

**PENETAPAN KADAR ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA) DAN ASAM
EIKOSAPENTAENOAT (EPA) DALAM SUSU BUBUK SECARA
KROMATOGRAFI GAS**

VILKA FITRIATI

0305250654



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM EKSTENSI
DEPOK
2008**

**PENETAPAN KADAR ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA) DAN ASAM
EIKOSAPENTAENOAT (EPA) DALAM SUSU BUBUK SECARA
KROMATOGRAFI GAS**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

VILKA FITRIATI

0305250654



DEPOK

2008

SKRIPSI : PENETAPAN KADAR ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA)
DAN ASAM EIKOSAPENTAENOAT (EPA) DALAM SUSU
BUBUK SECARA KROMATOGRAFI GAS

NAMA : VILKA FITRIATI

NPM : 0305250654

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008

Dr. HARMITA, Apt

PEMBIMBING I

Dr. HERMAN SURYADI, MS

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sarjana :
Penguji I :
Penguji II :
Penguji III :

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kita panjatkan kepada Allah SWT, Rabb semesta alam yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Shalawat dan salam semoga tercurahkan kepada Rasulullah SAW, keluarga, sahabat dan para pengikutnya hingga akhir zaman.

Skripsi dengan judul '**Penetapan Kadar Asam Dokosaheksaenoat (DHA) dan Asam Eikosapentaenoat (EPA) dalam Susu Bubuk Secara Kromatografi Gas**' diajukan sebagai syarat yang harus dipenuhi dalam menyelesaikan mata kuliah Skripsi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Selama proses penyusunan Skripsi ini, penulis telah banyak mendapatkan masukan maupun bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Harmita, Apt dan Bapak Dr. Herman Suryadi, MS, selaku pembimbing atas bimbingan dan ilmu yang bermanfaat bagi penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Maksum Radji, MBIomed, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
3. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS, selaku Ketua Program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

4. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua KBI Kimia Farmasi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
5. Bapak Sutriyo, MSi, selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan bimbingan selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
6. Seluruh staf pengajar, laboran, serta karyawan Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
7. Keluarga yang sangat penulis kasihi, ibu, bapak, adik-adikku serta husni yang selalu memberikan dukungan materi dan moril, berupa kasih sayang, semangat, perhatian maupun doa.
8. Rekan-rekan kerja di KBI Kimia Farmasi, Vina, Inggit, mba Tri, Ati, Risdie atas bantuan dan dukungannya
9. Semua pihak lain yang belum disebutkan, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah banyak membantu penulis.

Depok, April 2008

Penyusun

ABSTRAK

DHA (asam dokosaheksaenoat) dan EPA (asam eikosapentaenoat) merupakan asam lemak tidak jenuh rantai panjang omega-3 yang terdapat dalam susu bubuk dan dibutuhkan oleh tubuh dengan kadar tertentu untuk perkembangan otak dan retina mata. Karena kadarnya yang kecil, maka diperlukan metode analisis yang sensitif dan selektif. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kadar DHA dan EPA dalam matriks susu bubuk secara kromatografi gas yang terlebih dahulu diderivatisasi menggunakan reagen pemetilasi. Kondisi analisis optimum untuk campuran DHA metil ester dan EPA metil ester yaitu pada kecepatan alir gas 1,35 ml/menit, suhu injektor 230^oC, suhu detektor 250^oC, menggunakan pemrograman suhu dengan suhu awal 120^oC, kenaikan suhu 2^oC/menit sampai mencapai suhu 230^oC dipertahankan selama 100 menit. Heksan digunakan sebagai pelarut. Hasil pemeriksaan terhadap 3 sampel, menunjukkan kandungan DHA dan EPA pada sampel A berturut-turut sebesar 0,0024 dan 0,0019 %b/b, sampel B berturut-turut sebesar 0,0041 dan 0,0191 %b/b, dan sampel C berturut-turut sebesar 0,0068 dan 0,0018%b/b.

Kata kunci : DHA, EPA, kromatografi gas, omega-3, susu bubuk

x + 104 hlm; gbr; tabel; lamp.

Daftar acuan : 36 (1960-2006)

ABSTRACT

DHA (docosahexaenoic acid) and EPA (eicosapentaenoic acid) are a long chain polyunsaturated fatty acid omega-3 that consist in powder milk and needed for our body with certain concentration for brain and eyes development. Because of a small rate, so it is required sensitive and selective analyze method. The purposed of this research was to determine DHA and EPA contents in powder milk matrix by gas chromatography which was derivatisized with methylating agent. Optimum analytical condition of DHA methyl ester and EPA methyl ester were flow rate at 1.35 ml/minute, injector at 230⁰C, detector at 250⁰C, and using temperature programmed which beginning temperature at 120⁰C, followed by increasing temperature 2⁰C/minute until the temperature 230⁰C which was maintaining for 100 minutes. Hexane used as a solvent. The result from 3 samples, showed DHA and EPA contents in sample A were 0.002393 and 0.001864 %b/b, in sample B were 0.004091 and 0.019134 %b/b, and in sample C were 0.006822 and 0.001778%b/b.

Key words : DHA, EPA, gas chromatography, omega-3, powder milk

x + 104 pg.; fig.; tab.; app.

Bibliography : 36 (1960-2006)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Susu	5
B. Minyak dan Lemak	15
C. DHA dan EPA	22
D. Metode Analisis DHA dan EPA	25
E. Kromatografi Gas	27
F. Validasi Metode Analisis	36

BAB III. ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA.....	40
A. Alat	40
B. Bahan	40
C. Cara Kerja	41
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	50
A. Hasil.....	50
B. Pembahasan	53
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	66
A. Kesimpulan	66
B. Saran.....	67
DAFTAR ACUAN.....	68

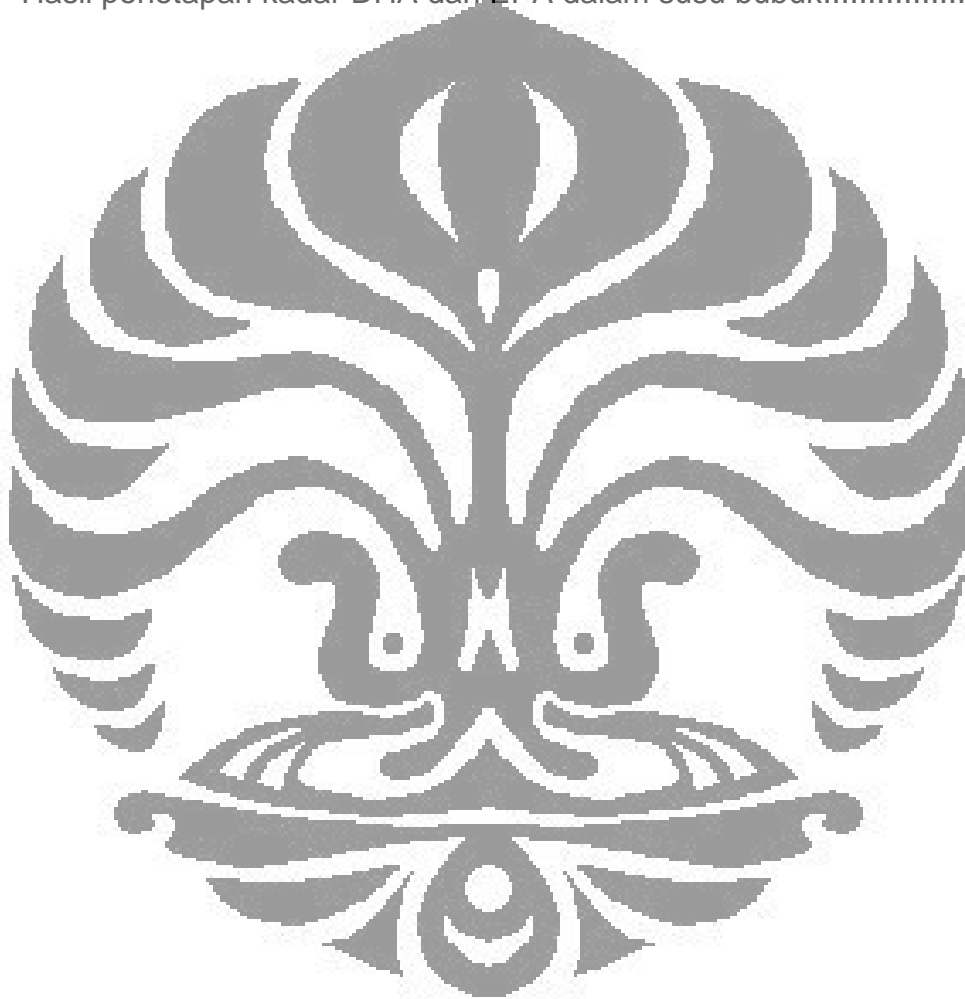
DAFTAR GAMBAR

Gambar		Hal.
1.	Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester pada suhu 120°C dan kecepatan alir gas 1,35 ml/menit.....	73
2.	Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester pada suhu 130°C dan kecepatan alir gas 1,35 ml/menit.....	74
3.	Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester pada suhu 140°C dan kecepatan alir gas 1,35 ml/menit.....	75
4.	Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester pada suhu 150°C dan kecepatan alir gas 1,35 ml/menit.....	76
5.	Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester pada suhu 120°C dan kecepatan alir gas 1,80 ml/menit.....	77
6.	Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester pada suhu 120°C dan kecepatan alir gas 2,00 ml/menit.....	78
7.	Kurva kalibrasi baku DHA metil ester.....	79
8.	Kurva kalibrasi baku EPA metil ester.....	80
9.	Kromatogram sampel A.....	81
10.	Kromatogram sampel B.....	82
11.	Kromatogram sampel C.....	83
12.	Alat kromatografi gas Shimadzu 17 A.....	84

DAFTAR TABEL

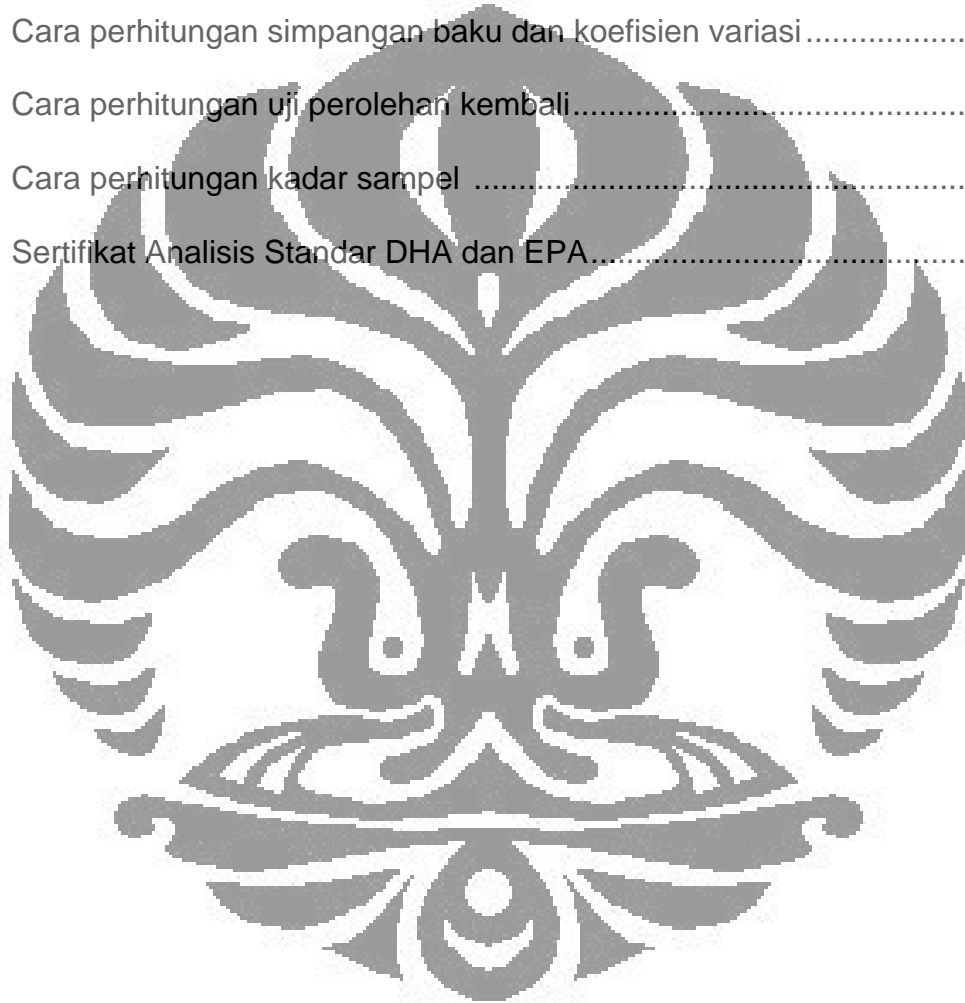
Tabel		Hal.
1.	Komposisi kimiawi rata-rata susu sapi	7
2.	Kandungan mineral rata-rata dalam susu dan dalam abu.....	9
3.	Contoh asam-asam lemak jenuh.....	18
4.	Contoh asam-asam lemak tidak jenuh	19
5.	Pemilihan kondisi analisis optimum untuk campuran asam dokosaheksaenoat (DHA) dan asam eikosapentaenoat (EPA) dalam heksan dengan variasi suhu awal kolom dan kecepatan alir	86
6.	Hasil pengukuran baku asam dokosaheksaenoat untuk pembuatan kurva kalibrasi	87
7.	Hasil pengukuran baku asam eikosapentaenoat untuk pembuatan kurva kalibrasi	88
8.	Data untuk perhitungan penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi asam dokosaheksaenoat	89
9.	Data untuk perhitungan penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi asam eikosapentaenoat	90
10.	Hasil pengukuran baku asam dokosaheksaenoat untuk data presisi.....	91

11.	Hasil pengukuran baku asam eikosapentaenoat untuk data presisi	92
12.	Hasil uji perolehan kembali asam dokosaheksaenoat.....	93
13.	Hasil uji perolehan kembali asam eikosapentaenoat	94
14.	Hasil penetapan kadar DHA dan EPA dalam susu bubuk.....	95



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Hal.
1.	Cara memperoleh persamaan garis linear	98
2.	Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantisasi	99
3.	Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi	100
4.	Cara perhitungan uji perolehan kembali	101
5.	Cara perhitungan kadar sampel	103
6.	Sertifikat Analisis Standar DHA dan EPA	105



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Susu merupakan salah satu komponen pelengkap dalam pola makan sehat yang dikenal dengan istilah “4 sehat 5 sempurna”. Susu dibutuhkan oleh berbagai kalangan, mulai dari bayi, anak-anak, orang tua terutama ibu hamil, dan manula. Ibu hamil dan bayi diharuskan meminum susu karena bayi membutuhkan nutrisi yang lebih lengkap untuk pertumbuhannya, terutama organ-organ vital seperti otak dan mata.

Lemak adalah salah satu komponen dalam susu. Lemak seringkali dianggap sebagai senyawa yang “jahat” terhadap tubuh dan dianggap dapat menyebabkan beberapa penyakit. Anggapan ini tidak sepenuhnya benar karena disamping lemak mengandung kalori yang tinggi, lemak juga mengandung asam lemak-asam lemak essensial yang sangat dibutuhkan tubuh (1).

Asam lemak essensial (*essential fatty acids* = EFAs) merupakan nutrisi yang diperlukan dalam jumlah makro (gram/hari) dan tidak dapat dibuat oleh tubuh manusia. Asam lemak essensial diperlukan untuk mempertahankan fungsi sel dan jaringan tubuh, misalnya menjadi bagian dari barrier membran

sel dan organel, menjaga fluiditas dan reaktifitas kimia membran, juga merupakan prekursor prostaglandin (2).

Asam lemak esensial terdiri dari omega-6 EFA (asam lemak linoleat) (18:2 n-6) dan omega-3 EFA (asam lemak linolenat) (18:3 n-3). Asam lemak esensial linoleat dan linolenat berperan sebagai bahan dasar untuk pembentukan zat yang menyerupai hormon (*hormon-like substances*), terdiri dari prostaglandin dan leukotrien. Asam linolenat dan hasil metabolisemenya yang mempunyai rantai lebih panjang, yaitu EPA (*eicosapentaenoic acid*) dan DHA (*docosahexaenoic acid*) mempunyai peran lebih awal dan sama penting dengan protein dalam perkembangan sel, khususnya sel otak manusia. Asam linolenat banyak ditemukan dalam minyak sayur. EPA dan DHA banyak terdapat dalam ikan laut, misalnya ikan tuna dan ikan salmon. DHA dan EPA juga terdapat dalam susu (2).

Saat ini iklan susu sedang marak dibicarakan di media cetak maupun elektronik, sehingga mendorong untuk menelusuri lebih lanjut tentang perlunya suplementasi DHA dan EPA dalam susu (3). DHA dan EPA diperlukan oleh tubuh dengan kadar tertentu. Bila kadar DHA dan EPA terlalu berlebih pada bayi, dapat menyebabkan pendarahan dan gangguan sistem kekebalan tubuh. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai kadar DHA dan EPA yang terdapat pada susu dan hasil yang diperoleh dibandingkan dengan kadar DHA dan EPA yang diizinkan oleh WHO. WHO/FAO melalui *Standard Codex Alimentarius, Food and Drug*

Administration (FDA), European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN) Committee on Nutrition, dan juga American Academy of Pediatrics mengatur susu formula pada standar yang tinggi, sehingga bayi yang diberi susu formula terjamin kebutuhan nutrisinya. Standar itu diterapkan pada susu formula agar kandungan zat gizi susu formula tidak kurang dari standar minimum, dan tidak melebihi standar maksimum yang telah ditetapkan (4).

Analisis asam lemak esensial DHA dan EPA dalam susu dapat dilakukan dengan metode kromatografi gas. Kromatografi gas merupakan metode yang paling sering digunakan di laboratorium penelitian dan industri. Hal ini disebabkan oleh tingkat keberhasilan yang tinggi dan keuntungan lainnya, seperti : metode yang sederhana, kecepatan analisis yang tinggi, sensitivitas yang tinggi pada sistem detektor, efisiensi pemisahan, mampu menganalisis sampel dengan matriks yang kompleks, dan jumlah sampel yang diperlukan untuk analisis relatif sedikit. Melalui penelitian ini, diharapkan diperoleh suatu metode analisis yang dapat digunakan untuk memantau kadar DHA dan EPA yang terdapat dalam sampel susu bubuk yang beredar di pasaran.

B. TUJUAN

1. Memperoleh kondisi analisis optimum DHA dan EPA dalam sampel susu bubuk secara kromatografi gas.
2. Melakukan uji validasi terhadap metode atau kondisi analisis optimum yang diperoleh
3. Menetapkan kadar DHA dan EPA dalam sampel susu bubuk dengan menggunakan prosedur terpilih.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. SUSU

1. Definisi

Susu merupakan hasil pemerahan susu sapi atau hewan lain yang dapat dikonsumsi dan digunakan sebagai bahan makanan yang sehat dan tidak dikurangi komponen-komponennya atau ditambah bahan-bahan lain (5). Susu adalah cairan berwarna putih yang diperoleh dari hasil pemerahan sapi atau binatang menyusui lainnya yang dapat dikonsumsi maupun digunakan sebagai bahan pangan yang sehat (6). Susu pada umumnya ialah susu sapi, yang tidak ditambahkan sesuatu apapun padanya, diperoleh dengan jalan pemerahan sapi yang sehat secara sempurna serta mempunyai berat jenis minimal 1,028 pada suhu 27,5°C dan kadar lemak minimal 2,7% (7). Susu merupakan bahan makanan yang sempurna, karena :

1. Susu mengandung zat-zat makanan yang penting bagi tubuh.
2. Mempunyai perbandingan yang sempurna dari zat gizi yang terkandung didalamnya.
3. Gizi yang tersedia dalam susu dapat dicerna dan diserap oleh tubuh secara sempurna.

Susu yang paling ideal untuk bayi adalah ASI. ASI merupakan makanan yang paling ideal untuk bayi karena mengandung semua zat gizi yang dibutuhkan, seperti : sumber energi, meningkatkan sistem pertahanan tubuh, serta penting untuk pertumbuhan dan perkembangan bayi. Selain ASI, bayi juga membutuhkan tambahan susu formula pengganti ASI (8). Kandungan susu formula dibuat semirip mungkin dengan ASI untuk memenuhi segala kebutuhan nutrisi bayi, seperti : karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral, dan air. Sebagian besar formula ini diambil dari susu sapi, yang kandungannya dinilai hampir menyerupai air susu manusia dan mampu memenuhi kebutuhan gizi bayi (4). Susu yang diperuntukkan bagi orang dewasa memiliki kandungan yang berbeda dengan susu untuk bayi.

2. Komposisi

Komposisi air susu lebih lengkap daripada bahan pangan lain, artinya komponen-komponen yang dibutuhkan oleh tubuh semuanya terdapat dalam susu. Komponen utamanya terdiri dari protein, lemak, karbohidrat, mineral, vitamin, dan air. Komponen-komponen lainnya yang terkandung dalam susu yang bersifat *trace* (jumlahnya sedikit) tetapi penting antara lain lesitin, fosfolipid, kolesterol, dan asam-asam organik.

Komponen-komponen susu selain air disebut sebagai padatan. Jika padatan dihilangkan lemaknya, maka disebut padatan bukan lemak (*solid non fat*).

Tabel 1. Komposisi Kimiawi Rata-Rata Susu Sapi.

Komponen	Rata-rata (%)	Variasi (%)
Protein	3,6	2,9-5,0
Lemak	3,8	2,5-6,0
Laktosa	4,8	3,6-5,5
Mineral (abu)	0,7	0,6-0,9
Air	87,2	85,5-89,5
Total padatan	13	10,5-14,5

Komposisi susu secara kimiawi, terdiri dari :

a) Protein

Protein susu dibagi dalam dua kelompok utama, yaitu kasein (80%) dan protein *whey* (20%). Selain dua kelompok protein tersebut terdapat pula jenis-jenis protein lainnya sebagai enzim dan immunoglobulin (antibodi). Protein hanya dapat memberikan 4,1 kalori setiap gram.

b) Lemak Susu

Lemak merupakan penyusun yang penting dari susu, karena :

1. Mempunyai arti ekonomis yang penting karena dapat digunakan sebagai bahan mentah dalam pembuatan mentega. Usaha seleksi sapi perah kadang-kadang ditujukan untuk menghasilkan jenis sapi yang menghasilkan air susu yang kadar lemaknya tinggi.

2. Lemak mempunyai nilai gizi tinggi atas dasar jumlah kalori yang dikandungnya. Selain itu, lemak juga mengandung zat-zat lain yang penting seperti asam-asam lemak essensial.
3. Lemak memegang peranan penting dalam menentukan rasa, bau, dan tekstur.
4. Lemak merupakan *konstituen* yang dapat mempengaruhi kesehatan manusia (9).

Lemak susu adalah bagian dari komposisi susu yang terutama tersusun oleh trigliserida. Lemak susu ini mempunyai kadar (%) yang bervariasi diantara individu sapi. Di dalam susu, lemak terdapat sebagai globula atau emulsi yaitu bulatan-bulatan minyak berukuran kecil di dalam serum susu. Bentuk globula bervariasi dari 0,10-0,22 μm . Globula-globula lemak tersebar merata di dalam susu sebagai emulsi lemak dalam air, yang berada dalam fase terdispersi. Globula-globula lemak tetap terpisah karena adanya lapisan koloid yang mengelilingi globula lemak yaitu protein dan fosfolipid. Lemak susu mengandung berbagai asam lemak.

Fosfolipid merupakan suatu senyawa gliserol yang dua gugus OH-nya berikatan dengan asam lemak, sedangkan gugus OH ketiga berikatan dengan asam fosfat. Lesitin termasuk fosfolipid berupa turunan lemak yang mengandung nitrogen dan fosfor. Lesitin dalam susu terdapat dalam jumlah 0,02% sampai 0,04%. Lesitin berfungsi sebagai *instantizer*, yang akan bergabung dengan partikel-partikel susu bubuk sehingga partikel tersebut mudah menyerap air dan mempercepat penarikan air dalam pelarutan susu

bubuk. Komponen lemak lain yang terdapat dalam susu adalah kolesterol ($C_{22}H_{44}OH$). Kandungan kolesterol dalam susu sekitar 105-176 ppm, atau sekitar 0,015%

c) Laktosa

Kelompok gula terkecil yang terdapat dan yang termasuk dalam kelompok kimia organik, disebut karbohidrat adalah laktosa. Laktosa merupakan disakarida yang tersusun dari glukosa dan galaktosa dengan ikatan α -1,4. Kandungan laktosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) dalam susu bervariasi antara 3,6-5,5%.

d) Garam-Garam Mineral

Bila air pada susu dihilangkan dengan penguapan dan sisa yang kering dibakar pada panas rendah akan diperoleh sisa abu putih yang berisi bahan-bahan mineral. Kadar abu susu sekitar 0,7% yang terdiri dari unsur anorganik atau mineral. Adapun kandungan mineral dalam 100 g susu dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Mineral Rata-Rata Dalam Susu dan Dalam Abu.⁽¹⁰⁾

Unsur-	Dalam susu (%)	Dalam abu(%)
Potassium	0,140	20
Kalsium	0,125	17,4
Klorin	0,103	14,5
Fosfor	0,096	13,3

Sodium	0,056	7,8
Magnesium	0,012	1,4
Sulfur	0,025	3,6

e) Air

Komponen yang terbanyak dalam susu adalah air yang mencapai 85,5% sampai 89,5%. Air merupakan tempat tersebarnya komponen-komponen susu lainnya. Komponen-komponen yang terdispersi secara molekuler (larut) adalah laktosa, garam-garam mineral, dan beberapa vitamin. Protein-protein, kasein, laktoglobulin, dan albumin tersebar secara koloidal, sedangkan lemak merupakan emulsi.

3. Sifat Fisika dan Sifat Kimia

- Warna, Bau, dan Rasa

Warna susu normal adalah putih sampai kekuningan. Warna putih merupakan pantulan cahaya yang disebabkan oleh penyebaran gumpalan partikel lemak, kalsium kaseinat, dan kalsium fosfat dalam susu. Sedangkan warna kuning disebabkan adanya pigmen karoten dan riboflavin dalam susu. Susu mempunyai bau dan rasa yang khas. Susu juga berasa asin yang disebabkan adanya klorida, sitrat, dan garam mineral (11).

- Kekentalan

Pada susu yang normal, kekentalan dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti protein, lemak, suhu susu, umur susu, dan yang penting adalah kandungan kasein dan globula lemak.

- Keasaman

Susu mempunyai pH antara 6,5-6,7 pada suhu 25⁰C. Faktor pH ini penting untuk menyangga keberadaan mineral fosfat dalam susu. Bila pH lebih tinggi menandakan adanya mastitis (penyakit pada sapi) dan bila pH lebih rendah berarti terdapat kerusakan susu yang disebabkan oleh bakteri (12).

- Berat Jenis dan Kerapatan

Berat jenis adalah berat dibagi volume, sedangkan kerapatan adalah berat jenis suatu zat dibagi berat jenis air pada suhu yang sama. Susu mempunyai berat jenis lebih tinggi dari air yaitu sekitar 1,027-1,035 dan kerapatannya berkisar antara 1,0135-1,0510.

- Titik Beku

Titik beku susu adalah -0,5⁰C sampai -0,61⁰C. Titik beku ini berguna untuk menentukan ada tidaknya pemalsuan susu. Penambahan 1 % air (v/v) ke dalam susu akan meningkatkan titik beku susu sebesar 0,0055⁰C (13).

4. Produk-produk Susu Olahan

1. Susu Segar

Susu ini adalah hasil perahan sapi atau yang biasa disebut susu segar atau susu murni. Susu jenis ini biasa disebut sebagai jenis susu yang paling dasar, diperoleh dari hasil perahan sapi. Susu hasil pemerahan dari sapi sehat ini dapat dikonsumsi tanpa penambahan zat apapun. Jenis susu ini merupakan hasil para peternak sapi. Pengawetan dilakukan hanya dengan cara pendinginan pada suhu di bawah 8°C . Susu murni hanya mengandung 3,25% lemak susu. Susu segar ini tentu tidak tahan lama, sehingga tidak bisa disimpan lama apalagi pada suhu ruangan.

2. Susu Pasteurisasi

Susu pasteurisasi adalah susu segar yang telah mengalami proses pemanasan pada suhu 63°C sampai 66°C selama minimum 30 menit atau pada pemanasan 72°C selama minimum 15 detik, kemudian segera didinginkan sampai 10°C dan selanjutnya diperlakukan secara aseptis dan disimpan pada suhu maksimal $4,4^{\circ}\text{C}$.

3. Susu Konsentrat (*Concentrated Milk*)

Susu konsentrat adalah susu segar yang dipanaskan di tempat khusus dengan maksud untuk mengurangi kadar air sehingga menjadi susu yang kental. Susu konsentrat dapat dibedakan menjadi dua, yaitu :

- Susu kental tanpa gula (*Unsweetened condensed milk, evaporated milk*), yaitu air susu segar yang sebagian airnya (kurang lebih separuhnya) telah diuapkan di dalam ruang hampa pada suhu 125° - 130° C. Kemudian susu tersebut dimasukkan ke dalam kaleng susu (*can*) tertutup dan disterilkan pada suhu $115,56^{\circ}$ C selama 15 menit.
- Susu kental manis (*sweet condensed milk*), adalah susu segar yang langsung ditambah gula terlebih dahulu kemudian diuapkan seperti pada susu kental tanpa gula. Kadar gula yang ditambahkan sebagai bahan pengawet adalah 40%-44%, sedangkan kadar lemaknya minimal 8,5% dan bahan kering tanpa lemak 28%. Susu kental manis ini tidak baik untuk bayi karena kandungan gula dan lemaknya tinggi.

4. Susu Skim

Susu ini telah diproses dan dikenal dengan istilah susu tanpa lemak. Susu ini dihasilkan dari proses pemisahan lemak dan padatan non lemak dari susu segar. Pada umumnya produksi susu *skim* ini dikeringkan melalui proses pengabutan, sehingga dihasilkan susu bubuk dengan kadar lemak tidak boleh lebih dari 0,1% dan kadar air maksimal 3%.

5. Krim

Krim dengan kadar lemak rendah adalah jenis krim yang hanya mengandung 18-30% lemak susu. Krim jenis ini dikenal pula dengan nama *coffe cream* atau *table cream*.

6. Susu Sterilisasi

Susu jenis ini diproses dengan homogenisasi, disterilisasi, dan menjalani proses kemasan dalam suhu yang sangat tinggi (UHT = *Ultra High Temperatur*). Susu UHT adalah produk susu yang diperoleh dengan cara mensterilkan susu minimal pada suhu 135⁰C selama 2 detik, dengan atau tanpa penambahan bahan makanan dan bahan tambahan makanan yang diijinkan serta dikemas secara aseptik (14). Kemasannya biasanya dalam bentuk kalengan dan sebagian besar untuk keperluan impor. Ada pula yang dikemas dalam sejenis karton, biasanya hanya untuk memenuhi kebutuhan masyarakat setempat. Proses sterilisasi menggunakan panas yang sangat tinggi dengan waktu yang singkat, sehingga efek negatif terhadap kualitas nutrisi bisa diminimalkan.

7. *Fortified Milk*

Fortified milk adalah susu segar yang ditambahkan dengan vitamin-vitamin dan mineral. Vitamin yang ditambahkan biasanya adalah vitamin D.

8. Susu Kering (Susu Bubuk)

Susu bubuk meliputi susu bubuk *whole* (*whole milk*) dan susu *skim* bubuk. Susu *whole* bubuk adalah susu segar yang airnya diuapkan sehingga kadar airnya tinggal 2%. Sedangkan susu *skim* bubuk adalah hasil dari susu segar yang kadar lemaknya telah dikurangi tinggal 0,1% dan airnya diuapkan hingga tinggal 3%. Karena susu *skim* tepung ini kandungan proteinnya tinggi dan kadar lemaknya rendah, maka susu tersebut cocok untuk bayi atau anak-anak yang sedang tumbuh.

B. MINYAK DAN LEMAK

1. Klasifikasi Lipid ⁽¹⁵⁾

Lipid adalah senyawa organik yang terdapat di alam serta tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non polar seperti eter, kloroform, dan lain-lain. Secara klasik, lipid digolongkan ke dalam :

- a. Lipid yang dapat disabunkan, yaitu apabila ditambahkan dengan larutan alkali Na^+ dan K^+ akan menghasilkan sabun dan bahan-bahan lain.
- b. Lipid yang tidak dapat disabunkan.

Klasifikasi lipida menurut Bloor sebagai berikut :

- a. Lipid sederhana adalah lipida yang terbentuk dari ester dari berbagai alkohol dengan asam lemak. Lemak dan lilin termasuk lipid sederhana.
- b. Lipid campuran adalah ester asam lemak yang selain mempunyai gugus alkohol dan asam lemak, juga mengandung gugusan yang lain. Fosfolipid, glikolipid, lipoprotein, dan sulfolipid termasuk lipid campuran.
- c. Lipid turunan adalah zat atau bahan-bahan yang dihasilkan dari hidrolisis lipid-lipid tersebut di atas. Asam lemak, gliserol, steroid, alkohol selain gliserol, sterol, aldehida lemak, dan senyawa keton.

Lipid termasuk golongan amfifil yang mempunyai dua sifat, yaitu sifat suka air dan tidak suka air (hidrofil dan hidrofob). Sifat suka air pada asam lemak adalah akibat kandungan gugusan ionik atau gugusan polar, sedangkan sifat tidak suka air adalah akibat kandungan hidrokarbon yang non polar.

2. Asam Lemak

Asam lemak adalah senyawa organik yang merupakan hasil hidrolisis dari bahan lemak atau minyak. Senyawa lemak atau minyak berada dalam bentuk trigliserida yang bila dihidrolisis menghasilkan gliserol dan asam lemak rantai panjang (16).

Asam lemak adalah asam organik berantai panjang yang mempunyai atom karbon dari 4 sampai 24. Asam lemak mempunyai gugus karboksil tunggal dan ekor hidrokarbon non polar yang panjang yang menyebabkan

kebanyakan lipid bersifat tidak larut dalam air dan tampak berminyak atau berlemak. Asam lemak tidak terdapat secara bebas atau berbentuk tunggal di dalam sel atau jaringan, tetapi terdapat dalam bentuk yang terikat secara kovalen pada berbagai kelas lipid yang berbeda.

Asam lemak bebas hanya sedikit terdapat secara alami. Kebanyakan asam lemak diperoleh melalui hidrolisis lemak, yang : (1) merupakan asam monokarboksilat yang mengandung gugus karboksil yang dapat berionisasi dan non polar, berantai atom C lurus dan siklik; (2) Umumnya terbentuk dari atom C yang genap (walaupun secara alami ada juga yang beratom C ganjil); (3) Dapat jenuh atau tidak jenuh (15).

Asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh dengan jumlah atom karbon genap berantai lurus merupakan bagian terbesar dari asam lemak dalam lemak alam (17). Ekor hidrokarbon mungkin jenuh sepenuhnya, yaitu hanya mengandung ikatan tunggal, atau bagian ini mungkin bersifat tidak jenuh dengan satu atau lebih ikatan ganda. Pada asam lemak tak jenuh terdapat ikatan ganda (misalnya : ν^9 , $n=9$, atau $\omega-9$) di antara atom karbon no.9 dan no.10. Jika terdapat ikatan ganda tambahan, ikatan ini biasanya terdapat di antara ikatan ganda dan rantai ujung terminal metal. Pada asam lemak yang mengandung dua atau lebih ikatan ganda, ikatan ganda tersebut tidak pernah terkonyugasi ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), tetapi terpisah oleh gugus metilen.



Ikatan ganda hampir semua lemak tidak jenuh yang ada di alam berada dalam konfigurasi *cis*, yang menghasilkan suatu lekukan kaku pada rantai alifatik.

Penggolongan asam lemak jenuh dan tidak jenuh ini berguna dalam teknologi makanan karena asam lemak jenuh bertitik leleh jauh lebih tinggi daripada asam lemak tidak jenuh, sehingga hal ini mempengaruhi secara bermakna sifat fisika lemak atau minyak. Beberapa contoh asam lemak jenuh dapat dilihat pada Tabel 3 dan asam lemak tidak jenuh dapat dilihat pada Tabel 4 (17).

Tabel 3. Contoh Asam-Asam Lemak Jenuh

Rumus Molekul	Rumus Struktur	Nama Umum	Nama Sistematis
$C_6H_{12}O_2$	$C_5H_{11}COOH$	Asam Kaproat	n-hexanoat
$C_8H_{16}O_2$	$C_7H_{15}COOH$	Asam Kaprilat	n-oktanoat
$C_{10}H_{20}O_2$	$C_9H_{19}COOH$	Asam Kaprat	n-dekanoat
$C_{12}H_{24}O_2$	$C_{11}H_{23}COOH$	Asam Laurat	n-dodekanoat
$C_{14}H_{28}O_2$	$C_{13}H_{27}COOH$	Asam Miristat	n-tetradekanoat
$C_{16}H_{32}O_2$	$C_{15}H_{31}COOH$	Asam Palmitat	n-hexadekanoat

Tabel 4. Contoh Asam-Asam Lemak Tidak Jenuh

Rumus Molekul	Rumus Struktur	Nama Umum	Nama Sistematis
$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	Asam Oleat	Oktadek-9-enoat
$C_{18}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4(CH:CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	Asam Linoleat	Oktadeka-9,12-dienoat
$C_{18}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2(CH:CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	Asam Linolenat	Oktadeka-9,12,15-trienoat
$C_{20}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4(CH:CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	Asam Arakidonat	Eikosa-5,8,11,14-tetraenoat
$C_{20}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2(CH:CHCH_2)_5(CH_2)_2COOH$	EPA	Asam Eikosa-5,8,11,14,17-pentaenoat
$C_{22}H_{32}O_2$	$CH_3CH_2(CH:CHCH_2)_6(CH_2)COOH$	DHA	Asam Dokosa-4,7,10,13,16,19-heksaenoat

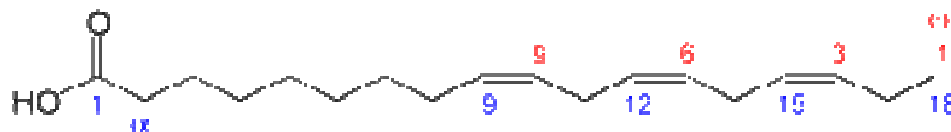
Ada penggolongan lainnya yang membedakan antara asam lemak essensial dan non-essensial (17). Asam lemak non-essensial merupakan nutrisi yang diperlukan oleh tubuh dan dapat di sintesis oleh tubuh manusia. Asam lemak-asam lemak essensial (*essential fatty acids* = EFAs) merupakan

nutrisi yang diperlukan dalam jumlah makro (gram/hari) dan tidak dapat dibuat oleh tubuh manusia. Asam lemak essensial diperlukan untuk mempertahankan fungsi sel dan jaringan tubuh, misalnya menjadi bagian dari barier membran sel dan organel, menjaga fluiditas dan reaktifitas kimia membran, dan juga merupakan prekursor prostaglandin (2).

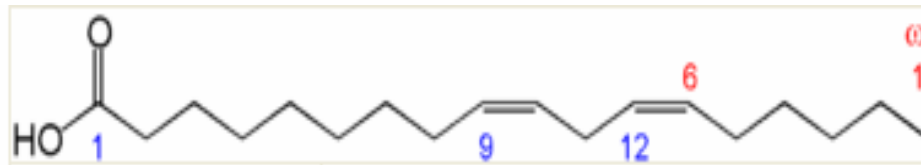
3. Asam Lemak Omega-3

Asam lemak essensial terdiri dari omega-6 EFA (asam lemak linoleat) (18:2 n-6) dan omega-3 EFA (asam lemak linolenat) (18:3 n-3). Perbedaan asam lemak omega-3 dan omega-6 terletak pada ikatan rangkap pertama yang dihitung dari ujung omega. Zat-zat ini mempunyai peran penting sebagai pengatur fungsi normal sel dan juga tromboksan yang berperan dalam platelet serta trombosit pada proses pembekuan darah (18). Kurangnya asupan bahan makanan yang mengandung asam lemak essensial tersebut atau adanya faktor-faktor yang menghambat konversinya menjadi turunannya, seperti adanya gula, kolesterol, obesitas, kekurangan mineral, virus, dan usia lanjut menyebabkan seseorang perlu mengkonsumsi makanan tambahan (*food supplement*) yang mengandung senyawa tersebut di atas atau turunannya (2). Contoh rumus struktur asam α -linolenat (omega-

3):



Contoh rumus struktur asam linoleat (omega-6) :



Asam lemak omega-3 adalah asam lemak tidak jenuh yang mempunyai beberapa ikatan rangkap, ikatan rangkap pertama berada pada atom karbon nomor 3 dihitung dari gugus metil omega. Gugus metil omega adalah gugus terakhir dari rantai asam lemak. Contoh asam lemak omega-3 adalah asam lemak linolenat (C18:3, n-3), asam lemak eikosapentaenoat (EPA, C20:5, n-3), dan asam lemak dokosaheksaenoat (DHA, C22:6, n-3).

Omega-3 paling banyak ditemukan pada minyak ikan, dan minyak ikan telah lama digunakan dan dikenal luas di seluruh dunia. Asam lemak omega-3 yang paling banyak pada ikan adalah EPA dan DHA. Berbagai penelitian tentang pengaruh asam lemak omega-3 terhadap kesehatan antara lain dapat mencegah penyakit aterosklerosis, trombosis, hipertensi, dan beberapa tipe kanker. Asam lemak omega-3 juga berkhasiat sebagai antiinflamasi, meningkatkan kekebalan tubuh, penurunan resiko kematian mendadak, dan resiko penyakit jantung koroner.

Asam lemak terikat pada gliserol sehingga pada analisis secara kromatografi gas perlu diadakan transesterifikasi untuk membentuk metil ester yang bertitik didih lebih rendah. Baik asam maupun basa dapat dipakai

sebagai katalis dalam proses metilasi tersebut, BF_3 -metanol merupakan katalis yang paling luas digunakan.

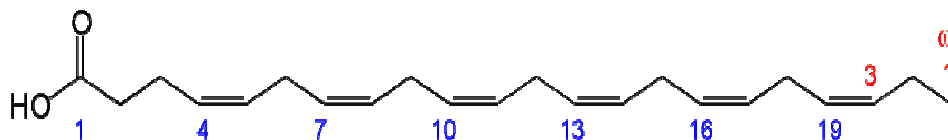
Metode analisis dengan kromatografi gas mampu memisahkan komponen asam lemak-asam lemak penyusun suatu lemak, sedangkan untuk mengetahui masing-masing komponen dilanjutkan dengan spektrometer massa. Metode gabungan kromatografi gas-spektrometri massa tersebut dapat diaplikasikan pada berbagai sampel lemak atau minyak dengan hasil yang memuaskan.

C. Asam Dokosaheksaenoat (DHA) dan Asam Eikosapentaenoat (EPA)

1. Asam Dokosaheksaenoat (DHA)

Asam dokosaheksaenoat (DHA atau *docosahexaenoic acid*, $\text{C}_{22}:6 \omega$ -3) merupakan asam lemak *polyunsaturated* rantai panjang dari omega-3 berbentuk cis yang terdiri dari 22 atom karbon dan 6 ikatan rangkap (19).

DHA memiliki rumus bangun sebagai berikut :



DHA merupakan komponen yang sangat penting dari fosfolipid pada

membran sel manusia, khususnya pada otak dan retina. DHA diperlukan dalam mengoptimalkan pengembangan saraf dan ketajaman visual. DHA adalah asam lemak omega-3 yang banyak terdapat pada ASI (Air Susu Ibu). Tubuh manusia sebenarnya secara alami memproduksi DHA, namun jumlahnya terlalu sedikit sehingga perlu tambahan dari luar (8).

Susu formula yang mengandung DHA baik untuk pertumbuhan otak, tetapi mempunyai efek samping pendarahan dan gangguan sistem kekebalan tubuh bila dikonsumsi berlebih. Pemberian susu yang mengandung DHA berlebihan akan beresiko terhadap kesehatan. Kelebihan DHA akan mengganggu kerja enzim desaturase dan elongase. Dalam kondisi normal, kedua enzim itu mengubah lemak menjadi asam linoleat dan asam alfa linolenat. Kedua asam tersebut memproduksi DHA dan AA (*arachidonic acid*). DHA merangsang produksi prostaglandin yang berfungsi mengencerkan darah dan memperlebar pembuluh darah. Sedangkan AA merangsang produksi trombosit yang membuat darah mengental dan mempersempit pembuluh darah. Bila kelebihan DHA, maka enzim akan mengurangi produksi DHAnya dan secara otomatis produksi AA pun akan ikut berkurang (20).

Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), kadar ideal DHA untuk bayi normal maksimum 20 mg per kg berat bayi per hari. Sedangkan kadar DHA untuk bayi prematur, WHO menyarankan 40 mg per kg berat bayi (8, 20). DHA berperan penting pada semua tahap kehidupan manusia, sejak masih dalam usia yang sangat dini, dalam kandungan, dan sampai usia yang

sudah lanjut (20).

2. Asam Eikosapentaenoat (EPA)

Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) adalah salah satu asam lemak omega-3 yang dibutuhkan oleh tubuh. Nama trivial EPA adalah *timnodonic acid*. Secara kimiawi, EPA merupakan asam karboksilat dengan rantai karbon 20 dan lima ikatan rangkap cis, ikatan rangkap pertama berada di atom karbon ketiga dari ujung omega (19). Rumus struktur EPA, sebagai berikut :



EPA secara alami ditemukan dalam susu ibu. Oleh karena itu, bayi yang diberi ASI akan mendapatkan cukup EPA. EPA merupakan prekursor prostaglandin-3 (yang menghambat agregasi platelet), thromboxan-3, dan grup leukotriin-5 (semua eicosanoid). EPA diperoleh dari minyak ikan atau makanan yang mengandung minyak ikan, hati ikan cod, ikan haring, mackerel, salmon, dan sardencis (19).

Menurut ISSFAL (International Society For The Study of Fatty Acids and Lipids), formula untuk bayi mengandung kurang dari 0,1% EPA. EPA untuk orang dewasa yang cukup minimal 220 mg/hari (21).

Asam lemak omega-3 termasuk EPA berfungsi untuk memperbaiki respon imun dan membantu mengobati penyakit autoimun inflammatory seperti rheumatoid arthritis. Asam lemak omega-3 termasuk EPA juga

mempunyai efek positif pada penyakit paru-paru dan ginjal, menjaga kesehatan jantung, serta mencegah akumulasi kolesterol dan lemak pada dinding arteri. Suplemen minyak ikan juga dapat mengurangi tekanan darah tinggi pada penderita diabetes (21).

D. Metode Analisis Asam Dokosaheksaenoat (DHA) dan Asam Eikosapentaenoat (EPA)

1. Metode Kromatografi Gas

- Kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, menggunakan kolom CP-Wax 52 CB dengan panjang 25m dan diameter 0,25 mm I.D. dengan ukuran partikel 0,2 m. Temperatur yang digunakan 170⁰C sampai 240⁰C dan suhu detektor 270⁰C. Gas pembawa yang digunakan adalah helium (22).
- Kromatografi gas HP 5890 seri II dengan menggunakan detektor MSD 5972 dan kondisi suhu inlet 250⁰C, suhu detektor 300⁰C, suhu oven terprogram 180⁰C (1 menit), naik 1⁰C/menit sampai 200⁰C (1 menit), naik 10⁰C/menit sampai 280⁰C (3 menit). Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan laju alir 1,1 ml/menit (2).
- Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (7673 FID),

autosampler, automatic injector, split injection port dan kolom kapiler silika kering 100 m dengan diameter 0,25 mm dilapisi dengan 0,2 m cyanopropylpolysiloxane (CP-SIL 88). Temperatur injektor dan detektor sebesar 225⁰ C. Temperatur kolom 70⁰C (4 menit setelah injeksi), naik 8⁰C/menit sampai 110⁰C, meningkat 5⁰C/menit sampai 170⁰C dan dipertahankan selama 10 menit. Kemudian meningkat 4⁰C sampai 225⁰C, dan naik kembali 20⁰C sampai 240⁰C dipertahankan selama 5 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah hidrogen dengan laju alir 2,1 ml/menit dan fuel gas dengan laju alir 32 ml/menit (23).

- Kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, menggunakan *packed column* Chromosorb W dengan ukuran mesh 80/100. temperatur kolom antara 170⁰C dan 210⁰C. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium dengan kemurnian 99,95%. Volume injeksi sampel 1 µl – 5 µl. (24).
- Kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, menggunakan *packed column* dengan 12 % silan 10C dalam 110/120 Chromosorb[®] WAW DMCS. Temperatur yang digunakan 150⁰C dengan kenaikan suhu 4⁰C/menit sampai 250⁰C yang dipertahankan selama 10 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah nitrogen dengan laju alir 25,0 ml/menit dan volume injeksi 1,0 µl (25).
- Kromatografi gas (model Clarus 500, Beaconsfield, UK) dengan

detektor ionisasi nyala menggunakan kolom CP-Sil 88. Temperatur kolom yang digunakan 70°C dengan kenaikan suhu 13°C sampai 175°C yang dipertahankan selama 27 menit dan meningkat kembali 4°C sampai 215°C yang dipertahankan selama 36 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan volume injeksi $0,2\ \mu\text{l}$ (26).

2. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi yang dilengkapi dengan ELSD (Evaporative Light Scattering Defection), menggunakan kolom Spherisorb™ S3W dengan ukuran $100 \times 4,6\ \text{mm}$ I. D. dan ukuran partikel $3\ \mu\text{m}$. Laju alir $2\ \text{ml/menit}$ dan menggunakan elusi gradient, temperatur detektor 40°C dan *air flow* $27\ \text{psi}$ (27).

E. KROMATOGRAFI GAS

1. Teori

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan kesetimbangan distribusi dari komponen-komponen yang terdapat dalam suatu campuran diantara dua fase, yaitu fase diam dengan permukaan yang luas (cair atau padat) dan fase gerak (cair atau gas) (28).

Kromatografi gas adalah suatu cara untuk memisahkan senyawa atsiri (menguap) dengan mengalir gas sebagai fase gerak melalui fase diam. Bila fase diam berupa zat padat, kita menyebut cara ini sebagai kromatografi gas-

padat (KGP). Bila fase diam berupa zat cair, cara tadi disebut kromatografi gas-cair (KGC). Pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya pada kromatografi gas-padat terjadi karena perbedaan adsorpsi relatif masing-masing komponen pada fase diam padatan, sedangkan pada kromatografi gas-cair pemisahan terjadi karena perbedaan kelarutan (partisi) relatif masing-masing komponen pada fase diam cairan (29,30).

Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisa secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi dari substansi yang dianalisis dengan waktu analisis dari suatu pembanding, sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan tinggi dan luas puncak kromatogram dari substansi yang dianalisis dengan tinggi atau luas puncak kromatogram dari pembanding (29).

Pemisahan puncak kromatografi berkaitan dengan dua faktor, yaitu keefisienan kolom dan keefisienan pelarut.

- a. Keefisienan kolom dapat dijelaskan secara kuantitatif dengan *theoretical plate* atau HETP (*Height Equivalent of Theoretical Plate*). HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk mencapai kesetimbangan linarut di antara fase gerak dan fase diam. Efisiensi kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram, semakin banyak pelat teoritis makin baik daya pisah dari suatu kolom (29).
- b. Keefisienan pelarut disebabkan oleh antaraksi linarut-pelarut dan menentukan letak relatif linarut pada kromatogram.

Keefisienan pelarut dapat dinyatakan dengan harga retensi relatif atau dengan perbandingan dari koefisien partisi dari dua komponen (29).

Pemisahan dua puncak yang berurutan dapat diukur dengan resolusi. Resolusi adalah ukuran keefisienan kolom dan pelarut. Resolusi dapat menerangkan sempitnya puncak, dan juga pemisahan antara dua maksimum puncak.

2. Instrumentasi

Sistem kromatografi gas memerlukan sistem tertutup sempurna kecuali pada tempat keluarnya gas, temperatur harus konstan atau dapat diatur dengan tepat serta diperlukan perlengkapan pendeteksi dan perekam yang terpadu. Bagian dari kromatografi gas-cair adalah sebagai berikut :

a. Gas Pembawa

Sesuai dengan namanya kromatografi gas, sebagai fase gerak digunakan gas. Gas pembawa yang biasa digunakan adalah helium, hidrogen, nitrogen, dan argon.

Gas pembawa harus bersifat :

- 1) Lambam (*inert*) untuk mencegah antaraksi dengan cuplikan atau pelarut (fase diam) serta tidak beracun. Karena gas tersebut inert maka interaksi antara molekul gas dapat diabaikan, kecuali pada tekanan tinggi.

- 2) Dapat meminimumkan difusi gas, koefisien distribusi suatu senyawa ditentukan oleh kemudahan menguap fase diam.
- 3) Mudah didapat dan murni, kemurnian gas pembawa sangat penting karena pengotoran sedikit saja dalam gas itu dapat menimbulkan bisingan pada detektor. Umumnya gas pembawa dialirkan melalui penyaring molekul untuk menghilangkan uap air yang biasanya terdapat dalam gas pembawa.
- 4) Murah
- 5) Cocok untuk detektor yang digunakan. Misalnya detektor penghantar panas paling cocok dengan hidrogen atau helium. Untuk kebanyakan hal helium merupakan pilihan pertama (28, 29, 31)

b. Pengatur Tekanan dan Pengendali Aliran

Pengatur tekanan digunakan untuk mengatur tekanan gas pembawa dan untuk menjaga agar tekanan gas pembawa tersebut konstan, sedangkan pengatur aliran digunakan untuk menjaga agar aliran gas pembawa konstan. Aliran gas yang konstan sangat diperlukan pada kromatografi gas agar diperoleh analisis yang memuaskan (28, 29).

c. Tempat Injeksi

Suhu tempat injeksi menentukan kecepatan cuplikan diupkan. Tempat injeksi diatur pada suhu agak tinggi, untuk cuplikan yang tidak terurai kena panas, biasanya sekitar 50°C diatas suhu kolom. Hal ini diperlukan supaya semakin cepat cuplikan masuk ke dalam kolom dalam volume yang sangat kecil. Cuplikan harus dimasukkan ke dalam kolom sekaligus. Cuplikan biasanya dimasukkan dengan semprit (*syringe*) kedap-gas (29, 31).

d. Kolom

Kolom merupakan tempat berlangsungnya pemisahan komponen campuran. Kolom dapat berupa tabung gelas atau logam (tembaga, baja nirkarat/ *stainless steel*, aluminium), dengan panjang 2-3 m dan garis tengah dalam 2-4 mm. Kolom yang lebih panjang menghasilkan jumlah plat teori dan daya pisah yang lebih besar.

Tabung dapat berbentuk lurus atau melingkar. Kolom lurus lebih efisien tetapi dapat menjadi tidak praktis apabila bekerja pada suhu tinggi. Tabung biasanya dibuat bentuk melingkar supaya mudah dimasukkan ke dalam thermostat, garis tengah lingkaran paling sedikit harus sepuluh kali garis tengah kolom, yaitu untuk meminimumkan difusi dan pengaruh laju alir.

Dua tipe kolom yang digunakan pada kromatografi gas :

1) Kolom yang terpacking (*packed columns*)

Kolom yang terpacking berisi suatu material pendukung padat inert yang dilapisi dengan suatu fase diam cair atau padat. Sifat alami material pendukung yang melapisi menentukan seperti apa macam

bahan-bahan yang dapat diadsorpsi dengan kuat. Dengan begitu banyak kolom yang tersedia, semuanya dirancang untuk memisahkan komponen campuran secara spesifik. Kebanyakan kolom terpacking mempunyai panjang 1,5-10 m dengan garis tengah dalamnya 2-4 mm. kolom terluar biasanya terbuat dari gelas atau baja nirkarat.

2) Kolom kapiler (*capillary columns*)

Kolom kapiler mempunyai suatu garis tengah internal sangat kecil, mendekati 1/10 milimeter. Dinding kolom dilapisi dengan bahan-bahan aktif. Kolom kapiler kebanyakan dibuat dari *fused-silica* dengan suatu polyimide pada salut luar. Kolom ini sangat fleksibel, maka suatu kolom yang sangat panjang dapat masuk ke dalam suatu *coil* yang kecil.

Pemilihan fase diam cair yang paling sesuai untuk pemisahan tertentu sangat penting. Secara garis besar fase diam cair dapat dikelompokkan menjadi :

1. Fase cair kelompok hidrokarbon non polar, contoh : minyak paraffin, squalane, silicone-gum rubber.
2. Fase cair dengan kepolaran sedang (senyawa ini punya gugus polar atau gugus terpolarisasi yang terikat pada kerangka non polar yang besar), contoh : ester dari alcohol yang mempunyai BM besar seperti dinonil ftalat.
3. Fase cair polar (senyawa ini mempunyai bagian gugus polar yang relatif besar), contoh : carbowax (polyglycols).

4. Fase cair yang mempunyai ikatan hydrogen, contoh : glikol, gliserol, asam hidroksi (29, 30, 32).

e. Detektor

Alat ini akan mendeteksi komponen-komponen yang meninggalkan kolom. Bagian alat ini akan mencetak hasil percobaan pada lembaran kertas berupa kumpulan puncak yang disebut kromatogram.

Detektor dapat dikelompokkan sebagai detektor diferensial dan detektor integral. Detektor diferensial mengukur kadar senyawa seketika itu juga atau kecepatan aliran seketika itu juga. Detektor integral menambahkan isyarat seketika itu juga dan memberikan jumlah total dan biasanya digunakan untuk analisis kualitatif. Sedangkan isyarat detektor diferensial untuk analisis kuantitatif.

Macam-macam detektor yang digunakan pada kromatografi gas :

1. Detektor konduktivitas panas (*Thermal Conductivity Detector*)

Prinsip kerjanya adalah suhu filament meningkat dengan adanya analit pada gas pembawa yang melaluinya, hal ini akan menyebabkan kenaikan resistensi.

2. Detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*)

Prinsip kerjanya adalah komponen yang dibakar pada suatu nyala akan menghasilkan ion, ion-ion ini dikumpulkan dan diubah menjadi arus listrik.

3. Detektor penangkap elektron (*Electron Capture Detector*)

Prinsip kerjanya adalah pada waktu spesies-spesies yang bersifat elektronegatif melewati detektor, spesies-spesies tersebut menangkap elektron-elektron termal yang mempunyai energi rendah, hal ini menyebabkan penurunan arus sel.

4. Detektor fotometri nyala (*Flame Photometric Detector*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor yang dibakar dalam suatu nyala akan menghasilkan spesies kemiluminesen yang dapat dimonitor pada panjang gelombang selektif.

5. Detektor nitrogen fosfor (*Nitrogen Phosphorus Detector*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor akan menyebabkan peningkatan arus pada nyala yang diperkaya dengan uap garam logam alkali (28, 29, 30, 32, 33).

f. Termostat

Suhu kolom adalah variabel penting yang harus dikontrol hingga beberapa puluh derajat pada pekerjaan yang perlu teliti. Kolom biasanya disimpan di dalam oven bertermostat. Suhu kolom optimum bergantung pada titik didih cuplikan dan derajat pemisahan yang diperlukan. Secara kasar, suhu kamar dengan atau sedikit di atas titik didih cuplikan menghasilkan waktu elusi yang baik (32).

g. Perekam

Perekam yang dihubungkan dengan bagian luar detektor berfungsi untuk menghasilkan gambaran yang disebut kromatogram. Kromatogram yang dihasilkan dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif (29).

3. Perhitungan Dalam Kromatografi Gas (34)

a. Retensi relatif (α)

$$\alpha = \frac{t_2 - t_a}{t_1 - t_a}$$

t_2 = waktu retensi baku pambanding

t_1 = waktu retensi zat uji

t_a = waktu retensi komponen inert (fase gerak)

b. Resolusi (R)

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

t_2 dan t_1 = waktu retensi kedua komponen

w_2 dan w_1 = lebar alas puncak

c. Jumlah lempeng teoritis (N)

$$N = \frac{16t^2}{W^2}$$

t = waktu retensi zat

w = lebar alas puncak

d. HETP

$$HETP = \frac{L}{N}$$

L = panjang kolom

N = jumlah lempeng teoritis

e. Faktor kapasitas (k')

$$k = \frac{t}{t_a} - 1$$

t = waktu retensi zat

t_a = waktu retensi fase gerak

f. Faktor Ikutan (T_f)

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{f}$$

$W_{0,05}$ = lebar alas puncak pada 5 % tinggi

f = jarak dari maksimum puncak sampel tepi muka puncak dihitung dengan ketinggian 5 % puncak dari garis dasar

F. VALIDASI METODE ANALISIS

Validasi metode analisis adalah proses dimana suatu metode ditetapkan melalui serangkaian uji laboratorium bahwa karakter penampilan metode tersebut memenuhi persyaratan untuk penerapan metode yang dimaksudkan. Tujuan utama validasi adalah untuk menjaminkan metode

analitik yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal sehingga dapat dipercaya (35).

Karakter penampilan metode dinyatakan dalam istilah parameter penampilan analisis. Beberapa parameter penampilan analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan di bawah ini.

1. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi dan metode penambahan bahan baku. Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai ratio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan ratio antara 80%-120%. Pada percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan placebo yang harus disiapkan dengan kadar antara 50% sampai 150% dari kandungan yang diharapkan (35).

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang

diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen (35).

3. Selektifitas (*specificitas*)

Selektifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur analit tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (35).

4. Linieritas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = aX + b$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai

$b=0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrument yang digunakan (35).

Rentang metode adalah pernyataan ras terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linieritas yang dapat diterima.

5. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi, yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (35).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. ALAT

1. Kromatografi gas Shimadzu 17A yang dilengkapi dengan *capillary column* VB-WAX panjang 60 m dan diameter 0,32 mm menggunakan Detektor Ionisasi Nyala. Suhu injektor 230⁰C, suhu detektor 250⁰C.
2. Data processor class GC solution
3. Alat-alat ekstraksi dan refluks.
4. Alat-alat gelas yang umum digunakan dalam analisis kuantitatif.

B. BAHAN

Baku DHA oil yang mengandung DHA 27,5 % dan EPA 7,7 % (Tama Biochemical); Natrium sulfat anhidrat (Merck); Kloroform (Merck); Metanol p.a (Merck); Natrium klorida (Mallinckrodt); Kalium hidroksida (Merck); Dietil eter (Merck); Petroleum eter (Mallinckrodt); Asam klorida (Merck); Gas nitrogen (HP); Heksan p.a (Merck); Toluena p.a (Merck); Asam Sulfat pekat (Mallinckrodt); Natrium bikarbonat (Merck); dan 3 sampel susu bubuk A, B, dan C.

C. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan induk baku DHA dan EPA

Ditimbang ± 300 mg baku DHA oil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 25 ml reagen pemetilasi metanol-toluen-asam sulfat pekat (20:10:1) dan refluks selama 120 menit pada suhu 75°C sampai 80°C diatas penangas air. Setelah dingin, ditambahkan 25 ml larutan natrium klorida 5 % b/v dan 50 ml n-heksan. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam corong pisah, dikocok kuat-kuat, didiamkan dan dikeluarkan lapisan air. Kemudian ditambahkan 25 ml larutan natrium bikarbonat 2 % b/v lalu dikocok, didiamkan dan lapisan air dikeluarkan. Untuk menyerap air yang masih tersisa ditambahkan 5 g natrium sulfat anhidrat, dikocok dan dibiarkan mengendap. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lalu diuapkan sampai kering menggunakan gas N_2 . Setelah dingin, residunya dilarutkan dengan 10,0 ml n-heksan. Diperoleh larutan baku DHA oil dengan konsentrasi DHA 8322,15 ppm dan EPA 2470,20 ppm. Selanjutnya Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

2. Mencari kondisi analisis optimum untuk campuran DHA metil ester dan EPA metil ester

Larutan induk DHA oil yang mengandung DHA metil ester 8822,15 ppm dan EPA metil ester 2470,20 ppm disuntikkan sebanyak 5,0 μ l pada kromatografi gas. Parameter yang diubah adalah suhu awal kolom dan kecepatan alir gas. Elusi dilakukan pada pemrograman suhu dengan kenaikan suhu 2^oC/menit sampai mencapai suhu 230^oC dan dipertahankan selama 100 menit. Variasi suhu awal kolom adalah 120^oC, 130^oC, 140^oC, dan 150^oC dengan kecepatan aliran gas 1,35 ml/menit.

Dilakukan juga elusi dengan variasi kecepatan aliran gas 1,35; 1,80; dan 2,00 ml/menit dengan suhu awal kolom 120^oC dan kenaikan suhu 2^oC/menit sampai mencapai suhu 230^oC dipertahankan selama 100 menit dengan tekanan gas pembawa 107 kPa. Untuk semua elusi, suhu injektor 230^oC dan suhu detektor 250^oC.

Masing-masing kondisi dicatat waktu retensinya dan dihitung jumlah lempeng teoritis. Kondisi yang terpilih adalah kondisi yang mempunyai harga plat teoritis (N) yang tinggi, HETP kecil dan resolusi \geq 1,5.

3. Validasi metode analisis DHA metil ester dan EPA metil ester dalam produk susu

a. Pembuatan kurva kalibrasi DHA metil ester dan EPA metil ester

Pembuatan kurva kalibrasi baku DHA oil menghubungkan 6 titik pada berbagai konsentrasi. Dibuat larutan baku DHA metil ester dengan konsentrasi 1270,39 ppm, 2117,32 ppm, 2646,64 ppm, 3528,86 ppm, 4411,08 ppm, dan 8822,15 ppm. Kemudian dibuat juga larutan baku EPA metil ester dengan konsentrasi 355,71 ppm, 592,85 ppm, 741,06 ppm, 988,08 ppm, 1235,10 ppm, dan 2470,20 ppm. Masing-masing larutan dengan berbagai konsentrasi tersebut disuntikkan ke dalam kolom kromatografi gas sebanyak 5,0 μ l dengan kondisi analisis terpilih. Luas puncak DHA metil ester dan EPA metil ester dicatat dan diolah secara statistik sehingga diperoleh persamaan garis linier dan koefisien korelasi masing-masing zat.

b. Menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi DHA metil ester dan EPA metil ester

Batas deteksi dan kuantitasi DHA metil ester dan EPA metil ester dihitung melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi masing-masing.

c. Uji presisi DHA metil ester dan EPA metil ester

Uji presisi dilakukan dengan melakukan pengukuran sebanyak 6 kali untuk tiap konsentrasi dan dilakukan pada 3 konsentrasi yang berbeda. Dibuat larutan baku DHA metil ester dengan konsentrasi 1270,39 ppm, 2117,32 ppm, dan 2646,64 ppm. Kemudian dibuat juga larutan baku EPA metil ester dengan konsentrasi 355,71 ppm, 592,85 ppm, dan 741,06 ppm. Masing-masing larutan dengan berbagai konsentrasi tersebut disuntikkan pada kromatografi gas sebanyak 5,0 μ l dengan kondisi analisis terpilih dan diulang sebanyak enam kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi.

d. Uji perolehan kembali DHA metil ester dan EPA metil ester

Asam lemak hasil ekstraksi (sesuai dengan prosedur 4) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml reagen pemetilasi metanol-toluen-asam sulfat pekat (20:10:1) dan refluks selama 120 menit pada suhu 75⁰C sampai 80⁰C diatas penangas air. Setelah dingin, ditambahkan 5 ml larutan natrium klorida 5 % b/v dan 10 ml n-heksan. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan baku DHA metil ester dan EPA metil ester dengan konsentrasi masing-

masing 2641,14 ppm dan 744,03 ppm, dikocok kuat-kuat, didiamkan dan dikeluarkan lapisan air. Kemudian ditambahkan 5 ml larutan natrium bikarbonat 2 % b/v lalu dikocok, didiamkan dan dikeluarkan lapisan air. Untuk menyerap air yang masih tersisa, ditambahkan 1 g natrium sulfat anhidrat, dikocok dan dibiarkan mengendap. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lalu diuapkan sampai kering menggunakan gas N₂. Setelah dingin, residunya dilarutkan dengan 10,0 ml n-heksan. Sebanyak 5,0 µl disuntikkan pada kromatografi gas. Perlakuan yang sama seperti di atas dilakukan juga pada DHA metil ester dan EPA metil ester pada konsentrasi masing-masing sebesar 3521,52 ppm dan 992,04 ppm, serta pada konsentrasi 4401,90 ppm dan 1240,04 ppm.

4. Penyiapan sampel

a. Ekstraksi

Sebanyak ± 100 gram sampel susu bubuk ditimbang ke dalam Erlenmeyer. Tambahkan 200 ml kloroform-metanol (2:2 v/v). Kocok sampai tercampur. Fraksi-protein akan terpisah dan ekstraknya disaring dengan kertas saring bebas lemak, ditampung di corong pemisah. Cuci Erlenmeyer dan kertas saring ± 3x dengan kloroform-metanol (sampai pencucian sempurna). Tambahkan NaCl 9% dalam air (larutan garam). Kocok dengan kuat dan

biarkan hingga memisah, lalu lapisan air dibuang dan lapisan kloroform dipindahkan ke dalam corong pisah yang baru. Kemudian cuci lapisan kloroform dengan kloroform-metanol-larutan garam (3:47:48 v/v). Fase kloroform yang mengandung lemak kemudian diuapkan.

b. Penyabunan

Hasil ekstraksi lemak dibiarkan mengering dalam labu didih 250 ml dan ditimbang sampai bobot tetap. Tambahkan 20 ml etanol-dietil eter (3 :1 v/v) dan 0,5 ml KOH 10 N. Letakkan labu pada penangas air yang mendidih selama 2 jam dengan pendingin tegak. Dinginkan dan tambahkan ± 10 ml air sehingga diperoleh larutan sabun yang mengandung etanol dalam air. Tambahkan 25 ml petroleum eter ke dalam labu kocok sambil dikocok dengan kuat dan biarkan hingga memisah. Selanjutnya lapisan petroleum eter dibuang dan lapisan air dicuci dengan petroleum eter (5 ml) $\pm 3x$ lalu pisahkan.

c. Pembebasan asam lemak

Pada lapisan air yang telah dipisahkan dan dicuci, tambahkan 3 ml HCl 1,5 N dan tambahkan 25 ml petroleum eter lalu kocok dan biarkan sampai larutan tersebut jernih dan memisah.

Fase petroleum eter yang mengandung asam lemak ditampung. Lalu cuci lapisan air dengan petroleum eter (5 ml) $\pm 3x$ dan pisahkan. Kedalam petroleum eter yang mengandung asam lemak tambahkan ± 10 ml air lalu kocok. Fase air yang terdapat di bagian bawah dibuang. Petroleum eter dikeringkan.

d. Metilasi

▪ Metode A

Ke dalam asam lemak baku atau lemak hasil ekstraksi yang sudah dikeringkan dalam tabung reaksi ditambahkan 400 μ l larutan baku metil trikosoat atau TME (sebagai baku internal) lalu dikeringkan dengan aliran gas N_2 . Selanjutnya ke dalam tabung reaksi tersebut ditambah 1,5 ml 0,5 N Na-metanolat dan dialiri gas N_2 . Setelah tabung ditutup rapat, dipanaskan selama 5 menit di dalam penangas air ($90^\circ C$), lalu didinginkan. Setelah dingin, ditambah dengan 2 ml 12% BF_3 dalam metanol, dialiri gas N_2 dan dipanaskan lagi selama 30 menit di dalam penangas air. Setelah cairan didinginkan sampai $30-40^\circ C$, ke dalam tabung dimasukkan 2,0 ml n-heptana dan dikocok selama 30 detik. Selanjutnya ditambah 5 ml larutan NaCl jenuh, dialiri gas N_2 , dikocok dan didinginkan, diambil lapisan n-heptana untuk dianalisis menggunakan GC. Bila tidak langsung diinjeksikan ke dalam GC,

lapisan n -heptana disimpan dalam vial bertutup setelah sebelumnya udara dalam vial diganti dengan gas N₂.

- Metode B

Asam lemak hasil ekstraksi ditimbang kemudian ditambahkan 5 ml reagen pemetilasi metanol-toluen-asam sulfat pekat (20:10:1) dan refluks selama 120 menit pada suhu 75⁰C sampai 80⁰C diatas penangas air. Setelah dingin, ditambahkan 5 ml larutan natrium klorida 5 % b/v dan 10 ml n-heksan. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke dalam corong pisah, dikocok kuat-kuat, didiamkan dan dikeluarkan lapisan air. Kemudian ditambahkan 5 ml larutan natrium bikarbonat 2 % b/v lalu dikocok, didiamkan dan lapisan air dikeluarkan. Untuk menyerap air yang masih tersisa, ditambahkan 1 g natrium sulfat anhidrat, dikocok dan dibiarkan mengendap. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lalu diuapkan sampai kering menggunakan gas N₂. Setelah dingin, residunya dilarutkan dengan 10,0 ml n-heksan. Sebanyak 5,0 µl disuntikkan pada kromatografi gas.

5. Analisis kualitatif dan kuantitatif DHA dan EPA dalam tiga produk susu

Untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, dilakukan ekstraksi produk susu seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 5,0 μ l disuntikkan pada kromatografi gas dengan kondisi analisis terpilih.

a. Analisis kualitatif

Puncak-puncak yang terdapat pada kromatogram sampel dicatat waktu retensinya dan dibandingkan dengan waktu retensi larutan baku DHA metil ester dan EPA metil ester.

b. Analisis kuantitatif

Luas puncak DHA metil ester dan EPA metil ester dicatat dan dihitung kadarnya dengan membandingkan luas puncak DHA metil ester dan EPA metil ester dengan luas puncak asam lemak keseluruhan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Mencari kondisi optimum untuk analisis asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar DHA metil ester dan EPA metil ester adalah elusi dengan program temperatur suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu 2°C per menit sampai mencapai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit. Kecepatan alir yang digunakan untuk menghasilkan kondisi optimum sebesar 1,35 ml/menit. Suhu injektor diatur pada suhu 230°C dan suhu detektor diatur pada suhu 250°C. Waktu retensi DHA metil ester dan EPA metil ester pada kondisi analisis optimum berturut-turut adalah ±29 menit dan ±39 menit. Pada kecepatan alir 2,0 ml/menit, waktu retensi dari DHA metil ester dan EPA metil ester lebih cepat, nilai HETP dan jumlah lempeng teoritisnya juga tidak jauh berbeda. Tetapi dengan mempertimbangkan keamanan kolom maka dipilih kecepatan alir 1,35 ml/menit untuk kondisi analisis optimum. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1, 2, 3, 4, 5, 6, serta Tabel 5.

2. Pembuatan kurva kalibrasi asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Persamaan garis kurva kalibrasi untuk DHA metil ester adalah $y=0,9909x + 86,9990$ dengan koefisien korelasi $r=0,9992$. Persamaan garis kurva kalibrasi untuk EPA metil ester adalah $y=0,8440x + 3,9986$ dengan koefisien korelasi $r=0,9988$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7, 8, Tabel 6, 7 dan Lampiran 1.

3. Menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi analisis asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Batas deteksi DHA metil ester dan EPA metil ester berturut-turut sebesar 368,42 ppm dan 157,30 ppm. Sedangkan batas kuantitasi DHA metil ester dan EPA metil ester berturut-turut sebesar 1228,08 ppm dan 524,34 ppm. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8, 9 dan Lampiran 2.

4. Uji presisi asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Pada konsentrasi 1270,39 ppm, 2117,32 ppm, dan 2646,64 ppm, simpangan baku untuk DHA metil ester berturut-turut adalah 17,2095; 45,6202; dan 27,2941. Sedangkan koefisien variasi yang diperoleh sebesar 1,40%, 1,99%, dan 1,08%.

Pada konsentrasi 355,71 ppm, 592,85 ppm, dan 741,06 ppm, simpangan baku untuk EPA metil ester berturut-turut adalah 8,1158; 7,2503; dan 15,6769. Sedangkan koefisien variasi yang diperoleh sebesar 2,94%, 1,35%, dan 2,61%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10, 11 dan Lampiran 3.

5. Uji perolehan kembali asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Persentase uji perolehan kembali DHA metil ester dengan penambahan 2641,14 ppm, 3521,52 ppm, dan 4401,90 ppm berturut-turut sebesar $(87,72 \pm 2,7431)\%$, $(86,94 \pm 3,4828)\%$, dan $(94,59 \pm 1,4362)\%$. Sedangkan persentase uji perolehan kembali EPA metil ester dengan penambahan 744,03 ppm, 992,04 ppm, dan 1240,04 ppm berturut-turut sebesar $(96,29 \pm 3,3763)\%$, $(103,51 \pm 0,7332)\%$, dan $(95,48 \pm 4,1177)\%$.

Rata-rata persen uji perolehan kembali sebesar $(89,75 \pm 4,2097)\%$ untuk DHA metil ester dan $(98,43 \pm 4,4209)\%$ untuk EPA metil ester. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 12,13 dan Lampiran 4.

6. Analisis kualitatif dan kuantitatif asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester) dalam sampel

Dari hasil analisis ketiga sampel susu bubuk, dapat diketahui kadar asam dokosaheksaenoat (DHA) dan asam eikosapentaenoat (EPA) yang terdapat pada masing-masing sampel. Kandungan DHA dan EPA pada sampel A berturut-turut sebesar $(0,0024 \pm 0,0011) \% \text{ b/b}$ dan $(0,0019 \pm 0,0005) \% \text{ b/b}$, sampel B berturut-turut sebesar $(0,0041 \pm 0,0006) \% \text{ b/b}$ dan $(0,0191 \pm 0,0078) \% \text{ b/b}$, dan sampel C berturut-turut sebesar $(0,0068 \pm 0,0014) \% \text{ b/b}$ dan $0,0018 \% \text{ b/b}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 9, 10, 11 Tabel 14 dan Lampiran 5.

B. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan analisis terhadap kandungan asam dokosaheksaenoat (DHA) dan asam eikosapentaenoat (EPA) yang terdapat dalam susu bubuk secara kromatografi gas. Metode ini menggunakan suatu

capillary column (kolom kapiler) VB-Wax dengan panjang 60 m dan diameter dalam 0,32 mm. VB-Wax merupakan 100 % *bonded polyethylene glycol* dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa alkohol, aldehid, aromatik, asam-asam organik, dan pelarut. Kolom ini memiliki suhu maksimum untuk analisis 250⁰/260⁰C. Kolom kapiler memiliki keefisienan yang diperlukan untuk memisahkan puncak yang berdekatan dan mempunyai daya pisah yang baik.

Detektor yang sesuai dengan jenis kolom ini harus peka dan mampu memberi tanggapan yang cepat. Detektor ionisasi nyala (*FID*) dapat digunakan sebab *FID* memberikan tanggapan terhadap hampir semua senyawa. Selain itu, *FID* memiliki rentang linier terlebar jika dibandingkan dengan detektor lain yang biasa digunakan yaitu antara 10⁶ dan 10⁷.

Pada penelitian ini digunakan gas nitrogen sebagai gas pembawa, menyesuaikan dengan detektor yang digunakan yaitu *FID*. Selain itu, gas nitrogen bersifat inert pada banyak analit dan harganya relatif lebih murah dibanding gas lainnya. Selain gas nitrogen, digunakan juga gas helium sebagai gas tambahan (*make up gas*) tujuannya untuk menghilangkan atau mengurangi pelebaran pita setelah melewati kolom, meningkatkan kecepatan linier, dan menurunkan waktu huni komponen ketika terbawa ke detektor.

Berikut akan dibahas hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan.

1. Mencari kondisi optimum untuk analisis asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

DHA dan EPA merupakan asam lemak omega 3 yang dapat larut dengan baik dalam pelarut heksan. Pada penelitian ini, seluruh kondisi yang dicoba dalam memperoleh kondisi optimum untuk analisis DHA dan EPA dilakukan dengan suhu injektor 230°C dan suhu detektor 250°C . Pertimbangan penetapan suhu injektor dan detektor adalah suhu injektor dan detektor haruslah lebih tinggi 15° sampai 30°C dari titik didih senyawa yang titik didihnya paling tinggi. Suhu injektor dan detektor diatur agar penguapan sampel dapat terjadi lebih cepat sehingga komponen dalam sampel tersebut dapat segera dibawa oleh gas pembawa memasuki kolom. Suhu harus dijaga cukup tinggi untuk mencegah pengembunan cuplikan.

Pada penelitian ini untuk mencari kondisi analisis optimum digunakan pemrograman temperatur agar sampel dapat terelusi lebih cepat. Pada program temperatur dilakukan elusi dengan suhu awal kolom yang rendah, kemudian dinaikkan secara bertahap dengan laju tertentu yang telah diatur hingga mencapai suhu yang lebih tinggi sesuai dengan yang telah ditentukan. Parameter yang divariasikan pada penelitian ini adalah suhu awal kolom dan kecepatan alir gas.

Hal pertama yang coba dilakukan dalam pemrograman temperatur adalah menentukan suhu awal kolom. Agar diperoleh suhu awal kolom yang optimum, maka dicoba variasi suhu awal kolom 120° , 130° , 140° , dan 150°C

yang kemudian dinaikkan $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai mencapai suhu 230°C dan dipertahankan selama 100 menit. Kecepatan alir yang digunakan sebesar $1,35 \text{ ml}/\text{menit}$. Pemrograman suhu dan kecepatan alir yang dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya dan disesuaikan dengan keadaan kolom yang digunakan pada penelitian ini.

Pada suhu awal kolom 120° , 130° , 140° , dan 150°C terlihat bahwa pemisahan antara puncak heksan, DHA metil ester, dan EPA metil ester sudah terpisah dengan baik. Semakin tinggi suhu awal kolom maka semakin cepat puncak DHA metil ester dan EPA metil ester keluar pada kromatogram. Hal ini dibuktikan dengan waktu retensi dari DHA metil ester dan EPA metil ester yang lebih cepat pada suhu 150°C dibandingkan dengan suhu 140°C , 130°C dan 120°C (Gambar 1, 2, 3, dan 4). Tetapi, semakin tinggi suhu awal kolom maka komponen sampel tersebut tidak akan lama berada di fase diam karena langsung menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga resolusinya akan semakin kecil (Tabel 5).

Dalam memperoleh kondisi analisis optimum, dilakukan juga variasi kecepatan alir gas, yaitu $1,35$; $1,8$; dan $2,0 \text{ ml}/\text{menit}$. Pemilihan kecepatan alir kolom disesuaikan dengan jenis kolom. Pertimbangan variasi kecepatan alir gas pembawa didasarkan pada ketentuan kecepatan alir maksimum untuk kolom kapiler adalah $2,0 \text{ ml}/\text{menit}$.

Pada kecepatan alir gas $2,0 \text{ ml}/\text{menit}$, puncak DHA metil ester dan EPA metil ester lebih cepat keluar dengan waktu retensi yang lebih singkat dibandingkan dengan kecepatan alir gas $1,35$ dan $1,8 \text{ ml}/\text{menit}$ (Gambar 1, 5,

dan 6). Tetapi, semakin tinggi kecepatan alir gas maka semakin cepat komponen sampel terdorong melalui kolom sehingga komponen sampel tidak akan lama berada di dalam fase diam dan akibatnya resolusi akan semakin kecil (Tabel 5).

Pemisahan puncak kromatografi salah satunya berkaitan dengan faktor keefisienan kolom yang diukur melalui nilai HETP. Oleh karena itu, pertimbangan lain dalam memilih kondisi analisis optimum yaitu berdasarkan perhitungan jumlah pelat teoritis (N), nilai HETP, dan resolusi. Dimana, kondisi yang terbaik yaitu kondisi yang memiliki nilai N paling tinggi, HETP paling kecil, dan resolusi yang lebih dari satu. Dari hasil perhitungan pada Tabel 5, dapat disimpulkan bahwa kondisi analisis optimum yang dapat digunakan pada penelitian ini yaitu suhu awal kolom 120°C dan kecepatan alir gas sebesar 1,35 ml/menit.

2. Pembuatan kurva kalibrasi asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya 5 konsentrasi analit yang berbeda dan digunakan untuk menentukan linieritas. Standar yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan baku DHA 27 yang mengandung DHA (*Docosahexaenoic Acid*) sebesar 27,5 % dan EPA (*Eicosapentaenoic Acid*) sebesar 7,7 %, sehingga rentang konsentrasi untuk kurva kalibrasi dibuat berdasarkan kadar DHA dan EPA yang tercantum dalam sertifikat analisis.

Metode perhitungan penetapan kadar DHA dan EPA dalam sampel susu bubuk menggunakan metode normalisasi, sehingga kurva kalibrasi pada penelitian ini tidak digunakan untuk perhitungan kadar DHA dan EPA dalam sampel. Pada metode ini, pembuatan kurva kalibrasi DHA metil ester dan EPA metil ester dilakukan dengan menghubungkan 6 titik pada berbagai konsentrasi. Baku DHA dan EPA yang tersedia masih dalam bentuk asam, oleh karena itu perlu dilakukan proses metilasi. Untuk mendapatkan larutan induk DHA metil ester dan EPA metil ester sebesar 8822,15 ppm dan 2470,20 ppm, maka dilakukan penimbangan larutan baku DHA 27 sebesar 334,60 mg.

Dalam mengefisienkan waktu dan pelarut, maka diupayakan dalam satu kali penyuntikan baku dapat dihasilkan 2 puncak yaitu puncak DHA metil ester dan EPA metil ester. Konsentrasi EPA yang digunakan untuk kurva kalibrasi adalah 355,71 ppm, 592,85 ppm, 741,06 ppm, 988,08 ppm, 1235,10 ppm, dan 2470,20 ppm. Sedangkan untuk DHA rentang konsentrasi yang digunakan adalah 1270,39 ppm, 2117,32 ppm, 2646,64 ppm, 3528,86 ppm, 4411,08 ppm, dan 8822,15 ppm.

Persamaan kurva kalibrasi untuk baku DHA metil ester adalah $y=0,9909x + 86,9990$ dengan koefisien korelasi $r=0,9992$. Persamaan kurva kalibrasi untuk baku EPA metil ester adalah $y=0,8440x + 3,9986$ dengan koefisien korelasi $r=0,9988$. Harga koefisien korelasi r yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak yang dihasilkan (35).

3. Menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi analisis asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik dengan memanfaatkan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh (35).

Batas deteksi DHA metil ester dan EPA metil ester berdasarkan perhitungan statistik berturut-turut sebesar 368,42 ppm dan 157,30 ppm. Sedangkan batas kuantitasi DHA metil ester dan EPA metil ester berturut-turut sebesar 1228,08 ppm dan 524,34 ppm.

4. Uji presisi asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) yang dapat dinyatakan sebagai keterulangan atau ketertiruan. Uji presisi dilakukan dengan pengukuran sedikitnya 6 kali

konsentrasi zat uji. Pada sediaan farmasi, kriteria seksama diberikan jika metode memberikan koefisien variasi 2 % atau kurang (35). Pada sampel biologis dalam hal ini produk susu sebagai *nutriceutical*, syarat presisi yang baik kurang dari 10 % dari rata-rata hasil keseluruhan yang diukur (2, 36). bahan baku yang digunakan sebagai standar juga tidak murni karena masih mengandung zat-zat lain.

Pada uji presisi, konsentrasi yang dipilih untuk pengukuran diambil dari konsentrasi pada kurva kalibrasi yang dianggap mewakili pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Data presisi untuk DHA metil ester dapat dilihat pada Tabel 6 dan untuk EPA metil ester dapat dilihat pada Tabel 7. Dari tabel dapat dilihat bahwa uji presisi untuk DHA metil ester dan EPA metil ester memenuhi kriteria seksama dengan hasil perbandingan konsentrasi pengukuran dan konsentrasi rata-rata yang kurang dari 10 %.

5. Uji perolehan kembali asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester)

Uji perolehan kembali dilakukan untuk mengetahui ukuran tahap ekstraksi dalam suatu metode analisis terhadap standar yang ditambahkan pada suatu cuplikan. Metode yang digunakan adalah metode adisi, yaitu dengan menambahkan baku dengan kadar tertentu ke dalam sampel susu bubuk yang telah direfluks pada tahap metilasi, kemudian diekstraksi untuk ditentukan kadarnya. Konsentrasi baku yang ditambahkan biasanya berkisar antara 80 % - 120 % (35).

Pada uji perolehan kembali ini digunakan metode adisi, sehingga perlu dilakukan pengukuran terhadap kadar zat uji dalam sampel terlebih dahulu dengan cara ekstraksi yang sama. Untuk perhitungannya, selisih konsentrasi larutan uji perolehan kembali dengan konsentrasi zat uji dalam sampel dibagi dengan konsentrasi baku yang ditambahkan dikali 100 % (Lampiran 4).

Sampel dan bahan baku yang akan diukur untuk uji perolehan kembali masih dalam bentuk asam, sehingga perlu diderivatisasi terlebih dahulu agar dapat dianalisis dengan kromatografi gas. Hasil derivatisasi merupakan bentuk metil ester yang dapat menguap pada suhu analisa. Karena dalam bentuk asam, zat uji memiliki titik didih yang sangat tinggi.

Pada uji perolehan kembali, sebelum sampel diekstraksi pada tahap metilasi terlebih dahulu ditambahkan baku DHA metil ester dengan konsentrasi masing-masing 2641,14 ppm, 3521,52 ppm, dan 4401,90 ppm dan baku EPA metil ester dengan konsentrasi masing-masing 744,03 ppm, 992,04 ppm, dan 1240,04 ppm.

Pada penelitian ini, sampel susu yang digunakan untuk uji perolehan kembali mengalami proses ekstraksi. Untuk mengetahui tingkat keberhasilan ekstraksi, diperlukan baku dalam sebagai pembanding sehingga penyimpangan dalam pengukuran dapat dikurangi. Contoh baku dalam yang dapat digunakan untuk analisis asam lemak secara kromatografi gas adalah metil trikosanoat. Baku dalam ini sulit didapatkan dan harganya juga relatif mahal, sehingga pada penelitian ini tidak menggunakan baku dalam.

Berdasarkan literatur jika konsentrasi analit $> 0,001$ % dalam matriks, rata-rata persentase perolehan kembali sebesar 90 % - 107 % (35). Syarat akurasi yang baik untuk sampel hayati (biologis atau nabati) yaitu ± 15 % dari 100 %, sehingga syarat akurasi yang baik untuk sampel biologis menjadi 85 % - 115 % (36). Hasil uji perolehan kembali untuk DHA metil ester dan EPA metil ester diperoleh rata-rata persen uji perolehan kembali sebesar $(89,75 \pm 4,2097)\%$ dan $(98,43 \pm 4,4209)\%$. Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa uji perolehan kembali untuk DHA metil ester dan EPA metil ester memenuhi persyaratan yang ditetapkan.

6. Analisis kualitatif dan kuantitatif asam dokosaheksaenoat metil ester (DHA metil ester) dan asam eikosapentaenoat metil ester (EPA metil ester) dalam sampel

DHA dan EPA merupakan asam lemak rantai panjang yang ada didalam susu bubuk dan terdapat dalam bentuk campuran dengan komponen lain. Oleh karena itu, untuk menganalisis DHA dan EPA perlu dipisahkan terlebih dahulu dari komponen-komponen lainnya. Dalam proses pemisahan, terdapat 4 tahapan proses yang harus dilakukan.

Tahapan pertama yaitu ekstraksi, tujuannya adalah untuk memisahkan lemak dari protein dan komponen lainnya yang terlarut dalam fase yang lebih polar yaitu metanol. Hasil yang diperoleh dalam kloroform yang diuapkan adalah lemak. Selanjutnya kloroform diuapkan pada suhu yang terkontrol yaitu $\pm 61^{\circ}\text{C}$, karena pada suhu tersebut kloroform dapat menguap.

Tahapan kedua yaitu proses penyabunan. Hidrolisis lemak menghasilkan gliserol dan asam-asam lemak. Jika lemak dididihkan dengan larutan kalium hidroksida hingga hidrolisis sempurna, diperoleh suatu campuran gliserol dan garam-garam kalium dari asam-asam lemak. Garam-garam kalium dari asam-asam lemak ini bersifat lebih polar sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut yang polar yaitu air. Ekstraksi menggunakan petroleum eter bertujuan untuk menghilangkan pengotor yang larut dalam pelarut non polar seperti sterol kolesterol.

Tahapan ketiga yaitu pembebasan asam lemak. Caranya dengan menambahkan asam klorida, sehingga gugus kalium dari asam lemak tersabunkan akan bereaksi dengan HCl membentuk garam KCl. Asam lemak bebas yang terbentuk, kembali menjadi bentuk non polar dan dapat diekstraksi dengan pelarut non polar yaitu petroleum eter. Petroleum eter digunakan karena petroleum eter merupakan pelarut organik non polar yang mudah menguap.

Tahapan terakhir yaitu proses metilasi, tujuannya untuk menderivatisasi asam lemak menjadi metil ester. Analisis asam lemak dilakukan dengan menggunakan kromatografi gas, sehingga zat yang akan dianalisis harus dapat menguap pada suhu analisis. DHA dan EPA dalam bentuk asam lemak mempunyai titik didih yang tinggi sekitar $\pm 230^{\circ}\text{C}$ sehingga perlu diderivatisasi agar titik didihnya menjadi lebih rendah dan dapat menguap pada suhu analisis. Proses metilasi dilakukan dengan cara

merefluks asam lemak hasil ekstraksi dengan reagen pemetilasi. Reagen pemetilasi yang digunakan adalah metanol-toluen-asam sulfat pekat.

Pemanasan pada refluks dilakukan untuk mempercepat reaksi metilasi. Pemanasan dilakukan dengan suhu terkontrol. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan natrium klorida, untuk meningkatkan kelarutan zat uji dalam heksan. Kemudian diekstraksi kembali dengan natrium karbonat untuk menetralkan larutan uji karena pada reagen pemetilasi yang digunakan terdapat asam sulfat. Sedangkan natrium sulfat anhidrat digunakan untuk menarik sisa air yang kemungkinan masih terdapat dalam larutan.

Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara kromatogram sampel dengan kromatogram baku DHA metil ester dan EPA metil ester. Sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan metode normalisasi (penormalan luas). Yang dimaksud dengan penormalan luas adalah menghitung susunan dalam % dengan mengukur luas setiap puncak dan membagi masing-masing luas puncak dengan luas keseluruhan. Metode ini dapat dipakai jika kita menganggap semua puncak dari asam lemak terelusi dan digunakan untuk menghitung % bobot (29).

Pada penelitian ini digunakan tiga sampel susu bubuk yang diperoleh dari pasar modern di daerah Depok. Sampel A merupakan susu untuk bayi, sedangkan sampel B dan C merupakan susu untuk dewasa. Dalam lemak susu terdapat 60-75% lemak yang bersifat jenuh, 25-30% lemak yang bersifat tak jenuh dan sekitar 4% merupakan asam lemak *polyunsaturated*.

Komponen mikro lemak susu antara lain adalah fosfolipid, sterol, tokoferol (vitamin E), karoten, serta vitamin A dan D.

Pada kromatogram dapat terlihat bahwa tidak hanya DHA dan EPA yang dapat dimetilasi dan terdeteksi oleh kromatografi gas tetapi juga asam-asam lemak lain yang terdapat dalam lemak susu. Komposisi asam-asam lemak terbesar dari susu adalah asam palmitat sebesar 22-35% dan asam oleat sebesar 20-30% (37). Sehingga dapat diketahui bahwa puncak besar yang terdapat dalam kromatogram merupakan puncak dari asam palmitat dan asam oleat.

Berdasarkan literatur, standar kandungan DHA maksimum nutrisi per 100 kcal untuk formula bayi adalah 0,5 % dari total asam lemak. Sedangkan rasio EPA/DHA yang baik yaitu < 1 (38). Pada bayi normal konsentrasi DHA yang baik yaitu 20 mg/kg BB, sedangkan pada bayi prematur 40 mg/kg BB. Hasil analisis DHA dan EPA secara kromatografi gas menunjukkan kadar DHA dan EPA yang lebih kecil dari kadar DHA dan EPA yang tercantum dalam label kemasan sampel susu bubuk. Faktor yang mempunyai pengaruh cukup besar pada tahap ini adalah proses esterifikasi dan ekstraksi analit. Proses ekstraksi sampel pada penelitian ini terlalu panjang, sehingga variasi besar hasil ekstraksi lemak dapat terjadi. Dengan koefisien variasi yang besar dari hasil analisis DHA dan EPA dalam sampel, berarti untuk mengetahui kadar DHA dan EPA yang pasti perlu dilakukan upaya perbaikan proses ekstraksi lemak yang digunakan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum DHA metil ester dan EPA metil ester dalam heksan secara kromatografi gas diperoleh dengan pemrograman suhu pada kecepatan alir gas pembawa 1,35 ml/menit dengan suhu injektor 230^oC dan suhu detektor 250^oC. Pemrograman suhu yang digunakan adalah suhu awal 120^oC dengan kenaikan suhu 2^oC/menit sampai mencapai suhu 230^oC dan dipertahankan selama 100 menit. Waktu retensi dari DHA metil ester dan EPA metil ester adalah ± 29 menit dan ±39 menit.
2. Hasil uji validasi menunjukkan bahwa DHA metil ester dan EPA metil ester memenuhi persyaratan presisi dan akurasi, dengan koefisien korelasi $r=0,9992$ untuk DHA metil ester dan $r=0,9988$ untuk EPA metil ester. Batas deteksi DHA metil ester dan EPA metil ester berturut-turut sebesar 368,42 ppm dan 157,30 ppm. Sedangkan batas kuantitasi DHA metil ester dan EPA metil ester berturut-turut sebesar 1228,08 ppm dan 524,34 ppm.

3. Hasil analisis dari tiga sampel susu bubuk, diperoleh kandungan DHA dan EPA pada sampel A berturut-turut sebesar $(0,0024 \pm 0,0011)\%$ b/b dan $(0,0019 \pm 0,0005)\%$ b/b, sampel B berturut-turut sebesar $(0,0041 \pm 0,0006)\%$ b/b dan $(0,0191 \pm 0,0078)\%$ b/b, dan sampel C berturut-turut sebesar $(0,0068 \pm 0,0014)\%$ b/b dan $0,0018\%$ b/b. Hasil analisis sampel dibandingkan dengan kadar dalam label kemasan dan % penyimpangannya dapat dilihat pada tabel 15.

B. SARAN

- Sebaiknya standar yang digunakan adalah standar murni
- Perlu dicari cara penyiapan sampel yang lebih singkat agar lebih efektif dan efisien
- Sebaiknya digunakan baku dalam untuk uji perolehan kembali dengan metode adisi agar hasil yang diperoleh dapat lebih dipercaya

DAFTAR PUSTAKA

1. Handayani, Sri dan C. Budi Marwanti. *Pengembangan Metode Analisis Sederhana Asam Lemak Omega-3 Melalui Penentuan Derivat Asam Propionat Secara Titrasi Alkalimetri*. Yogyakarta : Universitas Negeri Yogyakarta, 2005
2. Darmawati, Asri dan Moch. Yuwono. *Penentuan Kadar Asam Lemak Omega-3 Dalam Remis (*Corbicula javanica* Mousson)*. Majalah Farmasi Airlangga Vol.4 No.3, 2004
3. Anonim. *Perluakah Suplementasi AA/DHA dalam Susu Formula?*. <http://www.DHA dan AA.com/>. 30 Juli 2007, pkl 15:15
4. Anonim. *Menjaga standar susu siap saji balita*. vBulletin® v3.6.4. Jelsoft Enterprises Ltd, 25 Juni 2006
5. Hadiwiyoto, Soewedo. *Teknik Uji Mutu Susu dan Hasil Olahannya*. Yogyakarta : Liberty, 1982
6. Hadiwiyoto, S. *Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya*. Yogyakarta : Liberty, 1994
7. Redjo, S. *Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta : UGM, 1960
8. Anonim. *DHA, Asam Lemak Untuk Segala Usia*, 2 hlm. <http://www.DHA.com/DHAA22.htm>. 25 Juli 2007, pkl 19:10

9. Adnan, M. *Kimia dan Teknologi Pengolahan Air Susu*. Yogyakarta : UGM, 1984
10. Buckle, K. A., dkk. *Ilmu Pangan*. Penerjemah : Hari Purnomo dan Adiono. Jakarta : UI Press, 1987
11. Lampert, Lincoln M. *Modern Dairy Product Chemical*. New York : Publishing Company Inc., 1975
12. Paul, Paulina C, *et al. Food Theory and Applications*. New York : John Wiley & Sons, 1972
13. Muchtadi, T. R dan Sugiyono. *Petunjuk Laboratorium Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Bogor : Institut Pertanian Bogor, 1989
14. Anonim. *SNI 01-3950-1998*. Jakarta : BSN 1998
15. Ponten, M. *Teknologi Pengolahan Kelapa Sawit*. Medan : Pusat Penelitian Kelapa Sawit, 1996
16. Soemanto, Imam Khasani dan Tri Wahyuni Wiwiek. *Seminar Nasional Kimia dan Pembangunan*. Bandung : National Seminar of Chemistry and Development, 1992
17. M deMan, John. *Kimia Makanan*. Penerjemah : Kosasih Padmawinata. Bandung : Penerbit ITB, 1997
18. Silalahi, J dan Netty Hutagalung. *Komponen-Komponen Bioaktif Dalam Makanan dan Pengaruhnya Terhadap Makanan*. Medan : Jurusan Farmasi Fakultas MIPA. Universitas Sumatera Utara
19. Anonim. *Docosahexaenoic acid and Eicosapentaenoic acid* .[http://en.wikipedia.org/wiki/DHA and EPA](http://en.wikipedia.org/wiki/DHA_and_EPA). 25 Juli 2007, pkl 19:10

20. Anonim. *Susu Formula : Pilih Cerdas Atau Encer*. Majalah Gatra. 21 November 2001
21. Anonim. *Eicosapentaenoic Acid (EPA)*. <http://www.pediatric.com/EPA>. 25 Juli 2007, pkl 19:10
22. Anonim. *Council for Responsible Nutrition*. Voluntary Monograph. Maret 2006
23. S. Feng, A. L. Lock, and P. C. Garnsworthy. *A Rapid Lipid Separation Method For Determining Fatty Acid Composition of Milk*. J. Dairy Sci. 87:3785-3788. American Dairy Science Association, 2004
24. Horwitz, W. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Washington DC : Association of Official Analytical Chemists, 1975
25. Anonim. *Prosedur Tetap Merck*
26. Luna, P. *et al.* *Validation of a Rapid Milk Fat Separation Method to Determine the Fatty Acid Profile by Gas Chromatography*. Journal of Dairy Science 88:3377-3381. American Dairy Science Association, 2005
27. Tuulikki Seppanen-Laakso. *Replacement of Dietary Fats-Effects On Serum Lipids and Plasma Fatty Acid Composition with Special Emphasis on the Metabolism of Essential Fatty Acids*. Helsinki : Faculty of Science of the University of Helsinki, 2004
28. Grob, Robert L. *Modern Practice of Chromatography*. Pennsylvania : John Wiley & Sons, 1977

29. McNair, H. M & Bonelli, E. J. *Dasar Kromatografi Gas*, Penerjemah Kosasih Padmawinata. Bandung : ITB Bandung, 1988
30. Anonim. *Gas-Liquid Chromatography*.
[http://www.mywiseowl.com/articles/Gas liquid chromatography](http://www.mywiseowl.com/articles/Gas_liquid_chromatography). 22 Juli 2007, pkl : 18:30
31. Anonim. *Chromatography*. Illinois : Alltech Associates Inc., 1991
32. Hendayana, Sumar, *et al. Kimia Analitik Instrumen*, edisi kesatu. Semarang : IKIP Semarang Press. 1998 : 427-431
33. Sudjadi. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta : Kanisius. 1998 : 73, 153-166
34. Anonim. *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995
35. Harmita. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian 3(1). Depok : Departemen Farmasi Universitas Indonesia, 2004 : 117-135
36. Harmita. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi Universitas Indonesia, 2006
37. Jensen, R. G. *The Composition of Bovine Milk Lipids*. Journal of Dairy Science 85:295-350. American Dairy Science Association, 2002
38. Anonim. *Draft Revised Standard For Infant Formula and Formulas For Special Medical Purpose Intended For Infants*. Codex Committee On Nutrition And Foods For Special Dietary Uses, Twenty-seventh Session. Germany, 21-25 November 2005



Tabel 5

Pemilihan kondisi analisis optimum untuk campuran asam dokosaheksaenoat (DHA) dan asam eikosapentaenoat (EPA) dalam heksan dengan variasi suhu awal kolom dan kecepatan alir

Suhu awal kolom (°C)	Kecepatan alir (ml/menit)	tR DHA	tR EPA	Jumlah lempeng teoritis (N) DHA	Jumlah lempeng teoritis (N) EPA	HETP DHA	HETP EPA	Resolusi DHA dan EPA
120	2,00	26,618	36,352	45345,1471	132146,7904	0,1323	0,0454	21,6311
	1,80	27,445	37,250	39840,1600	138756,2500	0,1506	0,0432	20,6421
	1,35	30,019	40,025	57672,9831	160200,0625	0,1040	0,0374	22,2356
130		25,314	34,915	33893,4795	96320,5709	0,1770	0,0623	19,2020
140	1,35	20,852	29,839	19324,7068	70349,8999	0,3105	0,0853	17,1181
150		17,174	25,365	23304,3971	71289,0000	0,2575	0,0842	19,7373

Tabel 6

Hasil pengukuran baku asam dokosaheksaenoat untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak ($\mu\text{v/s}$)
1270,39	1338
2117,32	2219
2646,64	2539
3528,86	3619
4411,08	4617
8822,15	8780

Persamaan kurva kalibrasi baku asam dokosaheksaenoat (DHA):

$$y = 0,9909 x + 86,9990$$

koefisien korelasi, $r = 0,999168$

Keterangan :

Volume penyuntikkan 5,0 μl

Kondisi analisis :

Pemrograman suhu dengan suhu awal 120°C dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C, dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir 1,35 ml/menit.

Tabel 7

Hasil pengukuran baku asam eikosapentaenoat untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak ($\mu\text{v/s}$)
355,71	314
592,85	539
741,06	580
988,08	818
1235,10	1070
2470,20	2090

Persamaan kurva kalibrasi baku asam eikosapentaenoat :

$$y = 0,8440 x + 3,9986$$

koefisien korelasi, $r = 0,998842$

Keterangan :

Volume penyuntikkan 5,0 μl

Kondisi analisis :

Pemrograman suhu dengan suhu awal 120°C dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C, dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir 1,35 ml/menit.

Tabel 8

Hasil perhitungan penentuan batas deteksi
dan batas kuantitasi asam dokosaheksaenoat

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak DHA ($\mu\text{v/s}$) (Y)	Yi	(Y-Yi) ²
1270,39	1338	1345,8284	61,2838
2117,32	2219	2185,0514	1152,5074
2646,64	2539	2709,5546	29088,8716
3528,86	3619	3583,7464	1242,8163
4411,08	4617	4457,9382	25300,6562
8822,15	8780	8828,8674	2388,0228
Jumlah			59234,1581

Batas deteksi = 368,42 ppm

Batas kuantitasi = 1228,08 ppm

Tabel 9

Hasil perhitungan penentuan batas deteksi
dan batas kuantitasi asam eikosapentaenoat

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak DHA ($\mu\text{v/s}$) (Y)	Yi	(Y-Yi) ²
355,71	314	304,2178	95,6914
592,85	539	504,3640	1199,6525
741,06	580	629,4532	2445,6190
988,08	818	877,4613	3535,6462
1235,10	1070	1046,4230	555,8749
2470,20	2090	2088,8474	1,3285
Jumlah			7833,8125

Batas deteksi = 157,30 ppm

Batas kuantitasi = 524,34 ppm

Tabel 10

Hasil pengukuran baku asam dokosaheksaenoat untuk data presisi

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak ($\mu\text{v/s}$)	Konsentrasi pengukuran (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)	Simpangan baku	Koefisien variasi (%)
1270,39	1213	1136,34	1151,65	17,2095	1,40
	1211	1134,32			
	1233	1156,52			
	1242	1165,61			
	1217	1140,38			
	1253	1176,71			
2117,32	2269	2202,04	2222,22	45,6202	1,99
	2219	2151,58			
	2290	2223,23			
	2295	2228,28			
	2302	2235,34			
	2359	2292,87			
2646,64	2482	2416,99	2461,23	27,2941	1,08
	2518	2453,33			
	2542	2477,55			
	2514	2449,29			
	2560	2495,71			
	2539	2474,52			

Tabel 11

Hasil pengukuran baku asam eikosapentaenoat untuk data presisi

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)	Simpangan baku	Koefisien variasi (%)
355,71	281	328,20	321,88	8,1158	2,94
	273	318,72			
	276	322,28			
	286	334,12			
	276	322,28			
	262	305,69			
592,85	531	624,41	631,32	7,2503	1,35
	535	629,15			
	536	630,33			
	530	623,22			
	539	633,89			
	550	646,92			
741,06	594	699,05	707,15	15,6769	2,61
	596	701,42			
	596	701,42			
	580	682,47			
	641	754,74			
	618	727,49			

Tabel 12

Hasil uji perolehan kembali asam dokosaheksaenoat

Konsentrasi DHA metil ester yang disuntikkan (ppm)	Luas puncak DHA metil ester larutan UPK ($\mu\text{v/s}$)	Konsentrasi larutan UPK (ppm)	Selisih Konsentrasi DHA metil ester (ppm)	Kadar uji perolehan kembali (%)	Rata-rata uji perolehan kembali (%)
	4397	4349,58	2241,40	84,86	
2641,14	4540	4493,90	2385,72	90,33	87,72 \pm 2,7431
	4478	4431,33	2323,15	87,96	
	5136	5095,37	2987,19	84,83	
3521,52	5143	5102,43	2994,25	85,03	86,94 \pm 3,4828
	5350	5311,33	3203,15	90,96	
	6230	6199,42	4091,24	92,94	
4401,90	6345	6315,47	4207,29	95,58	94,59 \pm 1,4362
	6330	6300,33	4192,15	95,24	

Luas puncak DHA metil ester larutan sampel = 2176

Konsentrasi DHA metil ester larutan sampel = 2108,18 ppm

Tabel 13

Hasil uji perolehan kembali asam eikosapentaenoat

Konsentrasi EPA metil ester yang disuntikkan (ppm)	Luas puncak EPA metil ester larutan UPK ($\mu\text{v/s}$)	Konsentrasi larutan UPK (ppm)	Selisih Konsentrasi EPA metil ester (ppm)	Kadar uji perolehan kembali (%)	Rata-rata uji perolehan kembali (%)
	3792	4488,15	739,33	99,37	
744,03	3776	4469,20	720,38	96,82	96,29 \pm 3,3763
	3750	4438,39	689,57	92,68	
	4036	4777,25	1028,43	103,67	
992,04	4040	4781,99	1033,17	104,15	103,51 \pm 0,7332
	4028	4767,77	1018,95	102,71	
	4129	4887,44	1138,62	91,82	
1240,04	4214	4988,15	1239,33	99,94	95,48 \pm 4,1177
	4159	4922,99	1174,17	94,69	

Luas puncak EPA metil ester larutan sampel = 3168

Konsentrasi EPA metil ester larutan sampel = 3748,82 ppm

Tabel 14

Hasil penetapan kadar DHA dan EPA dalam susu bubuk

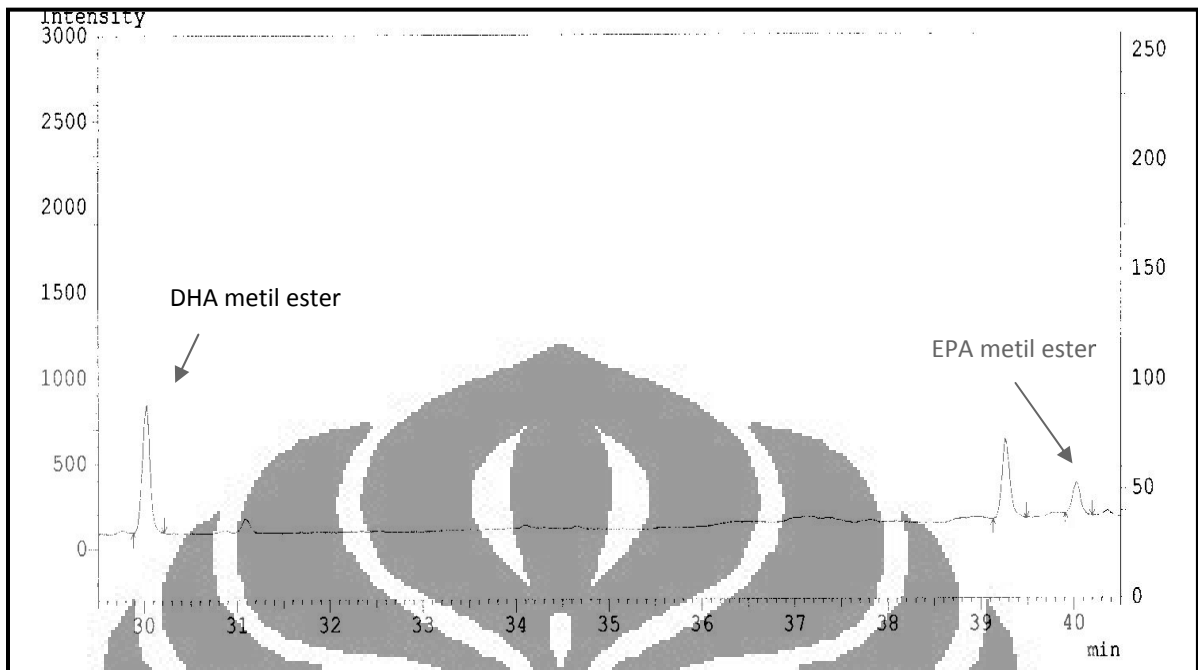
Sampel	Luas puncak DHA metil ester ($\mu\text{V/s}$)	Luas puncak EPA metil ester ($\mu\text{V/s}$)	Kadar DHA metil ester dalam sampel (%b/b)	Kadar DHA dalam sampel (%b/b)	Kadar EPA metil ester dalam sampel (%b/b)	Kadar EPA dalam sampel (%b/b)	Rata-rata kadar DHA dalam sampel (%b/b)	Rata-rata kadar EPA dalam sampel (%b/b)
A	3034	1766	0,0026	0,0025	0,0015	0,0014	0,0024 \pm 0,0011	0,0019 \pm 0,0005
	3760	7266	0,0013	0,0012	0,0025	0,0024		
	4956	2552	0,0036	0,0035	0,0019	0,0018		
B	6748	43827	0,0038	0,0036	0,0247	0,0236	0,0041 \pm 0,0006	0,0191 \pm 0,0078
	7761	38698	0,0050	0,0048	0,0248	0,0237		
	6712	17617	0,0040	0,0038	0,0106	0,0101		
C	662	-	0,0071	0,0068	-	-	0,0068 \pm 0,0014	-
	748	-	0,0086	0,0082	-	-		
	552	181	0,0057	0,0054	0,0019	0,0018		

Tabel 15

Perbandingan kadar DHA dan EPA hasil analisis dengan kadar DHA dan EPA dalam label kemasan

Nama Sampel	Hasil Analisis Sampel (ppm)		Pada Label (ppm)		Penyimpangan (%)	
	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA
A	24	19	115	20	79,13	5,00
B	41	191	58	200	29,31	27,33
C	68	18	77	77	11,69	76,62

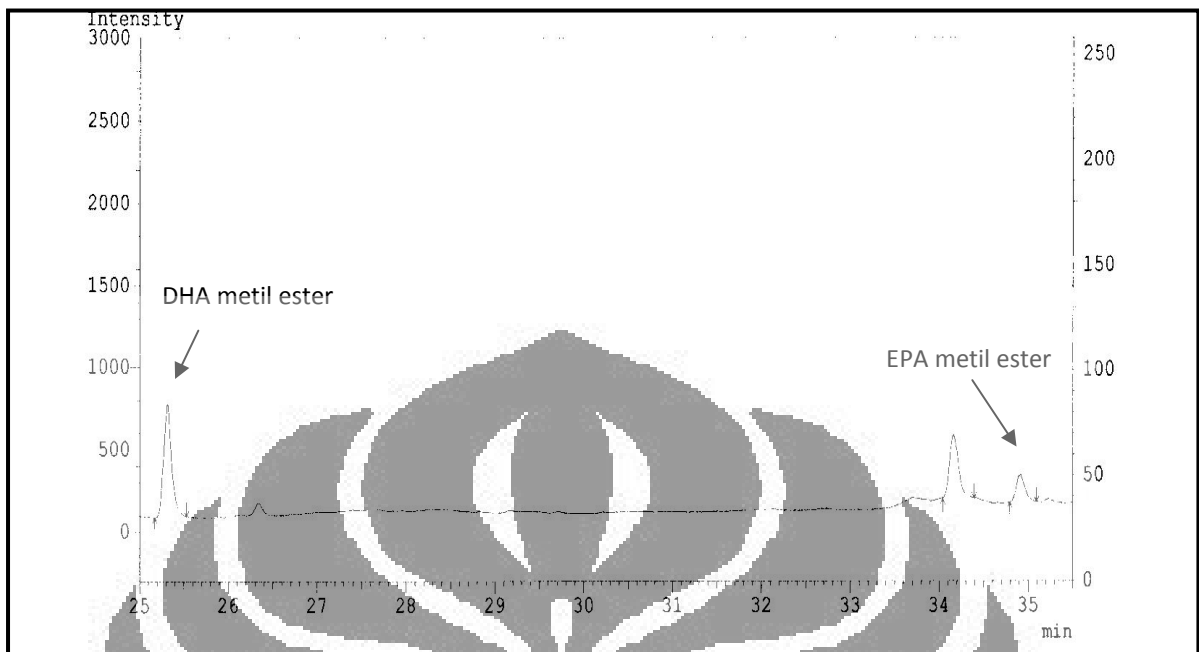




Gambar 1. Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester

Kondisi analisis :

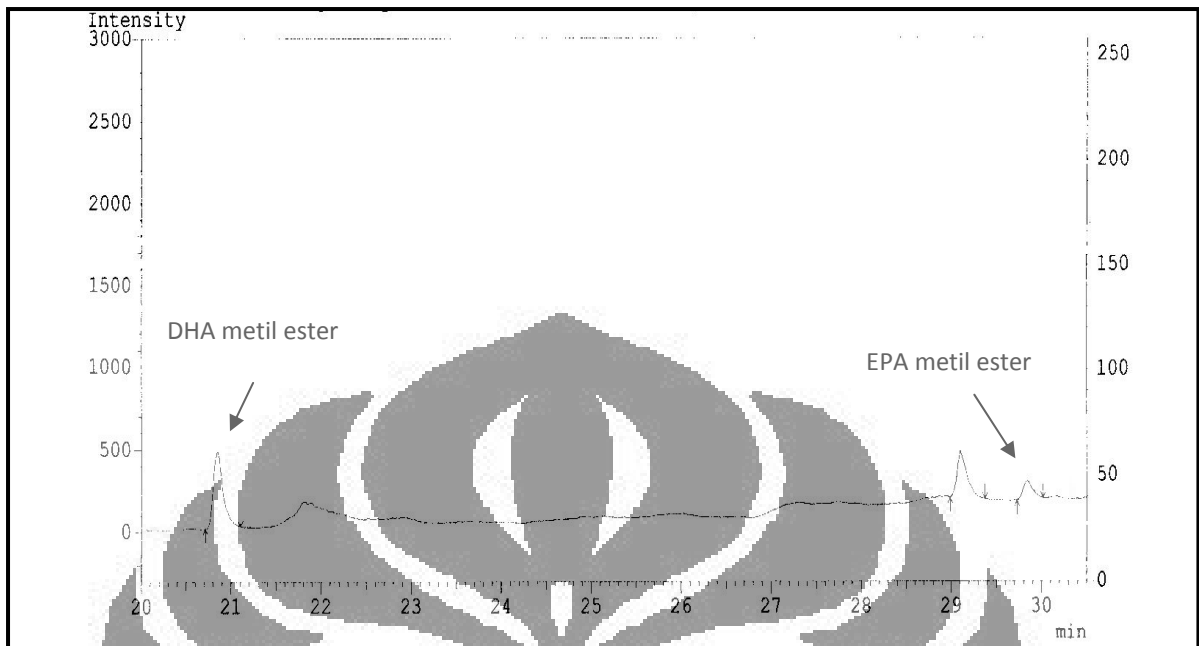
Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas 1,35 ml/menit.



Gambar 2. Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester

Kondisi analisis :

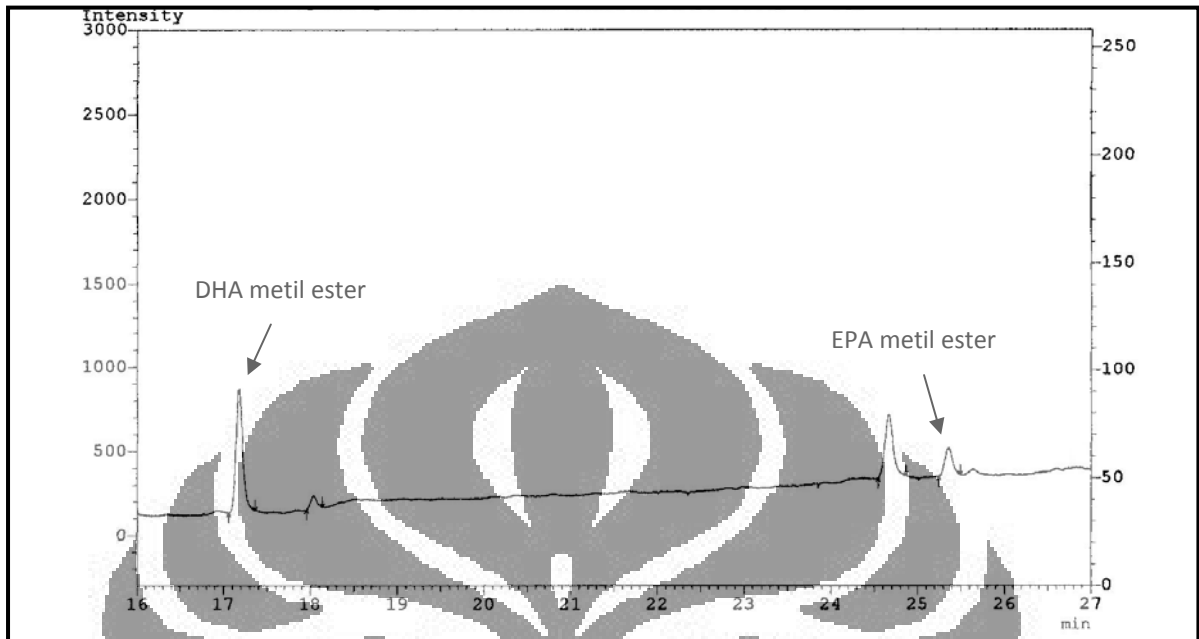
Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 130°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $1,35$ ml/menit.



Gambar 3. Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester

Kondisi analisis :

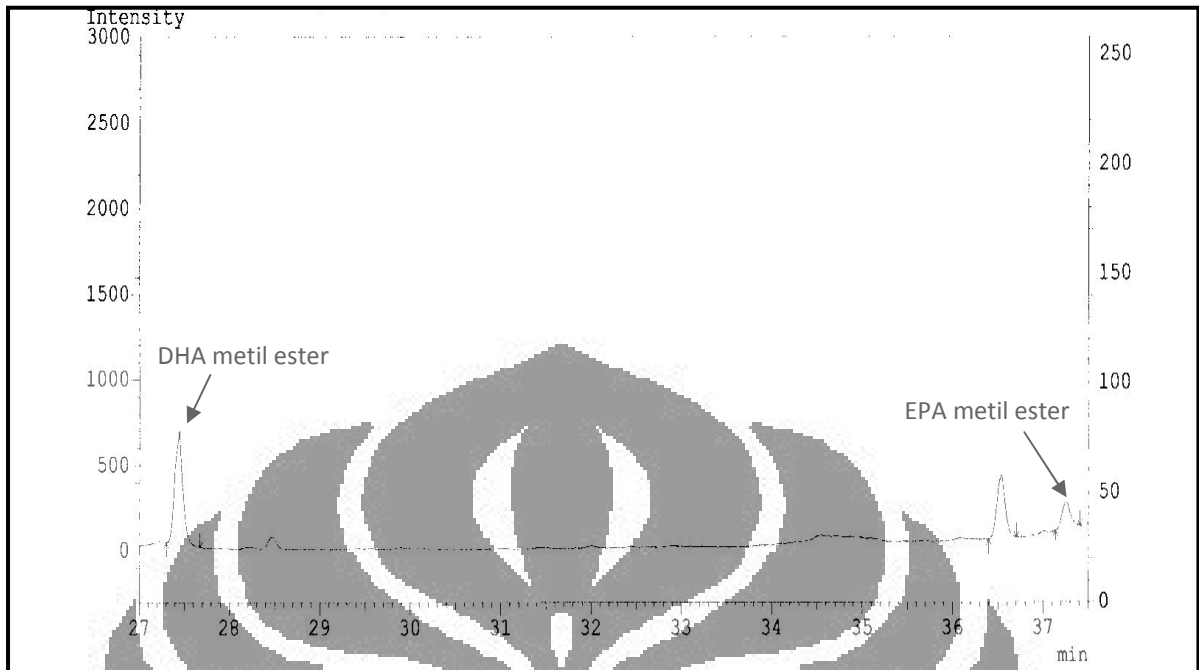
Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 140°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas 1,35 ml/menit.



Gambar 4. Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester

Kondisi analisis :

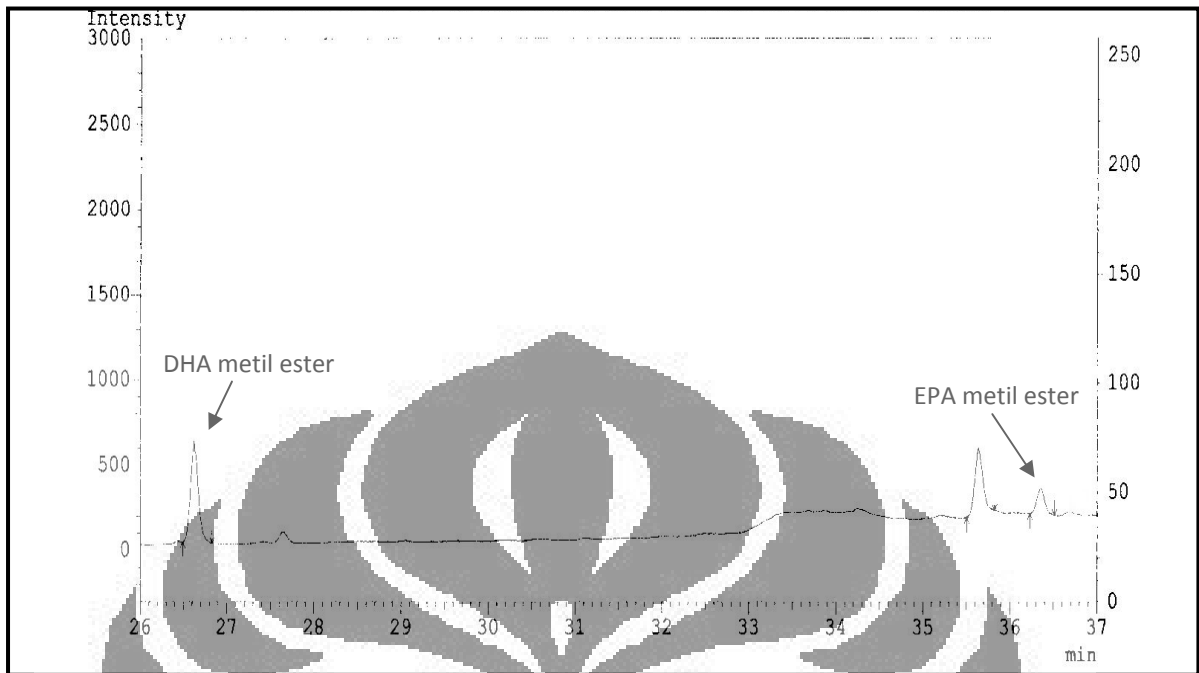
Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 150°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $1,35$ ml/menit.



Gambar 5. Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester

Kondisi analisis :

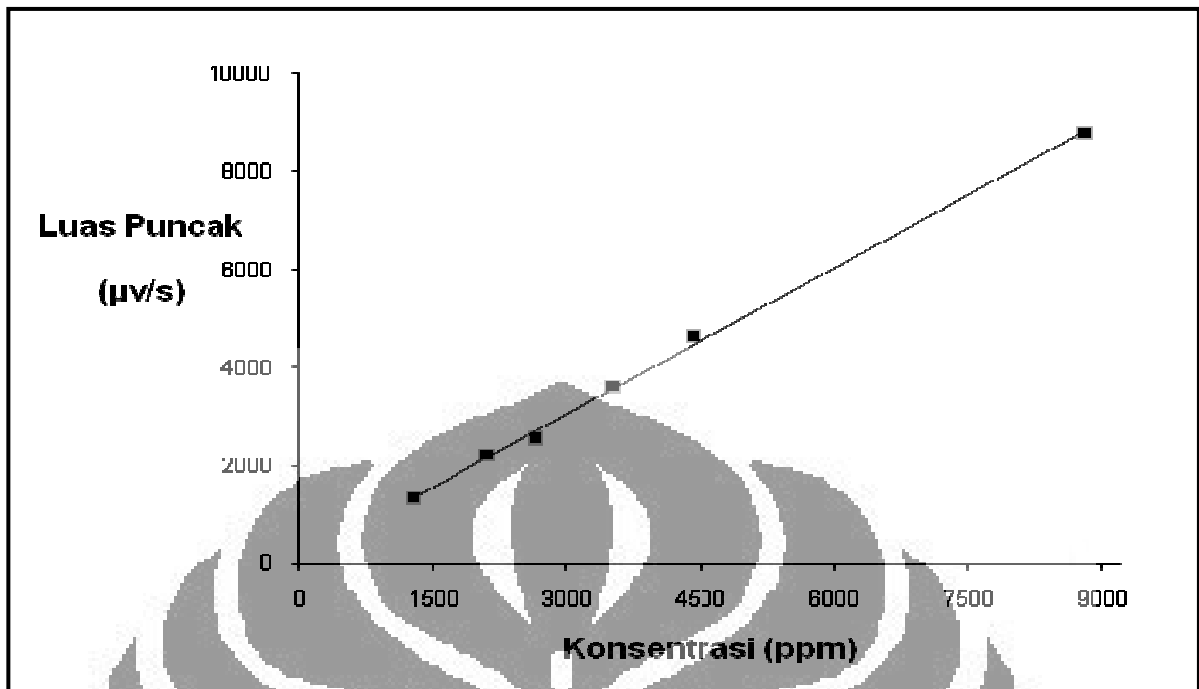
Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $1,80\text{ ml}/\text{menit}$.



Gambar 6. Kromatogram campuran baku DHA metil ester dan EPA metil ester

Kondisi analisis :

Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $2,00\text{ ml}/\text{menit}$.

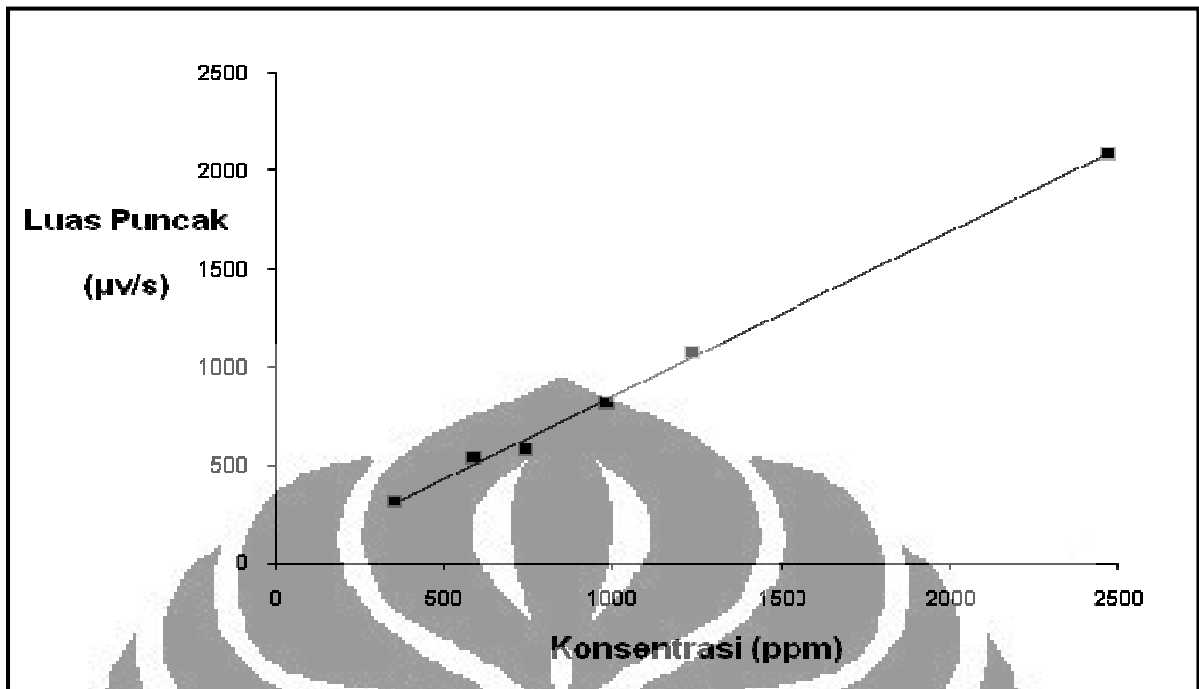


Gambar 7. Kurva kalibrasi baku DHA metil ester

Keterangan :

Persamaan kurva kalibrasi baku DHA metil ester : $y=0,9909x + 86,9990$

Dengan koefisien korelasi $r=0,9992$

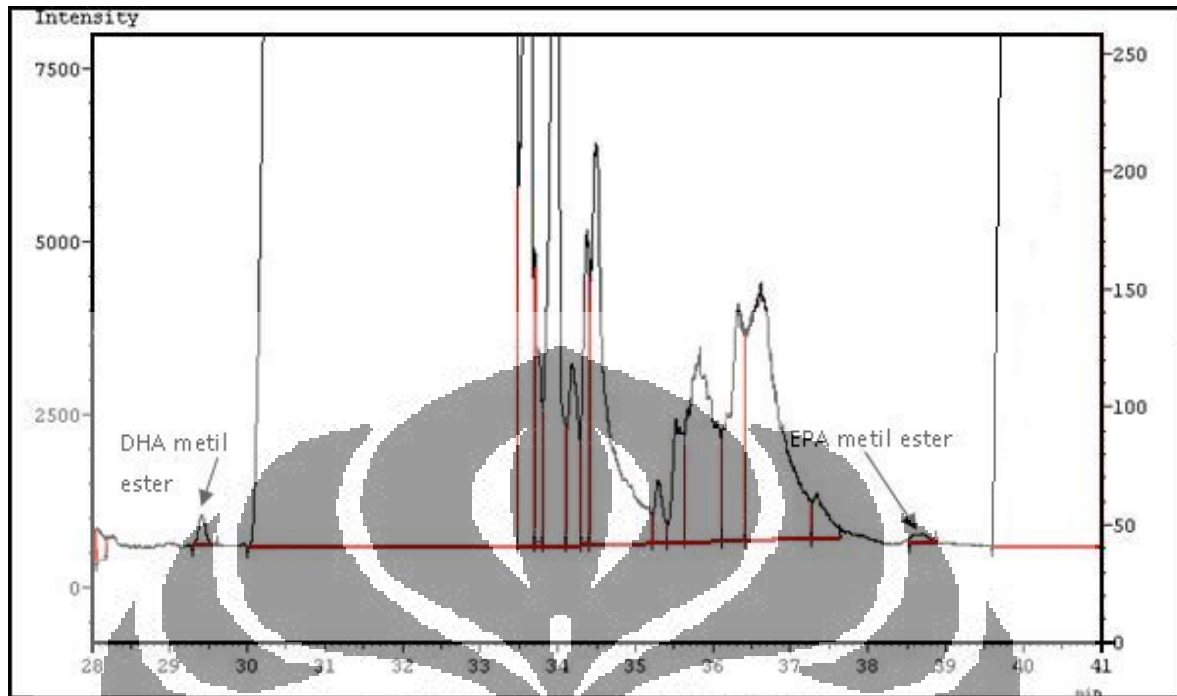


Gambar 8. Kurva kalibrasi baku EPA metil ester

Keterangan :

Persamaan kurva kalibrasi baku EPA metil ester : $y=0,8440x + 3,9986$

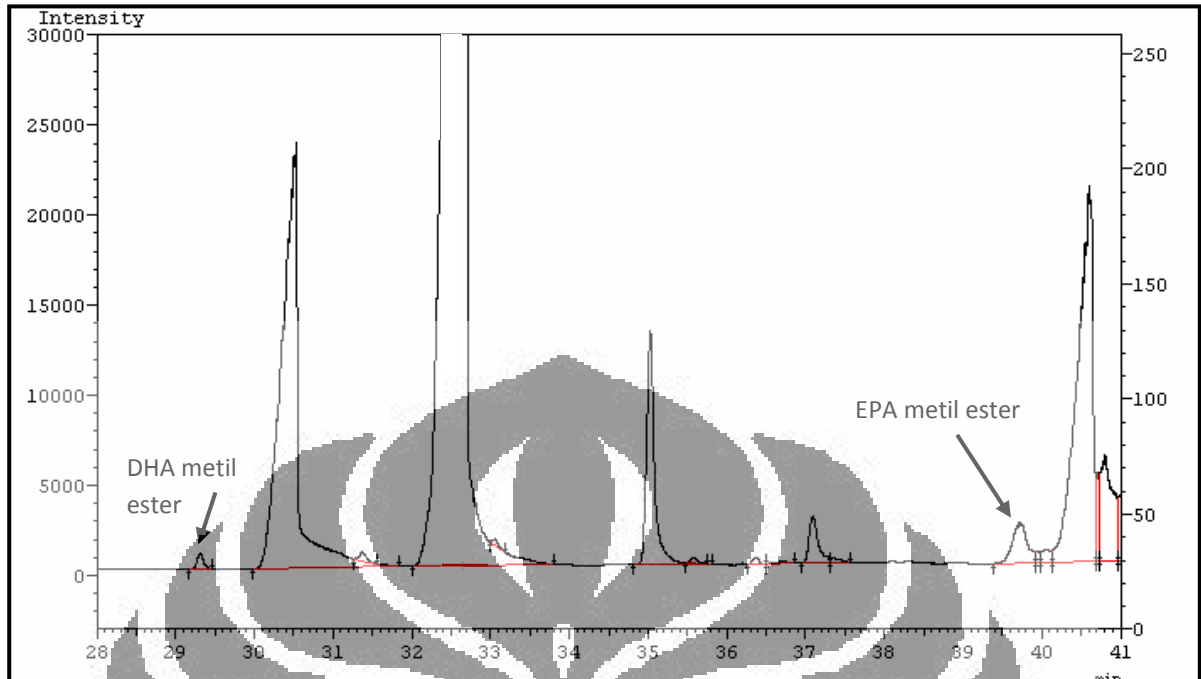
Dengan koefisien korelasi $r=0,9988$



Gambar 9. Kromatogram sampel A

Kondisi analisis :

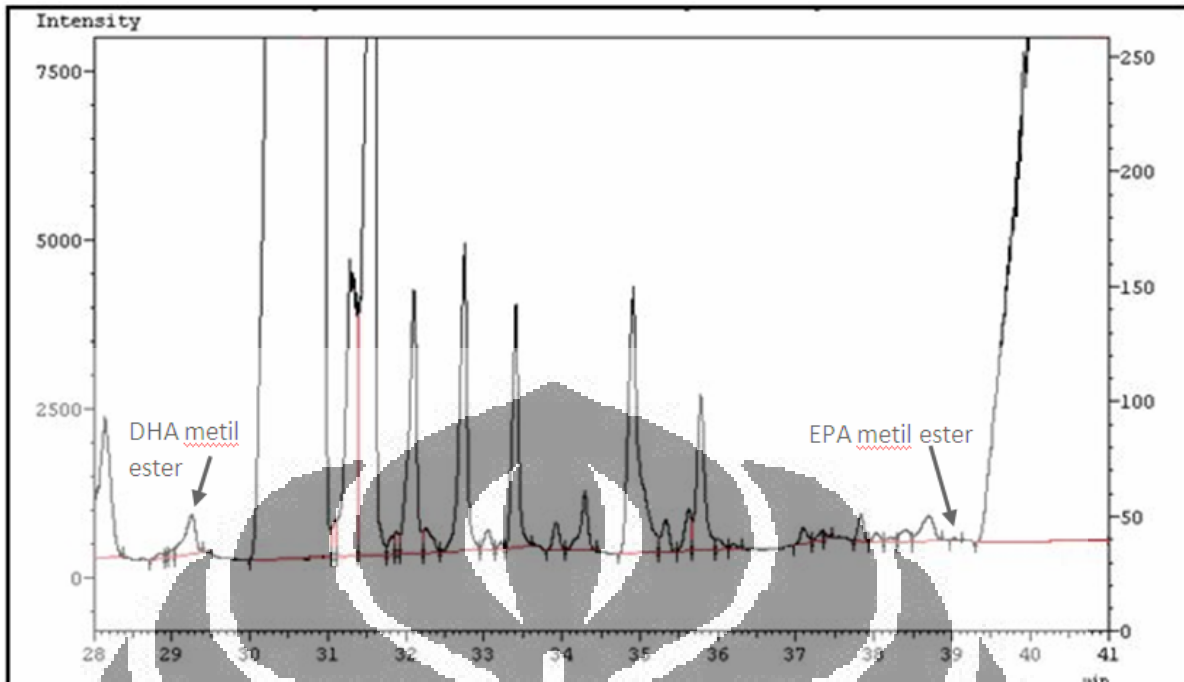
Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $1,35$ ml/menit.



Gambar 10. Kromatogram sampel B

Kondisi analisis :

Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $1,35$ ml/menit.



Gambar 11. Kromatogram sampel C

Kondisi analisis :

Pemrograman suhu dengan suhu awal kolom 120°C dan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu 230°C yang dipertahankan selama 100 menit, suhu injektor 230°C , dan suhu detektor 250°C dengan kecepatan alir gas $1,35$ ml/menit.



Gambar 11. Alat kromatografi gas Shimadzu 17 A

Keterangan :

A = Unit utama

B = Data processor class GC solution



Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan garis linear

$$y = a + bx$$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Derajat kelinieran dihitung dengan rumus :

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{\{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]\}}}$$

Lampiran 2

Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantisasi

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{(n-2)}}$$

$$\text{Batas deteksi} = \frac{3S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantisasi} = \frac{10S(y/x)}{b}$$

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi DHA : $y = 0,9909x + 86,9990$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{59234,1581}{(6-2)}}$$

$$= 121,6903$$

$$\text{Batas deteksi DHA} = \frac{3 \times 121,6903}{0,9909} = 368,4237 \text{ ppm}$$

$$\text{Batas kuantisasi DHA} = \frac{10 \times 121,6903}{0,9909} = 1228,0785 \text{ ppm}$$

Lampiran 3

Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

$$\text{Rata-rata} = \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Simpangan baku : SB} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Koefisien variasi : KV} = \frac{SB}{\bar{x}} \times 100\%$$

Contoh :

Hasil pengukuran baku DHA untuk data presisi :

Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) = 2461,23 ppm

$$\begin{aligned} \text{SB} &= \sqrt{\frac{(2525,8333 - 2482)^2 + (2525,8333 - 2518)^2 + \dots + (2525,8333 - 2539)^2}{6-1}} \\ &= 27,2941 \end{aligned}$$

$$\text{KV} = \frac{27,2941}{2525,8333} \times 100\% = 1,08\%$$

Lampiran 4

Cara perhitungan uji perolehan kembali

A. Uji perolehan kembali DHA

Persamaan kurva kalibrasi DHA :

$$y = 0,9909x + 86,9990$$

y = luas puncak DHA

x = konsentrasi DHA

Konsentrasi DHA yang ditambahkan = 2641,14 ppm

Konsentrasi DHA yang diinjekkan = 2641,14 ppm

Luas puncak DHA larutan upk = 4397 → x = 4349,58 ppm

Luas puncak DHA larutan sampel = 2176 → x = 2108,18 ppm

Persen perolehan kembali :

$$\%upk = \frac{(4349,58 - 2108,18) \text{ ppm}}{2641,14 \text{ ppm}} \times 100\%$$

$$\%upk = 84,86\%$$

B. Uji perolehan kembali EPA :

Persamaan kurva kalibrasi EPA :

$$y = 0,8440x + 3,9986$$

y = luas puncak EPA

x = konsentrasi EPA

Konsentrasi EPA yang ditambahkan = 744,029 ppm

Konsentrasi EPA yang diinjeksikan = 744,029 ppm

Luas puncak EPA larutan upk = 3792 → x = 4488,15 ppm

Luas puncak EPA larutan sampel = 3168 → x = 3748,82 ppm

Persen perolehan kembali :

$$\%upk = \frac{(4488,15 - 3748,82) \text{ ppm}}{744,029 \text{ ppm}} \times 100\%$$

$$\%upk = 99,37\%$$

Lampiran 5

Cara perhitungan kadar sampel

A. Perhitungan kadar DHA dalam sampel

Metode Normalisasi :

$$\frac{\text{Luas Puncak DHA Metil Ester}}{\text{Luas Puncak Seluruh Asam Lemak}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar metil laurat dalam sampel} = \frac{622}{8802099} \times 100\% = 0,0071\% \frac{b}{b}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar asam laurat dalam sampel} &= \frac{\text{BMDHA}}{\text{BMDHA Metil Ester}} \times \text{kadar DHA Metil Ester} \\ &= \frac{328,50}{342,52} \times 0,0071\% = 0,0068\% \frac{b}{b} \end{aligned}$$

B. Perhitungan kadar EPA dalam sampel

Metode Normalisasi :

$$\frac{\text{Luas Puncak EPA Metil Ester}}{\text{Luas Puncak Seluruh Asam Lemak}} \times 100\%$$

$$\text{Kadar metil laurat dalam sampel} = \frac{181}{9725255} \times 100\% = 0,0019\% \text{ } b/b$$

$$\text{Kadar asam laurat dalam sampel} = \frac{\text{BMEPA}}{\text{BMEPA Metil Ester}} \times \text{kadar EPA Metil Ester}$$


$$= \frac{302,45}{316,47} \times 0,0019\% = 0,0018\% \text{ } b/b$$

Lampiran 6

Sertifikat Analisis Standar DHA dan EPA

CERTIFICATE OF ANALYSIS

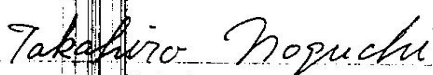
Feb. 19, 2007


タマ生化学株式会社
 TAMA BIOCHEMICAL CO., LTD.
 1-23-3, Nishishinjuku, Shinjuku-ku,
 Tokyo, 163-0023, Japan

DHA27 (DOCOSAHEXAENOIC ACID 27%)

Lot Number: 611151

Tests	Specifications	Results
Description	Clear, pale yellow oil	Good
Acid Value	Not more than 1.0	0.1
Peroxide Value	Not more than 5.0 meq/kg	0.2
Heavy Metals	Not more than 10 μ g/g	Within Limit
Arsenic	Not more than 1 μ g/g	Within Limit
Gardner Color No.	Not more than 5	3
Docosahexaenoic Acid	Not less than 27.0 %	27.5 %
Eicosapentaenoic Acid	Not less than 5.0 %	7.7 %
Total Tocopherols	Not less than 0.3 %	0.3 %
Aerobic Plate Count	Not more than 300/g	Within Limit
Coliforms	Negative	Negative
Evaluation		Passed


 Takahiro Noguchi
 Manager of Quality Control Div. of ISEHARA Plant