

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. TELUR

##### 1. Definisi

Telur dalam pengertian sehari-hari mempunyai dua kriteria yaitu sebagai bahan biologi dan sebagai bahan pangan. Sebagai bahan biologi, telur merupakan sumber nutrisi kompleks yang lengkap bagi pertumbuhan sel yang dibuahi. Sedangkan sebagai bahan pangan, telur merupakan salah satu sumber protein hewani kedua yang mudah dijangkau setelah ikan (15).

Nilai gizi telur serupa dengan susu, dalam arti dapat dijadikan sumber makanan bagi pertumbuhan biologi. Bedanya, susu merupakan bahan makanan bagi pertumbuhan anak, sedangkan telur merupakan bahan makanan bagi pertumbuhan embrio (16). Sebagai bahan makanan, telur memiliki reputasi yang tinggi karena:

- a. Telur mengandung zat-zat makanan yang penting bagi tubuh yakni sumber protein, lemak, vitamin dan mineral yang cukup lengkap, sehingga bisa membantu memperlancar proses-proses metabolisme dalam tubuh (4).
- b. Kandungan proteinnya secara nyata menyumbang gizi yang diperlukan pada fase pertumbuhan. Oleh karena itu sangat tepat

diberikan pada golongan masyarakat rawan gizi seperti ibu hamil dan menyusui, anak-anak pada usia pertumbuhan, orang tua maupun pekerja yang banyak menggunakan tenaga fisik (17).

- c. Gizi yang terkandung dalam telur mudah dicerna dan diabsorpsi oleh tubuh secara sempurna. Contohnya lemak dalam telur yang sudah dalam keadaan teremulsi sehingga mudah dicerna tubuh (4).

## 2. Struktur

Pada dasarnya, struktur telur terdiri atas sel yang hidup dan dikelilingi oleh kuning telur sebagai cadangan makanan terbesar. Kedua komponen tersebut dikelilingi oleh putih telur yang mempunyai kandungan air tinggi, bersifat elastis dan dapat mengabsorpsi guncangan yang mungkin terjadi pada telur tersebut. Komponen dalam itu dikelilingi oleh kulit telur yang berfungsi untuk mengurangi kerusakan fisik dan biologis. Adanya kulit telur ini memungkinkan dilakukan pernapasan dan pertukaran gas-gas dari dalam dan luar kulit telur. Telur ayam terdiri dari tiga bagian utama, yaitu kulit telur, kuning telur dan putih telur. Persentase berat kulit telur 8-11%, kuning telur 27-32% dan putih telur 56-61% (18). Komposisi kimia telur dapat dilihat pada tabel 1 (19).

Tabel 1. Komposisi Kimia Telur Berdasarkan Studi USDA (*The United States Department of Agriculture*)

Komposisi	Keseluruhan (%)	Putih (%)	Kuning (%)	Kulit (%)
% Total	100	58	31	11
Air	65,5	88	48	
Protein	11,8	11	17,5	
Lemak	11	0,2	32,5	
Abu	11,7	0,8	2	
CaCO <sub>3</sub>				94
MgCO <sub>3</sub>				1
CaPO <sub>4</sub>				1
Material organik				4

### 3. Kandungan Nutrisi

Telur ayam merupakan jenis telur yang paling umum dikonsumsi karena bernutrisi tinggi. Semakin maju suatu masyarakat, semakin tinggi konsumsi telur per orang per tahunnya. Contohnya Amerika Serikat memiliki konsumsi telur tertinggi di dunia yaitu 314 butir/orang/tahun. Bandingkan dengan Indonesia yang baru mencapai 15-40 butir/orang/tahun (17).

Meskipun telur mengandung 74% air, tetapi telur merupakan sumber protein bermutu tinggi dimana menyediakan semua asam amino esensial bagi manusia, terutama pada bagian putihnya (*albumen*). Sedangkan bagian kuningnya (*yolk*) merupakan sumber lemak. Telur juga menyediakan sejumlah penting vitamin termasuk vitamin A, E, K dan vitamin-vitamin B termasuk vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> B<sub>12</sub> dan asam folat. Sebagai sumber vitamin D alami, telur hanya kalah dengan minyak hati ikan hiu, karena itu telur sangat baik untuk pertumbuhan anak yang sedang tumbuh. Kelemahan telur hanyalah karena rendahnya kadar Ca dan tidak adanya kandungan vitamin C sama sekali. Telur juga mengandung sejumlah mineral penting seperti kalsium, besi, fosfor, magnesium dan kalium (19).

Kuning telur rata-rata mengandung 60 kalori (250 kilojoule), sedangkan putih telur mengandung sekitar 15 kalori (60 kilojoule). Kuning telur juga mengandung kolin, dimana memenuhi setengah dari kebutuhan harian yang direkomendasikan. Kolin merupakan nutrisi penting untuk perkembangan otak, penting bagi wanita hamil dan menyusui karena mempengaruhi perkembangan otak janin yang sehat (20).

Dalam kuning telur terdapat kolesterol dengan kadar yang sangat tinggi yaitu sekitar 2000 mg/100 g. Badan manusia mampu mensintesis kolesterol yang diperlukan dan menggunakannya dalam proses metabolisme tubuh. Bila terdapat kolesterol yang masuk melalui

makanan, maka tubuh cenderung melakukan kompensasi dengan cara memproduksi kolesterol lebih sedikit (17).

#### 4. Produk-Produk Telur Khusus (11)

Dalam usaha memenuhi permintaan konsumen, sekarang ini produsen telur telah memulai produksi telur-telur khusus. Contohnya telur organik, telur vegetarian, telur *Aracauna*, telur berkulit terpasteurisasi, telur fertil, telur *free-range*, telur *cage-free* dan telur rekayasa nutrisi seperti telur rendah kolesterol dan telur yang diperkaya omega-3. Terkait dengan biaya produksi yang lebih besar, produk-produk telur khusus biasanya lebih mahal daripada telur biasa.

##### a. Telur Organik

Pada bulan Oktober 2002, *The National Organic Standard Board* membuat aturan nasional yang harus dipenuhi oleh produsen yang ingin membuat telur organik. Telur organik diproduksi oleh ayam yang diberi makanan tanpa mengandung pestisida, fungisida, herbisida atau pupuk komersial lainnya. Juga tidak diperbolehkannya penggunaan hormon pertumbuhan dan antibiotik.

##### b. Telur Vegetarian

Telur vegetarian diproduksi oleh ayam yang diberi makanan produk yang bebas kandungan hewani, juga bebas dari pemberian hormon, antibiotik atau steroid.

c. Telur *Aracauna*

Telur *Aracauna* berasal dari ayam *Aracauna*, ayam suku asli dari Amerika Selatan. Walaupun telurnya berwarna biru kehijauan, tetapi kandungan nutrisinya tidak berbeda jauh dibandingkan telur coklat atau putih yang biasa ditemukan di toko lokal. Banyak konsumen berpikir telur jenis ini rendah kolesterol, padahal kenyataannya tinggi kolesterol.

d. Telur Berkulit Terpasteurisasi

Telur berkulit terpasteurisasi merupakan pilihan baik bagi konsumen yang ingin menggunakan telur mentah pada resep yang tidak membutuhkan pemasakan lebih lanjut. Telur ini telah diproses dengan pemanasan untuk membunuh bakteri *Salmonella* yang secara potensial dapat terdapat di dalamnya (resiko telur terkontaminasi *Salmonella* adalah 1: 20000). Karena proses pemanasan, kandungan vitamin yang tidak tahan panasnya menjadi lebih rendah.

e. Telur Fertil

Telur fertil dihasilkan oleh ayam yang hidup dengan pasangannya. Telur ini bisa diinkubasi dan ditetaskan. Tidak ada perbedaan nutrisi antara telur fertil dengan telur biasa.

f. Telur *Free-Range*

Telur ini diproduksi oleh ayam yang hidup di *outdoor* atau di luar ruangan. Ayam jenis ini mempunyai akses atau kebebasan lebih

ke wilayah di luar, sehingga dapat mengkonsumsi rumput dan insektisida, dibandingkan dengan ayam yang dikandangkan.

g. Telur *Cage-Free*

Telur ini diproduksi oleh ayam yang hidup di fasilitas *indoor* atau di dalam ruangan, sehingga tidak memiliki akses atau kebebasan lebih ke wilayah luar. Biasanya ayam jenis ini hidup di rumah peternakan. Kandungan nutrisi telur ini sama seperti telur yang diproduksi oleh ayam yang dikandangkan.

h. Telur Rendah Kolesterol

Telur ini mengandung kolesterol yang lebih rendah daripada telur pada umumnya. Namun telur rendah kolesterol dianggap kurang bermanfaat, pasalnya telur ini hanya mengurangi masukan kolesterol dari luar, tidak mengurangi kolesterol dari dalam tubuh.

i. Telur yang Diperkaya Omega-3

Telur ini diproduksi oleh ayam yang diberi makanan yang kaya akan sumber asam lemak omega-3, seperti biji kedelai, biji rami (*flax seed*), minyak hati ikan cod, dll. Hasilnya kandungan omega-3 pada kuning telur naik secara drastis.

Telur yang diperkaya omega-3 sedang marak beredar di pasaran, hal ini dikarenakan manfaat asam lemak omega-3 yang begitu besar bagi tubuh. Asam lemak omega 3 meliputi asam linolenat (ALA), asam dokosaheksaenoat (DHA) dan asam eikosapentaenoat (EPA). Asam lemak omega-3 merupakan asam lemak esensial dimana

tubuh tidak dapat memproduksinya, maka harus dipasok dari luar tubuh melalui makanan. Telur yang diperkaya omega-3 merupakan pilihan baik bagi orang yang ingin meningkatkan asupan asam lemak omega-3 tetapi tidak suka makan ikan atau minyak ikan (11).

Telur yang diperkaya omega-3 mencukupi seperempat (21-28%) kebutuhan asupan ALA bagi pria dan anak lelaki dan mencukupi sepertiga (31-34%) kebutuhan asupan ALA bagi wanita dan anak perempuan. Perbandingan nutrisi yang terkandung dalam telur yang diperkaya omega-3 dibandingkan dengan telur reguler/ biasa dapat dilihat pada tabel 2 (12).

Tabel 2. Perbandingan Nutrisi dalam Telur yang Diperkaya Omega-3 Dibandingkan dengan Telur Reguler/ Biasa Berdasarkan Studi USDA (*The United States Department of Agriculture*)

Nutrisi	Telur yang Diperkaya Omega-3	Telur Reguler/ Biasa
Energi	74 kalori	75 kalori
Protein	6,2 g	6,2 g
Total Lemak	4,8 g	5 g
Lemak Jenuh	1,5 g	1,6 g
Lemak Tak Jenuh Tunggal	2,1 g	1,9 g
Lemak Tak jenuh Ganda	1,3 g	0,68 g



Total Asam Lemak Omega-6	0,78 g	0,64 g
<u>Total Asam Lemak Omega-3</u>	<u>0,5 g</u>	<u>0,04 g</u>
	(0,34 g ALA dan 0,13 g EPA + DHA)	
Kolesterol	182 mg	212 mg

---

## B. LIPID, LEMAK DAN ASAM LEMAK

### 1. Lipid

Lipid merupakan senyawa organik yang terdapat di alam, bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut non polar seperti eter, kloroform, benzen, dll. Lipid merupakan molekul ampifatik karena memiliki 2 sifat yakni hidrofobik (tidak suka air) karena mengandung gugus nonpolar/ hidrokarbon dan bersifat hidrofilik (suka air) karena mengandung gugus polar atau gugusan ionik (21).

Berdasarkan sifat lipid yang dapat disabunkan atau tidak, lipid dibagi 2 yaitu (8):

- a. Lipid yang dapat disabunkan: lipid yang bila ditambahkan larutan alkali  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  akan menghasilkan sabun dan bahan-bahan lain. Contohnya lemak, lilin, fosfolipid.
- b. Lipid yang tidak dapat disabunkan: lipid bila ditambahkan larutan alkali  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  tidak bereaksi atau tidak akan menghasilkan sabun. Contohnya sterol, hidrokarbon, pigmen.

Berdasarkan komposisi kimianya, lipid diklasifikasikan oleh *Bloor* sebagai berikut (21):

- a. Lipid Sederhana: merupakan ester asam lemak dengan berbagai alkohol. Contohnya lemak dan lilin.
- b. Lipid Kompleks: merupakan ester asam lemak yang mengandung gugus-gugus lain selain alkohol dan asam lemak. Contohnya fosfolipid, glikolipid, sulfolipid dan lipoprotein.
- c. Prekursor dan Derivat Lipid: merupakan zat-zat yang dihasilkan dari hidrolisis lipid-lipid tersebut di atas. Contohnya asam lemak, gliserol, senyawa alkohol selain gliserol, sterol, aldehid lemak, badan keton, hidrokarbon, vitamin larut lemak, hormon.

## 2. Lemak dan Minyak

Lemak dan minyak termasuk salah satu anggota dari golongan lipid. Karbohidrat dan lemak berfungsi sebagai bahan pangan, merupakan sumber energi dalam aktivitas tubuh manusia. Lemak dioksidasi secara sempurna dalam tubuh menghasilkan 9,3 kalori lemak per gram, sedangkan protein dan karbohidrat menghasilkan 4,1 dan 4,2 kalori per gram.

Lemak dan minyak terdiri dari trigliserida campuran, yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak rantai panjang. Lemak tersebut jika dihidrolisis akan menghasilkan 3 molekul asam lemak rantai panjang yang berbeda dan 1 molekul gliserol. Lemak dan minyak hanya

berbeda dalam bentuk (wujud) tetapi tidak berbeda dalam bentuk umum trigliseridanya. Trigliserida dapat berwujud padat atau cair, tergantung dari komposisi asam lemak yang menyusunnya. Sebagian besar minyak nabati berbentuk cair pada suhu kamar karena mengandung sejumlah asam lemak tidak jenuh yang memiliki titik cair yang rendah. Lemak hewani umumnya berbentuk padat pada suhu kamar karena banyak mengandung asam lemak jenuh yang memiliki titik cair lebih tinggi (8).

### 3. Asam Lemak

Asam lemak merupakan senyawa organik yang sebagian besar ditemukan dalam bentuk ester dalam lemak dan minyak alami. Sedikit ditemukan asam lemak dalam bentuk tidak teresterifikasi sebagai asam lemak bebas, suatu bentuk pengangkut dalam plasma darah (21).

Kebanyakan asam lemak diperoleh melalui hidrolisis lemak atau minyak. Senyawa lemak atau minyak terdiri dari trigliserida campuran, yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak rantai panjang. Lemak tersebut jika dihidrolisis akan menghasilkan 3 molekul asam lemak rantai panjang yang berbeda dan 1 molekul gliserol .

Asam lemak adalah asam organik berantai panjang yang mempunyai atom karbon dari C<sub>2</sub> – C<sub>24</sub>, mempunyai gugus karboksil tunggal dan ekor hidrokarbon nonpolar yang panjang. Hal ini menyebabkan kebanyakan lipid bersifat hidrofobik atau tidak larut air.

Ikatan ester dari gliserol dan asam lemak dapat mengalami hidrolisis dalam suasana asam maupun basa. Reaksi hidrolisis oleh asam bersifat bolak-balik (*reversible*). Hidrolisis oleh basa tidak bersifat bolak-balik (*irreversible*) pada tahap terakhir, yaitu asam yang terbentuk tidak dapat bereaksi kembali dengan alkohol.

Sifat asam lemak dicerminkan oleh sifat rantai hidrokarbon. Secara alamiah asam lemak jenuh yang mengandung atom karbon C1 – C8 berwujud cair, sedangkan jika lebih besar dari C8 berwujud padat. Semakin banyak jumlah ikatan rangkap pada suatu rantai karbon maka titik cairnya semakin rendah. Contohnya asam stearat (C18:0) mempunyai titik cair 70°C, tetapi dengan adanya 1 ikatan rangkap (menjadi asam oleat, C18:1) titik cairnya turun menjadi 14°C (8).

Asam lemak dapat digolongkan berdasarkan tingkat kejenuhannya dan berdasarkan kepentingan nutrisinya dalam tubuh. Berdasarkan tingkat kejenuhannya asam lemak dibagi menjadi asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh (21).

- a. Asam Lemak Jenuh (*saturated*): tidak mengandung ikatan rangkap. Memiliki struktur dasar asam asetat ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ) dan seri yang menambahkan  $\text{-CH}_2\text{-}$  secara progresif di antara gugus terminal  $\text{CH}_3\text{-}$  dan  $\text{-COOH}$ . Contohnya asam palmitat C16:0, artinya memiliki 16 atom karbon dan nol ikatan rangkap.

- b. Asam Lemak Tidak Jenuh Tunggal (*monounsaturated*): mengandung 1 ikatan rangkap. Contohnya asam oleat C18:1, artinya memiliki 18 atom karbon dan 1 ikatan rangkap.
- c. Asam Lemak Tidak Jenuh Ganda (*polyunsaturated*): mengandung 2 atau lebih ikatan rangkap. Contohnya asam dokosaheksaenoat (DHA) C22:6,  $\omega$ 3, artinya memiliki 22 atom karbon dan 6 ikatan rangkap. Arti  $\omega$ 3 (omega-3) yaitu mengandung ikatan rangkap yang dimulai dari atom ketiga dari ujung terminal metil.

Beberapa contoh asam lemak jenuh dapat dilihat pada tabel 3 dan asam lemak tidak jenuh pada tabel 4 (8).

Tabel 3. Contoh Asam Lemak Jenuh

Nama Umum	Rumus Struktur	Cara Tulis Singkat	Sumber (asal)
Asam Asetat	CH <sub>3</sub> COOH	C2:0	Minyak pohon <i>spindle</i>
Asam Butirat	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> COOH	C4:0	Lemak susu sapi, mentega
Asam Kaproat	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> COOH	C6:0	Mentega, minyak kelapa, minyak kelapa sawit
Asam Kaprilat	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> COOH	C8:0	Idem
Asam Kaprat	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> COOH	C10:0	Susu sapi dan

			kambing, minyak kelapa, minyak kelapa sawit
Asam Laurat	$C_{11}H_{23}COOH$	C12:0	Susu, minyak inti sawit, minyak kelapa
Asam Miristat	$C_{13}H_{27}COOH$	C14:0	Minyak pala, susu ternak, lemak nabati; minyak babi dan minyak ikan hiu
Asam Palmitat	$C_{15}H_{31}COOH$	C16:0	Terdapat dalam sebagian lemak hewani dan minyak nabati

Tabel 4. Contoh Asam Lemak Tidak Jenuh

Nama Umum	Rumus Struktur	Cara Tulis Singkat	Sumber (asal)
Asam Oleat	$CH_3(CH_2)_7CH=CH$ $(CH_2)_7COOH$	C18:1, $\omega 9$	Di sebagian besar minyak dan lemak

Asam Linoleat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}:\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	C18:2, $\omega 6$	Minyak jagung, kacang, kedelai, biji kapas, <i>linseed</i>
Asam $\alpha$ - Linolenat (ALA)	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}:\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	C18:3, $\omega 3$	<i>Linseed</i> , biji bunga matahari, minyak kedelai
Asam Arakidonat (ARA)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}:\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	C20:4, $\omega 6$	Jaringan hati babi
Asam Eikosapenta enoat (EPA)	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}:\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	C20:5, $\omega 3$	Minyak hati ikan cod, salmon, mackerel, sarden, susu ASI
Asam Dokosaheksa enoat (DHA)	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}:\text{CHCH}_2)_6(\text{CH}_2)\text{COOH}$	C22:6, $\omega 3$	Minyak ikan, <i>microalgae</i> , biji <i>chia</i> , <i>flax seed</i>

Asam lemak juga dibedakan berdasarkan kepentingan nutrisinya dalam tubuh, yakni asam lemak esensial dan asam lemak non-esensial (21).

- a. Asam Lemak Non-Esensial: asam lemak atau nutrisi yang diperlukan oleh tubuh dan dapat disintesis oleh tubuh manusia itu sendiri. Contohnya asam oleat.
- b. Asam Lemak Esensial (*Essential Fatty Acids*, EFAs): asam lemak atau nutrisi yang diperlukan oleh tubuh dalam jumlah makro (gram/hari) dan tidak dapat disintesis oleh tubuh manusia, sehingga memerlukan asupan dari luar tubuh (makanan). Asam lemak esensial diperlukan untuk mempertahankan fungsi sel dan organel, menjaga fluiditas dan reaktifitas kimia membran, juga merupakan prekursor eikosanoid. Contohnya asam lemak omega-6 (asam linoleat, asam arakidonat) dan asam lemak omega-3 (asam linolenat/ ALA, asam eikosapentaenoat/ EPA dan asam dokosaheksaenoat/ DHA).

#### 4. Asam Lemak Omega-3

Asam lemak omega-3 termasuk asam lemak esensial, meliputi asam lemak tidak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acids*) seperti asam linolenat (ALA, C18:3,  $\omega$ 3), asam eikosapentaenoat (EPA, C20:5,  $\omega$ 3) dan asam dokosaheksaenoat (DHA, C22:6,  $\omega$ 3) (21).

Asam lemak omega-3 bersama dengan asam lemak omega-6 merupakan asam-asam lemak esensial yang dibutuhkan tubuh tetapi tubuh tidak dapat mensintesisnya sehingga dibutuhkan asupan dari luar tubuh. Kurangnya asupan bahan makanan yang mengandung asam lemak esensial tersebut menyebabkan seseorang perlu mengonsumsi



makanan tambahan (*food supplement*) yang mengandung senyawa tersebut di atas atau turunannya. Minyak ikan dikenal secara luas sebagai sumber utama asam lemak omega-3, terutama DHA dan EPA (5). Mengonsumsi makanan yang mengandung asam lemak omega-3 dapat mengurangi resiko penyakit jantung, arterosklerosis, mencegah keterbelakangan mental dan penting bagi perkembangan mata dan otak yang sehat (7, 8).

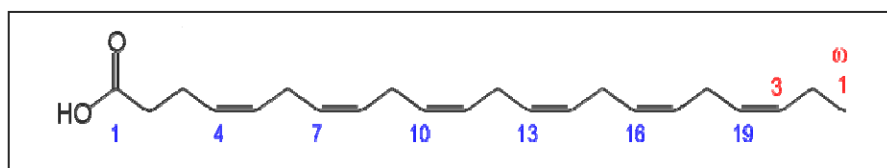
Metabolisme asam lemak omega-6 dan omega-3 dalam pencegahan penyakit berhubungan dengan pembentukan eikosanoid (prostaglandin, tromboksan dan leukotrien), yaitu bahan yang menyerupai hormon yang mengatur aktivitas dalam jaringan tertentu. Eikosanoid yang dihasilkan kedua jenis asam lemak tersebut berbeda secara struktural maupun fungsional. Misalnya  $TXA_2$  yang dihasilkan asam arakidonat/ARA (suatu omega-6) menyebabkan penggumpalan trombosit dan penyempitan pembuluh darah, sedangkan  $TXA_3$  yang dihasilkan EPA (suatu omega-3) dapat menghambat penggumpalan darah dan memperlancar aliran darah (3).

Keseimbangan rasio asam lemak omega-6 dan omega-3 pada makanan sangat penting bagi perkembangan dan pertumbuhan yang normal, juga dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskular (3, 12). Kadar asam lemak dalam plasma darah berkaitan erat dengan angka mortalitas (kematian) akibat penyakit kardiovaskular. Makin kecil nilai rasio omega-6 berbanding omega-3 dalam plasma, makin kecil pula

angka mortalitas akibat penyakit kardiovaskular pada populasi itu. Misalnya di Amerika memiliki nilai rasio asam lemak omega-6 berbanding omega-3 dalam darah yang tinggi, yakni 50, mortalitas akibat penyakit kardiovaskular mencapai 45%. Di Jepang yang nilai rasionya 12, angka kematian akibat penyakit kardiovaskular 12%. Sementara masyarakat Eskimo nilai rasionya hanya 1, mortalitas akibat penyakit kardiovaskular 7% (3). Di Jakarta (terutama populasi Jakarta Selatan) memiliki nilai rasio yang tinggi yakni 40, angka ini cukup memprihatinkan (13).

### C. ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA)

Asam dokosaheksaenoat atau biasa dikenal dengan DHA (*docosahexaenoic acid*, C<sub>22</sub>:6, ω<sub>3</sub>) dengan nama trivial *cervonic acid*, termasuk asam lemak esensial omega-3. DHA merupakan asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid*) yang terdiri dari 22 atom karbon dan 6 ikatan rangkap cis, dimana ikatan rangkap pertama berada pada atom karbon ketiga dari ujung terminal metil atau gugus omega (disebut ω<sub>3</sub>, n<sub>3</sub> atau omega-3). Berikut ini rumus bangun DHA (22).



Gambar 1. Rumus bangun DHA

DHA merupakan komponen utama fosfolipid pada membran sel manusia, khususnya pada retina mata, sel-sel otak dan sperma. DHA diperlukan dalam mengoptimalkan pengembangan saraf dan fungsi retina mata yang normal (23).

Asam lemak tidak jenuh (termasuk DHA) yang umumnya terdapat dalam bentuk cis, dalam membran membuat ekor hidrokarbon yang tertekuk. Dengan banyaknya tekukan yang disisipkan ke bagian dalam ekor, membran plasma menjadi kurang termampat padat dan memberikan lebih banyak ruang gerak. Adanya kesenjangan struktur molekul DHA dimana banyak atom H yang hilang karena adanya ikatan rangkap, membuat sel otak yang membrannya kaya akan DHA lebih fleksibel dan membuat sinyal listrik lebih mudah lewat untuk berkomunikasi antara sel yang satu dengan sel yang lain. Hal yang sebaliknya terjadi untuk asam lemak jenuh, dimana dalam membran membuat ekor hidrokarbon yang lurus sehingga membran sel menjadi kaku dan kurang fleksibel dalam menghantarkan listrik dan transmisi (21, 24).

Tubuh manusia secara alami memproduksi DHA, berasal dari asam linolenat (ALA) yang akan dikonversi oleh suatu reaksi enzimatik (reaksi elongasi dan desaturasi) menjadi asam eikosapentaenoat (EPA) lalu menjadi asam dokosaheksaenoat (DHA), namun jumlahnya terlalu sedikit sehingga butuh asupan makanan dari luar (3). Oleh karena itu konsumsi asam lemak omega-3 dalam bentuk minyak ikan alami atau konsentrat asam lemak omega-3 sangat dianjurkan. Sebuah konferensi kesehatan internasional di

Amerika Serikat merekomendasikan untuk mengkonsumsi 1-2 gram asam lemak omega-3 per hari atau sekitar 10-20 gram minyak ikan per hari (23).

Pemberian makanan yang mengandung DHA berlebihan beresiko terhadap kesehatan, mempunyai efek samping pendarahan dan gangguan sistem kekebalan tubuh. Hal ini berhubungan dengan metabolisme asam lemak esensial yang terbagi atas asam lemak omega-6 dan asam lemak omega-3. Kedua jenis asam lemak esensial tersebut mengalami reaksi desaturasi dan elongasi di dalam jaringan, serta saling bersaing secara kompetitif dalam sistem enzimatis tubuh. Peningkatan jumlah suatu jenis asam lemak akan menyebabkan penurunan reaksi elongasi dari jenis asam lemak yang lain. Misalnya peningkatan jumlah DHA (suatu asam lemak omega-3) menyebabkan sedikitnya asam arakidonat (ARA, C20:4,  $\omega$ 6) yang terbentuk dari asam linoleat (ALA, C18:2,  $\omega$ 6).

#### **D. METODE ANALISIS DHA**

##### **1. Ekstraksi Lipid dari Sampel (25)**

Tahap pertama yakni mengekstraksi lipid dari matriks jaringannya. Lipid berada dalam jaringan dalam berbagai bentuk. Lipid sederhana merupakan bagian dari agregat besar dalam jaringan, sehingga relatif lebih mudah diekstraksi. Tetapi lipid kompleks merupakan bagian penyusun membran yang terikat kuat dengan komponen lain seperti

protein dan polisakarida, yang berinteraksi dengan ikatan hidrofobik, ikatan Van der Waals dan ikatan ionik.

Kebanyakan analisis mengekstraksi lipid menggunakan campuran pelarut kloroform-metanol (2:1 v/v) seperti yang disarankan oleh Folch dan Stanley. Lipid akan tertarik dalam fase kloroform yang non polar. Kloroform-metanol bisa jadi merupakan ekstraktan terbaik, tetapi lebih toksik dibanding isopropanol-heksan (2:3 v/v) yang toksisitasnya relatif rendah namun tidak mengekstraksi gangliosida secara kuantitatif. Campuran etil asetat-etanol telah disarankan dan membutuhkan penelitian lebih lanjut.

Setelah mengekstraksi lipid dari matriks jaringan, tahap selanjutnya adalah memisahkan kontaminan non-lipid dari ekstrak, seperti gula, asam amino, urea and garam. Folch dan Stanley menambahkan larutan salin NaCl seperempat volumenya. Campuran akan terpisah menjadi 2 lapisan, lapisan bawah terdiri dari kloroform-metanol-air dengan proporsi 86:14:1, dan mengandung hampir semua komponen lipid. Sedangkan lapisan atas mengandung kloroform-metanol-air dengan proporsi 3:48:47, dan mengandung banyak kontaminan non-lipid. Penting disadari bahwa proporsi kloroform, methanol dan air sedekat mungkin mendekati 8:4:3, karena jika tidak maka akan terjadi kehilangan lipid.

Bligh dan Dyer mengadaptasi prosedur Folch untuk mengekstraksi lipid dari jaringan yang mengandung relatif lebih sedikit lipid dan tinggi kadar airnya, contohnya jaringan ikan. Digunakan campuran pelarut

kloroform-metanol (1:2 v/v). Kekurangannya yakni sang pengarang tidak mencoba sampel lainnya sehingga tidak dapat diklaim bahwa metode tersebut dapat digunakan secara universal.

Beberapa metode ekstraksi lipid:

a. Ekstraksi lipid dengan metode Folch dan Stanley (26)

Sampel ditambahkan kloroform-metanol (2:1 v/v) sampai volume akhir 20 kali volume sampel (1 g dalam 20 mL campuran pelarut). Campuran dihomogenkan selama 15-20 menit dalam orbital shaker pada suhu ruang. Pelarut dicuci dengan 0,2 volume air (4 mL untuk 20 mL) atau NaCl 0,9%, divortex, lalu disentrifuge 2000 rpm untuk pemisahan 2 fase. Pindahkan fase atas dengan penyabunan dan simpan untuk analisis gangliosida atau molekul organik polar kecil. Jika perlu untuk memisahkan molekul tertentu, lapisan antar muka dibilas 1-2 kali dengan metanol-air (2:1) tanpa mencampurkan seluruh preparasi. Fase kloroform yang mengandung lipid diuapkan dalam rotary evaporator atau dengan mengalirkan gas N<sub>2</sub> jika volume kurang dari 2-3 ml.

b. Ekstraksi lipid dengan metode Bligh dan Dyer (27)

Setiap 1 ml sampel ditambahkan 3,75 mL kloroform-metanol (1:2 v/v) dan divortex. Jika dianalisis dengan kromatografi gas, pelarut harus ditambahkan internal standar sejumlah yang diperlukan, misal 5 µg β-sitosterol. Tambahkan 1,25 mL kloroform, divortex. Tambahkan

1,25 mL air, divortex. Disentifuge 5 menit 1000 rpm pada suhu ruang untuk mendapatkan 2 fase (fase atas: lapisan air, fase bawah: lapisan organik). Fase bawah diambil, dan jika diperlukan fase tersebut dapat dicuci lagi dengan pelarut fase atas dengan komposisi yang sama.

## 2. Metode Kromatografi Gas

- a. Kromatografi gas Agilent 6890 series, kolom kapiler HP-5 5% phenylmethylsiloxan (30 m, id 320  $\mu\text{m}$ , fc 0,25  $\mu\text{m}$ ), detektor FID, gas pembawa helium dengan laju alir 1,1 mL/menit. Suhu injektor 250°C dan suhu detektor 300°C. Suhu oven terprogram: suhu awal 180°C (1 menit), naik 1°C/menit sampai 200°C (ditahan 1 menit), naik 10°C/menit sampai 280°C (ditahan 3 menit) (5).
- b. Kromatografi gas Hewlett-Packard 6890, kolom kapiler SP-2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu\text{m}$  *film thickness*), detektor FID, gas pembawa helium dengan laju alir 1,0 mL/menit. Suhu injektor dan detektor 250°C. Suhu kolom terprogram: suhu awal 110°C, naik 20°C/menit sampai 200°C (ditahan 50 menit), naik 10°C/menit sampai 230°C (ditahan 5 menit) (28).
- c. Kromatografi gas Hewlett-Packard 6890, kolom kapiler INNOWax 30-m (id 0,25mm x 0,25  $\mu\text{m}$  *coating thickness*), detektor FID, gas pembawa nitrogen dengan laju alir 2,0 mL/menit. Suhu injektor 250°C (*split mode* 25:1) dan suhu detektor 300°C. Suhu kolom terprogram: suhu awal 70°C (2 menit), naik 10°C/menit sampai 180°C (ditahan 10

menit), naik 7°C/menit sampai 222°C (ditahan 10 menit), naik 4°C/menit sampai 230°C (ditahan 8 menit) (29).

- d. Kromatografi gas Shimadzu GC-15A, kolom kapiler (HSS1-PM 50, 50 m x 0,25 mm), fase diam cair (HR-SS-10), gas pembawa helium. Suhu kolom terprogram: suhu awal 160°C, naik 3°C/menit sampai 190°C, naik 1°C/menit sampai 200°C, naik 1,5°C/menit sampai 215°C (ditahan 20 menit) (30).
- e. Kromatografi gas Hewlett-Packard 6890, kolom kapiler (HP-5, 30 m x 0,32 mm id x 0,25 µm *film thickness*), detektor FID, gas pembawa helium dengan laju alir 1,1 mL/menit. Suhu injektor dan detektor 280°C. Suhu kolom terprogram: suhu awal 180°C (2,5 menit), naik 2,5°C/menit sampai 230°C (ditahan 7,5 menit) (31).

### 3. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi yang dilengkapi dengan ELSD (*Evaporative Light Scattering Detection*), menggunakan kolom Spherisorb™ S3W dengan ukuran 100 x 4,6 mm id dan ukuran partikel 3 µm. Laju alir 2 mL/menit, menggunakan elusi gradien, temperatur detektor 40°C dan *air flow* 27 psi (32).



## E. KROMATOGRAFI GAS

### 1. Teori

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan kesetimbangan distribusi dari komponen-komponen yang terdapat dalam suatu campuran di antara dua fase, yaitu fase diam dengan permukaan yang luas (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar, yaitu *gas chromatography* (kromatografi gas) dan *liquid chromatography* (kromatografi cair) (33, 14).

*Gas chromatography* (kromatografi gas) adalah suatu cara untuk memisahkan campuran yang komponen-komponennya dapat menguap pada suhu percobaan (sampai 400°C) dengan menggunakan gas sebagai fase gerak melalui fase diam. Bila fase diam berupa zat padat maka disebut kromatografi gas-padat (KGP). Bila fase diam berupa zat cair maka disebut kromatografi gas-cair (KGC). Sampel harus mengandung komponen yang dapat menguap pada suhu percobaan dan zat tersebut tidak terurai selama analisis (14).

Pada KGC, pemisahan terjadi karena perbedaan kelarutan (partisi) relatif masing-masing komponen antara fase gerak dan fase diam yang berupa cairan dengan titik didih tinggi (tidak mudah menguap) yang terikat pada zat padat penunjangnya (*support*) yang bersifat inert. Sedangkan pada KGP, pemisahan campuran menjadi komponen-

komponennya terjadi karena perbedaan adsorpsi relatif masing-masing komponen pada fase diam yang berupa zat padat penyerap (34).

Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun analisis kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi zat yang dianalisis dengan waktu retensi zat pembanding (standar). Analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan tinggi dan luas puncak kromatogram dari zat yang dianalisis dengan tinggi dan luas puncak kromatogram zat pembanding (standar) (34). Jika puncak itu simetris atau berupa kurva Gauss, tinggi puncak dapat dipakai untuk mengukur luas. Luas puncak atau dalam beberapa kasus, tinggi puncak berbanding lurus dengan banyaknya senyawa yang ada (35).

Kromatografi gas (KG) jauh lebih unggul dibandingkan dengan teknik kromatografi lainnya dalam hal kecepatan, sensitivitas dan spesifitas (misalnya penggunaan *Mass Spectrometer* pada teknik GC-MS sebagai detektor). Serta dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap mikrosampel yang berupa gas, zat padat atau zat cair, dan dalam hal tertentu menghasilkan resolusi atau pemisahan yang lebih sempurna. Hal ini disebabkan karena metode KG dapat memisahkan komponen-komponen dengan titik didih yang hampir sama (14). Banyaknya macam fase cair yang dapat digunakan sampai suhu 400°C menyebabkan KGC merupakan bentuk kromatografi gas yang paling serba guna, selektif dan lebih populer dibandingkan dengan KGP (34).

Kelemahan KG adalah teknik ini terbatas untuk zat yang mudah menguap (36) dan harga instrumennya yang relatif lebih mahal (14).

Resolusi (R) atau daya pisah menunjukkan apakah dua komponen dapat terpisah dengan baik. Daya pisah didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak dibagi rata-rata lebar dua puncak yang diukur dari alas puncak. Resolusi merupakan ukuran dari efisiensi kolom maupun efisiensi pelarut. Keefisienan kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram (*peak broadening*), sedangkan keefisienan pelarut menentukan posisi puncak kromatogram (*relative retention*) (14).

Keefisienan kolom dapat diukur dari jumlah *theoretical plate* (N) atau HETP (*Height Equivalent of Theoretical Plate*). HETP yaitu panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya kesetimbangan komponen cuplikan (linarut) antara fase gerak dan fase diamnya. Efisiensi kolom semakin meningkat jika nilai HETP semakin kecil dan nilai N (jumlah lempeng teoritis) semakin besar (14, 34).

## 2. Instrumentasi

Instrumentasi pada kromatografi gas memerlukan sistem tertutup sempurna kecuali pada tempat keluarnya gas, temperatur harus konstan dan dapat diatur dengan tepat, serta diperlukan perlengkapan pendeteksi dan perekam yang terpadu. Berikut ini bagian dari instrumentasi kromatografi gas cair (KGC).

#### a. Tanki Gas Pembawa

Tanki gas bertekanan tinggi berlaku sebagai sumber gas pembawa. Berbagai jenis gas yang dapat digunakan adalah nitrogen, helium, hidrogen, argon (14) dan karbondioksida (37). Kecepatan linier dari gas pembawa menentukan efisiensi kolom.

Persyaratan untuk gas pembawa yaitu (34):

- 1) Inert (lebam), untuk mencegah interaksi dengan cuplikan atau pelarut (fase diam) serta tidak beracun. Karena gas tersebut inert maka interaksi antar molekul gas dapat diabaikan, kecuali pada tekanan tinggi.
- 2) Koefisien difusi sampel pada gas tersebut rendah.
- 3) Kemurnian tinggi. Kemurnian gas pembawa sangat penting karena pengotoran sedikit saja dalam gas pembawa akan menimbulkan bisingan (*noise*) pada detektor. Sehingga sebaiknya gas pembawa dialirkan melalui penyaring molekular terlebih dahulu untuk menghilangkan uap air yang biasanya terdapat dalam gas pembawa (38).
- 4) Murah dan mudah diperoleh.
- 5) Gas pembawa harus cocok dengan detektor yang digunakan. Misalnya detektor penghantar panas (TCD, *Thermal Conductivity Detector*) bekerja baik dengan gas pembawa ringan yaitu hidrogen atau helium. Detektor pengionan nyala (FID, *Flame Ionization*

*Detector*), biasanya menggunakan nitrogen, walaupun gas lain juga dapat dipakai (35).

b. Kolom

Aliran gas selanjutnya menemui kolom yang diletakkan dalam oven bertemperatur konstan. Di dalam kolom berlangsung pemisahan komponen campuran. Kolom bervariasi dalam hal ukuran dan bahan isian. Kolom dapat terbuat dari logam (tembaga, baja tahan karat, aluminium) atau gelas. Gelas lebih disukai karena inert. Kolom dapat berbentuk lurus, bentuk U atau spiral (14).

Fase diam dalam KGC (kromatografi gas cair) adalah cairan, tetapi tidak dimasukkan begitu saja ke dalam tabung. Cairan ini harus dimobilisasi sedapat mungkin dalam bentuk lapisan tipis di atas permukaan yang luas (38). Temperatur maksimum yang dapat diperlakukan terhadap suatu kolom ditentukan oleh penguapan fase diamnya (36).

*Kolom.* Kolom pada kromatografi gas dikelompokkan menjadi dua kelompok utama, yaitu kolom yang terkemas (*packed column*) dan kolom kapiler (*capillary column*) atau kolom tabung terbuka.

- i. Kolom yang terkemas (*packed column*) mempunyai panjang antara 1-10 meter dengan diameter dalam antara 3-10 mm atau sampai lebih dari 10 cm bagi kolom preparatif. Kolom diisi dengan suatu material pendukung padat inert yang dilapisi dengan suatu fase

diam cair atau padat (14). Kolom ini mudah dibuat, tidak begitu mahal, lebih awet, mempunyai kapasitas yang tinggi dan memadai untuk hampir segala macam pemisahan yang sangat sulit (38).

ii. Kolom kapiler (*capillary column*) atau kolom tabung terbuka panjangnya dapat mencapai 10-50 meter dengan diameter dalam sangat kecil, yakni 0,2-1,2 mm. Berdasarkan cara fase diam dilekatkan pada kolom, maka dibagi menjadi dua yakni:

1. Kolom WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) dimana fase diam cairan dilapiskan secara langsung pada dinding dalam tabung kapiler.
2. Kolom SCOT (*Support Coated Open Tubular Column*) dimana fase diam cairan dilapiskan pada bahan penunjang (*support*) (39). Efisiensi kolom SCOT lebih rendah daripada kolom WCOT tetapi lebih besar daripada *packed column* (37).

*Bahan penunjang (support)*. Penggunaan *support* dimaksudkan untuk memperoleh permukaan yang luas dan inert bagi lapisan fase diam. Persyaratan bagi *support* yaitu harus inert untuk mencegah adsorpsi, kuat atau tahan gesekan, permukaannya luas (1-20 m<sup>2</sup>/g), berukuran serba sama dan bentuknya teratur untuk memudahkan pengepakan serta berpori dengan ukuran  $\pm 10 \mu\text{m}$  atau kurang. Bahan baku *support* biasanya kerangka diatomae. Dalam perdagangan dikenal dengan *Chromosorb*<sup>®</sup>, terdiri dari dua jenis yaitu *Chromosorb P* (warna pink, sifat adsorpsi kuat, cocok untuk pemisahan hidrokarbon)

dan *Chromosorb W* (warna putih, nonadsorptif, cocok untuk pemisahan senyawa polar) (14).

*Fase diam.* Pemilihan cairan fase diam merupakan salah satu hal yang sangat menentukan keberhasilan pemisahan. Pemilihan fase diam disesuaikan dengan polaritas sampel. Sampel yang polar maka fase diamnya juga polar, dan sebaliknya. Jadi dengan pemilihan fase diam yang tepat maka komponen-komponen dengan titik didih sama dapat dipisahkan karena adanya perbedaan koefisien partisi (14).

Secara garis besar fase diam cair dapat dikelompokkan menjadi (34):

1. Fase cair kelompok hidrokarbon non polar. Contoh: squalane, *silicone gum rubber*, minyak parafin.
2. Fase cair dengan kepolaran sedang (senyawa ini punya gugus polar atau gugus terpolarisasi yang terikat pada kerangka non polar yang besar). Contoh: ester dari alkohol yang mempunyai BM besar seperti dinonil ftalat.
3. Fase cair polar (memiliki bagian gugus polar yang relatif besar), contoh: carbowax (polyglycols).
4. Fase cair yang mempunyai ikatan hidrogen. Contoh: glikol, gliserol, asam hidroksi.

#### c. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi dan mengukur jumlah komponen yang telah terpisah yang terdapat dalam aliran gas

pembawa yang meninggalkan kolom. Detektor akan mencetak hasil percobaan pada lembaran kertas berupa kumpulan puncak yang disebut kromatogram. Pemilihan detektor tergantung pada sifat dan konsentrasi komponen-komponen yang telah terpisah.

Detektor dapat dikelompokkan sebagai detektor diferensiasi dan detektor integrasi. Detektor diferensiasi menghasilkan tanggapan yang berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa atau kecepatan aliran seketika itu juga, biasanya digunakan untuk analisis kuantitatif. Sedangkan detektor integrasi menghasilkan tanggapan yang berbanding lurus dengan massa total komponen senyawa, biasanya digunakan untuk analisis kualitatif. Berikut ini macam-macam detektor yang biasa digunakan pada kromatografi gas (34).

1. Detektor konduktivitas panas (*Thermal Conductivity Detector*)

Prinsip kerjanya adalah suhu filament meningkat dengan adanya analit pada gas pembawa yang melaluinya, hal ini akan menyebabkan kenaikan resistensi.

2. Detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*)

Prinsip kerjanya adalah komponen yang dibakar pada suatu nyala akan menghasilkan ion, ion-ion ini dikumpulkan dan diubah menjadi arus listrik.

3. Detektor penangkap elektron (*Electron Capture Detector*)



Prinsip kerjanya adalah pada waktu spesies-spesies yang bersifat elektronegatif melewati detektor, spesies-spesies tersebut menangkap elektron-elektron termal.

4. Detektor fotometri nyala (*Flame Photometric Detector*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor yang dibakar dalam suatu nyala akan menghasilkan spesies kemiluminesen yang dapat dimonitor pada panjang gelombang selektif.

5. Detektor nitrogen fosfor (*Nitrogen Phosphorus Detector*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor akan menyebabkan peningkatan arus pada nyala yang diperkaya dengan uap garam logam alkali.

d. Pengatur Tekanan dan Pengatur Aliran

Pengatur tekanan digunakan untuk mengatur tekanan gas pembawa dan menjaga agar tekanan gas pembawa tersebut konstan. Sedangkan pengatur aliran digunakan untuk menjaga agar aliran gas pembawa konstan. Aliran gas yang konstan sangat diperlukan pada KG agar diperoleh hasil analisis yang memuaskan (34).

e. Sistem Injeksi Sampel

Sampel harus dimasukkan ke dalam kolom sekaligus, secepat mungkin dan dalam volume sekecil mungkin, berkisar antara 0,5-10  $\mu$ l.

Sampel diinjeksikan dengan suatu semprit (syringe) ke dalam kotak logam yang dipanaskan dengan pemanas listrik (36). Suhu tempat injeksi (ruang suntik) menentukan kecepatan cuplikan diuapkan. Tempat injeksi diatur pada suhu agak tinggi, untuk cuplikan yang tidak terurai kena panas, biasanya sekitar 50°C di atas suhu kolom, dimana sampel seketika menjadi uap dan segera masuk ke dalam kolom untuk dibawa gas pembawa (*carrier gas*) (34).

f. *Recorder* (Perekam)

Perekam yang dihubungkan dengan bagian luar detektor berfungsi untuk menghasilkan gambaran yang disebut kromatogram. Kromatogram yang dihasilkan dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif (34). Akurasi suatu kromatogram pada suatu daerah pembacaan ditentukan oleh pemilihan pencatat sinyal (rekorder)nya. Kadang mutlak diperlukan penguatan sinyal. Kepekaan perekam adalah 10 mV dengan range 1-10 mV (36).

g. Sistem Pengolah Data

Peran pengolah data dilakukan oleh alat pengolah data (*data processor*) atau komputer. Informasi yang diperoleh dapat dimanfaatkan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif (14).

### 3. Analisis Kuantitatif (39, 33)

Prinsip analisis kuantitatif suatu komponen zat dilakukan dengan perhitungan relatif dari tinggi atau luas puncak kromatogram sampel terhadap zat baku pembanding (standar). Metode yang biasa digunakan adalah dengan metode baku luar (*external standar*) atau baku dalam (*internal standar*)

#### a. Metode Baku Luar

Dibuat kurva kalibrasi zat baku (standar), dengan cara membuat larutan baku dengan berbagai macam konsentrasi larutan sampel yang akan dianalisis, disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara meplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau dengan rumus perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

#### b. Metode Baku Dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Dibuat kurva antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan metode

ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kekurangan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

Persyaratan senyawa baku dalam yang ideal (39, 34).

- 1) Murni dan mudah diperoleh.
- 2) Mempunyai sifat fisikokimia yang mirip dengan cuplikan.
- 3) Mempunyai puncak yang terpisah baik dari cuplikan.
- 4) Tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan.
- 5) Tidak bereaksi dengan cuplikan dan fase gerak.
- 6) Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur.
- 7) Mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan.

## **F. VALIDASI METODE ANALISIS**

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

Validasi metode diperlukan dalam suatu proses analisis untuk memastikan hasil analisis yang dilakukan dapat dipertanggungjawabkan. Suatu metode analisis perlu divalidasi apabila metode tersebut baru dikembangkan untuk suatu permasalahan yang khusus. Validasi juga dilakukan jika ada perbaikan dari metode yang sudah ada untuk memecahkan suatu permasalahan analisis yang baru. Selain itu proses

validasi juga diperlukan jika diterapkan metode rutin pada laboratorium yang berbeda peralatannya dan jika dilakukan oleh analis yang berbeda pula. Seiring dengan berjalannya waktu, proses validasi metode juga perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode tersebut masih dapat diandalkan.

Ada beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis. Untuk menentukan parameter-parameter yang digunakan, perlu diperhatikan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Parameter yang sering digunakan untuk pengembangan metode analisis antara lain kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), selektivitas (*specificity*), linearitas (*linearity*) dan rentang (*range*), batas deteksi (*LOD*) dan batas kuantitasi (*LOQ*), ketangguhan (*ruggedness*), serta kekuatan (*robustness*) (14).

#### 1. Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis yang diperoleh dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) dari analit yang ditambahkan.

Cara penentuan kecermatan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara absolut atau metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan cara adisi atau metode penambahan bahan baku (*standard addition method*).

Dalam cara absolut atau metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (sampel plasebo, dapat berupa eksipien obat, cairan biologis dll.), lalu campuran tersebut dianalisis dengan metode yang akan diuji validitasnya. Hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya).

Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa senyawa endogen, maka dapat dipakai cara adisi. Cara adisi atau metode penambahan bahan baku dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menghitung berapa persen analit yang ditambahkan sebelumnya dapat ditemukan.

Syarat akurasi yang baik adalah 98-102% untuk bahan baku farmasi, dan  $\pm 10\%$  untuk sampel hayati atau biologis. Rentang kesalahan perolehan kembali yangizinkan berbeda-beda tergantung pada konsentrasi analit pada matriks sampel. Pada percobaan penetapan kecermatan, dianjurkan sedikitnya 5 (lima) sampel yang mengandung analit dan plasebo disiapkan dengan kadar 50% sampai 150% dari kandungan yang diharapkan (14, 40).

## 2. Keseksamaan (*Precision*)

Keseksamaan 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). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*).

Keterulangan (*repeatability*) adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal.

Ketertiruan (*reproducibility*) adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analisis dilakukan pada sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Ketertiruan juga dapat dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analis yang berbeda.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (untuk sediaan obat).

Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium.

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini (14, 40).

### 3. Selektivitas (*Specificity*)

Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuan metode yang hanya untuk mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara



menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji, lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya ( $R_s$ ) (14, 40).

#### 4. Linearitas (*Linearity*) dan Rentang (*Range*)

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional konsentrasi analit dalam sampel. Dalam praktek digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien relasi ( $r$ ) 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. Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima (14, 40).

## 5. Batas Deteksi (*LOD*) dan Batas Kuantitasi (*LOQ*)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Sedangkan batas kuantitasi adalah kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (14, 40).

