



LAPORAN PENELITIAN DASAR  
TAHUN ANGGARAN 2004

LP 15/06  
Dar  
P

# PENENTUAN KADAR ASAM LEMAK OMEGA-3 DALAM BAHAN MAKANAN RAKYAT

Peneliti:

Dra. Asri Darmawati, MS.  
Dr. rer.nat. M. Yoewono, MS., Apt.

## LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Penelitian Pengembangan Ilmu Pengetahuan Terapan  
DIP Nomor : 002/XXIII/1/--/2004 Tanggal 1 Januari 2004  
Kontrak Nomor : 73/P2IPT/DPPM/PID/III/2004  
Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas  
Nomor Urut : 10.

001506141

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

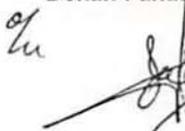
Nopember, 2004

Judul :

**PENENTUAN KADAR ASAM LEMAK OMEGA-3  
DALAM BAHAN MAKANAN RAKYAT**

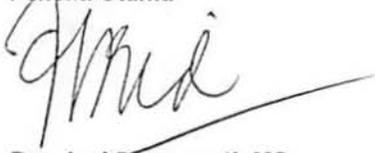
A. Ketua Peneliti :

Nama	Dra. Asri Darmawati, MS
Jenis kelamin	Perempuan
Pangkat/golongan	Penata Tk I/III d
NIP	131474956
Jabatan	Lektor
Jurusan/Fakultas/Pusat penelitian	Fakultas Farmasi
Perguruan tinggi	Universitas Airlangga
Alamat kantor : telepon/Fax/e-mail	Jl. Darmawangsa dalam 031 5033710 Fax. 031 5020514 farmasi@unair.ac.id.
Alamat rumah/telepon	Jl. Darmawangsa dalam selatan 2b Tilp. 031 5025252
Jangka waktu penelitian	10 bulan
Biaya yang diusulkan	Rp.20.000.000,-
Disetujui :	
Jangka waktu penelitian	6 bulan
Biaya penelitian	Rp 15.000.000,-

Mengetahui  
Dekan Fakultas Farmasi



Prof. Dr. Noor Cholies Zani  
NIP. 130355372

Peneliti Utama



Dra. Asri Darmawati, MS  
NIP. 131474956

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga




Prof. Dr. Sarmanu, MS  
NIP. 130701125

## RINGKASAN

## PENENTUAN KADAR ASAM LEMAK OMEGA-3 DALAM BAHAN MAKANAN RAKYAT

Oleh

Asri Darmawati\*, Mochammad Yuwono\*

Tahun 2004, 36 halaman

Asam lemak omega-3, terutama Asam Linolenat (LNA, C18:3  $\omega$ -3), Asam Eikosa-pentaenoat (EPA, C20:5  $\omega$ -3) dan Asam Dokosaheksaenoate (DHA, C22:6  $\omega$ -3), merupakan asam lemak yang penting bagi manusia (Hui, 1992). Senyawa tersebut berperan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan sel (khususnya sel otak manusia), dapat mencegah penyakit jantung koroner karena pengaruhnya pada pembuluh darah (EPA diketahui merupakan prekursor pembentukan prostaglandin-3 dan thromboxan-2) dan gangguan kardiovaskuler yang lain (Hui, 1992).

Sumber utama asam lemak omega-3, khususnya EPA dan DHA, adalah minyak ikan, terutama ikan yang berasal dari laut dalam, seperti *Tuna*, *Salmon* dan *Herring* (Hui, 1992).

Mengingat masyarakat, khususnya di Jatim tidak biasa mengkonsumsi jenis ikan tersebut di atas, maka perlu dilakukan upaya untuk mengetahui sumber EPA, DHA maupun LNA dalam bahan makanan yang sudah dikenal mayoritas masyarakat tersebut. Untuk itu akan dilakukan penelitian tentang kandungan LNA, EPA dan DHA dalam bahan makanan yang dikenal rakyat Jatim yaitu Kupang Putih (*Corbula faba* Hinds), Kupang Merah (*Musculitis senhausia* Bens) dan Remis (*Corbicula javanica* Mousson).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengetahui validitas metode kromatografi gas yang digunakan untuk penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam Kupang Putih, Kupang Merah dan Remis serta mengetahui kadar LNA, EPA dan DHA dalam sampel tersebut.

Sampel Kupang Putih dan Kupang Merah diperoleh dari pengepul di desa Balongdowo, Kecamatan Candi, Kabupaten Sidoarjo pada bulan Juli 2004 dalam bentuk kupang yang belum dipisahkan daging dari cangkangnya. Sedangkan Remis diperoleh dari pengepul di desa Wonokarang, Kecamatan Balung Bendo, Sidoarjo pada bulan Agustus 2004 dalam bentuk daging yang sudah terpisah dari cangkangnya. Sampel daging tersebut setelah dibersihkan, ditiriskan, lalu dihaluskan dengan blender.

Ekstraksi lemak dari sampel daging basah (kadar air ditentukan) dilakukan dengan *soxhlet* menggunakan penyari petroleum eter (PE) selama 6 jam. Setelah ekstrak dalam PE

dibebaskan dari air dengan menambahkan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kering, selanjutnya diuapkan dalam lemari asam sampai hampir kering. Residu dihidrolisis dengan Na metanolat dan diesterkan dengan katalisator  $\text{BF}_3$  (dalam metanol). Metil ester asam lemak yang terbentuk diekstraksi dengan heptana untuk disuntikkan dalam Kromatograf gas (KG).

Uji kualitatif metil ester LNA, EPA, DHA dilakukan berdasarkan waktu retensi, dibandingkan dengan senyawa baku LNA, EPA dan DHA, *spiking* dengan senyawa baku tersebut dan dikonfirmasi dengan GC-MSD. Validasi metode penentuan kadar LNA, EPA, DHA yang dilakukan meliputi selektifitas, linieritas, presisi dan akurasi.

Hasil optimasi kondisi KG dengan kolom HP-5 untuk analisis sampel ini adalah sebagai berikut : suhu *inlet*  $250^\circ\text{C}$ , suhu detektor  $300^\circ\text{C}$ , suhu oven terprogram :  $180^\circ\text{C}$  1 menit, naik  $1^\circ\text{C}/\text{menit}$  sampai  $200^\circ\text{C}$  1 menit, naik  $10^\circ\text{C}/\text{menit}$  sampai  $280^\circ\text{C}$  3 menit (total waktu sekali suntik adalah 33 menit , laju Helium 1,1 ml/menit, *split* 1:10).

Dengan menggunakan kondisi optimum instrumen tersebut di atas, diperoleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa proses ekstraksi lemak sampel dengan PE belum baik, terlihat dari akurasi dan presisi metode yang tidak memuaskan, yaitu LNA ( $102,8 \pm 16,57\%$ ), EPA ( $29,01 \pm 14,37\%$ ), DHA ( $135,1 \pm 8,17\%$ ). Sedangkan presisi proses derivatisasi (esterifikasi) LNA, EPA, DHA baku dan ekstraksi metil esternya memenuhi persyaratan (yaitu  $\text{KV} < 10\%$ ).

Dengan kondisi tersebut di atas disimpulkan bahwa Kupang Putih, Kupang Merah maupun Remis mengandung LNA, EPA dan DHA dengan kadar minimal sebagai berikut :

Sampel (kadar air)	Kadar dalam satuan mg/100g daging basah		
	LNA	EPA	DHA
Kupang Merah (83,82%)	$8,97 \pm 1,13$	$2,77 \pm 0,21$	$3,65 \pm 0,42$
Kupang Putih (81,65%)	$12,31 \pm 0,90$	$6,52 \pm 2,86$	$6,61 \pm 2,92$
Remis (70,33%)	$34,84 \pm 6,77$	$5,64 \pm 1,03$	$7,35 \pm 1,48$

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk tidak menggunakan cara ekstraksi lemak langsung dengan petroleum eter, karena rekoverynya akan rendah. Mengingat kadar lemaknya yang relatif kecil dan kadar airnya besar maka disarankan untuk mengeringkan sampel sebelum proses ekstraksi menggunakan pengeringan tanpa pemanasan ( misalnya *freeze drying*).

\* Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas, Kontrak Nomor : 73/P21PT/DPPM/PID/III/2004

## KATA PENGANTAR

Dengan rahmat Allah SWT, kami dapat menyelesaikan penelitian kami yang berjudul *Penentuan Kadar Asam Lemak Omega-3 dalam Bahan Makanan Rakyat*.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar asam lemak Omega 3, khususnya LNA, EPA dan DHA, dalam bahan makanan yang biasa dikonsumsi rakyat, khususnya Jawa Timur. Bahan makanan tersebut adalah Kupang Putih (*Corbula faba* Hinds), Kupang Merah (*Musculitas senhausia* Bens) dan Remis (*Corbicula javanica* Mousson). Dalam penentuan kadar LNA, EPA dan DHA ini juga dilakukan validasi terhadap metode kromatografi gas yang digunakan.

Hasil penelitian ini diharapkan merupakan informasi tentang validitas metode analisis untuk penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam Kupang Putih, Kupang Merah dan Remis beserta prosentase kadar LNA, EPA dan DHA dalam sampel tersebut. Informasi tentang kadar LNA, EPA dan DHA dalam sampel tersebut diharapkan dapat meningkatkan nilai jualnya.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terimakasih kepada yang terhormat :

- Ketua Lembaga Penelitian Unair, yang telah mempercayai kami menggunakan dana DIP (DP3M) 2003/2004 untuk penelitian ini.
- Dekan Fakultas Farmasi Unair yang telah memberikan kesempatan untuk menggunakan semua fasilitas di Laboratorium Multiguna I (MM I) untuk keperluan penelitian ini.
- Kepala Laboratorium Forensik POLDA Jatim yang memberikan kesempatan kepada kami untuk menggunakan fasilitas GC-MSD.
- Semua pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat selesai.

Semoga Allah SWT. membalas kebaikan bapak, ibu sekalian dan semoga pula penelitian ini berguna bagi masyarakat pada umumnya dan kalangan yang punya perhatian pada kesehatan pada khususnya.

Surabaya, Desember 2004

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	iii
RINGKASAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
I. PENDAHULUAN .....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	16
IV. METODE PENELITIAN .....	17
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	23
VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	34
DAFTAR PUSTAKA .....	36
LAMPIRAN .....	37

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar II.1. Triglicerida dan Fosfolipida	4
Gambar II.2. Asam $\alpha$ linolenat (LNA)	4
Gambar II.3. Asam Eikosapentaenoat (EPA)	5
Gambar II.4. Asam Dokosaheksaenoat (DHA)	5
Gambar II.5. Cara pengukuran lebar puncak	8
Gambar II.6. Kupang Putih ( <i>Corbula faba</i> Hinds)	13
Gambar II.7. Kupang Merah ( <i>Musculitas senhausia</i> Bens)	13
Gambar II.8. Remis ( <i>corbicula lavanica</i> Mousson 1849)	14
Gambar IV.1. Ekstraksi lemak dari Sampel	22
Gambar V.1. Kromatogram hasil esterifikasi baku LNA, EPA, DHA	23
Gambar V.2. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Kupang Putih	24
Gambar V.3. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Kupang Merah	24
Gambar V.4. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Kupang Merah yang diadisi dengan baku LNA, EPA dan DHA	25
Gambar V.5. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Remis	26
Gambar VII.1. Kromatogram baku LNA, EPA, DHA, TME menggunakan GC-MSD	38
Gambar VII.2. Spektrogram baku DHA menggunakan GC-MSD	38
Gambar VII.3. Spektrogram baku LNA menggunakan GC-MSD	39
Gambar VII.4. Spektrogram baku EPA menggunakan GC-MSD	39
Gambar VII.5. Kromatogram ester asam Lemak dalam Kupang Merah (menggunakan GC-MSD)	40
Gambar VII.6. Spektrogram DHA sampel yang berasal dari Kupang Merah menggunakan GC-MSD	40

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
<b>LAMPIRAN 1</b> Contoh Perhitungan Linieritas	37
<b>LAMPIRAN 2</b> Hasil Analisis Kualitatif LNA, EPA, DHA menggunakan GC-MSD	38
<b>LAMPIRAN 3</b> Repeatabilitas dan Reproducibilitas Instrumen	42
<b>LAMPIRAN 4</b> Presisi dan Akurasi Proses Ekstraksi TME dan AME	43
<b>LAMPIRAN 5</b> Contoh Cara Perhitungan Rekoveri	44

## DAFTAR TABEL

		<b>Halaman</b>
Tabel V.1.	Hasil optimasi kondisi analisis LNA, EPA, DHA dengan KG	26
Tabel V.2.	Uji linieritas hasil esterifikasi LNA, EPA, DHA baku	27
Tabel V.3.	Presisi proses esterifikasi LNA, EPA, DHA baku dan ekstraksi hasil esterifikasi	29
Tabel V.4.	Akurasi dan presisi metode penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam Sampel	30
Tabel V.5.	Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam Kupang Merah	31
Tabel V.6.	Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam Kupang Putih	32
Tabel V.7.	Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam Remis	32
Tabel V.8.	Resume penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam sampel Kupang Merah, Kupang Putih dan Remis	33

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### I.1. Latar Belakang Penelitian

Sudah lama diketahui bahwa protein berperan besar dalam proses pertumbuhan dan perkembangan sel, khususnya sel otak manusia. Baru mulai tahun 1981, diyakini orang bahwa lemak dan beberapa asam lemak esensial, misalnya asam linoleat (*Linoleic acid* = LA, C:18:2  $\omega$ -6) dan asam linolenat (*Linolenic acid* = LNA, C18:3  $\omega$ -3) maupun hasil metabolismenya yang berantai lebih panjang yaitu asam eikosapentaenoat (*Eicosa pentaenoic acid* = EPA, C20:5  $\omega$ -3) dan asam dokosaheksaenoat (*Docosahexaenoic acid* = DHA, C22:6  $\omega$ -3), mempunyai peran lebih awal dan sama penting dengan protein. LA maupun LNA tersebut di atas merupakan asam lemak esensial, karena manusia tidak dapat mensintesa sendiri dari tubuhnya (Hui, 1992).

Komposisi lemak yang dikonsumsi manusia/mamalia mempengaruhi komposisi lemak yang terakumulasi dalam jaringan lemak (Linder, 1992). Oleh karena itu makanan yang banyak mengandung asam lemak tertentu akan meningkatkan jumlah asam lemak tersebut dalam tubuh. Orang dewasa (Amerika) memerlukan asam lemak esensial (1-2) % dari kalori yang dibutuhkan (40% lemak makanan).

LNA ditemukan dalam minyak sayur, misalnya minyak biji rami (*linseed oil*), Canola (*rapeseed oil*), minyak kenari maupun minyak kedelai (Hui, 1992). LNA juga terdapat dalam kloroplas tanaman berdaun hijau misalnya, krokot (*Purslane*) mengandung 4,05 mg LNA dan 0,89 mg LA dalam setiap gram berat basah. Sedangkan EPA dan DHA banyak terdapat dalam ikan laut (terutama yang berasal dari laut dalam) misalnya ikan Tuna *Albacore* (mengandung 0,3 % EPA dan 1 % DHA), ikan Salmon *chinook* (mengandung 0,8 % EPA, 0,6 % DHA) dan ganggang laut (Hui, 1992 dan Linder, 1992).

Mengingat mayoritas penduduk Indonesia tidak biasa mengonsumsi jenis ikan tersebut di atas, maka perlu dilakukan upaya untuk mencari/mengetahui sumber EPA, DHA maupun LNA dalam bahan makanan yang sudah biasa dikonsumsi (dikenal) mayoritas masyarakat Indonesia. Hal ini perlu dilakukan karena merubah selera makanan seseorang adalah sulit, padahal di sisi lain pemenuhan suplemen asam lemak ini diperlukan, khususnya bagi janin (melalui ibunya) dan balita yang sedang dalam proses pertumbuhan dan

pengembangan fungsi sel-sel otaknya. Kondisi ini sudah mulai direspon sebagai peluang oleh produsen bahan makanan dengan menambahkan senyawa tersebut ke dalam produknya, seperti susu formula untuk bayi atau sediaan farmasi tertentu (berbentuk kapsul), yang sepuluh tahun yang lalu belum pernah dilakukan (Hui, 1992). Dengan mengetahui bahan makanan yang kaya LNA, EPA dan DHA maka dapat disarankan suatu pola atau komposisi makanan, bagi khususnya balita agar pertumbuhan dan perkembangan sel otaknya maksimal.

Suatu bahan makanan khas yang disukai rakyat di sekitar pantai Surabaya-Sidoarjo yang mulai tidak populer adalah kupang dan remis. Oleh karena itu pada penelitian ini akan ditentukan kadar LNA, EPA, DHA dalam daging remis (*Corbicula javanica* Mousson), kupang putih (*Corbula faba* Hinds) dan kupang merah (*Musculitis senhausia* Bens). Sehingga bila kandungan asam lemak omega-3 dalam kerang tersebut signifikan akan mengangkat kepopulerannya kembali dan memperluas budi dayanya.

Dalam penelitian sebelumnya diketahui kadar protein total dalam *Corbicula javanica* adalah  $(12,56 \pm 0,76)\%$  (berat basah), sedang kadar lemaknya adalah  $(25,41 \pm 0,40)\%$  dengan bilangan iodium yang cukup tinggi (yang menunjukkan adanya asam lemak tidak jenuh) yaitu sebesar  $88,30 \pm 0,06$ . Dari analisis kualitatif menggunakan kromatografi gas diperoleh 18 puncak metil ester asam lemak bebas (*fatty acid methyl ester* = FAME), meskipun belum diketahui apakah diantara puncak tersebut terdapat asam lemak omega-3 (Yuwono dkk, 2002).

Diantara beberapa asam lemak omega-3, senyawa LNA, EPA, DHA dipilih, sebagai wakil dari asam lemak  $\omega$ -3, untuk diteliti pada tahap ini karena keterbatasan waktu dan sarana yang ada disamping karena ketiga senyawa tersebut berperan penting dalam awal tumbuh-kembang manusia. Dengan alasan yang sama optimasi ekstraksi lemak yang diusulkan untuk diteliti dalam proposal yang diajukan, juga tidak dilakukan, tetapi akan dipilih satu prosedur ekstraksi dari buku standar (Cunnif P., 1995).

Metode yang digunakan untuk analisis LNA, EPA, DHA dalam penelitian ini adalah kromatografi gas, dengan instrumen yang ada di Laboratorium Multiguna (MM I) Fakultas Farmasi Unair.

Meskipun telah ada pustaka standar (Cunnif P., 1995) yang mencantumkan cara analisis asam lemak dalam kapsul minyak ikan, tetapi karena sampel yang akan dianalisis dalam penelitian ini adalah sampel segar yang memerlukan proses preparasi yang panjang sedang metode maupun instrument yang digunakan belum diketahui validitasnya untuk analisis

sampel tersebut, maka perlu dilakukan validasi terlebih dahulu sebelum digunakan untuk analisis sampel.

## **1.2. Rumusan masalah**

Permasalahan yang ingin diperoleh jawabannya dalam penelitian ini adalah :

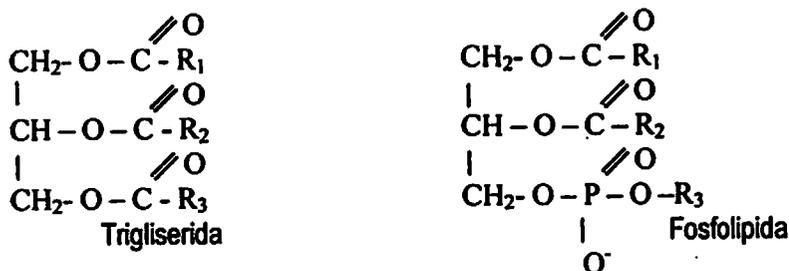
1. Bagaimana validitas metode kromatografi gas (KG) untuk penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam daging Kupang Putih, Kupang Merah maupun Remis .
2. Berapa kadar LNA, EPA dan DHA dalam daging Kupang Putih, Kupang Merah dan Remis .

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1. Asam Lemak Omega-3

LNA, EPA maupun DHA termasuk asam lemak tak jenuh ganda (*Polyunsaturated fatty acids* = *PUFAs*,) dengan ikatan rangkap yang pertama terletak pada atom C ke 3 dari gugus metil terakhir ( $\omega$ ) molekul asam lemak. Di alam, asam lemak ini umumnya terdapat sebagai isomer *cis* dalam ikatan trigliserida. (Fessenden, 1981)



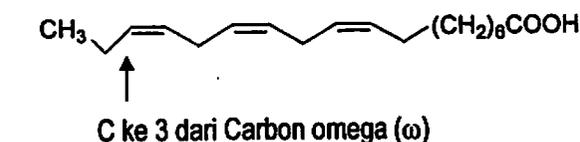
**Gambar II.1. Trigliserida dan Fosfolipida**

Secara umum asam lemak ini merupakan makro nutrien, diperlukan beberapa gram/hari. Senyawa ini mudah terurai bila terpapar cahaya, panas dan metal (anonim, *The Analyst*<sup>TM</sup>). Karena sifatnya yang sensitif ini menyebabkan proses pengolahannya harus ekstra hati-hati.

EPA merupakan prekursor prostaglandin-3 dan thromboksen-2. Ada pustaka yang menghubungkan antara diet makanan dari ikan laut yang kaya EPA (*Salmon, Herring, Tuna*) dengan penurunan kejadian penyakit jantung *ischemic* (<http://www.uni-sb.de/matfak/fb12/iaua>).

##### II.1.1. Sifat Kimia Asam Linolenat

Asam linolenat,  $\alpha$  *linolenic acid* (LNA), mempunyai rumus molekul  $C_{18}H_{30}O_2$ , mengandung 3 ikatan rangkap pada  $C_9, C_{12}$  dan  $C_{15}$ , (MR = 278,44). LNA merupakan cairan tidak berwarna, berbau khas,  $d_4^{18} 0,914$  dengan titik didih  $(230-232)^\circ C$  (O'Neil, 2001).

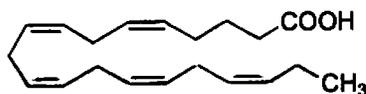


**Gambar II.2. Asam  $\alpha$  linolenat (LNA)**

LNA tidak larut air, larut dalam pelarut organik ( O'Neil, 2001). Adanya gugus karboksilat menyebabkan asam ini tidak larut dalam pelarut organik yang tidak polar, a.l. heksan.

### II.1.2. Sifat Kimia Asam Eikosapentaenoat

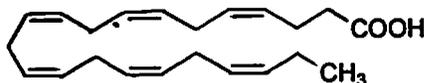
Asam Eikosapentaenoat, *all cis 5,8,11,14,17, Eicosapentaenoic acid (EPA)*, MR= 302,96, mempunyai rumus molekul  $C_{20}H_{30}O_2$ , MR 302,46, merupakan cairan tidak berwarna,  $n_D^{20} = 1,4986$ .



Gambar II.3. Asam Eikosapentaenoat (EPA)

### II.1.3. Sifat Kimia Asam Dokosaheksaenoat (DHA)

DHA mempunyai rumus molekul  $C_{22}H_{32}O_2$ , MR 328,49, merupakan cairan jernih, kuning lemah,  $n_D^{26} = 1,5017$ , dan memiliki titik leleh ( $-44,7^{\circ} - 44,5^{\circ}$ ) C. ( O'Neil, 2001)



Gambar II.4. Asam Dokosaheksaenoat (DHA)

### II.1.4. Ekstraksi Asam Lemak

Prosedur preparasi kerang sebelum diekstraksi lemaknya menurut pustaka (Cunnif P., 1995) adalah sebagai berikut . Mula-mula cangkang kerang dicuci dengan air untuk menghilangkan lumpur dan kotoran lain. Selanjutnya daging kerang dilepaskan dari cangkangnya, untuk diletakkan/diratakan di atas *skimmer* dan ditiriskan (2 menit). Setelah tiris daging kerang tersebut diblender (1-2 menit) menggunakan blender dengan kecepatan tinggi.

Cunnif.P. (1995) mencantumkan beberapa cara ekstraksi lemak (*crude fat*) antara lain

#### a. Cara hidrolisis asam

Dengan cara ini daging ikan di hidrolisis dengan HCl di atas penangas air selama 90 menit, selanjutnya diekstraksi menggunakan wadah labu *Mojonnier* dengan alkohol, eter dan terakhir dengan petroleum eter.

b. Cara *Babcock* yang dimodifikasi

Dengan pereaksi campuran sama banyak  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan (70-72)%  $\text{HClO}_4$ , menggunakan peralatan khusus (*Babcock cheese bottle*) dan pemanasan di atas penangas air, lemak dapat dipisahkan dari matrik *seafood*.

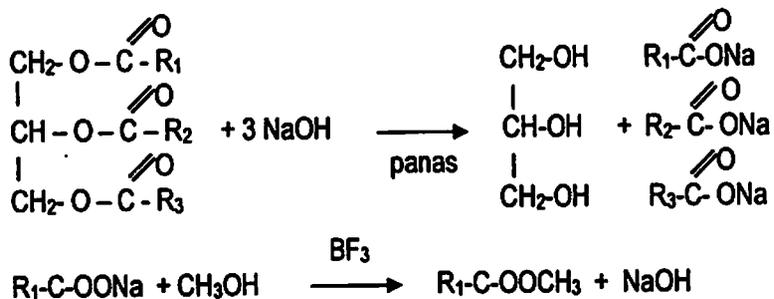
c. Cara ekstraksi selama 16 jam menggunakan aseton (untuk tepung ikan).

d. Cara semimikro, yaitu menggunakan peralatan khusus dengan  $\text{CHCl}_3$  sebagai cairan penyari (untuk tepung ikan)

e. Ekstraksi menggunakan soxhlet selama 6 jam ( $100^\circ\text{--}102^\circ\text{C}$ ) dengan petroleum eter sebagai cairan penyari (untuk daging atau cereal) (Egan H., 1988, Cunnif.P., 1995)

### II.1.5. Esterifikasi Asam Lemak

Metode yang selektif untuk penentuan kadar campuran bermacam-macam asam lemak adalah kromatografi gas (KG). Untuk dapat dianalisis menggunakan KG, asam lemak harus dibebaskan dari trigliserida-nya. Kemudian asam lemak tersebut diderivatisasi menjadi ester yang lebih mudah menguap, biasanya metil ester (*Fatty Acid Methyl Esters* = FAME).



Derivatisasi asam lemak, dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti :

a. Menggunakan  $\text{BF}_3$  sebagai katalisator

Cara ini tercantum dalam pustaka (Cunnif P., 1995) untuk esterifikasi minyak dan lemak. Cara ini tidak cocok untuk pembuatan metil ester dari asam lemak yang mempunyai gugus fungsi epoksi, hidroperoksi, aldehid dan keton karena gugus fungsi tersebut akan terdestruksi. Sebagai penyari metil ester yang terbentuk digunakan heptana, tetapi bila asam lemak yang akan diesterkan mengandung  $\text{C} \leq 20$ , maka dapat digunakan heksana.

Bila asam lemak mengandung ikatan rangkap 2 (*double bound*) lebih dari 2 maka udara dalam tabung harus diganti dengan  $\text{N}_2$ . Ester yang terbentuk harus segera diperiksa, bila terpaksa disimpan, harus dalam pendingin dan diberi  $\text{N}_2$ .

Jumlah pereaksi yang ditambahkan adalah sebagai berikut (Cunnif P.,1995). Penambahan pereaksi dilakukan melalui kondenser, karena reaksi dilakukan dalam labu alas bulat (refluks).

Sampel (mg)	Labu alas bulat (mL)	0,5 N Na metanolat (mL)	Pereaksi BF <sub>3</sub> 12,5% dalam metanol (mL)
100 – 250	50	4	5
250 – 500	50	6	7
500- 750	100	8	9
750 – 1000	100	10	12

Dengan cara ini sampel disabunkan dengan Na metanolat dalam labu alas bulat, direfluks selama 5-10 menit. Setelah ditambah dengan BF<sub>3</sub> dalam metanol dan dididihkan 1 menit, ditambahkan lagi 2-5 ml heptana melalui kondenser, dididihkan lagi 1 menit. Setelah ditambah dengan NaCl jenuh 15 ml dan dikocok, diambil lapisan heptana, dikeringkan dengan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kering. Fase heptana diencerkan 5-10% , siap disuntikkan ke dalam KG.

Prinsip ini digunakan untuk penentuan kadar 24 asam lemak yang terdapat dalam kapsul minyak ikan (Cunnif P., 1995) .

- b. Untuk asam lemak rantai pendek, misalnya yang terdapat dalam susu, esterifikasi dapat dilakukan tanpa penambahan katalis BF<sub>3</sub> (Egan, 1985)
- c. Menggunakan asam sulfat- metanol (Cunnif P., 1995)
- d. Menggunakan HCl - metanol (Cunnif P., 1995)
- e. Menggunakan pereaksi campuran yang terdiri dari 2 gram NH<sub>4</sub>Cl, 60 ml metanol dan 3ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. (Egan, 1985)

## II.2. Kromatografi Gas

### II.2.1. Tinjauan Umum Kromatografi Gas

Kromatografi gas merupakan metode terpilih untuk analisis senyawa, khususnya campuran senyawa, yang mudah menguap dan stabil pada suhu yang digunakan untuk analisis. Prinsip metode ini adalah adanya perbedaan kecepatan migrasi senyawa-senyawa yang dianalisis, akibat perbedaan distribusinya dalam fase diam ( padat/cair) dan fase gerak (gas).

Fase gerak dalam KG berfungsi sebagai transpor molekul yang dianalisis. Yang biasa digunakan sebagai fase gerak adalah gas inert seperti Helium, N<sub>2</sub>, atau H<sub>2</sub>. Fase diam KG

yang digunakan dalam penelitian ini cair, yaitu 5% Phenyl methyl siloksan (merek dagang HP-5, relatif nonpolar). Fase diam ini merupakan lapisan film di bagian dalam kolom kapiler yang terbuat dari fused silica (wall coated open tubular = WCOT). Senyawa yang mempunyai derajat polaritas sama dengan fase diam ini akan tertahan relatif lebih lama dalam fase diam dibanding senyawa yang lain, sehingga mempunyai waktu retensi ( $t_R$ ) paling lama (Manual Agilent Chem Station dan Skoog, 1998). Waktu retensi ini karakteristik tapi tidak spesifik, oleh karena itu dapat digunakan untuk identifikasi suatu senyawa (uji kualitatif).

Untuk uji kuantitatif, yang dasarnya adalah pengukuran area puncak analit, maka derajat keterpisahan antara puncak analit dengan senyawa lain disekitarnya menentukan akurasi pengukuran. Parameter keterpisahan diantara puncak-puncak senyawa adalah resolusi yang dipengaruhi oleh selektifitas kolom.

Faktor selektifitas ( $\alpha$ ) kolom terhadap senyawa (1) dan senyawa (2) adalah :

$$\alpha = \frac{T_{R(2)} - t_m}{T_{R(1)} - t_m} \quad \begin{array}{l} t_m = \text{waktu retensi zat yang tidak di tahan fase diam} \\ t_{R(2)} = \text{waktu retensi zat yang lebih lama ditahan kolom} \end{array}$$

Bila  $T_{R(2)}$  adalah senyawa baku, maka  $\alpha$  dapat digunakan untuk data identifikasi senyawa  $R_{(1)}$  yang lebih presis dari pada harga  $T_{R(1)}$  absolut.

Ukuran efisiensi kolom adalah jumlah pelat teoritis ( $N$ ), yang untuk puncak berbentuk gaussian adalah (USP., 2000) :

$$N = 16 [ t_R/W ]^2 \quad \text{atau} \quad N = 5,54 [ t_R/W_{50} ]^2$$

Harga  $N$  tergantung pada sifat kimia senyawa analit dan kondisi kerja instrumen (laju fase gerak, suhu), ketipisan film fase diam, internal diameter dan panjang kolom (USP., 2000). Pemisahan antara senyawa (1) dari senyawa (2) dinyatakan dengan resolusi ( $R_s$ ). Resolusi, menurut (Skoog, 1998) atau menurut Manual Agilent Technologies, 2003 (untuk integrator elektronik) adalah :

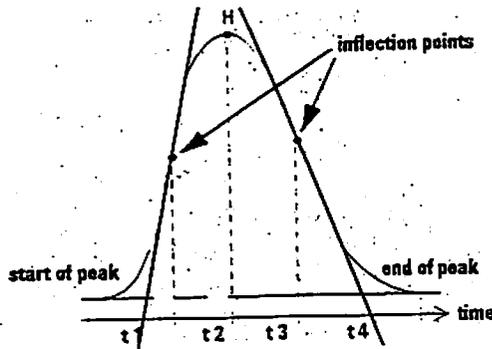
$$R_s = \frac{2 ( t_{R2} - t_{R1} )}{W_2 + W_1} \quad \text{atau} \quad R_s = \frac{(2,35/2) ( t_{R2} - t_{R1} )}{W_{50(2)} + W_{50(1)}}$$

Keterangan :

$W_{50}$  = lebar puncak pada setengah tinggi bila puncak simetris

Untuk puncak asimetris, Manual Agilent Technologies, 2003, merumuskan :

$$W_{50} = 0,3 \times ( t_1 + t_2 ) + 0,7 \times A/H$$



Gambar II.5. Cara Pengukuran Lebar Puncak

$R_s$  sebesar 1,5 menunjukkan pemisahan yang sempurna (derajat *overlapping* 0,3%), sedangkan  $R_s$  1,0 menunjukkan adanya *overlapping* sebesar 4% (Skoog, 1998). Cunnif.P., 1995 memberikan syarat untuk analisis FAME dalam minyak,  $n > 2000$  dan  $R_s \geq 1,25$

Ukuran simetri puncak suatu senyawa menurut USP., 2000 adalah sebagai berikut :

$$T = W_{0,05} / 2f$$

Keterangan :

$W_{0,05}$  = lebar puncak pada 5% tinggi puncak

$f$  = lebar puncak mulai awal timbul puncak ( pada 5% tinggi puncak) sampai puncak tertinggi

Detektor KG yang digunakan dalam penelitian ini adalah FID (*Flame Ionizing Detector*). Prinsip kerja FID adalah mengukur kuatnya arus (pA) yang ditimbulkan oleh adanya ion dan elektron hasil pirolisis senyawa organik (analit), oleh nyala  $H_2$ -udara di ujung *burner*, yang melewati medan potensial (antara ujung bumer dan elektrode kolektor yang letaknya di atas ujung bumer diberi potensial beberapa ratus volt). Detektor ini tidak sensitif terhadap gas  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$  dan  $NO_2$  (Skoog, 1998).

FID ini destruktif tetapi sangat peka. Agar hasil analisis dapat dipercaya (*reliable*) maka perlu dikalibrasi kemampuannya dengan parameter sensitifitas, linieritas, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi.

Sensitifitas ditunjukkan oleh kecuraman lereng/*slope* dari kurva kalibrasi, yaitu kurva yang menggambarkan besarnya respon detektor (sumbu y) yang ditimbulkan oleh setiap jumlah analit yang diinjeksikan.

Linieritas menunjukkan kemampuan detektor memberikan respon yang sebanding linier dengan jumlah analit yang diinjeksikan (karena mulai jumlah analit tertentu detektor dapat mengalami kejenuhan). Linieritas ini diukur dengan menghitung besarnya koefisien korelasi ( $r$ ) dan persamaan garis regresi menggunakan metode *least squares* (Day.R.A,1991, Skoog, 1998).

$$r = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sqrt{[\sum x^2 - (\sum x)^2/n] \cdot [\sum y^2 - (\sum y)^2/n]}} \quad Y = b x + a$$

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n} \quad a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Koefisien korelasi ( $r$ ) mendekati 1 atau -1 menunjukkan adanya hubungan linier antara kadar analit dengan besarnya signal, dengan batas minimum, untuk  $n$  tertentu, sesuai tabel  $r$ .

$$\text{Standar deviasi regresi ( } S_y) = \sqrt{\frac{D - b^2 C}{n-2}}$$

$$C = (\sum x^2 - (\sum x)^2/n) \quad D = (\sum y^2 - (\sum y)^2/n)$$

$$\text{Standar deviasi slope ( } S_b) = S_y/\sqrt{C}$$

$$\text{Standar deviasi intersep ( } S_a) = S_y \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}}$$

Untuk membuat kurva kalibrasi, pustaka (USP., 2000) menggunakan sedikitnya 5 macam konsentrasi analit dalam rentang (80-120) % dari kadar analit yang akan diukur kadarnya, sedangkan beberapa prosedur kerja dalam Jeffery, 1989 dan Cunnif.P., 1995 cukup menggunakan (minimum) 4 macam konsentrasi.

Presisi yang merupakan derajat ketenerulangan, Cunnif,1995 membedakan antara *repeatabilitas* (yaitu hasil analisis terhadap sampel, alat, operator dan hari yang sama) dan *reproducibilitas* (yaitu hasil analisis terhadap sampel yang sama dari laboratorium yang berbeda). Untuk *major component* ( $> 5\%$ ), Cunnif P., 1995 mensyaratkan *repeatabilitas* maksimum 3% (relatif), dan 1% absolut. Sedang *reproducibilitas*, maksimum 10% relatif dan 3% absolut.

Batas deteksi menunjukkan jumlah analit minimum yang memberikan signal yang besarnya 3-5 kali besarnya *noise* (USP., 2000) atau 6 kali  $S_y$  (standar deviasi) garis regresi (Agilent Technologies, 2003). Untuk analisis *major component*, USP., 2000, tidak mensyaratkan penentuan batas deteksi.

Validitas hasil analisis suatu sampel tidak hanya ditentukan oleh instrumen yang digunakan, tetapi juga proses preparasi sampel sebelumnya. Untuk itu diperlukan uji akurasi, presisi metode dan selektifitas.

Parameter akurasi adalah perolehan kembali (*recovery*), yang menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan harga benar. Cara menentukan perolehan kembali suatu analit dalam sampel ada beberapa cara (USP., 2000), yaitu :

1. Menentukan kadar senyawa analit baku (*Reference Standard*) dalam matrik sintetik/ imitasi, menggunakan metode yang akan divalidasi.
2. Membandingkan hasil analisis metode yang divalidasi dengan metode baku yang sudah diketahui validitasnya.
3. Menentukan kadar senyawa analit baku yang sengaja dimasukkan (*spiking*) ke dalam sampel

Parameter presisi metode adalah standar deviasi atau koefisien variasi hasil analisis dengan beberapa kali replikasi (*independen*). USP., 2000 menyebutkan replikasi dilakukan terhadap hasil penentuan kadar analit masing-masing 3 kali, untuk analit dengan 3 macam konsentrasi dalam rentang kadar analit yang dianalisis. Atau 6 kali replikasi terhadap kadar analit yang sama (100%) .

### II.2.2. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif menggunakan Kromatografi gas

KG sering digunakan untuk menguji kemurnian suatu senyawa. Adanya puncak selain puncak utama menunjukkan adanya cemaran. KG merupakan metode relatif, jadi memerlukan senyawa baku. Untuk analisis kualitatif, parameter yang digunakan adalah kesamaan waktu retensi relatif ( $t_R$ ) antara sampel dengan baku .

Untuk analisis kuantitatif, parameter yang digunakan adalah besarnya signal yang ditimbulkan oleh analit ( dibaca sebagai tinggi puncak atau area) . Karena pada kenyataannya sering terjadi *leading* atau *tailing*, maka pengukuran area lebih sering digunakan dari pada tinggi puncak. Untuk 2 senyawa yang berbeda, area yang sama belum tentu menunjukkan kadar yang sama, karena sensitifitas kedua senyawa tersebut belum tentu sama. Cara perhitungan kadar dapat menggunakan cara berikut ini :

#### a. Normalisasi area

Dengan cara ini komposisi senyawa dalam campuran dinyatakan sebagai prosentase dari total area puncak yang ditunjukkan masing-masing senyawa dalam campuran tersebut.

#### b. Baku eksternal

Cara ini memerlukan senyawa baku untuk membuat kalibrasi. Bila menggunakan satu kadar analit baku maka kadar tersebut harus sedekat mungkin dengan kadar analit

dalam sampel. Yang lebih akurat adalah dengan cara intrapolasi area analit sampel ke dalam kurva kalibrasi ( $Y = bx + a$ )

### c. Baku Internal

Cara ini dilakukan dengan menambahkan senyawa baku internal dalam jumlah sama ke dalam larutan baku maupun sampel yang akan diinjeksikan. Dengan menggunakan baku internal yang benar maka kesalahan sistematis maupun random dapat dieliminasi. Misalnya, kesalahan akibat fluktuasi elektronik, pengaruh matrik, preparasi sampel, variasi volume yang masuk ke dalam *injection port* dll.

Senyawa baku internal yang dipilih idealnya memenuhi syarat antara lain (Jeffery, 1989 dan Skoog, 1998) :

- Mempunyai struktur kimia mirip, sehingga sensitifitas detektor juga mirip
- Mempunyai waktu retensi tidak jauh dari analit, tetapi terpisah sempurna ( $R_s \geq 1,25$ ).
- Bentuk puncak identik dengan analit dan sama area.
- Murah, aman, tidak mengganggu proses analisis dll

### II.3. Kupang

Ada dua jenis kupang yang sering ditangkap oleh masyarakat desa Balungdowo, Kecamatan Candi, Sidoarjo yaitu kupang putih dan kupang merah. Gambar kupang tersebut tercantum pada gambar II.6. dan gambar II.7. Kupang ini ditangkap nelayan dari dasar perairan berlumpur atau berpasir di sepanjang pantai Sidoarjo, Surabaya, Bangil, Gresik dan sekitarnya menggunakan alat *rancak*, *caruk* dan keranjang bambu (Prayitno S., 2001).

Menurut pustaka (Prayitno S., 2001), kupang putih hidup di daerah berombak kecil, di muara sungai atau di pinggir laut dekat muara sungai, dengan menancap di lumpur. Pada musim penghujan dan keadaan ombak di pesisir kecil, jumlah kupang banyak. Dari pustaka ini diketahui pada bulan Juli-Agustus jumlah produksi kupang relatif lebih kecil dibanding bulan lainnya. Kupang merah hidup agak ke tengah laut ( $\pm 80$  m dari pantai) yang berombak kecil dan kedalaman air waktu surut (1-2) m. Kupang merah hidup bergerombol saling mengikat satu sama lain dengan semacam benang lumpur yang disebut kowol (*bysus*).

Jika mati, cangkang kupang putih tertutup rapat (sehingga relatif tidak berbau), sedang kupang merah jika mati cangkangnya membuka.

Menurut determinasi (Prayitno S., 2001), klasifikasi kupang putih adalah sebagai berikut .



Philum : *Mollusca*  
Kelas : *Pelecypoda*  
Ordo : *Filibransia*  
Familia : *Corbulidae*  
Genus : *Corbula*  
Spesies : *Corbula faba* Hinds.

**Gambar II.6 : Kupang Putih (*Corbula faba* Hinds)**

Menurut determinasi Lembaga Oseanografi LIPI, klasifikasi kupang merah adalah sebagai berikut.



Philum : *Mollusca*  
Kelas : *Pelecypoda*  
Ordo : *Filibransia*  
Familia : *Mytilidae*  
Genus : *Musculita*  
Spesies : *Musculita senhausia* Bens.

**Gambar II.7 : Kupang Merah (*Musculita senhausia* Bens)**

Ukuran cangkang kupang yang kecil, menyebabkan proses pengambilan dagingnya memerlukan keahlian tersendiri. Proses pengolahan kupang oleh pengepul adalah sebagai berikut.

a. Pencucian pertama

Setelah diturunkan ke darat pada malam hari, kupang merah dibebaskan dari *kowol* (*byssus*) yaitu semacam benang dari lumpur liat dan dicuci dengan air sungai sampai bersih dari lumpur dan kotoran lainnya. Setelah itu dicuci dengan air bersih sebelum direbus. (Kupang putih langsung dicuci dengan air bersih, tidak perlu menghilangkan kowol).

## b. Perebusan pertama

Kupang yang telah dicuci, direbus dengan air mendidih selama lebih kurang 2 jam sambil di aduk-tekan dengan bantuan alat kayu, untuk melepaskan daging kerang dari cangkangnya.

c. Kupang yang telah direbus, dicuci ulang dalam tempayan besar menggunakan air bersih. Dalam proses ini sekaligus dipisahkan daging kerang dari cangkangnya menggunakan *ereg* (semacam keranjang bundar dari bambu). (daging kerang dapat dipisahkan karena mengendap di bagian bawah, sedangkan cangkangnya mengapung di atas).

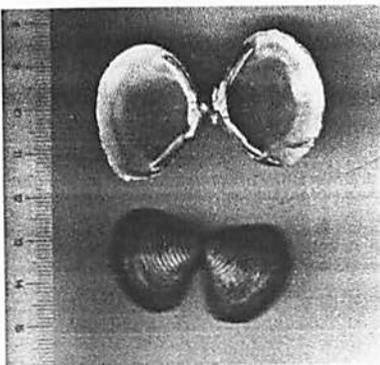
## d. Daging kerang yang sudah dipisahkan ini dapat dijual kepada pedagang di pasar atau penjual kupang masak lain, atau diolah lagi menjadi produk makanan lainnya.

Dalam pustaka (Prayitno S., 2001) disebutkan, kadar lemak kupang merah adalah 2,68% sedangkan kupang putih 1,50% (kadar air masing-masing adalah 75,7% dan 72,96%). Menurut Purwanto dan Andjar Sardjimah dalam (Prayitno S., 2001) daging kupang kering mengandung minyak 25,0% yang komponennya terdiri dari 14 macam asam lemak dengan kadar bervariasi antara (0,23-25,79) % antara lain LNA (0,71%) dan EPA (10,12 %), tetapi DHA tidak disebut secara khusus.

#### II.4. Remis

Remis ini hidup di air tawar (sungai, danau, balong atau sawah), harus dalam air yang mengalir. Bila air tak mengalir, remis akan mati. Remis ini rasanya enak sehingga biasa dikonsumsi dan sekarang sudah ada usaha budi daya remis. Ukuran remis relatif lebih besar dari kupang, yaitu (1,5-5) cm (gambar II.8).

Hasil determinasi Lembaga Oseanografi LIPI klasifikasi remis adalah sebagai berikut:



Phylum : Mollusca  
 Kelas : Pelecypoda (Bivalvia)  
 Ordo : Filibransia  
 Familia : Corbiculidae  
 Genus : Corbicula  
 Spesies: *Corbicula javanica* Mousson, 1849

Gambar II.8. Remis (*corbicula javanica* Mousson 1849)

Dalam penelitian sebelumnya diketahui kadar protein total *Corbicula javanica* Mousson adalah  $(12,56 \pm 0,76)\%$  (berat basah), sedang kadar lemaknya adalah  $(25,41 \pm 0,40)\%$  dengan bilangan iodium yang cukup tinggi (yang menunjukkan adanya asam lemak tidak jenuh) yaitu sebesar  $88,30 \pm 0,06$ . Dari analisis kualitatif menggunakan gas kromatografi diperoleh 18 puncak metil ester asam lemak bebas (FAME = free fatty acid methyl ester) (proses esterifikasi menggunakan katalis  $\text{BF}_3$ ), meskipun belum diketahui apakah diantara puncak tersebut terdapat asam lemak omega-3 (Yuwono M.,2002).

### **BAB III**

## **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **III.1. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan :

1. Mendapatkan metode yang valid untuk penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam daging Kupang Putih, Kupang Merah maupun Remis menggunakan kromatograf gas (KG).
2. Mengetahui kadar LNA, EPA dan DHA dalam daging Kupang Putih, Kupang Merah dan Remis.

### **III.2. Manfaat Penelitian**

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan metode analisis LNA, EPA, DHA (dalam lemak biologis ) yang valid. Kondisi optimum analisis asam lemak  $\omega$ -3 yang didapatkan dalam penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk mendukung penelitian tentang senyawa tersebut di atas, khususnya tahap penentuan kadar LNA, EPA, DHA .
2. Mendapatkan bahan makanan yang mengandung LNA, EPA dan DHA dengan harga yang relatif murah.
3. Meningkatkan derajat makanan rakyat (Kupang Putih, Kupang Merah dan Remis).

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### IV.1. Lokasi Penelitian

Analisis sampel dilakukan di Laboratorium Multiguna I (MM I), Fakultas Farmasi Unair dan di Laboratorium Forensik POLDA Jatim.

Sampling sampling kupang putih dan kupang merah dilakukan pada bulan Juli 2004, dengan cara membeli dari pengepul di desa Balongdowo, Kecamatan Candi, Kabupaten Sidoarjo. Sampel dibeli dalam bentuk kerang yang belum dipisah dagingnya.

Sampling Remis dilakukan pada bulan Agustus 2004, dengan cara membeli dari pengepul di desa Wonokarang, kecamatan Balung Bendo, Sidoarjo. Sampel dibeli dalam bentuk daging kerang yang sudah terpisah dari cangkangnya.

#### IV.2. Alat yang Digunakan

Kromatograph Gas (*Agilent 6890 series*), kolom kapiler HP-5 5% Phenylmethylsiloxan (30,0 m, id 320  $\mu\text{m}$ , fc 0,25 $\mu\text{m}$ ), fase gerak Helium, detektor FID, Hamilton microsyringe 10  $\mu\text{L}$ . Kromatograph Gas HP 5890 seri II dengan detektor MSD 5972, Kolom HP1 ( 25m, id 0,2 mm, fc 0,25  $\mu\text{m}$ ).

Blender, oven, neraca analitik ( $d = 0,2 \text{ mg}$ ), peralatan pengestraksi lemak termasuk refluks 1 set dengan kapasitas labu alas bulat 150 ml.

Tabung reaksi ( $\phi$  1 cm, panjang 20 cm) bertutup teflon, penangas air, mikropipet socorex 200  $\mu\text{L}$ , serta peralatan gelas untuk analisis kuantitatif lain yang umum digunakan.

#### IV.3. Bahan Penelitian

##### IV.3.1. Pereaksi

Asam Eikosapentaenoat (EPA, *Sigma*, CAS no.10417), Asam Dokosaheksaenoat (DHA, *Sigma*, CAS no. 6217545), Asam Linolenat (LNA, *Fluka*, kode 62160 ). Metil Arakidonat (AME, *Sigma*, lot 77F-0820), Metil Trikosanoat (TME, *Sigma*, Lot 100K5224).

Petroleum Eter pa (E Merck), Heptana pa(E Merck), NaCl pa (E Merck), NaOH pa (E Merck), Natrium Sulfat kering pa (E Merck), Metanol pa ( E Merck ), BF<sub>3</sub> 12% dalam Metanol pa (E Merck).

### IV.3.2. Sampel

- a. Kupang putih ( *Corbula faba* Hinds )
- b. Kupang merah ( *Musculitas senhausia* Bens)
- c. Remis ( *Corbicula javanica* Mouson, 1849)

### IV.4. Pembuatan Larutan Pereaksi

#### IV.4.1. Larutan 0,5 N Natrium metanolat

Dilartkan 2 gram NaOH dalam metanol sampai 100 ml.

#### IV.4.2. Larutan NaCl jenuh

Dilartkan 36 gram NaCl dalam air sampai volume total 100 ml, bila perlu, disaring.

#### IV.4.3. Larutan baku TME 2000 ppm

Ditimbang teliti 50 mg Metil trikosanoat (TME), dilartkan dalam heptana sampai volume 25 ml dalam labu takar. Larutan ini digunakan sebagai baku internal.

#### IV.4.4. Larutan baku EPA 5000 ppm

Asam Eikosapentaenoat (EPA) 50 mg dalam kemasan aslinya dilartkan dalam metanol, dipindahkan kuantitatif ke dalam labu takar 10 ml dan ditambah metanol sampai tanda. Pipet larutan ini masing-masing 1,0 ml, masukkan ke dalam vial. Bila tidak segera digunakan, vial ini dikeringkan di bawah aliran N<sub>2</sub> sampai kering , kemudian ditutup dan disimpan di dalam lemari pendingin. Bila akan dilakukan pengujian, EPA dalam vial ini ditambah metanol 1,0 ml. (Tiap ml larutan ini mengandung EPA = 5 mg). Selanjutnya volume yang dibutuhkan diambil menggunakan mikropipet socorex ( d= 1 µL) .

#### IV.4.5. Larutan baku DHA 10.000 ppm

Asam Dokosaheksaenoat (DHA) 100 mg dalam kemasan aslinya, dilartkan dalam metanol, dipindahkan kuantitatif ke dalam labu takar 10 ml dan ditambah metanol sampai tanda. Pipet larutan ini masing-masing 1,0 ml, masukkan ke dalam vial. Bila tidak segera digunakan untuk pengujian, vial ini dikeringkan di bawah aliran N<sub>2</sub> sampai kering , kemudian ditutup dan disimpan di dalam lemari pendingin. Bila akan dilakukan pengujian, DHA dalam vial ini ditambah metanol 1,0 ml. (Tiap ml larutan ini mengandung DHA = 10 mg). Selanjutnya volume yang dibutuhkan diambil menggunakan mikropipet socorex ( d= 1 µL) .

#### IV.4.6. Larutan baku LNA

Ditimbang teliti 88,2 mg Asam linolenat (LNA), dilartkan dalam metanol, dipindahkan kuantitatif ke dalam labu takar 25 ml dan ditambah metanol sampai tanda (konsentrasi LNA 3528 ppm) .

#### IV.4.7. Larutan baku kerja (ester) campuran LNA, EPA, DHA

Ke dalam 5 tabung reaksi bertutup teflon dimasukkan masing-masing 400  $\mu\text{L}$  larutan baku TME 2000 ppm, selanjutnya ditambah dengan larutan baku sebagai berikut:

Tabung 1 : 100  $\mu\text{L}$  LNA, 50  $\mu\text{L}$  EPA, 50  $\mu\text{L}$  DHA

Tabung 2: 200  $\mu\text{L}$  LNA, 100  $\mu\text{L}$  EPA, 100  $\mu\text{L}$  DHA

Tabung 3: 300  $\mu\text{L}$  LNA, 200  $\mu\text{L}$  EPA, 200  $\mu\text{L}$  DHA

Tabung 4: 400  $\mu\text{L}$  LNA, 300  $\mu\text{L}$  EPA, 300  $\mu\text{L}$  DHA

Tabung 5: 500  $\mu\text{L}$  LNA, 400  $\mu\text{L}$  EPA, 400  $\mu\text{L}$  DHA

Setelah dikeringkan dengan gas  $\text{N}_2$ , selanjutnya diesterkan dengan cara sesuai tahap IV.6.4. (dimulai dari '\*\* Selanjutnya.....'). Ester yang diperoleh dianalisis menggunakan KG dengan kondisi optimum yang didapatkan.

### IV.5. Validasi Metode

#### IV.5.1. Optimasi kondisi instrumen

Dengan menggunakan instrumen KG tersebut di atas dilakukan optimasi kondisi instrumen yang meliputi : suhu *Inlet*, suhu detektor, program suhu *oven*, laju gas pembawa, *split* dll. hingga diperoleh pemisahan yang optimum ( $R_s \geq 1,25$ , Cunnif.P., 1995) diantara analit (LNA, EPA, DHA) dari senyawa lain dalam matrik sampel (termasuk dari baku internal terpilih) dengan waktu yang efisien.

Untuk memastikan puncak analit sudah terpisah dari senyawa lain dalam matrik, dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi analit sampel dengan baku, adisi/*spiking* analit baku ke dalam sampel dan menggunakan KG-dengan detektor massa (GC-MSD).

#### IV.5.2. Uji selektifitas

Selektifitas ditunjukkan oleh besarnya harga resolusi antara analit dengan senyawa lain yang mempunyai waktu retensi berdekatan. Dalam pustaka (Skoog D.A, 1992) harga  $R_s$  yang baik adalah  $>1,5$  (overlap 0,3%). Cunnif.P., 1995 memberikan syarat untuk analisis FAMEs (metil ester asam lemak) dalam minyak,  $n > 2000$  dan  $R_s \geq 1,25$

$$R_s = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_B - W_A}$$

Bila menggunakan integrator elektronik (USP, 2000)

$$R_s = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{1,7 (W_{0,5(B)} - W_{0,5(A)})}$$

#### IV.5.3. Uji linieritas

Dibuat campuran larutan baku LNA, EPA dan DHA, masing-masing dengan volume antara ( 50  $\mu\text{L}$  – 500  $\mu\text{L}$ ), sehingga saat disuntikkan ke dalam KG didapatkan konsentrasi akhir LNA (200-1000) ppm, EPA (125-1000) ppm, DHA (250-2000) ppm (masing-masing lima macam variasi kadar analit). Setelah dikeringkan dengan  $\text{N}_2$ , selanjutnya diproses sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari \*\* Selanjutnya.....' .

Parameter linieritas yang digunakan adalah koefisien korelasi ( $r$ ). Selanjutnya dihitung persamaan garis regresi dengan metode *least squares* (Day.R.A, 1991) (contoh perhitungan di lampiran 1 sedangkan cara perhitungan di tinjauan pustaka bab II.2.1.).

#### IV.5.4. Presisi dan akurasi proses esterifikasi/ekstraksi hasil esterifikasi

Dipipet 500  $\mu\text{L}$  larutan LNA (0,1177 g/10 ml metanol) dan 200  $\mu\text{L}$  larutan AME (10 mg/10 ml heptana), dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah dikeringkan dengan  $\text{N}_2$ , kemudian diproses sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari \*\* Selanjutnya.....' (replikasi 6 kali).

Dipipet 200  $\mu\text{L}$  larutan EPA (50 mg/10 ml metanol) dan 200  $\mu\text{L}$  larutan AME (10 mg/10 ml heptana), dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah dikeringkan dengan  $\text{N}_2$ , selanjutnya diesterkan sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari \*\* Selanjutnya... ' (replikasi 6 kali).

Dipipet 200  $\mu\text{L}$  larutan DHA (25 mg/5 ml metanol) dan 100  $\mu\text{L}$  AME (10 mg/10 ml heptana), dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah dikeringkan dengan  $\text{N}_2$ , selanjutnya diesterkan sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari \*\* Selanjutnya... ' (replikasi 6 kali).

Dipipet 400  $\mu\text{L}$  larutan TME (51,8 mg/25 ml heptana) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah dikeringkan dengan  $\text{N}_2$ , selanjutnya diproses sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari \*\* Selanjutnya.....' (replikasi 6 kali).

Dipipet 200  $\mu\text{L}$  larutan AME (10mg/10 ml heptana) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah dikeringkan dengan  $\text{N}_2$ , selanjutnya diproses sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari \*\* Selanjutnya.....' (replikasi 6 kali).

Parameter presisi adalah standar deviasi (SD) atau koefisien variasi (KV) dari hasil analisis dengan replikasi enam kali (USP, 2000). Parameter akurasi adalah prosen perolehan kembali.

#### IV.5.5. Presisi dan Akurasi metode

Pengukuran presisi dan akurasi metode dilakukan dengan cara adisi baku masing-masing larutan LNA (100  $\mu\text{L}$ , 0,1177 g/10 ml) , EPA (100  $\mu\text{L}$ , 50 mg/10ml) dan DHA (100  $\mu\text{L}$ ,

100 mg/10 ml) ke dalam hasil ekstraksi sampel kupang merah. Setelah dikeringkan dengan  $N_2$ , selanjutnya diproses sesuai tahap IV.6.4. dimulai dari '\*\* Selanjutnya.....' (replikasi 6 kali).

Parameter akurasi yang digunakan adalah perolehan kembali (rekoveri) yaitu :

$$\% \text{ rekoveri} = X_n / X \times 100 \%$$

Keterangan :

$$X_n = X_{(total)} - X_{(sampel)}$$

$X_{(total)}$  = konsentrasi *analit total* yang diperoleh berdasarkan kurva baku (tahap IV.5.4)

$X_{(sampel)}$  = rata-rata konsentrasi *analit dalam sampel* yang diperoleh berdasarkan kurva baku/kurva kalibrasi (tahap IV.6.3 dilanjutkan IV.6.4)

$X$  = konsentrasi analit baku (LNA, EPA, DHA) yang diadiskan

Parameter presisi adalah standar deviasi (SD) atau koefisien variasi (KV) dari hasil analisis dengan replikasi enam kali (USP, 2000).

## IV.6. Preparasi Sampel

### IV.6.1. Pemisahan daging kupang dari cangkang

Segera setelah sampling, kupang dicuci dengan air bersih. Setelah bersih, kupang dimasukkan ke dalam panci yang sudah berisi air mendidih. Kupang direbus selama  $\pm 2$  jam sambil diaduk-aduk dan ditekan-tekan. Daging kupang yang sudah terlepas dipisahkan dari cangkangnya dengan bantuan pengayak. Daging yang diperoleh dicuci lagi dengan air bersih.

Daging sampel yang sudah bersih, dicuci dengan air suling, ditiriskan di atas nampan berlubang (2 menit). Setelah tiris, diblender (1-2 menit) dengan kecepatan tinggi (Cunnif.P., 1995) Setelah daging cukup halus, sebagian ditimbang untuk ditentukan kadar airnya, dan sebagian besar yang lain di proses untuk penentuan kadar LNA, EPA, DHA, dan sisanya disimpan dalam freezer lemari pendingin untuk pertinggal.

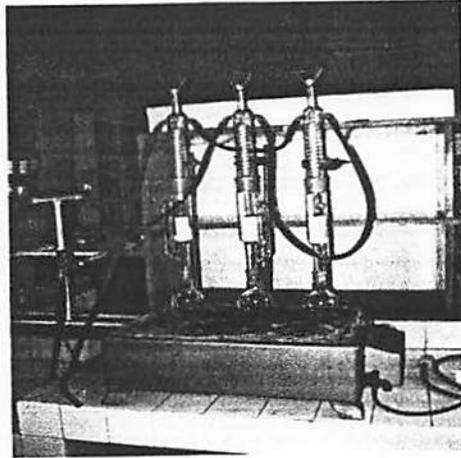
### IV.6.2. Penentuan kadar air sampel

Ditimbang teliti daging kerang yang sudah dihaluskan (2 gram), dimasukkan ke dalam botol timbang bermulut lebar yang sudah diketahui berat keringnya. Keringkan daging kerang dalam wadah tersebut selama (16-18) jam pada suhu ( $100^{\circ}$ - $102^{\circ}$ ) C dalam oven, selanjutnya ditimbang teliti (Cunnif.P., 1995).

### IV.6.3. Ekstraksi lemak sampel

Ditimbang teliti ( 20-25 ) gram daging kerang yang sudah dihaluskan, dimasukkan ke dalam timbel soxhlet, lalu dialiri PE sampai volume satu sirkulasi (  $\pm 150$  ml ). Selanjutnya dilakukan ekstraksi selama 6 jam di atas penangas air (gambar IV.1). Hasil ekstraksi dikering

kan dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kering, kemudian dipindahkan kuantitatif ke dalam beker dan PE diuapkan dengan suhu kamar di dalam lemari asam. Setelah hampir kiser dipindahkan kuantitatif ke dalam tabung bertutup teflon, dan sisa PE diuapkan sampai kiser \*. (Cunnif.P., 1995). Residu yang mengandung lemak ini selanjutnya diesterkan sesuai prosedur IV.6.4.



Gambar IV.1. Ekstraksi lemak dari sampel

#### IV.6.4. Esterifikasi lemak

Ke dalam asam lemak baku atau lemak hasil ekstraksi yang sudah dikeringkan dalam tabung reaksi \* (IV.6.3) ditambah dengan  $400 \mu\text{L}$  larutan baku TME sebagai baku internal, lalu dikeringkan dengan aliran  $\text{N}_2$ .

\*\*Selanjutnya ditambah dengan 1,5 ml 0,5 N Na metanolat. Setelah cairan diaduk dengan dialiri  $\text{N}_2$ , tabung ditutup rapat, dipanaskan selama 5 menit di dalam penangas air ( $90^\circ\text{C}$ ), lalu didinginkan.

Setelah dingin ditambah dengan 2 ml 12%  $\text{BF}_3$  dalam metanol, dialiri  $\text{N}_2$ , dan dipanaskan lagi selama 30 menit di dalam penangas air. Setelah didinginkan sampai ( $30-40^\circ\text{C}$ ) kemudian ditambah dengan 2,0 ml heptana dan dikocok selama 30 detik.

Selanjutnya ditambah dengan 5 ml larutan NaCl jenuh, dialiri  $\text{N}_2$ , dikocok dan didinginkan, diambil lapisan atas untuk dianalisis menggunakan KG. Bila tidak langsung diinjeksikan ke dalam KG, lapisan heptana ini disimpan dalam vial bertutup setelah sebelumnya udara dalam vial diganti dengan dialiri gas  $\text{N}_2$  (Cunnif P., 1995).

**BAB V**  
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

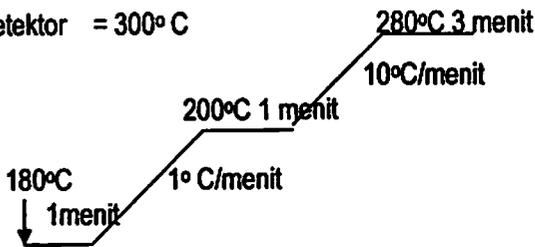
**V.1. Validasi Metode**

**V.1.1. Optimasi kondisi instrumen**

Dengan melakukan modifikasi kondisi analisis yang tercantum dalam berbagai pustaka (Cunnif P., 1995, Jochum, 2003, Restek corporation, 2003) untuk disesuaikan dengan instrumen yang digunakan, maka didapatkan kondisi optimum sebagai berikut :

Suhu Inlet = 250°C

Suhu detektor = 300°C

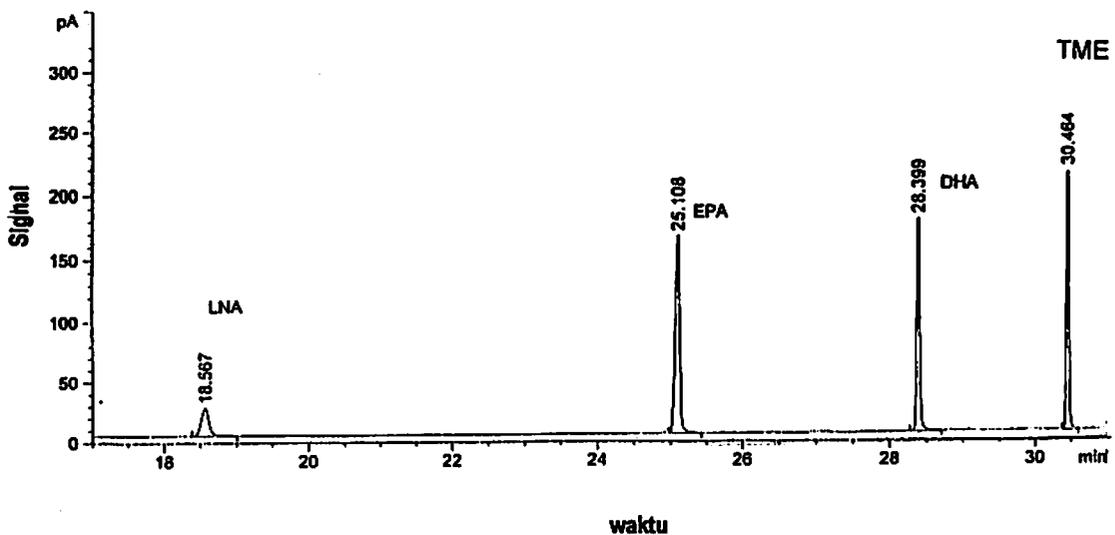


Laju He = 1,1 ml/menit

Split = 1:10

Total waktu yang dibutuhkan setiap kali injeksi adalah 33 menit

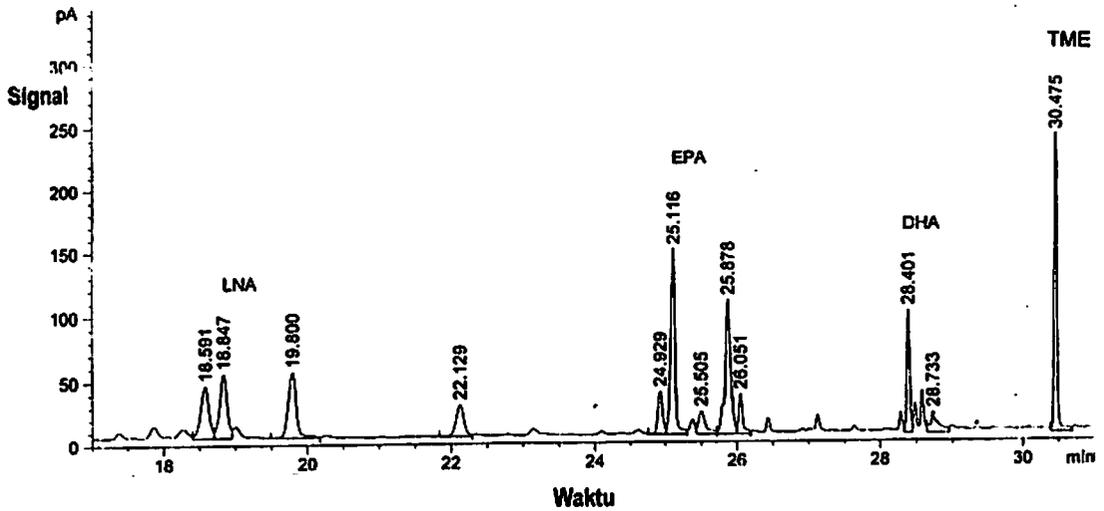
Dengan kondisi tersebut di atas diperoleh profil kromatogram metil ester dari LNA, EPA, DHA dan TME (baku internal ) berikut ini (gambar V.1). Metil ester tersebut dihasilkan setelah analit baku LNA, EPA dan DHA diproses sesuai tahap IV.6.4.



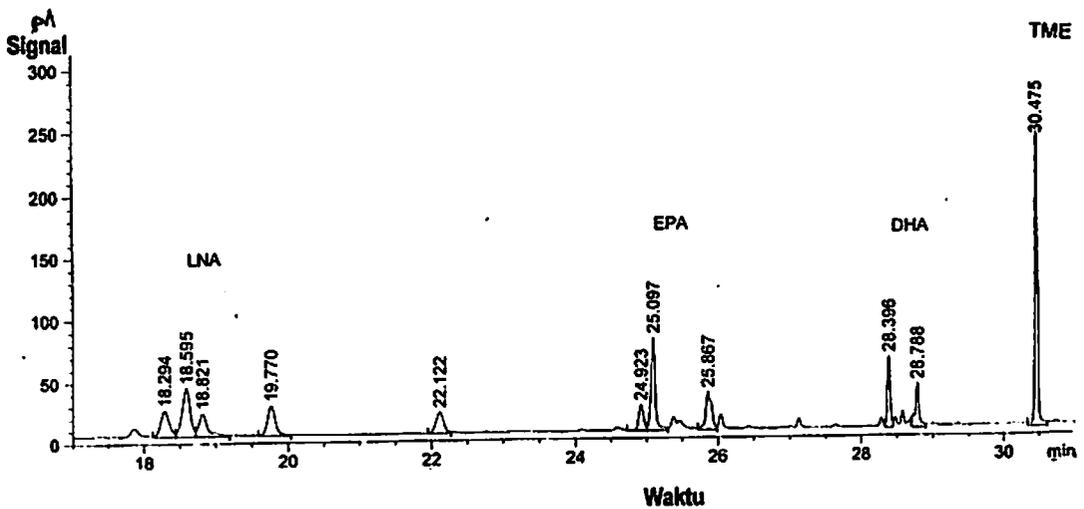
Gambar V.1. Kromatogram hasil esterifikasi baku LNA, EPA, DHA

**V.1.2. Uji selektifitas**

Hasil uji selektifitas metode KG untuk LNA, EPA dan DHA dapat dilihat pada tabel V.1. Harga resolusi ( $R_s$ ) dan faktor selektifitas ( $\alpha$ ) pada tabel tersebut dihitung berdasarkan kromatogram hasil esterifikasi sampel kupang putih (gambar V.2), kupang merah (gambar V.3) maupun remis (gambar V.5).

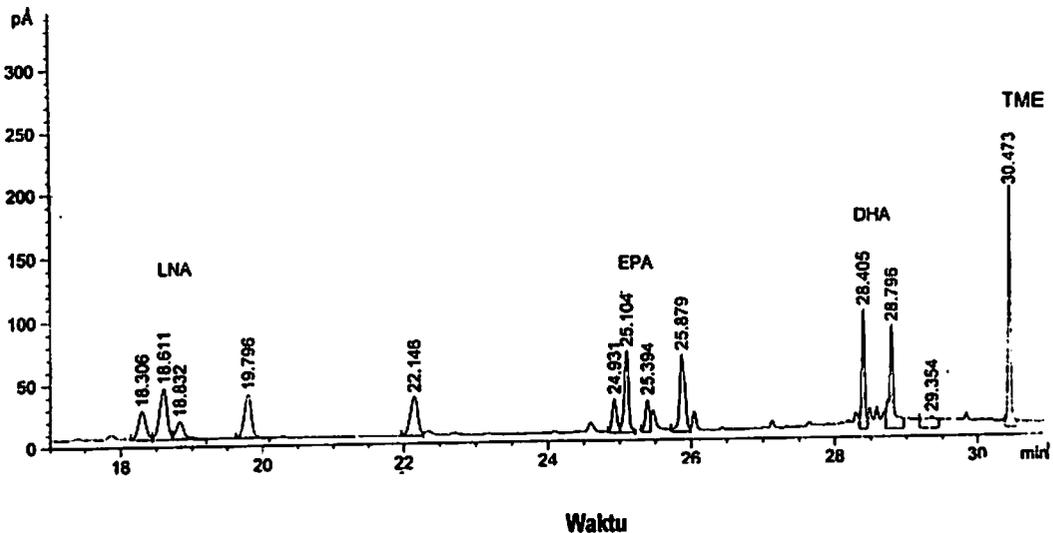


Gambar V.2. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Kupang Putih



Gambar V.3. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Kupang Merah

Dari kromatogram hasil esterifikasi ekstrak kupang merah yang sudah diadisi dengan baku LNA, EPA dan DHA (gambar V.4) dapat dilihat adanya peningkatan perbandingan area analit dengan area baku internal ( $A_{\text{Analit}}/A_{\text{baku internal}}$ ) pada  $t_R$ /puncak masing-masing analit dalam sampel (dibandingkan dengan  $A_{\text{Analit}}/A_{\text{baku internal}}$  pada saat tanpa adisi analit baku, gambar V.3.). Dengan adanya peningkatan tersebut berarti puncak yang timbul pada  $t_R$  yang sama dengan  $t_R$  analit baku LNA, EPA, DHA, *kemungkinan besar*, adalah analit yang sama.



Gambar V.4. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Kupang Merah yang diadisi dengan baku LNA, EPA dan DHA

Keterangan gambar V.4. :

$A_{\text{LNA}}/A_{\text{TME}}$  (gambar V.4) = 0,629, bila tanpa adisi  $A_{\text{LNA}}/A_{\text{TME}}$  (gambar V.3) = 0,512

$A_{\text{EPA}}/A_{\text{TME}}$  (gambar V.4) = 0,579, bila tanpa adisi  $A_{\text{EPA}}/A_{\text{TME}}$  (gambar V.3) = 0,548

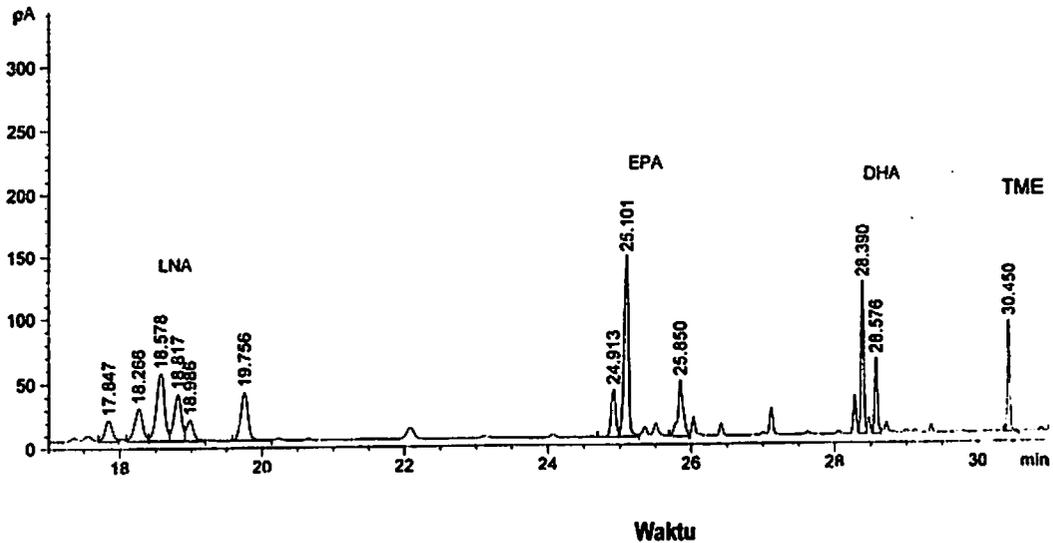
$A_{\text{DHA}}/A_{\text{TME}}$  (gambar V.4) = 0,550, bila tanpa adisi  $A_{\text{DHA}}/A_{\text{TME}}$  (gambar V.3) = 0,269

Untuk memastikan bahwa puncak analit pada  $t_R$  yang sama dengan  $t_R$  baku LNA, EPA, DHA adalah senyawa yang sama, selain dilakukan *spiking* dengan analit baku, juga diuji menggunakan KG-detektor massa (GC-MSD). Dari kromatogram dan spektrogram yang diperoleh (tercantum di lampiran 2) menunjukkan bahwa :

- Pada  $t_R = t_R$  LNA baku, sampel mengandung LNA dengan kemungkinan sebesar 62%.
- Pada  $t_R = t_R$  EPA baku, sampel mengandung EPA dengan kemungkinan sebesar 99%.
- Pada  $t_R = t_R$  DHA baku, sampel mengandung DHA dengan kemungkinan sebesar 91%.
- Pada  $t_R = t_R$  TME baku, sampel mengandung TME dengan kemungkinan sebesar 99%

Waktu yang diperlukan untuk elusi analit dengan menggunakan kolom HP-1 (GC-MSD) relatif lebih pendek (untuk LNA, EPA, DHA, TME, masing-masing 17,50, 24,83, 28,73 dan 31,15 menit ), tetapi secara prinsip menunjukkan profil yang sama dengan bila menggunakan HP-5.

Profil kromatogram hasil esterifikasi ekstrak remis dapat dilihat pada gambar V.5. Dari profil tersebut dapat disimpulkan dalam remis juga terdapat LNA, EPA dan DHA.



Gambar V.5. Kromatogram hasil esterifikasi ekstrak Remis

Tabel V.1. Hasil optimasi kondisi analisis LNA, EPA, DHA dengan KG

No	Sampel	Analit	t <sub>r</sub> analit (Menit)	t <sub>r</sub> TME (menit)	Simetri	Resolusi dgn puncak lain		Faktor Selektivitas (α)
						Sblm t <sub>r</sub>	Ssdh t <sub>r</sub>	
1	Kupang Putih	LNA	18,591	30,475	1,37	1,33	1,29	1,02
		EPA	25,116		1,28	1,67	2,30	1,01
		DHA	28,401		1,09	15,61	1,12	1,05
2	Kupang Merah	LNA	18,595	30,475	1,14	1,45	1,15	1,02
		EPA	25,097		0,96	1,57	6,00	1,01
		DHA	28,396		0,97	28,71	5,75	1,10
3	Kupang merah diadisi LNA, EPA, DHA	LNA	18,611	30,473	1,31	1,60	1,18	1,02
		EPA	25,104		1,17	1,61	2,69	1,01
		DHA	28,394		1,21	1,06	0,90	1,00
4	Remis	LNA	18,578	30,450	1,29	1,53	1,22	1,02
		EPA	25,101		1,52	1,72	7,02	1,01
		DHA	28,390		1,07	1,61	2,89	1,07
5	Baku campuran LNA, EPA DHA	LNA	18,567	30,464	0,98	-	-	1,39
		EPA	25,108		1,62	-	-	1,14
		DHA	28,399		1,09	-	-	1,08

Berdasarkan data tersebut, dapat dipastikan bahwa dalam sampel kupang putih, kupang merah dan remis terdapat LNA, EPA dan DHA.

Hasil optimasi kondisi instrumen menunjukkan  $t_R$  LNA, EPA dan DHA berturut-turut (18,60, 25,10 dan 28,4) menit dengan deviasi 0,02 menit.

Perhitungan secara otomatis menggunakan *Agilent Chem Station*, menunjukkan bahwa puncak ketiga analit yang dianalisis bermodel *gaussian* (simetris  $\geq 1$ ) dan relatif terpisah dari puncak senyawa lain sebelum maupun sesudah  $t_R$  masing-masing, dengan  $R_s > 1,12$  (tabel V.1), (persyaratan Cunnif. P., 1995,  $R_s > 1,25$ ). Berarti kolom KG yang digunakan cukup selektif untuk digunakan pada analisis LNA, EPA, DHA dalam sampel tersebut. Meskipun, dilihat dari simetrinya ada puncak analit yang masih *fronting* maupun *tailing*. *Fronting* dan *tailing* ini akan mempengaruhi akurasi hasil analisis kuantitatif. Mengingat dalam sampel tersebut juga terdapat senyawa lain yang mempunyai  $t_R$  dekat dengan analit.

**V.1.3. Uji linieritas**

Uji linieritas menggunakan analit baku LNA, EPA dan DHA, masing-masing dengan lima kadar, dan TME sebagai baku Internal dapat dilihat pada tabel V.2. berikut. (Cara perhitungan di lampiran 1)

Tabel V.2. Uji linieritas hasil esterifikasi LNA, EPA, DHA baku

→ Analit ↓ Keterangan	LNA		EPA		DHA		TME	
	Kadar (ppm)	Area (pA.d)	Kadar (ppm)	Area (pA.d)	Kadar (ppm)	Area (pA.d)	Kadar (ppm)	Area (pA.d)
I	176,4	44,67	125	120,90	250*	62,58	414,4	510,39
II	352,8	93,98	250	259,41	500	180,69	414,4	555,26
III	529,2	127,51	500*	398,12	1000	438,88	414,4	533,99
IV	705,6	176,23	750	697,19	1500	-	414,4	559,22
					1500	669,68	414,4	472,42
V	882*	238,73	1000	938,11	2000	1058,87	414,4	542,40
Koef. korelasi (r)	0,9932		0,9950		0,9988			
Lereng = b	4,825.10 <sup>-4</sup>		1,6783.10 <sup>-3</sup>		1,0606.10 <sup>-3</sup>			
Intersep = a	- 5,174.10 <sup>-3</sup>		4,0610.10 <sup>-3</sup>		- 0,1858			
S <sub>y</sub>	0,01825		0,0693		0,04251			
(S <sub>y</sub> /b): X <sub>rerata</sub> x 100	35,41 ppm (6,69%)		41,29 ppm ( 7,86%)		40,08 ppm (3,81%)			
R <sub>0,05</sub> untuk n=5	0,878							

Keterangan tabel V.2.:

\* data ditolak untuk mendapatkan 4 data dengan koefisien korelasi (r) lebih baik

Persamaan garis regresi :  $Y = bx + a$

$Y = A_{baku}/A_{baku\ internal}$        $x = \text{konsentrasi (ppm)}$

Bila hanya menggunakan 4 data ( yaitu data minimum untuk kurva kalibrasi menurut (Jeffery, 1989), maka koefisien korelasi ( $r$ ) masing-masing analit adalah sebagai berikut :

$$\text{- LNA : } r = 0,9996 \quad , y = 4,265 \cdot 10^{-4} x + 145,7 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{- EPA : } r = 0,9991 \quad , y = 1,672 \cdot 10^{-3} x + 31,63 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{- DHA : } r = 0,9994 \quad , y = 1,095 \cdot 10^{-3} x - 239,6 \cdot 10^{-3}$$

Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa ada korelasi linier antara kadar analit (hasil esterifikasi analit baku LNA, EPA dan DHA) dengan respon detektor. Berarti penentuan kadar analit dalam sampel dapat dilakukan pada rentang kadar tersebut.

Faktor yang mempunyai pengaruh cukup besar/menyebabkan variasi pada tahap ini adalah proses derivatisasi dan ekstraksi analit. Baku Internal TME ditambahkan untuk mengeliminasi pengaruh variasi volume ekstraksi (dan variasi volume injeksi kedalam KG/instrumen). Pengaruh baku internal terhadap presisi metode ini dicantumkan dalam bab V.1.4. berikut.

#### V.1.4. Presisi dan akurasi

##### V.1.4.1. Presisi Instrumen

Pengujian ini dilakukan dengan cara menginjeksikan (beberapa kali) larutan baku yang mengandung metil ester LNA (529,2 ppm), EPA (500 ppm), DHA (1000 ppm) dan TME (414,4 ppm sebagai baku internal), pada hari yang sama (*repeatabilitas*) dan pada hari yang berbeda (*reproducibilitas*). Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui besarnya variasi volume injeksi larutan ke dalam instrumen/respon detektor.

Data uji *repeatabilitas* instrumen untuk analisis LNA, EPA dan DHA, tercantum di lampiran 3.a. Dari data tersebut diketahui bahwa *repeatabilitas* (absolut) untuk LNA, EPA, DHA berturut-turut (4,10%, 2,68%, 2,62%), tetapi dengan menggunakan baku internal *repeatabilitas* menjadi lebih baik, yaitu 1,01% (LNA), 2,32% (EPA), kecuali DHA 4,56%. Menurut Cunniff P., 1995, untuk komponen mayor (>5%), maksimum *repeatabilitas* relatif adalah 3%. Jadi *repeatabilitas* DHA dengan kondisi yang digunakan ini belum baik.

Uji *reproducibilitas* yang dilakukan dalam kurun 3 bulan terhadap campuran baku LNA, (529,2 ppm), EPA (500 ppm), DHA ( 1000 ppm) dan TME (414,4 ppm sebagai baku internal), tercantum di lampiran 3.b. Data tersebut menunjukkan bahwa *reproducibilitas* instrumen memenuhi syarat bila digunakan baku internal. *Reproducibilitas* relatif LNA (3,14%), EPA (2,53%), dan DHA (4,07%) (masing-masing sesuai syarat Cunniff P., 1995, yaitu kurang dari 10% ).

#### V.1.4.2. Presisi dan akurasi proses ekstraksi metil ester

Uji presisi dan akurasi proses ekstraksi dilakukan terhadap senyawa baku metil arakidonat (AME) dan metil trikosanoat (TME) yang diproses sesuai tahap (IV.5.4.) dengan replikasi 6 kali. Sebagai pembanding adalah larutan AME/TME dalam heptana (tanpa diproses/ekstraksi). Hasilnya terinci dalam lampiran 4. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa cara ekstraksi metode ini sudah baik (rekoveri TME dengan kadar 414,4 ppm adalah 103,45% , presisi 3,18%). Tetapi bila kadar analit kecil presisinya tidak baik (AME dengan kadar 100 ppm, rekoveri 99,66%, presisi 15,90%) .

#### V.1.4.3. Presisi proses esterifikasi LNA, EPA, DHA baku dan ekstraksi hasil esterifikasi

Presisi tahap ini dihitung berdasarkan prosen koefisien variasi (% KV) dari penentuan kadar baku LNA, EPA dan DHA (secara mandiri) yang diproses sesuai tahap IV.5.4, dengan replikasi 6 kali. Hasilnya tercantum dalam tabel V.3.

Tabel V.3. Presisi proses esterifikasi LNA, EPA, DHA baku dan ekstraksi hasil esterifikasi

Replikasi	LNA (2942,5 ppm)			EPA (500 ppm)			DHA (500 ppm)		
	Area LNA	Area AME	$A_{LNA}/A_{AME}$	Area LNA	Area AME	$A_{LNA}/A_{AME}$	Area DHA	Area AME	$A_{LNA}/A_{AME}$
1	334,96	65,45	5,118	78,31	54,17	1,4456	335,33	43,88	7,642
2	304,60	59,08	5,156	75,08	52,72	1,4241	253,45	34,92	7,258
3	286,95	58,21	4,930	71,48	51,75	1,381	497,03	55,87	8,896
4	378,45	75,60	5,006	63,87	50,76	1,258	453,86	56,45	8,040
5	413,08	83,93	4,922	67,44	50,146	1,345	421,00	51,92	8,108
Rerata	343,61	68,45	5,026	71,24	51,91	1,371	392,13	48,61	7,989
SD	52,07	11,09	0,107	5,778	1,60	0,074	97,60	9,15	0,611
KV	15,15 %	16,21%	2,13%	8,11%	3,08 %	5,40%	24,89%	18,82%	7,65%

Data tabel V.3. menunjukkan bahwa deviasi absolut hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA cukup besar, yaitu, berturut-turut, 15,15%, 8,111%, 24,89%. Tetapi dengan adanya baku internal KV menjadi lebih baik (menjadi 2,13%, 5,40 %, 7,65%). Hal ini menyebabkan penambahan baku internal harus dilakukan pada setiap replikasi. Besarnya deviasi tersebut diduga karena, terutama, fluktuasi kesempurnaan reaksi pembentukan ester (derivatisasi), selain juga karena injeksi ke dalam *inlet* yang dilakukan secara *manual*. Disimpulkan demikian karena hasil perolehan kembali ekstraksi AME maupun TME, yang diproses dengan cara yang sama, adalah antara 99,66%-103,45% ( lampiran 4).

#### V.1.4.4. Akurasi dan presisi metode

Uji akurasi metode dilakukan menggunakan cara *fortified* (Cunnif P., 1995), yaitu berdasarkan prosentase rekovery jumlah baku LNA, EPA dan DHA yang ditambahkan ke dalam sampel sebelum proses derivatisasi dilakukan. Hasilnya dicantumkan pada tabel V.4.

Uji akurasi ini dilakukan dengan menggunakan hasil ekstraksi kupang merah sebagai matrik. Hal ini dilakukan karena kromatogram hasil derivatisasi ekstrak kupang merah lebih kompleks (puncak senyawa pengganggu lebih banyak).

Jumlah masing-masing analit baku yang diadisi adalah 100 µL 11.770 ppm LNA, 100 µL 5000 ppm EPA dan 100 µL 10.000 ppm DHA. (Contoh cara perhitungan rekovery tercantum di lampiran 5).

Tabel V.4. Akurasi dan presisi metode penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam sampel

Repli- kasi	Konsentrasi LNA (mg/100g daging)				Konsentrasi EPA (mg/100g daging)				Konsentrasi DHA (mg/100g daging)			
	Total	Asal	Adisi	%Re	Total	Asal	Adisi	%Re	Total	Asal	Adisi	%Re
1	14,23		4,703	111,9	3,365		1,998	29,83	8,797		3,996	128,8
2	14,60		4,705	119,7	3,729		1,999	48,02	9,511		3,998	146,5
3	13,55		4,706	97,34	3,507		1,999	36,92	9,068		3,998	135,5
4	12,83		4,699	82,17	1,984*		1,996	*	8,828		3,992	129,6
5	9,853		4,685	18,87*	3,012		1,990	12,17	4,428*		3,980	*
6	10,34		4,689	29,23*	3,130		1,992	18,12	4,488*		3,984	*
Rata- rata	12,57	8,969		102,8	3,349	2,769		29,01	9,051	3,652		135,1
SD	2,01			16,57	0,288			14,37	0,330			8,166
%KV	16,01			16,12	8,589			49,55	3,64			6,04

Keterangan tabel V.4 :

\* = Data ditolak (*reject*) karena menyimpang 4 SD dari kelompoknya.

Total = Kadar total analit yang diperoleh setelah ekstrak Kupang Merah diadisi dengan analit baku dan diproses sesuai tahap IV.6.4, dalam satuan mg/100 gram daging

Asal = Kadar rata-rata analit sesuai tabel V.5, dalam satuan mg/100 gram daging

Adisi = Kadar analit yang ditambahkan ke dalam ekstrak Kupang Merah dihitung dalam satuan mg/100 gram daging yang diadisi

% Re = rekovery =  $\{(Total - Asal) : Adisi\} \times 100 \%$

Hasil uji ini menunjukkan bahwa akurasi dan presisi metode ini belum baik. Faktor yang dicurigai sebagai penyebabnya adalah kesempurnaan ekstraksi lemak dari daging kerang. Sebab, kadar lemak kerang sangat kecil (dihitung dari berat basah), yaitu 0,0369 % (kupang merah) dan 0,941 % (kupang putih), sedangkan proses ekstraksinya panjang (sebelum sampai tahap esterifikasi dan ekstraksi metil ester analit, yang presisi relatifnya <10%, tabel V.3.). maka variasi besar hasil ekstraksi lemak dapat terjadi.

Hal ini sesuai dengan kesimpulan Jochum M, 2004 dalam penelitiannya tentang penentuan kadar asam lemak omega-3 dari makanan tambahan (*supplemented food samples*) yang menunjukkan bahwa ekstraksi lemak menggunakan soxhlet-petroleum eter menghasilkan rekoveri asam lemak omega-3 rendah.

Pada umumnya ekstraksi lemak dari sampel daging dilakukan pada sampel yang sudah dikeringkan (Cunnif P., 1995). Tetapi pada penelitian ini ekstraksi dilakukan langsung terhadap daging basah dengan kadar air 81,85% (kupang putih) dan 83,82 % (kupang merah), karena analit dikhawatirkan akan rusak pada pemanasan. Hal ini dilakukan karena proses pengeringan baku adalah menggunakan oven suhu 100°C-102°C, sedangkan asam lemak omega-3 tidak tahan pemanasan.

Diperkirakan adanya air dalam sampel menghambat kesempumaan ekstraksi lemak. Selain itu *design* ekstraktor (soxhlet) diperkirakan juga mempengaruhi proses ekstraksi ini, karena dari hasil pengamatan, alat gelas (ukuran dan merek sama) menghasilkan ekstrak yang intensitas warna (kuning) yang tidak sama. Jochum M, 2004 menyebutkan kemungkinan terjadinya kompleks karbohidrat-lemak menyebabkan rendahnya rekoveri. Untuk itu perlu tahap hidrolisis sebelum proses ekstraksi dilakukan.

## V.2. Hasil Penentuan Kadar LNA, EPA, DHA dalam Kupang Merah

Hasil penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam kupang merah yang dilakukan sesuai prosedur IV.6.4 tercantum dalam tabel V.5 berikut.

Tabel V.5. Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam Kupang merah

Replikasi	Kadar LNA (mg/100 gram)	Kadar EPA (mg/100 gram)	Kadar DHA (mg/100 gram)	Keterangan
1	9,871	2,697	3,992	Kadar air sampel = (83,82± 0,26) %  Kadar minyak sampel = (0,03691± 1,43.10 <sup>-3</sup> ) % dari berat basah
2	9,761	2,860	4,124	
3	8,821	2,516	3,674	
4	5,989*	1,349*	3,174	
5	5,214*	1,775*	1,875*	
6	7,424	3,004	3,298	
<b>Rerata</b>	<b>8,969</b>	<b>2,769</b>	<b>3,652</b>	
<b>SD</b>	<b>1,133</b>	<b>0,2103</b>	<b>0,4161</b>	
<b>% KV</b>	<b>12,63</b>	<b>7,594</b>	<b>11,39</b>	

Keterangan tabel V.5 :

\* data ditolak (*reject*) karena menyimpang 4SD dari kelompoknya.

## V.3. Hasil Penentuan Kadar LNA, EPA, DHA dalam Kupang Putih

Hasil penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam kupang putih yang dilakukan sesuai prosedur IV.6.4 tercantum dalam tabel V.6. berikut.

Tabel V.6. Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam kupang putih

Replikasi	Kadar LNA (mg/100 gram)	Kadar EPA (mg/100 gram)	Kadar DHA (mg/100 gram)	Keterangan
1	5,877*	3,294	3,886	Kadar air sampel = (81,65 ± 0,35)%
2	11,60	8,546	11,11	
3	5,825*	3,354	3,577	
4	11,52	5,799	5,335	
5	13,34	10,25	8,604	
6	12,79	7,860	7,144	
Rerata	12,31	6,517	6,609	Kadar minyak sampel = (0,9415 ± 0,0221)% dari berat basah
SD	0,898	2,855	2,924	
% KV	7,294	43,81	44,24	

Keterangan tabel V.6 :

\* data ditolak (*reject*) karena menyimpang 4SD dari kelompoknya.

Dengan koefisien variasi yang besar tersebut di atas berarti untuk mengetahui kadar LNA, EPA, DHA yang pasti (akurasi lebih tinggi) perlu dilakukan upaya perbaikan proses ekstraksi lemak yang digunakan, misalnya pengeringan daging menggunakan *freeze drying* (pengeringan *vacuum*) atau dengan cara yang dilakukan oleh Jochum.M, 2004 untuk *food supplement* yaitu sekaligus esterifikasi menggunakan pereaksi etanol/Asam Sulfat 20:1 (v/v) di bawah refluks. Pustaka tersebut memperkirakan ± 10% dari ester akan hilang dengan cara ekstraksi tersebut (sekali-gus esterifikasi)

#### V.4. Hasil Penentuan Kadar LNA, EPA, DHA dalam Remis

Hasil penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam remis yang dilakukan sesuai prosedur IV.6.4 tercantum dalam tabel V.7. berikut.

Tabel V.7. Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam remis

Replikasi	Kadar LNA (mg/100 gram)	Kadar EPA (mg/100 gram)	Kadar DHA (mg/100 gram)	Keterangan
1	44,88	7,380	9,915	Kadar air sampel = 70,33% ± 0,20%
2	28,50	4,877	6,339	
3	34,59	5,743	7,501	
4	26,62	4,343	5,550	
5	39,39	5,808	7,507	
6	35,09	5,726	7,316	
Rerata	34,84	5,646	7,355	
SD	6,773	1,033	1,476	
% KV	19,44	18,30	20,07	

Dengan hasil validasi tidak memuaskan ini, yang dapat dipastikan adalah bahwa dalam Kupang merah, Kupang putih maupun Remis mengandung LNA, EPA maupun DHA dengan kadar minimal sebagai berikut (tabel V.8).

Tabel V.8. Resume penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam sampel kupang merah, kupang putih dan remis

Sampel	Kadar dalam satuan mg/100g daging basah		
	LNA	EPA	DHA
Kupang Merah	8,97 ± 1,13	2,77 ± 0,21	3,65 ± 0,42
Kupang Putih	12,31 ± 0,90	6,52 ± 2,86	6,61 ± 2,92
Remis	34,84 ± 6,77	5,64 ± 1,03	7,35 ± 1,48

Dibandingkan dengan kadar EPA dan DHA dalam ikan Salmon *chinook* , yaitu 0,8% EPA dan 0,6 % DHA (Hui, 1992), kadar EPA dan DHA dalam sampel tersebut diatas ± 100 kali lebih kecil.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

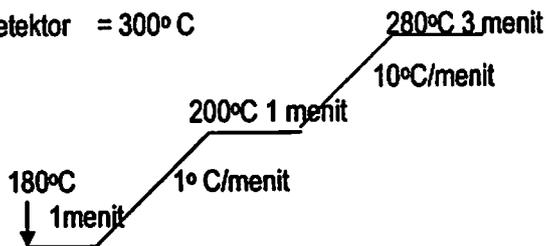
#### VI.1. Kesimpulan

##### VI.1.1. Validitas metode

Kondisi optimum Kromatograph Gas, menggunakan kolom HP 5, untuk analisis asam lemak omega 3, khususnya LNA, EPA, DHA yang diperoleh dalam penelitian ini adalah :

Suhu Inlet = 250°C

Suhu detektor = 300°C



Laju He = 1,1 ml/menit

Split = 1:10

Kondisi tersebut telah memenuhi persyaratan validitas instrumen untuk analisis kualitatif dan kuantitatif LNA, EPA, DHA. Persyaratan tersebut meliputi repetabilitas, reproduktibilitas,  $R_s$  dan selektivitas ( $\alpha$ ).

Validasi metode analisis yang dilakukan menunjukkan bahwa dengan menggunakan baku internal metil trikosanoat (TME) diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Kadar analit dalam rentang kadar yang diteliti, yaitu LNA (176,4-882) ppm, EPA (125-1000) ppm dan DHA (250-2000) ppm, menunjukkan hubungan linier dengan perbandingan area ( $A_{\text{analit}}/A_{\text{TME}}$ ) yang diperoleh.
- Presisi proses esterifikasi LNA, EPA dan DHA baku cukup baik, masing-masing adalah (2,13%, 5,40% dan 7,65%). Faktor kritis yang menyebabkan penurunan presisi adalah kesempurnaan pembentukan ester (derivatisasi). Karena proses tersebut dilakukan dalam tabung reaksi, maka tekanan dalam tabung sering kurang terkontrol dan meletup/memecahkan tabung (ketebalan tabung tidak sama, meskipun sudah dipilih merek tertentu). Sedangkan kesempurnaan ekstraksi metil ester (AME, TME) tidak bermasalah (rekoveri 99,66%-103,4%).
- Akurasi dan presisi metode analisis LNA, EPA, DHA dalam sampel kupang merah yang dilakukan dengan cara *fortified* ternyata belum baik, masing-masing rekoveri LNA ( $102,8\% \pm 16,57\%$ ), EPA ( $29,01\% \pm 14,37\%$ ) dan DHA ( $135,1\% \pm 8,17\%$ ). Kondisi

tersebut disebabkan karena ekstraksi lemak dari daging sampel tidak sempurna (ada sebagian lemak yang tidak tersari).

### VI.1.2. Kadar LNA, EPA dan DHA dalam kupang merah, kupang putih dan remis

Dengan hasil validasi metode tidak memuaskan tersebut, yang dapat dipastikan adalah bahwa dalam kupang merah, kupang putih maupun remis mengandung LNA, EPA maupun DHA dengan kadar minimal sebagai berikut (tabel V.8):

Tabel V.8. Hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam sampel kupang merah, kupang putih dan remis

Sampel	Kadar dalam satuan mg/100g daging basah		
	LNA	EPA	DHA
Kupang Merah	8,97 ± 1,13	2,77 ± 0,21	3,65 ± 0,42
Kupang Putih	12,31 ± 0,90	6,52 ± 2,86	6,61 ± 2,92
Remis	34,84 ± 6,77	5,64 ± 1,03	7,35 ± 1,48

Hasil tersebut menunjukkan kadar EPA dan DHA dalam sampel tersebut diatas ± 100 kali lebih kecil dibandingkan dengan kadar EPA dan DHA dalam ikan Salmon *chinook*, yang merupakan makanan sumber utama EPA dan DHA, yaitu 0,8% EPA dan 0,6 % DHA (Hui, 1992).

### VI.2. Saran

Kondisi optimum instrumen, proses esterifikasi lemak dan proses ekstraksi metil ester yang terbentuk, yang diperoleh dalam penelitian ini dapat digunakan untuk penentuan kadar LNA, EPA dan DHA dalam lemak dengan akurasi dan presisi yang memenuhi syarat.

Tahap ekstraksi lemak dari daging kerang (tahap awal preparasi sampel untuk penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam daging), disarankan untuk tidak menggunakan cara ekstraksi langsung dengan petroleum eter, karena rekovernya akan rendah. Mengingat kadar lemak dalam daging tersebut relatif kecil sedangkan kadar airnya besar maka disarankan untuk mengeringkan sampel sebelum proses ekstraksi menggunakan pengeringan tanpa pemanasan (misalnya *freeze drying*), karena LNA, EPA, DHA peka terhadap pemanasan

## DAFTAR PUSTAKA

1. Agilent Technologies. Inc, 2003, **Manual Agilent ChemStation**, Understanding Your ChemStation, Agilent Technologies. Inc.
2. Cunnif.P., 1995, **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemist (AOAC)**, edisi 16, AOAC International, Chapter 35, hal. 1, 10, Chapter 41, hal. 17-21.
3. Day R.A.Jr., A.L. Underwoods, 1991, **Quantitative Analysis**, 6<sup>th</sup> edition, Prentice-Hall international edition, pages 32-37.
4. Egan H., Ronald.S.K., Ronald.S., 1988, **Pearson's Chemical Analysis of Foods**, 8<sup>th</sup> edition, Longman Scientific & Technical, hal. 507-508, 525-530, 420-421.
5. Fessenden and Fessenden, 1981, **Organic Chemistry**, Willard Grant Press, Boston, pages 870-871.
6. Hui.Y.H., 1992, **Encyclopedia of Food Science and Technology**, Vol.3., John Wiley & Sons, , hal. 1925-1945.
7. Jeffery G.H., J. Bassett, J. Mendham, R.C. Denney, 1989, **Vogel's Textbook of qualitative Chemical Analysis**, 5<sup>th</sup> edition, English language Book Society Longman, England, hal. 235-251.
8. Jochum.M, H.Engelhardt, 2004, <http://www.uni-sb.de/matfak/fb12/iaua>
9. Linder.C.M., **Biokimia Nutrisi dan metabolisme**, UI Press, 1992, hal. 89-85.
10. O'Neil M. J., 2001, **The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**, 13<sup>th</sup> edition, Merck Research laboratories Division of Merck and Co.,Inc., Whitehouse Station, NJ, 3432, 3562 .
11. Prayitno S., Tri S., 2001, **Kupang dan produk Olahannya**, Kanisius
12. Skoog, D.A, F. James H., Timothy A. N., 1998, **Principles of Instrumental Analysis**, 5<sup>th</sup> edition , Saunders College Publihsing , halaman 688, 701-722,A-1-A-19
13. The Analyst™ , 2002 , , **Analysis Treatments Essential Fatty acids.htm**, last updated oct 10.,(8000 356-1688. <http://www.restekcorp.com>)
14. United States Pharmacopeial Convention.Inc, 2000, **The Official Compendia of Standards, USP 24/NF 19**, Board of Trustees, Rockville, Maryland.
15. Yuwono.M.,et.all, 2002, Protein, amino acid and lipid contents of *Corbicula javanica* Mousson, **Folia medica**, No2, June, hal. 95-100

**LAMPIRAN 1**  
**Contoh Perhitungan Linieritas**

Data uji linieritas dari EPA adalah sebagai berikut :

KODE	EPA		MTE		Y A <sub>EPA</sub> /A <sub>MTE</sub>
	X Kadar (ppm)	Area (pA*s)	Kadar (ppm)	Area (pA*s)	
I	125	120,90	414,4	510,39	0,2369
II	250	259,41	414,4	555,26	0,4672
III	500	398,12	414,4	533,99	0,7456
IV	750	697,19	414,4	472,42	1,2467
V	1000	938,11	414,4	542,40	1,7295

$$r = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sqrt{[\sum x^2 - (\sum x)^2/n] \cdot [\sum y^2 - (\sum y)^2/n]}} = 0,9950$$

$$Y = bx + a$$

$$b = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n} = 1,6783 \cdot 10^{-3} \quad a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} = 4,0610 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Standar deviasi regresi ( } S_y \text{ )} = \sqrt{\frac{D - b^2 C}{n-2}} = 0,0693$$

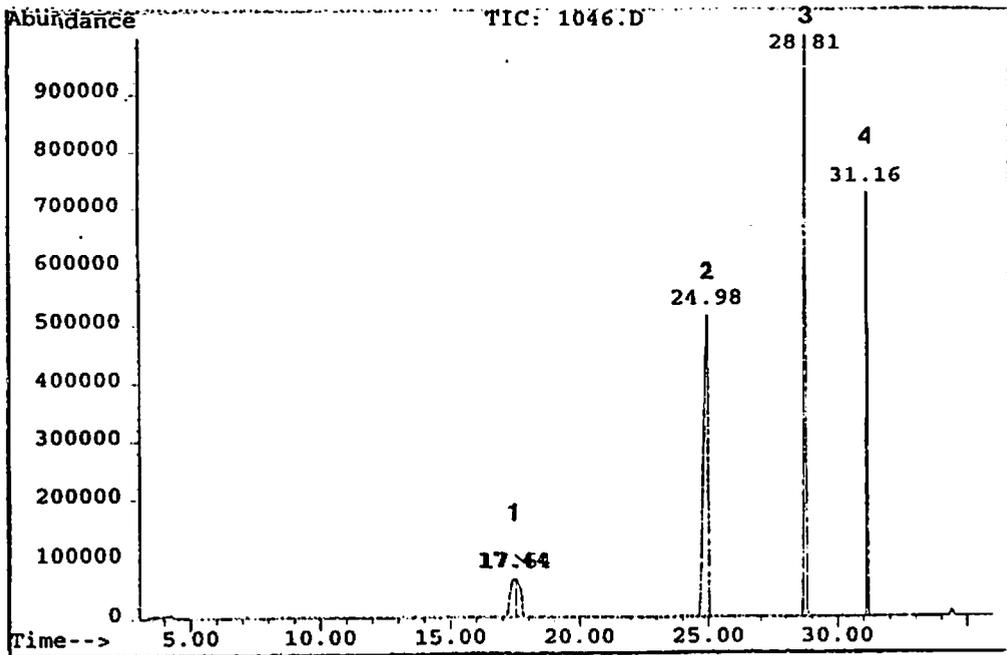
$$C = (\sum x^2 - (\sum x)^2/n) = 512500 \quad D = (\sum y^2 - (\sum y)^2/n) = 1,4580$$

$$\text{Standar deviasi slope ( } S_b \text{ )} = S_y / \sqrt{C} = 9,68 \cdot 10^{-5}$$

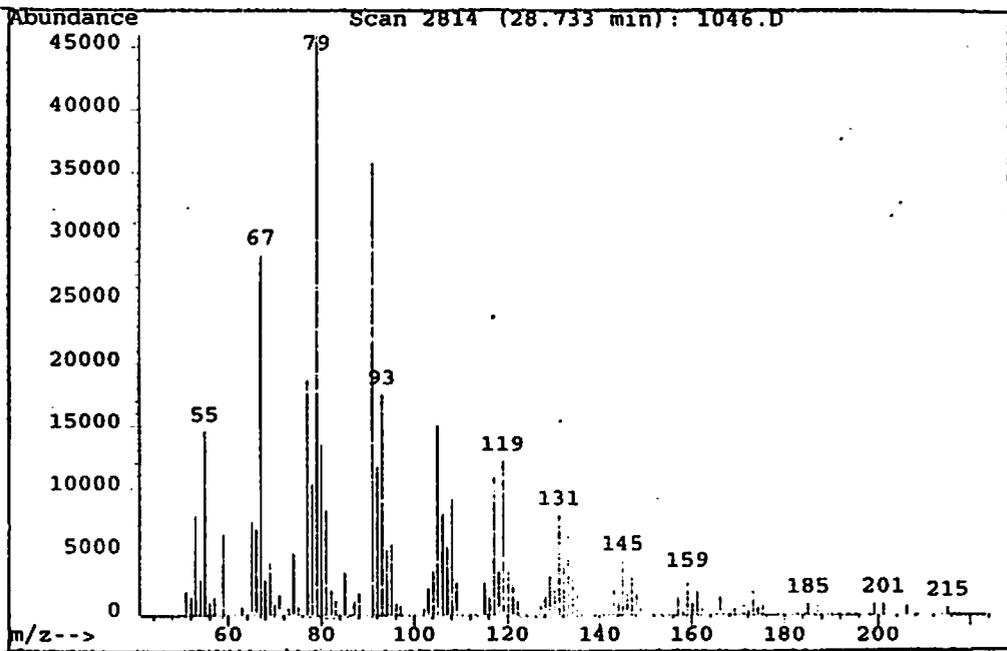
$$\text{Standar deviasi intersep ( } S_a \text{ )} = S_y \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}} = 0,0595$$

### LAMPIRAN 2

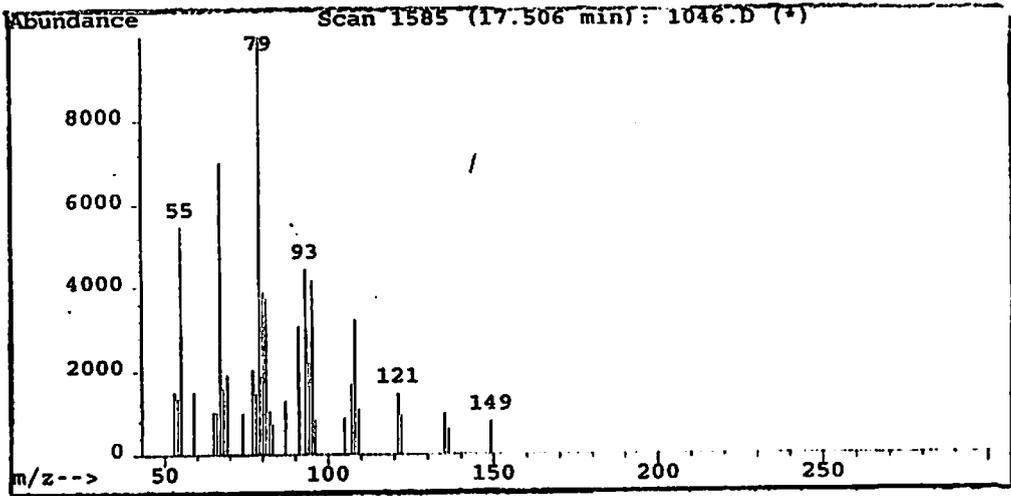
#### Hasil Analisis Kualitatif LNA, EPA, DHA Menggunakan GC-MSD



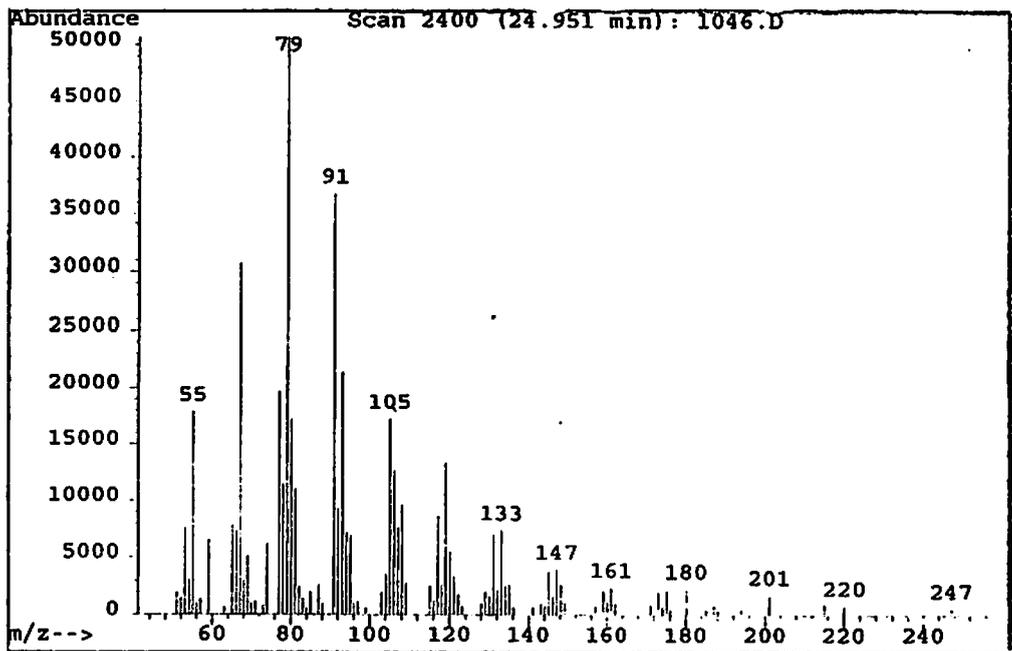
Gambar VII.1. Kromatogram baku LNA, EPA, DHA, TME menggunakan GC-MSD



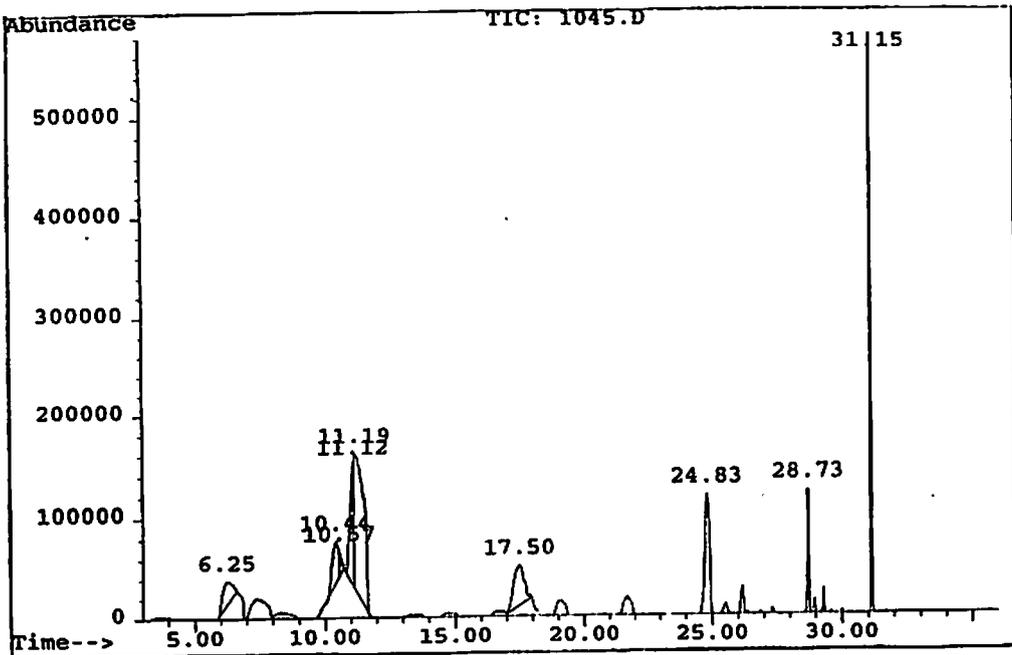
Gambar VII.2. Spektrogram baku DHA menggunakan GC-MSD



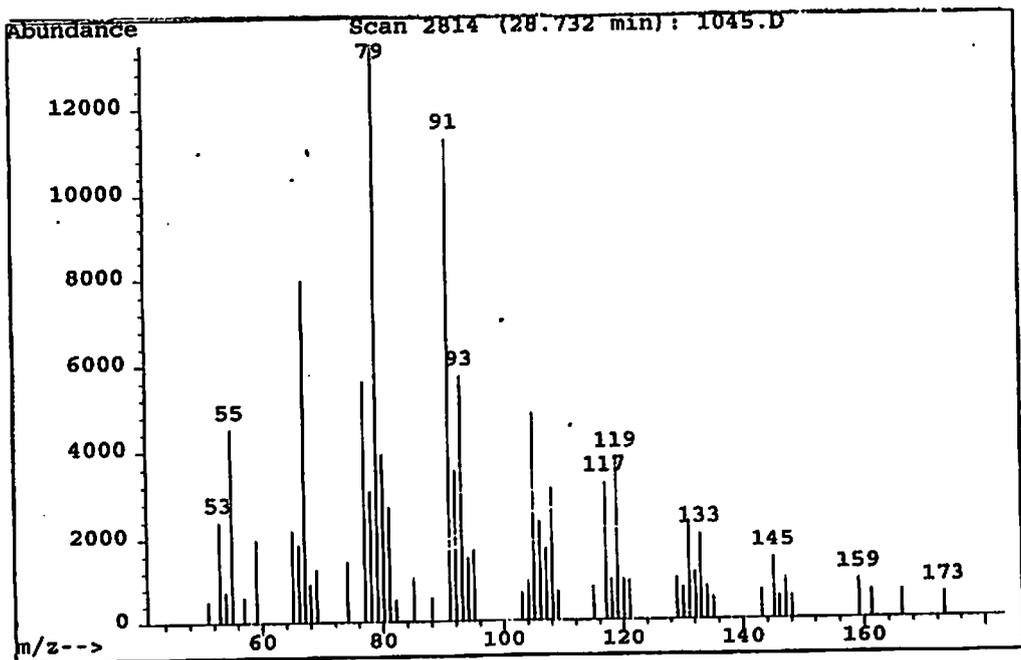
Gambar VII.3. Spektrogram baku LNA menggunakan GC-MSD



Gambar VII.4. Spektrogram baku EPA menggunakan GC-MSD



Gambar VII.5. Kromatogram Ester Asam Lemak dalam Kupang Merah menggunakan GC-MSD



Gambar VII.6. Spektrogram DHA Sampel yang Berasal dari Kupang Merah menggunakan GC-MSD

**Kesimpulan kemiripan analit dengan LNA, EPA, DHA baku**

## Information from Data File:

: C:\HPCHEM\1\DATA\1045.D  
 ator : msh  
 ired : 4 Oct 104 12:26 pm using AcqMethod NARKOBA2  
 le Name: K M R 15 ( 31/ 9 )  
 Info : Fak Farmasi Unair ( Asri )  
 Number: 1

ch Libraries: C:\DATABASE\ASRI.L Minimum Quality: 0

own Spectrum: Apex  
 gration Params: AutoIntegrate

RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
6.25	5.83	C:\DATABASE\ASRI.L asri4	1	000000-00-0	38
10.44	6.21	C:\DATABASE\ASRI.L No matches found			
10.57	1.31	C:\DATABASE\ASRI.L No matches found			
11.12	9.82	C:\DATABASE\ASRI.L asri4	1	000000-00-0	35
11.18	33.95	C:\DATABASE\ASRI.L asri4	1	000000-00-0	38
17.50	10.86	C:\DATABASE\ASRI.L asri1 asri2	2 3	000000-00-0 000000-00-0	62 10
24.83	14.23	C:\DATABASE\ASRI.L asri2 asri3 asri1	3 4 2	000000-00-0 000000-00-0 000000-00-0	99 80 9
28.73	4.31	C:\DATABASE\ASRI.L asri3 asri2 asri1	4 3 2	000000-00-0 000000-00-0 000000-00-0	91 74 9
31.15	13.49	C:\DATABASE\ASRI.L  asri4	1	000000-00-0	99

Wed Oct 20 13:49:39 2004

## LAMPIRAN 3

## Repeatabilitas dan Reprodusibilitas Instrumen

Uji presisi instrumen dilakukan dengan cara menginjeksikan (6 kali) larutan baku yang mengandung metil ester LNA (529,2 ppm), EPA (500 ppm), DHA (1000 ppm) dan TME (414,4 ppm sebagai baku internal), pada hari yang sama (*repeatabilitas*) dan pada hari yang berbeda (*reprodusibilitas*). Hasilnya tercantum di bawah ini.

## a. Hasil Uji repeatabilitas KG Agilent 6890, kolom HP-5

Replikasi	LNA 529,2 ppm		EPA 500 ppm		DHA 1000 ppm		TME 414,4 ppm	
	tr	area	tr	Area	tr	area	tr	area
1	18,55	141,65	25,08	418,64	28,39	439,68	30,47	584,04
2	18,55	148,47	25,08	436,00	28,40	445,03	30,46	614,35
3	18,61	137,26	25,09	418,48	28,40	452,92	30,47	574,79
4	18,56	133,04	25,10	403,21	28,41	426,14	30,47	554,82
5	18,59	135,48	25,09	418,48	28,40	457,68	30,47	552,66
6	18,57	134,96	25,10	408,84	28,40	435,22	30,47	552,73
Rerata absolut	18,57	138,48	25,09	417,28	28,40	442,78	30,47	572,23
SD	0,024	5,70	0,01	11,17	0,01	11,61	0,004	24,43
% KV	0,13	4,10	0,04	2,68	0,02	2,62	0,01	4,27
Rerata rel. thd TME		0,2420		0,7297		0,7748		
SD		$2,44 \cdot 10^{-3}$		$1,69 \cdot 10^{-2}$		$3,53 \cdot 10^{-2}$		
% KV		1,01		2,32		4,56		

Hasil uji reprodusibilitas instrumen yang dilakukan dengan cara menginjeksikan (6 kali), dalam kurun waktu 3 bulan terhadap larutan yang sama (tersebut di atas), adalah sebagai berikut.

## b. Hasil Uji Reprodusibilitas KG Agilent 6890, kolom HP-5

Replikasi	LNA 529,2 ppm		EPA 500 ppm		DHA 1000 ppm		TME 414,4 ppm	
	area	$A_{LNA}/A_{TME}$	area	$A_{EPA}/A_{TME}$	Area	$A_{DHA}/A_{TME}$		area
1	123,00	0,2424	369,27	0,7278	392,39	0,7734		507,4
2	143,88	0,2420	441,10	0,7420	483,20	0,8128		594,48
3	141,65	0,2425	418,64	0,7168	439,68	0,7528		584,04
4	121,28	0,2609	356,73	0,7673	357,17	0,7682		464,93
5	154,35	0,2408	476,07	0,7428	527,25	0,8226		640,91
6	144,66	0,2428	429,10	0,7204	443,82	0,7451		595,67
Rerata	138,14	0,2452	415,15	0,7362	440,58	0,7792		
SD	13,14	$7,71 \cdot 10^{-3}$	44,96	0,01866	61,02	0,03171		
KV	9,52 %	3,14 %	10,83 %	2,53 %	13,85 %	4,07 %		

**LAMPIRAN 4****Presisi dan Akurasi Proses Ekstraksi TME dan AME**

Dengan menyuntikkan hasil ekstraksi TME baku maupun AME baku yang diproses seperti tahap IV.5.4. dan membanding hasilnya dengan larutan TME maupun AME yang tidak melalui fase ekstraksi akan diperoleh data sebagai berikut.

Replikasi	AME		TME	
	Area	Konsentrasi (ppm)	area	Konsentrasi (ppm)
1	39,70	82,55	548,69	442,73
2	49,28	102,47	543,05	438,18
3	56,67	117,84	530,59	428,12
4	56,80	118,11	540,26	435,93
5	44,84	93,24	502,37	405,35
6	40,29	83,78	522,95	421,96
<b>Rerata</b>		<b>99,66</b>		<b>428,71</b>
<b>SD</b>		<b>15,90</b>		<b>13,63</b>
<b>KV</b>		<b>15,90%</b>		<b>3,18 %</b>
<b>TME/AME baku tanpa ekstraksi</b>				
- konsentrasi	90,91 ppm		345,3 ppm	
- Area	43,72		427,98	
<b>Konsentrasi seharusnya</b>		<b>100,0 ppm</b>		<b>414,4 ppm</b>
<b>Perolehan kembali</b>		<b>99,66%</b>		<b>103,45 %</b>

## LAMPIRAN 5

## Contoh Cara Perhitungan Rekoveri

Data hasil penentuan kadar LNA, EPA, DHA dalam Kupang Merah berdasarkan Kurva Baku Campuran LNA, EPA, DHA (menggunakan baku internal TME) adalah sebagai berikut.

Keterangan	Kode replikat	Berat sampel gram	LNA (ppm)	EPA (ppm)	DHA (ppm)
Sampel Kupang merah	1	25,2370	1245,56	340,35	503,75
	2	25,2468	1232,12	360,98	520,56
	3	25,2377	1113,09	317,56	463,6
	4	20,0197	599,46*	135,0*	317,7
	5	25,0717	653,6*	222,5*	235,1*
	6	25,0923	931,5	376,9	413,81
Sampel Kupang merah diadisi LNA baku	1	25,0236	1780,54	421,06	1100,62
	2	25,0132	1826,36	466,32	1189,50
	3	25,0112	1694,73	438,56	1130,99
	4	25,0455	1626,80	248,48*	1105,57
	5	25,1230	1237,73*	378,34	556,21*
	6	25,0997	1298,43*	392,82	563,24*

Baku yang di adisikan ke dalam tabung (setiap replikat) masing-masing :

LNA = 100  $\mu$ L 11.770 ppm atau 1,177 mg

EPA = 100  $\mu$ L 5.000 ppm atau 0,5 mg

DHA = 100  $\mu$ L 10.000 ppm atau 1,0 mg

## Perhitungan :

## a. Kadar LNA dalam replikat 1

Berdasarkan kurva baku ( $A_{LNA}/A_{TME}$  vs  $C_{LNA}$ ) diperoleh konsentrasi LNA 1245,56 ppm, untuk penimbangan sampel 25,2370 gram atau 2 ml ekstrak heptan. Jadi tiap 100 gram sampel mengandung LNA sebesar :

$$(2/1000 \times 1245,56) \text{ mg} \times 100\text{g}/25,2370 = 9,871 \text{ mg}/100 \text{ gram sampel}$$

Dengan cara perhitungan yang sama, rata-rata kandungan LNA dalam daging Kupang Merah dengan replikasi 6 kali ( data replikat 4 dan 5 di tolak, karena menyimpang >4 SD dari data yang lain ) adalah  $(8,969 \pm 1,133)$  mg/100 gram daging kupang merah.

**b. Rekoveri LNA dalam Kupang Merah yang diadisi LNA baku 1,177 mg/tabung**

(data replikat 1 adisi).

Berdasarkan kurva baku ( $A_{LNA}/A_{TME}$  vs  $C_{LNA}$ ) diperoleh konsentrasi total LNA 1780,54 ppm, untuk penimbangan sampel 25,0236 gram atau 2 ml ekstrak heptan. Jadi tiap 100 gram sampel mengandung LNA Total sebesar :

$$(2\text{mL}/1000\text{mL} \times 1780,54) \text{ mg} \times 100\text{g}/25,0236 = 14,23 \text{ mg}/100 \text{ gram sampel}$$

LNA baku yang diadisi 1,177 mg/tabung, atau dalam tiap 100 gram sampel adalah :

$$100 \text{ g}/25,0236 \text{ g} \times 1,177 \text{ mg} = 4,70 \text{ mg}/100 \text{ gram sampel}$$

$$\text{Rekoveri} = \{(14,23 \text{ mg} - 8,969 \text{ mg}) : 4,70\} \times 100\% = \underline{\underline{111,94\%}}$$