





Gambar 1. Alat kromatografi gas

Keterangan:

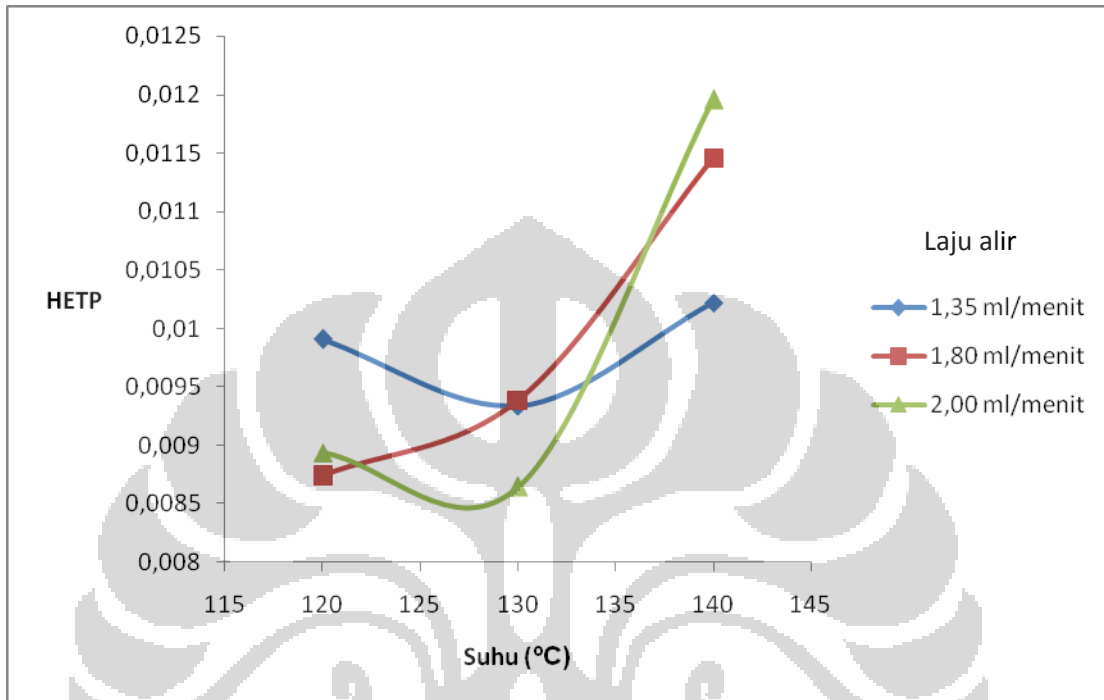
- A. Unit utama
- B. Sistem kontrol



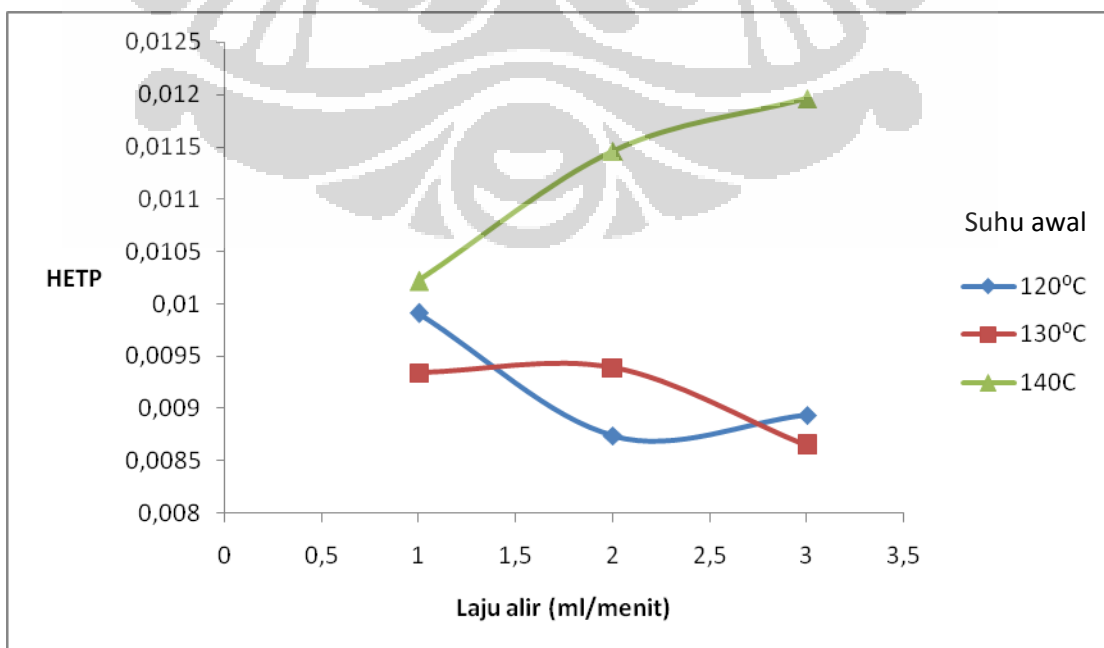
Gambar 2. Kromatogram larutan standar DHA 1552,5  $\mu\text{g/g}$

Kondisi:

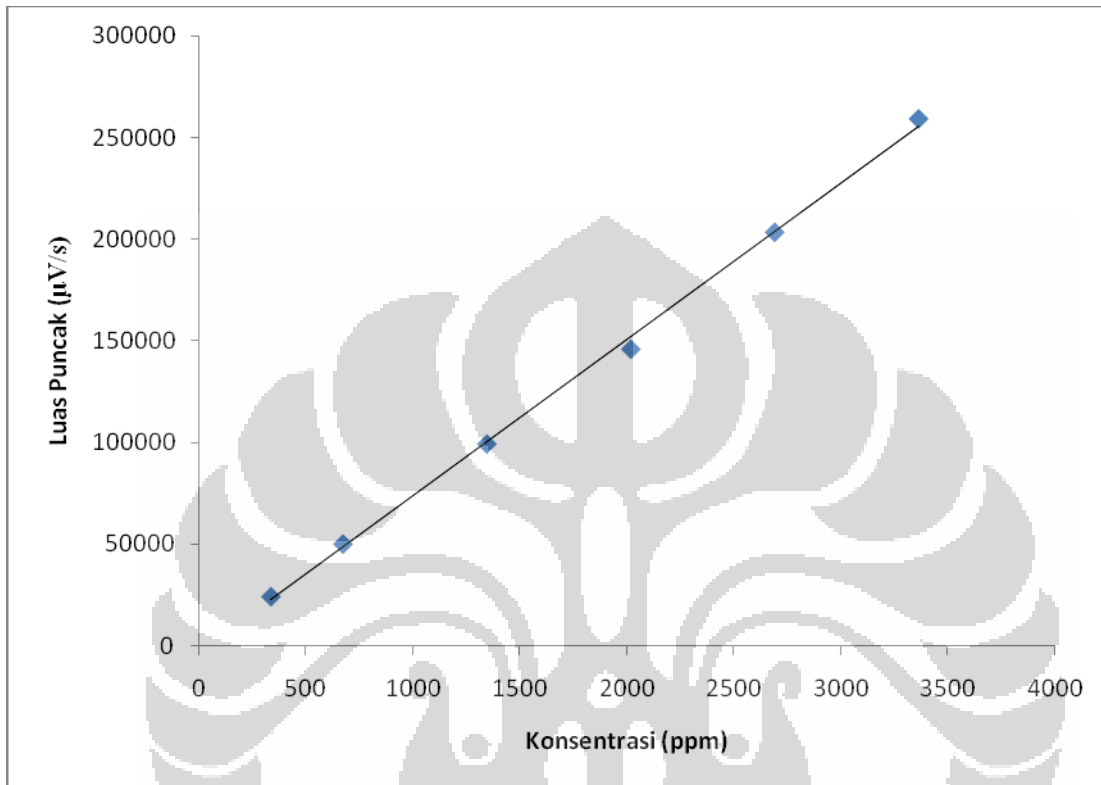
Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .



Gambar 3. Grafik hubungan suhu awal kolom dengan HETP



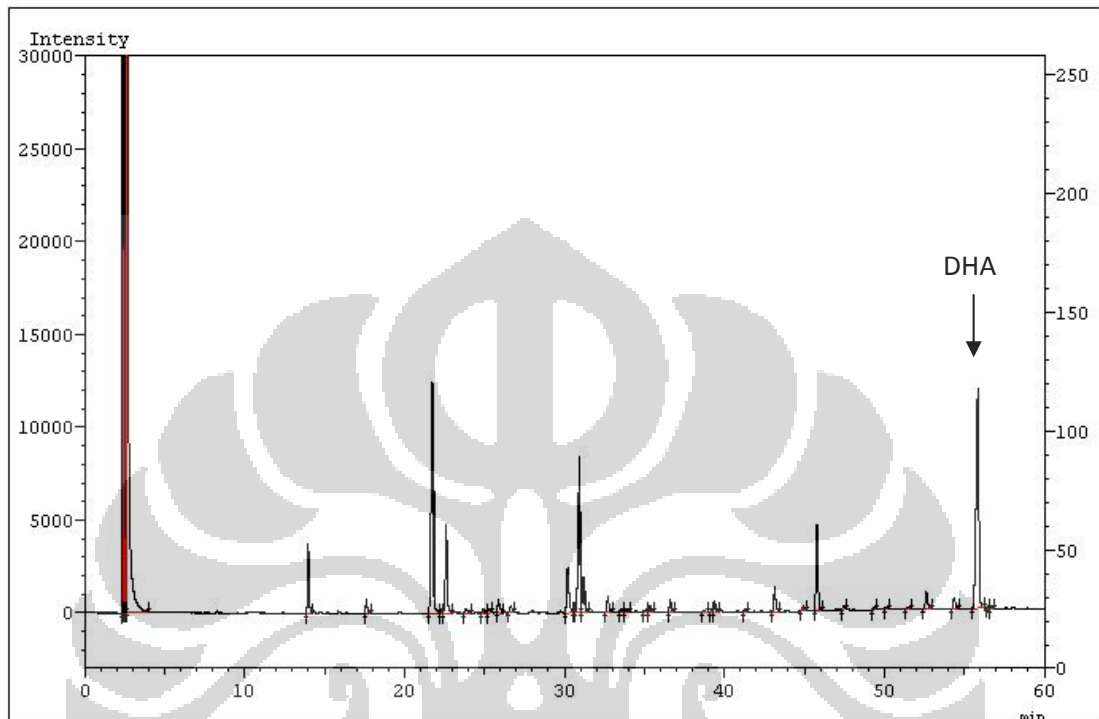
Gambar 4. Grafik hubungan laju alir dengan HETP



Gambar 5. Kurva kalibrasi standar DHA

Keterangan:

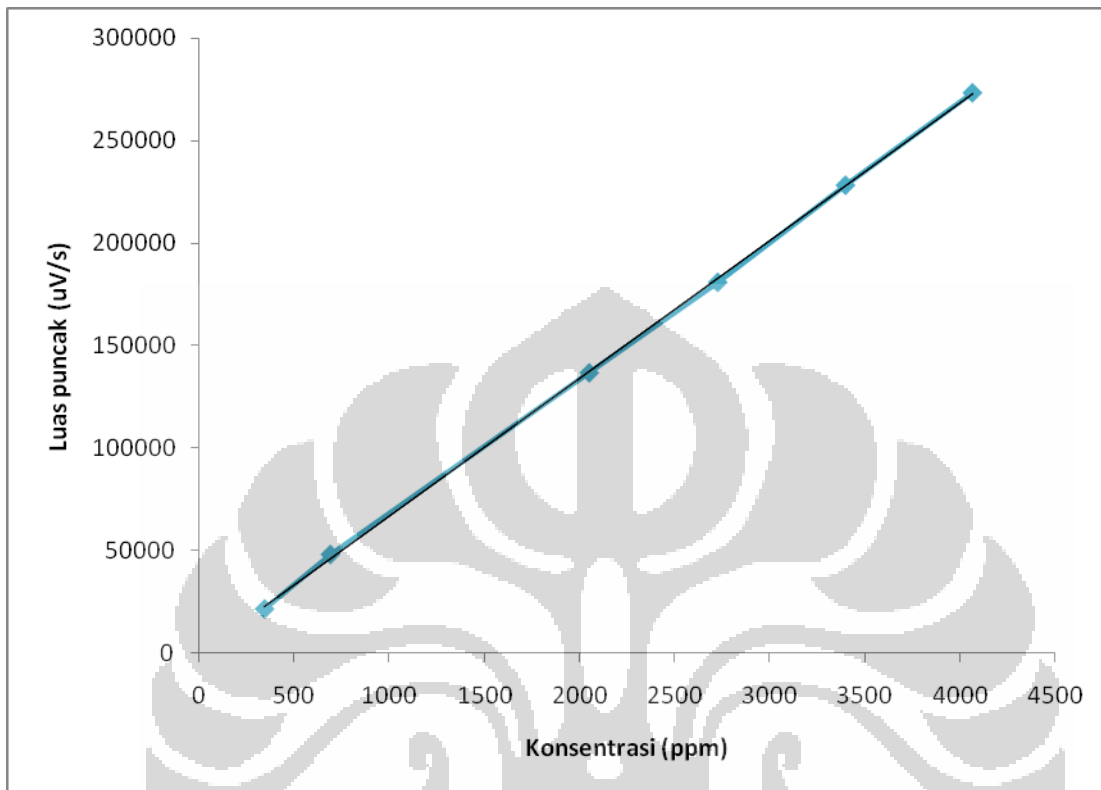
Persamaan kurva kalibrasi DHA yaitu  $y = -3349,651624 + 66,86540058x$  dengan koefisien korelasi,  $r$ , adalah 0,9993.



Gambar 6. Kromatogram larutan DHA oil 7186,2  $\mu\text{g/g}$

Kondisi:

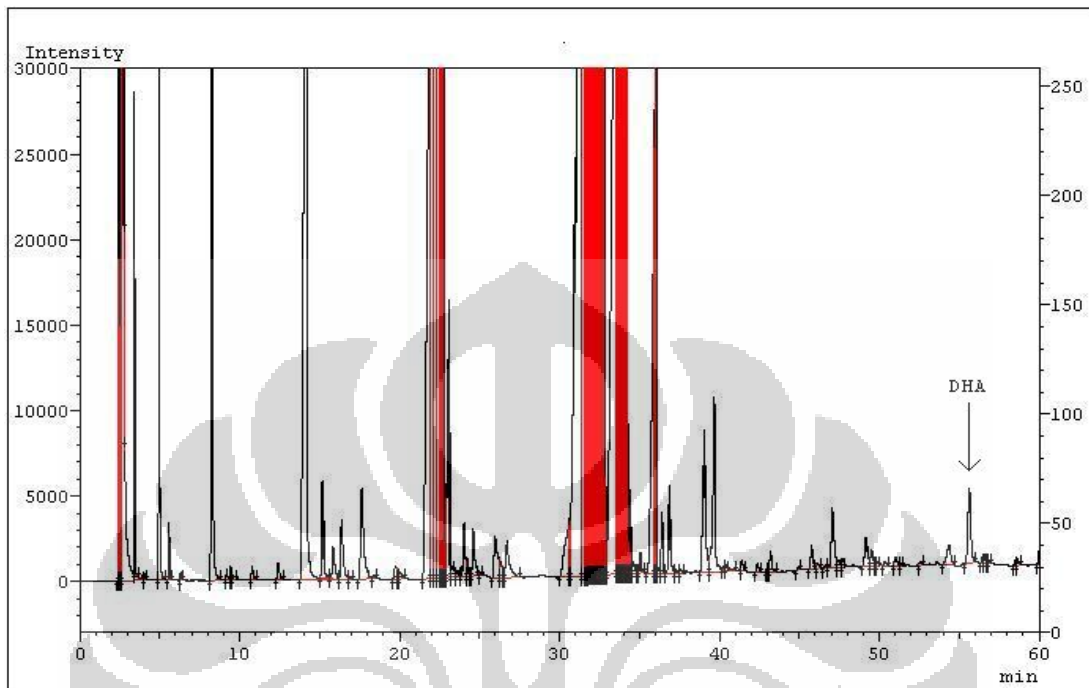
Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .



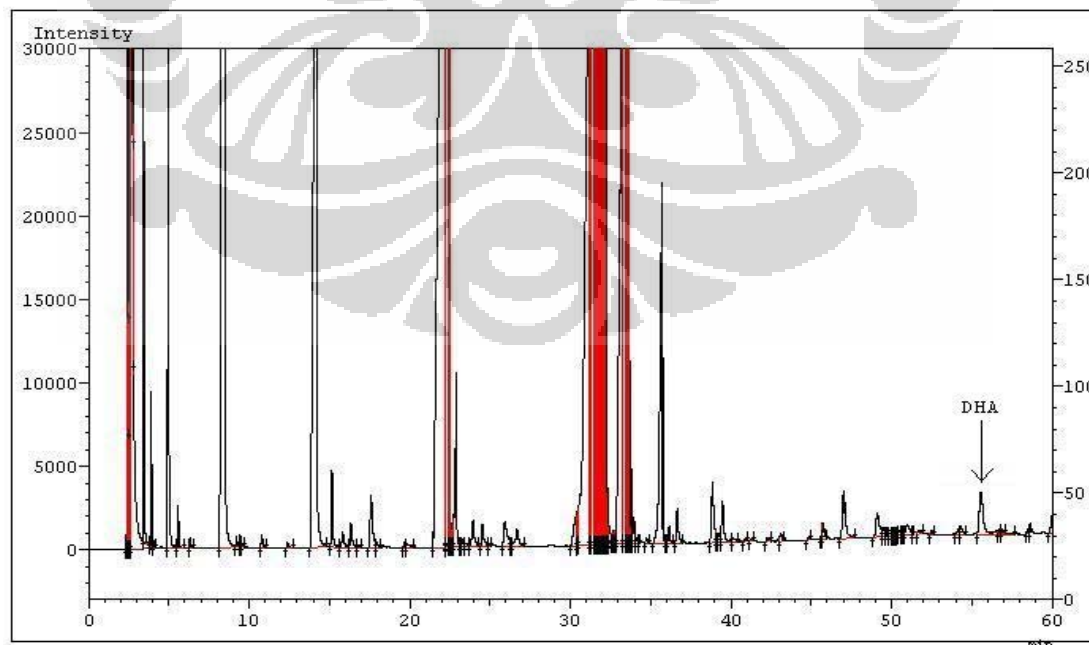
Gambar 7. Kurva Kalibrasi DHA dalam DHA oil

Keterangan:

Persamaan kurva kalibrasi  $y = -356,1393772 + 67,12064247x$ ,  
dengan nilai koefisien korelasi,  $r$ , sebesar 0,9999.

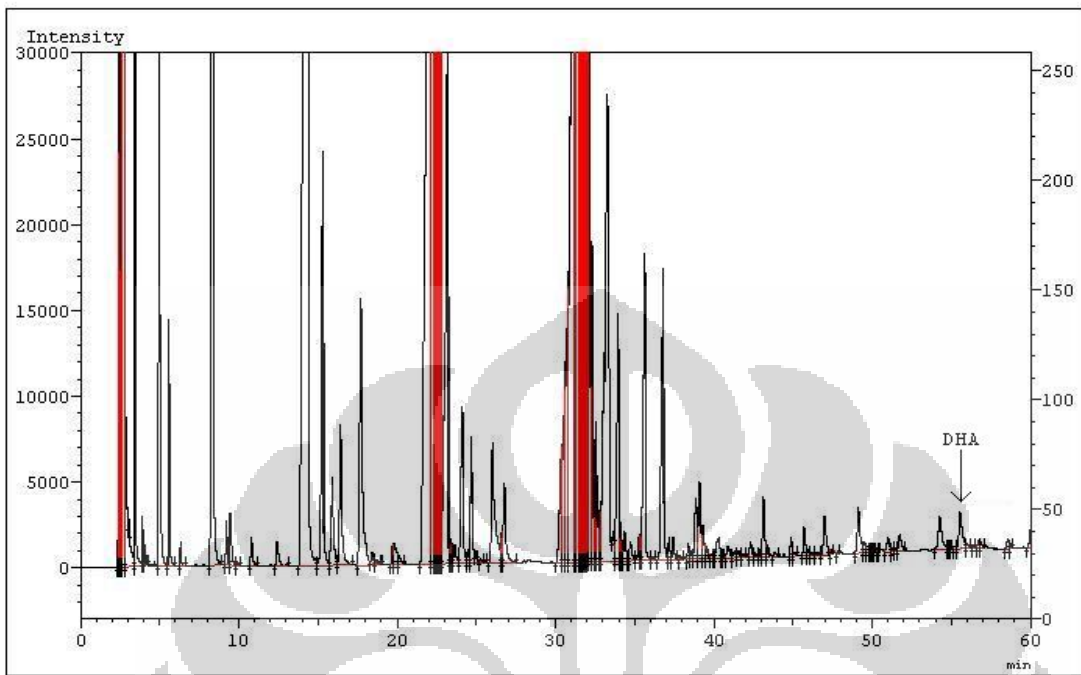


Gambar 8a. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula A

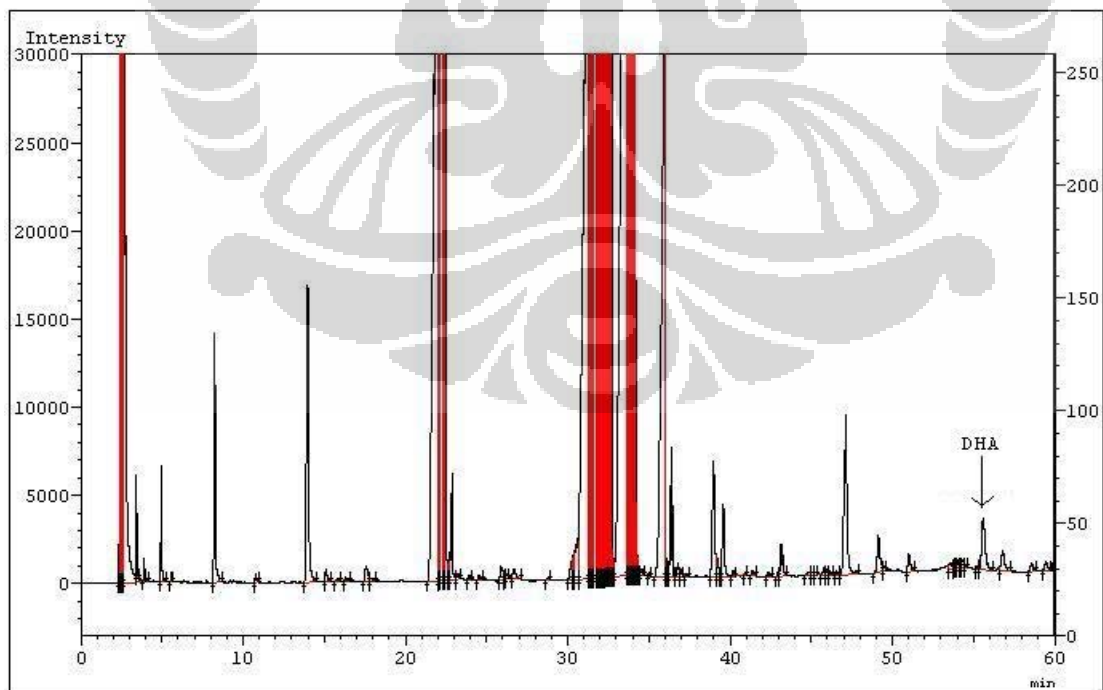


Gambar 8b. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula B

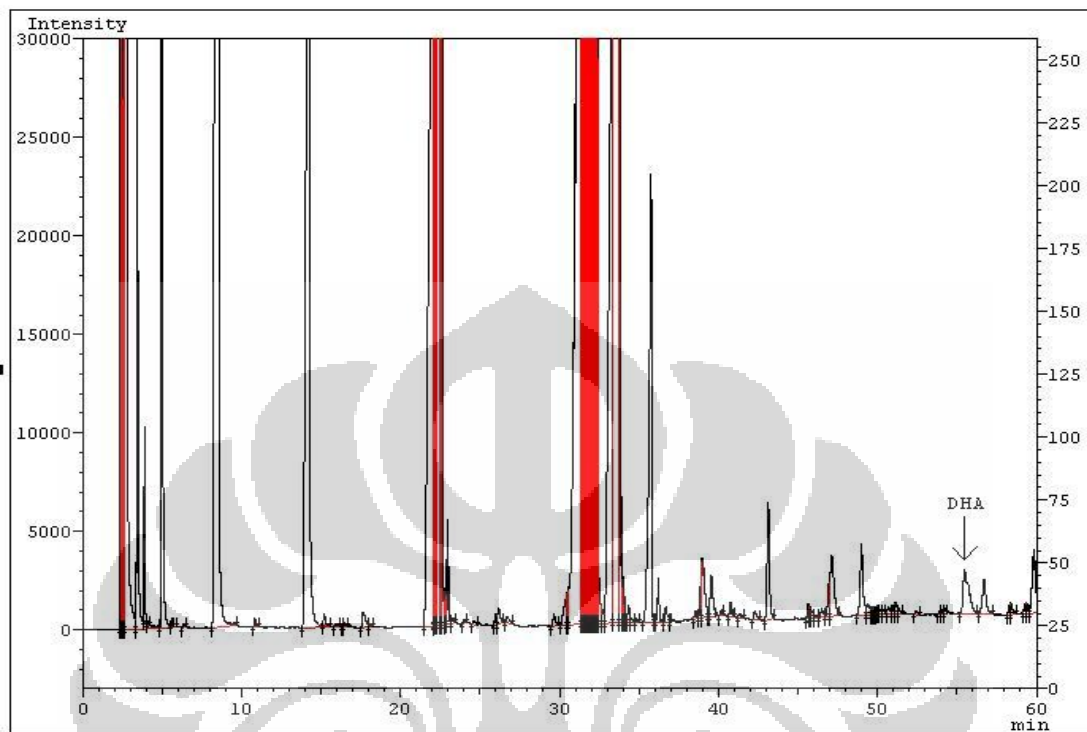




Gambar 8c. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula C



Gambar 8d. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula D



Gambar 8e. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula E

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu$ m), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikan 1,0  $\mu$ L.



# Taboei

Tabel 3

Pemilihan kondisi analisis DHA optimum secara kromatografi gas

	Suhu awal (°C)	Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Jumlah Plat teori	HETP
Suhu	120	1,35	68,200	605654,984	0,00991
terprogram	120	1,80	63,468	686485,845	0,00874
dari suhu	120	2,00	62,116	671114,224	0,00894
awal naik	130	1,35	62,686	638605,624	0,00934
2°C/menit	130	1,80	57,996	639246,648	0,00939
sampai	<b>130</b>	<b>2,00</b>	<b>56,592</b>	<b>693799,411</b>	<b>0,00865</b>
230°C lalu	140	1,35	56,731	587010,084	0,01022
ditahan 20	140	1,80	52,439	523527,926	0,01146
menit	140	2,00	51,029	501615,256	0,01196
Isotermal	200	1,35	68,280	-	-

Tabel 4

Hasil pengukuran standar DHA untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/g}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V/s}$ )
388,58	24495
776,85	50342
1552,50	99519
2326,94	146129
3100,19	203598
3872,23	259360

Konsentrasi larutan standar DHA yang digunakan 2690  $\mu\text{g/mL}$

Persamaan garis kurva kalibrasi :  $y = -3349,651624 + 66,86540058x$

$$r = 0,9993$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130 $^{\circ}\text{C}$  naik 2 $^{\circ}\text{C}$ /menit sampai 230 $^{\circ}\text{C}$  lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 5  
 Hasil penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kadar dalam DHA oil (%)	Kadar rata-rata (%)
133947	2389,711	23,78	
133956	2389,868	23,78	22,76
133573	2383,201	23,72	

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 10490  $\mu\text{g/mL}$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130 $^{\circ}\text{C}$  naik 2 $^{\circ}\text{C}$ /menit sampai 230 $^{\circ}\text{C}$  lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 6

Hasil pengukuran DHA dalam DHA oil untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/g}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V/s}$ )
344,50	21668
689,95	48238
2051,45	136502
2727,07	180966
3398,66	228314
4066,25	273395

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 10490  $\mu\text{g/mL}$

Persamaan garis kurva kalibrasi :  $y = -356,1393772 + 67,12064247x$

$$r = 0,9999$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130 $^{\circ}\text{C}$  naik 2 $^{\circ}\text{C}$ /menit sampai 230 $^{\circ}\text{C}$  lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 7  
Perhitungan secara statistik untuk menentukan batas deteksi  
dan batas kuantitasi DHA

Konsentrasi ( $\mu\text{g/g}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V/s}$ )	$y_i$	$(y - y_i)^2$
344,50	21668	22766,92	1207629,46
689,95	48238	45953,75	5217807,68
2051,45	136502	137338,50	699736,63
2727,07	180966	182686,55	2960296,03
3398,66	228314	227764,10	302386,31
4066,25	273395	272573,17	675399,51
Jumlah			11063255,62

$$S (y/x) = 1663,07$$

$$\text{Batas deteksi} = 74,33 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Batas kuantitasi} = 247,77 \mu\text{g/g}$$



Tabel 8

Hasil pengukuran DHA dalam DHA oil untuk data presisi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/g}$ )	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )	Konsentrasi pengukuran ( $\mu\text{g/g}$ )	Konsentrasi rata-rata ( $\mu\text{g/g}$ )	Simpangan baku ( $\mu\text{g/g}$ )	Koefisien variasi (%)
689,95	49277	739,462	721,164	12,4506	1,73
	47014	705,746			
	48238	723,982			
	47500	712,987			
	47603	714,507			
	48662	730,299			
2051,45	130731	1953,008	1975,261	28,7647	1,46
	133947	2000,922			
	133956	2001,056			
	131826	1969,322			
	129315	1931,911			
	133573	1995,349			
4066,25	271621	4052,064	4110,744	75,5626	1,84
	273395	4078,494			
	282373	4212,253			
	280094	4178,299			
	269217	4016,248			
	276658	4127,108			

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 10490  $\mu\text{g/mL}$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130 $^{\circ}\text{C}$  naik 2 $^{\circ}\text{C}$ /menit sampai 230 $^{\circ}\text{C}$  lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 9  
Hasil uji perolehan kembali

DHA yang ditambahkan( $\mu\text{g}$ )	Berat total ekstrak(mg)	Berat ekstrak diesterifikasi (mg)	Hasil yang diperoleh			
			Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )	DHA yang diperoleh ( $\mu\text{g}$ )	Persentase UPK (%)	Persentase UPK rata-rata (%)
419,694	292,2	160,2	29299	407,928	97,20	96,27
	292,6	154,7	28158	402,315	95,86	
	302,2	155,3	27293	401,834	95,74	
524,618	276,7	156,9	38461	512,903	97,77	96,05
	278,1	155,5	37059	499,957	95,30	
	282,8	151,6	35716	498,857	95,09	
629,542	271,4	150,6	44403	596,784	94,80	96,88
	280,4	161,1	46536	616,623	97,95	
	285,3	157,6	45022	616,342	97,90	

Rata-rata hasil uji perolehan kembali = 96,40%

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 9220  $\mu\text{g/mL}$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130 $^{\circ}\text{C}$  naik 2 $^{\circ}\text{C}$ /menit sampai 230 $^{\circ}\text{C}$  lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 10

Hasil penetapan kadar DHA dalam sampel susu formula

Sampel	Berat yang ditimbang (g)	Berat ekstrak total (mg)	Berat ekstrak diesterifikasi (mg)	Hasil yang diperoleh			Kadar pada kemasan (mg/100 g)
				Luas puncak (uV/s)	Konsentrasi ( $\mu\text{g/g}$ )	Kadar (mg/100 g)	
A	2	371,2	302,1	46642	689,592	27,46	30,0
		383,1	313,3	45125	666,991	26,89	
		380,8	287,7	45380	670,790	28,13	
B	2	249,6	147,6	50954	753,835	31,46	20,0
		258,9	159,1	50403	745,625	30,64	
		252,7	150,6	50789	751,376	31,31	
C	3	356,2	202,8	25334	372,134	11,96	7,8
		342,2	197,2	24722	363,016	11,41	
		329,7	207,7	28158	414,207	12,14	
D	3	441,5	327,4	44655	659,989	19,98	8,2
		413,5	303,9	44101	651,735	19,21	
		437,1	321,1	42120	622,221	18,83	
E	1,5	394,9	296,2	54080	800,407	45,69	43,5
		397,2	297,9	53796	796,176	45,57	
		391,3	293,5	55080	815,306	46,34	

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130<sup>0</sup>C naik 2<sup>0</sup>C/menit sampai 230<sup>0</sup>C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0  $\mu\text{L}$ .



# Lampiran

## Lampiran 1

## Cara menghitung konsentrasi akhir DHA setelah esterifikasi

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Berat standar yang ditimbang (mg)}}{\text{Volume larutan yang dibuat (mL)}} \times 1000 \mu\text{g} \times \text{kadar DHA}$$

dalam standar x volume pipet (mL) ÷ berat fase atas (g)

Keterangan :

Kadar DHA dalam standar = 100% untuk standar DHA murni atau  
22,76% untuk DHA oil

Berat fase atas = berat standar dalam larutan teresterifikasi + berat 0,4 ml  
toluen (BJ = 0,865 g/mL)

$$\text{Berat standar dalam larutan teresterifikasi} = \frac{\text{Berat standar yang ditimbang (mg)}}{\text{Volume larutan yang dibuat (mL)}} \times \text{volume pipet (mL)} \div 1000 \text{ g}$$

Contoh :

$$\begin{aligned} \text{Berat fase atas} &= \left( \frac{26,9 \text{ mg}}{10,0 \text{ mL}} \times 0,05 \text{ mL} \div 1000 \right) + (0,4 \text{ mL} \times 0,865 \text{ g/mL}) \\ &= 0,3461345 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi} &= \frac{26,9 \text{ mg}}{10,0 \text{ mL}} \times 1000 \times 100\% \times 0,05 \text{ ml} \div 0,3461 \text{ g} \\ &= 388,58 \mu\text{g/g} \end{aligned}$$

## Lampiran 2

## Cara memperoleh persamaan garis linier

Persamaan garis  $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai  $a$  dan  $b$  digunakan metode kuadrat terkecil (least square)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N \sum xi^2 - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi \cdot yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi ( $r$ )

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

## Lampiran 3

## Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

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

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

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

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi DHA :  $y = -356,1393772 + 67,12064247x$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{(21668 - 22766,92)^2 + \dots + (273395 - 272573,17)^2}{6 - 2}}$$

$$= 1663,07$$

$$\text{Batas deteksi DHA : LOD} = \frac{3 \times 1663,07}{67,12064247}$$

$$= 74,33 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Batas kuantitasi : LOQ} = \frac{10 \times 1578,98}{67,12064247}$$

$$= 247,77 \mu\text{g/g}$$

## Lampiran 4

## Cara perhitungan kadar DHA dalam DHA oil

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Luas puncak} + 3349,651624}{66,85640058} \times \frac{\text{Berat fase atas (g)}}{\text{Volume pemipetan (mL)}}$$

$$\text{Kadar} = \frac{\text{Konsentrasi DHA } (\mu\text{g/mL})}{\text{Konsentrasi DHA oil } (\mu\text{g/mL})} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat fase atas = berat DHA oil dalam larutan teresterifikasi + berat 0,4 ml toluen (BJ = 0,865 g/mL)

Contoh:

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi DHA} &= \frac{133947 + 3349,651624}{66,85640058} \times \frac{(0,003147 + 0,346)}{0,3} \\ &= 2389,711 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar DHA dalam DHA oil} &= \frac{2389,711}{10490} \times 100\% \\ &= 22,78\% \end{aligned}$$



## Lampiran 5

## Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

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

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

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

Contoh :

Hasil pengukuran standar DHA untuk data presisi:

Konsentrasi rata-rata = 721,1637 µg/g

$$SB = \sqrt{\frac{(721,7665 - 740,3381)^2 + \dots + (721,7665 - 631,0384)^2}{6 - 1}}$$

$$= 12,4506$$

$$KV = \frac{12,4506}{721,1637} \times 100\%$$

$$= 1,73\%$$

## Lampiran 6

## Cara perhitungan uji perolehan kembali

DHA yang ditambahkan = Konsentrasi larutan DHA oil x kadar DHA dalam  
DHA oil x volume pemipetan (mL)

$$\text{DHA yang diperoleh} = \frac{\text{Luas puncak} + 356,1393772}{67,12064247} \times \frac{Wt}{We} \times \text{berat fase atas}$$

$$\text{Persentase UPK} = \frac{\text{DHA yang diperoleh } (\mu\text{g})}{\text{DHA yang ditambahkan } (\mu\text{g})} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat fase atas = berat ekstrak yang dimetilasi + berat 0,40 ml toluen (g) (BJ)  
toluen = 0,865 g/ml)

Wt = berat ekstrak total (mg)

We = berat ekstrak yang dimetilasi (mg)

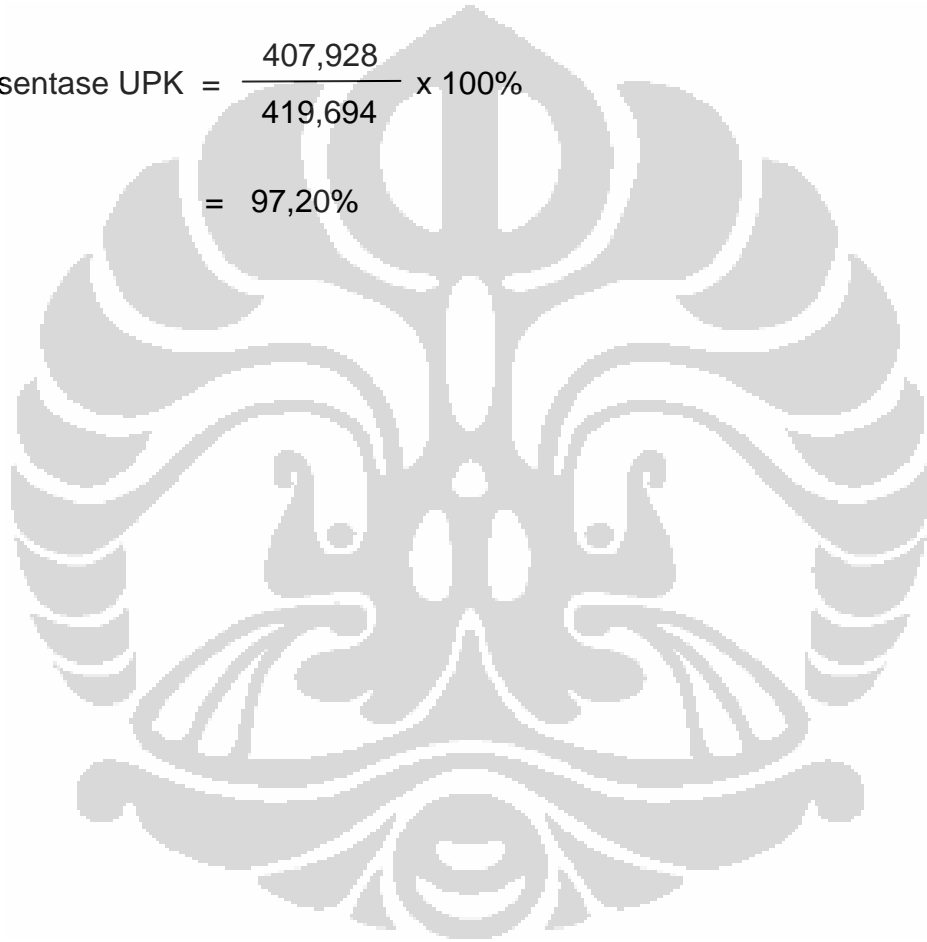
Contoh:

$$\begin{aligned} \text{DHA yang ditambahkan} &= 9220 \mu\text{g/mL} \times 22,76\% \times 0,2 \text{ mL} \\ &= 419,694 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Luas puncak yang didapat = 29299

$$\begin{aligned} \text{DHA yang diperoleh} &= \frac{29299 + 356,1393772}{67,12064247} \times \frac{292,2}{160,2} \times (0,1602 + 0,346) \\ &= 407,928 \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Persentase UPK} &= \frac{407,928}{419,694} \times 100\% \\ &= 97,20\% \end{aligned}$$



## Lampiran 7

## Cara perhitungan kadar DHA dalam sampel

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Luas puncak} + 356,1393772}{67,12064247} \mu\text{g/g}$$

$$\text{Kadar} = \text{Konsentrasi} (\mu\text{g/g}) \times \frac{W_t}{W_e} \times \text{berat fase atas} \div \frac{\text{Berat sampel (g)} \times 1000}{100 \text{ g}}$$

Keterangan :

Berat fase atas = berat ekstrak yang dimetilasi + berat 0,40 ml toluen (g) (BJ  
toluen = 0,865 g/ml)

$W_t$  = berat ekstrak total (mg)

$W_e$  = berat ekstrak yang dimetilasi (mg)

Contoh:

Luas puncak yang didapat = 46642

$$\text{Konsentrasi} = \frac{46642 + 356,1393772}{67,12064247}$$

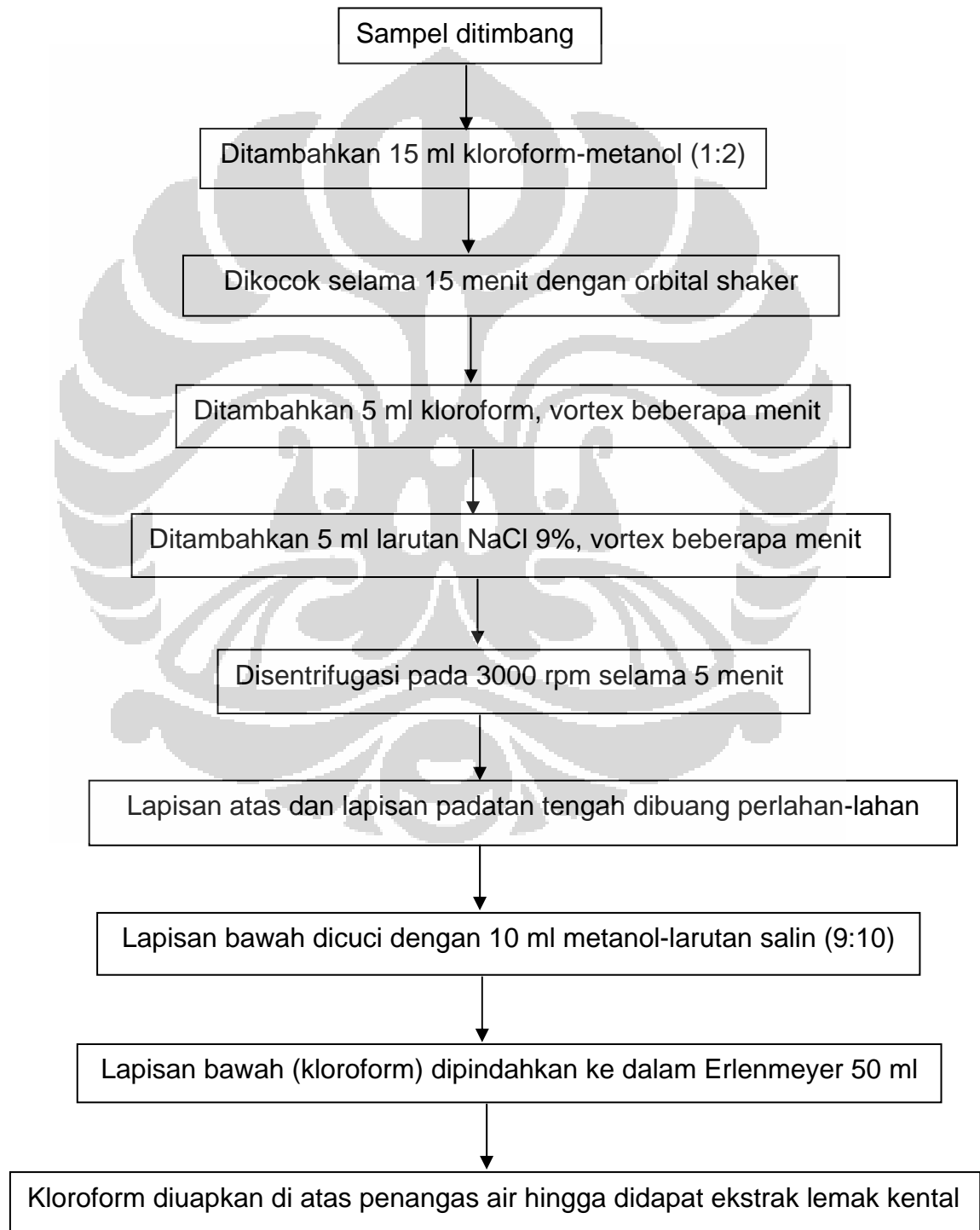
$$= 689,592 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Kadar} = 689,592 \times \frac{371,2}{302,1} \times (0,3021 + 0,346) \div \frac{2 \times 1000}{100 \text{ g}}$$

$$= 27,46 \text{ mg}/100\text{g}$$

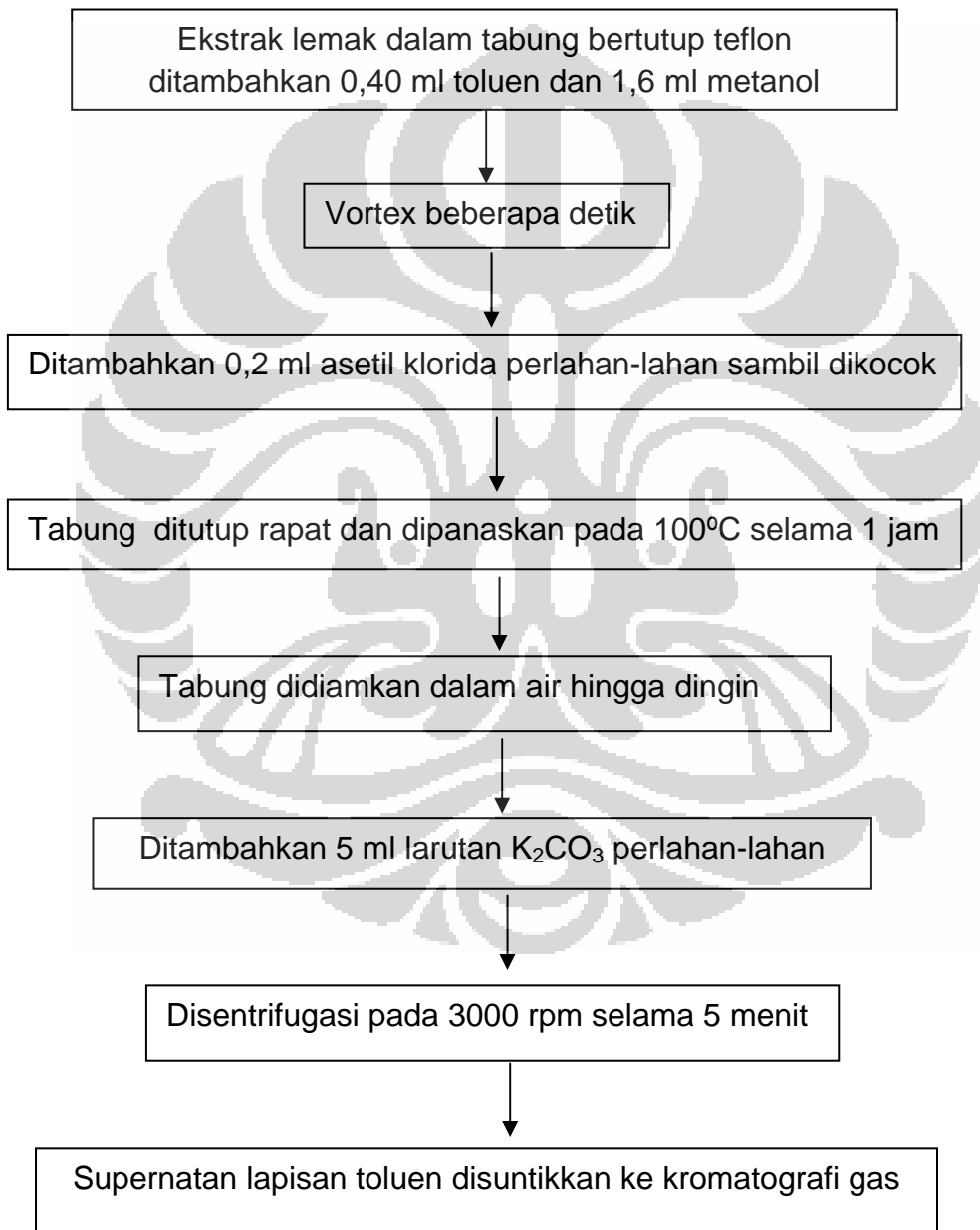
## Lampiran 8

## Skema kerja ekstraksi sampel



## Lampiran 9

## Skema kerja esterifikasi lemak



## Lampiran 10

## Sertifikat analisis standar DHA



**SIGMA-ALDRICH**

---

**Certificate of Analysis**

<b>Product Name</b>	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, ≥98%	
<b>Product Number</b>	D2534	
<b>Product Brand</b>	Sigma	
<b>CAS Number</b>	6217-54-5	
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Molecular Weight</b>	328.49	
<b>Storage Temp</b>	-20°C	

<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT 017K1123 RESULTS</b>
<b>APPEARANCE</b>	CLEAR COLORLESS TO FAINT YELLOW OIL	CLEAR COLORLESS LIQUID
<b>IR SPECTRUM</b>	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
<b>PURITY BY GAS</b>	MINIMUM 98%	99.5%
<b>QC RELEASE DATE</b>		APRIL 2007




Rodney Burbach, Supervisor  
Analytical Services  
St. Louis, Missouri USA

## Lampiran 11

## Sertifikat DHA oil

CERTIFICATE OF ANALYSIS


Feb. 19, 2007


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

DHA27 (DOCOSAHEXAENOIC ACID 27%)

Lot Number: 611151 ✓

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

  
 Takahiro Noguchi  
 Manager of Quality Control Div. of ISIFHARA Plant