

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Optimasi esterifikasi DHA

Dilakukan dua metode esterifikasi DHA yakni prosedur Lepage dan Merck, kemudian larutan DHA (oil) yang termetilasi dengan kadar akhir DHA setara dengan 10081,5 ppm disuntikkan pada kromatografi gas. Mengingat kadar DHA (oil) seperti tertera di sertifikat analisis yakni 27,5% adalah cukup besar, waktu retensi DHA diperkirakan pada menit ke 30 atau 68. Esterifikasi Lepage dan Merck masing-masing memberikan luas puncak pada menit ke 30 sebesar 448672 dan 381846 $\mu\text{V/s}$, sedangkan pada menit ke 68 sebesar 614305 dan 545361 $\mu\text{V/s}$. Metode esterifikasi DHA optimum terpilih yakni yang memberikan luas puncak DHA terbesar, yaitu prosedur Lepage. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

2. Pencarian kondisi analisis optimum DHA murni

a. Penyiapan larutan standar DHA murni

Ditimbang 26,9 mg standar DHA murni, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan heksan sampai batas. Diperoleh larutan standar DHA murni dengan konsentrasi 2690 ppm.

Larutan standar DHA murni yang akan digunakan untuk optimasi kondisi KG diesterifikasi terlebih dahulu dengan metode esterifikasi DHA optimum yakni prosedur Lepage, hingga didapatkan DHA murni termetilasi dengan kadar akhir 1345 ppm (0,2 mL larutan terlarut dalam 0,4 mL toluen).

b. Pencarian kondisi analisis optimum DHA murni

Pada penelitian ini digunakan kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m, dan dicobakan 2 metode elusi yakni dengan suhu terprogram dan suhu tetap/ isothermal. Elusi dengan suhu terprogram dilakukan dengan variasi suhu awal kolom yaitu 120°C, 130°C dan 140°C. Dielusi dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai mencapai suhu 230°C dan dipertahankan selama 20 menit. Elusi dilakukan dengan variasi laju alir gas pembawa 1,35; 1,8 dan 2 mL/menit. Elusi dengan suhu tetap/ isothermal dilakukan pada suhu kolom tetap 200°C dan laju alir gas pembawa 1,35 mL/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C dan 250°C.

Sebanyak 1,0 µL larutan DHA murni termetilasi 1345 ppm di atas disuntikkan pada kromatografi gas. Dari hasil percobaan dipilih metode elusi suhu terprogram dengan suhu awal kolom 130°C dan laju alir gas pembawa 2 mL/menit. Kondisi ini dipilih karena paling optimum, yaitu mempunyai harga plat teoritis (N) tertinggi dan HETP terkecil. Waktu

retensi DHA yakni pada menit ke 56. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4,5,6 serta Tabel 6.

3. Pembakuan DHA dalam DHA (oil) menggunakan kurva kalibrasi DHA murni

a. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA murni

Dari larutan induk standar DHA murni 2690 ppm diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum yakni prosedur Lepage, hingga didapatkan DHA murni termetilasi dengan 6 titik konsentrasi DHA berbeda yakni 336,25; 672,5; 1345; 2017,5; 2690 dan 3362,5 ppm. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi DHA murni adalah $y = 76,97913123x - 3161,369863$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9993$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7 serta Tabel 7.

b. Penetapan kadar DHA dalam DHA (oil)

Ditimbang 262,25 mg standar DHA (oil) dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan volumenya dengan heksan sampai batas. Diperoleh larutan standar DHA (oil) dengan konsentrasi 10490 ppm. Kemudian diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum yakni prosedur Lepage, hingga didapatkan larutan DHA (oil) termetilasi 7867,5 ppm. Luas puncak DHA dalam DHA (oil) diplot ke persamaan regresi linier standar DHA murni. Hasilnya diperoleh kadar DHA dalam DHA (oil) sebesar 22,619%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8.

4. Validasi metode analisis DHA (oil)

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas DHA (oil)

Digunakan larutan standar DHA (oil) dengan konsentrasi 10490 ppm dan mengandung DHA dengan konsentrasi 2372,73 ppm (kadar DHA dalam DHA oil sebesar 22,619%). Kemudian diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum yakni prosedur Lepage, hingga didapatkan DHA (oil) termetilasi dengan 6 titik konsentrasi DHA berbeda yakni 296,59; 593,18; 1779,55; 2372,73; 2965,91 dan 3559,10 ppm. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi DHA (oil) adalah $y = 503,0871254 + 76,60239311x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9998$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 8 serta Tabel 9 dan 10.

b. Uji presisi DHA

Dari larutan standar DHA (oil) dengan konsentrasi DHA 2372,73 ppm diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum yakni prosedur Lepage, hingga didapatkan DHA (oil) termetilasi dengan 3 konsentrasi DHA berbeda (rendah, sedang dan tinggi) yakni 593,18; 1779,55 dan 3559,10 ppm. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai koefisien variasi (KV) berturut-turut 1,76%; 1,47% dan 1,84%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 11.

c. Uji perolehan kembali DHA

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode adisi. Diperiksa kadar DHA dalam telur blanko dan telur dengan penambahan standar DHA sebanyak 0,5537% (seharusnya 0,5237%, berdasarkan salah satu sampel telur omega-3 yang diperiksa sebelumnya). Persentase uji perolehan kembali DHA adalah sebesar $(80,12 \pm 0,65)\%$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 12.

d. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) DHA

Berdasarkan perhitungan statistik menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi standar DHA (oil), diperoleh batas deteksi DHA sebesar 61,64 ppm dan batas kuantitasi DHA sebesar 205,45 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 13.

5. Penetapan kadar DHA dalam sampel telur yang diperkaya omega-3

Dari ketiga sampel telur yang diperkaya omega-3 yang diperiksa, didapatkan bahwa semua sampel mengandung DHA dengan kadar yang bervariasi. Kadar DHA dalam sampel A sebesar $(0,52 \pm 0,006)\%$; sampel B sebesar $(1,36 \pm 0,03)\%$ dan sampel C sebesar $(1,28 \pm 0,015)\%$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 9, 10, 11 serta Tabel 14.

B. PEMBAHASAN

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui kadar DHA yang terdapat dalam kuning telur yang diperkaya omega-3, apakah kadarnya memenuhi kadar omega-3 total (ALA, EPA dan DHA) yang tercantum pada kemasan produk. Sampel telur yang diteliti ini terdiri dari tiga merek berbeda yang paling banyak beredar di pasaran wilayah Depok.

Seperti yang telah dipaparkan pada pendahuluan, munculnya telur hasil rekayasa, termasuk telur yang diperkaya omega-3 diharapkan bukan hanya taktik bisnis belaka, mengingat harga telur jenis ini lebih mahal dibandingkan harga telur biasa pada umumnya. Agar tidak terkecoh, konsumen harus waspada, terlebih terhadap produk yang tidak disertai daftar kandungan zat makanan. Sebab secara fisik sulit dibedakan antara telur reguler/ biasa dengan telur yang diperkaya omega-3. Ukuran, tekstur cangkang dan warna kuning telur tidak spesifik, sehingga tidak dapat dijadikan patokan.

Tahapan kerja yang dilakukan yakni mencari kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar DHA, lalu melakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar DHA dari kondisi analisis optimum yang diperoleh. Kemudian setelah memperoleh metode analisis yang telah divalidasi, metode tersebut digunakan untuk memperoleh kadar DHA dalam sampel kuning telur yang diperkaya omega-3

1. Optimasi esterifikasi DHA

Pada awal penelitian ini praktikan membandingkan dua metode esterifikasi DHA yakni prosedur Lepage dan Merck. Standar DHA (oil) diesterifikasi dengan cara berbeda, namun tetap dihasilkan DHA (oil) termetilasi dengan kadar akhir sama yakni 10081,5 ppm. Karena DHA (oil) ini tidak murni, maka pada kromatogram terdapat banyak luas puncak asam-asam lemak yang terdapat dalam kuning telur. Mengingat kadar DHA (oil) seperti tertera di sertifikat analisis yakni 27,5% adalah cukup besar, waktu retensi DHA diperkirakan pada menit ke 30 atau 68. Metode esterifikasi DHA optimum terpilih yakni yang memberikan luas puncak DHA terbesar, cara kerja lebih mudah dan waktu pengerjaan lebih singkat, yaitu prosedur Lepage.

Esterifikasi cara Lepage ini mempunyai keuntungan yakni waktu pengerjaan esterifikasi yang relatif lebih cepat dan lebih mudah (dalam tabung reaksi bertutup teflon dan pemanasan dalam oven 100°C selama 1 jam), dibandingkan esterifikasi cara Merck yang membutuhkan waktu yang lebih lama dan sulit karena proses reflux di pendingin tegak selama 2,5 jam dan ekstraksi di corong pisah.

2. Pencarian kondisi analisis optimum DHA murni

Larutan yang digunakan untuk pencarian kondisi analisis optimum ini berasal dari larutan induk standar DHA murni 2690 ppm, yang

diesterifikasi dengan cara Lepage, hingga didapatkan DHA murni termetilasi dengan kadar akhir 1345 ppm (0,2 mL larutan DHA murni 2690 ppm terlarut dalam 0,4 mL toluen).

Pada penelitian ini dilakukan 2 metode elusi yakni dengan suhu terprogram dan suhu tetap/ isothermal. Elusi dengan suhu terprogram dilakukan dengan variasi suhu awal kolom yaitu 120°C, 130°C dan 140°C. Dielusi dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai mencapai suhu 230°C dan dipertahankan selama 20 menit. Elusi dilakukan dengan variasi laju alir gas pembawa 1,35; 1,8 dan 2 mL/menit. Pertimbangan variasi laju alir gas pembawa yang digunakan adalah berdasarkan ketentuan bahwa untuk kolom kapiler, laju alir maksimum yang dapat digunakan adalah 2,0 mL/menit.

Kemudian juga dilakukan elusi dengan suhu tetap/ isothermal dilakukan pada suhu kolom tetap 200°C dan laju alir gas pembawa 1,35 mL/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C dan 250°C.

Pada percobaan variasi suhu awal kolom dapat terlihat bahwa semakin tinggi suhu awal kolom maka semakin cepat waktu retensi DHA, semakin kecil nilai N dan semakin besar nilai HETP. Pada percobaan variasi laju alir gas pembawa dapat terlihat bahwa semakin tinggi laju alir gas pembawa maka semakin cepat pula waktu retensi DHA, semakin kecil nilai N dan semakin besar nilai HETP.

Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa semakin tinggi suhu kolom dan laju alir gas pembawa maka komponen sampel tersebut hanya sebentar berada di dalam fase diam, karena langsung menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga pemisahan yang terjadi kurang baik.

Dari hasil percobaan dengan menggunakan variasi suhu awal kolom dan laju alir gas pembawa didapatkan bahwa kondisi yang memberikan nilai N paling besar dan nilai HETP paling kecil adalah metode elusi suhu terprogram dengan suhu awal kolom 130°C dan laju alir gas pembawa 2,0 mL/menit. Waktu retensi DHA yakni pada menit ke 56. Jadi dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk penetapan kadar DHA dalam telur adalah dengan suhu terprogram dengan suhu awal kolom 130°C dan laju alir gas pembawa 2,0 mL/menit.

3. Pembakuan DHA dalam DHA (oil) menggunakan kurva kalibrasi DHA murni

Pada penelitian ini digunakan zat standar DHA (oil) untuk validasi metode analisis, tetapi karena konsentrasi DHA dalam standar DHA (oil) tersebut cukup kecil kadarnya seperti yang tercantum dalam sertifikat analisis yakni 27,5%, maka perlu dilakukan pembakuan DHA dalam DHA (oil) dengan menggunakan kurva kalibrasi standar DHA murni. Hal ini bertujuan selain untuk mengecek kembali kadar DHA dalam DHA (oil), juga untuk mengetahui waktu retensi DHA yang sebenarnya.

a. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA murni

Pembuatan kurva kalibrasi DHA murni dilakukan dengan menghubungkan enam titik pada berbagai konsentrasi DHA murni termetilasi yaitu 336,25; 672,5; 1345; 2017,5; 2690 dan 3362,5 ppm. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi DHA murni adalah $y = 76,97913123x - 3161,369863$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9993$. Harga koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

b. Penetapan kadar DHA dalam DHA (oil)

Dibuat larutan standar DHA (oil) termetilasi dengan konsentrasi 10490 ppm. Kemudian diesterifikasi hingga didapatkan DHA (oil) termetilasi 7867,5 ppm (0,3 mL larutan terlarut dalam 0,4 mL toluen). Luas puncak DHA diplot ke persamaan regresi linier standar DHA murni. Hasilnya diperoleh kadar DHA dalam DHA (oil) sebesar 22,619%.

Standar DHA (oil) berasal dari minyak ikan yang mudah teroksidasi karena mengandung asam lemak tidak jenuh ganda, maka harus hati-hati dalam penyimpanannya. Jika penyimpanannya tidak benar, misalnya bila terpapar suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan oksidasi atau penjumlahan ikatan rangkap yang akan menurunkan kualitas minyak ikan. Dari hasil analisis yang dilakukan praktikan ini terlihat bahwa kadar DHA dalam DHA (oil) sebesar 22,619%, ternyata berbeda dari yang tercantum

pada sertifikat analisis (27,5%). Kemungkinan terjadi penurunan kadar DHA yang disebabkan oleh banyak faktor, bisa karena faktor penyimpanan standar DHA (oil) yang tidak benar (misalnya terpapar suhu tinggi), juga karena faktor keterbatasan metode analisis yang dilakukan oleh praktikan (dapat menimbulkan kesalahan/ penyimpangan kadar).

4. Validasi metode analisis DHA (oil)

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas DHA (oil)

Sebelum melakukan penetapan kadar, metode yang telah ditetapkan perlu divalidasi. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi yang bertujuan untuk kepentingan analisis secara kuantitatif, yaitu untuk menghitung kadar zat dalam sampel. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi analit berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat harus dipertimbangkan dengan matang agar hasil pengukuran luas puncak sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut, sehingga hasil pengukuran yang diperoleh lebih akurat.

Pada penelitian ini, pembuatan kurva kalibrasi DHA (oil) dilakukan dengan menghubungkan enam titik pada berbagai konsentrasi DHA termetilasi yaitu 296,59; 593,18; 1779,55; 2372,73; 2965,91 dan 3559,10 ppm. Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai sumbu x, sedangkan luas puncak DHA yang diperoleh dari hasil pengukuran

dinyatakan sebagai sumbu y. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi DHA (oil) yang diperoleh adalah $y = 503,0871254 + 76,60239311x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9998$. Harga koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

b. Uji presisi DHA

Keseksamaan (*precision*) 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). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (KV) 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Koefisien variasi umumnya meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis.

Pada penelitian yang dilakukan, tiga konsentrasi DHA termetilasi berbeda (rendah, sedang dan tinggi) dibuat untuk uji presisi yakni 593,18; 1779,55 dan 3559,10 ppm. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai koefisien variasi (KV) berturut-turut 1,76%; 1,47% dan 1,84%. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria seksama.

c. Uji perolehan kembali DHA

Uji perolehan kembali (UPK) merupakan cara untuk menentukan kecermatan hasil analisis suatu metode. Uji perolehan kembali dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu metode absolut dan metode adisi. Pada penelitian ini dilakukan uji perolehan kembali dengan metode adisi, dimana sejumlah analit ditambahkan dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan. Digunakan metode adisi karena pada telur biasa (bukan telur yang diperkaya omega-3) juga mengandung asam lemak omega3 (ALA, EPA dan DHA), walaupun dengan kadar yang lebih rendah daripada sampel telur yang diperkaya omega-3.

Diperiksa kadar DHA dalam telur blanko dan telur dengan penambahan standar DHA sebanyak 0,5537%. Persentase rata-rata uji perolehan kembali DHA sebesar $(80,12 \pm 0,65)\%$. Dengan demikian maka hasil UPK DHA memenuhi kriteria uji perolehan kembali, dimana nilai % *recovery* yang baik berada dalam rentang 80–120%. Untuk mendapatkan nilai akurasi yang lebih baik disarankan menggunakan baku dalam untuk meminimalisasi kesalahan karena adanya metode ekstraksi asam lemak dalam telur yang cukup panjang.

d. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) DHA

Batas deteksi (*limit of detection/ LOD*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi (*limit of quantitation/ LOQ*) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

Berdasarkan perhitungan secara statistik menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi standar DHA (oil), diperoleh batas deteksi DHA sebesar 61,64 ppm dan batas kuantitasi DHA sebesar 205,45 ppm. Konsentrasi tersebut berada di bawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi.

5. Penetapan kadar DHA dalam sampel telur yang diperkaya omega-3

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar DHA dari tiga sampel telur yang diperkaya omega-3. Pemilihan sampel berdasarkan merek yang paling banyak beredar di pasaran wilayah Depok. Tahapan kerja yang dilakukan yakni mengekstraksi lipid dari kuning telur; penyabunan untuk memisahkan lipid yang dapat tersabunkan (salah satunya adalah lemak); pembebasan asam lemak untuk menetralkan

asam lemak yang terionisasi sehingga menjadi tidak terion dan mudah diekstraksi dengan pelarut non polar; lalu esterifikasi atau pemasukan gugus metil sehingga menjadi DHA-metil ester agar menjadi lebih mudah menguap sehingga lebih mudah dianalisis dengan kromatografi gas.

Penetapan kadar DHA dilakukan dengan memplot luas puncak DHA ke persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi DHA (oil). Dari ketiga sampel telur yang dianalisis, didapatkan bahwa semua sampel mengandung DHA dengan kadar yang bervariasi. Kadar DHA dalam telur bergantung pada konsumsi makanan yang mengandung omega-3 pada ayam yang menghasilkan telur tersebut. Kandungan DHA dalam sampel A sebesar $(0,52 \pm 0,006)\%$; sampel B sebesar $(1,36 \pm 0,03)\%$ dan sampel C sebesar $(1,28 \pm 0,015)\%$. Kadar DHA dalam sampel berada dalam kadar omega-3 total (ALA, EPA dan DHA) yang tercantum pada kemasan produk.