

**PENETAPAN KADAR ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA)
DALAM SUSU FORMULA BAYI DAN ANAK
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

**STEPHANIE
030405066X**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2008**

**PENETAPAN KADAR ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA)
DALAM SUSU FORMULA BAYI DAN ANAK
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**Oleh
STEPHANIE
030405066X**



**DEPOK
2008**

**SKRIPSI : PENETAPAN KADAR ASAM DOKOSAHEKSAENOAT (DHA)
DALAM SUSU FORMULA BAYI DAN ANAK SECARA
KROMATOGRAFI GAS**

NAMA : STEPHANIE

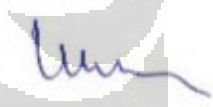
NPM : 030405066X

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JUNI 2008



DR. HARMITA, APT.

PEMBIMBING I


DRS. UMAR MANSUR, MSC.

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sarjana : 15 Juli 2008
Penguji I : Drs. Hayun, MSi
Penguji II : Dra. Sundarsih
Penguji III : Dra. Syafrida Siregar



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Allah Bapa di Surga, atas segala kemurahan, berkat, kasih karunia, dan penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul Penetapan Kadar Asam Dokosaheksaenoat (DHA) dalam Susu Formula Bayi dan Anak secara Kromatografi Gas ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian dan penyusunan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung, yaitu kepada:

1. Bapak Dr. Harmita, Apt. dan Bapak Drs. Umar Mansur, MSc. sebagai pembimbing skripsi yang telah memberikan perhatian dan bantuannya dalam membimbing dan mengarahkan penulis hingga akhir penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI dan atas segala perhatian dan kebaikan beliau.
3. Bapak Dr. Maksum Radji, M. BioMed selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Papa dan mama tercinta, dan kakak-kakak tersayang yang telah memberikan bantuan moril dan materiil serta doanya selama ini.

5. Rekan sepenelitian yaitu Dea, dan teman-teman di Laboratorium Kimia Kuantitatif, Mikrobiologi, dan Farmasetika atas bantuan, keceriaan, dan kehebohannya selama penelitian. Juga kepada sahabat-sahabat terbaik yaitu Angel, Susan, Sharon, Oloan, Rendy, Luci, Eci, Oliph, dan Anglia atas persahabatan yang indah dan menyenangkan selama studi di Farmasi UI, serta Kak Tharia yang telah memberikan dan meminjamkan diktat dan catatan kuliah, serta alat-alat dan bahan penelitian yang dibutuhkan.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya yang telah membantu penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Besar harapan penulis agar skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis,

2008

ABSTRAK

Asam dokosaheksaenoat (DHA) sangat penting bagi pertumbuhan sistem saraf dan penglihatan bayi karena merupakan asam lemak utama dalam fosfolipid otak dan retina. Namun, manfaat penambahan DHA dalam susu formula bayi masih kontroversial. Pemberian DHA yang berlebihan pada bayi perlu diwaspadai mengingat kemungkinan terjadinya efek samping yang ditimbulkannya. Penelitian ini bertujuan memperoleh metode analisis DHA secara kromatografi gas (KG) yang valid yang akan diterapkan untuk menetapkan kadar DHA dalam susu formula. Sebelum disuntikkan ke alat KG, lemak susu diekstraksi dengan kloroform-metanol (1:2) dan kemudian dimetilasi dalam metanol-toluen (4:1) dengan asetil klorida. Kondisi KG yang digunakan yaitu: suhu injektor 230°C, suhu detektor 250°C, suhu oven terprogram dengan suhu awal 130°C dinaikkan 2°C/menit sampai 230°C kemudian suhu ditahan selama 20 menit, laju alir helium 2,00 ml/menit, split 1:3. Metode ini telah memenuhi syarat uji presisi dan uji perolehan kembali. Hasil penetapan kadar DHA dari 5 sampel susu formula bayi dan anak yaitu (27,49 ± 0,62) mg/100 g, (31,14 ± 0,43) mg/100 g, (11,83 ± 0,38) mg/100 g, (19,34 ± 0,58) mg/ 100 g, dan (45,87 ± 0,42) mg/100 g.

Kata kunci : DHA, susu formula, kromatografi gas

IX + 96 hlm; gbr; tabel; lamp.

Daftar acuan : 30 (1957-2007)

ABSTRACT

Docosahexaenoic acid (DHA) is important for development of infant's nervous and visual system because it is a major fatty acid in brain and retina phospholipids. However, the benefit of DHA addition in infant formula is still controversial. The over intake of DHA should be an awareness because of its side effect. The aim of this study was to get a valid analysis method of DHA using gas chromatography (GC) which will be used to determine the concentration of DHA in infant formula. Before being injected to GC, the milk fat was extracted with chloroform-methanol (1:2) and then methylated in methanol-toluene (4:1) with acetyl chloride. The GC conditions were: injector temperature was 230°C, detector temperature was 250°C, oven temperature was programmed to increase from 130°C to 230°C by 2°C/minute and held for 20 minutes, helium flow rate was 2.00 ml/minute, and split ratio was 1:3. This method had passed the precision and recovery evaluation. The results of DHA determination in 5 infant formula samples were (27.49 ± 0.62) mg/100 g, (31.14 ± 0.43) mg/100 g, (11.83 ± 0.38) mg/100 g, (19.34 ± 0.58) mg/ 100 g, and (45.87 ± 0.42) mg/100 g.

Key words: DHA, infant formula, gas chromatography

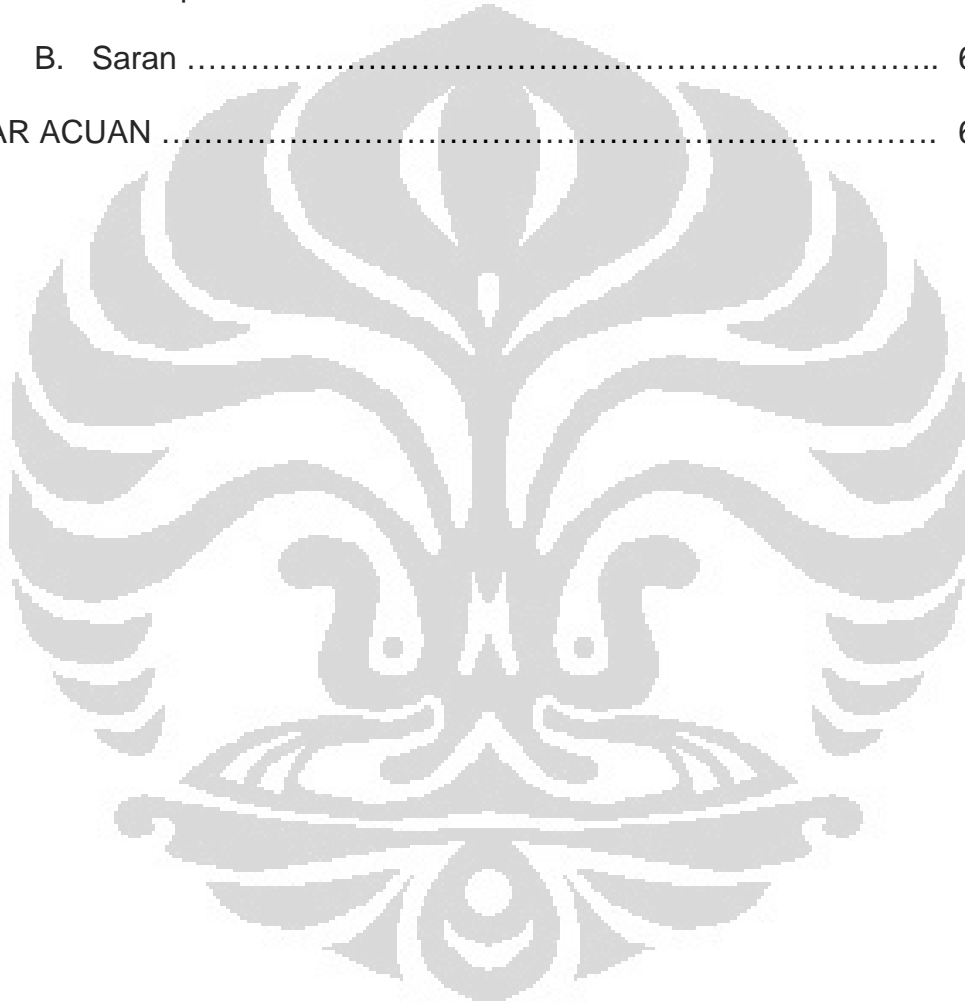
IX + 96 pg.; fig.; tab.; enc.

Bibliography : 30 (1957-2007)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang	1
B. Tujuan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Susu	6
B. Lipid dan Asam Lemak	12
C. Asam Dokosaheksaenoat (DHA)	16
D. Analisis Lipid	18
E. Kromatografi Gas	31
F. Validasi Metode Analisis	37
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	42
A. Alat	42
B. Bahan	43
C. Cara Kerja	44

BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	50
A.	Hasil Percobaan	50
B.	Pembahasan	53
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	63
A.	Kesimpulan	63
B.	Saran	64
DAFTAR ACUAN	65



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Alat kromatografi gas	68
2. Kromatogram larutan standar DHA 1552,5 µg/g	69
3. Grafik hubungan suhu awal kolom dengan HETP	70
4. Grafik hubungan laju alir dengan HETP	70
5. Kurva kalibrasi standar DHA	71
6. Kromatogram larutan DHA oil 7186,2 µg/g	72
7. Kurva kalibrasi DHA dalam DHA oil	73
8. a. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula A	74
b. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula B	74
c. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula C	75
d. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula D	75
e. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula E	76

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi rata-rata susu sapi	6
2. Asam lemak tak jenuh ganda dari formula umum $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_n\text{COOH}$ (8)	15
3. Pemilihan kondisi analisis DHA optimum secara kromatografi gas	77
4. Hasil pengukuran standar DHA untuk pembuatan kurva kalibrasi	78
5. Hasil penetapan kadar DHA dalam DHA oil	79
6. Hasil pengukuran DHA dalam DHA oil untuk pembuatan kurva kalibrasi	80
7. Perhitungan secara statistik untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi DHA	81
8. Hasil pengukuran DHA dalam DHA oil untuk data presisi	82
9. Hasil uji perolehan kembali	83
10. Hasil penetapan kadar DHA dalam sampel susu formula	84

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara menghitung konsentrasi akhir DHA setelah esterifikasi	85
2. Cara memperoleh persamaan garis linier	86
3. Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi	87
4. Cara perhitungan kadar DHA dalam DHA oil	88
5. Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi	89
6. Cara perhitungan uji perolehan kembali	90
7. Cara perhitungan kadar DHA dalam sampel	92
8. Skema kerja ekstraksi sampel	93
9. Skema kerja esterifikasi lemak	94
10. Sertifikat analisis standar DHA	95
11. Sertifikat analisis DHA oil	96

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Kualitas manusia sangat ditentukan oleh pertumbuhan dan perkembangannya sejak dini. Pemenuhan gizi yang baik dan benar merupakan modal dasar agar anak dapat mengembangkan potensi genetiknya secara optimal. Zat gizi yang diberikan harus tersedia secara tepat baik kualitas dan kuantitasnya (1). Kesalahan dalam memberikan makan akan sangat mempengaruhi kualitas manusia di kemudian hari. Hal ini terutama berhubungan dengan pertumbuhan dan perkembangan organ vital terutama otak yang sebagian besar terjadi sangat cepat pada masa prenatal dan bulan-bulan pertama kehidupan. Otak yang sedang tumbuh ini sangat membutuhkan asupan gizi yang sempurna (2).

Kenyataan membuktikan bahwa seperempat dari bagian padat otak manusia terdiri dari fosfolipid yang keadaannya sangat tergantung pada kondisi sirkulasi setempat. Nutrisi lemak pada masa kehamilan dan postnatal dini sangat penting bagi pertumbuhan otak. Pertumbuhan otak sangat bergantung pada terbentuknya asam lemak tak jenuh ganda menjadi bagian dari fosfolipid yang terdapat pada bagian korteks otak (3).

Otak manusia dibangun dari 60% substansi lemak yang terdiri dari milyaran sel-sel. Salah satu jenis sel tersebut adalah sel saraf, yang disebut

neuron, dan berperan dalam komunikasi sinyal elektrik pada otak dan bagian tubuh lain. Membran pelindung yang merupakan lipid bilayer menyelimuti setiap neuron. Lipid bilayer terdiri dari dua lapis fosfolipid. Tiap fosfolipid mengandung asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh. Komponen terbesar asam lemak tak jenuh ini adalah DHA (4).

DHA terdapat dalam ASI, tapi tidak dalam kebanyakan susu formula. Sebagian besar formula ini diambil dari susu sapi, yang dinilai kandungannya hampir menyerupai ASI. Untuk membuat susu formula yang semirip mungkin dengan ASI dan untuk memenuhi kebutuhan gizi bayi, DHA ditambahkan pada susu formula. Dengan adanya kenyataan bahwa DHA merupakan komponen penting dari asam lemak di otak, maka pemberian DHA pada susu formula terutama bagi bayi prematur akan sangat bermanfaat bagi otaknya (2).

Susu formula yang ditambahkan DHA harganya lebih mahal sekitar 20% dari susu formula biasa. Kandungan DHA dalam susu formula bervariasi dari 7 mg/100 g sampai 45 mg/100 g. Karena suplemen tersebut terdaftar sebagai bahan makanan, maka pengawasan mutunya tidak begitu ketat. Untuk menjamin keadilan bagi konsumen, perlu dilakukan pengawasan mutu terhadap kadar DHA. Hal ini untuk memastikan apakah kandungan DHA yang dicantumkan dalam label kemasan sesuai dengan kandungan sebenarnya.

Namun pemberian DHA pada bayi yang lahir cukup bulan dan anak dianggap masih kontroversial. Beberapa penelitian terdahulu mengklaim bahwa pemberian AA/DHA meningkatkan perkembangan tingkat kecerdasan tertentu dan kemampuan visual anak. Sebuah penelitian menunjukkan adanya peningkatan fungsi penglihatan pada bayi yang mendapatkan susu formula dengan suplementasi AA/DHA dibandingkan yang mendapat susu formula biasa, dengan melihat indikator perilaku dan elektrofisiologi mata pada bayi berumur 2 dan 4 bulan. Banyak juga penelitian yang mengungkapkan bahwa penambahan DHA pada susu formula, ternyata tidak terbukti meningkatkan kemampuan penglihatan dan sistem saraf bayi (1).

Penelitian yang dilakukan dr. Widodo Judarwanto terhadap 256 bayi dengan riwayat alergi yang melakukan rawat jalan di Children Allergy Center Rumah Sakit Bunda Jakarta didapatkan 34 bayi (13%) mengalami reaksi samping terhadap AA dan DHA, setelah dilakukan eliminasi provokasi susu formula AA/DHA dan susu tanpa AA/DHA dengan jenis yang sama. Gejala yang ditimbulkan karena pengaruh reaksi samping itu antara lain dermatitis, batuk dan gangguan saluran cerna berupa muntah, diare atau konstipasi (1). Pemberian DHA yang berlebihan dapat menekan proses pembentukan AA, serta dapat menekan aktivitas enzim siklooksigenase yang memfasilitasi pembentukan prostaglandin PGH_2 dan PGH_3 dari AA, sehingga dapat menghambat pembentukan prostaglandin berikut tromboksan dan leukotrien, dapat menyebabkan terhambatnya respon terhadap proses peradangan

khususnya pada pelepasan interleukin-1 dan TNF, memanjangnya masa pendarahan, menurunnya renin yang turut dalam pengontrolan fungsi ginjal (5,6). Overdosis DHA pada manusia, sejauh ini baru terlihat dialami orang Eskimo yang banyak mengkonsumsi ikan laut, yaitu sel darah yang lebih tipis. Gejalanya berupa pendarahan, mirip flek-flek berwarna kebiruan di kulit (1).

Untuk mencegah terjadinya penyimpangan kandungan DHA dalam susu formula maka diperlukan suatu metode penetapan kadarnya. Metode penetapan kadar DHA dalam susu cukup rumit karena sebelumnya perlu dilakukan proses pemisahan lemak dari protein dan karbohidrat. Proses pemisahan ini harus dilakukan dengan tepat dan hati-hati untuk mencegah terjadi hilangnya DHA saat proses berlangsung mengingat sifat DHA yang mudah rusak karena oksidasi. Setelah pemisahan, DHA harus diderivatisasi menjadi metil esternya terlebih dahulu sebelum analisis dengan kromatografi gas. Derivatisasi inipun harus dilakukan secara hati-hati dengan metode yang tepat. Setelah DHA metil ester terbentuk barulah sampel dapat disuntikkan ke alat kromatografi gas untuk menentukan kadarnya (7). Karena langkah-langkah penetapan kadar DHA yang cukup rumit inilah maka perlu dilakukan penelitian terhadap penetapan kadar DHA.

Dari penelitian-penelitian yang sudah ada, kromatografi gas merupakan metode yang paling banyak digunakan karena cepat, sensitif, selektif, dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif, jumlah sampel yang

dibutuhkan sedikit (μg), dan dalam analisis lipid resolusi atau pemisahan yang dihasilkan lebih sempurna (8,9). Detektor yang biasa digunakan adalah detektor ionisasi nyala (*flame ionized detector/ FID*). Selain kromatografi gas, analisis lipid dapat juga menggunakan kromatografi gas cair kinerja tinggi (HPLC) ataupun kromatografi lapis tipis (TLC) (7).

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh kondisi analisis optimum untuk analisis DHA secara kromatografi gas.
2. Memperoleh metode analisis DHA yang valid.
3. Mengetahui kadar DHA dalam beberapa produk susu formula bayi dan anak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Susu

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

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

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

1. Komposisi Susu

a. Lemak Susu

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

b. Protein susu

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

c. Laktosa

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

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

d. Mineral

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

e. Vitamin dan enzim

Kadar vitamin di dalam air susu tergantung dari jenis makanan yang diperoleh ternak sapi dan waktu laktasinya. Vitamin yang terdapat dalam lemak yaitu A, D, E, dan K. Vitamin yang larut dalam air susu yang terpenting adalah vitamin B₁, B₂,

asam nikotinat dan asam pantotenat. Bila air susu dipanaskan/dimasak, dipasteurisasi atau disterilisasi maka 10-30% vitamin B₁ akan hilang, vitamin C akan hilang 20-60% (10).

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

2. Produk-produk susu

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

a. Susu segar

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

b. Susu homogen

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

c. Susu Pasteurisasi

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

d. Susu Sterilisasi

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

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

e. Susu skim

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

f. Krim

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

g. Susu kental

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

h. Susu bubuk

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

B. LIPID DAN ASAM LEMAK

1. Lipid

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

Klasifikasi lipid menurut Bloor adalah sebagai berikut: (11)

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

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

2. Asam lemak

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

4. Asam lemak omega-3

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

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

C. Asam Dokosaheksaenoat (DHA)

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

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

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

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

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

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

D. Analisis DHA

1. Ekstraksi Lipid

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

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

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

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

Beberapa metode ekstraksi lipid:

- a. Ekstraksi lipid dari jaringan dengan pelarut bertoksistas rendah (16)
 - 1) 10 ml susu disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 menit pada 4°C.
 - 2) Lapisan padatan lemak atas dipindahkan ke tabung *solvent-resistant* 15 ml yang telah dibilas dengan heksan.
 - 3) Ditambahkan heksan : isopropanol (3:2 v/v, mengandung 50 mg hidroksitoluen terbutilasi untuk mencegah oksidasi asam lemak susu) 18 ml/g padatan lemak, vortex selama 1 menit.
 - 4) Larutan Na₂SO₄ (6,7% dalam aquadest) ditambahkan sebanyak 12 ml/g padatan lemak untuk memisahkan heksan dari isopropanol, vortex.
 - 5) Dibiarkan sampai terpisah sempurna.

- 6) Lapisan atas heksan dipindahkan ke tabung reaksi 15 ml yang telah dibilas heksan dan ditambahkan 1 g Na_2SO_4 anhidrat, vortex.
 - 7) Dialiri gas N_2 , biarkan selama 30 menit.
 - 8) Bagian atas (heksan dan lipid susu) dipindahkan ke tabung lain.
 - 9) Heksan diuapkan dengan mengalirkan N_2 pada 40°C selama 30 menit sampai bobot konstan (perubahan kurang dari 0,5 mg).
- b. Metode cepat dalam menentukan komposisi asam lemak susu (17)
- 1) 20 ml susu dalam tabung 50 ml disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 menit pada 4°C .
 - 2) Padatan lemak dipindahkan ke tabung 1,5 ml, biarkan pada suhu ruang ($\sim 20^\circ\text{C}$) selama 20 menit sampai padatan lemak mencair.
 - 3) Disentrifugasi pada 13000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang.
 - 4) Terjadi 3 lapisan (atas : lipid; tengah : protein, lemak & senyawa tdk larut air lainnya; bawah : air).
- c. Metode cepat untuk ekstraksi dan purifikasi lipid total (18)
- 1) Setiap 1 ml sampel, ditambahkan 3,75 ml campuran kloroform : metanol (1:2 v/v) dan divortex.
 - 2) Ditambahkan 1,25 ml kloroform, vortex.
 - 3) Ditambahkan 1,25 ml H_2O , vortex.

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

evaporator atau dengan mengalirkan gas N₂ jika volume kurang dari 2-3 ml.

e. Ekstraksi lemak susu bubuk (20)

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

11) Fase kloroform yang mengandung lemak kemudian diuapkan.

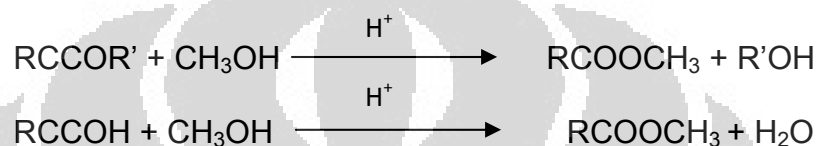
2. Esterifikasi

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

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

a. Esterifikasi dan transesterifikasi yang dikatalisis asam.

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



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

Larutan 1-2% (v/v) H_2SO_4 pekat dalam metanol mentransesterifikasi lipid dengan cara yang sama dan dengan

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

BF_3 dalam metanol (12-14% w/v) juga telah digunakan sebagai katalis transesterifikasi lipid dan esterifikasi asam lemak bebas. Pereaksi ini mempunyai waktu simpan yang terbatas, bahkan jika didinginkan, dan penggunaan BF_3 yang sudah lama atau terlalu pekat dapat menyebabkan hilangnya PUFA dalam jumlah yang bermakna. Jika dibandingkan dengan pereaksi lain katalis asam, BF_3 mempunyai banyak reaksi samping dan sebaiknya dihindari (7).

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

HCl metanolat (1%) atau H_2SO_4 (1%) mungkin adalah agen pengesterifikasi yang paling baik karena memetilasi asam lemak bebas dengan sangat cepat dan dapat digunakan untuk mentransesterifikasi lipid O-asil secara efisien. Tidak ada pelarut

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

b. Transesterifikasi yang dikatalisis basa.

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

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

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

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

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

3. Kromatografi

a. Kromatografi Gas

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

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

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

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

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

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

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

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

b. Kromatografi cair kinerja tinggi

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

E. Kromatografi Gas

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

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

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

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

1. Instrumentasi

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

a) Suplai gas pembawa

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

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

b) Sistem injeksi sampel

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

c) Konfigurasi kolom dan oven kolom

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

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

Dua tipe kolom pada kromatografi gas (29):

- (1) Kolom yang terpaking (*packed coloumns*)
- (2) Kolom kapiler (*capillary coloumns*)

d) Detektor

Alat ini akan mendeteksi komponen-komponen yang meninggalkan kolom.

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

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

2. Analisis Kualitatif

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

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

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

Keterangan:

α = waktu retensi relatif

t_1 = waktu retensi zat uji

t_2 = waktu retensi standar

t_a = waktu retensi komponen inert (fase gerak)

3. Analisis Kuantitatif

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

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

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

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

Keterangan:

C_s = konsentrasi sampel

C_{st} = konsentrasi standar

A_s = luas puncak sampel

A_{st} = luas puncak standar

b. Baku dalam

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

Persyaratan untuk baku dalam yang efektif yaitu (27):

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

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

F. Validasi Metode Analisis

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

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

1. Kecermatan (*accuracy*)

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

2. Keseksamaan (*precision*)

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

3. Selektivitas (*specificity*)

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

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

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

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

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

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

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

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

Keterangan :

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

k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

S_b = simpangan baku respon analitik dari blanko

S_1 = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi

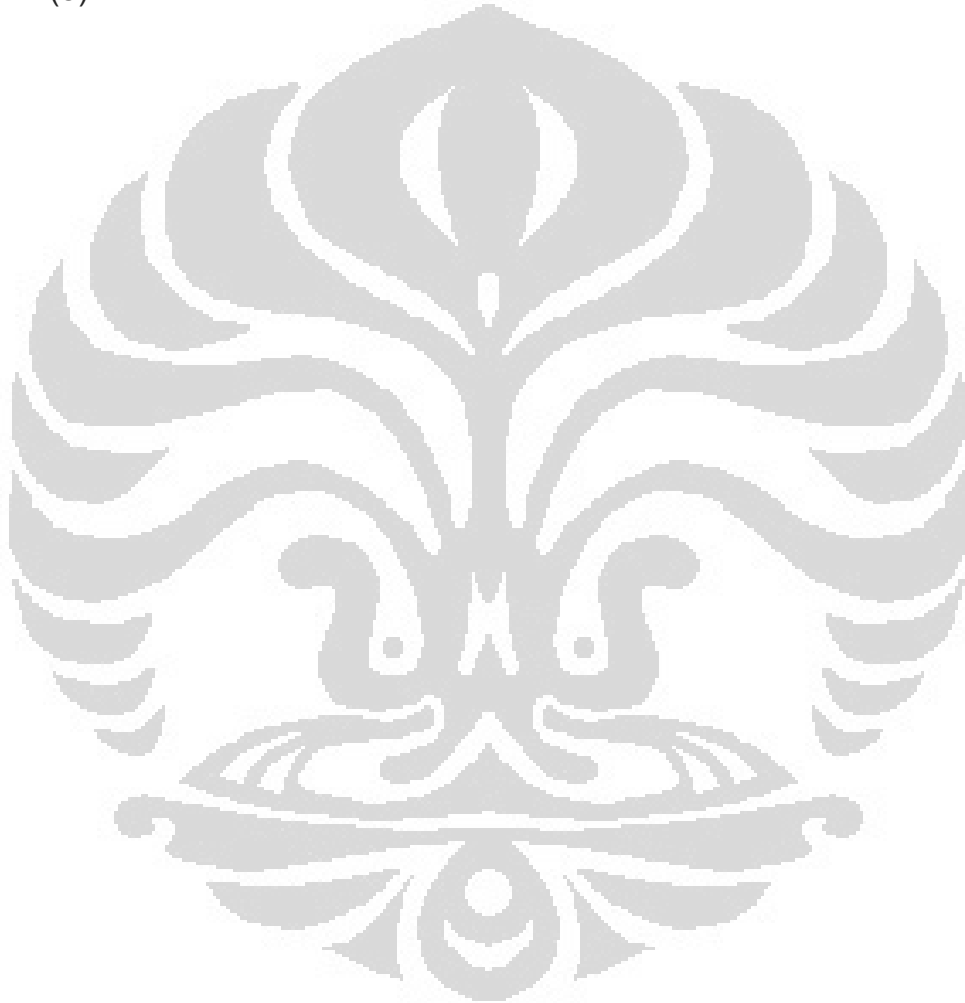
= slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

6. Ketangguhan (Ruggedness)

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

7. Kekuatan (Robustness)

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



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 N_2 dan diesterifikasi. Lapisan toluen dari larutan hasil esterifikasi tersebut disuntikkan ke alat kromatografi gas sebanyak 1,0 μ L 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 μ L, 250 μ L, dan 300 μ L larutan DHA oil ke dalam tabung tersebut, kemudian diperlakukan seperti cara ekstraksi dan esterifikasi sampel. Sebanyak 1,0 μ L 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.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pemilihan Kondisi Optimum Kromatografi Gas untuk Analisis DHA

Kondisi analisis optimum kromatografi gas terpilih adalah dengan pemrograman suhu dengan suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C kemudian suhu dipertahankan selama 20 menit, laju alir 2,00 ml/menit. Suhu injektor diatur pada 230°C, suhu detektor 250°C, split 1:3. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2.

2. Pembakuan DHA dalam DHA Oil

a. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA murni

Persamaan garis kurva kalibrasi standar DHA murni yaitu $y = -3349,651624 + 66,86540058x$ dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9993. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 4.

b. Penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Rata-rata kadar DHA dalam DHA oil dari uji triplo yang dilakukan sebesar 22,76%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

3. Validasi Metode Analisis

a. Pembuatan kurva kalibrasi serta uji linearitas DHA menggunakan DHA oil

Persamaan garis kurva kalibrasi DHA menggunakan DHA oil yaitu $y = -356,1393772 + 67,12064247x$, dengan nilai koefisien korelasi, r , sebesar 0,9999. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7 dan Tabel 6.

b. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi DHA sebesar 74,33 $\mu\text{g/g}$, sedangkan batas kuantitasnya sebesar 247,77 $\mu\text{g/g}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7.

c. Uji presisi

DHA dengan konsentrasi rendah, sedang dan tinggi, masing-masing 689,95 $\mu\text{g/g}$, 2051,45 $\mu\text{g/g}$, dan 4066,25 $\mu\text{g/g}$ memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 1,73%, 1,46%, dan 1,84%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8.

d. Uji perolehan kembali

Persentase uji perolehan kembali DHA untuk konsentrasi 419,694 μg , 524,618 μg , dan 629,542 μg berturut-turut adalah sebesar $(96,27 \pm 0,81)\%$, $(96,05 \pm 1,49)\%$, dan $(96,88 \pm 1,81)\%$. Rata-rata hasil uji perolehan kembali sebesar $(96,40 \pm 0,43)\%$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

4. Penetapan Kadar DHA dalam Susu

Kandungan DHA dalam kelima sampel susu formula bubuk yang diperiksa berturut-turut sebesar $(27,49 \pm 0,62) \text{ mg}/100 \text{ g}$, $(31,14 \pm 0,43) \text{ mg}/100 \text{ g}$, $(11,83 \pm 0,38) \text{ mg}/100 \text{ g}$, $(19,34 \pm 0,58) \text{ mg}/100 \text{ g}$, dan $(45,87 \pm 0,42) \text{ mg}/100 \text{ g}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 8a, 8b, 8c, 8d, 8e, dan Tabel 10.

B. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar DHA dalam susu formula bubuk untuk bayi dan anak. Sampel susu formula yang diteliti ini terdiri dari lima merek yang berbeda, dimana kandungan DHA pada label kemasannya bervariasi dari 7,8 mg/100 g sampai 43,5 mg/100 g.

Sebagian besar susu formula ditambahkan DHA sebagai ikon kecerdasan. DHA termasuk dalam golongan suplemen makanan, bukan

obat, sehingga pengawasan mutunya tidak begitu ketat. Pemberian DHA yang berlebihan pada bayi dapat menekan pembentukan asam arakidonat, prostaglandin, tromboksan, dan leukotrien sehingga dapat menyebabkan sel darah menjadi tipis, terhambatnya respon peradangan, memanjangnya masa pendarahan, dan menurunnya renin yang berperan dalam pengontrolan ginjal. Selain itu dapat juga terjadi reaksi alergi berupa dermatitis, batuk, dan gangguan pencernaan. Menurut WHO, kadar ideal untuk bayi normal maksimum 20 mg/kgBB/hari, sedangkan kadar ideal DHA untuk bayi prematur maksimum 40 mg/kgBB/hari (5).

DHA merupakan suatu asam lemak tak jenuh ganda yang mudah teroksidasi oleh cahaya dan udara. Oleh karena itu, proses analisisnya harus dilakukan secara tepat dan hati-hati. Sebelum kadarnya ditentukan dengan kromatografi gas, terlebih dahulu DHA perlu diekstraksi dari sampel dan diderivatisasi menjadi metil esternya. Langkah yang cukup rumit tersebut menjadi salah satu alasan dilakukannya penelitian ini.

1. Pencarian kondisi analisis optimum

Langkah pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah mencari kondisi analisis DHA optimum dengan kromatografi gas. Kondisi analisis mempengaruhi resolusi serta faktor ikutan pada kromatogram. Resolusi yang semakin besar menunjukkan pemisahan senyawa yang semakin baik. Bila nilai resolusi lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik atau lebih dari 99,7% dan bila

nilai resolusi lebih kecil dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan tidak baik. Resolusi dipengaruhi efisiensi kolom dan efisiensi pelarut. Efisiensi kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram, sedangkan efisiensi pelarut menentukan posisi puncak kromatogram. Efisiensi kolom dapat dihitung dari jumlah plat teori atau harga HETP-nya. Efisiensi kolom semakin tinggi jika jumlah plat teori semakin besar atau harga HETP semakin kecil.

Optimasi kondisi analisis dilakukan secara isothermal dan dengan pemrograman suhu. Secara isothermal dilakukan pada suhu 120°C dan laju alir 1,35 ml/menit. Ternyata hasilnya tidak baik karena puncak yang dihasilkan melebar. Optimasi kondisi dengan cara pemrograman suhu memberi hasil yang jauh lebih baik. Pemrograman suhu ini dilakukan dengan 9 variasi kondisi, yaitu variasi suhu awal dan variasi laju alir. Secara teoritis, resolusi akan semakin baik dengan penurunan suhu. Di samping itu, kemungkinan penguraian sampel juga diperkecil. Akan tetapi penurunan suhu mengakibatkan waktu analisis lebih lama dan adsorpsi bertambah. Laju alir mempengaruhi waktu retensi zat. Idealnya digunakan laju alir optimum yang menghasilkan nilai HETP terendah. Laju alir hanya divariasikan sampai 2,00 ml/menit sebab jika digunakan laju alir yang terlalu besar maka kolom dapat rusak karena semakin besar laju alir semakin besar pula tekanannya.

Dari 10 kondisi analisis yang diuji, ternyata analisis secara pemrograman suhu dengan suhu awal 130°C dan laju alir 2,00 ml/menit menghasilkan jumlah plat teori yang paling besar. Dari suhu awal dinaikkan 2°C/menit sampai 230°C kemudian suhu ditahan selama 20 menit sampai kolom bersih atau tidak ada lagi puncak yang terbentuk. Suhu injektor diatur pada 230°C dan suhu detektor 250°C, split 1:3. Kondisi ini digunakan untuk percobaan selanjutnya.

2. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA

Karena jumlah standar DHA yang dimiliki sangat terbatas, yaitu sekitar 25 mg, maka digunakan DHA oil untuk dijadikan baku kerja untuk tahap selanjutnya. Standar DHA yang terbatas ini digunakan untuk membakukan DHA oil yang akan digunakan sebagai baku kerja tersebut. Untuk membakukan DHA dalam DHA oil, maka pertama-tama dibuatlah kurva kalibrasi standar DHA untuk mendapatkan persamaan garis yang akan digunakan untuk memplot area yang didapatkan dari penetapan kadar DHA dalam DHA oil.

Pada pembuatan kurva kalibrasi standar DHA ini, dihubungkan 6 titik pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi DHA yang ditentukan yaitu 388,58 µg/g, 776,85 µg/g, 1552,5 µg/g, 2326,94µg/g, 3100,19 µg/g, dan 3872,23 µg/g. Persamaan garis kurva kalibrasi DHA yang didapat yaitu $y = -3349,651624 + 66,86540058x$ dengan koefisien korelasi, r , sebesar 0,9993. Harga koefisien korelasi yang diperoleh

menunjukkan hubungan yang linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan. Kurva kalibrasi yang diperoleh ini sudah cukup baik dan memenuhi syarat untuk penetapan kadar DHA oil.

3. Penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Penetapan kadar DHA oil dilakukan dengan memplot luas puncak yang dihasilkan ke dalam persamaan garis kurva kalibrasi standar DHA. Setelah diderivatisasi menjadi DHA metil ester, larutan DHA oil siap disuntikkan ke alat kromatografi gas. Dengan berorientasi pada kadar DHA yang tercantum dalam sertifikat analisis DHA oil yaitu 27,5%, maka disiapkan larutan DHA oil yang memiliki konsentrasi pada rentang kurva kalibrasi standar DHA.

Dari uji triplo yang dilakukan, didapatkan kadar DHA dalam DHA oil sebesar 22,76%. Hasil ini 17,24% lebih rendah dari kadar yang tertera dalam sertifikat analisis. Hal ini disebabkan karena DHA yang dikandung di dalam DHA oil telah teroksidasi dari jangka waktu sejak dibuatnya sertifikat analisis hingga digunakannya DHA oil pada percobaan ini yaitu lebih kurang 1 tahun. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa DHA adalah suatu asam lemak tak jenuh ganda yang mudah teroksidasi oleh cahaya dan udara, sehingga kadar yang menurun seiring berlalunya waktu sangat wajar terjadi.

4. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas DHA menggunakan DHA oil

Sebelum melakukan penetapan kadar sampel, metode yang digunakan perlu divalidasi. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi ini juga akan dipergunakan untuk menghitung kadar DHA dalam sampel. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya 5 konsentrasi analit yang berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat harus dipertimbangkan dengan seksama agar hasil pengukuran luas puncak sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut.

Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai sumbu x, sedangkan luas puncak DHA yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai nilai sumbu y.

Pembuatan kurva kalibrasi DHA ini dilakukan dengan menghubungkan 6 titik pada konsentrasi 344,50 µg/g, 689,95 µg/g, 2051,45 µg/g, 2727,07 µg/g, 3398,66 µg/g, dan 4066,25 µg/g. Persamaan garis yang didapatkan yaitu $y = -356,1393772 + 67,12064247x$, dengan nilai koefisien korelasi, r , sebesar 0,9999. Harga koefisien korelasi yang semakin mendekati 1 menunjukkan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram. Harga koefisien korelasi yang didapatkan dari

persamaan garis kurva kalibrasi ini memenuhi syarat linearitas validasi metode analisis sehingga selanjutnya dapat digunakan untuk menghitung kadar DHA dalam sampel.

5. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Dengan memanfaatkan persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi yang telah diperoleh, batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi dan memberikan respon yang bermakna dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi ini merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Berdasarkan perhitungan secara statistik, diperoleh batas deteksi DHA sebesar 74,33 $\mu\text{g/g}$, sedangkan batas kuantitasnya sebesar 247,77 $\mu\text{g/g}$. Konsentrasi tersebut masih berada di bawah konsentrasi terkecil pada kurva kalibrasi sehingga kurva kalibrasi yang dibuat memenuhi syarat deteksi dan kuantitasi.

6. Uji presisi

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif 2% atau kurang. Akan tetapi

kriteria ini fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Koefisien variasi umumnya meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis.

Uji presisi pada penelitian ini dilakukan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi pada kurva kalibrasi yaitu 689,95 $\mu\text{g/g}$, 2051,45 $\mu\text{g/g}$, dan 4066,25 $\mu\text{g/g}$, masing-masing sebanyak enam kali. Pada ketiga konsentrasi tersebut, simpangan relatif atau koefisien variasinya kurang dari 2%, sehingga dapat disimpulkan metode analisis ini memenuhi kriteria seksama.

7. Uji perolehan kembali

Uji perolehan kembali merupakan cara untuk menentukan kecermatan hasil analisis suatu metode. Kecermatan atau akurasi adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Uji perolehan kembali dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu cara absolut dan adisi. Penelitian ini menggunakan cara absolut untuk uji perolehan kembali. Susu bubuk tanpa DHA digunakan sebagai blanko. Cara adisi sedapat mungkin dihindari karena kesalahan akan semakin besar akibat ketidakseksamaan hasil pengukuran sehingga nilai perolehan kembali zat yang dianalisis menjadi jauh dari nilai sebenarnya.

Idealnya, kadar dalam setiap sampel dibuat uji perolehan kembalinya agar penetapan kadarnya menjadi lebih akurat. Umumnya,

makin kecil kadar analit dalam sampel, makin kecil pula persentase perolehan kembalinya. Namun, dalam proses ekstraksi dapat pula terjadi hal sebaliknya apabila terjadi kejenuhan dalam melarutkan analit dalam pelarut yang digunakan, sehingga tidak seluruh analit dapat terbawa dalam pelarut tersebut. Jumlah sampel yang diperiksa juga mempengaruhi hasil perolehan kembali. Semakin banyak jumlah sampel, semakin banyak pula zat pengganggu yang ada, sehingga hasil perolehan kembalinya mungkin saja lebih rendah.

Umumnya konsentrasi analit yang dibuat untuk uji perolehan kembali adalah 80, 100, dan 120% dari kadar analit yang diperkirakan terdapat dalam setiap sampel. Kadar DHA dalam sampel sangat bervariasi, yaitu dari 0,008 – 0,043%. Sebelumnya peneliti telah melakukan uji perolehan kembali dari setiap kadar DHA dalam sampel. Karena hasilnya tidak berbeda secara bermakna, maka hanya salah satu kadar DHA dalam sampel yang dibuat uji perolehan kembalinya pada konsentrasi 80, 100, dan 120%, yaitu kadar 0,025%.

Banyaknya DHA yang ditambahkan dalam uji perolehan kembali ini yaitu 419,69 µg, 524,62 µg, dan 629,54 µg. Rata-rata hasil uji perolehan kembali pada ketiga konsentrasi ini sebesar $(96,40 \pm 0,43)\%$. Hasil ini termasuk cukup akurat mengingat kadarnya dalam sampel hanya 0,025%. Untuk analit pada matriks sampel dengan konsentrasi lebih besar atau sama dengan 0,1%, rata-rata persen

perolehan kembali yang dikategorikan akurat adalah 95% hingga 105%, sedangkan untuk konsentrasi kurang dari 0,1% tetapi lebih besar atau sama dengan 0,01%, rata-rata persen uji perolehan kembali yang diperbolehkan adalah 90% sampai 110%.

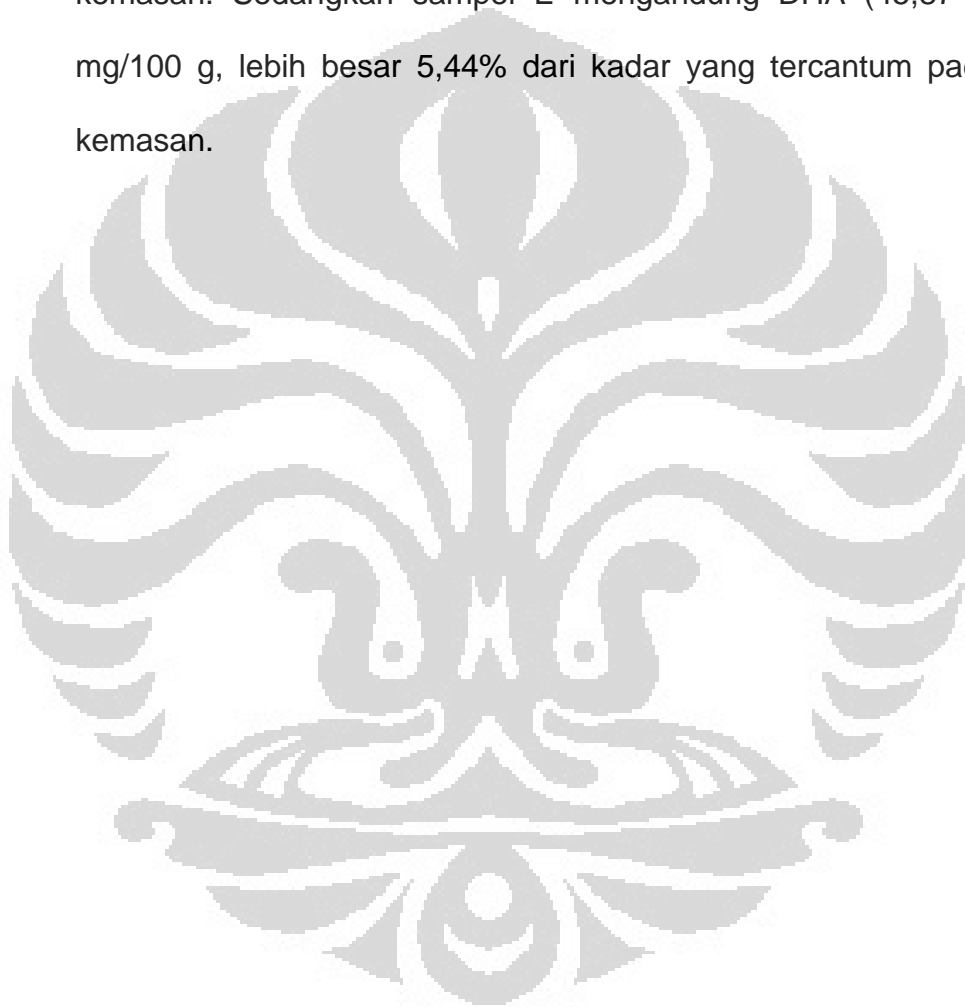
8. Penetapan kadar DHA dalam sampel susu

Kelima sampel susu formula bubuk yang diperiksa mengandung DHA dengan kadar yang bervariasi. Sampel susu tersebut mencantumkan kadar DHA yang dikandung dalam label kemasan produknya. Pada kemasan, sampel susu tersebut mengandung DHA masing-masing 30,0 mg/100 g untuk sampel A, 20,0 mg/100 g untuk sampel B, 7,8 mg/100 g untuk sampel C, 8,2 mg/100 g untuk sampel D, dan 43,5 mg/100 g untuk sampel E.

Menurut WHO, kadar ideal untuk bayi normal maksimum 20 mg/kgBB/hari, sedangkan kadar ideal DHA untuk bayi prematur maksimum 40 mg/kgBB/hari (5). Sebagian besar bayi yang diberi susu formula adalah bayi berusia 6 bulan ke atas karena bayi 6 bulan ke bawah harus diberi ASI eksklusif.

Dari kelima sampel yang diperiksa, tiga sampel di antaranya mengandung DHA lebih besar secara bermakna dari yang tertera pada label kemasan. Sampel A mengandung DHA ($27,46 \pm 0,62$) mg/100 g, lebih kecil 8,36% dari kadar yang tercantum pada label kemasan. Sampel B mengandung DHA ($31,14 \pm 0,43$) mg/100 g, lebih

besar 55,68% dari kadar yang tercantum pada label kemasan. Sampel C mengandung DHA ($11,83 \pm 0,38$) mg/100 g, lebih besar 51,70% dari yang tercantum pada label kemasan. Sampel D mengandung DHA ($19,34 \pm 0,58$) mg/ 100 g, lebih besar 136,44% dari kadar pada kemasan. Sedangkan sampel E mengandung DHA ($45,87 \pm 0,42$) mg/100 g, lebih besar 5,44% dari kadar yang tercantum pada label kemasan.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar DHA secara kromatografi gas dengan kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μ m) dan fase gerak helium adalah dengan pemrograman suhu dengan suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C kemudian suhu dipertahankan selama 20 menit, laju alir 2,00 ml/menit. Suhu injektor diatur pada 230°C dan suhu detektor 250°C.
2. Hasil validasi metode yang digunakan menunjukkan bahwa uji linearitas, uji presisi, dan uji perolehan kembali memenuhi syarat yang telah ditetapkan.
3. Hasil penetapan kadar DHA dari 5 sampel susu formula bayi dan anak yaitu (27,49 \pm 0,62) mg/100 g, (31,14 \pm 0,43) mg/100 g, (11,83 \pm 0,38) mg/100 g, (19,34 \pm 0,58) mg/ 100 g, dan (45,87 \pm 0,42) mg/100 g.

B. SARAN

1. Pada penelitian selanjutnya digunakan konsentrasi kurva kalibrasi dengan rentang yang lebih kecil untuk mendapatkan akurasi metode analisis yang lebih tinggi.
2. Pada penelitian selanjutnya digunakan baku dalam untuk mendapatkan presisi dan akurasi yang lebih baik.



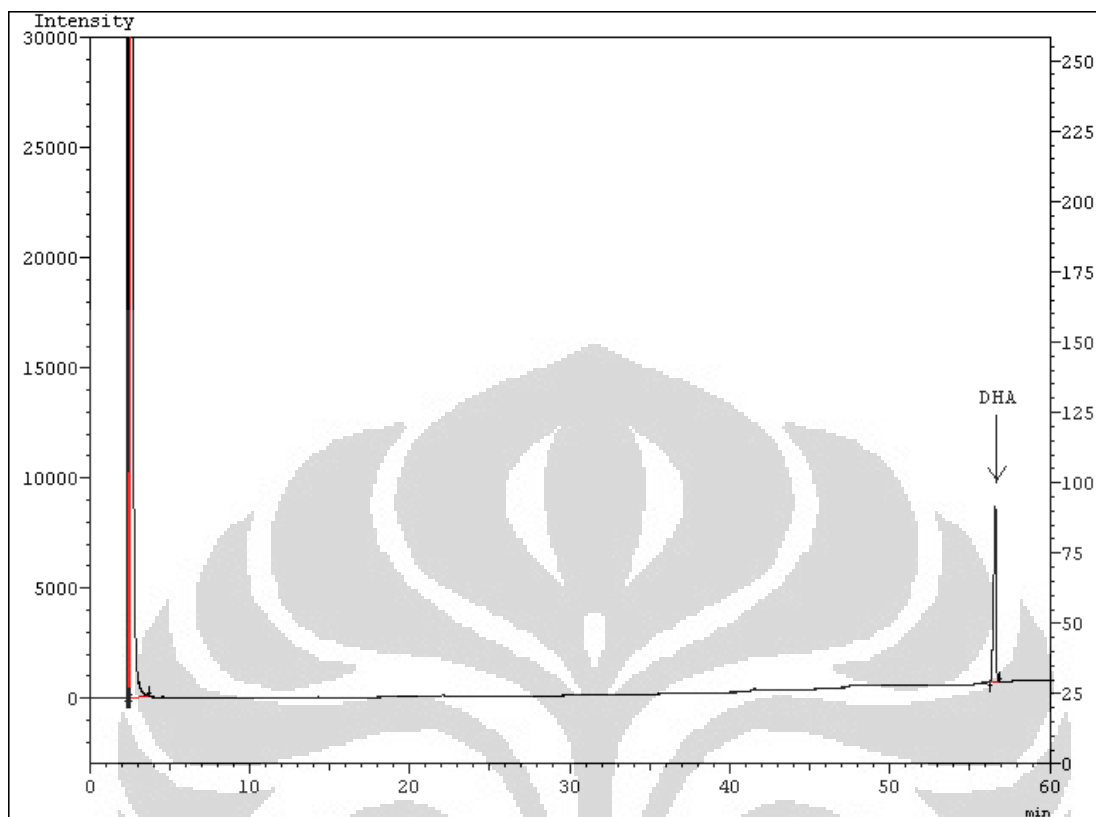




Gambar 1. Alat kromatografi gas

Keterangan:

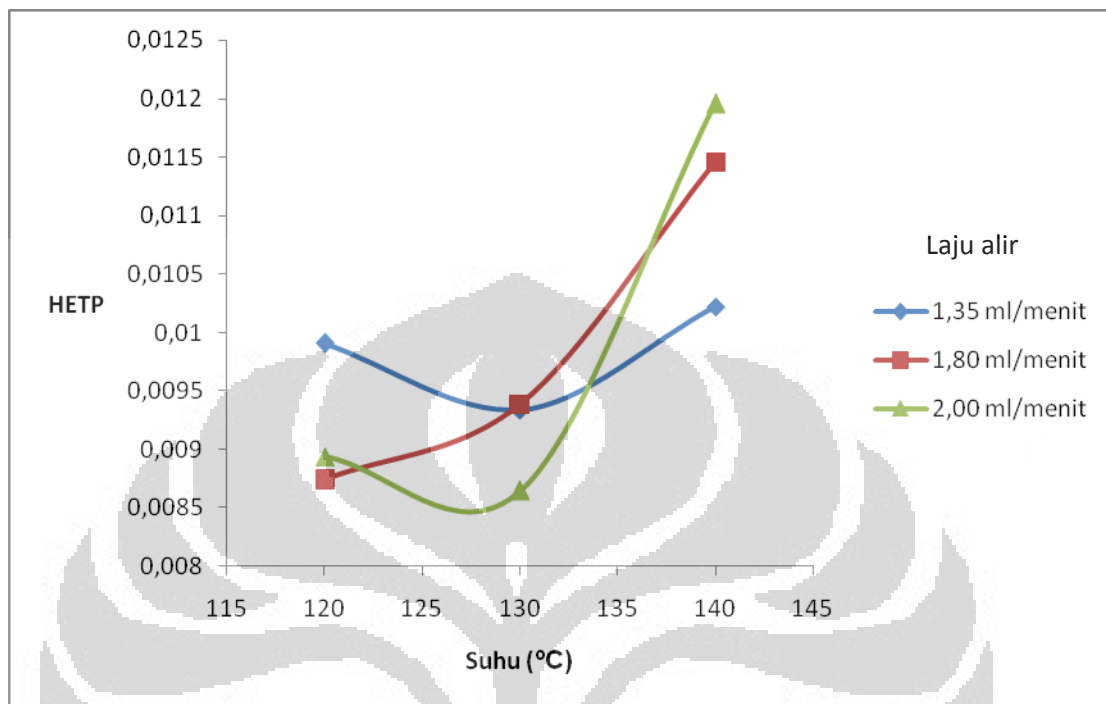
- A. Unit utama
- B. Sistem kontrol



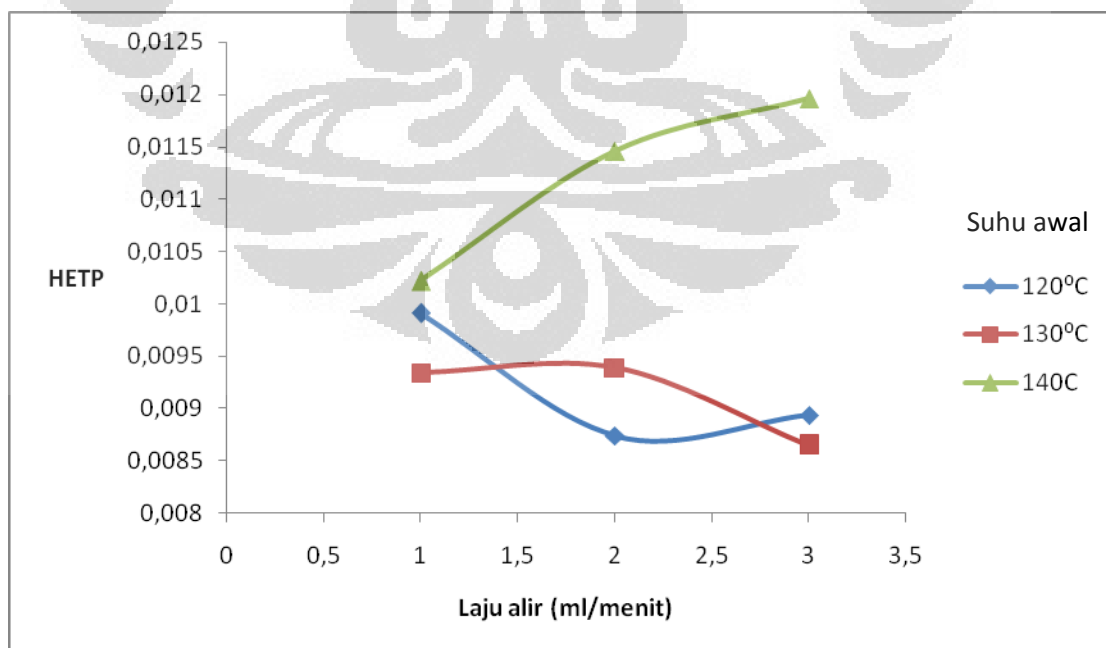
Gambar 2. Kromatogram larutan standar DHA 1552,5 $\mu\text{g/g}$

Kondisi:

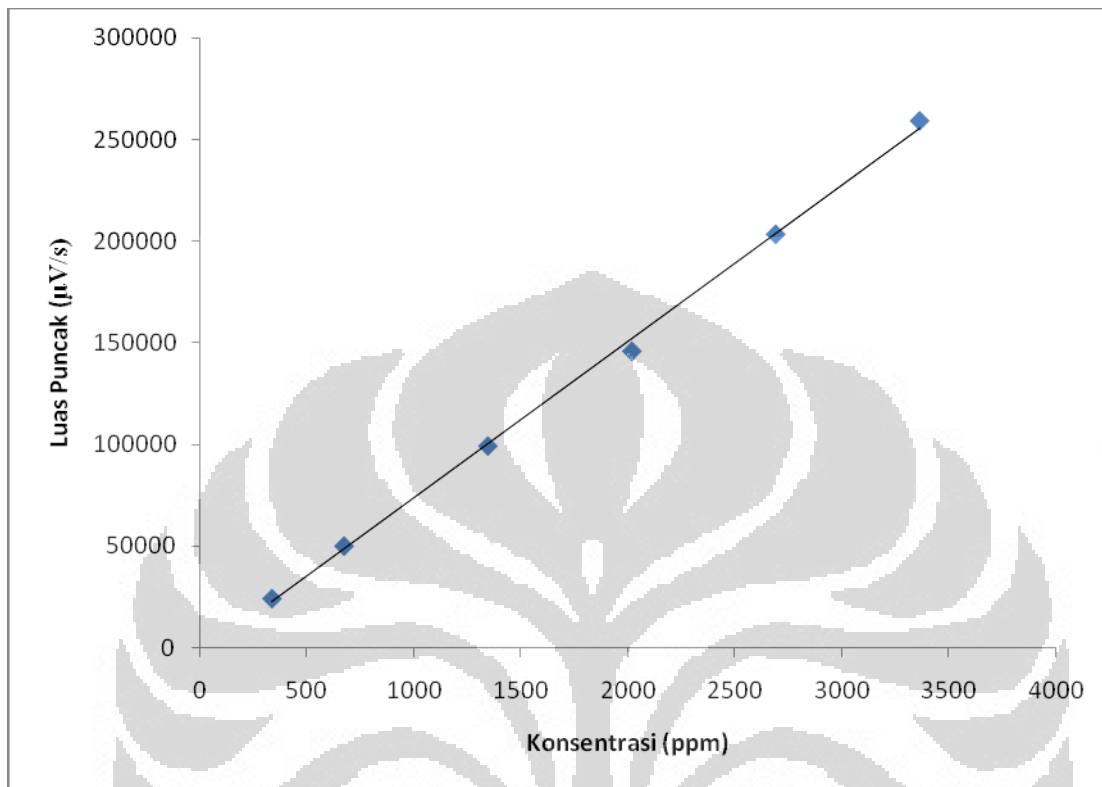
Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .



Gambar 3. Grafik hubungan suhu awal kolom dengan HETP



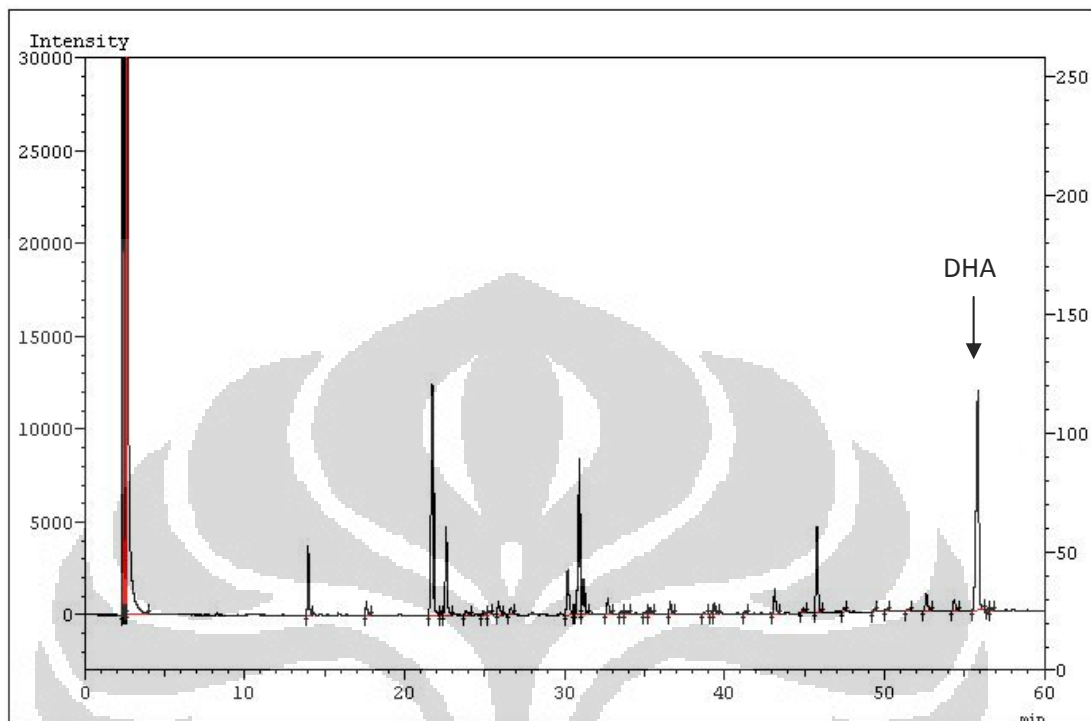
Gambar 4. Grafik hubungan laju alir dengan HETP



Gambar 5. Kurva kalibrasi standar DHA

Keterangan:

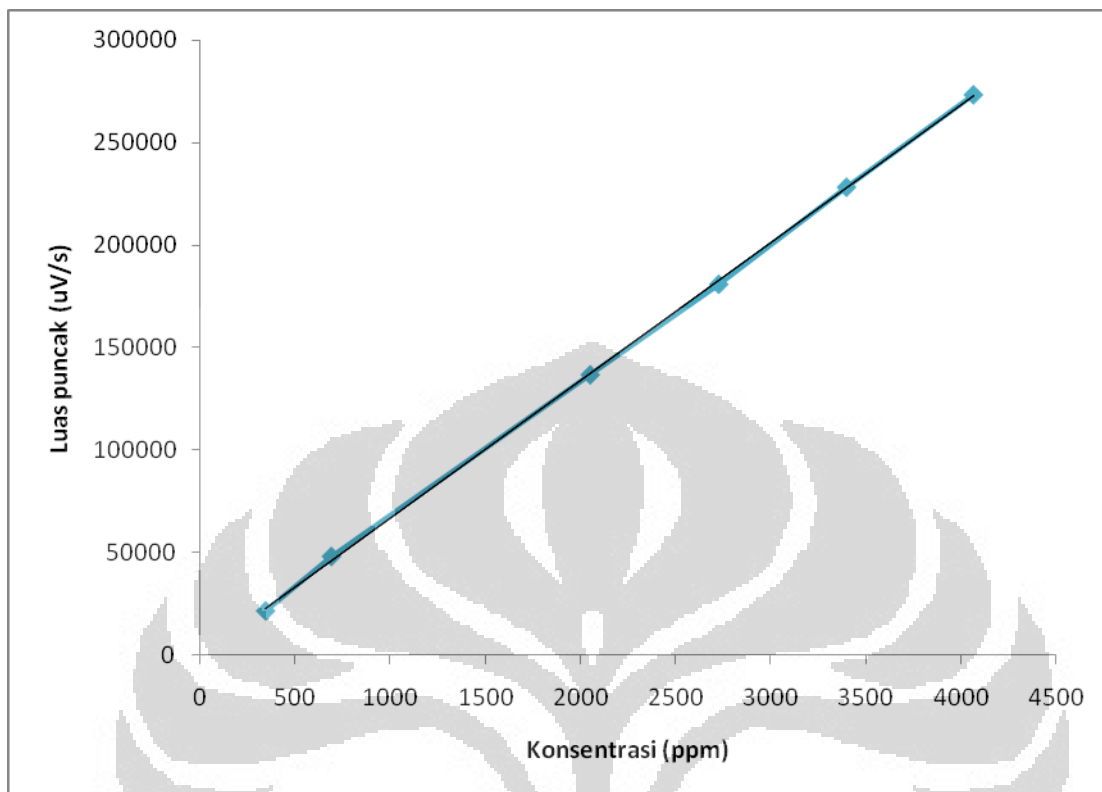
Persamaan kurva kalibrasi DHA yaitu $y = -3349,651624 + 66,86540058x$ dengan koefisien korelasi, r , adalah 0,9993.



Gambar 6. Kromatogram larutan DHA oil 7186,2 $\mu\text{g/g}$

Kondisi:

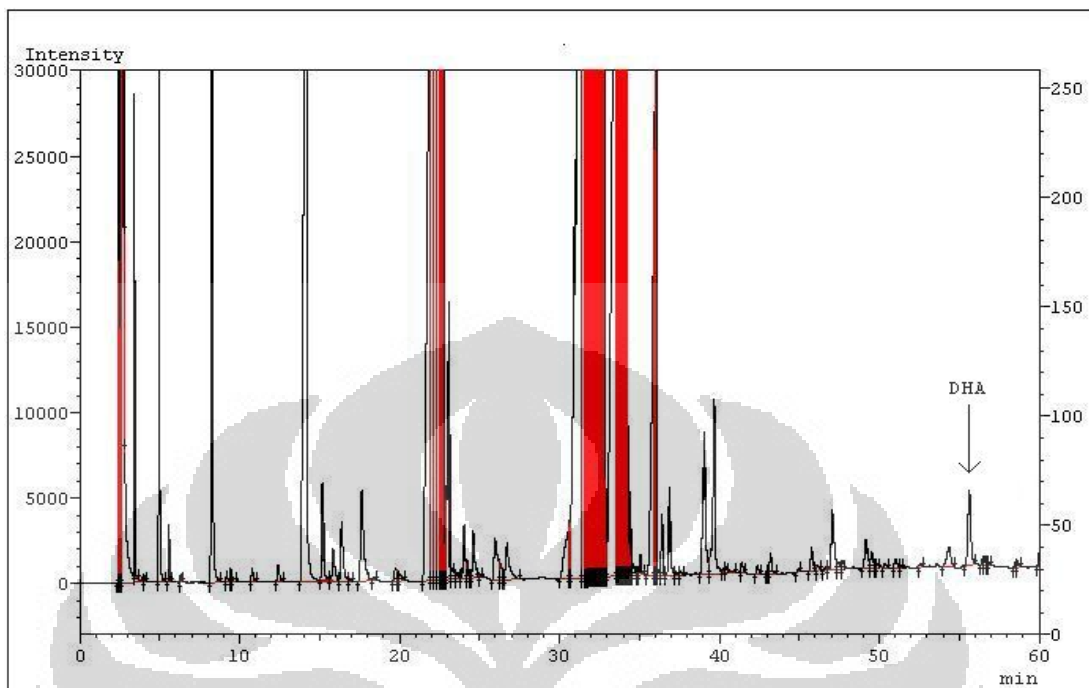
Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .



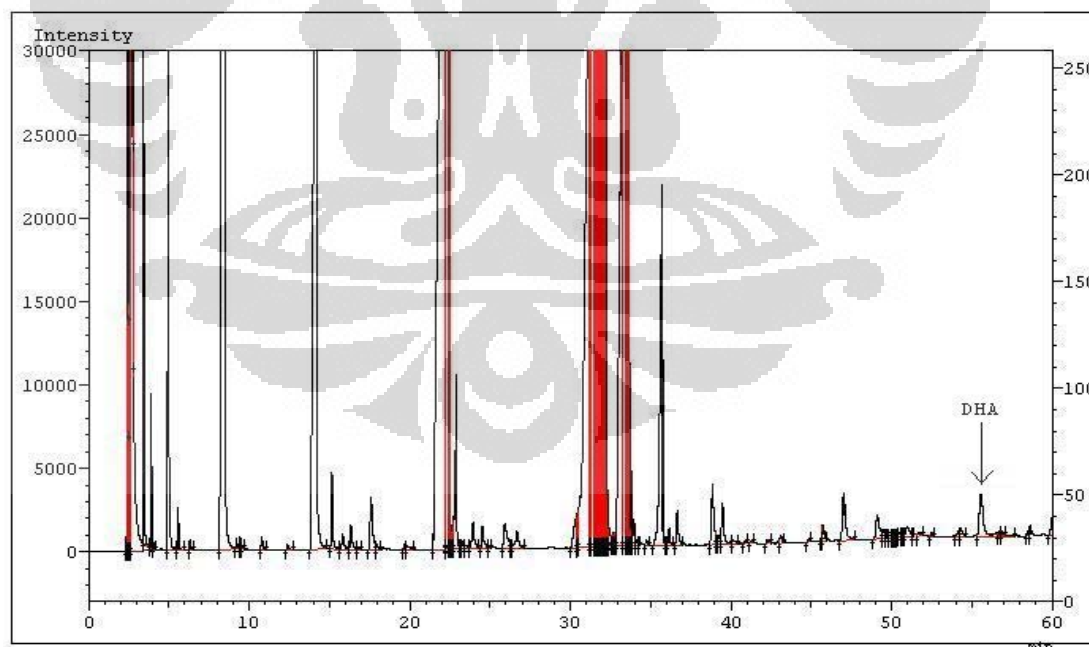
Gambar 7. Kurva Kalibrasi DHA dalam DHA oil

Keterangan:

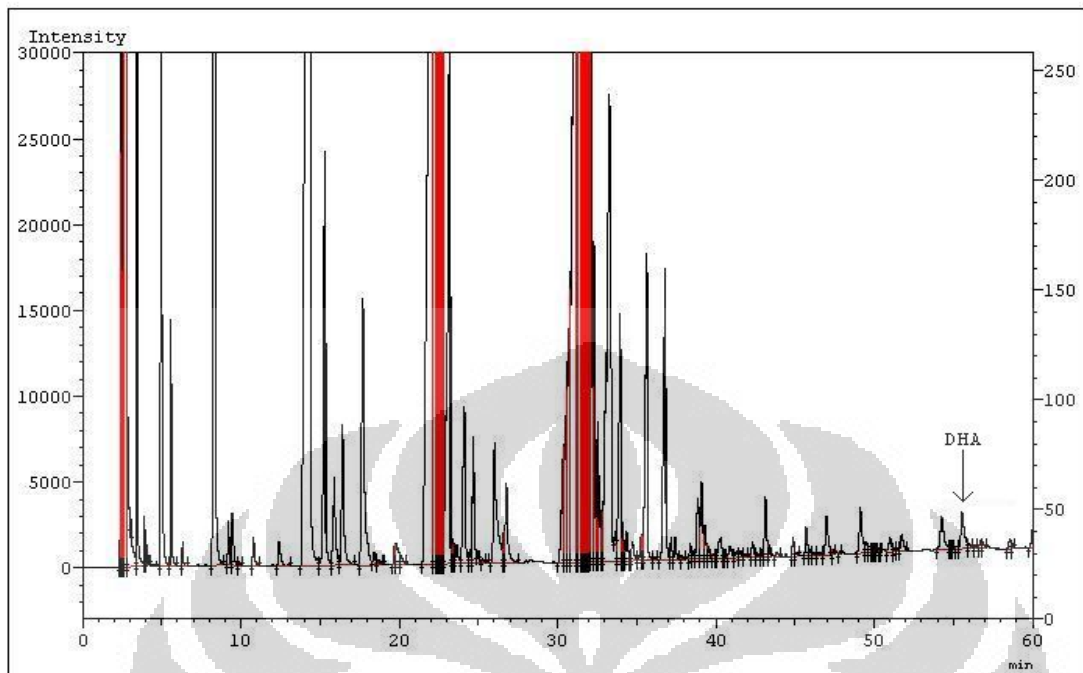
Persamaan kurva kalibrasi $y = -356,1393772 + 67,12064247x$,
dengan nilai koefisien korelasi, r , sebesar 0,9999.



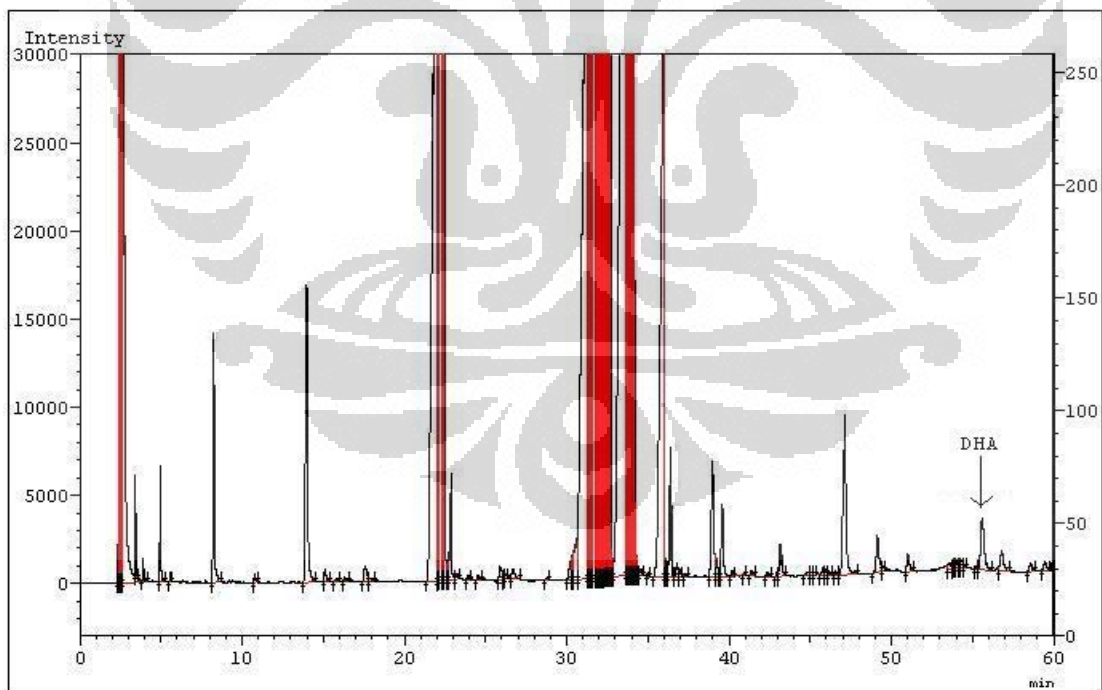
Gambar 8a. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula A



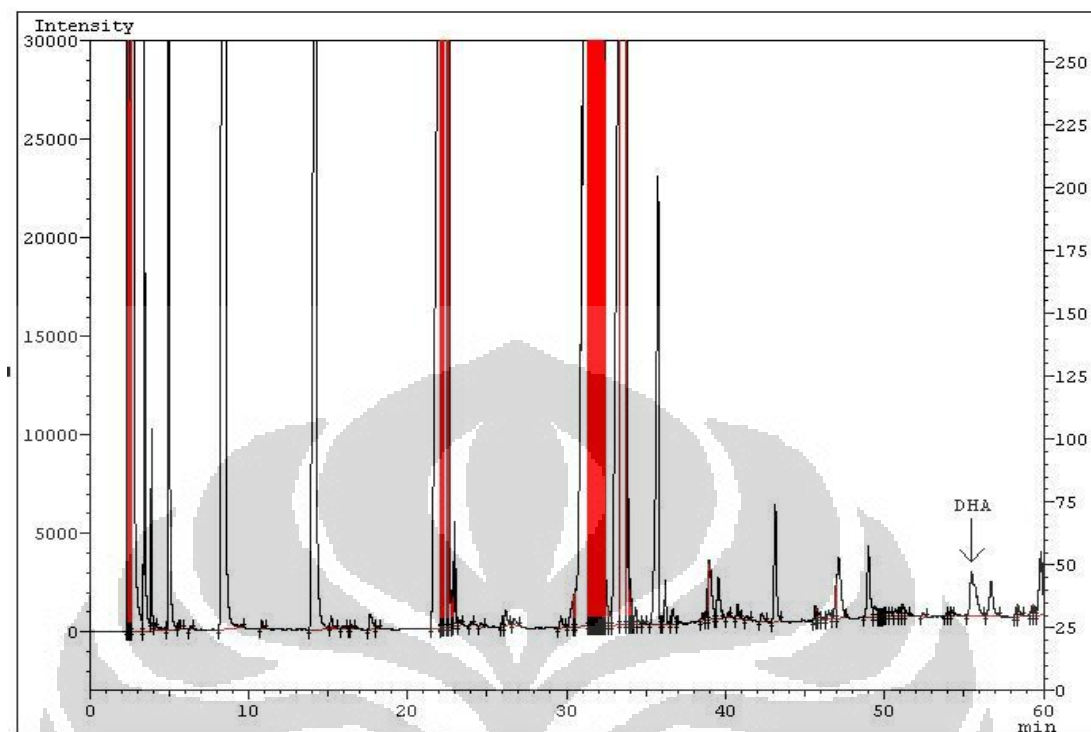
Gambar 8b. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula B



Gambar 8c. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula C



Gambar 8d. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula D



Gambar 8e. Kromatogram DHA dalam sampel susu formula E

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μ m), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikan 1,0 μ L.



Tabel 3

Pemilihan kondisi analisis DHA optimum secara kromatografi gas

	Suhu awal (°C)	Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Jumlah Plat teori	HETP
Suhu	120	1,35	68,200	605654,984	0,00991
terprogram	120	1,80	63,468	686485,845	0,00874
dari suhu	120	2,00	62,116	671114,224	0,00894
awal naik	130	1,35	62,686	638605,624	0,00934
2°C/menit	130	1,80	57,996	639246,648	0,00939
sampai	130	2,00	56,592	693799,411	0,00865
230°C lalu	140	1,35	56,731	587010,084	0,01022
ditahan 20	140	1,80	52,439	523527,926	0,01146
menit	140	2,00	51,029	501615,256	0,01196
Isotermal	200	1,35	68,280	-	-

Tabel 4

Hasil pengukuran standar DHA untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/g}$)	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)
388,58	24495
776,85	50342
1552,50	99519
2326,94	146129
3100,19	203598
3872,23	259360

Konsentrasi larutan standar DHA yang digunakan 2690 $\mu\text{g/mL}$

Persamaan garis kurva kalibrasi : $y = -3349,651624 + 66,86540058x$

$$r = 0,9993$$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .

Tabel 5
Hasil penetapan kadar DHA dalam DHA oil

Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar dalam DHA oil (%)	Kadar rata-rata (%)
133947	2389,711	23,78	22,76
133956	2389,868	23,78	
133573	2383,201	23,72	

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 10490 $\mu\text{g/mL}$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .

Tabel 6

Hasil pengukuran DHA dalam DHA oil untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi ($\mu\text{g/g}$)	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)
344,50	21668
689,95	48238
2051,45	136502
2727,07	180966
3398,66	228314
4066,25	273395

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 10490 $\mu\text{g/mL}$

Persamaan garis kurva kalibrasi : $y = -356,1393772 + 67,12064247x$

$r = 0,9999$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .

Tabel 7
Perhitungan secara statistik untuk menentukan batas deteksi
dan batas kuantitasi DHA

Konsentrasi ($\mu\text{g/g}$)	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	y_i	$(y - y_i)^2$
344,50	21668	22766,92	1207629,46
689,95	48238	45953,75	5217807,68
2051,45	136502	137338,50	699736,63
2727,07	180966	182686,55	2960296,03
3398,66	228314	227764,10	302386,31
4066,25	273395	272573,17	675399,51
Jumlah			11063255,62

$$S(y/x) = 1663,07$$

$$\text{Batas deteksi} = 74,33 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Batas kuantitasi} = 247,77 \mu\text{g/g}$$

Tabel 8

Hasil pengukuran DHA dalam DHA oil untuk data presisi

Konsentrasi ($\mu\text{g/g}$)	Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi pengukuran ($\mu\text{g/g}$)	Konsentrasi rata-rata ($\mu\text{g/g}$)	Simpangan baku ($\mu\text{g/g}$)	Koefisien variasi (%)
689,95	49277	739,462	721,164	12,4506	1,73
	47014	705,746			
	48238	723,982			
	47500	712,987			
	47603	714,507			
	48662	730,299			
2051,45	130731	1953,008	1975,261	28,7647	1,46
	133947	2000,922			
	133956	2001,056			
	131826	1969,322			
	129315	1931,911			
	133573	1995,349			
4066,25	271621	4052,064	4110,744	75,5626	1,84
	273395	4078,494			
	282373	4212,253			
	280094	4178,299			
	269217	4016,248			
	276658	4127,108			

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 10490 $\mu\text{g/mL}$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .

Tabel 9
Hasil uji perolehan kembali

DHA yang ditambahkan(μg)	Berat total ekstrak(mg)	Berat ekstrak diesterifikasi (mg)	Hasil yang diperoleh			
			Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	DHA yang diperoleh (μg)	Persentase UPK (%)	Persentase UPK rata-rata (%)
419,694	292,2	160,2	29299	407,928	97,20	96,27
	292,6	154,7	28158	402,315	95,86	
	302,2	155,3	27293	401,834	95,74	
524,618	276,7	156,9	38461	512,903	97,77	96,05
	278,1	155,5	37059	499,957	95,30	
	282,8	151,6	35716	498,857	95,09	
629,542	271,4	150,6	44403	596,784	94,80	96,88
	280,4	161,1	46536	616,623	97,95	
	285,3	157,6	45022	616,342	97,90	

Rata-rata hasil uji perolehan kembali = 96,40%

Konsentrasi larutan DHA oil yang digunakan 9220 $\mu\text{g/mL}$

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 μm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 μL .


Tabel 10

Hasil penetapan kadar DHA dalam sampel susu formula

Sampel	Berat yang ditimbang (g)	Berat ekstrak total (mg)	Berat ekstrak diesterifikasi (mg)	Hasil yang diperoleh				Kadar pada kemasan (mg/100 g)
				Luas puncak (uV/s)	Konsentrasi (µg/g)	Kadar (mg/100 g)	Kadar rata-rata (mg/100 g)	
A	2	371,2	302,1	46642	689,592	27,46	27,46	30,0
		383,1	313,3	45125	666,991	26,89		
		380,8	287,7	45380	670,790	28,13		
B	2	249,6	147,6	50954	753,835	31,46	31,14	20,0
		258,9	159,1	50403	745,625	30,64		
		252,7	150,6	50789	751,376	31,31		
C	3	356,2	202,8	25334	372,134	11,96	11,83	7,8
		342,2	197,2	24722	363,016	11,41		
		329,7	207,7	28158	414,207	12,14		
D	3	441,5	327,4	44655	659,989	19,98	19,34	8,2
		413,5	303,9	44101	651,735	19,21		
		437,1	321,1	42120	622,221	18,83		
E	1,5	394,9	296,2	54080	800,407	45,69	45,87	43,5
		397,2	297,9	53796	796,176	45,57		
		391,3	293,5	55080	815,306	46,34		

Kondisi:

Kolom kapiler VB-wax (60 m x 0,32 mm x 0,25 µm), fase gerak helium, laju alir 2,00 mL/menit, suhu awal 130°C naik 2°C/menit sampai 230°C lalu ditahan 20 menit, split 1:3, volume penyuntikkan 1,0 µL.



Lampiran

Lampiran 1

Cara menghitung konsentrasi akhir DHA setelah esterifikasi

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Berat standar yang ditimbang (mg)}}{\text{Volume larutan yang dibuat (mL)}} \times 1000 \mu\text{g} \times \text{kadar DHA dalam standar} \times \text{volume pipet (mL)} \div \text{berat fase atas (g)}$$

Keterangan :

Kadar DHA dalam standar = 100% untuk standar DHA murni atau
22,76% untuk DHA oil

Berat fase atas = berat standar dalam larutan teresterifikasi + berat 0,4 ml
toluen (BJ = 0,865 g/mL)

$$\text{Berat standar dalam larutan teresterifikasi} = \frac{\text{Berat standar yang ditimbang (mg)}}{\text{Volume larutan yang dibuat (mL)}} \times \text{volume pipet (mL)} \div 1000 \text{ g}$$

Contoh :

$$\begin{aligned} \text{Berat fase atas} &= \left(\frac{26,9 \text{ mg}}{10,0 \text{ mL}} \times 0,05 \text{ mL} \div 1000 \right) + (0,4 \text{ mL} \times 0,865 \text{ g/mL}) \\ &= 0,3461345 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi} &= \frac{26,9 \text{ mg}}{10,0 \text{ mL}} \times 1000 \times 100\% \times 0,05 \text{ ml} \div 0,3461 \text{ g} \\ &= 388,58 \mu\text{g/g} \end{aligned}$$

Lampiran 2

Cara memperoleh persamaan garis linier

Persamaan garis $y = a + bx$

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

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

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

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

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

Lampiran 3

Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2}}$$

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

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

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi DHA : $y = -356,1393772 + 67,12064247x$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{(21668 - 22766,92)^2 + \dots + (273395 - 272573,17)^2}{6 - 2}}$$

$$= 1663,07$$

$$\text{Batas deteksi DHA : LOD} = \frac{3 \times 1663,07}{67,12064247}$$

$$= 74,33 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Batas kuantitasi : LOQ} = \frac{10 \times 1578,98}{67,12064247}$$

$$= 247,77 \mu\text{g/g}$$

Lampiran 4

Cara perhitungan kadar DHA dalam DHA oil

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Luas puncak} + 3349,651624}{66,85640058} \times \frac{\text{Berat fase atas (g)}}{\text{Volume pemipetan (mL)}}$$

$$\text{Kadar} = \frac{\text{Konsentrasi DHA } (\mu\text{g/mL})}{\text{Konsentrasi DHA oil } (\mu\text{g/mL})} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat fase atas = berat DHA oil dalam larutan teresterifikasi + berat 0,4 ml toluen (BJ = 0,865 g/mL)

Contoh:

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi DHA} &= \frac{133947 + 3349,651624}{66,85640058} \times \frac{(0,003147 + 0,346)}{0,3} \\ &= 2389,711 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar DHA dalam DHA oil} &= \frac{2389,711}{10490} \times 100\% \\ &= 22,78\% \end{aligned}$$

Lampiran 5

Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

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

$$\text{Simpangan baku : } SB = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

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

Contoh :

Hasil pengukuran standar DHA untuk data presisi:

Konsentrasi rata-rata = 721,1637 µg/g

$$SB = \sqrt{\frac{(721,7665 - 740,3381)^2 + \dots + (721,7665 - 631,0384)^2}{6 - 1}}$$

$$= 12,4506$$

$$KV = \frac{12,4506}{721,1637} \times 100\%$$

$$= 1,73\%$$

Lampiran 6

Cara perhitungan uji perolehan kembali

DHA yang ditambahkan = Konsentrasi larutan DHA oil x kadar DHA dalam
DHA oil x volume pemipetan (mL)

$$\text{DHA yang diperoleh} = \frac{\text{Luas puncak} + 356,1393772}{67,12064247} \times \frac{W_t}{W_e} \times \text{berat fase atas}$$

$$\text{Persentase UPK} = \frac{\text{DHA yang diperoleh } (\mu\text{g})}{\text{DHA yang ditambahkan } (\mu\text{g})} \times 100\%$$

Keterangan :

Berat fase atas = berat ekstrak yang dimetilasi + berat 0,40 ml toluen (g) (BJ)
toluen = 0,865 g/ml)

W_t = berat ekstrak total (mg)

W_e = berat ekstrak yang dimetilasi (mg)

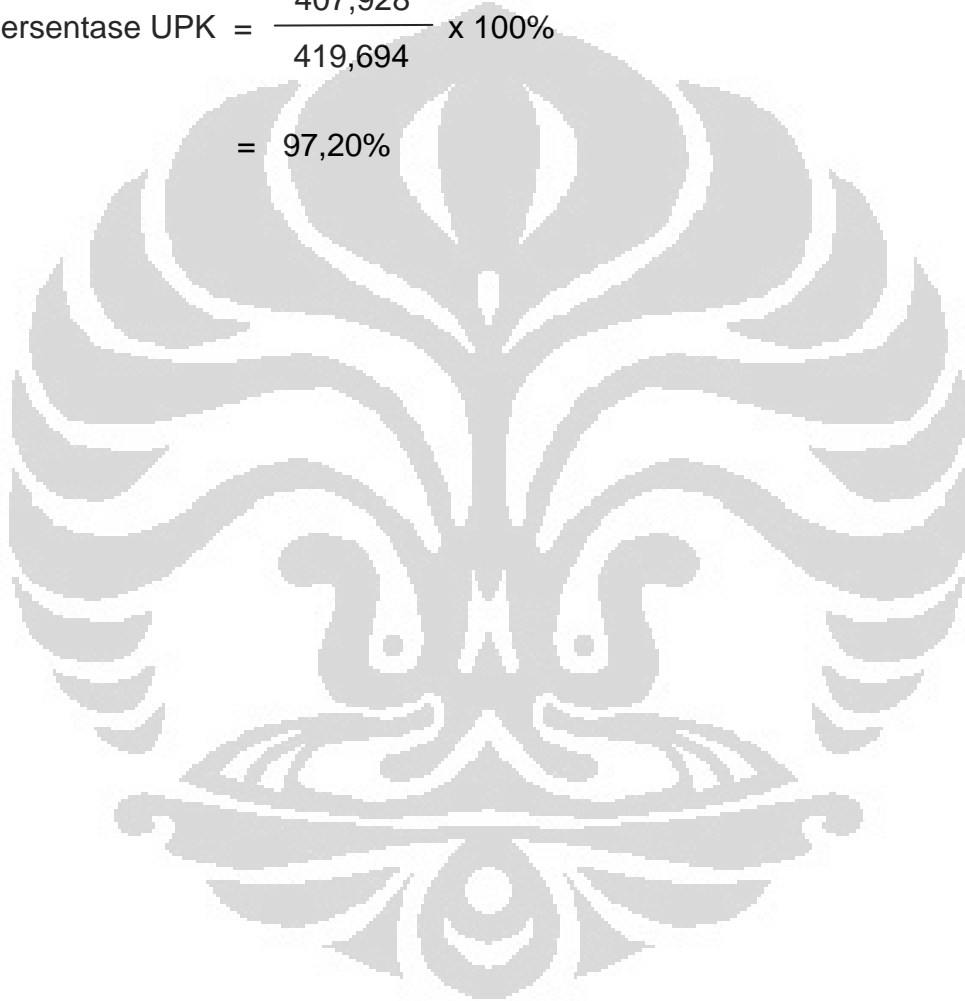
Contoh:

$$\begin{aligned} \text{DHA yang ditambahkan} &= 9220 \mu\text{g/mL} \times 22,76\% \times 0,2 \text{ mL} \\ &= 419,694 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Luas puncak yang didapat = 29299

$$\begin{aligned}\text{DHA yang diperoleh} &= \frac{29299 + 356,1393772}{67,12064247} \times \frac{292,2}{160,2} \times (0,1602 + 0,346) \\ &= 407,928 \mu\text{g}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Persentase UPK} &= \frac{407,928}{419,694} \times 100\% \\ &= 97,20\%\end{aligned}$$



Lampiran 7

Cara perhitungan kadar DHA dalam sampel

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Luas puncak} + 356,1393772}{67,12064247} \mu\text{g/g}$$

$$\text{Kadar} = \text{Konsentrasi } (\mu\text{g/g}) \times \frac{W_t}{W_e} \times \text{berat fase atas} \div \frac{\text{Berat sampel (g)} \times 1000}{100 \text{ g}}$$

Keterangan :

Berat fase atas = berat ekstrak yang dimetilasi + berat 0,40 ml toluen (g) (BJ

toluen = 0,865 g/ml)

W_t = berat ekstrak total (mg)

W_e = berat ekstrak yang dimetilasi (mg)

Contoh:

Luas puncak yang didapat = 46642

$$\text{Konsentrasi} = \frac{46642 + 356,1393772}{67,12064247}$$

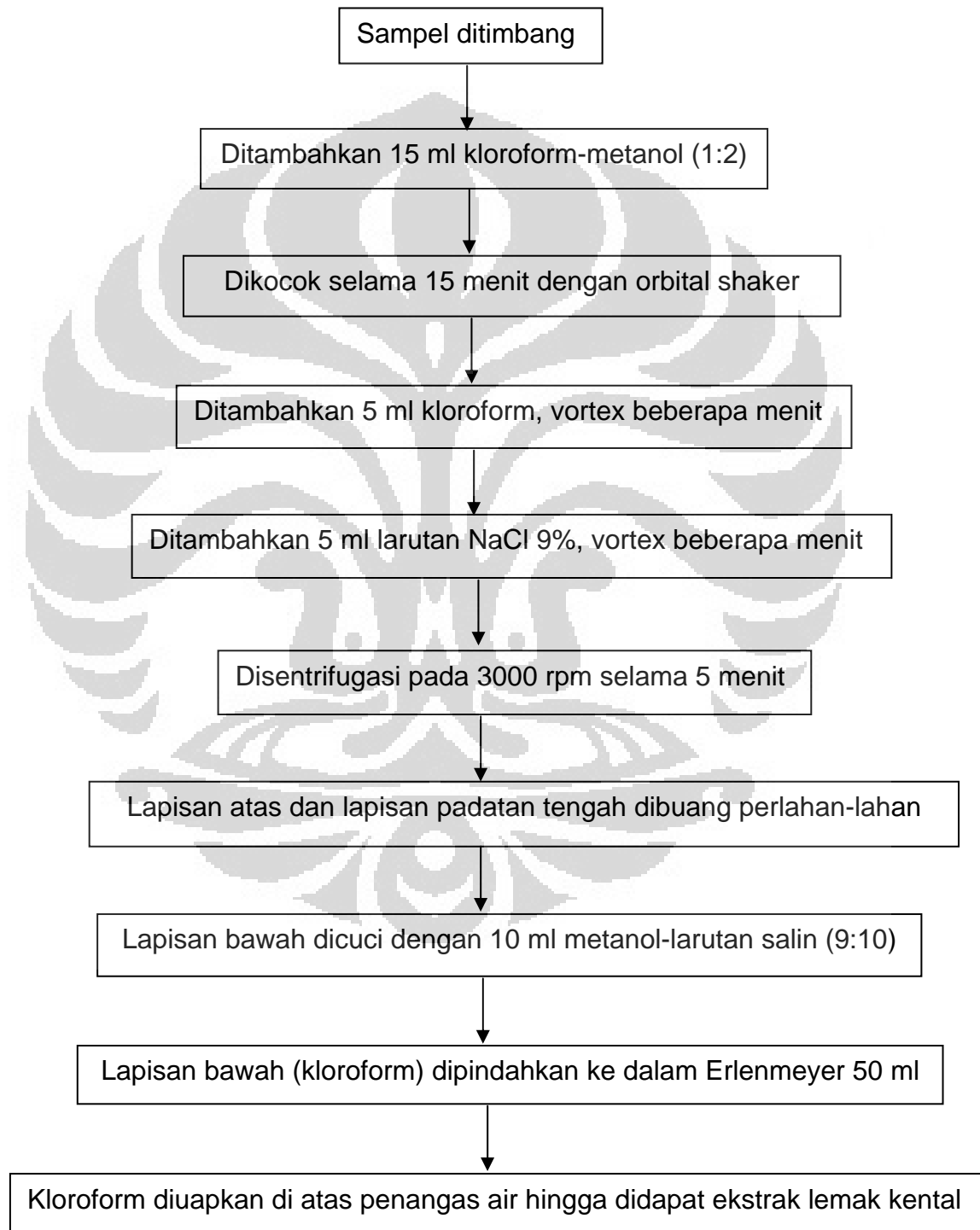
$$= 689,592 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Kadar} = 689,592 \times \frac{371,2}{302,1} \times (0,3021 + 0,346) \div \frac{2 \times 1000}{100 \text{ g}}$$

$$= 27,46 \text{ mg/100g}$$

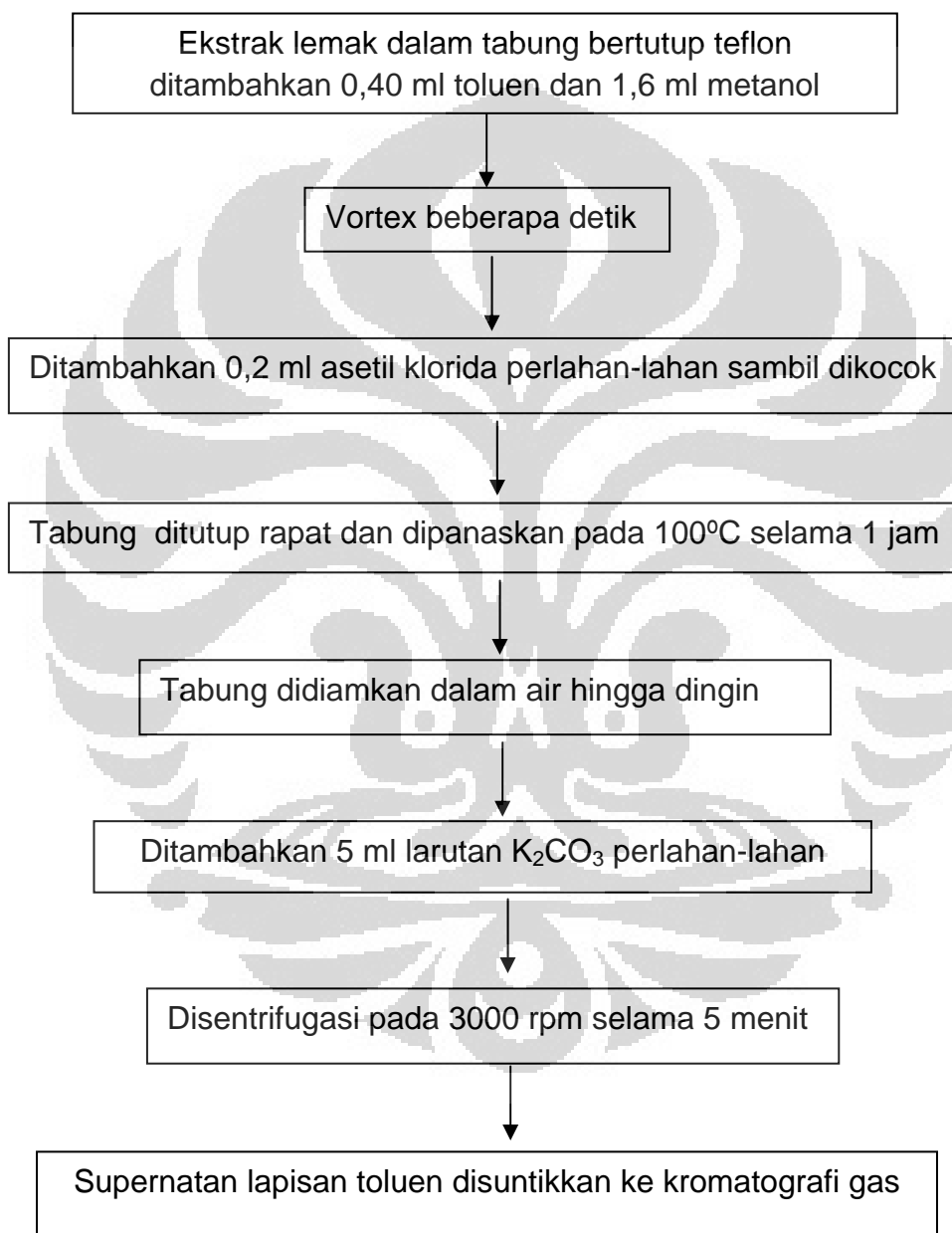
Lampiran 8

Skema kerja ekstraksi sampel



Lampiran 9

Skema kerja esterifikasi lemak



Lampiran 10

Sertifikat analisis standar DHA



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 11

Sertifikat DHA oil

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Feb. 19, 2007

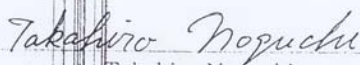

タマ生化学株式会社
 TAMA BIOCHEMICAL CO., LTD.
 1-23-3, Nishishinjuku, Shinjuku-ku,
 Tokyo, 163-0023, Japan

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 ISPHARA Plant