

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Susu

Susu adalah hasil pemerahan dari ternak sapi perah atau dari ternak menyusui lainnya yang diperah secara kontinu dan komponen-komponennya tidak dikurangi dan tidak ditambahkan bahan-bahan lain. Komponen utama susu terdiri dari air, protein, lemak, karbohidrat, mineral, dan vitamin. Komponen-komponen lainnya yang terkandung dalam susu yang jumlahnya sedikit tetapi penting antara lain lesitin, kolesterol, dan asam-asam organik (10).

Tabel 1. Komposisi rata-rata susu sapi (10)

Komposisi	Kadar
Air, %	83.3
Protein, %	3.2
Lemak, %	4.3
Karbohidrat, %	3.5
Kalium, mg/100g	4.3
Kalsium, mg/100g	143.3
Fosfor, mg/100g	60.0
Besi, mg/100g	1.7
Vitamin A, SI	130.0
Vitamin B1, mg/100g	0.3
Vitamin C, mg/100g	1.0

## 1. Komposisi Susu

### a. Lemak Susu

Lemak tersusun dari trigliserida yang merupakan gabungan gliserol dan asam-asam lemak. Dalam lemak susu terdapat 60-75% lemak yang bersifat jenuh, 25-30% lemak yang bersifat tak jenuh dan sekitar 4% merupakan asam lemak tak jenuh ganda. Komponen mikro lemak susu antara lain adalah fosfolipid, sterol, tokoferol (vitamin E), karoten, serta vitamin A dan D (10).

### b. Protein susu

Kadar protein dalam air susu rata-rata 3,2% yang terdiri dari: 2,7% casein (bahan keju), dan 0,5% albumin. Berarti 26,5% dari bahan kering air susu adalah protein. Protein dalam air susu juga merupakan penentu kualitas air susu sebagai bahan konsumsi. Albumin ditemukan 5 gram per kg air susu, dalam keadaan larut. Dalam pembentukan keju, albumin memisah dalam bentuk whey. Pada suhu 64°C albumin mulai menjadi padat, sifat ini identik dengan sifat protein pada telur (10).

### c. Laktosa

Laktosa adalah bentuk karbohidrat yang terdapat di dalam air susu. Bentuk ini tidak terdapat dalam bahan-bahan makanan yang lain. Kadar laktosa di dalam air susu adalah 4,6% dan

ditemukan dalam keadaan larut. Laktosa terbentuk dari dua komponen gula yaitu glukosa dan galaktosa. Sifat air susu yang sedikit manis ditentukan oleh laktosa. Kadar laktosa dalam air susu dapat dirusak oleh beberapa jenis kuman pembentuk asam susu (10).

d. Mineral

Bila air pada susu dihilangkan dengan penguapan dan sisa yang kering dibakar pada panas rendah akan diperoleh sisa abu putih yang berisi bahan-bahan mineral. Kalsium dan fosfor dari abu ini menarik perhatian khusus sebab mempunyai nilai gizi yang penting dan karena kalsium fosfat merupakan bagian dari partikel kasein dan mempengaruhi sifat partikel ini terhadap penggumpalan oleh renin, panas dan asam. Mineral lain terdapat dalam jumlah yang sangat sedikit (*trace mineral*), contohnya adalah besi, tembaga, aluminium, boron, seng, mangan dan silikon (10).

e. Vitamin dan enzim

Kadar vitamin di dalam air susu tergantung dari jenis makanan yang diperoleh ternak sapi dan waktu laktasinya. Vitamin yang terdapat dalam lemak yaitu A, D, E, dan K. Vitamin yang larut dalam air susu yang terpenting adalah vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>,

asam nikotinat dan asam pantotenat. Bila air susu dipanaskan/dimasak, dipasteurisasi atau disterilisasi maka 10-30% vitamin B<sub>1</sub> akan hilang, vitamin C akan hilang 20-60% (10).

Enzim berfungsi untuk mengolah suatu bahan menjadi bahan lain dengan jalan autolisis. Enzim yang terkenal adalah peroksidase, reduktase, katalase dan fosfatase. Dengan adanya pemanasan, enzim tidak akan berfungsi lagi (10).

## 2. Produk-produk susu

Proses pengolahan susu bertujuan untuk memperoleh produk olahan susu yang beraneka ragam, berkualitas tinggi, bergizi tinggi, tahan simpan, mempermudah pemasaran dan transportasi, sekaligus meningkatkan nilai tukar dan daya guna bahan mentahnya (10).

### a. Susu segar

Susu segar adalah susu dari sapi, kerbau, kuda, kambing atau domba yang sehat dan tidak tercampur kolostrum. Demi menjaga keamanan pangan, susu segar yang akan diminum langsung sebaiknya diproses terlebih dulu. Caranya, dengan memanaskannya hingga mencapai suhu 70-80°C selama 5-10 menit. Jadi, jangan sampai mendidih agar emulsi susu tidak pecah (10).

b. Susu homogen

Susu homogen adalah susu yang telah diproses untuk memecah butiran lemak sedemikian rupa sehingga setelah 48 jam penyimpanan tanpa adanya gangguan pada suhu 10-15°C tidak terjadi pemisahan krim pada susu. Susu homogen menjadi lebih mudah tergumpalkan oleh panas dan asam karena jumlah butiran lemak yang meningkatkan daerah permukaannya menjadi lebih luas. Susu homogen lebih mudah mengalami aktivitas lipase dan lebih mudah menjadi tengik (10).

c. Susu Pasteurisasi

Susu pasteurisasi adalah susu segar yang telah mengalami pemanasan pada suhu di bawah 100°C. Standar pasteurisasi menggunakan suhu 62°C selama 30 menit, atau pada suhu 71°C selama 15 menit. Pemanasan tersebut bertujuan untuk mematikan bakteri-bakteri patogen, sehingga susu ini dalam jangka waktu tertentu aman untuk dikonsumsi atau diminum tanpa harus dipanaskan lagi (10).

d. Susu Sterilisasi

Susu steril merupakan susu segar yang telah disterilkan sehingga tidak mengandung bakteri. Susu ini tidak perlu disimpan pada suhu rendah jika disimpan dalam wadah steril. Susu UHT

adalah produk susu yang diperoleh dengan cara memanaskan susu minimal pada suhu 135°C selama 2 detik (10).

e. Susu skim

Susu skim adalah bagian susu yang tertinggal sesudah krim diambil sebagian atau seluruhnya. Susu skim mengandung semua zat makanan dari susu kecuali lemak dan vitamin-vitamin yang larut dalam lemak. Susu skim seharusnya tidak digunakan untuk makanan bayi tanpa adanya pengawasan gizi karena tidak adanya lemak dan vitamin-vitamin yang larut dalam lemak (10).

f. Krim

Krim adalah bagian susu yang banyak mengandung lemak yang timbul ke bagian atas dari susu pada waktu didiamkan atau dipisahkan dengan alat pemisah. Pemisahan krim dan susu skim dapat terjadi karena kedua bahan tersebut mempunyai berat jenis yang berbeda (10).

g. Susu kental

Susu kental adalah susu hasil penguapan kandungan air susu segar yang tidak sampai habis melainkan hanya terbatas atau sebagian saja. Kadar air susu kental rata-rata 40%. Dengan kadar air yang rendah ini susu dapat tahan disimpan lama dalam keadaan baik (10).

#### h. Susu bubuk

Susu bubuk adalah susu segar yang diuapkan semua kandungan airnya. Prinsip pembuatan susu bubuk adalah menguapkan sebanyak mungkin kandungan air susu dengan cara pemanasan atau pengeringan. Kadar air yang dikandung susu bubuk yaitu sekitar 5% (10).

## B. LIPID DAN ASAM LEMAK

### 1. Lipid

Lipid adalah asam lemak dan derivatnya, dan substansi yang terkait secara biosintetik atau fungsional dengan komponen-komponen ini. Asam lemak adalah senyawa yang secara alami disintesis melalui kondensasi unit malonil-koenzim A oleh kompleks sintetase asam lemak. Dengan definisi tersebut, kolesterol (tapi bukan hormon steroid) dapat dikelompokkan ke dalam lipid, seperti fosfolipid dan glikolipid. Gangliosida, yang merupakan glikolipid asam, larut dalam air tidak seperti lipid pada umumnya (7).

Klasifikasi lipid menurut Bloor adalah sebagai berikut: (11)

- a. Lipid sederhana, adalah lipid yang terbentuk dari ester berbagai alkohol dengan asam lemak. Lemak dan lilin termasuk lemak sederhana.

- b. Lipid campuran, adalah ester asam lemak yang selain mempunyai gugus alkohol dan asam lemak juga mengandung gugusan lain. Fosfolipid, glikolipid, lipoprotein, dan sulfolipid termasuk lipid campuran.
- c. Lipid turunan, adalah zat atau bahan-bahan yang dihasilkan dari hidrolisis lipid-lipid tersebut di atas. Yang termasuk lipid turunan antara lain asam lemak, gliserol, steroid, alkohol selain gliserol, sterol, aldehid lemak, dan senyawa keton.

## 2. Asam lemak

Asam lemak adalah senyawa organik yang merupakan hasil hidrolisis dari bahan lemak atau minyak. Senyawa lemak atau minyak berada dalam bentuk trigliserida yang bila dihidrolisis menghasilkan gliserol dan asam lemak rantai panjang (12).

Asam lemak bebas hanya sedikit terdapat secara alami. Kebanyakan asam lemak diperoleh melalui hidrolisis lemak yang :

- a. Merupakan asam monokarboksilat yang mengandung gugus karboksil yang dapat berionisasi dan nonpolar, berantai atom karbon lurus dan siklik.
- b. Umumnya terbentuk dari atom C yang genap (walaupun secara alami ada juga yang beratom C ganjil).
- c. Dapat jenuh atau tidak jenuh (11).

### 3. Asam lemak tak jenuh ganda (*Polyunsaturated fatty acids*)

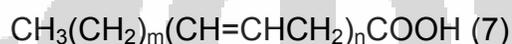
Asam lemak tak jenuh ganda (PUFA = *Polyunsaturated fatty acids*) yang berasal dari binatang dapat dikelompokkan berdasarkan derivatnya dari prekursor biosintetik spesifik. Tiap kelompok mengandung dua sampai maksimum enam ikatan rangkap *cis*, yang dipisahkan oleh gugus metilen tunggal, dan mempunyai struktur terminal yang sama (8). Umumnya, asam lemak tak jenuh ganda mempunyai titik leleh yang rendah dan rentan terhadap oksidasi (7).

Asam lemak tak jenuh mempunyai fungsi yang lebih kompleks, sebagai bioregulator endogen, misalnya dalam pengaturan homeostasis ion, transkripsi gen, signal transduksi hormon, sintesa lemak serta mempengaruhi pembentukan protein (2).

Asam lemak tak jenuh ganda berdasarkan letak ikatan rangkapnya pada ikatan karbon dari gugus omega, dikenal: omega-3, omega-6, omega-7, omega-9. Keberadaan letak ikatan rangkap dalam struktur kimiawi asam lemak mengakibatkan adanya perbedaan konfigurasi, bila ikatan rangkapnya terletak pada sisi yang sama dengan gugus hidrogen maka disebut sebagai konfigurasi *cis*, sedangkan bila ikatan rangkapnya terletak di sisi yang berlawanan maka disebut sebagai konfigurasi *trans*. Perbedaan konfigurasi ini memberikan konsekuensi fungsional yang cukup bermakna. Konfigurasi *trans* membuat PUFAs tidak dapat berfungsi sebagai PUFAs, bahkan dapat sebaliknya. Ternyata bahwa

asam lemak konfigurasi trans justru memberikan resiko terjadinya penyakit jantung koroner. PUFAs yang ideal adalah PUFAs yang berkonfigurasi cis, biasanya yang berasal dari alam, seperti asam lemak omega-3 cis yang berasal dari ikan (2).

Tabel 2. Asam lemak tak jenuh ganda dari formula umum:



Nama sistematis	Nama Trivial	Singkatan
9,12-octadecadienoic	Linoleic	18:2(n-6)
6,9,12-octadecatrienoic	$\gamma$ -linolenic	18:3(n-6)
8,11,14-eicosatrienoic	Homo- $\gamma$ -linolenic	20:3(n-6)
5,8,11,14-eicosatetraenoic	Arachidonic (AA)	20:4(n-6)
4,7,10,13,16-eicosapentaenoic	-	20:5(n-6)
9,12,15-octadecatrienoic	$\alpha$ -linolenic	18:3(n-3)
5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA	20:5(n-3)
7,10,13,16,19-docosapentaenoic	-	22:5(n-3)
4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic	DHA	22:6(n-3)
5,8,11-eicosatrienoic	Mead's Acid	20:3(n-9)

#### 4. Asam lemak omega-3

Asam lemak omega-3 adalah kelompok asam lemak tak jenuh ganda yang mempunyai ikatan rangkap antar atom karbon pada posisi  $\omega$ -

3. Nutrisi esensial penting asam lemak omega-3 yaitu: asam  $\alpha$ -linolenat (ALA), asam eikosapentaenoat (EPA), dan asam dokosaheksaenoat (DHA). Tubuh manusia tidak dapat mensintesis asam lemak omega-3 secara *de novo*, tapi dapat membentuk 20- dan 22-karbon tak jenuh asam lemak omega-3 dari 18-karbon asam lemak omega-3, asam  $\alpha$ -linolenat. Perubahan ini terjadi secara kompetitif dengan asam lemak omega-6, yang merupakan analog kimiawi yang diturunkan dari asam linoleat. Asam  $\alpha$ -linolenat omega-3 dan asam linoleat omega-6 adalah nutrisi esensial yang harus diperoleh dari makanan. Sintesis asam lemak omega-3 yang lebih panjang dari asam linolenat dalam tubuh secara kompetitif diperlambat oleh analog omega-6. Akumulasi asam lemak omega-3 rantai panjang lebih efektif jika didapatkan langsung dari makanan atau jika jumlah analog omega-6 tidak melebihi jumlah omega-3 (13).

### C. Asam Dokosaheksaenoat (DHA)

DHA (22:6( $\omega$ -3), asam cis-dokosa-4,7,10,13,16,19-heksaenoat; nama trivial: asam cervonat) adalah asam lemak esensial omega-3. Secara kimia, DHA adalah asam karboksilat dengan rantai 22-karbon dan enam ikatan rangkap cis; ikatan rangkap pertama berada pada atom C ketiga dari ujung omega (14).

DHA adalah asam lemak utama dalam fosfolipid otak, dan khususnya pada retina (12). DHA juga ada dalam setiap sel dalam tubuh, dalam membran mitokondria, terutama banyak dalam sel otot jantung (15).

DHA adalah asam lemak tak jenuh ganda rantai panjang. Banyak kesenjangan dalam struktur molekulnya dimana atom-atom H hilang karena adanya ikatan rangkap. Kesenjangan ini membuat DHA sangat fleksibel dan membuat sinyal-sinyal listrik lebih mudah lewat dari satu sel otak ke sel yang lain ketika jumlah yang optimum terdapat dalam otak. Karena strukturnya, DHA juga menyebabkan membran tetap mengelilingi sinaps. Hal ini membantu sel saraf melepaskan zat kimia dengan lebih cepat. Sel otak yang membrannya kaya akan DHA dapat berkomunikasi lebih cepat satu sama lain. Jika jumlah DHA hanya sedikit, asam lemak lain, khususnya asam lemak jenuh, diinkorporasikan ke dalam membran sel saraf sehingga membran sel saraf akan lebih kaku dan menjadi kurang fleksibel serta kurang efisien dalam menghantarkan listrik dan transmitter. Akibatnya, kecepatan komunikasi antara satu sel otak dengan yang lainnya akan bertambah lambat (15).

Dalam tubuh manusia, DHA didapatkan dari makanan atau dibuat dari asam eikosapentaenoat (EPA, 20:5,  $\omega$ -3) melalui asam dokosapentaenoat (DPA, 22:5,  $\omega$ -3) sebagai intermediet. Proses ini dilakukan melalui tahap elongasi diikuti dengan kerja enzim  $\Delta$ 4-saturase. Jalur lain juga terjadi di peroksisom dan mitokondria. EPA dielongasi dua kali menjadi 24:5  $\omega$ -3, kemudian didesaturasi menjadi 24:6  $\omega$ -3, kemudian dipendekkan menjadi

DHA (22:6  $\omega$ -3) melalui beta oksidasi. Jalur ini dikenal sebagai Sprecher's shunt (14).

Pemberian DHA yang berlebihan dapat menekan proses pembentukan asam arakhidonat (AA), serta dapat menekan aktivitas enzim siklooksigenase yang memfasilitasi pembentukan prostaglandin  $PGH_2$  dari AA, sehingga dapat menghambat pembentukan prostaglandin berikut tromboksan dan leukotrien, dapat menyebabkan terhambatnya respon terhadap proses peradangan khususnya pada pelepasan interleukin-1 dan TNF, memanjangnya masa pendarahan, menurunnya renin yang turut dalam pengontrolan fungsi ginjal (5,6).

#### **D. Analisis DHA**

##### **1. Ekstraksi Lipid**

Sebelum sampel lipid dianalisis dengan kromatografi, pertama-tama perlu dilakukan ekstraksi dari matriksnya. Pada jaringan, lipid berada dalam berbagai bentuk. Lipid sederhana sering merupakan bagian dari agregat besar dalam jaringan, yang mana dapat diekstraksi dengan relatif mudah. Di sisi lain, lipid kompleks biasanya merupakan bagian penyusun membran, yang terikat dengan komponen lain seperti protein dan polisakarida, dan tidak dapat diekstraksi dengan segera. Umumnya, lipid terikat dengan komponen selular lain oleh ikatan hidrofobik atau Van der Waals yang lemah, ikatan hidrogen dan ikatan ionik (7).

Untuk mengekstraksi lipid, perlu dicari pelarut yang tidak hanya melarutkan lipid dengan segera tapi juga menangani interaksi antara lipid dan matriks. Berbagai pelarut atau kombinasi pelarut telah disarankan sebagai ekstraktan untuk lipid, salah satunya adalah isopropanol-heksan (2:3 v/v), dimana toksisitasnya relatif rendah namun tidak mengekstraksi gangliosida secara kuantitatif. Kebanyakan analisis menggunakan kloroform-metanol (2:1, v/v), dengan air endogen sebagai komponen tersier dalam sistem. Biasanya, jaringan dihomogenkan dengan adanya kedua pelarut, namun untuk hasil yang lebih baik sebaiknya matriks diekstraksi dengan metanol terlebih dahulu sebelum kloroform ditambahkan ke dalam campuran. Umumnya, tidak perlu memanaskan pelarut untuk membantu ekstraksi, walaupun terkadang hal tersebut diperlukan (7).

Lipid yang diekstraksi dari jaringan dengan cara di atas, cenderung mengandung sejumlah kontaminan non lipid seperti gula, asam amino, urea dan garam. Kontaminan ini harus disingkirkan sebelum lipid dianalisis. Sebagian besar analisis menggunakan metode pencucian sederhana, yang dikemukakan oleh Folch dan Stanley, yang mana ekstrak kloroform-metanol (2:1) dikocok dan ditambahkan dengan larutan salin  $\frac{1}{4}$  volumenya. Campuran terpisah menjadi 2 lapisan, dimana lapisan bawah terdiri dari kloroform-metanol-air dengan proporsi 86:14:1 (v/v) dan mengandung hampir semua lipid, sedangkan fase bawah

mengandung pelarut yang sama dengan perbandingan 3:48:47 mengandung kontaminan non lipid. Perbandingan antara kloroform, metanol dan air harus sedekat mungkin 8:4:3 (v/v) jika tidak akan terjadi kehilangan lipid selektif. Jika pencucian kedua diperlukan untuk menghilangkan sisa kontaminan, harus digunakan campuran yang komposisinya mirip dengan fase atas, contoh metanol : larutan salin (1:1, v/v). Gangliosida akan berada dalam fase atas bersama dengan sejumlah oligoglikosfingolipid, bisa didapatkan dari lapisan ini dengan cara dialisis kemudian liofilisasi residu (7).

Beberapa metode ekstraksi lipid:

- a. Ekstraksi lipid dari jaringan dengan pelarut bertoksitas rendah (16)
  - 1) 10 ml susu disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 menit pada 4°C.
  - 2) Lapisan padatan lemak atas dipindahkan ke tabung *solvent-resistant* 15 ml yang telah dibilas dengan heksan.
  - 3) Ditambahkan heksan : isopropanol (3:2 v/v, mengandung 50 mg hidroksitoluen terbutilasi untuk mencegah oksidasi asam lemak susu) 18 ml/g padatan lemak, vortex selama 1 menit.
  - 4) Larutan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6,7% dalam aquadest) ditambahkan sebanyak 12 ml/g padatan lemak untuk memisahkan heksan dari isopropanol, vortex.
  - 5) Dibiarkan sampai terpisah sempurna.

- 6) Lapisan atas heksan dipindahkan ke tabung reaksi 15 ml yang telah dibilas heksan dan ditambahkan 1 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat, vortex.
  - 7) Dialiri gas  $\text{N}_2$ , biarkan selama 30 menit.
  - 8) Bagian atas (heksan dan lipid susu) dipindahkan ke tabung lain.
  - 9) Heksan diuapkan dengan mengalirkan  $\text{N}_2$  pada  $40^\circ\text{C}$  selama 30 menit sampai bobot konstan (perubahan kurang dari 0,5 mg).
- b. Metode cepat dalam menentukan komposisi asam lemak susu (17)
- 1) 20 ml susu dalam tabung 50 ml disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 menit pada  $4^\circ\text{C}$ .
  - 2) Padatan lemak dipindahkan ke tabung 1,5 ml, biarkan pada suhu ruang ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) selama 20 menit sampai padatan lemak mencair.
  - 3) Disentrifugasi pada 13000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang.
  - 4) Terjadi 3 lapisan (atas : lipid; tengah : protein, lemak & senyawa tdk larut air lainnya; bawah : air).
- c. Metode cepat untuk ekstraksi dan purifikasi lipid total (18)
- 1) Setiap 1 ml sampel, ditambahkan 3,75 ml campuran kloroform : metanol (1:2 v/v) dan divortex.
  - 2) Ditambahkan 1,25 ml kloroform, vortex.
  - 3) Ditambahkan 1,25 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , vortex.

- 4) Disentrifugasi pada 1000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar untuk mendapatkan sistem 2 fase (atas: fase air; bawah: fase organik).
  - 5) Fase bagian bawah diambil.
  - 6) Jika diperlukan, fase bawah tersebut dicuci lagi dengan pelarut fase atas dengan komposisi yang sama.
- d. Metode sederhana untuk isolasi dan purifikasi lipid total jaringan hewan (19)
- 1) Sampel dihomogenkan dengan kloroform : metanol (2:1) sampai volume akhir 20 kali volume sampel (1 g dalam 20 ml campuran pelarut). Setelah dispersi, seluruh campuran diagitasi selama 15 – 20 menit dalam orbital shaker pada suhu ruang.
  - 2) Pelarut dicuci dengan 0,2 volume (4 ml untuk 20 ml) air atau lebih baik dengan larutan NaCl 0,9%. Setelah divortex beberapa detik, campuran disentrifugasi pada kecepatan rendah (2000 rpm) untuk memisahkan dua fase. Pindahkan fase atas dengan penyabunan dan simpan untuk analisis gangliosida atau molekul organik polar kecil. Jika perlu (perlu memisahkan molekul tertentu), lapisan antar muka dibilas satu atau dua kali dengan metanol : air (2:1) tanpa mencampurkan seluruh preparasi.
  - 3) Setelah sentrifugasi dan saponifikasi lapisan atas, fase bawah kloroform yang mengandung lipid diuapkan dalam *rotary*

*evaporator* atau dengan mengalirkan gas N<sub>2</sub> jika volume kurang dari 2-3 ml.

e. Ekstraksi lemak susu bubuk (20)

- 1) Sebanyak 1 – 5 g sampel ditimbang ke dalam Erlenmeyer.
- 2) Ditambahkan 20 ml kloroform : metanol (2 : 2 v/v) (untuk setiap gram sampel).
- 3) Dikocok sampai tercampur. Fraksi protein akan terpisah dan ekstraknya disaring dengan kertas saring bebas lemak, ditampung di corong pemisah.
- 4) Erlenmeyer dan kertas saring dicuci ± 3x dengan kloroform/metanol (sampai pencucian sempurna).
- 5) Ditambahkan NaCl 9% dalam air (saline) sebanding dengan 1/5 volume yang diekstrak (± 50 ml).
- 6) Dikocok dengan kuat dan dibiarkan semalam atau sampai larutan yang diekstrak tersebut jernih.
- 7) Fase bagian atas terdiri dari air, metanol, garam.
- 8) Fase bagian bawah terdiri dari kloroform.
- 9) Fase bagian atas dibuang, fase bagian bawah yang mengandung lemak adalah kloroform.
- 10) Permukaan yang tertinggal (permukaan kloroform) dicuci dengan kloroform-metanol-saline (3:47:48 v/v) untuk menghilangkan sisa-sisa air dengan 30 ml.

11) Fase kloroform yang mengandung lemak kemudian diuapkan.

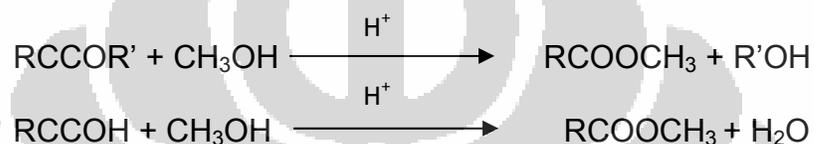
## 2. Esterifikasi

Sebelum komponen asam lemak dari lipid dianalisis dengan kromatografi gas, perlu dilakukan perubahan menjadi derivat nonpolar dengan berat molekul rendah, seperti metil ester. Juga disarankan untuk menutupi gugus fungsional polar lain dengan cara yang sama, atau menyiapkan derivat khusus untuk membantu identifikasi. Bentuk dan resolusi puncak akan lebih baik pada waktu yang sama. Asam lemak hanya mungkin diidentifikasi dengan waktu retensi dari kromatografi gas saja, tapi kromatografi gas yang digunakan dalam kombinasi dengan derivatisasi atau prosedur degradatif kimia atau prosedur spektroskopi terutama spektrometri massa, dapat sangat bermanfaat dalam karakterisasi. Karena itu, sebelum prosedur kromatografi dilakukan, perlu dipertimbangkan derivat apa yang harus disiapkan dan metode apa yang harus dilakukan (7).

Hidrolisis lipid tidak perlu dilakukan untuk mendapatkan asam lemak bebas sebelum menyiapkan ester karena sebagian besar lipid dapat ditransesterifikasi secara langsung. Dalam menguapkan pelarut harus hati-hati karena sejumlah ester sampai  $C_{14}$  dapat hilang jika langkah ini dilakukan tidak dengan hati-hati. Penggunaan nitrogen yang berlebihan untuk menguapkan pelarut harus dihindari (7).

a. Esterifikasi dan transesterifikasi yang dikatalisis asam.

Asam lemak bebas diesterifikasi dan lipid O-asil ditransesterifikasi dengan memanaskannya dengan sejumlah besar metanol anhidrat dengan adanya katalis asam. Reaksinya adalah sebagai berikut:



Adanya air dapat mencegah reaksinya berlangsung sempurna. Pereaksi yang paling umum adalah 5% HCl anhidrat dalam metanol. Metode pembuatan HCl metanolat yang paling sederhana adalah dengan menambahkan asetil klorida (5 ml) perlahan-lahan ke dalam metanol kering (50 ml). Metil asetat akan terbentuk tapi tidak mengganggu metilasi pada konsentrasi ini. Biasanya sampel lipid dipanaskan dalam pelarut dengan cara reflux selama sekitar 2 jam, tapi dapat juga dipanaskan bersama dalam tabung tertutup pada temperatur yang lebih tinggi dalam waktu yang lebih singkat. Alternatif lain, esterifikasi yang efektif dapat diperoleh jika campuran reaksi dipanaskan dalam tabung pada 50°C semalaman (7).

Larutan 1-2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dalam metanol mentransesterifikasi lipid dengan cara yang sama dan dengan

kecepatan yang sama dengan HCl metanolat. Cara ini mudah dilakukan, tapi menggunakan temperatur di bawah temperatur reflux. Jika pereaksi digunakan dengan tidak hati-hati, dekomposisi PUFA dapat terjadi (7).

$\text{BF}_3$  dalam metanol (12-14% w/v) juga telah digunakan sebagai katalis transesterifikasi lipid dan esterifikasi asam lemak bebas. Pereaksi ini mempunyai waktu simpan yang terbatas, bahkan jika didinginkan, dan penggunaan  $\text{BF}_3$  yang sudah lama atau terlalu pekat dapat menyebabkan hilangnya PUFA dalam jumlah yang bermakna. Jika dibandingkan dengan pereaksi lain katalis asam,  $\text{BF}_3$  mempunyai banyak reaksi samping dan sebaiknya dihindari (7).

Lipid nonpolar, seperti kolesteril ester atau triasil gliserol, tidak larut dalam metanol dan tidak akan bereaksi dalam waktu yang singkat kecuali pelarut lain ditambahkan untuk mempengaruhi kelarutan. Benzen pernah digunakan namun karena toksisitasnya yang tinggi, disarankan untuk menggunakan pelarut lain seperti toluen atau tetrahidrofur (7).

HCl metanolat (1%) atau  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1%) mungkin adalah agen pengesterifikasi yang paling baik karena memetilasi asam lemak bebas dengan sangat cepat dan dapat digunakan untuk mentransesterifikasi lipid O-asil secara efisien. Tidak ada pelarut

lain selain metanol yang diperlukan jika hanya asam lemak bebas yang akan dimetilasi atau jika lipid polar yang akan ditransesterifikasi (7).

b. Transesterifikasi yang dikatalisis basa.

Lipid O-asil ditransesterifikasi dengan sangat cepat dalam metanol anhidrat dengan adanya katalis basa. Asam lemak bebas tidak diesterifikasi secara normal dengan cara ini. Natrium metoksida dalam metanol anhidrat, yang dibuat secara sederhana dengan melarutkan natrium kering ke dalam metanol kering, adalah pereaksi yang paling populer, namun kalium metoksida atau hidroksida juga telah digunakan sebagai katalis. Pereaksi ini stabil selama beberapa bulan pada temperatur kamar, khususnya bila digunakan metanol bebas  $O_2$  dalam pembuatannya. Reaksi ini terjadi sangat cepat, sebagai contoh fosfogliserida ditransesterifikasi sempurna dalam beberapa menit pada temperatur kamar (7).

Seperti pada transesterifikasi yang dikatalisis asam, pelarut tambahan, seperti toluen atau tetrahidrofur, diperlukan untuk melarutkan lipid nonpolar seperti kolesterol atau triasilgliserol tapi tidak dibutuhkan bila lipid-lipid tersebut tidak ada dalam sampel. Kloroform tidak dapat digunakan pada cara ini karena

mengandung etanol sebagai penstabil, dan dapat bereaksi dengan Natrium metoksida menghasilkan diklorokarben yang dapat bereaksi dengan ikatan rangkap (7).

Walaupun asam lemak bebas tidak diesterifikasi dengan cara seperti digambarkan di atas, metil ester dapat dibuat dengan cara menukar dengan N,N-dimetilformamida dimetil asetal dengan adanya piridin. Mirip dengan itu, metil iodida bereaksi dengan garam natrium atau kalium dari asam lemak dengan adanya pelarut polar aprotik seperti dimetilasetamida untuk membentuk metil ester (7).

Garam ammonium kuarterner dari asam lemak diubah menjadi derivat metil ester secara pirotikal dalam injektor GC. Dari beberapa pereaksi yang telah disebutkan untuk tujuan tersebut, trimetilsulfonim hidoksida adalah yang paling kuat dan reaksi sampingnya lebih sedikit, dapat digunakan untuk transesterifikasi lipid secara simultan dan esterifikasi asam lemak bebas (7).

### 3. Kromatografi

#### a. Kromatografi Gas

- 1) Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dengan kolom kapiler 0,32 mm (id) x 50 m x 0,25  $\mu$ m ketebalan film, fase gerak helium (1,1 ml/menit), split 1:10,

suhu inlet 250°C, suhu detektor 300°C, temperatur oven terprogram dari 180°C (1 menit), naik 1°C/menit sampai 200°C (1 menit), naik 10°C/menit sampai 280°C (3 menit) (21).

2) Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dengan kolom kapiler 0,32 mm (id) x 60 m x 0,25 µm ketebalan film, fase gerak helium, suhu injektor dan detektor 250°C, temperatur oven terprogram dari 50°C naik 10°C sampai 190°C dan dipertahankan selama 41,5 menit (22).

3) Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dengan kolom kapiler 0,32 mm (id) x 50 m x 0,25 µm ketebalan film, fase gerak helium, suhu injektor 100°C dinaikkan menjadi 250°C pada 50°C/menit, suhu detektor 250°C, temperatur oven terprogram dari 130°C naik 3°C/menit sampai 180°C, naik 4°C/menit sampai 200°C, naik 1°C /menit sampai 210°C (23).

4) Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dengan kolom kapiler 0,25 mm (id) x 100 m x 0,20 µm ketebalan film, fase gerak hidrogen (2,1 ml/menit), split 1:100, temperatur oven terprogram 70°C selama 4 menit, naik 8°C/menit sampai 110°C, naik 5°C/menit sampai 170°C (10

menit), naik 2°C/menit sampai 240°C (5 menit), suhu injektor dan detektor 225°C (17).

5) Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dengan kolom kapiler 0,32 mm (id) x 50 m x 0,25 µm ketebalan film, fase gerak helium (1,8 bar), split 1:20, temperatur oven terprogram dari 100°C naik 14°C/menit sampai 190°C, naik 25°C/menit sampai 220°C, suhu awal injektor 65°C dinaikkan menjadi 250°C dalam 10 detik, suhu detektor 250°C (24).

6) Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dengan kolom kapiler CP-88 0,25 mm (id) x 100 m x 0,2 µm ketebalan film, fase gerak helium (207 kPa), temperatur oven terprogram 70°C selama 4 menit, naik 13°C/menit sampai 175°C (27 menit), naik 4°C/menit sampai 215°C (36 menit) (25).

b. Kromatografi cair kinerja tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi yang dilengkapi ELSD (Evaporative Light Scattering Detection), menggunakan kolom Spherisorb™ S3W dengan ukuran 100 x 4,6 mm i.d. dan ukuran partikel 3 µm. Laju alir 2 mL/menit dan menggunakan elusi gradien, suhu detektor 40°C dan *air flow* 27 psi (26).

## E. Kromatografi Gas

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat, cair) dan fase gerak (cair, gas). Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas dan kromatografi cair (8).

Kromatografi gas digunakan untuk memisahkan campuran-campuran yang komponen-komponennya dapat menguap pada suhu percobaan (sampai 400°C) dengan menggunakan gas sebagai fase gerak (25). Pada kromatografi gas, sampel diuapkan dan disuntikkan ke dalam kolom kromatografi. Elusi dibawa oleh aliran gas inert fase gerak. Perbedaannya dengan tipe kromatografi lainnya, fase gerak tidak berinteraksi dengan molekul analit, fungsinya hanya membawa analit melewati kolom (9).

Kromatografi gas dibagi menjadi dua kategori utama: kromatografi gas-cair (GLC), dimana pemisahan terjadi melalui partisi analit antara fase gerak gas dan fase diam berupa cairan yang disalutkan pada suatu padatan inert, dan kromatografi gas-padat (GSC), yang pemisahannya didasarkan pada fase diam padat dimana retensi analit terjadi melalui adsorpsi (penjerapan) fisik. Kromatografi gas-cair telah digunakan secara luas dalam semua bidang ilmu pengetahuan, yang namanya biasanya disingkat menjadi kromatografi gas (GC) (8,9).

Kelebihan kromatografi gas yaitu cepat, sensitif, selektif, dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif, jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit ( $\mu\text{g}$ ), dan dalam hal tertentu resolusi atau pemisahan yang dihasilkan lebih sempurna. Namun harga instrumen kromatografi gas relatif lebih mahal dibanding teknik kromatografi lainnya dan penggunaannya terbatas pada senyawa yang mudah menguap pada suhu percobaan (8,9,28).

#### 1. Instrumentasi

Bagian-bagian utama dari kromatografi gas yaitu: suplai gas pembawa, sistem injeksi sampel, konfigurasi kolom dan oven kolom, dan detektor.

##### a) Suplai gas pembawa

Gas pembawa haruslah inert secara kimia, yaitu meliputi helium, argon, nitrogen, karbondioksida, dan hidrogen. Pemilihan gas didasarkan pada tipe detektor yang digunakan. Helium adalah gas pembawa yang paling umum digunakan dalam GC. Sistem gas pembawa sering mengandung pengayak molekular untuk menyingkirkan air atau kontaminan lain (26).

Kecepatan aliran gas pembawa menentukan efisiensi kolom. Kecepatan aliran optimum dapat ditentukan dengan persamaan Van Deemter (8).

b) Sistem injeksi sampel

Konsentrasi dan volume larutan yang diinjeksikan tergantung dari jenis sampel, tujuan percobaan, dan kondisi percobaan seperti detektor dan kolom yang digunakan. Untuk analisis biasanya dibuat larutan sampel dalam pelarut yang mudah menguap dengan konsentrasi 1-10%. Volume yang diinjeksikan berkisar 0,1-1,0  $\mu\text{l}$  untuk cairan dan 1-10 ml untuk gas. Perlu diusahakan agar sampel diinjeksikan secepat mungkin dengan volume sekecil mungkin. Suhu dari *injection port* biasanya sama atau sedikit lebih tinggi, misalnya 50°C di atas suhu kolom, dimana sampel seketika menjadi uap dan segera masuk ke dalam kolom dibawa oleh gas pembawa (8).

c) Konfigurasi kolom dan oven kolom

Kolom merupakan tempat berlangsungnya pemisahan komponen campuran. Kolom dapat berupa tabung gelas atau logam (tembaga, baja nirkarat/*stainless steel*, aluminium) dengan panjang 2-3 m dan garis tengah 2-4 mm. Kolom yang lebih panjang menghasilkan jumlah plat teori dan daya pisah yang lebih besar. Kolom dapat berbentuk lurus atau melingkar. Kolom lurus lebih efisien tetapi dapat menjadi tidak praktis apabila bekerja pada suhu tinggi. Kolom biasanya dibuat bentuk melingkar supaya mudah dimasukkan ke dalam thermostat, garis

tengah lingkaran paling sedikit harus sepuluh kali garis tengah kolom, yaitu untuk meminimumkan difusi dan pengaruh laju alir (29).

Dua tipe kolom pada kromatografi gas (29):

- (1) Kolom yang terpacking (*packed columns*)
- (2) Kolom kapiler (*capillary columns*)

d) Detektor

Alat ini akan mendeteksi komponen-komponen yang meninggalkan kolom.

Macam-macam detektor yang digunakan pada kromatografi gas (8):

- (1) Detektor konduktivitas panas (*Thermal Conductivity Detector*)
- (2) Detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*)
- (3) Detektor penangkap elektron (*Electron Capture Detector*)
- (4) Detektor fotometri nyala (*Flame Photometric Detector*)
- (5) Detektor Nitrogen Fosfor (*Nitrogen Phosphorus Detector*)

## 2. Analisis Kualitatif

Waktu retensi berguna untuk identifikasi komponen dalam campuran. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi komponen zat uji dengan waktu retensi standar. Data

waktu retensi khas tapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama (27).

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

Keterangan:

$\alpha$  = waktu retensi relatif

$t_1$  = waktu retensi zat uji

$t_2$  = waktu retensi standar

$t_a$  = waktu retensi komponen inert (fase gerak)

### 3. Analisis Kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan:

#### a. Baku luar (dengan kurva kalibrasi dan perbandingan luas puncak)

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung (8).

$$C_s = \frac{A_s}{A_{st}} \times C_{st}$$

Keterangan:

$C_s$  = konsentrasi sampel

$C_{st}$  = konsentrasi standar

$A_s$  = luas puncak sampel

$A_{st}$  = luas puncak standar

b. Baku dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Dibuat kurva baku antara perbandingan luas puncak komponen terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan volume injeksi dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (8).

Persyaratan untuk baku dalam yang efektif yaitu (27):

- 1) Harus menghasilkan puncak yang terpisah sepenuhnya, tetapi harus terelusi dengan komponen yang akan diukur.
- 2) Tinggi atau luas puncak harus kira-kira sama dengan tinggi atau luas puncak dari komponen yang akan diukur.

- 3) Secara kimiawi harus serupa dengan sampel/zat uji, tetapi tidak terdapat dalam sampel aslinya.

## F. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan penggunaannya (8).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis yaitu:

1. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekspien obat) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80 – 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang divalidasi. Data *recovery* yang digunakan minimal triplo untuk masing-masing konsentrasi (80%, 200%, 120%) (8).

## 2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan relatif (koefisien variasi) (8).

## 3. Selektivitas (*specificity*)

Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya (8).

#### 4. Linearitas (*linearity*) dan rentang (*range*)

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. 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. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko. Sebagai parameter adanya hubungan linier, digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $y = a + bx$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (8).

Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (8).

#### 5. Batas kuantitasi (LOQ) dan batas deteksi (LOD)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih dapat memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai

kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (8).

$$Q = \frac{k \times S_b}{S_1}$$

Keterangan :

Q = LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)

k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

$S_b$  = simpangan baku respon analitik dari blanko

$S_1$  = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi  
= slope (b pada persamaan garis  $y = a + bx$ )

#### 6. Ketangguhan (Ruggedness)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal seperti laboratorium, analis, instrumen, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan analis (8).

## 7. Kekuatan (Robustness)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus-menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada akurasi dan presisi (8).

