

PENENTUAN KADAR KOLESTEROL DENGAN METODE KROMATOGRAFI GAS

Laila Khamsatul Muharrami

Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Pertanian

Korespondensi : Jl. Raya telang PO BOX 2 Kamal-Bangkalan, Email: laila@trunojoyo.ac.id

ABSTRACT

The methods for quantitative determination of cholesterol in foods by chromatography determination Two types of lipid classes including free cholesterol and cholesterol ester exist in food. Total cholesterol is measured after chemical hydrolysis of cholesterol esters to free cholesterol Prior to instrumental analysis, cholesterol is extracted from the food sample and saponified. The amount of the food sample depends on the cholesterol content; a sample containing ~1 mg of cholesterol is required for lipid extraction. Saponification hydrolyzes the carboxyl group attached to carbon in cholesterol and yields only free cholesterol in unsaponifiable matter. The unsaponifiable matter can be extracted by n-hexane, diethyl ether, or petroleum ether. In the present protocol, unsaponifiable matter is extracted using n-hexane. This protocol requires prior knowledge of GC methodologies and adherence to instructions from the instrument's manufacturer.

Key words: cholesterol, foods, capillary gas chromatography

PENDAHULUAN

Kolesterol merupakan salah satu komponen susu yang terdapat dalam lapisan tipis lemak susu. Sebagian besar lemak di dalam tubuh dan makanan terdapat dalam bentuk trigliserida, yang dapat berbentuk lemak jenuh dan lemak tak jenuh. Lemak jenuh terutama ditemui dalam makanan berasal dari hewan meliputi mentega, daging berlemak, organ-organ tubuh, dan susu berlemak sedangkan dari bahan makanan nabati tertentu seperti santan, minyak kelapa, dan minyak kelapa sawit. Lemak tak jenuh dijumpai dalam bahan makanan dari tumbuhan macam minyak tumbuhan selain minyak kelapa dan kelapa sawit, alpukat, dan makanan nabati lainnya. Kolesterol dalam jumlah yang sedikit pada tubuh diperlukan untuk proses-proses tertentu bagi kelangsungan hidup. Akan tetapi, kalau jumlahnya berlebihan maka kolesterol akan membuat darah menjadi lebih kental, lebih berlemak sehingga mengancam bagi kelancaran peredaran darah apalagi jika sudah menempel di dinding pembuluh darah atau mengendap membuat sumbatan pada pembuluh darah kecil.

Kadar kolesterol total yang dianggap ideal adalah dibawah 200 mg/dL. (General hospital Singapore). Perhatian terhadap kolesterol dimulai sejak adanya pendapat tentang kaitan antara konsumsi kolesterol dan insiden penyakit jantung koroner. Hal ini menekankan akan pentingnya penentuan kolesterol pada makanan hewani, termasuk daging, telur, susu dan produk-produk lainnya. Timbulnya konsensus pembatasan kolesterol ikut memperbaiki peraturan kesehatan yang dihasilkan dalam pedoman baru pengadaan makanan yang khusus membutuhkan kolesterol.

Oleh karena itu, penentuan kadar kolesterol dalam makanan menjadi penting. Beberapa metode yang digunakan untuk menentukan kadar kolesetrol antara lain Kromatografi Gas, HPLC dan *enzimatic measurement*.

Penentuan kolesterol dalam makanan dengan metoda kromatografi gas lebih banyak disukai karena metodanya yang cukup sederhana. Kolesterol merupakan fraksi lemak yang tidak tersabunkan. Metode kromatografi gas memerlukan preparasi sebelum analisis yang meliputi : ekstraksi lipida total, menguapkan pelarut yang digunakan,

saponifikasi alkalis dari lipida, ekstarksi senyawa tak tersaponifikasi dengan pelarut organik, menguapkan pelarut yang dipakai, derivatisasi senyawa tak tersaponifikasi dianalisis dengan kromatografi. Metode lain yang lebih singkat adalah dengan mengadakan saponifikasi langsung dari sample kemudian diteruskan dengan ekstraksi media alkali tersebut dengan pelarut organik dan penentuan dengan kromatografi gas. Review ini bertujuan untuk melaporkan penentuan kadar kolesterol dengan metode kromatografi gas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kolesterol

Kolesterol merupakan salah satu sterol yang penting dan banyak terdapat di alam. Kolesterol terdapat pada hampir semua sel hewan dan manusia. Pada tubuh manusia kolesterol terdapat dalam darah, empedu, kelenjar adrenal bagian luar dan jaringan syaraf. Mula-mula kolesterol diisolasi dari batu empedu karena kolesterol ini merupakan komponen utama batu empedu tersebut. Kolesterol dapat larut dalam pelarut lemak misalnya eter, kloroform, benzena dan alkohol panas. Apabila terdapat dalam konsentrasi tinggi kolesterol mengkristal dalam bentuk kristal yang tidak berwarna, tidak terasa, tidak berbau dan mempunyai titik lebur 150°-151°C. Endapan kolesterol apabila terdapat dalam pembuluh darah dapat menyebabkan penyempitan pembuluh darah karena dinding pembuluh darah menjadi lebih tebal. Hal ini mengakibatkan berkurangnya kelenturan pembuluh darah sehingga aliran darah terganggu dan untuk mengatasi gangguan ini jantung harus memompa darah lebih keras

Kolesterol dalam jumlah yang sedikit pada tubuh diperlukan untuk proses-proses tertentu bagi kelangsungan hidup. Akan tetapi, kalau jumlahnya berlebihan maka kolesterol akan membuat darah menjadi lebih kental, lebih berlemak sehingga mengancam bagi kelancaran peredaran darah apalagi jika sudah menempel di dinding pembuluh darah atau mengendap membuat sumbatan pada pembuluh darah kecil. Kadar kolesterol total yang dianggap ideal adalah dibawah 200 mg/dL. (General hospital Singapore) Kolesterol dalam tubuh manusia terdapat

dalam darah, empedu, kelenjar adrenal bagian luar dan jaringan syaraf. Mula-mula kolesterol diisolasi dari batu empedu karena kolesterol ini merupakan komponen utama batu empedu tersebut. Kolesterol dapat larut dalam pelarut lemak, misalnya heksana, eter, kloroform, benzena dan alkohol panas. Kolesterol akan mengkristal dalam bentuk kristal yang tidak berwarna, tidak terasa, tidak berbau dan mempunyai titik lebur 150°-151°C. Endapan kolesterol apabila terdapat dalam pembuluh darah dapat menyebabkan penyempitan pembuluh darah karena dinding pembuluh darah menjadi lebih tebal. Hal ini mengakibatkan berkurangnya kelenturan pembuluh darah sehingga aliran darah terganggu dan untuk mengatasi gangguan ini jantung harus memompa darah lebih keras (Poedjiadi, 1994).

Perhatian terhadap kolesterol dimulai sejak adanya pendapat tentang kaitan antara konsumsi kolesterol dan insiden penyakit jantung koroner. Hal ini menekankan akan pentingnya penentuan kolesterol pada makanan hewani, termasuk daging, telur, susu dan produk-produk lainnya. Timbulnya konsensus pembatasan kolesterol ikut memperbaiki peraturan kesehatan yang dihasilkan dalam pedoman baru pengadaan makanan yang khusus membutuhkan kolesterol. Oleh karena itu, penentuan kadar kolesterol dalam makanan menjadi penting.

Saponifikasi

Metode kuantitatif penentuan kadar kolesterol makanan yang diadopsi dari AOAC, 1996 ;Punwar, 1976 diantaranya adalah ekstraksi lipid, saponifikasi, ekstraksi dari zat yang tidak tersaponifikasi dengan benzena dan kromatografi gas 5a-kolestana sebagai standar internal.

Saponifikasi adalah reaksi hidrolisis asam lemak oleh adanya basa lemah. Saponifikasi tidak hanya menghasilkan kolesterol akan tetapi juga pengotor lain dari asam lemak. Meskipun pada kenyataannya lipid dalam sampel sudah diekstraksi terlebih dahulu. Van Elswyk et al. (1991) menyimpulkan bahwa metode saponifikasi langsung adalah metode yang paling akurat untuk menghasilkan kolesterol bebas. Pernyataan ini diawali dengan penelitian Adam et al yang menggunakan metode

saponifikasi langsung dengan KOH-etanol dan metode ini dapat mengeliminasi ekstraksi lipid. Dalam penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa saponifikasi langsung lebih efisien dibandingkan dengan metode yang lain. Teknik saponifikasi ini dapat dilakukan dengan penambahan KOH dalam air atau alkohol. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa saponifikasi yang menggunakan larutan KOH dalam air dengan penambahan etanol lebih efektif menghilangkan semua pengotor (asam lemak) dalam bentuk busa yang dapat dipisahkan selama ekstraksi dan purifikasi.

Walaupun hasil kromatogram menunjukkan masih terdapat peak asam lemak bebas akan tetapi yang menarik adalah tidak ada overlap pada peak kolesterol dan 5 α -kolestana hal ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan larutan saponifikasi KOH/metanol bersama eter dapat mengeliminasi gangguan asam lemak untuk mengekstrak kolesterol.

Ekstraksi

Pembersihan hasil kromatogram tidak hanya disebabkan oleh saponifikasi akan tetapi juga ekstraksi dan purifikasi. Kolesterol dengan polaritas rendah dalam campuran yang tersaponifikasi harus diekstraksi dengan pelarut yang dapat bercampur baik dalam suasana air-etanol dan menciptakan fase homogen dalam ekstraksi. Penelitian yang lain untuk mengekstraksi kolesterol adalah dengan menggunakan eter (Hwang et al., 2003) atau heksana Fenton, 1992; Fenton and Sim, 1991). Penggunaan eter sebagai pelarut dapat menghasilkan peroksida yang dapat menyebabkan degradasi sterol (Fenton, 1992). Indyk (1990) and Fenton and Sim (1991). Sehingga ekstraksi kolesterol yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan heksana dimana berdasarkan laporan menunjukkan bahwa hasilnya cukup akurat. Hal ini karena heksana merupakan pelarut yang baik untuk kolesterol. Heksana tidak berbahaya dibandingkan dengan pelarut-pelarut yang lain dan tidak membentuk emulsi sebagai toluen serta tidak membentuk peroksida yang dapat menurunkan kadar kolesterol dan tidak larut sempurna dalam air.

Ekstraksi tersebut dilakukan dengan menggunakan ekstraksi heksana ganda untuk

memperoleh recoveri yang cukup seperti yang dilakukan oleh Patton et al. (1990) dan Al-Hasani et al. (1990, 1993). Fenomena ini dapat terjadi karena heksana merupakan pelarut yang sangat rendah polaritasnya.

Pada penelitian D.J. Fletouris et al, juga menggunakan metode ekstraksi heksana ganda dengan penambahan air sebagai langkah awalnya. Keefisienan heksana dengan ada atau tidak adanya air diuji dengan percobaan yaitu dengan menambahkan sejumlah variasi air yang berbeda Hasilnya menunjukkan bahwa ketika tanpa penambahan air, keefisienan heksana rendah sedangkan ekstraksi kedua dapat meningkatkan persen recovery kolesterol

KG (Kromatografi Gas)

Kromatografi berasal dari kata chroma (warna) dan graphein (penulisan) merupakan suatu teknik pemisahan fisik karena memanfaatkan perbedaan yang kecil sifat-sifat fisik dari komponen-komponen yang akan dipisahkan. Istilah penulisan warna sudah tidak tepat lagi karena pemisahan dengan kromatografi dapat dipakai untuk memisahkan komponen-komponen yang tidak berwarna. Kromatografi adalah pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia berdasarkan pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh fase gerak. Kromatografi gas (KG) adalah suatu cara untuk memisahkan campuran dengan mengalirkan arus gas melalui fase diam (H.M Mc nair, 1988).

Metode kromatografi yang digunakan ada dua cara yaitu cara tradisional dengan derivatisasi dan modern tanpa derivatisasi. Derivatisasi sterol dianalisis dengan detektor flame ionisasi. Pada derivatisasi sterol, kolom GC dilapisi dengan golongan silanol aktif pada permukaan yang terbuat dari silika yang dapat mencegah adsorpsi analit yang tidak dapat dideritivikasi sehingga gangguan puncak tidak dapat teramati. Meskipun puncak beberapa asam lemak metil ester masih ada dalam kromatogram, tetapi tidak nampak pada saat pemisahan atau kontaminasi pada kolom kapiler, elusi hanya terjadi pada bidang pelarut. Pemisahan kromatografi kolesterol tanpa derivatisasi

TMS eter sudah diteliti dan didokumentasi akhir-akhir ini karena perkembangan teknologi kromatografi gas kapiler dengan resolusi tinggi (Fenton, 1992; Wu et al., 1997; Hwang et al., 2003; Thompson and Merola, 1993; Al-Hasani et al., 1993). Penelitian ini menunjukkan bahwa kolesterol tidak membutuhkan untuk dirubah menjadi lebih volatil dan hasilnya dapat dibandingkan dengan teknik derivatisasi tradisional.

Kalibrasi

Kalibrasi standard internal dan eksternal telah direkomendasikan untuk analisis kolesterol. Teknik standard internal dapat meminimalkan pengaruh berbagai macam error analit termasuk fluktuasi ukuran sample yang mana timbal baliknya adalah senyawa yang digunakan sebagai standar internal mempunyai sifat kimia yang sama dengan analit. Senyawa 5-kolesten yang sering digunakan sebagai standar internal dalam analisis kolesterol adalah alkana yang mempunyai sifat kimia dan fisika seperti kolesterol sehingga kegunaannya sebagai standar internal sangat dibutuhkan. Selanjutnya, ketidaktentuan pengukuran area standar internal sendiri dapat meningkatkan presisi eror analisis dibandingkan pengukuran dengan kalibrasi teknik standar eksternal karena muncul dua puncak pada pengukuran lebih dari satu.

Persamaan garis yang diperoleh sudah memadai untuk memperoleh target analisa yang dapat dipercaya. Berdasarkan penelitian D. J. Fletouris, 1998, kalibrasi standard eksternal lebih baik karena dapat mengurangi manipulasi dan menekan biaya analisis.

Validasi Metode Analisis

Validasi menurut Badan Standarisasi Nasional Indonesia adalah konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk maksud khusus dipenuhi. Definisi validasi metode sendiri adalah proses terdokumentasi yang menjamin bahwa pelaksanaannya dapat juga diartikan sebagai rangkaian seri percobaan tertentu untuk memastikan bahwa metode analisis yang akan dipakai telah sah memenuhi persyaratan-persyaratan yang telah ditentukan. Rangkaian seri percobaan yang dipakai untuk memvalidasi metode analisis

disebut parameter validasi. Parameter metode analisis terdiri dari :

a. Selektivitas dan Spesifitas

Selektivitas diartikan sebagai kemampuan suatu metode analisis untuk memberi tanggap detector terhadap komponen-komponen kimia secara terpisah sedangkan spesifitas diartikan sebagai kemampuan suatu metode analisis untuk memberi tanggap detector hanya terhadap suatu analat.

b. Kecermatan (Presisi)

Kecermatan atau presisi diartikan sebagai perbedaan dari hasil penentuan berulang kali (2-10 kali) dengan protokol atau prosedur analisis yang diikuti ketat secara sama. Kecermatan dapat dinyatakan dengan Coefficient of Variation (CV) dan Relative Standard Deviation (RSD) sebagai berikut :

$$RSD = (s/x) \times 1000 \text{ppt}$$

$$CV = (s/x) \times 100\%$$

Dimana s adalah simpangan baku dan x merupakan hasil penentuan rata-rata. Untuk harga $RSD < 20 \text{ ppt}$ atau $CV < 2\%$ dapat dikatakan metode tersebut memiliki presisi yang bagus.

c. Ketepatan (Accuracy)

Ketepatan (akurasi) adalah keterdekatan hasil penentuan metode analisis dengan harga sebenarnya. Indikasi yang paling umum untuk menyatakan "High Accuracy" adalah persen perolehan kembali (% recovery) yang dinyatakan :

$$\% \text{recovery} = X_t/X_i \times 100\%$$

Akurasi dapat juga dinyatakan dalam absolute Error (AE) atau Relative Error (RE) sebagai berikut :

$$AE = X_i - X_t$$

$$RE = [(X_i - X_t)] \times 100\%$$

Dimana X_i adalah harga atau kadar rata-rata yang didapat dan X_t adalah harga atau kadar yang sebenarnya. Persen atau kadar yang sebenarnya. Persen recovery 80%-120% sudah dikatakan memadai untuk analisis

cuplikan biologis atau bioanalisis (Mulja, Muhammad, 1997).

KESIMPULAN

Metode kromatografi gas merupakan metode sederhana dan mempunyai tingkat keakurasian yang baik untuk penentuan kolesterol dalam makanan

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, M.L., Sullivan, D.M., Smith, R.L., Richter, E.F. 1986. *Evaluation of direct saponification method for determination of cholesterol in meats*. Journal of Association of Official Analytical Chemists Vol. 69. Hal. 844–846.
- Al-Hasani, S.M., Shabany, H., Hlavac, J. 1990. *Rapid determination of cholesterol in selected frozen foods*. Journal of Association of Official Analytical Chemists. Vol. 73 (5). Hal. 817–820.
- Al-Hasani, S.M., Hlavac, J., Carpenter, M.W., 1993. *Rapid determination of cholesterol in single and multi-component prepared foods*. Journal of AOAC International 74 (4), 902–906.
- Fenton, M., and J. S. Sim. 1991. *Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography*. J. Chromatogr. Vol.540. Hal:323–329.
- Hwang, B.S., Wang, J.T., Choong, Y.M. 2003. *A simplified method for the quantification of total cholesterol in lipids using gas chromatography*. Journal of Food Composition and Analysis 16, 169–178.
- Naeemi, E. D., N. Ahmad, T. K. Al-Sharrah, and M. Behbahani.1995. *Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food*. J. AOAC Int. Vol.78. Hal.1522–1525.
- Patton, G.M., Fasulo, J.M., Robins, S.J., 1990. *Analysis of lipids by high performance liquid chromatography: part I*. Journal of Nutritional Biochemistry. Vol. 1 (9). Hal. 493–500.
- Punwar, J.K., 1975. *Gas-liquid chromatographic determination of total cholesterol in multi-component foods*. Journal of Association of Official Analytical Chemists 58 (4), 804–810.
- Punwar, J.K., 1976. *Collaborative study for the comparison of two methods for the determination of total cholesterol in multi-component foods*. Journal of Association of Official Analytical Chemists 59 (1),46–50.
- Sastrohamidjojo Hardjono. (1991). *Kromatografi*. Edisi Kedua. Cetakan Pertama. Universitas Gadjah mada. Yogyakarta.
- Soedigno Soekeni. 1977. *Cara Statistika Kimia*. Cetakan Kesembilan. Penerbit ITB. Bandung.
- Van Elswyk, M.E., Schake, L.S., Hargis, P.S. 1991. *Research note: evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol*. Poultry Science. Vol.70. Hal. 1258–1260.