

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. BAHAN

1. Standar DHA murni (Sigma-Aldrich)
2. Standar DHA oil (Tama Biochemical Co., Ltd.)
3. Bahan baku dengan mutu pro analisis yang berasal dari Merck (kloroform, metanol, toluen, heksan, etanol, dietil eter, petroleum eter, asetil klorida)
4. Aquadest
5. Gas Nitrogen HP (High Purity)
6. Sampel Produk Telur yang Diperkaya Omega-3 (tiga merek berbeda)
7. Larutan NaCl 5% dan 9% (5 g dalam 100 mL aquadest dan 9 g dalam 100 mL aquadest)
8. K_2CO_3 6% (6 g dalam 100 mL aquadest)
9. Larutan H_2SO_4 pekat
10. Larutan $NaHCO_3$ 2% (2 g dalam 100 mL aquadest)
11. Serbuk Na_2SO_4 anhidrat
12. KOH 10 N (56,1 g dalam 100 mL aquadest)
13. HCl 1,5 N (25 mL HCl 12 N dalam 200 mL aquadest)

B. ALAT

1. Kromatografi gas Shimadzu GC-17A yang dilengkapi dengan Detektor Ionisasi Nyala, *capillary column* dengan panjang 60 meter, 0,32 mm id, *film thickness* 0,25 μm , dengan fase diam VB-Wax, gas pembawa helium
2. *Data processor Class GC solution*
3. *Mycrosyringe* berukuran 10 μL
4. Neraca analitik, alat penguap dengan gas nitrogen, tabung reaksi tahan panas bertutup teflon, vortex, oven, sentrifugator, alat-alat ekstraksi dan alat-alat gelas yang umum digunakan dalam analisa kuantitatif

C. CARA KERJA

1. Optimasi esterifikasi DHA

Dilakukan optimasi dari dua metode esterifikasi DHA yakni prosedur Lepage dan Merck, kemudian dibandingkan luas puncak DHA yang diperoleh. Metode esterifikasi DHA optimum yakni yang memberikan luas puncak DHA terbesar, cara kerja lebih mudah dan waktu pengerjaan lebih singkat.

a. Esterifikasi Lepage (41)

Ditimbang seksama kurang lebih 182 mg standar DHA (oil), dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan dilarutkan dengan heksan sampai batas. Diperoleh larutan standar DHA (oil) dengan konsentrasi

DHA 10000 ppm (asumsi kadar DHA oil seperti tertera di sertifikat analisis yakni 27,5%). Dari larutan induk di atas dipipet 0,4 mL ke dalam tabung reaksi bertutup teflon, kemudian dikeringkan dengan gas N₂. Selanjutnya dilakukan esterifikasi sehingga diperoleh DHA termetilasi dengan kadar akhir DHA setara dengan 10000 ppm. Larutan yang telah dikeringkan dengan gas N₂ ditambahkan 2 mL metanol-toluen (4:1 v/v), vortex. Kemudian tambahkan 0,2 mL asetil klorida perlahan-lahan ke dalam tabung reaksi sambil divortex. Tabung ditutup rapat kemudian dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Dinginkan tabung dalam air, tambahkan 5 mL K₂CO₃ 6% perlahan-lahan, vortex. Tabung ditutup rapat lalu disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 1,0 µL lapisan atas toluen siap disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas.

Kondisi kromatografi gas yang digunakan yakni dengan suhu terprogram, suhu awal kolom 120°C, kenaikan suhu 2°C/menit sampai 230°C (ditahan 20 menit) dan laju alir gas pembawa (He) 1,35 mL/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C dan 250°C.

b. Esterifikasi Merck (42)

Ditimbang seksama kurang lebih 364 mg standar DHA (oil) dalam erlenmeyer, kemudian tambahkan 40 mL reagen pemetilasi metanol-toluen-asam sulfat pekat (20:10:1). Reflux selama 2,5 jam pada suhu 75°-80°C diatas penangas air. Setelah dingin tambahkan 40 mL larutan NaCl 5% b/v dan 50 mL heksan. Larutan dipindahkan secara kuantitatif ke

dalam corong pisah, kocok kuat, diamkan dan keluarkan lapisan air. Tambahkan 5 mL larutan NaHCO_3 2% b/v, kocok, diamkan dan keluarkan lapisan air. Untuk menyerap air yang masih tersisa, tambahkan 5 g Na_2SO_4 anhidrat, kocok dan biarkan mengendap. Cairan supernatan dipindahkan ke dalam tabung reaksi lalu diuapkan sampai kering menggunakan gas N_2 . Setelah dingin, residunya dilarutkan dengan 10 mL heksan, diperoleh larutan standar DHA (oil) dengan konsentrasi DHA 10000 ppm (asumsi kadar DHA oil seperti tertera di sertifikat analisis yakni 27,5%). Sebanyak 1,0 μL larutan disuntikkan ke dalam kromatografi gas.

Kondisi kromatografi gas yang digunakan yakni dengan suhu terprogram, suhu awal kolom 120°C , kenaikan suhu $2^\circ\text{C}/\text{menit}$ sampai 230°C (ditahan 20 menit) dan laju alir gas pembawa (He) 1,35 mL/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C dan 250°C .

2. Pencarian kondisi analisis optimum DHA murni

a. Penyiapan larutan standar DHA murni

Ditimbang seksama kurang lebih 25 mg standar DHA murni, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan heksan sampai batas. Diperoleh larutan standar DHA murni dengan konsentrasi 2500 ppm. Selanjutnya dapat dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

Larutan standar DHA murni yang akan digunakan untuk optimasi diesterifikasi terlebih dahulu dengan metode esterifikasi DHA yang telah

dioptimasi sebelumnya (dipilih salah satu prosedur eterifikasi, yakni prosedur Lepage atau prosedur Merck), hingga didapatkan DHA murni termetilasi 1250 ppm (0,2 mL larutan terlarut dalam 0,4 mL toluen).

b. Pencarian kondisi analisis optimum DHA murni

Sebanyak 1,0 μ L larutan DHA murni termetilasi 1250 ppm di atas disuntikkan pada kromatografi gas. Parameter yang diubah adalah suhu awal kolom dan laju alir gas pembawa. Elusi dilakukan dengan 2 cara yakni dengan suhu terprogram dan suhu tetap/ isothermal.

Elusi dengan suhu terprogram dilakukan dengan variasi suhu awal kolom yaitu 120°C, 130°C dan 140°C. Dielusi dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai mencapai suhu 230°C dan dipertahankan selama 20 menit. Elusi dilakukan dengan variasi laju alir gas pembawa 1,35; 1,8 dan 2 mL/menit. Elusi dengan suhu tetap/ isothermal dilakukan pada suhu kolom tetap 200°C dan laju alir gas pembawa 1,35 mL/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C dan 250°C. Masing-masing kondisi dicatat waktu retensinya dan dihitung jumlah lempeng teoritisnya (N). Kondisi yang terpilih adalah kondisi yang mempunyai harga plat teoritis (N) tinggi dan HETP kecil.

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

a. Pembuatan kurva kalibrasi standar DHA murni

Dari larutan induk standar DHA murni 2500 ppm diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum hingga didapatkan DHA murni termetilasi dengan 6 titik konsentrasi berbeda yakni 312,5; 625; 1250; 1875; 2500 dan 3125 ppm. Sebanyak 1,0 μ L larutan disuntikkan pada kromatografi gas menggunakan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak DHA murni dicatat dan diolah secara statistik sehingga diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya.

b. Penetapan kadar DHA dalam DHA (oil)

Ditimbang seksama kurang lebih 250 mg standar DHA (oil) dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan volumenya dengan heksan sampai batas. Diperoleh larutan standar DHA (oil) dengan konsentrasi 10000 ppm. Pipet 0,3 mL larutan standar DHA (oil) 10000 ppm sebanyak tiga kali untuk diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum, hingga didapat konsentrasi larutan DHA (oil) termetilasi 7500 ppm (0,3 mL terlarut dalam 0,4 mL toluen). Sebanyak 1,0 μ L larutan disuntikkan pada kromatografi gas menggunakan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak DHA (oil) dicatat. Kadar DHA dalam DHA (oil) didapatkan dengan memplot luas puncak DHA berdasarkan persamaan regresi linier standar DHA murni.

4. Validasi metode analisis DHA (oil)

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

Digunakan larutan standar DHA (oil) 10000 ppm dengan konsentrasi DHA 2750 ppm (asumsi kadar DHA seperti tertera di sertifikat analisis yakni 27,5%). Kemudian diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum hingga didapatkan DHA (oil) termetilasi dengan 6 titik konsentrasi DHA berbeda yakni 340, 690, 2060, 2750, 3430 dan 4125 ppm. Sebanyak 1,0 μ L larutan disuntikkan pada kromatografi gas menggunakan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak DHA dicatat dan diolah secara statistik sehingga diperoleh persamaan regresi linier dan koefisien korelasinya.

b. Uji presisi DHA

Digunakan larutan standar DHA (oil) 10000 ppm dengan konsentrasi DHA 2750 ppm (asumsi kadar DHA seperti tertera di sertifikat analisis yakni 27,5%). Pipet 0,1 mL, 0,3 mL dan 0,6 mL larutan standar DHA (oil) 10000 ppm sebanyak enam kali untuk diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA optimum, hingga didapat konsentrasi larutan DHA (oil) termetilasi dengan 3 konsentrasi DHA yang berbeda (rendah, sedang dan tinggi) yakni 690, 2060 dan 4125 ppm (0,1 mL, 0,3 mL dan 0,6 mL larutan terlarut dalam 0,4 mL toluen).

Sebanyak 1,0 μ L larutan dari masing-masing konsentrasi tersebut disuntikkan pada kromatografi gas dan dianalisis dengan menggunakan

kondisi analisis optimum terpilih dan diulang sebanyak enam kali pengukuran untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) 2% atau kurang.

c. Uji perolehan kembali DHA

Dilakukan uji perolehan kembali dengan metode adisi. Digunakan 5 butir telur biasa yang dipisahkan kuning telurnya dan dikocok homogen. Pisahkan menjadi dua bagian, yakni untuk pemeriksaan kadar DHA dalam telur blanko dan telur dengan penambahan standar DHA sebanyak 0,5237% (konsentrasi ini dipilih berdasarkan salah satu sampel telur omega-3 yang diperiksa sebelumnya). Kemudian dilakukan ekstraksi lemak dari telur, penyabunan, pembebasan asam lemak dan esterifikasi seperti pada penetapan kadar DHA dalam sampel. Sebanyak 1,0 μ L dari masing-masing larutan disuntikkan pada alat kromatografi gas dengan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak DHA dicatat, kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali DHA.

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

Batas deteksi dan batas kuantitasi DHA ditentukan dengan metode perhitungan statistik, melalui persamaan regresi linier berdasarkan kurva kalibrasi standar DHA (oil) yang telah dibuat sebelumnya.

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

a. Ekstraksi lipid (43)

Sebanyak tiga buah telur dipisahkan kuningnya dan dihomogenkan. Timbang 10-15 gram kuning telur ke dalam erlenmeyer, tambahkan 40 mL larutan *Folch 1* (kloroform-metanol 2:1 v/v) (26), kocok dengan alat shaker selama 15 menit dengan kecepatan 200 rpm sampai tercampur. Fraksi protein akan terpisah dan ekstraknya disaring dengan kertas saring, tampung di corong pemisah. Cuci erlenmeyer dan kertas saring dengan 10 mL kloroform-metanol 2:1 v/v. Tambahkan NaCl 9% 10 mL, kocok kuat dan biarkan memisah. Akan diperoleh lapisan atas yang terdiri dari air, metanol, garam dan lapisan bawah yang terdiri dari kloroform. Lapisan atas dibuang dan lapisan bawah yang terdiri dari kloroform mengandung lemak. Cuci permukaan yang tertinggal (permukaan kloroform) dengan kloroform-metanol-NaCl 9% (3:47:48 v/v) untuk menghilangkan sisa air. Lapisan kloroform yang mengandung lemak kemudian diuapkan.

b. Penyabunan (43)

Hasil ekstraksi lemak ditambahkan 20 mL etanol-dietil eter (3 :1 v/v) dan 0,2 mL KOH 10 N, reflux 1 jam untuk menyempurnakan reaksi. Dinginkan dan tambahkan \pm 10 mL air sehingga diperoleh larutan sabun yang mengandung etanol dalam air. Tambahkan 25 mL petroleum eter (30°-60°C) dalam corong pemisah sambil dikocok kuat dan biarkan

memisah. Akan diperoleh lapisan atas yang terdiri dari petroleum eter dan sterol kolesterol serta bagian bawah yang terdiri dari alkohol, air dengan garam kalium dari asam lemak. Cuci bagian bawah dengan 10 mL petroleum eter lalu dipisahkan. Petroleum eter yang mengandung sterol kolesterol untuk analisa kolesterol. Lapisan bawah yang mengandung garam kalium dari asam lemak untuk analisa lemak.

c. Pembebasan asam lemak (43)

Lapisan bawah yang mengandung garam kalium dari asam lemak di atas ditambahkan 3 mL HCl 1,5 N dan 25 mL petroleum eter, kocok kuat dan biarkan memisah. Akan diperoleh lapisan atas yang terdiri dari petroleum eter yang mengandung asam lemak. Lalu lapisan bawah dicuci dengan 10 mL petroleum eter lalu dipisahkan. Lapisan petroleum eter dikeringkan, diperoleh ekstrak asam lemak.

d. Esterifikasi

Ekstrak asam lemak diesterifikasi dengan metode esterifikasi DHA yang telah dioptimasi sebelumnya (dipilih salah satu prosedur esterifikasi, yakni prosedur Lepage atau prosedur Merck). Sebanyak 1,0 μ L larutan disuntikkan pada kromatografi gas dengan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak DHA dicatat dan dihitung kadarnya menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi DHA (oil).