





Gambar 2. Alat kromatografi gas Shimadzu GC-17A

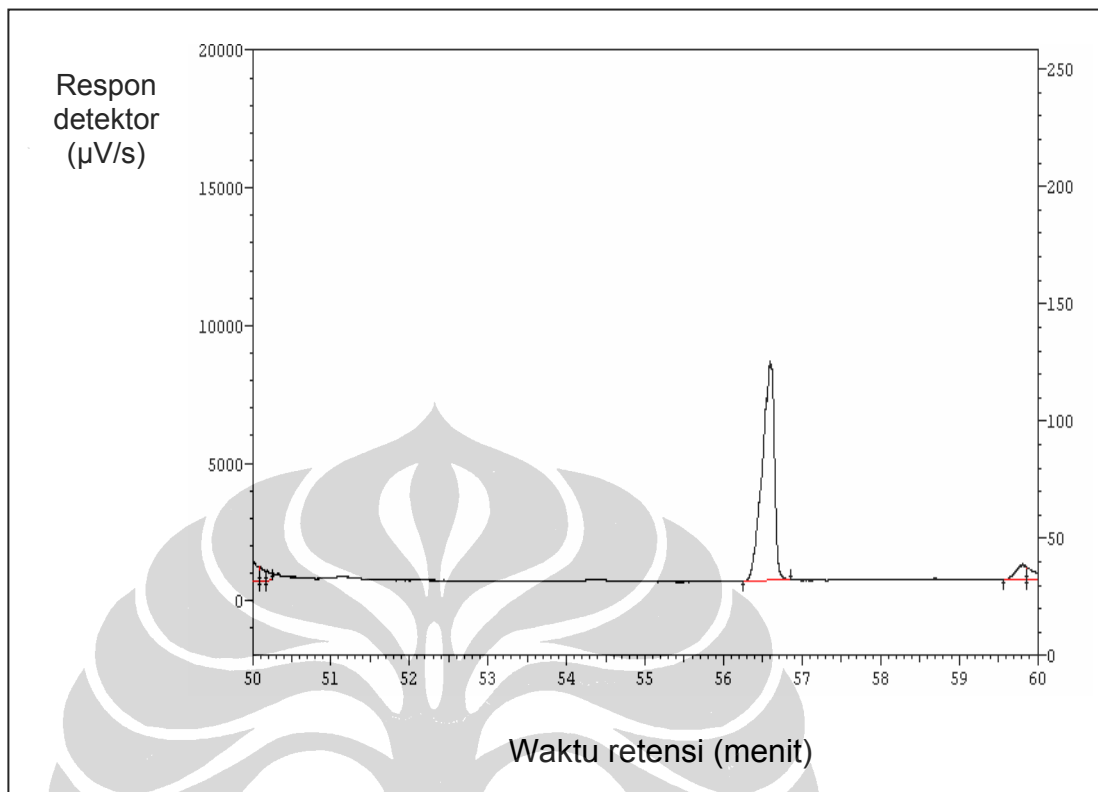
Keterangan:

A = unit utama

B = sistem kontrol / integrator CBM-102 (Shimadzu)



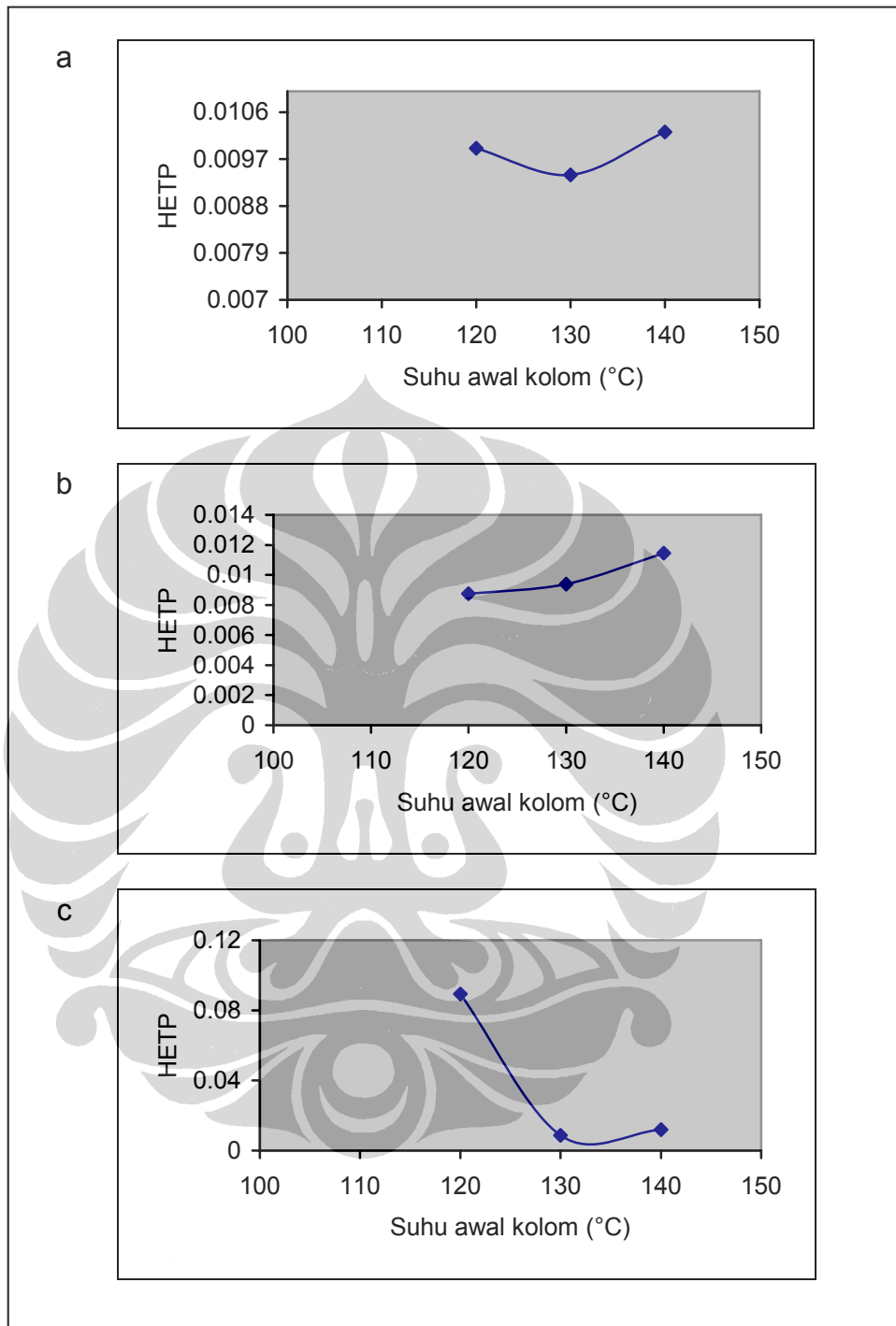
Gambar 3. Sampel telur yang diperkaya omega-3: sampel A, sampel B dan sampel C.



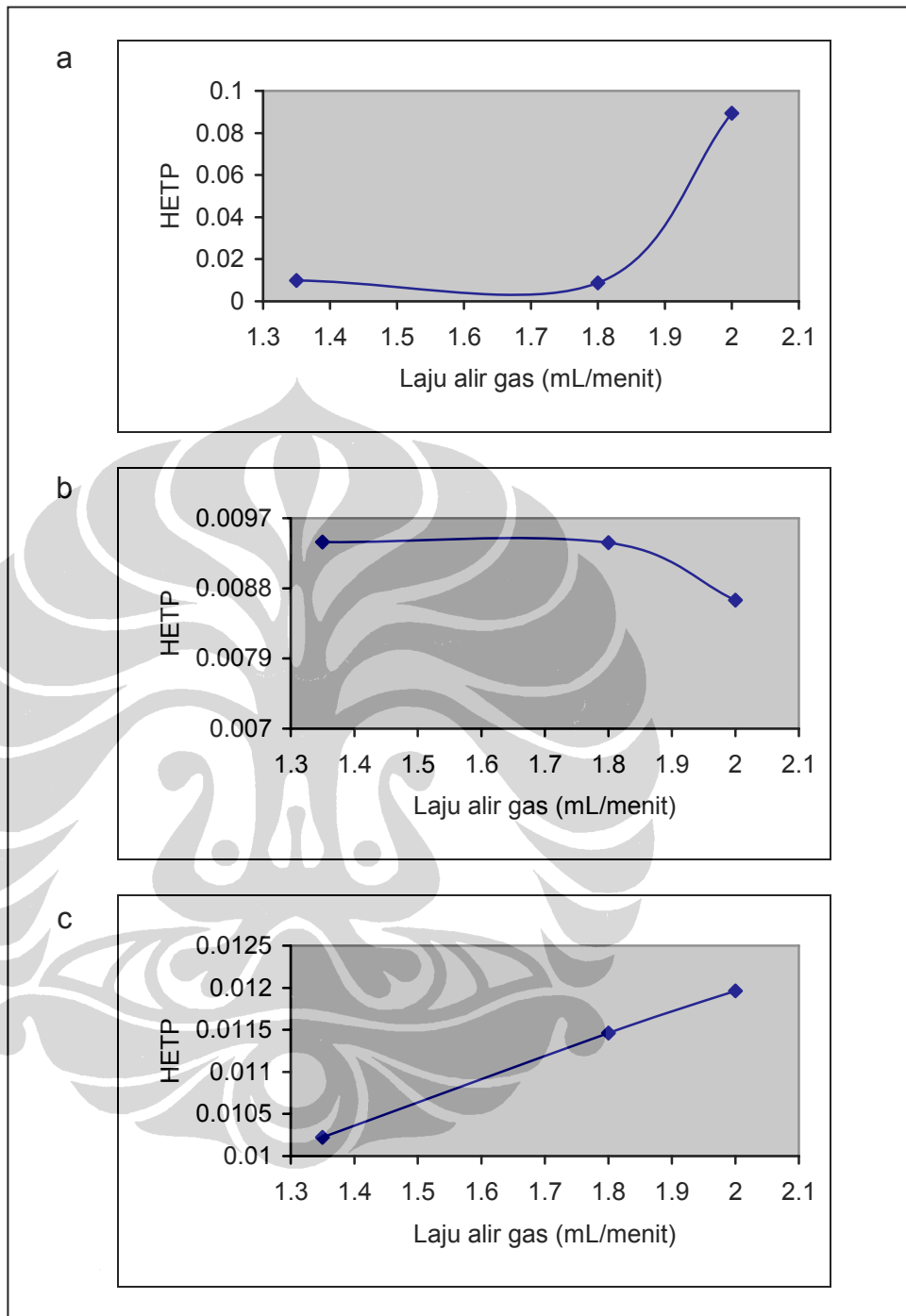
Gambar 4. Kromatogram standar DHA murni 1345 ppm dengan suhu awal kolom 130°C (suhu terprogram) dan laju alir gas 2,0 mL/menit (waktu retensi DHA 56.592 menit).

Kondisi:

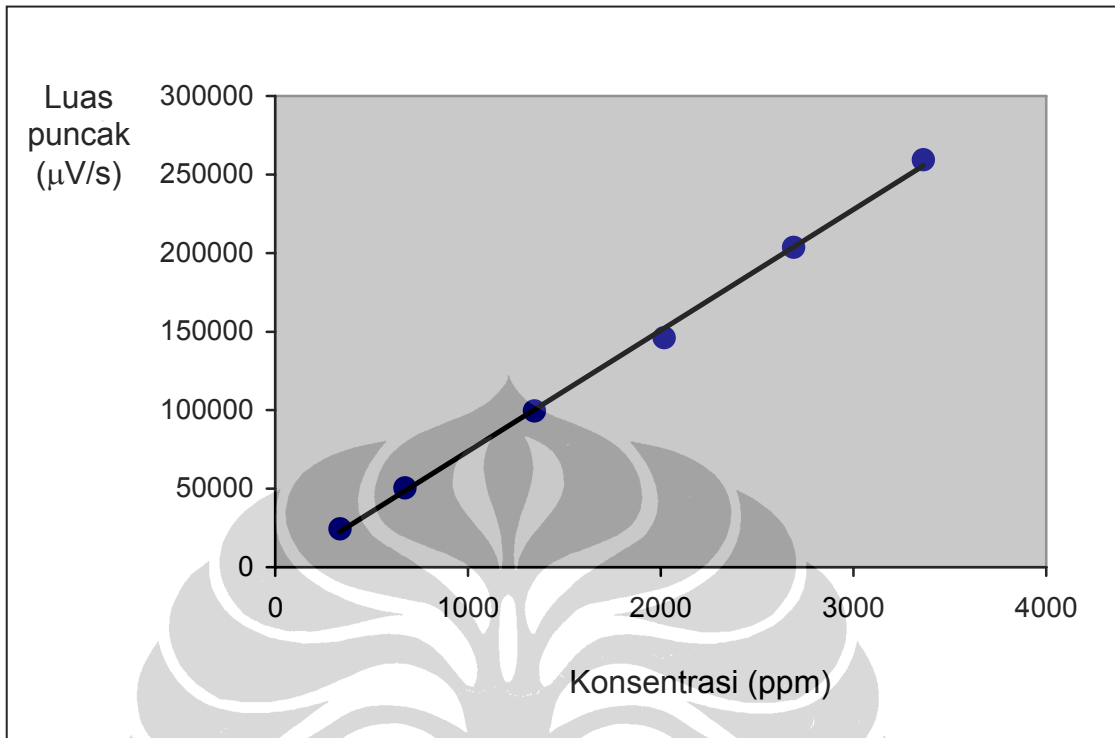
Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 µL.



Gambar 5. Kurva hubungan suhu awal kolom dan HETP dari larutan standar DHA murni 1345 ppm dengan laju alir gas 1,35 mL/menit (a), 1,8 mL/menit (b) dan 2,0 mL/menit (c).



Gambar 6. Kurva hubungan laju alir gas dan HETP dari larutan standar DHA murni 1345 ppm dengan suhu awal kolom 120°C (a), 130°C (b) dan 140°C (c).



Gambar 7. Kurva kalibrasi standar DHA murni

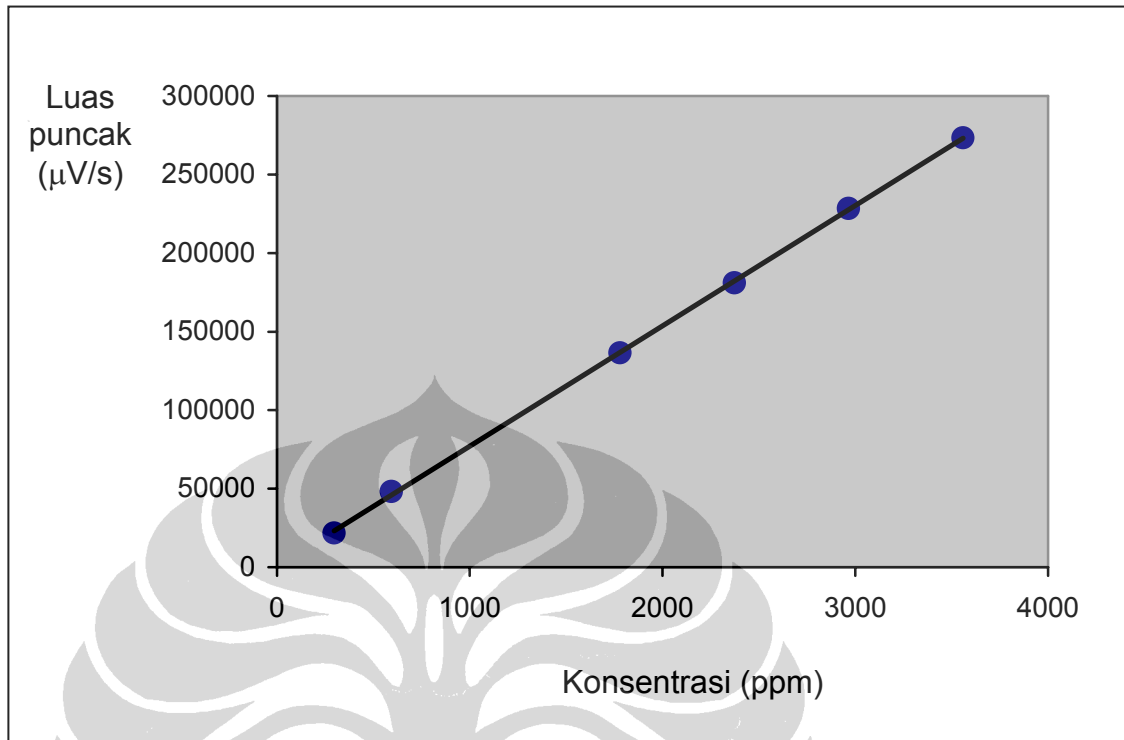
Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi DHA murni :

$$y = 76,97913123x - 3161,369863 \text{ dengan koefisien korelasi } r = 0,9993$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL.



Gambar 8. Kurva kalibrasi standar DHA (oil)

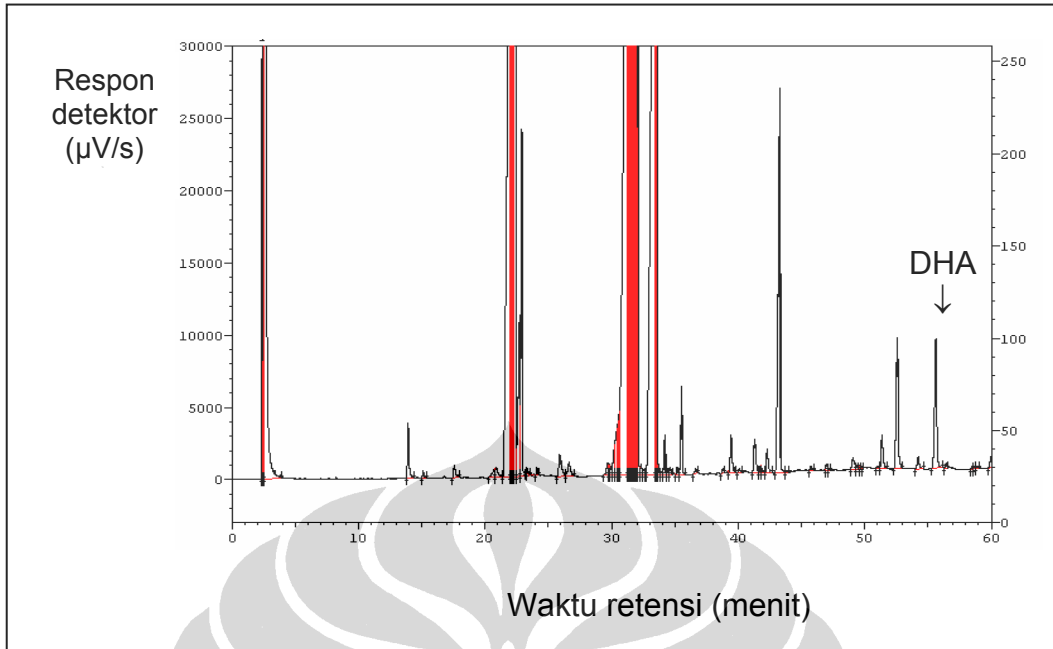
Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi DHA (oil) :

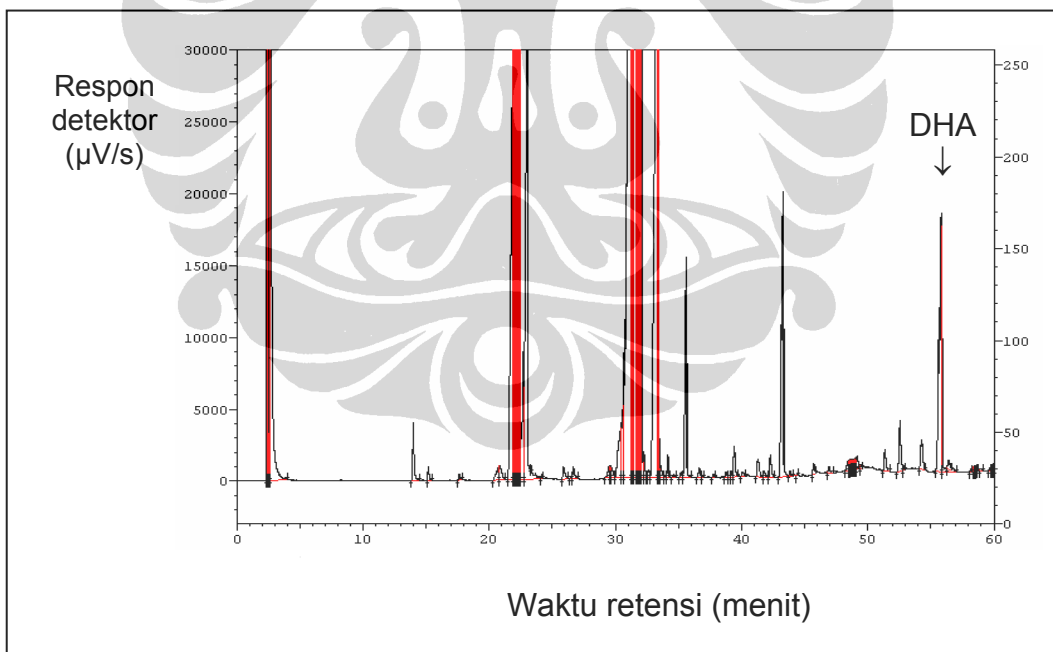
$$y = 503,0871254 + 76,60239311x \text{ dengan koefisien korelasi } r = 0,9998$$

Kondisi:

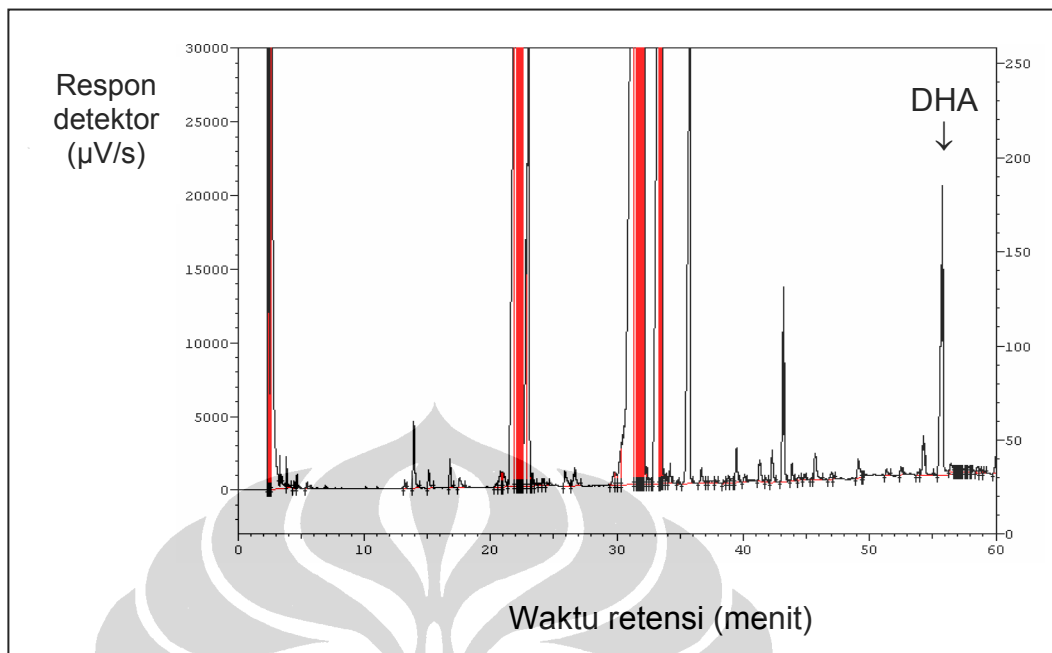
Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 µL.



Gambar 9. Kromatogram sampel telur yang diperkaya omega-3 A



Gambar 10. Kromatogram sampel telur yang diperkaya omega-3 B



Gambar 11. Kromatogram sampel telur yang diperkaya omega-3 C

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 µL.

Tabel 5

Data optimasi esterifikasi DHA (oil)

Metode esterifikasi	Konsentrasi DHA (ppm)	Waktu retensi (menit)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)
Esterifikasi Lepage	10081,5	30.316	448672
		68.380	614305
Esterifikasi Merck	10081,5	30.295	381846
		68.442	545361

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,35 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 6

Pemilihan kondisi analisis optimum penetapan kadar DHA dengan variasi suhu awal kolom dan laju alir gas pembawa

Metode elusi	Suhu awal kolom (°C)	Laju alir gas pembawa (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Faktor ikutan	Jumlah lempeng teoritis (N)	HETP (cm)
Suhu terprogram (kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan ditahan selama 20 menit)	120	1,35	68.200	0.648	605654.984	0.0099066
	120	1,8	63.468	0.720	686485.845	0.0087402
	120	2,0	62.116	0.819	671114.224	0.0893998
	130	1,35	62.686	0.693	638605.624	0.00939547
	130	1,8	57.996	0.672	639246.648	0.00938605
	130	2,0	56.592	0.746	693799.411	0.00864803
	140	1,35	56.731	0.666	587010.084	0.010221289
	140	1,8	52.439	0.705	523527.926	0.011460706
	140	2,0	51.029	0.807	501615.256	0.011961358
	Suhu tetap / isothermal	200	1,35	59.010	-	-

Tabel 7

Data kurva kalibrasi standar DHA murni

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)
336,25	24495
672,5	50342
1345	99519
2017,5	146129
2690	203598
3362,5	259360

Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi DHA murni :

$$y = 76,97913123x - 3161,369863 \text{ dengan koefisien korelasi } r = 0,9993$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 8

Data penetapan kadar DHA dalam DHA (oil)

Konsentrasi larutan (ppm)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran (ppm)	Konsentrasi pengukuran rata-rata (ppm)
	133947	1781,11	
7867,5	133956	1781,23	1779,53
	133573	1776,25	

Luas puncak DHA diplot ke persamaan regresi linier DHA murni :

$$y = 76,97913123x - 3161,369863$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar DHA dalam DHA (oil)} &= \frac{\text{Konsentrasi pengukuran rata-rata}}{\text{Konsentrasi larutan}} \times 104,3\% \\ &= \frac{1779,53 \text{ ppm}}{7867,5 \text{ ppm}} \times 100\% = 22,619\% \end{aligned}$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 9

Data kurva kalibrasi standar DHA (oil)

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)
296,59	21668
593,18	48238
1779,55	136502
2372,73	180966
2965,91	228314
3559,10	273395

Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi DHA (oil) :

$$y = 503,0871254 + 76,60239311x \text{ dengan koefisien korelasi } r = 0,9998$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 10
Data linearitas DHA (oil)

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)	Δx	Δy	$\Delta y/\Delta x$
296,59	21668	296,59	26570	89,58
593,18	48238	1186,37	88264	74,39
1779,55	136502	593,18	44464	74,96
2372,73	180966	593,18	47348	79,82
2965,91	228314	593,19	45081	75,99
3559,10	273395			
$\bar{x} = 1927,84$				

$$S (y/x) = 1573,834262$$

$$b = 76,60239311$$

$$S_{x_0} = 20,54549732$$

$$V_{x_0} = 0,010657262$$

Tabel 11

Data uji presisi DHA (oil)

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran (x_i) (ppm)	Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) (ppm)	Simpangan baku (SD)	Koefisien variasi (KV) (%)
593,18	49277	636,7153	620,6823	10,9095	1,76
	47014	607,1731			
	48238	623,1517			
	47500	613,5176			
	47602	614,8491			
	48662	628,6868			
1779,55	130731	1700,0502	1719,5491	25,2042	1,47
	133947	1742,0332			
	133956	1742,1507			
	131826	1714,3448			
	129315	1681,5651			
	133573	1737,1509			
3559,10	271621	3539,2878	3590,7048	66,2096	1,84
	273395	3562,4463			
	282373	3679,6489			
	280094	3649,8979			
	269217	3507,9049			
	276658	3605,0429			

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:3; suhu kolom 130°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C dan dipertahankan selama 20 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 2,0 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 12

Data uji perolehan kembali DHA (oil)

Telur	Konsentrasi DHA yang dimasukkan (%)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran (ppm)	Konsentrasi larutan (ppm)	Kadar DHA (%)		UPK (%)	UPK rata- rata (%)
					Kadar DHA	Kadar rata- rata		
Telur		77110	1000,0590	257750	0,3880			
blanko	-	82492	1070,3179	275750	0,3881	0,3926	-	-
		86020	1116,3739	278000	0,4016			
Telur +		174484	2271,2203	270500	0,8396		80,73	
standar	0,5537	152618	1985,7723	238500	0,8326	-	79,47	80,12
DHA (oil)		177340	2308,5038	276000	0,8364		80,16	

Tabel 13

Data batas deteksi dan batas kuantitasi DHA (oil)

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak (y) ($\mu\text{V/s}$)	y_i	$(y - y_i)^2$
296,59	21668	23222,5909	2416752,86
593,18	48238	45942,0947	5271181,283
1779,55	136502	136820,8758	101681,7658
2372,73	180966	182259,8833	1674134,07
2965,91	228314	227698,8909	378359,2365
3559,10	273395	273138,6644	65707,9177
			$\Sigma = 9907817,132$

Persamaan regresi linier DHA (oil) : $y = 503,0871254 + 76,60239311x$

$$r = 0,9998$$

$$S (y/x) = 1573,834262$$

$$b = 76,60239311$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = 61,64 \text{ ppm}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = 205,45 \text{ ppm}$$

Tabel 14

Data penetapan kadar DHA dalam sampel telur yang diperkaya omega-3

Sampel	Berat telur yang ditimbang (kuning telur) (mg)	Berat ekstrak asam lemak total (mg)	Berat ekstrak asam lemak yang dimetilasi (mg)	Luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran (ppm)	Konsentrasi larutan (ppm)
A	15206,4	797,6	103,8	103397	1343,2206	259500
	16818,8	888,2	101,2	102081	1326,0409	253000
	15012	676,8	102,5	104419	1356,5622	256250
B	15038,3	629,9	101,9	263897	3438,4554	254750
	15849,4	771,6	102,1	272871	3555,6058	255250
	16922,2	850,1	83,5	215987	2813,0180	208750
C	15937,8	632,8	103,3	255032	3322,7280	258250
	13229,9	869,4	102,4	253622	3304,3212	256000
	13849,5	773,4	86,3	209651	2730,3052	215750

Tabel 14 (lanjutan)

Sampel telur	Kadar DHA (%)		Berat DHA (mg)		Kadar omega-3 total (tda DHA, EPA dan ALA) dalam kemasan
	Kadar DHA (%)	Kadar DHA rata-rata (%)	Berat DHA dalam 1 telur (kuning telur) (mg)	Berat DHA rata-rata dalam 1 telur ~ 60 g (mg)	
A	0,5176		78,71		Tidak tercantum
	0,5241	0,5237	88,15	82,11	
	0,5294		79,47		
B	1,3497		202,98		310 mg/120 g telur
	1,3930	1,3634	220,78	217,26	
	1,3476		228,04		
C	1,2866		205,06		618 mg/60 g telur
	1,2908	1,2809	170,76	183,69	
	1,2655		175,26		

Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis $y = a + bx$

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

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

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

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

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

Lampiran 2

Cara perhitungan penetapan kadar DHA dalam DHA (oil)

Dari larutan standar DHA (oil) 10490 ppm → pipet 0,3 mL sebanyak tiga kali untuk diesterifikasi (0,3 mL terlarut dalam 0,4 mL toluen) → didapat konsentrasi larutan DHA (oil) termetilasi 7867,5 ppm.

Persamaan kurva kalibrasi DHA murni : $y = 76,97913123x - 3161,369863$

Luas puncak DHA dalam DHA (oil) = 133947 $\mu\text{V/s}$ → diplot persamaan regresi linier DHA murni, maka $x = 1781,11$ ppm.

Konsentrasi pengukuran rata-rata = 1779,53 ppm.

$$\begin{aligned} \text{Kadar DHA dalam DHA (oil)} &= \frac{\text{Konsentrasi pengukuran rata - rata}}{\text{Konsentrasi larutan}} \times 104,3\% \\ &= \frac{1779,53 \text{ ppm}}{7867,5 \text{ ppm}} \times 100\% = 22,619\% \end{aligned}$$

Lampiran 3

Cara perhitungan uji presisi

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

Simpangan baku :
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

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

Contoh:

Hasil pengukuran standar DHA (oil) untuk data presisi konsentrasi rendah:

Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) = 620,6823 ppm

$$SD = \sqrt{\frac{(636,7153 - 620,6823)^2 + \dots + (628,6868 - 620,6823)^2}{6-1}} = 10,9095$$

$$KV = \frac{10,9095}{620,6823} \times 100\% = 1,76$$

Lampiran 4

Cara perhitungan uji perolehan kembali

Perhitungan UPK dengan metode adisi:

$$\text{Persen perolehan kembali : } \% \text{UPK} = \frac{C_a - C_b}{C} \times 100\%$$

C_a = konsentrasi DHA dalam sampel telur yang ditambahkan standar DHA

C_b = konsentrasi DHA dalam sampel telur blanko

C = konsentrasi DHA yang ditambahkan sebenarnya

Contoh:

Persamaan kurva kalibrasi DHA (oil) : $y = 503,0871254 + 76,60239311x$

y = luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi DHA (ppm)

Luas puncak DHA pada telur yang ditambahkan standar DHA = 174484 $\mu\text{V/s}$

→ diplot persamaan regresi linier DHA, maka $x = 2271,2203$ ppm

$$\begin{aligned} \text{Kadar DHA dalam sampel} &= \frac{\text{Konsentrasi pengukuran}}{\text{Konsentrasi larutan}} \times 100\% \\ &= \frac{2271,2203 \text{ ppm}}{270500 \text{ ppm}} \times 100\% = 0,8396\% \end{aligned}$$

Konsentrasi DHA yang ditambahkan sebenarnya = 0,5537%

Kadar DHA rata-rata pada telur blanko = 0,3926%

$$\% \text{UPK} = \frac{0,8396 - 0,3926}{0,5537} \times 100\% = 80,73\%$$

Lampiran 5

Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas

$$\text{Simpangan baku residual : } S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

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

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

$$\text{Standar deviasi dari fungsi : } S_{x_0} = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi : } V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

Contoh:

Persamaan kurva kalibrasi DHA (oil) : $y = 503,0871254 + 76,60239311x$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{(21668 - 23222,5909)^2 + \dots + (273395 - 273138,6644)^2}{6 - 2}} = 1573,834262$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 \times 1573,834262}{76,60239311} = 61,64 \text{ ppm}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 \times 1573,834262}{76,60239311} = 205,45 \text{ ppm}$$

$$S_{x_0} = \frac{1573,834262}{76,60239311} = 20,54549732$$

$$V_{x_0} = \frac{20,54549732}{1927,84} = 0,010657262$$

Lampiran 6

Cara perhitungan kadar zat dalam sampel

Contoh perhitungan kadar DHA dalam sampel:

Persamaan kurva kalibrasi DHA (oil) : $y = 502,8897396 + 73,446235x$

y = luas puncak DHA ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi DHA (ppm)

Luas puncak DHA dalam sampel = $103397 \mu\text{V/s}$ → diplot persamaan regresi

linier DHA, maka $x = 1343,2206 \text{ ppm}$

Konsentrasi larutan = 259500 ppm

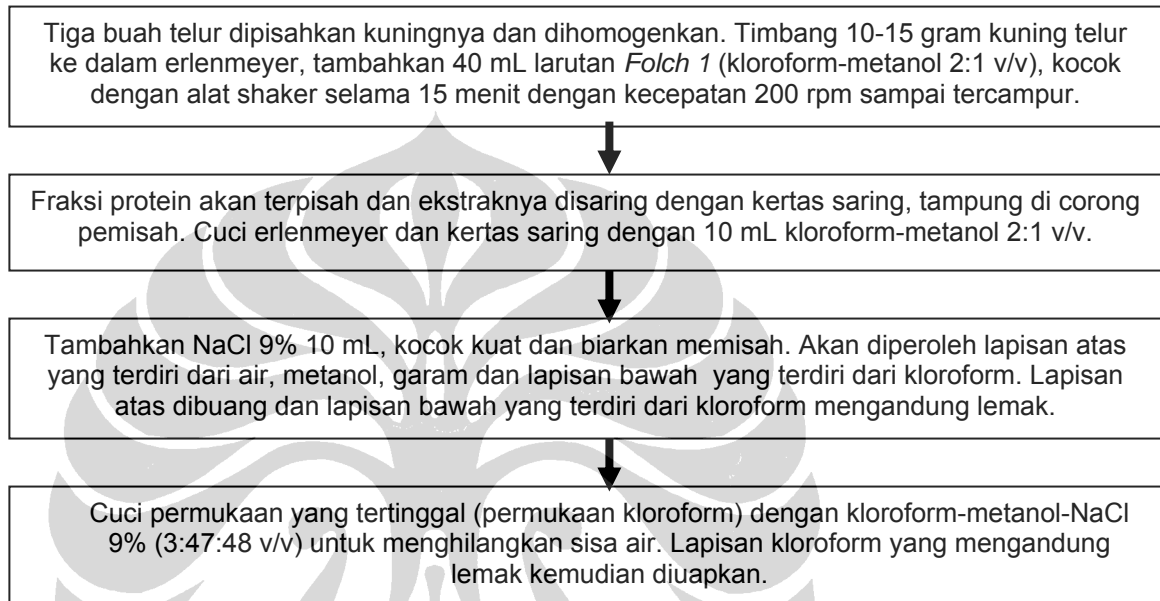
$$\begin{aligned} \text{Kadar DHA dalam sampel} &= \frac{\text{Konsentrasi pengukuran}}{\text{Konsentrasi larutan}} \times 100\% \\ &= \frac{1343,2206 \text{ ppm}}{259500 \text{ ppm}} \times 100\% = 0,5176\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat DHA dalam sampel} &= \text{Kadar DHA dalam sampel} \times \text{berat telur yang ditimbang} \\ &= 0,5176\% \times 15206,4 \text{ mg} \\ &= 78,71 \text{ mg} \end{aligned}$$

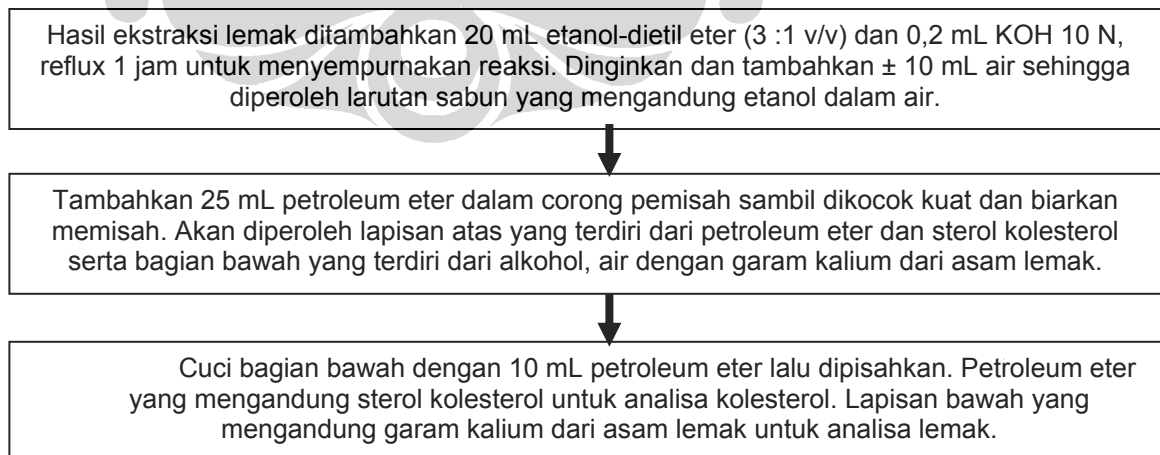
Lampiran 7

Skema penetapan kadar DHA dalam sampel telur

a. Ekstraksi lipid



b. Penyabunan



c. Pembebasan asam lemak

Lapisan bawah yang mengandung garam kalium dari asam lemak di atas ditambahkan 3 mL HCl 1,5 N dan 25 mL petroleum eter, kocok kuat dan biarkan memisah. Akan diperoleh lapisan atas yang terdiri dari petroleum eter yang mengandung asam lemak.

Lapisan bawah dicuci dengan 10 mL petroleum eter lalu dipisahkan. Lapisan petroleum eter dikeringkan, diperoleh ekstrak asam lemak.

d. Esterifikasi Lepage

Timbang ekstrak asam lemak \pm 100 mg di dalam tabung reaksi bertutup teflon. Tambahkan 2 mL metanol-toluen (4:1 v/v), vortex.

Tambahkan 0,2 mL asetil klorida perlahan-lahan ke dalam tabung reaksi sambil divortex.

Tabung ditutup rapat kemudian dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam.

Dinginkan tabung dalam air, tambahkan 5 mL K₂CO₃ 6% perlahan-lahan, vortex.

Tabung ditutup rapat lalu disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 1,0 μ L lapisan atas toluen siap disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas.

Lampiran 8

Sertifikat analisis DHA murni



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

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

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




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

Lampiran 9

Sertifikat analisis 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 μ g/g	Within Limit
Arsenic	Not more than 1 μ 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 ISHARA Plant