

UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE MODIFIKASI METILASI MINYAK
NABATI UNTUK PENENTUAN KANDUNGAN ASAM LEMAK
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

SKRIPSI

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
sarjana sains**

**RIRY WIRASNITA
0606069281**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI S1 KIMIA REGULER
DEPOK
JULI 2010**

i

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Riry Wirasnita

NPM : 0606069281

Tanda Tangan :

Tanggal : Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Riry Wirasnita
NPM : 0606069281
Program Studi : S1 Reguler
Judul Skripsi : Validasi Metode Modifikasi Metilasi Minyak Nabati untuk Penentuan Kandungan Asam Lemak Secara Kromatografi Gas.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Kimia Reguler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS ()
Pembimbing II : Yus Maria Novelina M.Si ()
Penguji : Dr. Endang Saepudin ()
Penguji : Dr. Budiawan ()
Penguji : Dr. Sunardi M.Si ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2010

KATA PENGANTAR/ UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirrabbi'l'amin, Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Validasi Metode Modifikasi Metilasi Minyak Nabati untuk Penentuan Kandungan Asam Lemak Secara Kromatografi Gas”. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Science Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang setulusnya kepada:

- (1) Prof. Dr. Sumi Hudiyono PWS dan Ibu Yus Maria Novelina M.Si, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- (2) Bapak Ir. Yang Yang Setiawan, M.Sc Kepala Balai Besar Industri Agro Bogor yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian di BBIA;
- (3) Bpk. Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI dan Ibu Dra. Tresye Utari, M.Si. selaku koordinator penelitian sekaligus pembimbing akademis penulis yang telah memberikan kesempatan penulis melakukan penelitian
- (4) Dosen-dosen Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia yang telah mengajarkan banyak hal pada penulis.
- (5) Ayahanda dan ibunda yang sangat penulis sayangi terimakasih atas segenap cinta, dukungan baik material maupun moral serta doa yang selalu diberikan; serta kakak dan adik penulis (Windra dan Ilham) yang senantiasa mengadirkan keceriaan dalam hidup penulis.
- (6) Ibu Dini, ibu Neneng, pak Agus, pak Wawan, mba Frita dan seluruh staf

Laboratorium Instrumen yang telah membantu penulis selama di BBIA

- (7) Sopianita Lestari, Sahabat sekaligus teman sekamar penulis terimakasih atas masukan, hiburan, dan semangat, yang selalu diberikan. Vania R, teman satu kos yang telah banyak membantu penulis serta sahabatku Atyka dan Diana, yang telah memberikan info-info selama penelitian ini.
- (8) Kak astri atas info, cerita dan masukannya, Nanik dan Britsanti teman sesama bimbingan, Wiwit yang telah membantu penulis mencari jurnal.
- (9) Terimakasih kepada Rio atas kerjasamanya, Genny, Dina, Mega, Alex, Nurul, yang telah menemani penulis selama penelitian di BBIA, tanpa kalian mungkin penulis akan kesepian disana.
- (10) Teman-teman kimia angkatan 2006 baik yang sama-sama berjuang menulis skripsi maupun yang akan menyusul
- (11) Changmin, Jonghyun, Hyungjun, Taecyon dan Eli yang telah menghibur penulis, serta dbsk, shinee, 2pm, ukiss, double S, cnblue, dan suju.
- (12) Kakak-kakak dan adik-adik kelas penulis angkatan 2005, 2007,2008 dan 2009
- (13) Serta semua pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak terdapat kekurangan. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak. Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riry Wirasnita
NPM : 0606069281
Program Studi : S1 Reguler
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
Validasi Metode Modifikasi Metilasi Minyak Nabati untuk Penentuan Kandungan Asam Lemak secara Kromatografi Gas

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : Juli 2010
Yang menyatakan

(.....)

ABSTRAK

Nama : Riry Wirasnita
Program Studi : Kimia
Judul : Validasi Metode Modifikasi Metilasi Minyak Nabati untuk Penentuan Kandungan Asam Lemak secara Kromatografi Gas

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi metode analisis asam lemak standar AOAC internasional serta validasi metode agar metode tersebut dapat diaplikasikan dalam laboratorium. Metode analisis ini melibatkan pemanasan minyak yang telah ditambahkan NaOH-metanol dan katalis BF_3 dilanjutkan dengan ekstraksi, penguapan pelarut dan analisis dengan kromatografi gas. Dari hasil penelitian diketahui bahwa penambahan katalis BF_3 dalam metanol sebelum pemanasan dan dengan mempercepat waktu metilasi asam lemak dengan terlebih dahulu menaikkan suhu tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap kadar asam lemak yang diperoleh. Berdasarkan hasil validasi metode diperoleh kurva kalibrasi asam lemak yang cukup linier dengan R^2 0,999. Sensitifitas alat kromatografi gas yang mampu menganalisis asam lemak hingga beberapa ppm saja, presisi yang cukup baik dengan %RSD antara 1,45%-19,46% serta hasil yang cukup akurat dengan % recovery sebesar 99,14% pada range 80,01% - 113,26 %

Kata Kunci : Lemak, Asam lemak, metilasi, validasi metode.
xiii+75 halaman ; 18 gambar; 12 tabel
Daftar Pustaka : 29 (1954-2010)

ABSTRACT

Name : Riry Wirasnita
Program Study : Chemistry
Title : Validation Metilation Modified Method for Determine Fatty Acid Content by Gas Chromatography

This study has been conducted modification of fatty acid analysis method from standard methods AOAC and has been carried out validation of this modified method so this method can be applied in the laboratory. This analysis method involves reflux of oil that has been mixed NaOH-methanol and BF₃ catalyst followed by extraction, solvent evaporation and analysis by gas chromatography. From the results we know by adding BF₃ catalyst in methanol prior to heating and accelerate the time of methylation process of fatty acids by first raising the temperature did not give significant influence on fatty acid content. Based on the validation method results we obtained a quite linear calibration curve of fatty acids with R² in range 0.997-0.999. Sensitivity of gas chromatography instrument which able to analyze some fatty acids up to a few ppm only, good enough precision with % RSD between 1.45% -19.46% and the results are quite accurate with the% recovery 99.14% in the range 80.01% -113 , 26%

Key Words : fat, fatty acid, methylation, validation method.
xiii+75 pages ; 18 pictures; 12 tables
Bibliography : 29 (1954-2010)

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL ... | i |
| PERNYATAAN ORISINALITAS..... | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN ... | iii |
| KATA PENGANTAR..... | iv |
| LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH | vi |
| ABSTRAK | vii |
| ABSTRACT..... | vii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| | |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 3 |
| | |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Lemak dan Minyak..... | 4 |
| 2.2 Sumber Lemak dan Minyak | 6 |
| 2.3 Asam Lemak..... | 8 |
| 2.3.1 Asam Lemak Jenuh..... | 8 |
| 2.3.2 Asam Tak Jenuh..... | 10 |
| 2.4. Minyak Jagung | 12 |
| 2.4.1 Klasifikasi Minyak Jagung | 13 |
| 2.4.2 Manfaat Minyak Jagung | 13 |
| 2.4.3 Komposisi Minyak Jangun | 14 |
| 2.5. Kromatografi gas..... | 14 |
| 2.5.1 Prinsip Kromatografi Gas..... | 15 |
| 2.5.2 Keunggulan Kromatografi Gas..... | 16 |
| 2.5.3 Tehnik Pemisahan..... | 17 |
| 2.5.4 Instrumentasi Kromatografi gas..... | 18 |
| 2.6 Derivatisasi asam lemak..... | 20 |
| 2.7 Validasi Metode Pengujian..... | 22 |
| 2.7.1 Manfaat Validasi Metoda..... | 22 |
| 2.7.2 Kapan Metode Harus Divalidasi..... | 23 |
| 2.7.3 Parameter Validasi Metode..... | 24 |
| 2.7.3.1 akurasi..... | 24 |
| 2.7.3.2 Presisi..... | 25 |
| 2.7.3.3 Linieritas..... | 26 |
| 2.7.3.4. Batas Deteksi Dan Batas Kuantitasi..... | 27 |

| | |
|--|----|
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 28 |
| 3.1 Alat dan Bahan..... | 28 |
| 3.1.1. Alat..... | 28 |
| 3.1.2 Bahan..... | 29 |
| 3.2 Prosedur kerja..... | 29 |
| 3.2.1 Penyiapan larutan | 29 |
| 3.2.2 Preparasi metil ester..... | 30 |
| 3.2.2.1 Metode Standar (AOAC 969.33) | 30 |
| 3.2.2.2 Metode Modifikasi | 31 |
| 3.2.3 Analisis dengan Kromatografi gas..... | 31 |
| 3.2.4 Validasi Metode Analisis..... | 33 |
| 3.2.4.1 Linieritas Larutan Standar..... | 33 |
| 3.2.4.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi | 33 |
| 3.2.4.3 Uji presisi..... | 34 |
| 3.2.4.4 Uji akurasi..... | 34 |
| 3.3 Bagan kerja..... | 35 |
| 3.3.1 Metode Preparasi Standar AOAC | 35 |
| 3.2.2 Metode modifikasi..... | 36 |
| BAB 4. HASIL PEMBAHASAN..... | 37 |
| 4.1 Preparasi Metil Ester Asam Lemak..... | 37 |
| 4.2 Analisis dengan Kromatografi Gas..... | 42 |
| 4.2.1 Analisa Kualitatif..... | 42 |
| 4.2.2 analisa Kuantitatif..... | 43 |
| 4.3 Uji perbedaan..... | 43 |
| 4.4 Validasi metode analisis..... | 44 |
| 4.4.1 Uji Linieritas | 44 |
| 4.4.2 Limit deteksi..... | 46 |
| 4.4.3 Limit kuantitasi..... | 47 |
| 4.4.5 Uji presisi..... | 47 |
| 4.4.6 Uji akurasi..... | 49 |
| 4.5 Aplikasi Pada Minyak Nabati Lain..... | 51 |
| 4.5.1 Minyak Kelapa Sawit..... | 51 |
| 4.5.2 Minyak Kelapa | 52 |
| 4.5.3 Minyak Zaitun..... | 53 |
| BAB 5. PENUTUP..... | 55 |
| 5.1 Kesimpulan | 55 |
| 5.2 Saran..... | 55 |
| DAFTAR PUSTAKA | 56 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|---|----|
| Gambar 2.1. | Asam Lemak Jenuh (Asam Palmitat & Asam Stearat) | 9 |
| Gambar 2.2 | Asam Lemak Tak Jenuh (Asam Oleat)..... | 10 |
| Gambar 2.3 | Bagan Kromatografi Gas | 18 |
| Gambar 2.4 | Perbedaan akurasi dan presisi..... | 26 |
| Gambar 3.1 | Skema Preparasi Asam Lemak Metil Ester dengan Metode Standar AOAC 969.33..... | 35 |
| Gambar 3.2 | Skema Preparasi Asam Lemak Metil Ester dengan Metode yang dimodifikasi | 36 |
| Gambar 4.1. | Ekstraksi Campuran | 38 |
| Gambar 4.2. | Kromatogram-kromatogram hasil uji coba modifikasi metode..... | 40 |
| Gambar 4.3 | Larutan Asam Lemak Metil Ester..... | 42 |
| Gambar 4.4 | Kurva Linieritas asam Lemak..... | 45 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|------------|---|----|
| Tabel 2.1. | Jenis-Jenis Asam Lemak Jenuh | 9 |
| Tabel 2.2 | Jenis-Jenis Asam Lemak Tak Jenuh..... | 11 |
| Tabel 2.3 | Komposisi Asam Lemak Minyak Jagung | 14 |
| Table 3.1 | Penimbangan Sampel, Labu, Penambahan Reagen..... | 30 |
| Tabel 3.2 | Program Temperatur pada Kolom Kromatografi Gas..... | 32 |
| Tabel 4.1 | Persamaan Garis Dan Koefisien Korelasi..... | 46 |
| Tabel 4.2 | Data Uji Presisi Asam Lemak..... | 48 |
| Tabel 4.3 | Persen Recoveri Asam Linolenat..... | 51 |
| Tabel 4.4 | Kadar Rata-Rata Asam Lemak Minyak Kelapa Sawit..... | 52 |
| Tabel 4.5 | Kadar Rata-Rata Asam Lemak Minyak Kelapa Sawit..... | 53 |
| Tabel 4.6 | Kadar Rata-Rata Asam Lemak Minyak Zaitun | 54 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|--------------|---|----|
| Lampiran 1. | Perhitungan LOD dan LOQ..... | 61 |
| Lampiran 2. | Komposisi Asam Larutan Standar Lemak Metil Ester..... | 64 |
| Lampiran 3. | Komposisi Asam Lemak Minyak Jagung dengan Metode Standar..... | 64 |
| Lampiran 4. | Komposisi Asam Lemak Minyak Jagung dengan Metode Modifikasi..... | 64 |
| Lampiran 5. | Perhitungan kadar asam lemak..... | 65 |
| Lampiran 6. | Kromatogram larutan blangko..... | 65 |
| Lampiran 7. | Kromatogram Larutan Standar Asam lemak..... | 65 |
| Lampiran 8. | Kromatogram uji linieritas..... | 66 |
| Lampiran 9. | Data uji presisi..... | 68 |
| Lampiran 10. | Kromatogram uji presisi..... | 69 |
| Lampiran 11 | Data uji akurasi..... | 71 |
| Lampiran 12 | Perhitungan uji akurasi..... | 71 |
| Lampiran 13. | Kromatogram uji akurasi dengan penambahan spike asam linolenat..... | 72 |
| Lampiran 14. | Perhitungan Uji perbedaan dengan t-test..... | 74 |
| Lampiran 15. | Kadar Asam Lemak Minyak Kelapa Sawit..... | 75 |
| Lampiran 16. | Kadar Asam Lemak Minyak Kelapa | 75 |
| Lampiran 17. | Kadar Asam Lemak Minyak Zaitun..... | 75 |
| Lampiran 18. | Kromatogram Minyak Kelapa Sawit..... | 76 |
| Lampiran 19. | Kromatogram Minyak Kelapa..... | 77 |
| Lampiran 20. | Kromatogram Minyak Zaitun..... | 78 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Minyak dan lemak merupakan salah satu jenis komponen bahan makanan yang banyak dibutuhkan. Hal ini disebabkan karena keuntungannya yang telah dirasakan oleh segenap lapisan masyarakat, yaitu untuk meningkatkan cita rasa, memperbaiki tekstur, dan sebagai sumber energi. Didalam makanan lemak memberikan rasa gurih, memberi kualitas renyah terutama pada makanan yang digoreng, memberi kandungan kalori tinggi dan memberikan sifat empuk pada kue yang dimasak. Didalam tubuh lemak berfungsi sebagai cadangan energi dalam bentuk jaringan lemak. Jaringan lemak juga berfungsi sebagai bantalan organ-organ tubuh tertentu (Sediaoetama, 2000).

Secara kimiawi lemak adalah trigliserida yang merupakan bagian terbesar dari kelompok lipida. Trigliserida merupakan senyawa hasil kondensasi satu molekul gliserol dengan tiga molekul asam lemak. Asam lemak penyusun trigliserida terdiri dari berbagai macam asam lemak dengan komposisi yang berbeda-beda. Komposisi asam lemak dalam berbagai macam minyak dan lemak mempunyai pengaruh yang nyata pada nilai nutrisi dan sifat fisika-kimia minyak tersebut. Komposisi asam lemak dalam suatu minyak atau lemak dapat diketahui dengan cara melakukan analisis terhadap minyak tersebut.

Umumnya analisis asam lemak menggunakan kromatografi gas tidak dilakukan langsung dari asam lemak hasil hidrolisis trigliseridanya, tetapi dianalisis dalam bentuk derivatnya yaitu asam lemak metil ester. Banyak metode penyiapan asam lemak metil ester salah satunya adalah metode yang telah dipublikasikan oleh berbagai publikasi seperti AOCS (American Oil Chemists Society, 2000), AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2005), dan IUPAC (International Union Of Pure and Applied Chemistry).

Salah satu jenis pengujian yang saat ini banyak dibutuhkan industri adalah pengujian terhadap 9 komponen asam lemak utama. Oleh karena itu penelitian ini

lebih memfokuskan analisis terhadap asam lemak utama yang terdiri atas asam kaprilat, asam kaprat, asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat. Hal ini disebabkan karena dengan meningkatnya teknologi industri pangan maka banyak industri yang berlomba-lomba untuk menyediakan nutrisi yang komprehensif dan info yang mendetail tentang jumlah asam lemak jenuh, monoena dan polienu selain itu asam lemak utama merupakan asam lemak yang paling banyak dibutuhkan tubuh dan banyak terkandung dalam berbagai minyak, baik minyak nabati maupun hewani.

Seiring dengan berkembangnya industri di Indonesia khususnya industri pangan maka semakin banyak pula permintaan pengujian asam lemak dalam berbagai minyak. Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode pengujian yang lebih cepat, simpel dan efisien namun tanpa mengorbankan ketepatan hasil. Dengan mempertimbangkan tingkat kesulitan dan fasilitas laboratorium dalam hal ini akan dilakukan modifikasi dan validasi metode terhadap analisis asam lemak menggunakan kromatografi gas. Metode yang divalidasi adalah metode modifikasi dari metode standar AOAC 969.33 yang dipublikasikan baik secara internasional maupun nasional.

Suatu metode uji yang akan digunakan sebagai metode analisis harus mempunyai keterandalan fungsi, artinya unjuk kerja metode analisis baik dan dapat dipertahankan terus. Apabila unjuk kerja metode analisis kurang baik dimana terdapat keragaman analisis yang cukup tinggi maka hanya akan membuat kita bertanya-tanya mengenai hasil analisis dan menimbulkan kecacauan interpretasi. Hal ini juga berlaku dalam analisis asam lemak dengan menggunakan kromatografi gas.

Setiap pengukuran kemungkinan dapat memberikan hasil pengukuran yang bervariasi untuk menduga ketidakpastian ini maka perlu diketahui variabilitas yang terjadi apabila pengukuran dilakukan secara berulang-ulang. Berdasarkan hal tersebut maka cara yang dapat ditempuh dalam meningkatkan kepercayaan hasil analisis adalah dengan validasi metode analisis.

Pada dasarnya suatu metode pengujian perlu divalidasi dahulu sebelum metode tersebut digunakan menjadi metode analisis rutin laboratorium dan suatu

metode dapat dipertanggungjawabkan keabsahannya apabila telah memenuhi beberapa parameter-parameter pengujian tertentu. Namun dengan melihat keterbatasan alat, bahan serta kondisi lainnya terkadang validasi metode tidak selalu dapat diikuti secara keseluruhan ataupun sama seperti yang ada dalam prosedur. Kemudian setelah dilakukan unjuk kerja terhadap metode yang telah melalui pengembangan barulah metode tersebut dapat digunakan untuk analisis rutin dalam laboratorium.

1.2. Perumusan masalah

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi metode analisis asam lemak standar AOAC berdasarkan reaksi esterifikasi minyak dengan menggunakan pereaksi NaOH 0,5 N dan BF₃-methanol 12,5 %. Analisis asam lemak dilakukan dengan kromatografi gas untuk mengetahui kandungan asam lemak dan persen kadar asam lemak dihitung dengan metode normalisasi. Kemudian dilakukan validasi metode terhadap metode modifikasi tersebut.

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini ialah:

- Penentuan asam lemak utama (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3) pada minyak nabati secara kromatografi gas
- Studi modifikasi metode uji asam lemak standar AOAC 969.33.
- Memvalidasi metode.

1.4. Manfaat penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi yang cukup tentang metode analisis asam lemak serta metode ini dapat diterapkan setelah tervalidasi untuk analisis rutin dilaboratorium Balai Besar Industri Agro Bogor.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Lemak dan Minyak

Lipid atau yang lebih dikenal dengan lemak dan minyak merupakan salah satu konstituen yang banyak digunakan untuk kebutuhan pangan dan non pangan. Lemak dan minyak merupakan zat makanan yang penting untuk menjaga kesehatan tubuh manusia. Selain itu lemak dan minyak juga merupakan sumber energi yang lebih efektif dibanding dengan karbohidrat dan protein. satu gram lemak yang dioksidasi secara sempurna dalam tubuh menghasilkan 9,3 kalori lemak per 1 gram lemak sedangkan protein dan karbohidrat masing-masing menghasilkan 4,1 dan 4,2 kalori per gram (Linder,1985).

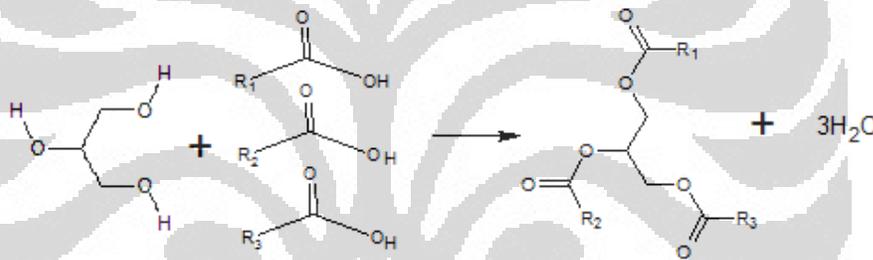
Lemak adalah sekelompok ikatan organik yang terdiri atas unsur karbon, hydrogen dan oksigen yang mempunyai sifat larut dalam pelarut organik nonpolar, seperti petroleum eter, Kloroform, atau benzene tetapi tidak larut dalam air. Lemak dan minyak dapat larut dalam pelarut yang disebutkan di atas karena mempunyai polaritas yang sama dengan pelarut tersebut. Minyak atau lemak, khususnya minyak nabati, mengandung asam- asam lemak esensial seperti asam linoleat, linolenat, dan arakidonat yang dapat mencegah penyempitan pembuluh darah akibat penumpukan kolestrol. Minyak dan lemak juga berfungsi sebagai sumber dan pelarut bagi vitamin-vitamin A, D, E, dan K (Kertaren,1986).

Istilah minyak atau lemak sebenarnya tergantung apakah pada suhu kamar bahan tersebut berada dalam keadaan cair atau padat. Bila pada suhu kamar dalam keadaan cair, maka disebut minyak, sebaliknya bila dalam keadaan padat disebut lemak. Hal ini disebabkan karena lemak tersusun atas relatif banyak asam lemak jenuh. Sedangkan minyak relatif lebih banyak asam lemak monoena dan poliena.

Secara umum lipid dapat dikelompokkan menjadi dua bagian besar, yaitu lipid tidak tersabunkan dan lipid tersabunkan. Lipid tidak tersabunkan adalah lipid yang tidak dapat bereaksi dengan KOH, sedangkan lipid tersabunkan adalah lipid yang dapat bereaksi dengan KOH membentuk garam asam lemak (RCOOK), yang

dikenal dengan sabun. Lipid tersabunkan adalah kelompok lipid turunan asam lemak terutama dari kelompok gliseridik seperti trigliserida, asam lemak bebas, dan fosfolipid. Sedangkan lipid tidak tersabunkan adalah lipid non-gliseridik seperti hidrokarbon dan sterol. Lipid juga sering dikelompokkan sebagai lipid netral dan lipid polar. Contoh lipid netral adalah gliserol, hidrokarbon, ester kolesterol dan karoten. Sedangkan yang termasuk lipid polar adalah fosfolipid dan asam karboksilat (Hudiyono,2005).

Minyak dan lemak merupakan senyawaan trigliserida yang berarti 'triestere dari gliserol. Dalam pembentukannya, trigliserida merupakan hasil proses kondensasi satu molekul gliserol dan tiga molekul asam lemak (umumnya ketiga asam lemak tersebut berbeda-beda), yang membentuk satu molekul trigliserida dan satu molekul air.



Bila $R_1 = R_2 = R_3$, maka trigliserida yang terbentuk disebut trigliserida sederhana sedangkan bila R_1 , R_2 , dan R_3 berbeda maka disebut trigliserida campuran. Trigliserida sederhana jarang ditemukan di alam, kebanyakan trigliserida alami adalah trigliserida campuran. Lemak hewan dan minyak nabati merupakan campuran beberapa trigliserida.

Trigliserida yang kaya akan asam lemak tak jenuh, seperti oleat dan linoleat biasanya berwujud minyak sedangkan trigliserida yang kaya akan asam lemak jenuh seperti asam stearat dan palmitat biasanya adalah lemak. Asam lemak merupakan monomer dari trigliserida karena semua jenis lemak tersusun oleh asam-asam lemak yang terikat oleh gliserol. Akibatnya sifat dari lemak tergantung dari jenis asam lemak penyusunnya. Trigliserida merupakan penyusun utama lemak hewan dan nabati.

2.2. Sumber Lemak dan Minyak

Minyak dan lemak dapat diklasifikasikan berdasarkan sumbernya, sebagai berikut: (Hudiyono,2005).

1. Bersumber dari tanaman

- a. Biji-bijian palawija: minyak jagung, biji kapas, kacang, wijen, kedelai, bunga matahari.
- b. Kulit buah tanaman tahunan: minyak zaitun dan kelapa sawit.
- c. Biji-bijian dari tanaman tahunan: kelapa, coklat, inti sawit, dan sejenisnya.

2. Bersumber dari hewani

- a. Susu hewan peliharaan: lemak susu, dan sebagainya.
- b. Daging hewan peliharaan: lemak sapi, lemak babi, dan sebagainya.
- c. Hasil laut: minyak ikan sardin, minyak udang, dan sebagainya.

Minyak/ lemak nabati juga diklasifikasikan berdasarkan sifat fisiknya:

1. Lemak (berwujud padat): lemak biji coklat, inti sawit, tengkawang, dan sebagainya.
2. Minyak (berwujud cair)
 - a. Tidak mengering (*non drying oil*): minyak zaitun, kelapa, kacang tanah, almond, inti alpukat, inti plum, dan sebagainya.
 - b. Setengah mengering (*semi drying oil*): minyak dari biji kapas, kapok, jagung, gandum, biji bunga matahari, dan sebagainya.
 - c. Mengering (*drying oil*): minyak kacang kedelai, *walnut*, biji karet, dan sebagainya.

Jenis minyak mengering (*drying oil*) adalah minyak yang mempunyai sifat dapat mengering jika teroksidasi, dan akan berubah menjadi lapisan tebal, bersifat kental dan membentuk sejenis selaput jika dibiarkan di udara terbuka. Istilah minyak setengah mengering berupa minyak yang mempunyai daya mengering lebih lambat.

Klasifikasi lemak hewani berdasarkan sifat fisiknya, yaitu:

1. Lemak (berwujud padat)
 - a. Lemak susu (*butter fat*): lemak dari susu sapi, kerbau, kambing, dan domba.
 - b. Hewan peliharaan (golongan mamalia): lemak babi, lemak tulang, lemak/gemuk wool.
2. Minyak (berwujud cair)
 - a. Hewan peliharaan: minyak *neats foot*.
 - b. Ikan (*fish oil*): minyak ikan paus, salmon, sardin, dan sebagainya.

Lemak hewani mengandung banyak sterol yang disebut kolestrol, sedangkan lemak nabati mengandung fitosterol dan lebih banyak mengandung asam lemak tak jenuh sehingga umumnya berbentuk cair.

2.3 Asam Lemak

Asam lemak adalah asam karboksilat dengan jumlah atom karbon tertentu. Biasanya asam lemak mempunyai jumlah atom karbon genap dari 2–30 atau lebih, dan mempunyai satu gugus karboksil. Bagian alkil dari asam lemak bersifat nonpolar, sedangkan gugus karboksil bersifat polar. Asam lemak alamiah kebanyakan tidak memiliki cabang dan mengandung jumlah atom karbon genap dengan rumus umum $C_nH_{2n}O_2$. Asam lemak disintesis dengan penambahan dua unit atom karbon. Asam lemak memiliki panjang rantai dan derajat ketidakjenuhan yang berbeda-beda. Perbedaan panjang rantai dapat dibedakan sebagai berikut: (Nollet, 1996).

Short Chain Fatty Acid (SCFA) : 2-8 atom karbon

Medium Chain Fatty Acid (MCFA) : 10-12 atom karbon

Long Chain Fatty Acid (LCFA) : 14-18 atom karbon

Very Long Chain Fatty Acid (LCFA) : 20 atau lebih atom karbon

Asam lemak dalam minyak atau lemak umumnya terikat dengan molekul lain yaitu gliserol membentuk senyawa trigliserida. Suatu trigliserida dapat berwujud padat dan cair, hal ini tergantung dari komposisi asam lemak penyusunnya. Sebagian besar minyak nabati berbentuk cair karena mengandung asam lemak tak jenuh yaitu asam oleat, linoleat atau asam linolenat yang memiliki titik cair rendah. Lemak hewani pada umumnya berbentuk padat pada suhu kamar karena mengandung asam lemak jenuh, misalnya asam palmitat dan stearat yang mempunyai titik cair lebih tinggi (Eckey, 1954).

Asam lemak yang ditemukan di alam merupakan asam lemak monokarboksilat yang berantai lurus dan dengan jumlah atom karbon genap. Asam lemak di alam ada yang jenuh (tidak memiliki ikatan rangkap) seperti asam stearat (C18:0) dan ada yang tidak jenuh (memiliki ikatan rangkap) seperti asam linoleat (C18:2). Untuk mempermudah penulisan, adanya ikatan rangkap pada asam lemak biasa ditulis sebagai berikut, misal asam oleat C18:1 (ω 9) berarti terdapat 18 atom C (karbon) dengan 1 ikatan rangkap yang berada pada atom C nomor 9 (Kertaren, 1986).

Asam lemak dalam tanaman, hewan dan mikroorganisme secara umum mengandung sejumlah atom karbon dalam rantai-rantai lurus dengan gugus karboksil dan ikatan rangkap dalam bentuk cis, karena itu pada ikatan rangkap molekulnya akan bengkok, walaupun ada juga asam lemak tak jenuh dalam bentuk trans. Dalam jaringan sel hewan, panjang rantai karbon asam lemaknya umumnya bervariasi antara 14-22. Asam lemak dari jaringan hewan dapat mempunyai satu sampai enam ikatan rangkap, sedangkan asam lemak dari jaringan ganggang dapat mempunyai sampai lima ikatan rangkap. Tumbuhan tingkat tinggi jarang mempunyai ikatan rangkap lebih dari tiga dan asam lemak dari mikroorganisme hanya mempunyai satu ikatan rangkap.

2.3.1 Asam lemak Jenuh

Asam lemak jenuh merupakan asam lemak yang tidak memiliki ikatan rangkap dan banyak ditemukan baik dalam jaringan hewan maupun tumbuhan. Berikut ini merupakan tabel jenis-jenis asam lemak jenuh beserta sifatnya:

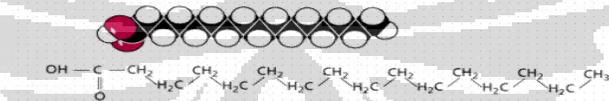
Tabel 2.1. Jenis-Jenis Asam Lemak Jenuh, (Nollet,1996).

| No | Trivial name | Systemic name | Symbol | MW | m.p | b.p |
|----|--------------|---------------|--------|--------|-------|-------|
| 1 | Acetic | Ethanoic | C2:0 | 60,05 | 16,5 | 118,1 |
| 2 | Butyric | Butanoic | C4:0 | 88,11 | -7,9 | 163 |
| 3 | Caproic | Hexanoic | C6:0 | 116,16 | -4 | 205 |
| 4 | Caprylic | Octanoic | C8:0 | 144,2 | 16 | 239 |
| 5 | Capric | Decanoic | C10:0 | 172,27 | 31,3 | 269 |
| 6 | Lauric | Dodecanoic | C12:0 | 200,32 | 43,5 | 225 |
| 7 | Myristic | Tetradecanoic | C14:0 | 228,38 | 54,4 | 250,5 |
| 8 | Palmitic | Hexadecanoic | C16:0 | 256,43 | 62,85 | 268,5 |
| 9 | Margaric | Heptadecanoic | C17:0 | 270,46 | 62 | 227 |
| 10 | Stearic | Octadecanoic | C18:0 | 284,49 | 69,6 | 298 |
| 11 | Arachidic | Eicosanoic | C20:0 | 312,54 | 75,4 | 328 |
| 12 | behenic | Behenic | C22:0 | 340,59 | 80 | 306 |

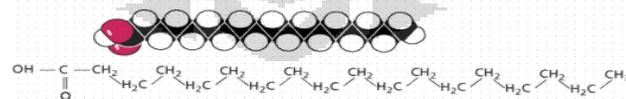
*MW: Molecular Weight ; m.p: melting point in °C ; b.p: boiling point in °C

Contoh asam lemak jenuh:

(a)Palmitic acid



(b)Stearic acid



Gambar 2.1. Asam lemak jenuh (Asam Palmitat & Asam Stearat)

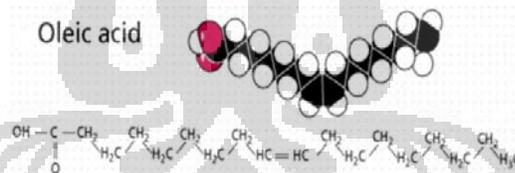
Menurut Mary Enig. PhD (2009) Asam lemak jenuh memainkan peranan penting dalam fungsi kimiawi tubuh yaitu sebagai berikut:

- Asam lemak jenuh memenuhi sedikitnya 50 persen membran sel. Mereka memberikan sel-sel kita integritas dan kekentalan yang diperlukan.

- Mereka memainkan peranan penting terhadap kesehatan tulang. Agar kalsium dapat bersatu dengan struktur tulang kerangka secara efektif, sedikitnya 50 persen lemak makanan seharusnya mengandung lemak jenuh.
- Mereka diperlukan untuk penggunaan asam lemak penting dalam jumlah tepat. Asam lemak omega-3 bertahan lebih lama di dalam jaringan ketika makanan yang masuk kaya akan lemak jenuh.
- Asam stearat (C18:0) dan asam palmitat (C16:0) adalah jenis asam lemak jenuh yang baik bagi jantung, itulah mengapa di sekitar otot jantung kaya akan lemak jenuh. Jantung mengambil cadangan lemak ini saat mengalami depresi.

2.3.2 Asam Lemak Tak Jenuh

Asam lemak tak jenuh merupakan asam lemak yang memiliki ikatan rangkap. Asam lemak tak jenuh terdiri dari Asam Lemak Monoena/ Monounsaturated Fatty Acids (MUFA) dan Asam Lemak Poliena/ Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA), Menurut Christie (2006) asam lemak monoena mempunyai jumlah atom karbon 10 sampai 30 dengan satu ikatan rangkap berkonfigurasi cis. Berikut ini contoh asam lemak tak jenuh dengan satu ikatan rangkap:



Gambar 2.2 Asam Lemak Tak Jenuh (Asam Oleat)

Asam lemak monoena paling banyak ditemukan dalam bentuk cis-9 asam oktadekanoat atau yang lebih dikenal dengan asam oleat. Asam lemak poliena merupakan asam lemak dengan jumlah ikatan rangkap dua atau lebih. Asam linoleat dan asam linolenat merupakan asam lemak poliena yang paling banyak ditemukan dan kedua asam lemak ini merupakan asam lemak esensial. Asam lemak esensial adalah asam lemak yang penting bagi kesehatan tubuh tetapi asam lemak ini tidak dapat disintesis dalam tubuh sehingga diperlukan asupan dari luar (pangan/suplemen). Berikut ini merupakan tabel jenis-jenis asam lemak tak jenuh beserta sifat:

Tabel 2.2. Jenis-Jenis Asam Lemak Tak Jenuh, (Nollet,1996).

| No | Trivial name | Systemic name | Symbol | MW | m.p | b.p |
|----|--------------|---------------------------------|-----------|--------|-------|-----|
| 1 | Myristoleic | 9-tetradecanoic | C14:1 n-5 | 226,36 | - | - |
| 2 | Palmitoleic | 9-heksadecanoic | C16:1 n-7 | 254,42 | 1 | 219 |
| 3 | Oleic | 9-octadecanoic | C18:1 n-9 | 282,47 | 13 | 286 |
| 4 | Linoleic | 9,12-octadecadienoic | C18:2 n-6 | 280,45 | -11 | 230 |
| 5 | Linolenic | 9,12,15-octadecatrienoic | C18:3 n-3 | 278,44 | -11 | 231 |
| 6 | Arachidonic | 5,8,11,14-eicosatetraenoic | C20:4 n-6 | 304,48 | -49,5 | - |
| 7 | Timnodonic | 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic | C20:5 n-3 | 302,46 | - | - |
| 8 | Clupanodonic | 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic | C22:6 n-3 | 328,52 | -78 | 236 |

*MW: molecular weight ; m.p melting point in °C ; b.p boiling point in °C

Sifat dari asam lemak dicerminkan oleh sifat rantai hidrokarbon. Secara alami asam lemak jenuh yang mengandung atom karbon C1-C8 berwujud cair, sedangkan jika lebih besar dari C8 akan berwujud padat. Asam stearat (C18) mempunyai titik cair 69,6 °C, tetapi dengan adanya 1 ikatan rangkap (disebut asam oleat), maka titik cair turun hingga 13°C. Makin banyak jumlah ikatan rangkap pada suatu rantai karbon tertentu, maka titik cairnya semakin rendah.

Asam lemak tak jenuh yang mempunyai dua atau lebih ikatan rangkap disebut Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). Asam lemak PUFA tidak dapat disintesis didalam tubuh padahal ia sangat diperlukan bagi kesehatan, karena itu PUFA merupakan asam lemak esensial yang harus ada dalam makanan. PUFA merupakan zat gizi yang esensial bagi kesehatan kulit dan rambut. Pada binatang percobaan yang menderita defisiensi PUFA timbul gejala kulit sejenis eczema bersisik, tetapi belum pernah dilaporkan terjadi pada manusia. Namun demikian ada sejenis eczema di daerah kulit muka dan kepala pada anak-anak yang dilaporkan dapat disembuhkan dengan pemberian PUFA dalam bentuk minyak (Sediaoetama, 2000).

Lemak hewani pada umumnya mengandung asam lemak jenuh rantai panjang dan sangat miskin akan kadar asam PUFA. akibatnya lemak hewani cenderung meningkatkan kadar kolestrol dalam darah. Minyak jagung dikenal tinggi kandungan akan PUFA-nya sehingga dianjurkan bagi penderita penyakit kardiovaskular, termasuk tekanan darah tinggi (hipertensi). Minyak biji bunga matahari dan minyak safflower dikenal sebagai minyak nabati yang tertinggi kandungan akan PUFA-nya (Sediaoetama, 2000).

Diperkirakan orang dewasa membutuhkan minimal 1%-2% dari kalorinya dalam bentuk asam lemak esensial dan sekitar 12%-14% dari kalori (40% lemak makanan) untuk kesehatan optimum. Di Amerika defisiensi asam lemak esensial jarang karena minyak nabati dan derivatnya banyak dikonsumsi, Defisiensi asam lemak esensial ditandai dengan adanya lesi kulit yang memerah terutama pada pipi dan daerah yang lecet (Linder, 1985).

2.4 Minyak jagung

Tanaman jagung merupakan salah satu jenis tanaman pangan biji-bijian dari keluarga rumput-rumputan. Berasal dari Amerika yang tersebar ke Asia dan Afrika melalui kegiatan bisnis orang-orang Eropa ke Amerika. Sekitar abad ke-16 orang Portugal menyebarkanluaskannya ke Asia termasuk Indonesia. Jagung oleh orang Belanda dinamakannya *maiz* dan orang Inggris menamakannya *corn* (Saenong, 1988).

Minyak jagung diperoleh dengan jalan mengekstrak bagian lembaga. System ekstraksi yang digunakan biasanya system pres (*pressing*) atau kombinasi system press dan pelarut menguap (*solvent extraction*).

Jagung (*Zea mays*) merupakan salah satu tanaman pangan dunia yang terpenting, selain gandum dan padi. Jagung merupakan tanaman semusim, satu siklus hidupnya diselesaikan dalam 80-150 hari. Jagung menjadi sumber karbohidrat utama di beberapa daerah di Indonesia (misalnya di Madura dan Nusa Tenggara). Selain sumber karbohidrat, jagung juga ditanam sebagai pakan ternak, dibuat tepungnya, dan diambil minyaknya.

2.4.1 Klasifikasi Minyak Jagung

Sistematika tanaman jagung adalah sebagai berikut:

Kingdom: *Plantae* (Tumbuhan)

Subkingdom: *Tracheobionta* (Tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi: *Spermatophyta* (Menghasilkan biji)

Divisi: *Magnoliophyta* (Tumbuhan berbunga)

Kelas: *Liliopsida* (berkeping satu / monokotil)

Sub Kelas: *Commelinidae*

Ordo: *Poales*

Famili: *Poaceae* (suku rumput-rumputan)

Genus: *Zea*

Spesies: *Zea mays L.*

2.4.2 Manfaat Minyak Jagung

Tanaman jagung sangat bermanfaat bagi kehidupan manusia dan hewan. Di Indonesia, jagung merupakan komoditi tanaman pangan kedua terpenting setelah padi. Berdasarkan urutan bahan makanan pokok di dunia, jagung menduduki urutan ke 3 setelah gandum dan padi. Di daerah Madura, jagung banyak dimanfaatkan sebagai makanan pokok (Saenong,1988).

Minyak jagung kaya akan kalori yaitu sekitar 250 kalori per ons. Minyak jagung merupakan minyak goreng yang stabil (tahan terhadap ketengikan) karena adanya tokoferol yang larut dalam minyak. Dalam minyak jagung terdapat sitosterol yang fungsinya sama dengan kolesterol pada lemak hewan, yaitu dapat membentuk endapan pada dinding pembuluh darah karena adanya ion Ca^{++} . Namun dengan adanya asam-asam lemak essential dalam minyak jagung dapat mengurangi pembentukan kompleks Ca dengan sitosterol, sehingga minyak jagung jauh lebih baik bila dibandingkan dengan sumber minyak yang lain, apalagi bila dibandingkan dengan sumber lemak yang berasal dari hewan (Kertaren,1986).

Oleh sebagian kalangan, minyak jagung dianggap sebagai minyak alternatif pengganti minyak sawit karena diyakini mengandung lebih sedikit asam lemak jenuh. Dengan begitu, minyak ini lebih bersahabat dengan mereka yang ingin tetap langsing. Minyak jagung murni mengandung 99 % trigliserida dengan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) 59 %, asam lemak tak jenuh tunggal (MUFA) 24 %, dan asam lemak jenuh (SFA) 13 %. Minyak jagung mudah dicerna, selain itu minyak jagung juga menyediakan energi dan asam lemak esensial (EFA).

2.4.3 Komposisi Asam Lemak Minyak Jagung

Minyak jagung berwarna merah gelap dan setelah dimurnikan berwarna kuning keemasan. Bobot jenis minyak jagung sekitar 0.918-0.925 sedangkan nilai indeks biasanya pada suhu 25°C berkisar 1,4657-1,4659. Kekentalan minyak jagung hampir sama dengan minyak nabati lainnya.

Table 2.3. Komposisi Asam Lemak Minyak Jagung (SNI 01-3394-1998).

| No | komponen | % asam lemak |
|----|-------------------|--------------|
| 1 | Miristat (C14:0) | < 0.3 % |
| 2 | Palmitat (C16:0) | 9-14 % |
| 3 | Stearat (C18:0) | 0.5-4% |
| 4 | Oleat (C18:1) | 24-42% |
| 5 | Linoleat (C18:2) | 34-62% |
| 6 | Linolenat (C18:3) | <2% |

2.5 Kromatografi gas

Kromatografi Gas / *Gas Chromatography* (GC) adalah metode pemisahan suatu komponen yang dibuat dalam bentuk gas. Tswett pada tahun 1903 menemukan teknik kromatografi yang bermanfaat untuk memisahkan suatu campuran. Bila ditinjau dari sistem peralatannya maka GC termasuk kromatografi kolom karena fase diam yang dipakai diisikan kedalam kolom, sedangkan bila

ditinjau dari proses pemisahannya GC dapat digolongkan sebagai kromatografi partisi.

Kromatografi gas (KG) merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk mengukur jumlah dan kelimpahan asam lemak dalam lemak dan minyak atau komposisi campuran asam lemak. Kromatografi dapat digunakan untuk tujuan analisis kualitatif dan analisis kuantitatif serta dapat digunakan untuk tujuan preparatif.

Kromatografi gas menggunakan gas sebagai fasa geraknya. Sementara itu fasa diamnya dapat berupa zat padat (kromatografi gas-padat) atau berupa zat cair yang terikat pada pendukung padat (kromatografi gas-cair). Dasar pemisahan dari kromatografi adalah pendistribusian sampel antara dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Pemisahan terjadi berdasarkan koefisien partisinya (tingkat volatilitas dan kelarutan relatifnya pada fase cair) yang kemudian keluar dari kolom sebagai puncak-puncak konsentrasi. Komponen yang diuapkan didorong oleh gas pembawa melewati kolom dengan kepolaran tinggi. Pemisahan terjadi menurut koefisien partisinya. Luas area yang terdeteksi dapat dikonversi menjadi konsentrasi komponen pada fasa gas (Christie 2006).

2.5.1 Prinsip Analisis Dengan Kromatografi Gas

Prinsip identifikasi sampel dengan kromatografi gas adalah sebagai berikut: Sampel diinjeksikan, sehingga sampel tersebut masuk ke dalam *Sample Injection Port*. Gerbang injeksi dipanaskan, sehingga sampel-sampel cair akan menguap dengan cepat. Sampel sebanyak beberapa mikroliter dalam bentuk cairan, dimasukkan dengan menggunakan syringe. Uap yang terjadi, dibawa masuk ke dalam kolom oleh gas pembawa. Kolom akan memisahkan komponen-komponen analit dari cuplikan berdasarkan volatilitas analit dan afinitas/ interaksi yang terjadi antara analit dengan fasa diam. Setelah analit terelusi dalam kolom, selanjutnya analit dideteksi oleh detektor dan sinyal dalam bentuk puncak akan dihasilkan oleh pencatat (Sastrohamidjojo,1985).

Dalam kromatografi dikenal istilah waktu retensi (t_r), yaitu waktu yang diperlukan komponen sampel untuk ditahan oleh kolom/ fasa diam. Waktu retensi setiap komponen dalam sampel berbeda-beda (spesifik), dan dapat dipergunakan untuk penentuan analisis kualitatif suatu komponen. Hasil pengukuran dicatat dalam bentuk puncak-puncak yang disebut kromatogram. dan luas area kromatogram yang dihasilkan digunakan untuk penentuan analisis kuantitatif suatu sampel (Christie, 2006).

2.5.2 Keunggulan Kromatografi Gas

1. Kecepatan

- a. Gas yang merupakan fasa gerak sangat cepat mengadakan kesetimbangan antara fasa bergerak dengan fasa diam
- b. Dapat diperoleh waktu pemisahan yang relatif sangat cepat (diukur dalam menit) dengan kecepatan gas yang tinggi.

2. Sensitif

Kromatografi gas sangat sensitif. Alat yang paling sederhana dapat mendeteksi konsentrasi dalam ukuran 100 ppm. Alat – alat GC yang lebih rumit dapat mendeteksi senyawa yang konsentrasinya hanya beberapa ppm saja.

Karena sensitifitasnya yang tinggi dari GC maka hanya diperlukan sejumlah kecil dari cuplikan, biasanya dalam ukuran mikroliter saja.

3. Pemisahan

Dengan kromatografi gas memungkinkan untuk memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, dimana hal ini tidak mungkin dipisahkan dengan cara-cara yang lain. Misalnya pemisahan metil ester seperti asam laurat dari metil ester lain seperti asam miristat, asam palmitat dll. Senyawa tersebut tak mungkin dianalisis dengan cara distilasi atau dengan cara ekstraksi, tetapi sangat mudah dipisahkan dengan GC.

4. Alat kromatografi gas dapat dipakai dalam waktu yang lama dan berulang-ulang (Sastrohamidjojo,1985).

2.5.3 Tehnik Pemisahan

Kromatografi gas didasarkan pada 2 sifat senyawa yang dipisahkan, kelarutan senyawa itu dalam cairan tertentu dan tekanan uapnya atau keatsiriannya karena tekanan uapnya bergantung langsung pada suhu maka suhu merupakan faktor utama dalam kromatografi gas. Pemisahan dapat dilakukan pada suhu tetap biasanya disebut isokratik atau pada suhu berubah secara terkendali biasa disebut sistem gradien (Griffer, 1991).

a. Sistem Isokratik

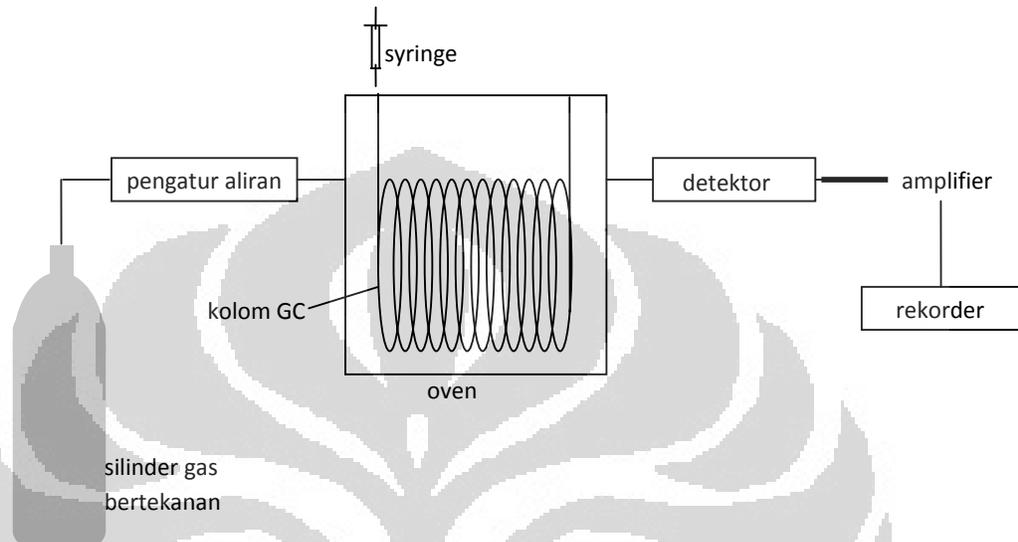
Tehnik pemisahan dengan suhu kolom tidak berubah selama analisis berlangsung. Hal ini berarti suhu kolom dibuat tetap selama pemisahan berlangsung. Ada beberapa masalah yang sering ditemui pada pemisahan isokratik, yang pertama adalah pemilihan suhu. Jika suhu terlalu tinggi komponen akan terelusi tanpa terpisah. Jika suhu terlalu rendah komponen bertitik didih tinggi akan keluar sangat lambat atau bahkan tetap dalam kolom. Masalah kedua ialah pada proses kromatografi, yaitu makin lama suatu analit berada dalam kolom makin lebar alasnya. Pelebaran puncak ini dapat diatasi dengan menggunakan suhu diprogram. Jika suhu dinaikan saat kromatografi berlangsung seperti pada suhu diprogram senyawa yang bertitik didih tinggi didorong lebih cepat dari kolom sehingga pelebarannya berkurang.

b. Sistem Gradien

Tehnik pemisahan dengan suhu kolom berubah secara periodik selama analisis berlangsung. Hal ini berarti selama analisis, suhu kolom bervariasi atau berubah-ubah. Sistem ini digunakan untuk pemisahan contoh yang mengandung komponen-komponen dengan polaritas bervariasi sehingga akan memberikan hasil pemisahan yang baik.

2.5.4 Instrumentasi Kromatografi gas

Sistem GC biasanya terdiri dari gas pembawa, gerbang suntik (injektor), oven, kolom, detektor dan sistem pengolah data.



Gambar 2.3. Bagan kromatografi gas

a. Gas Pembawa

Gas pembawa yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan berikut, yaitu :

- 1) Lembam (inert).
- 2) Koefisien difusi gas rendah.
- 3) Kemurnian tinggi (99,99%).
- 4) Mudah didapat dan murah.
- 5) Cocok dengan detektor yang digunakan.

Gas pembawa berada dalam tangki bertekanan tinggi. Pengatur tekanan digunakan untuk memberikan tekanan yang seragam pada injektor sehingga diperoleh laju alir yang tetap. Gas yang biasa dipakai adalah hidrogen, helium dan nitrogen (Winarno,2002).

b. Gerbang suntik (injektor)

Injektor adalah alat untuk memasukkan sampel yang akan dianalisis ke dalam sistem GC dengan pertolongan jarum injeksi yang biasa disebut syringe. Tempat injeksi alat GC selalu dipanaskan, aturan pertama untuk pengaturan suhu

ini adalah suhu tempat injeksi dipanaskan 50°C lebih tinggi dari titik didih campuran cuplikan yang mempunyai titik didih paling tinggi (Sastrohamidjojo,1985).

c. Kolom

Kolom pada GC merupakan bagian yang sangat penting, sebab pada kolom terjadi proses pemisahan komponen yang akan dianalisis. Proses pemisahan dapat dipandang sebagai serangkaian dari partisi dimana cuplikan masuk ke dalam larutan dari fasa cair dan selang beberapa waktu akan teruapkan lagi. Jadi fasa cair menahan molekul-molekul cuplikan dan gerakan cuplikan dilakukan oleh fasa bergerak. Afinitas cuplikan terhadap fasa cair menentukan berapa lama cuplikan ditahan. Senyawa-senyawa yang mempunyai afinitas rendah (tidak suka) terhadap fasa diam akan keluar dari kolom pertama. Sedangkan senyawa-senyawa dengan afinitas besar (larut dengan baik) terhadap fasa diam akan keluar dari kolom kemudian (Sastrohamidjojo,1985).

Ada dua tipe kolom yang tersedia untuk kromatografi analisis yaitu kolom packing dan kolom kapiler. Saat ini kolom packing bukan merupakan pilihan utama dalam analisis rutin asam lemak hal ini disebabkan karena resolusinya yang rendah dan membutuhkan sampel dalam jumlah yang lebih besar. Bila dibandingkan dengan kolom packing kolom kapiler membutuhkan sampel yang jauh lebih sedikit dan mampu menghasilkan resolusi pemisahan yang lebih tinggi (Whitaker, 2005).

d. Detektor

Detektor pada GC akan memberikan informasi tentang segala sesuatu yang diperlukan sehubungan dengan tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif dengan GC. Detektor yang banyak digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa organik adalah FID (Flame Ionisation Detector). Pada FID cuplikan yang dibawa oleh gas pembawa mengalir ke dalam nyala dan diuraikan menjadi ion. Ion ini meningkatkan arus listrik yang mengalir antara kedua elektroda dan kemudian arus tersebut diperkuat dan direkam (Griffer, 1991).

Ada beberapa syarat utama yang harus dimiliki oleh detektor, yaitu :

- 1) Memberikan respon yang spesifik untuk setiap senyawa yang diukur.
- 2) Mempunyai linieritas yang lebar.
- 3) Mempunyai kepekaan yang tinggi dan dapat diperkirakan.
- 4) Tidak merusak komponen yang diukur
- 5) Memberikan informasi kualitatif pada puncak yang dideteksi.

Gas kromatografi merupakan instrument yang paling sering digunakan dilaboratorium penelitian dan industri. Hal ini disebabkan karena tingkat keberhasilannya yang tinggi, waktu analisis yang cepat, efisiensi pemisahan yang baik dan jumlah sampel yang dibutuhkan untuk analisis relatif sedikit. Selain dengan menggunakan kromatografi gas analisis asam lemak juga dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi, dan kromatografi lapis tipis.

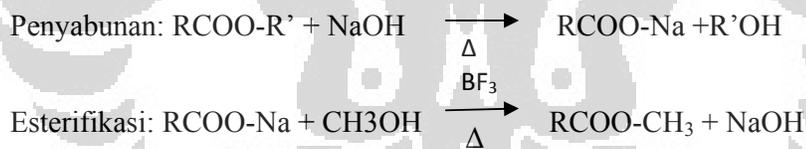
2.6 Derivatisasi asam lemak

Syarat suatu senyawa dapat dianalisis dengan kromatografi gas (KG) adalah senyawa tersebut harus bersifat mudah menguap (*volatile*) sehingga senyawa yang bersifat tidak mudah menguap (*nonvolatile*) harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa yang mudah menguap dengan cara derivatisasi. Asam lemak kurang bersifat *volatile* sehingga tidak memberikan kromatogram maupun pemisahan yang baik agar dapat dianalisis dengan KG dan memberikan pemisahan yang lebih baik asam lemaknya harus diderivatisasi dengan mengubahnya menjadi bentuk ester. (Yuniarti, 2008)

Banyak metode yang telah dijelaskan dalam literatur yang digunakan untuk menyiapkan metil ester. Penyiapan metil ester dapat dilakukan baik menggunakan katalis asam maupun basa. BF_3 dalam methanol, HCl dalam metanol dan asam sulfat dalam metanol merupakan katalis asam yang banyak digunakan untuk memetilasi asam lemak, sedangkan NaOH dalam metanol dan *tetramethylguanidine* (TMG) dalam metanol merupakan katalis basa yang juga banyak digunakan (Whitaker, 2005).

Pengujian asam lemak dengan menggunakan metode diatas memiliki kelebihan dan kekurangannya tersendiri. Tidak ada metode tunggal yang dapat memenuhi kebutuhan metilasi semua jenis sampel. Metode BF_3 dalam metanol sejak diperkenalkan Metcalfe et al. pada tahun 1966 merupakan metode yang dapat digunakan secara luas sehingga diadaptasikan sebagai metode resmi oleh American Oil Chemist Society dan Association of Official Analytical Chemists internasional. Hal ini disebabkan karena keuntungannya yang dapat memetilasi asam lemak bebas secara cepat dan bila dikombinasikan dengan reaksi saponifikasi dapat memetilasi asam lemak dengan lebih cepat (Whitaker, 2005).

Mekanisme perubahan asam lemak menjadi metil ester (FAME) melalui proses metilasi dengan hidrolisis asam lemak dari lemak kompleks atau transesterifikasi langsung. Mekanisme pertama melibatkan saponifikasi/ penyabunan (hidrolisis basa) dengan pemutusan ikatan ester antara asam lemak dan gliserol melalui pemanasan dan adanya katalis basa (natrium hidroksida), dilanjutkan metilasi dengan katalis asam dalam metanol. Transesterifikasi langsung mempunyai satu tahap reaksi yang melibatkan katalis asam dan basa (Yuniarti, 2008).



Minyak umumnya mengandung senyawa tak tersabunkan. Apabila jumlahnya 1-2% biasanya hal ini tidak mengganggu pengukuran. Apabila kita ingin menyiapkan metil ester yang bebas dari senyawa yang tak tersabunkan maka minyak terlebih dahulu harus disabunkan kemudian senyawa tak tersabunkan dipisahkan dengan ekstraksi dan asam lemak bebas diesterifikasi dengan metode tertentu.

2.7 Validasi Metode Pengujian

Validasi adalah suatu pembuktian bahwa kebutuhan penggunaannya telah terpenuhi secara ketentuan/ syarat. Validasi metoda adalah suatu proses penetapan suatu syarat analitik dan mengkonfirmasi bahwa suatu metoda adalah konsisten sesuai keperluan aplikasinya. Secara implisit adalah untuk mengevaluasi kemampuan kinerja metoda.

Dalam proses validasi metoda studi penentuan parameter kinerja metode dilakukan menggunakan peralatan yang berada dalam spesifikasinya, bekerja secara benar dan terkalibrasi dengan baik. Demikian juga operatornya harus kompeten dalam bidang kerjanya dan mempunyai kemampuan yang cukup berhubungan dengan pengambilan keputusan dari observasi yang dibuatnya sebagai kemajuan pekerjaannya (Persulesy,2005).

2.7.1 Manfaat validasi metoda

a. Untuk memenuhi kebutuhan akan pengukuran analitik

Jutaan pengukuran analitik dilakukan setiap hari dalam ribuan laboratorium diseluruh dunia. Ada banyak sekali alasan untuk melakukan pengukuran, diantaranya untuk mengevaluasi barang/ produk untuk kepentingan perdagangan, mendukung perawatan kesehatan, menguji kualitas air minum. Analisis forensik cairan tubuh dalam investigasi criminal. Analisis komposisi unsur suatu alloy untuk mengkonfirmasi kecocokannya dalam kontruksi pesawat terbang.

b. Menentukan batasan suatu metode, misalnya akurasi, presisi, limit deteksi dan lain-lain.

c. Memberikan kepercayaan terhadap hasil

Laboratorium mempunyai suatu tingkat keahlian yang tidak dimiliki pelanggan. Pelanggan diharapkan mampu mempercayai hasil yang dilaporkan oleh laboratorium dan apabila ada keraguan analisis maka laboratorium dan staffnya mempunyai tanggung jawab untuk memberi jawaban yang benar. Dengan kata lain hasil analisis tersebut mempunyai kehandalan untuk tujuan '*fitness for purpose*'.

Agar suatu hasil analitik menjadi handal untuk tujuan yang diinginkan maka suatu keputusan hendaknya didasarkan pada batas kepercayaan (*confidence*) yang ditetapkan. Ketidakpastian pada hasil analisis hendaknya diestimasi pada suatu tingkat kepercayaan yang diberikan. Bagaimanapun baiknya suatu metoda dan keterampilan seorang analis menggunakannya suatu masalah analitik belum tentu dapat dipecahkan jika sampel-sampel tersebut tidak sesuai dengan metoda yang dipakai (Persulesy,2005).

2.7.2 Kapan metode harus divalidasi

Suatu metode perlu divalidasi bila diperlukan untuk membuktikan ketepatan kinerja parameternya untuk digunakan dalam kasus analitik tertentu, contohnya:

- Pengembangan metode baru untuk kasus tertentu
- Memutakhirkan metode yang direvisi untuk penambahan perbaikan atau diperluas kesuatu problem atau kasus baru.
- Bila kendali mutu mengidikasikan suatu metode yang mutakhir berubah bersama waktu.
- Metode mutakhir digunakan pada laboratorium yang berbeda, atau analisis yang berbeda atau instrument yang berbeda.
- Untuk memperlihatkan ekuivalensi diantara dua metoda, misalnya metoda baru dan metoda standar

Validasi metoda memberikan jaminan kepercayaan selama penggunaan normal dan kadang-kadang dilukiskan sebagai proses yang memberikan bukti yang terdokumentasi bahwa metode benar-benar siap digunakan. Ada beberapa tahapan yang dilakukan dalam validasi metoda dan beberapa tahapan utama yang harus dipenuhi dalam validasi adalah akurasi, presisi, LOD, LOQ dan linieritas (Persulesy,2005).

2.7.3 Parameter validasi metode

2.7.2.1 Akurasi

Kecermatan atau akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur (Harmita, 2004).

Uji akurasi biasanya dilakukan dengan menggunakan 3 cara, yaitu: (Persulesy, 2005)

1. Menggunakan bahan acuan/ *reference material* (CRM/SRM)

Bahan acuan adalah suatu bahan yang sifat-sifatnya telah diketahui dengan prosedur atau teknik tertentu. Ada beberapa macam bahan acuan, yaitu:

- a. *Certified reference material* (CRM) yaitu suatu bahan acuan yang satu atau lebih sifat-sifatnya diberi sertifikat dengan prosedur teknik yang telah baku. Bahan acuan tersebut dapat ditelusuri ke suatu sertifikat atau dokumen lain yang diterbitkan oleh badan sertifikasi
 - b. *Standard reference material* (SRM) yaitu suatu contoh acuan yang nilai sebenarnya diperoleh melalui uji profisiensi
 - c. *Inhouse reference material* (IRM) yaitu suatu contoh acuan yang dibuat laboratorium dengan teknik tertentu yang mampu telusur terhadap bahan acuan
2. Mengikuti uji profisiensi yang diselenggarakan oleh lembaga yang berwenang. Uji profisiensi merupakan salah satu metode untuk

mengetahui kualitas dari laboratorium pengujian dengan cara uji banding antar laboratorium yang sudah terakreditasi

3. Melakukan uji contoh spike (*recovery*)

Bila tidak ada SRM/CRM atau uji profisiensi, maka uji akurasi bisa dilakukan dengan menggunakan contoh spike. Spike adalah penambahan bahan analit yang sudah diketahui konsentrasinya kedalam contoh kemudian dilakukan pengujian terhadap contoh spike dan contoh itu sendiri sehingga dapat dihitung persentase perolehan kembali (persen *recovery*). Uji akurasi dengan cara spike dilakukan minimal 7 kali pengulangan. Konsentrasi analit yang ditambahkan dalam contoh spike diperkirakan dua atau tiga kali lipat konsentrasi yang diperkirakan ada pada contoh.

Penilaian akurasi suatu metode analisis didasarkan pada nilai perolehan kembali (*recovery*).

$$\text{Persen Recovery} = \frac{\text{Kadar Terukur}}{\text{Kadar Sebenarnya}} \times 100\%$$

2.7.2.2 Presisi

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*).

Keterulangan (*repeatability*) adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal (Harmita, 2004).

Ketertiruan (*reproducibility*) adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-

laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Penilaian presisi suatu metode analisis dinyatakan dalam nilai *Coefficient of Variation* (CV). Menurut Purwantoko analit dengan konsentrasi kurang dari 0,1 %, presisi dikatakan baik jika memiliki nilai $CV \leq 20 \%$. Keseksamaan dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

1. Hasil analisis adalah $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$. maka simpangan bakunya adalah

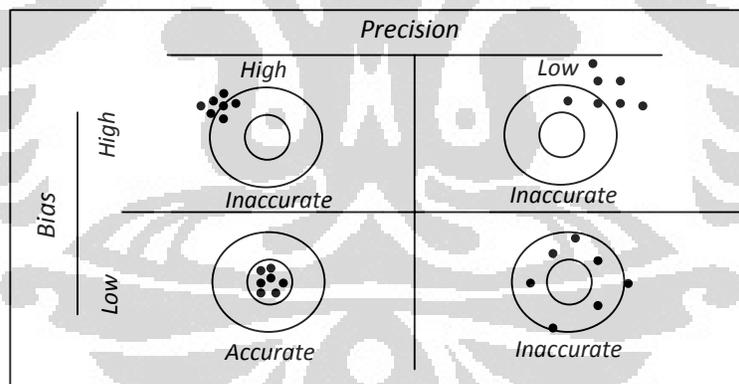
$$SD = \sqrt{\frac{(\sum (x - \bar{x})^2)}{n - 1}}$$

2. Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) adalah:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

Gambar di bawah ini menggambarkan perbedaan mendasar antara akurasi (ketepatan) dan presisi (ketelitian) (Persulesy,2005).



Gambar 2.4. Perbedaan akurasi dan presisi

2.7.2.3 Linieritas dan Rentang Kerja (Range)

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisa untuk menunjukkan hubungan secara langsung atau proporsional antara respons detektor dengan perubahan konsentrasi analit. Rentang kerja adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linieritas

pengukuran berfungsi untuk mengetahui seberapa linier pengukuran akan diperoleh dari setiap pengukuran standar.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Pada beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya (Harmita,2004).

Linieritas diuji secara statistik, yaitu Linear Regression ($y = a + bx$); dimana b adalah kemiringan slope garis regresi dan a adalah perpotongan dengan sumbu y . Persyaratan data linieritas untuk validasi metode bisa diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) 0,999.

2.7.2.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terendah dari analit dalam contoh yang dapat terdeteksi, tetapi tidak perlu terkuantisasi/ terukur, dibawah kondisi pengujian yang disepakati. Batas deteksi merupakan parameter uji batas.

$$\text{LOD} = \frac{3 (S_y/x)}{b}$$

Batas kuantisasi atau biasa disebut juga limit pelaporan (*limit of reporting*) adalah Merupakan jumlah analit terkecil yang yang masih bisa diukur dengan akurat (tepat) dan presisi (teliti), dibawah kondisi pengujian yang disepakati (Harmita,2004).

$$\text{LOQ} = \frac{10 (S_y/x)}{b}$$

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 ALAT DAN BAHAN

3.1.1 Alat

1. Neraca analitik
2. Peralatan gelas :
 - a. Beaker glass
 - b. Labu didih 250 ml
 - c. Labu ukur
 - d. Gelas ukur
 - e. Corong pemisah 250ml
 - f. Pipet volumetri
 - g. Pipet tetes
 - h. Batang pengaduk
 - i. Corong biasa
3. Peralatan refluks
 - a. Penangas air
 - b. Kondensor
 - c. Batu didih
 - d. termometer
4. *Gas Chromatography Shimadzu 2010*

dilengkapi dengan detektor FID dan kolom kapiler INNOWAX dengan panjang 30 meter, diameter 0,25 mm dan film dengan tebal 0,25 μm .
5. Syringe

6. GC Vial
7. *Rotary evaporator*
8. Alumunium foil

3.1.2. Bahan

1. Larutan standar asam lemak
2. Sampel minyak jagung
3. Larutan BF_3 -metanol 12,5 %
4. Larutan NaOH
5. Larutan metanol
6. Larutan NaCl jenuh
7. Larutan Heksana
8. Larutan Petroleum eter
9. Akuabides
10. Indikator phenoftalein (PP)

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Penyiapan Larutan

1. BF_3 -metanol 12,5% : Mendinginkan 1 liter metanol dalam bak es, kemudian ditambahkan 125 g BF_3 perlahan-lahan, pencampuran dilakukan diruang asam karena larutan ini sangat toksik.
2. NaOH 0,5 M dalam metanol: Melarutkan 2 g NaOH dalam 100 mL MeOH yang mengandung air kurang dari 0,5%.
3. NaCl jenuh : Melarutkan 36 g NaCl dalam 100 mL akuades.

4. Larutan standar asam lemak: Membuka ampul yang berisi larutan standar asam lemak metil ester kemudian dilarutkan dengan heksan dalam labu ukur 10 ml. Larutan disimpan didalam kulkas sebagai larutan induk.

3.2.2. Preparasi Metil Ester

Penimbangan sampel minyak jumlahnya tidak ditentukan, tetapi perlu diketahui untuk menentukan ukuran labu dan jumlah pereaksi yang akan digunakan seperti yang tercantum pada tabel di bawah ini

Tabel 3.1 Penimbangan Sampel, Labu, Penambahan Reagen

| Berat sampel (mg) | Ukuran labu (mL) | NaOH 0,5 M (mL) | BF ₃ -metanol (mL) |
|-------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|
| 100-250 | 50 | 4 | 5 |
| 250-500 | 50 | 6 | 7 |
| 500-750 | 100 | 8 | 9 |
| 750-1000 | 100 | 10 | 12 |

3.2.2.1 Metode Standar (AOAC 969.33)

1. Tahap metilasi

Sampel minyak jagung ditimbang seberat \pm 350 mg dalam labu didih, ditambahkan 6 ml NaOH-metanol 0,5 M, larutan dipanaskan pada suhu 55°C dengan penangas air yang dilengkapi dengan kondensor selama 5-10 menit, kemudian ditambahkan 7 ml BF₃-metanol 12,5 % dari atas sistem refluks dan pemanasan dilanjutkan 2 menit, setelah 2 menit ditambahkan 5 ml heksan lalu dipanaskan lagi 1 menit. Selama proses pemanasan campuran dikocok sekali-sekali. Setelah selesai campuran didinginkan.

2. Tahap ekstraksi

Setelah dimetilasi campuran diekstraksi dengan menambahkan \pm 30 ml larutan NaCl jenuh dan dikocok dengan corong pemisah. Campuran kemudian dibiarkan memisah dan setelah terpisah akan terbentuk 2 fasa, cuci fasa bawah dengan cara diekstraksi dengan \pm 50 ml petroleum eter

sebanyak 2x, gabung kedua larutan dan cuci dengan akuabides hingga bebas basa (uji bebas basa dilakukan dengan indikator PP). Setelah bebas basa, ambil fasa atas dan uapkan pelarut dengan *rotary evaporator*. Metil ester siap diinjeksikan ke kromatografi gas namun terlebih dahulu dilarutkan dengan 1 ml heksan.

3.2.2.2 Metode Modifikasi

1. Tahap metilasi

Sampel minyak jagung ditimbang seberat ± 350 mg dalam labu didih, ditambahkan 6 ml NaOH-metanol 0,5 M dan diaduk kemudian ditambahkan 7 ml BF₃-metanol 12,5 %, aduk. Campuran lalu dipanaskan pada suhu 70°C dengan penangas air yang dilengkapi dengan kondensor selama 2-3 menit, kemudian ditambahkan 5 ml heksan dari atas sistem refluks pemanasan dilanjutkan lagi 2 menit. Setelah selesai campuran didinginkan.

2. Tahap ekstraksi

Setelah dimetilasi campuran diekstraksi dengan menambahkan ± 30 ml larutan NaCl jenuh dan dikocok dengan corong pemisah. Campuran dibiarkan memisah dan setelah terpisah akan terbentuk 2 fasa, cuci fasa bawah dengan dengan ± 50 ml petroleum eter sebanyak 2x, gabung kedua larutan dan cuci dengan akuabides hingga bebas basa (uji bebas basa dilakukan dengan indikator PP). Setelah bebas basa, ambil fasa atas dan uapkan pelarut dengan *rotary evaporator*. Metil ester siap diinjeksikan ke kromatografi gas namun terlebih dahulu dilarutkan dengan 1 ml heksan.

3.2.3 Analisis dengan kromatografi gas

1. Parameter kondisi operasi Kromatografi

Analisis dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography Shimadzu 2010* dengan kondisi sebagai berikut:

Injektor : - Suhu injektor: 200°C

- Mode : Split
- Split rasio: 30:1
- Sampling rate: 40 msec

Kolom : - Kolom kapiler INNOWAX

- Panjang : 30 m
- Diameter dalam: 0.25 mm ID
- Film thickness: 0,25 µm
- Suhu terprogram

Tabel 3.2 Program Temperatur pada Kolom Kromatografi Gas

| Perubahan (°C/menit) | Suhu (°C) | Waktu penahanan (menit) |
|----------------------|-----------|-------------------------|
| - | 100 | 0 |
| 3.0 | 150 | 0 |
| 3.0 | 250 | 0 |

Detektor :- Jenis detektor : *Flame Ionization Detector* (FID)

- Suhu detektor : 250°C

Gas Pembawa : - Gas Hidrogen : 40 ml/min

- Udara: 400ml/min
- Make up gas He : 30 ml/min

2. Kandungan/identifikasi asam lemak ditentukan dengan membandingkan waktu retensi standar dengan waktu retensi sampel
3. Penentuan luas area berdasarkan area puncak yang terukur oleh detector
4. Konsentrasi sampel dihitung dengan cara normalisasi area :
 - a. Menghitung persen berat dan persen area larutan standar

$$\% \text{ berat} = \frac{m_i}{\sum m_i} \times 100 \%$$

$$\% \text{ area} = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100 \%$$

- b. Menentukan faktor koreksi

$$K_i = \frac{\% \text{ berat}}{\% \text{ area}}$$

$$Kt' = \frac{Kt}{K18}$$

c. Menghitung persen asam lemak dalam sampel berdasarkan area sampel yang telah dinormalisasi

$$\% \text{ asam lemak} = \frac{A_i \times Kt'}{\sum(A \times Kt')} \times 100 \%$$

3.2.4 Validasi Metode Analisis

3.2.4.1 Linieritas Larutan Standar

Uji linieritas 9 komponen asam lemak diperoleh dengan mengukur deret standar. Deret standar dibuat dengan pengenceran larutan standar induk, larutan standar induk mengandung 9 komponen asam lemak yaitu asam kaprilat, asam kaprat, asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat, dan asam linolenat dengan konsentrasi berbeda yaitu 670 ppm, 480 ppm, 4600 ppm, 1450 ppm, 730 ppm, 290 ppm, 1160 ppm, 290 ppm, dan 1000 ppm. Dari larutan standar campuran asam lemak metil ester induk ini diambil 0.01 ml, 0.03ml, 0.05 ml, 0.07 ml, dan 0.1 ml dan dilarutkan dengan heksana dalam labu ukur 5 ml untuk memperoleh deret standar asam lemak dengan konsentrasi yang berbeda. selanjutnya masing-masing larutan diinjeksikan ke kromatografi gas. Setelah diperoleh luas area masing-masing konsentrasi dialurkan kurva kalibrasi luas area terhadap konsentrasi dan ditentukan koefisien korelasi.

3.2.4.2 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi dan kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - \hat{y}_1)^2}{N - 2}} \quad \text{di mana } \hat{y}_1 = a + bx$$

Karena $k = 3$ atau 10 Simpangan baku (Sb) = Sy/x dan $b = \text{slope}$. maka

$$Q = \frac{k \times Sh}{b}$$

a. Batas deteksi (LOD)

$$LOD = \frac{3 (Sy/x)}{b}$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

$$LOQ = \frac{10 (Sy/x)}{b}$$

3.2.4.3 Uji presisi

Presisi pengukuran ditunjukkan dengan melakukan uji repeatabilitas. Uji repeatabilitas dilakukan dengan cara mengukur sampel yang telah dipreparasi sebanyak tujuh kali ulangan kemudian dihitung rata-rata dan standar deviasi dengan rumus:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(\sum (x - \bar{x})^2)}{n - 1}}$$

Kemudian dihitung koefisien variasi (CV) atau standar deviasi relatif (RSD)

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

3.2.4.4 Uji akurasi

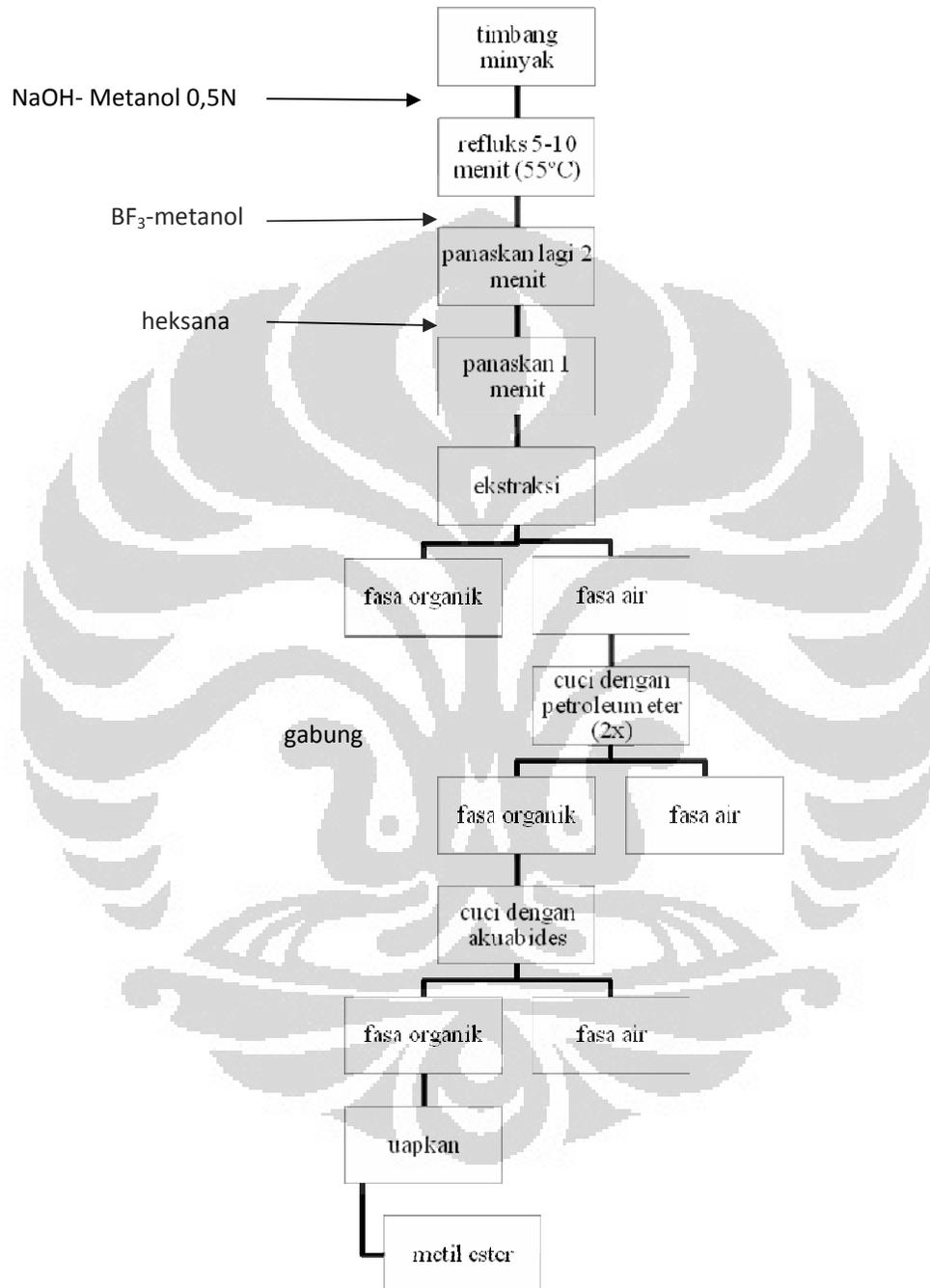
Bila tidak ada sertifikat standar. Uji akurasi dapat dilakukan dengan menggunakan penambahan spike.

1. Tambahkan standar dalam jumlah tertentu ke dalam sampel lalu homogenkan
2. Tentukan kandungan standar dalam contoh spike
3. Lakukan pengulangan minimal 7 x
4. Tetapkan kadar asam lemak dalam sampel awal
5. Hitung kadar asam lemak dalam sampel dan hitung %R

$$\%Recovery = \frac{C_{\text{sampel}} - C_{\text{sampel+spike}}}{C_{\text{spike}}} \times 100\%$$

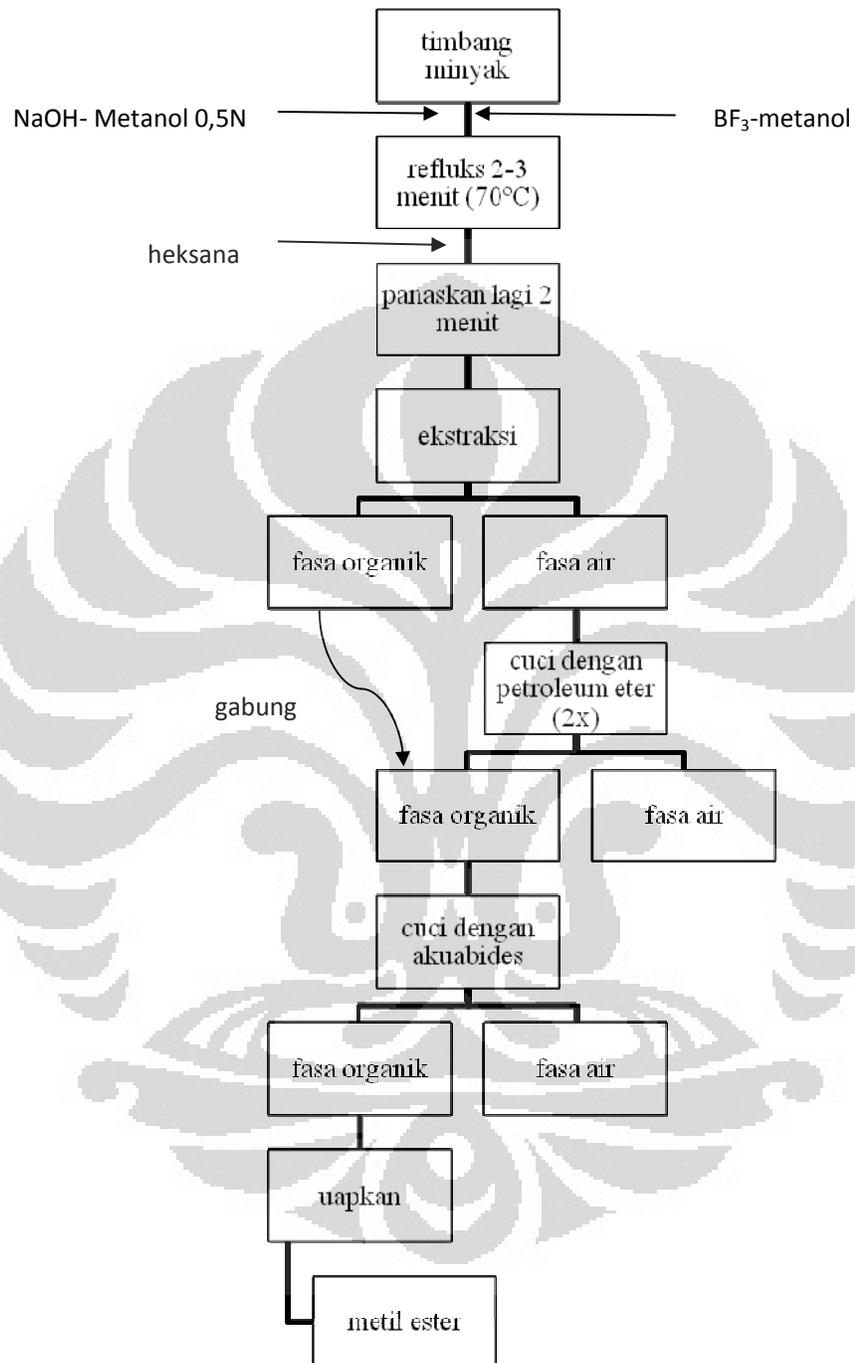
3.3 Bagan Kerja

3.3.1 Metode Preparasi Standar AOAC 969.33



Gambar 3.1 Skema Preparasi Asam Lemak Metil Ester dengan Metode Standar AOAC 969.33

3.3.2 Metode Modifikasi



Gambar 3.2 Skema Preparasi Asam Lemak Metil Ester dengan Metode yang Dimodifikasi

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Preparasi Metil Ester Asam Lemak

Preparasi sampel merupakan salah satu langkah penting dalam setiap prosedur analitis. Karena buruknya preparasi sampel hanya akan memberikan hasil yang juga buruk dan tidak seragam. Syarat suatu senyawa dapat dianalisis dengan kromatografi gas adalah senyawa tersebut harus bersifat mudah menguap (*volatile*) sehingga senyawa yang bersifat tidak mudah menguap (*nonvolatile*) harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa *volatile* dengan cara derivatisasi. Oleh karena itu agar sampel minyak dapat dianalisis dengan kromatografi gas maka asam lemaknya harus diderivatisasi menjadi bentuk esternya.

Pada penelitian ini preparasi asam lemak dilakukan dengan menambahkan NaOH-methanol 0,5 N kedalam minyak yang telah ditimbang, campuran direfluks pada suhu 55°C selama 5-10 menit hingga seluruh minyak larut, kemudian ditambahkan larutan BF₃-methanol dan dipanaskan kembali selama 2 menit, setelah 2 menit melalui bagian atas sistem refluks ditambahkan 5 ml heksan dan pemanasan dilanjutkan selama 1 menit. Setelah 1 menit campuran didinginkan dan siap diekstraksi untuk memisahkan metil ester dari campuran.

Penambahan NaOH bertujuan untuk menghidrolisis senyawa trigliserida menjadi gliserol dan garam asam lemak serta metil ester, sedangkan BF₃-methanol berfungsi sebagai katalis untuk mempercepat reaksi metilasi garam asam lemak maupun asam-asam lemak bebas menjadi asam lemak metil ester. Sedangkan penambahan heksan bertujuan untuk melarutkan metil ester dan memisahkannya dari fasa air.

Ekstraksi dilakukan dengan terlebih dahulu menambahkan larutan NaCl jenuh sebanyak ± 30 ml, campuran kemudian dikocok dengan corong pisah beberapa kali dan dibiarkan memisah. Setelah terpisah akan terbentuk dua fasa dimana fasa atas merupakan metil ester dan fasa bawah merupakan fasa air. Pemisahan ini didasarkan atas perbedaan kepolaran antara metil ester dengan fasa

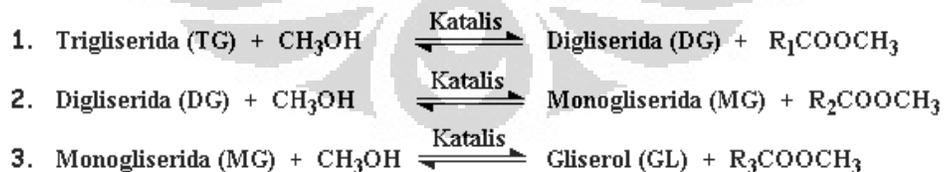
air. Dimana metil ester bersifat nonpolar sedangkan air bersifat polar. Selain itu hal ini juga disebabkan karena perbedaan massa jenis, larutan air yang memiliki massa jenis lebih tinggi akan berada dibawah metil ester.



Gambar 4.1 Ekstraksi campuran

Meskipun larutan terlihat telah memisah namun kemungkinan masih terdapat metil ester yang terperangkap dalam fasa air, Untuk merecover metil ester tersebut, lapisan bawah diekstrak sebanyak 2x dengan ± 50 ml petroleum eter (Gambar 4.1) kemudian kedua larutan digabungkan dan dicuci dengan akuabides hingga bebas basa. Pengujian bebas basa dilakukan dengan menambahkan phenoftalein pada air cucian. Setelah bebas basa lapisan atas diambil dan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh residu metil ester. Residu ini tidak dapat langsung diinjeksikan kedalam kromatografi gas namun terlebih dahulu dilarutkan dengan pelarut heksana. Setelah diinjeksikan akan diperoleh kromatogram seperti (Gambar 4.2 (a)).

Mekanisme perubahan asam lemak menjadi metil ester (FAME) sebenarnya berlangsung dalam tiga tahap sebagai berikut dengan katalis OH^- :



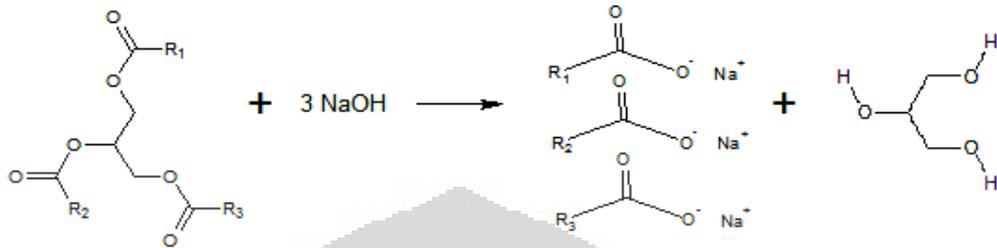
Katalis sejati bagi reaksi sebenarnya adalah ion metoksida (CH_3O^-) yang terbentuk karena reaksi ion hidroksida (OH^-) dengan metanol:



Namun karena reaksinya reversibel kemungkinan dapat terjadi reaksi saponifikasi (hidrolisis basa) menghasilkan garam asam lemak dan gliserol, oleh

katalis BF_3 , garam asam lemak kemudian diubah menjadi metil ester asam lemak. Tahap reaksi dapat ditulis sebagai berikut:

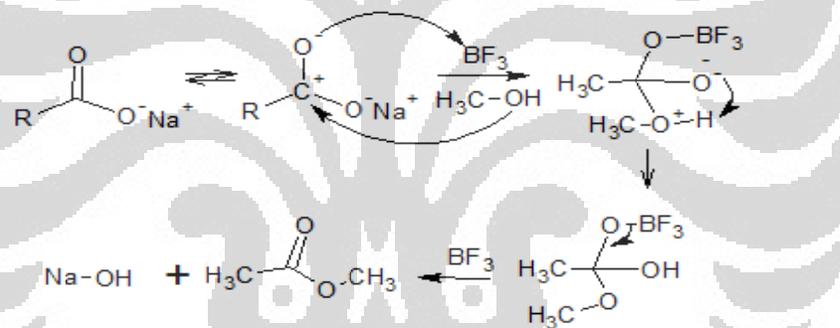
- Reaksi saponifikasi



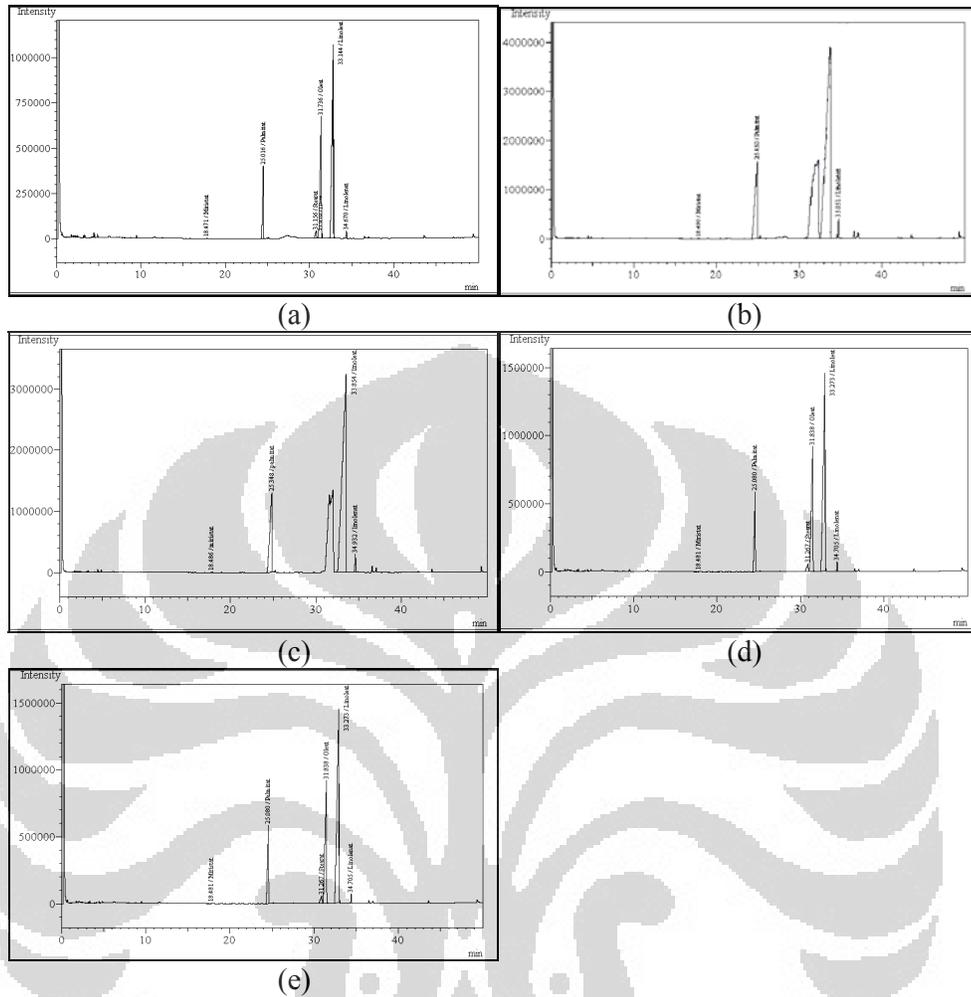
- Reaksi metilasi



- Mekanisme reaksi metilasi



Namun untuk memenuhi tuntutan pengujian asam lemak yang semakin meningkat maka dicoba untuk menyederhanakan metoda standar pengujian asam lemak diatas. Modifikasi dilakukan untuk memperoleh metode pengujian yang lebih cepat, simpel dan efisien. Cecil D. Bannon et al (1982) membuktikan dengan merefluks minyak selama 3 menit masing-masing untuk kedua tahap saponifikasi dan metilasi tetap dapat memberikan persen recoveri yang baik. Tetapi berdasarkan percobaan untuk mempercepat waktu pengujian tidak dapat dilakukan pada suhu 55°C karena akan diperoleh kromatogram dengan senyawa yang tidak terpisah dengan baik seperti pada Gambar 4.2 (b) terutama pada asam stearat dan oleat serta terjadi pelebaran puncak begitu juga pada suhu 60°C (Gambar 4.2 (c)) sehingga tidak dapat dilakukan perhitungan terhadap kadar asam lemak.



Gambar 4.2 Kromatogram-kromatogram hasil uji coba modifikasi metode*

Keterangan:

- (a) Suhu 55°C, +NaOH-metanol dipanaskan 5-10 menit, +BF₃-methanol dipanaskan 2 menit, +heksana 1 menit (metode standar AOAC)
- (b) Suhu 55°C, +NaOH-metanol dipanaskan 2-3 menit, +BF₃-methanol dipanaskan 2 menit, +heksana 1 menit
- (c) Suhu 60°C, +NaOH-metanol dipanaskan 2-3 menit, +BF₃-methanol dipanaskan 2 menit, +heksana 1 menit
- (d) Suhu 70°C, +NaOH-metanol dipanaskan 2-3 menit, +BF₃-methanol dipanaskan 2 menit, +heksana 1 menit
- (e) Suhu 70°C, +NaOH-metanol & BF₃-methanol dipanaskan 2-3 menit, +heksana 2 menit (metode modif)

*Proses preparasi sama, variasi hanya pada suhu, waktu reaksi dan tahap penambahan reagen.

Hal ini mungkin disebabkan karena suhunya yang rendah dan waktu reaksi yang singkat menyebabkan reaksinya belum sempurna dimana belum semua senyawa trigliserida terhidrolisis menjadi metil ester, masih ada asam lemak dalam bentuk asam lemak bebas, digliserida, atau monogliserida sehingga analit terdistribusi secara tidak seragam dalam kolom mengakibatkan terjadinya pelebaran puncak dan pemisahan yang tidak sempurna.

Tetapi apabila suhu dinaikkan menjadi 70 °C dan waktu pemanasan diturunkan akan diperoleh kromatogram dengan pemisahan yang baik (Gambar (d)). Pemilihan suhu 70°C dan percepatan waktu reaksi ini didasarkan atas pengamatan terhadap sifat katalis BF_3 yang sangat kuat dan pengamatan terhadap sifat fisik komponen asam lemak yaitu titik leleh asam lemak yang akan dianalisis. Oleh karena itu untuk mempercepat proses hidrolisis maka dipilih suhu dimana seluruh asam lemak penyusun trigliserida mudah larut. Dari keseluruhan asam lemak yang akan dianalisis, asam stearat (C18:0) memiliki titik leleh tertinggi yaitu 69,6°C (Tabel 2.1). Oleh karena itu dipilih suhu pemanasan 70°C agar minyak lebih cepat larut dan bereaksi dengan reaktan.

Mengingat sifat katalis BF_3 yang kuat maka dicoba untuk menyederhanakan metode pengujian dengan melihat apakah terdapat pengaruh apabila katalis BF_3 dalam methanol ditambahkan (kedalam minyak yang telah dicampur NaOH) sebelum dipanaskan pada suhu 70°C dibanding dengan penambahan BF_3 -methanol pada saat pemanasan. Ternyata dengan menambahkan kedua reaktan diawal sebelum pemanasan memberikan kromatogram pemisahan yang sama baiknya dengan penambahan reaktan NaOH-metanol dan BF_3 -methanol secara bertahap (Gambar 4.2 (e)). Hal ini mungkin disebabkan karena dengan adanya katalis BF_3 yang sangat kuat, senyawa trigliserida lebih mudah dihidrolisis oleh OH^- dan membentuk garam, garam asam lemaknya segera dikatalisis BF_3 menjadi asam lemak metil ester.

Berdasarkan perhitungan diperoleh kadar asam lemak yang tidak berbeda terlalu jauh antara metoda preparasi standar dengan metode yang telah dimodifikasi, perbedaan komposisi dapat dilihat pada Lampiran 3 dan Lampiran 4. Misalnya asam linolenat dengan metode yang dimodif diperoleh kadar sebesar

0,92% sedangkan dengan metode standar diperoleh kadar asam linolenat 0,91%. Karena tidak terdapat perbedaan yang signifikan maka ditetapkanlah untuk melakukan validasi metode modifikasi uji asam lemak berdasarkan uji coba yang telah dilakukan, Gambar 4.3 merupakan larutan metil ester yang diperoleh:



Gambar 4.3. Larutan Asam Lemak Metil Ester

4.2 Analisis dengan Kromatografi Gas

Pemisahan komponen-komponen asam lemak dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography Shimadzu 2010* yang dilengkapi dengan detektor *Flame Ionization Detector* (FID) dan kolom kapiler INNOWAX yang memiliki panjang 30 meter, diameter 0,25 mm, ketebalan film 0,25 μm , suhu diatur terprogram (Tabel 3.2), sistem injeksi menggunakan sistem split dan waktu analisis total 50 menit.

Pada kondisi tersebut alat memberikan sensitifitas yang cukup baik dalam mendeteksi asam lemak terlihat dari kromatogram yang diberikan blanko (Lampiran 6) dan kromatogram larutan standar asam lemak (Lampiran 7), pada pengukuran blanko tidak terdeteksi adanya puncak pada waktu retensi 9 komponen asam lemak yang ingin dianalisis.

4.2.1. Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi asam lemak penyusun sampel minyak jagung dengan waktu retensi standar pembanding. Contoh kromatogram minyak jagung dengan menggunakan kondisi operasi yang sama dengan pengukuran larutan standar dapat dilihat pada Gambar 4.2 (e).

Pada pengukuran sampel minyak jagung tidak terdeteksi adanya asam lemak kaprilat, kaprat dan laurat karena tidak terdapat waktu retensi yang sesuai dengan waktu retensi standar. Berdasarkan analisis kualitatif hanya asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat saja yang memiliki waktu retensi yang cocok dengan waktu retensi asam lemak larutan standar.

4.2.2 Analisis Kuantitatif

Setelah diketahui asam lemak apa saja yang terdapat dalam sampel, selanjutnya dilakukan perhitungan untuk mengetahui persen kadar asam lemak dalam sampel. Namun untuk menghitung persen kadar asam lemak tidak dapat dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi, karena apabila perhitungan dilakukan berdasarkan persamaan garis dari kurva kalibrasi maka akan diperoleh perhitungan yang tidak tepat.

Perhitungan dengan menggunakan persen area juga tidak cocok digunakan mengingat perbedaan berat molekul yang besar antar asam lemak sehingga diperlukan faktor koreksi yaitu dengan metode perhitungan normalisasi area. Karena meskipun detektor FID yang digunakan memberikan respon persen berat dari atom karbon yang diionisasi namun respon yang diberikan tidak sepenuhnya linier terhadap berat masing-masing asam lemak, sehingga luas area yang diperoleh perlu dikalikan dengan faktor koreksi relatif. Cara perhitungan dengan metode normalisasi area dapat dilihat pada Lampiran 5.

4.3 Uji perbedaan

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak antara kedua metode maka dapat diketahui dengan melakukan uji perbedaan, pada penelitian ini metode dibandingkan dengan uji t-student. Uji ini dilakukan dengan menghitung nilai t dari rata-rata sampel kemudian harga t hitung tersebut dibandingkan dengan harga t tabel. Bila t hitung lebih besar dari t tabel maka perbedaan itu signifikan dan sebaliknya bila t tabel lebih besar dari t hitung maka perbedaannya tidak signifikan.

Berdasarkan tabel t dapat diketahui bahwa dengan tingkat kesalahan 0,5%, harga t tabel 9,925. Sehingga dari perhitungan t test (Lampiran 14) pada tingkat kepercayaan 99,5% diperoleh nilai t hitung yang lebih kecil dari t tabel, ini berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar asam lemak yang diperoleh dengan metode standar AOAC dan metode yang dimodifikasi.

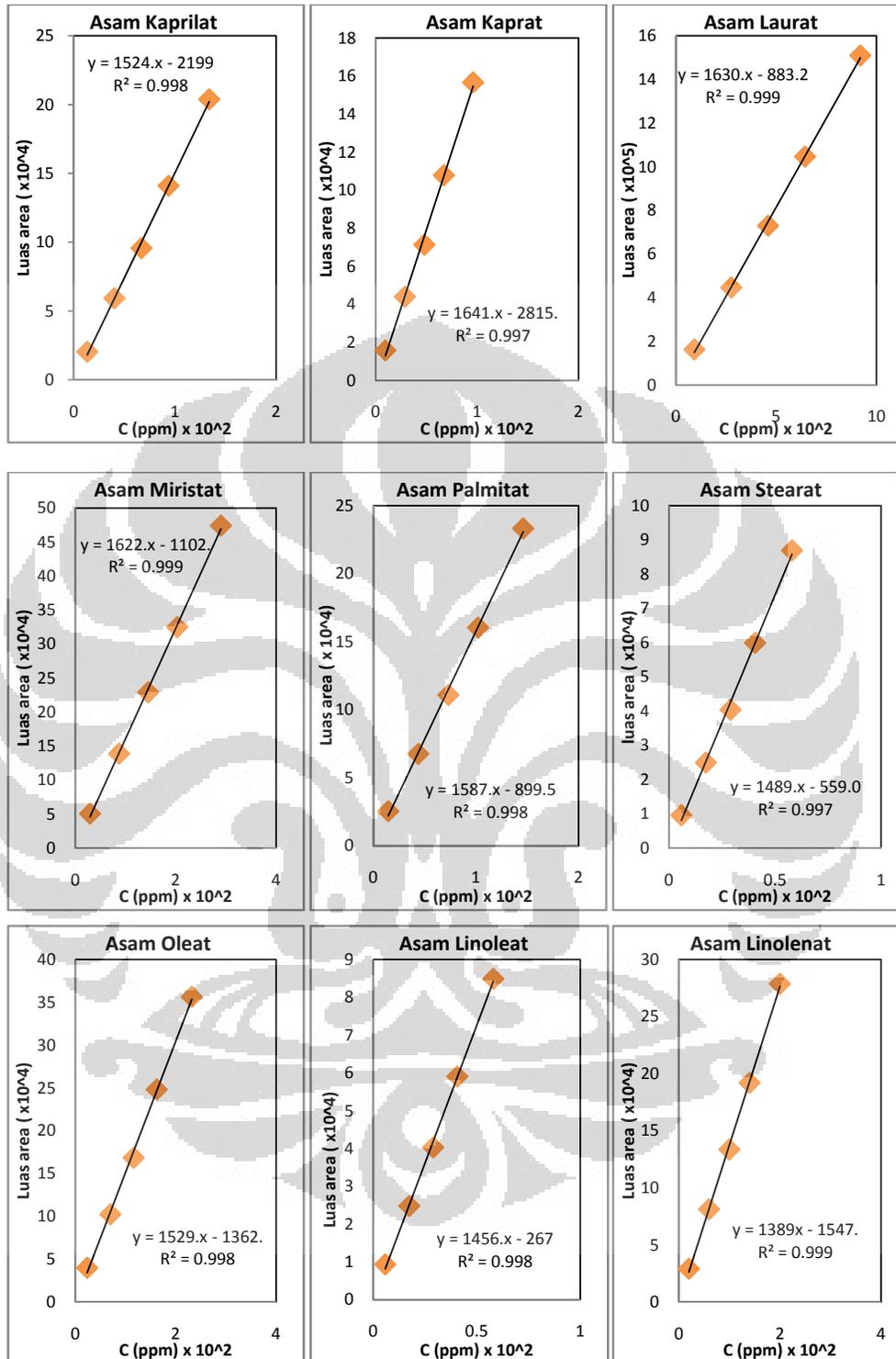
4.4 Validasi metode analisis

Terkadang sering kali kita bingung dalam menginterpretasikan data dan membuat kita bertanya-tanya mengapa hasil yang diperoleh tidak seragam atau tidak sesuai yang diharapkan. Salah satu cara untuk menghindari hal tersebut adalah dengan melakukan validasi metode. Karena sebelum digunakan sebagai metode pengujian sebuah metode harus dipastikan bahwa kebutuhan penggunaannya telah terpenuhi secara ketentuan/ syarat terutama bagi metode yang digunakan sebagai metode analisis rutin dalam laboratorium pengujian. Hal ini bertujuan untuk menghindari kecacauan dan ketidakpercayaan terhadap hasil analisis serta untuk mengetahui sejauh mana penyimpangan suatu metode tidak dapat dihindari pada kondisi normal. Oleh karena itu diperlukan validasi metode terlebih dahulu sebelum metode digunakan dalam analisis rutin.

4.4.1 Uji Linieritas

Linieritas menggambarkan kemampuan metode analisis untuk memberikan respon terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Uji linieritas dilakukan dengan mengukur larutan standar menggunakan kromatografi gas pada berbagai konsentrasi, dari konsentrasi kecil ke konsentrasi besar. Selanjutnya luas area yang diperoleh dialurkan terhadap konsentrasinya untuk memperoleh kurva linieritas standard kemudian dicari persamaan garis dan harga koefisien korelasi (R^2)

Kromatogram dan tingkat konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 6 dan Kurva linieritas standar asam kaprilat, asam kaprat, asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat dapat dilihat pada Gambar 4.4 :



Gambar 4.4 Kurva Linieritas Asam Lemak