

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok, pada bulan Februari sampai Mei 2008.

A. ALAT

1. Alat kromatografi gas merek Shimadzu GC-17A, kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μ m), fase gerak helium, dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, serta pengolah data Class GC Solution.
2. Neraca analitik
3. Tabung reaksi bertutup teflon
4. Tabung sentrifugasi
5. Vortex
6. Alat sentrifugasi Kubota 5100 dan Kubota 6800
7. Penguap Turbo Vap
8. Mikropipet
9. Oven
10. Syringe berukuran 10 μ L
11. Peralatan gelas untuk analisis kuantitatif yang umum digunakan.

B. BAHAN

1. Asam dokosaheksaenoat (Sigma-Aldrich)
2. DHA Oil (Tama Biochemical Co.,Ltd)
3. Pereaksi dengan mutu pro analisis yang berasal dari Merck:
 - a. Metanol
 - b. Toluena
 - c. Kloroform
 - d. Heksana
 - e. Asetil klorida (for synthesis)
 - f. Kalium karbonat
 - g. Natrium klorida
4. Larutan kalium karbonat 6% (6 gram kalium karbonat dalam 100 ml aquadest)
5. Larutan natrium klorida 9% (9 gram natrium klorida dalam 100 ml aquadest)
6. Gas nitrogen (UHP dan HP)
7. Gas hidrogen (UHP)
8. Gas helium (UHP)
9. Sampel susu formula bubuk untuk bayi dan anak (5 merek yang berbeda)

C. CARA KERJA

1. Pemilihan kondisi analisis optimum kromatografi gas untuk analisis DHA

a. Pembuatan larutan standar DHA murni

Ditimbang seksama lebih kurang 25 mg standar DHA (Sigma) ke dalam labu ukur 10,0 mL lalu dilarutkan dengan heksan hingga batas sehingga didapatkan larutan standar DHA dengan konsentrasi 2500 ppm.

b. Esterifikasi (30)

Sebanyak 0,2 mL larutan induk DHA murni 2500 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon, kemudian dikeringkan dengan mengalirkan gas N_2 . Lalu ditambahkan 0,40 mL toluen dan 1,6 mL metanol kemudian divortex. Ditambahkan 0,2 mL asetil klorida perlahan-lahan ke dalam tabung reaksi sambil dikocok. Tabung ditutup rapat kemudian dipanaskan di dalam oven pada $100^\circ C$ selama 1 jam. Setelah tabung didinginkan dalam air, ditambahkan 5 mL larutan K_2CO_3 6% perlahan-lahan. Tabung ditutup rapat, divortex dan disentrifugasi. Setelah itu akan didapat larutan dengan 2 lapisan, lapisan atas adalah lapisan toluen yang mengandung DHA metil ester, sedangkan lapisan bawah adalah lapisan metanol-air.

c. Pencarian kondisi analisis optimum kromatografi gas

Sebanyak 1,0 μL supernatan lapisan toluen disuntikkan ke alat kromatografi gas. Pencarian kondisi analisis optimum dilakukan secara isothermal dan dengan pemrograman suhu. Elusi dilakukan secara isothermal pada suhu kolom 200°C dengan laju alir 1,35 mL/menit. Elusi juga dilakukan dengan pemrograman suhu dengan variasi suhu awal kolom 120°C, 130°C, dan 140°C serta variasi laju alir 1,35, 1,80 dan 2,00 mL/menit. Dari suhu awal dinaikkan 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit. Untuk semua elusi, suhu injektor 230°C dan suhu detektornya 250°C.

Masing-masing kondisi dicatat waktu retensinya dan jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah kondisi yang mempunyai harga plat teori (N) tertinggi dan HETP terkecil.

2. Pembakuan DHA dalam DHA oil

a. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA

Dari larutan standar DHA 2500 ppm diambil masing-masing 50, 100, 200, 300, 400, dan 500 μL ke dalam 6 tabung reaksi bertutup teflon. Kemudian masing-masing dikeringkan dengan gas N_2 , selanjutnya diesterifikasi sehingga diperoleh variasi 6 kadar baku. Lapisan toluen dari larutan hasil esterifikasi tersebut

disuntikkan sebanyak 1,0 μL pada kromatografi gas. Luas puncak DHA dicatat dan dihitung persamaan regresi liniernya.

b. Penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Ditimbang seksama lebih kurang 250 mg DHA oil, masukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL lalu dicukupkan volumenya dengan heksan hingga batas sehingga didapatkan larutan DHA oil 10000 ppm.

Dari larutan DHA oil 10000 ppm dipipet 300 μL ke dalam tabung reaksi bertutup teflon kemudian dikeringkan dengan gas N_2 . Selanjutnya diesterifikasi dan disuntikkan sebanyak 1,0 μL pada alat kromatografi gas. Percobaan diulang sebanyak dua kali. Luas puncak DHA dicatat dan dimasukkan ke persamaan regresi linier standar DHA dan dihitung kadarnya.

3. Validasi metode analisis DHA dalam DHA oil

a. Uji linearitas, pembuatan kurva kalibrasi, dan perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi

Dari larutan induk standar DHA oil 10000 ppm diambil masing-masing 50, 100, 200, 300, 400, 500, dan 600 μL ke dalam 7 tabung reaksi bertutup teflon. Kemudian masing-masing dikeringkan dengan gas N_2 dan selanjutnya diesterifikasi. Lapisan toluen dari larutan hasil esterifikasi tersebut disuntikkan pada alat

kromatografi gas. Luas puncak DHA dicatat dan dihitung persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya. Dari kurva kalibrasi, dihitung batas deteksi dan batas kuantitasnya.

b. Uji presisi

Ke dalam 3 tabung reaksi bertutup teflon dimasukkan masing-masing sebanyak 0,1 mL, 0,3 mL, dan 0,6 mL larutan DHA oil 10000 ppm, kemudian dikeringkan dengan gas N₂ dan diesterifikasi. Lapisan toluen dari larutan hasil esterifikasi tersebut disuntikkan ke alat kromatografi gas sebanyak 1,0 µL dan diulang 5 kali untuk masing-masing konsentrasi. Dihitung nilai simpangan baku relatif dari masing-masing konsentrasi.

c. Uji perolehan kembali

Ditimbang seksama lebih kurang 90 mg DHA oil ke dalam labu ukur 10,0 ml lalu dicukupkan volumenya dengan kloroform hingga batas. Ditimbang lebih kurang 2 g susu blanko ke dalam tabung sentrifugasi 50 mL, dipipet larutan DHA oil masing-masing sebanyak 200 µL, 250 µL, dan 300 µL larutan DHA oil ke dalam tabung tersebut, kemudian diperlakukan seperti cara ekstraksi dan esterifikasi sampel. Sebanyak 1,0 µL lapisan toluen dari larutan hasil esterifikasi disuntikkan ke alat kromatografi gas. Prosedur diulangi 2 kali untuk tiap konsentrasi. Perolehan kembali dihitung

dengan cara membandingkan konsentrasi yang diperoleh dengan konsentrasi sebenarnya.

4. Penetapan kadar DHA dalam sampel susu

a. Ekstraksi lipid (18)

Ditimbang seksama lebih kurang 2 gram sampel dalam tabung sentrifugasi 50 ml ke kemudian ditambahkan 15 mL kloroform-metanol (1:2 v/v), dikocok selama 15 menit. Ditambahkan lagi 5 mL kloroform, dikocok selama 15 menit. Lalu ditambahkan 5 mL larutan NaCl 9%, dikocok selama 15 menit. Setelah itu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar sehingga terbentuk 3 lapisan. Lapisan atas dibuang dengan pipet. Lapisan padatan di tengah dibuang perlahan-lahan. Lapisan bawah (kloroform) dicuci dengan 10 mL metanol-larutan NaCl 9% (9:10 v/v), divortex dan disentrifugasi. Lapisan bawah diambil kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer 50 mL. Sisa lapisan bawah yang masih tertinggal diencerkan dengan 10 mL kloroform lalu dipindahkan ke dalam erlenmeyer. Pengenceran dilakukan dua kali. Setelah itu kloroform diuapkan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak lemak. Jumlah ekstrak lemak yang diperoleh adalah selisih bobot erlenmeyer kosong dengan bobot erlenmeyer setelah penguapan.

Erlenmeyer ditimbang setelah bobot konstan (perubahan kurang dari 0,5 mg).

b. Esterifikasi

Ekstrak lemak dipindahkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon sambil ditimbang seksama, kemudian diperlakukan seperti cara esterifikasi standar.

c. Kromatografi Gas

Sebanyak 1,0 μL lapisan toluen dari larutan hasil esterifikasi disuntikkan ke alat kromatografi gas. Luas puncak yang terbentuk dicatat dan diplot ke persamaan kurva kalibrasi DHA dalam DHA oil dan dihitung konsentrasinya.