

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pemilihan Kondisi Optimum Kromatografi Gas untuk Analisis DHA

Kondisi analisis optimum kromatografi gas terpilih adalah dengan pemrograman suhu dengan suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C kemudian suhu dipertahankan selama 20 menit, laju alir 2,00 ml/menit. Suhu injektor diatur pada 230°C, suhu detektor 250°C, split 1:3. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2.

2. Pembakuan DHA dalam DHA Oil

a. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA murni

Persamaan garis kurva kalibrasi standar DHA murni yaitu $y = -3349,651624 + 66,86540058x$ dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9993. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 4.

b. Penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Rata-rata kadar DHA dalam DHA oil dari uji triplo yang dilakukan sebesar 22,76%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

3. Validasi Metode Analisis

a. Pembuatan kurva kalibrasi serta uji linearitas DHA menggunakan DHA oil

Persamaan garis kurva kalibrasi DHA menggunakan DHA oil yaitu $y = -356,1393772 + 67,12064247x$, dengan nilai koefisien korelasi, r , sebesar 0,9999. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7 dan Tabel 6.

b. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi DHA sebesar 74,33 $\mu\text{g/g}$, sedangkan batas kuantitasnya sebesar 247,77 $\mu\text{g/g}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7.

c. Uji presisi

DHA dengan konsentrasi rendah, sedang dan tinggi, masing-masing 689,95 $\mu\text{g/g}$, 2051,45 $\mu\text{g/g}$, dan 4066,25 $\mu\text{g/g}$ memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 1,73%, 1,46%, dan 1,84%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8.

d. Uji perolehan kembali

Persentase uji perolehan kembali DHA untuk konsentrasi 419,694 µg, 524,618 µg, dan 629,542 µg berturut-turut adalah sebesar $(96,27 \pm 0,81)\%$, $(96,05 \pm 1,49)\%$, dan $(96,88 \pm 1,81)\%$. Rata-rata hasil uji perolehan kembali sebesar $(96,40 \pm 0,43)\%$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

4. Penetapan Kadar DHA dalam Susu

Kandungan DHA dalam kelima sampel susu formula bubuk yang diperiksa berturut-turut sebesar $(27,49 \pm 0,62)$ mg/100 g, $(31,14 \pm 0,43)$ mg/100 g, $(11,83 \pm 0,38)$ mg/100 g, $(19,34 \pm 0,58)$ mg/ 100 g, dan $(45,87 \pm 0,42)$ mg/100 g. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, dan Tabel 10.

B. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar DHA dalam susu formula bubuk untuk bayi dan anak. Sampel susu formula yang diteliti ini terdiri dari lima merek yang berbeda, dimana kandungan DHA pada label kemasannya bervariasi dari 7,8 mg/100 g sampai 43,5 mg/100 g.

Sebagian besar susu formula ditambahkan DHA sebagai ikon kecerdasan. DHA termasuk dalam golongan suplemen makanan, bukan

obat, sehingga pengawasan mutunya tidak begitu ketat. Pemberian DHA yang berlebihan pada bayi dapat menekan pembentukan asam arakidonat, prostaglandin, tromboksan, dan leukotrien sehingga dapat menyebabkan sel darah menjadi tipis, terhambatnya respon peradangan, memanjangnya masa pendarahan, dan menurunnya renin yang berperan dalam pengontrolan ginjal. Selain itu dapat juga terjadi reaksi alergi berupa dermatitis, batuk, dan gangguan pencernaan. Menurut WHO, kadar ideal untuk bayi normal maksimum 20 mg/kgBB/hari, sedangkan kadar ideal DHA untuk bayi prematur maksimum 40 mg/kgBB/hari (5).

DHA merupakan suatu asam lemak tak jenuh ganda yang mudah teroksidasi oleh cahaya dan udara. Oleh karena itu, proses analisisnya harus dilakukan secara tepat dan hati-hati. Sebelum kadarnya ditentukan dengan kromatografi gas, terlebih dahulu DHA perlu diekstraksi dari sampel dan diderivatisasi menjadi metil esternya. Langkah yang cukup rumit tersebut menjadi salah satu alasan dilakukannya penelitian ini.

1. Pencarian kondisi analisis optimum

Langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah mencari kondisi analisis DHA optimum dengan kromatografi gas. Kondisi analisis mempengaruhi resolusi serta faktor ikutan pada kromatogram. Resolusi yang semakin besar menunjukkan pemisahan senyawa yang semakin baik. Bila nilai resolusi lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik atau lebih dari 99,7% dan bila

nilai resolusi lebih kecil dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan tidak baik. Resolusi dipengaruhi efisiensi kolom dan efisiensi pelarut. Efisiensi kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram, sedangkan efisiensi pelarut menentukan posisi puncak kromatogram. Efisiensi kolom dapat dihitung dari jumlah plat teori atau harga HETP-nya. Efisiensi kolom semakin tinggi jika jumlah plat teori semakin besar atau harga HETP semakin kecil.

Optimasi kondisi analisis dilakukan secara isothermal dan dengan pemrograman suhu. Secara isothermal dilakukan pada suhu 120°C dan laju alir 1,35 ml/menit. Ternyata hasilnya tidak baik karena puncak yang dihasilkan melebar. Optimasi kondisi dengan cara pemrograman suhu memberi hasil yang jauh lebih baik. Pemrograman suhu ini dilakukan dengan 9 variasi kondisi, yaitu variasi suhu awal dan variasi laju alir. Secara teoritis, resolusi akan semakin baik dengan penurunan suhu. Di samping itu, kemungkinan penguraian sampel juga diperkecil. Akan tetapi penurunan suhu mengakibatkan waktu analisis lebih lama dan adsorpsi bertambah. Laju alir mempengaruhi waktu retensi zat. Idealnya digunakan laju alir optimum yang menghasilkan nilai HETP terendah. Laju alir hanya divariasikan sampai 2,00 ml/menit sebab jika digunakan laju alir yang terlalu besar maka kolom dapat rusak karena semakin besar laju alir semakin besar pula tekanannya.

Dari 10 kondisi analisis yang diuji, ternyata analisis secara pemrograman suhu dengan suhu awal 130°C dan laju alir 2,00 ml/menit menghasilkan jumlah plat teori yang paling besar. Dari suhu awal dinaikkan 2°C/menit sampai 230°C kemudian suhu ditahan selama 20 menit sampai kolom bersih atau tidak ada lagi puncak yang terbentuk. Suhu injektor diatur pada 230°C dan suhu detektor 250°C, split 1:3. Kondisi ini digunakan untuk percobaan selanjutnya.

2. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA

Karena jumlah standar DHA yang dimiliki sangat terbatas, yaitu sekitar 25 mg, maka digunakan DHA oil untuk dijadikan baku kerja untuk tahap selanjutnya. Standar DHA yang terbatas ini digunakan untuk membakukan DHA oil yang akan digunakan sebagai baku kerja tersebut. Untuk membakukan DHA dalam DHA oil, maka pertamanya dibuatlah kurva kalibrasi standar DHA untuk mendapatkan persamaan garis yang akan digunakan untuk memplot area yang didapatkan dari penetapan kadar DHA dalam DHA oil.

Pada pembuatan kurva kalibrasi standar DHA ini, dihubungkan 6 titik pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi DHA yang ditentukan yaitu 388,58 µg/g, 776,85 µg/g, 1552,5 µg/g, 2326,94µg/g, 3100,19 µg/g, dan 3872,23 µg/g. Persamaan garis kurva kalibrasi DHA yang didapat yaitu $y = -3349,651624 + 66,86540058x$ dengan koefisien korelasi, r , sebesar 0,9993. Harga koefisien korelasi yang diperoleh

menunjukkan hubungan yang linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan. Kurva kalibrasi yang diperoleh ini sudah cukup baik dan memenuhi syarat untuk penetapan kadar DHA oil.

3. Penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Penetapan kadar DHA oil dilakukan dengan memplot luas puncak yang dihasilkan ke dalam persamaan garis kurva kalibrasi standar DHA. Setelah diderivatisasi menjadi DHA metil ester, larutan DHA oil siap disuntikkan ke alat kromatografi gas. Dengan berorientasi pada kadar DHA yang tercantum dalam sertifikat analisis DHA oil yaitu 27,5%, maka disiapkan larutan DHA oil yang memiliki konsentrasi pada rentang kurva kalibrasi standar DHA.

Dari uji triplo yang dilakukan, didapatkan kadar DHA dalam DHA oil sebesar 22,76%. Hasil ini 17,24% lebih rendah dari kadar yang tertera dalam sertifikat analisis. Hal ini disebabkan karena DHA yang dikandung di dalam DHA oil telah teroksidasi dari jangka waktu sejak dibuatnya sertifikat analisis hingga digunakannya DHA oil pada percobaan ini yaitu lebih kurang 1 tahun. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa DHA adalah suatu asam lemak tak jenuh ganda yang mudah teroksidasi oleh cahaya dan udara, sehingga kadar yang menurun seiring berlalunya waktu sangat wajar terjadi.

4. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas DHA menggunakan DHA oil

Sebelum melakukan penetapan kadar sampel, metode yang digunakan perlu divalidasi. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi ini juga akan dipergunakan untuk menghitung kadar DHA dalam sampel. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya 5 konsentrasi analit yang berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat harus dipertimbangkan dengan seksama agar hasil pengukuran luas puncak sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut.

Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai sumbu x, sedangkan luas puncak DHA yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai nilai sumbu y.

Pembuatan kurva kalibrasi DHA ini dilakukan dengan menghubungkan 6 titik pada konsentrasi 344,50 µg/g, 689,95 µg/g, 2051,45 µg/g, 2727,07 µg/g, 3398,66 µg/g, dan 4066,25 µg/g. Persamaan garis yang didapatkan yaitu $y = -356,1393772 + 67,12064247x$, dengan nilai koefisien korelasi, r , sebesar 0,9999. Harga koefisien korelasi yang semakin mendekati 1 menunjukkan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram. Harga koefisien korelasi yang didapatkan dari

persamaan garis kurva kalibrasi ini memenuhi syarat linearitas validasi metode analisis sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk menghitung kadar DHA dalam sampel.

5. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Dengan memanfaatkan persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi yang telah diperoleh, batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi dan memberikan respon yang bermakna dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi ini merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Berdasarkan perhitungan secara statistik, diperoleh batas deteksi DHA sebesar 74,33 $\mu\text{g/g}$, sedangkan batas kuantitasnya sebesar 247,77 $\mu\text{g/g}$. Konsentrasi tersebut masih berada di bawah konsentrasi terkecil pada kurva kalibrasi sehingga kurva kalibrasi yang dibuat memenuhi syarat deteksi dan kuantitasi.

6. Uji presisi

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif 2% atau kurang. Akan tetapi

kriteria ini fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Koefisien variasi umumnya meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis.

Uji presisi pada penelitian ini dilakukan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi pada kurva kalibrasi yaitu 689,95 $\mu\text{g/g}$, 2051,45 $\mu\text{g/g}$, dan 4066,25 $\mu\text{g/g}$, masing-masing sebanyak enam kali. Pada ketiga konsentrasi tersebut, simpangan relatif atau koefisien variasinya kurang dari 2%, sehingga dapat disimpulkan metode analisis ini memenuhi kriteria seksama.

7. Uji perolehan kembali

Uji perolehan kembali merupakan cara untuk menentukan kecermatan hasil analisis suatu metode. Kecermatan atau akurasi adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Uji perolehan kembali dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu cara absolut dan adisi. Penelitian ini menggunakan cara absolut untuk uji perolehan kembali. Susu bubuk tanpa DHA digunakan sebagai blanko. Cara adisi sedapat mungkin dihindari karena kesalahan akan semakin besar akibat ketidakseksamaan hasil pengukuran sehingga nilai perolehan kembali zat yang dianalisis menjadi jauh dari nilai sebenarnya.

Idealnya, kadar dalam setiap sampel dibuat uji perolehan kembalinya agar penetapan kadarnya menjadi lebih akurat. Umumnya,

makin kecil kadar analit dalam sampel, makin kecil pula persentase perolehan kembalinya. Namun, dalam proses ekstraksi dapat pula terjadi hal sebaliknya apabila terjadi kejenuhan dalam melarutkan analit dalam pelarut yang digunakan, sehingga tidak seluruh analit dapat terbawa dalam pelarut tersebut. Jumlah sampel yang diperiksa juga mempengaruhi hasil perolehan kembali. Semakin banyak jumlah sampel, semakin banyak pula zat pengganggu yang ada, sehingga hasil perolehan kembalinya mungkin saja lebih rendah.

Umumnya konsentrasi analit yang dibuat untuk uji perolehan kembali adalah 80, 100, dan 120% dari kadar analit yang diperkirakan terdapat dalam setiap sampel. Kadar DHA dalam sampel sangat bervariasi, yaitu dari 0,008 – 0,043%. Sebelumnya peneliti telah melakukan uji perolehan kembali dari setiap kadar DHA dalam sampel. Karena hasilnya tidak berbeda secara bermakna, maka hanya salah satu kadar DHA dalam sampel yang dibuat uji perolehan kembalinya pada konsentrasi 80, 100, dan 120%, yaitu kadar 0,025%.

Banyaknya DHA yang ditambahkan dalam uji perolehan kembali ini yaitu 419,69 µg, 524,62 µg, dan 629,54 µg. Rata-rata hasil uji perolehan kembali pada ketiga konsentrasi ini sebesar $(96,40 \pm 0,43)\%$. Hasil ini termasuk cukup akurat mengingat kadarnya dalam sampel hanya 0,025%. Untuk analit pada matriks sampel dengan konsentrasi lebih besar atau sama dengan 0,1%, rata-rata persen

perolehan kembali yang dikategorikan akurat adalah 95% hingga 105%, sedangkan untuk konsentrasi kurang dari 0,1% tetapi lebih besar atau sama dengan 0,01%, rata-rata persen uji perolehan kembali yang diperbolehkan adalah 90% sampai 110%.

8. Penetapan kadar DHA dalam sampel susu

Kelima sampel susu formula bubuk yang diperiksa mengandung DHA dengan kadar yang bervariasi. Sampel susu tersebut mencantumkan kadar DHA yang dikandung dalam label kemasan produknya. Pada kemasan, sampel susu tersebut mengandung DHA masing-masing 30,0 mg/100 g untuk sampel A, 20,0 mg/100 g untuk sampel B, 7,8 mg/100 g untuk sampel C, 8,2 mg/100 g untuk sampel D, dan 43,5 mg/100 g untuk sampel E.

Menurut WHO, kadar ideal untuk bayi normal maksimum 20 mg/kgBB/hari, sedangkan kadar ideal DHA untuk bayi prematur maksimum 40 mg/kgBB/hari (5). Sebagian besar bayi yang diberi susu formula adalah bayi berusia 6 bulan ke atas karena bayi 6 bulan ke bawah harus diberi ASI eksklusif.

Dari kelima sampel yang diperiksa, tiga sampel di antaranya mengandung DHA lebih besar secara bermakna dari yang tertera pada label kemasan. Sampel A mengandung DHA ($27,46 \pm 0,62$) mg/100 g, lebih kecil 8,36% dari kadar yang tercantum pada label kemasan. Sampel B mengandung DHA ($31,14 \pm 0,43$) mg/100 g, lebih

besar 55,68% dari kadar yang tercantum pada label kemasan. Sampel C mengandung DHA ($11,83 \pm 0,38$) mg/100 g, lebih besar 51,70% dari yang tercantum pada label kemasan. Sampel D mengandung DHA ($19,34 \pm 0,58$) mg/ 100 g, lebih besar 136,44% dari kadar pada kemasan. Sedangkan sampel E mengandung DHA ($45,87 \pm 0,42$) mg/100 g, lebih besar 5,44% dari kadar yang tercantum pada label kemasan.

