk M.H. (ed). W.B. Saunders Co, Philadelphia.

- Gurr, M.I. 1992. **Role of Fats in Food and Nutrition**. Elsev. App. Sci., London.
- Hensyl, W. 1990. **Stedman's Medical Dictionary**. 25<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hu, F.B., J.E. Manson, and W.C. Willet. 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. **J. Am. Coll. Nutr.** 20(1):5-19.
- Irie, M., and M. Sakimoto. 1992. Fat characteristics of pig fed fish oil containing eicosapentanoic and docosahexanoic acids. **J. Anim. Sci.** 70:470-477.
- Jenkins, T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. **J. Dairy Sci.** 76:3851-3863.
- Jenkins, T.C. and C.S. Adam. 2002. The biohydrogenation of linoleamide in vitro and its effects on linoleic acid concentration in duodenal contents of sheep. **J. Anim. Sci.** 80:533-540.
- Kelley, D.S., G.J. Nelson, C.M. Serato, P.C. Schmidt, and L.B. Branch. 1988. Effect of type of dietary fat on indices of immune status of rabbits. **J. Nutr.** 118(11):1376-1384.
- Kew, S., T. Benerjee, A.M. Minihane, Y.E. Finnegan, R. Muggli, R. Albers, C.M. Williams, and P.C. Calder. 2003. Lack of effect of food enriched with plant- or marine-derived n-3 Fatty acids on human immune function. **Am. J. Clin. Nutr.** 77(5):1287-1295.
- Kresno, S.B. 1996. **Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium**. Edisi ketiga. FKUI, Jakarta.
- Leeson, C.R., T.S. Lesson, dan A.A. Paparo. 1990. **Buku Ajar Histologi**. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- McCowan, K.C. and B.R. Bistrian. 2003. Immunonutrition: problematic or problem solving? **Am. J. Clin. Nutr.** 77(4):764-770.
- Medicastore. 2012. Biologi Darah. [http://medicastore.com/penyakit/160/Biologi\\_Darah.html](http://medicastore.com/penyakit/160/Biologi_Darah.html)
- Moibi, J.A. and R.J. Christopherson. Effect of environmental temperature and a protected lipid supplement on the fatty acid profile of ovine longissimus dorsi muscle, liver and adipose tissues. **Livest. Prod. Sci.** 69:245-254.
- Ponnampalan E.N., A.J. Sinclair, B.J. Hosking, and A.R. Egan. 2002. Effects of dietary lipid type on muscle fatty acid composition, carcass leanless, and meat toughness in lamb. **J. Anim. Sci.** 80:628-636.
- Ringler, D.H. and L. Dabich. 1979. Hematology and Clinical Biochemistry. In **The Laboratory Rat. Volume I Biology and Diseases**. H.J. Baker, J.R. Lindsey, and S.H. Weisbroth (eds). Academic Press, Inc., New York.
- Sastradipradja, D., S.S. Sri Hartini, W. Reviany, U. Tonny, M. Achmad, N. Hamdani, S. Regina, dan H. Razak. 1989. **Penuntun Praktikum Fisiologi Veteriner**. PAU, IPB, Bogor.
- Schermer, S. 1967. **The Blood Morphology of Laboratory Animals**. 3<sup>rd</sup> Ed. Davis, Philadelphia, Pennsylvania.
- Sekisuidiagnostics. 2012. Direct Liquid Select Cholesterol Reagent. [http://www.Sekisuidiagnostics.com/pdf/Gen\\_LDL\\_7120\\_PL\\_pdf](http://www.Sekisuidiagnostics.com/pdf/Gen_LDL_7120_PL_pdf)
- Sherman, A.R. and N.A. Hallquist. 1990. Immunity. In **Present Knowledge in Nutrition**. Brown, M.L. (ed). 6<sup>th</sup> Edition. International Life Sci. Institute Nutr. Found, Washington D.C.
- Starr, C. 1994. **Biology. Concepts and Applications**. Wadsworth Publishing Company. Belmont, CA.
- Wilbraham, A.C. dan M.S. Matta. 1992. **Pengantar Kimia Organik dan Hayati**. Penerbit ITB, Bandung.