

Validasi Metode Analisis Kolesterol dalam Telur dengan HPLC-ELSD

(Method Validation of Cholesterol Analysis in Egg Using HPLC-ELSD)

Hanifah Nuryani Lioe*, Tika Setianingrum, Ririn Anggraeni

ABSTRAK

Metode analisis kolesterol dalam telur menggunakan instrumen kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) yang dilengkapi dengan detektor *evaporative light scattering* (ELSD) divalidasi dalam penelitian ini. Kolom silika dan campuran tunggal fase gerak yang terdiri atas 90% heksana dan 10% isopropanol dipakai untuk menentukan kolesterol dengan HPLC. Kolesterol terdeteksi pada waktu retensi 1,5 menit memakai standar kolesterol dan kondisi HPLC-ELSD: suhu evaporasi 50 °C, tekanan udara 2,2 bar, dan laju alir fase gerak 2 mL/min. Linearitas metode analisis kolesterol menggunakan matriks sampel telur dicapai pada konsentrasi 50–3000 µg/g sampel, dengan $R^2 > 0,990$. Limit deteksi instrumen dan limit kuantifikasi berturut-turut diperoleh pada konsentrasi larutan kolesterol 1,07 dan 3,56 µg/mL. Hasil uji rekoveri dengan metode penambahan kolesterol standar dalam matriks sampel telur pada konsentrasi rendah (50 µg/g), sedang (250 µg/g), dan tinggi (3000 µg/g) masing-masing adalah 122,13, 108,23, dan 44,71%, dengan nilai presisi masing-masing 5,26, 4,29, dan 10,11%. Limit deteksi metode diketahui pada konsentrasi 2,30 µg/g. Reprodusibilitas intralab untuk menganalisis sebuah sampel telur adalah 0,04%. Metode analisis kolesterol dalam telur ini dinyatakan valid apabila digunakan untuk analisis kolesterol pada konsentrasi rendah dan sedang dalam sampel.

Kata kunci: HPLC-ELSD, kolesterol, telur, validasi metode

ABSTRACT

A method using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with an evaporative light-scattering detector (ELSD) for the determination of cholesterol in egg was validated. A silica column and a binary mixture of hexane and isopropanol (90:10) as a mobile phase were used to separate cholesterol. Cholesterol was detected at 1.5 min using cholesterol standard and HPLC-ELSD condition: evaporation temperature 50 °C, air pressure 2.2 bars, and flow rate of mobile phase 2 mL/min. A method linearity for the cholesterol analysis in egg as a sample matrix was obtained at a range of 50 to 3000 µg/g sample, with $R^2 > 0.990$. Instrument detection limit and limit of quantitation were determined at 1.07 and 3.56 µg/mL, respectively. Recovery test results by spiking cholesterol standard in egg sample at low, medium, and high concentrations (50, 250 and 3000 µg/g) were 122.13, 108.23, and 44.71%, respectively. Their corresponding repeatability values were 5.26, 4.29, and 10.11%. Method detection limit and intralab reproducibility (to analyze a sample) were observed at 2.30 µg/g and 0.04%. The method is valid for cholesterol analysis in egg at low and medium concentrations.

Keywords: cholesterol analysis, egg, HPLC-ELSD, method validation

PENDAHULUAN

Kolesterol merupakan jenis steroid yang paling dikenal dengan 27 atom karbon. Kolesterol hanya ditemukan pada pangan yang berasal dari hewan. Berikut adalah beberapa contoh kandungan kolesterol dalam produk pangan berdasarkan hasil penelitian USDA (2011). Kandungan kolesterol dalam produk daging dan olahannya adalah 262–3010 mg/100 g, untuk produk telur dan olahannya mencapai 356–2335 mg/100 g, untuk produk ikan dan olahannya mencapai 266–766 mg/100 g, dan produk ayam dan olahannya mencapai 262–568 mg/100 g. Menurut anjuran yang dikeluarkan oleh USDA (2011), produk pangan yang mengandung lebih dari 300,00 mg/100 g sebaiknya dihindari, terutama pengaruhnya

terhadap risiko penyakit jantung koroner (FERENCE *et al.* 2012). Kolesterol pun dapat membentuk produk hasil oksidasi kolesterol dalam pangan olahan selama proses pemanasan, contohnya pada pengolahan pasta yang mengandung telur. Kecukupan asupan kolesterol yang dibutuhkan oleh tubuh dapat diperoleh dari bahan pangan yang dikonsumsi sehari-hari. Informasi mengenai kadar kolesterol dari berbagai bahan pangan yang dikonsumsi setiap harinya sangat penting untuk diketahui mengingat setiap jenis bahan pangan memiliki kandungan kolesterol yang berbeda-beda.

Kadar kolesterol di dalam bahan pangan dapat diukur dengan berbagai metode, akan tetapi tahap yang paling kritis dalam metode analisis kolesterol adalah tahap persiapan sampel. Analisis diawali dengan proses ekstraksi; proses ini dipengaruhi oleh banyak hal. Salah satu hal penting yang menentukan dalam proses ekstraksi adalah matriks bahan pangan (Min & Steenson 1998). Matriks bahan pangan adalah jaringan makanan tempat zat gizi terperangkap.

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

* Penulis korespondensi: E-mail: hanilioe@hotmail.com

Proses persiapan sampel berupa hidrolisis oleh asam dapat digunakan untuk menghilangkan interaksi yang menghambat ekstraksi komponen target. Menurut Min dan Streenson (1998), hidrolisis oleh asam dapat memecah ikatan kovalen dan ikatan ionik pada sampel sehingga ikatan antara senyawa target dan komponen matriks sampel dapat terlepas. Hal ini menyebabkan senyawa target mudah diekstraksi.

Berdasarkan penelitian Osman dan Chin (2006), kolesterol dapat dideteksi dan ditentukan kuantitasnya dengan menggunakan beberapa metode seperti spektrofotometer UV-VIS, kromatografi gas (GC), dan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dengan detektor UV. Dengan metode spektrofotometer UV-VIS kolesterol dapat dideteksi hingga konsentrasi 14 µg/mL, dengan menggunakan GC kolesterol terdeteksi hingga 4,00 µg/mL, dan dengan menggunakan HPLC-UV terdeteksi hingga 0,08 µg/mL. HPLC yang dipadu dengan detektor *evaporative light scattering detector* (ELSD) masih jarang digunakan untuk analisis kolesterol, akan tetapi menurut Letter (1992), HPLC-ELSD dapat digunakan untuk mengklasifikasikan fosfolipid (kolesterol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidikolin, dan spingomielin) pada konsentrasi 350 µg/µL.

Metode analisis yang tidak baku dan yang dikembangkan satu laboratorium, serta metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan memerlukan proses validasi metode (Hadi 2007). Validasi metode adalah suatu proses untuk mengkonfirmasi bahwa prosedur analisis yang dilakukan untuk pengujian tertentu sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Huber 2001). Tujuan penelitian ini adalah memvalidasi analisis kolesterol dalam bahan pangan dengan matriks sampel telur dengan menggunakan metode deteksi HPLC-ELSD. Validasi metode analisis terdiri atas uji presisi instrumen, spesifisitas, linearitas metode, limit deteksi instrumen (LDI) dan limit kuantifikasi, rekoverti, keterulangan, metode deteksi limit (*method detection limit*, MDL), dan intralab reproduibilitas. Validasi metode dilakukan dengan menggunakan matriks.

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan adalah telur ayam broiler (*Gallus sp.*) yang diperoleh dari pasar lokal di sekitar Bogor. Jumlah sampel yang dibeli adalah satu kotak (10 butir). Preparasi sampel diawali dengan pencampuran 10 butir telur dalam sebuah wadah, kemudian dikocok hingga tercampur rata. Sampel yang telah tercampur rata kemudian dimasukkan ke dalam 15 kantong plastik kecil dan disimpan dalam lemari pembeku dengan suhu -18 °C hingga dilakukan validasi analisis.

Bahan pereaksi dan pelarut yang digunakan adalah metanol, KOH, heksan, gas N₂ teknis, gas N₂ HP (*high purity*), HCl, 2-propanol (isopropanol), standar kolesterol kemurnian 95% (Sigma Chemical

Inc, USA), air bebas ion, Na₂SO₄ *anhydrous*, dan kertas saring.

Alat yang digunakan pada penelitian ini timbangan analitik, waterbath, seperangkat alat gelas dan HPLC LC 6A (Shimadzu, Jepang) yang dilengkapi kolom *normal phase* silika LiChrosorb Si 60 (10µm) (25 cm x i.d. 4,6 cm) (Merck, Jerman), dan detektor ELSD Sedex 55 (Sedere, Prancis).

Validasi metode analisis yang dilakukan meliputi uji presisi instrumen, spesifisitas, pengukuran linearitas metode, limit deteksi instrumen (IDL), limit kuantifikasi (LOQ), ketepatan (akurasi), dan ketelitian (presisi) dari hasil uji rekoverti pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi, penentuan limit deteksi metode (*method detection limit*, MDL) dan intrareproduibilitas menurut EURACHEM (1998) dan FDA (2012).

Uji Presisi Instrumen

Uji ini dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan standar kolesterol (konsentrasi 50 µg/mL) sebanyak 7 ulangan ke instrumen HPLC, kemudian dihitung nilai standar deviasi (SD)-nya dan standar deviasi relatif (RSD)-nya dari waktu retensi dan luas puncak kolesterol yang terdeteksi. Batas keberterimaan menurut JECFA (2006) adalah RSD ≤ 2,00%.

Spesifisitas

Spesifisitas diamati dari hasil injeksi larutan standar kolesterol, larutan sampel telur dengan dan tanpa tambahan kolesterol standar.

Linearitas Metode

Linearitas metode ditentukan dengan menginjeksikan larutan sampel telur (3 g sampel) yang ditambahkan standar kolesterol pada 6 konsentrasi yang berbeda (300, 750, 1500, 3000, 7500, dan 15000 µg/mL). Pengujian dilakukan 3 kali pada setiap konsentrasi kolesterol standar. Linearitas diukur dengan nilai R^2 dari kurva hubungan antara luas puncak kolesterol (sebagai sumbu *y*) dan konsentrasinya (µg/g) (sebagai sumbu *x*). Linearitas yang baik adalah R^2 lebih dari 0,990.

Limit Deteksi Instrumen dan Limit Kuantifikasi

Limit deteksi instrumen (IDL) dan limit kuantifikasi (LOQ) ditentukan dengan cara menginjeksikan larutan standar kolesterol pada konsentrasi terendah yang dapat dideteksi oleh HPLC-ELSD. Injeksi ini dilakukan sebanyak 7 kali sehingga diperoleh 7 hasil konsentrasi yang terukur. Standar deviasi dari 7 konsentrasi ini dihitung, kemudian nilai IDL ditentukan dari rumus $3 \times SD$, sedangkan LOQ dari $10 \times SD$.

Akurasi dan Presisi

Akurasi dan presisi ditentukan dari uji rekoverti. Uji ini dilakukan dengan menggunakan sampel *spike* pada 3 konsentrasi kolesterol berbeda. Konsentrasi *spiking* yang diuji adalah konsentrasi rendah (50 µg/g), konsentrasi sedang (250 µg/g), dan konsentrasi tinggi, yaitu konsentrasi kolesterol tertinggi yang dapat

ditemui dalam telur (3000 µg/g). *Spiking* dicoba sebanyak 7 kali untuk setiap tingkat konsentrasi. Rekoveri dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rekoveri (\%)} = \frac{(\text{konsentrasi yang ditemukan} - \text{konsentrasi sampel tanpa spiking})}{\text{konsentrasi spiking}} \times 100\%$$

Presisi atau keterulangan dapat diketahui dari hasil pengukuran sampel *spike* pada konsentrasi kolesterol rendah, sedang, dan tinggi. Mula-mula rata-rata dan SD hasil uji sampel *spike* pada konsentrasi tertentu dihitung, kemudian RSD ditentukan. RSD merupakan presisi atau keterulangan.

Limit Deteksi Metode

Limit deteksi metode (MDL) ditentukan dari kurva hubungan linear antara SD (sumbu y) dari hasil uji rekoveri dengan konsentrasi standar kolesterol yang bersangkutan (sumbu x). Nilai interpolasi pada x sama dengan nol dinyatakan sebagai SD₀. Nilai MDL dihitung sebagai 3 kali nilai SD₀.

Reprodusibilitas Intralab

Reprodusibilitas intermediet menggunakan 1 operator, 1 laboratorium tetapi pada waktu yang berbeda atau disebut juga reprodusibilitas intralab. Ini dilakukan dengan menggunakan 1 sampel matriks yang dianalisis sebanyak 3 ulangan dalam waktu yang sama. Rerata dari pengukuran dalam waktu yang berbeda dan standar deviasi dari rata-rata tersebut dihitung, selanjutnya intralab reprodusibilitas ditentukan dari RSD perhitungan tersebut.

Prosedur Analisis Kolesterol

Prosedur analisis yang dilakukan diawali dengan menyiapkan larutan standar kolesterol, menyiapkan sampel pada matriks telur untuk memperoleh larutan sampel, dan menentukan kandungan kolesterol dengan menggunakan HPLC-ELSD.

Persiapan larutan standar kolesterol

Sejumlah 50 dan 150 mg standar kolesterol *powder* masing-masing dilarutkan dalam 50 mL fase gerak HPLC (heksan:isopropanol = 90:10) yang terpisah. Larutan standar stok ini mempunyai konsentrasi 1000 dan 3000 µg/mL. Selanjutnya serial pengenceran larutan stok menggunakan fase gerak sebagai pelarut dibuat untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 10, 25, 50, 100, 150, 250, 300, 500, 750, 1500, 3000, dan 7500 µg/mL.

Penyiapan larutan sampel telur (AOAC 976.26 dalam Sullivan dan Carpenter 1993)

Sekitar 3 g sampel telur (sampel telur telah dihomogenkan) ditimbang dalam tabung reaksi bertutup, selanjutnya ditambahkan 10 mL larutan HCl (4:1) lalu divorteks hingga tercampur. Untuk uji linearitas metode dengan sampel *spiking*, sebelum ditambahkan HCl, sampel diberi tambahan kolesterol standar sebanyak 1 mL dari setiap konsentrasi di

atas. Tahap ini dilanjutkan dengan mengembuskan gas N₂ selama 30 detik lalu ditutup dengan segera untuk menghindari oksidasi kolesterol. Kemudian campuran dipanaskan pada penangas air mendidih selama 30 menit, sambil dikocok setiap 5 menit. Setelah selesai, isi dalam tabung reaksi tersebut didinginkan dengan cara ujung tabung dikenakan air mengalir. Isi tabung dipindahkan ke dalam labu pemisah (250 mL), tabung reaksi dibilas dengan 2 x 10 mL air bebas ion, lalu air bilasan tersebut digabungkan ke dalam labu pemisah. Kolesterol dalam sampel yang terdapat dalam tabung diekstraksi dengan heksana 3 x 10 mL sambil dikocok. Fraksi heksana diambil lalu heksana yang terkandung diuapkan dengan gas N₂. Setelah kering, padatan yang diperoleh ditambahkan 10 mL KOH 2% dalam metanol lalu dipanaskan 80 °C selama 30 menit. Komponen kolesterol kemudian diekstraksi dengan heksana 3 x 10 mL dalam labu pemisah dan fraksi heksana disaring dengan menggunakan kertas saring yang diberi tambahan Na₂SO₄ anhidrat 1–2 g. Heksana yang terkandung dalam fraksi itu diuapkan dengan gas N₂. Setelah kering, padatan dilarutkan dengan fase gerak pada volume tertentu (1,0 mL) secara tepat. Kemudian larutan tersebut diencerkan sebanyak 10 kali tingkat pengenceran. Larutan sampel ini siap diinjeksikan ke HPLC.

Penentuan kolesterol dengan HPLC-ELSD

Analisis dengan HPLC-ELSD merupakan hasil pengembangan di laboratorium LDITP milik Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor dengan kondisi isokratik menggunakan:

Fase gerak	: Heksan: 2-propanol (90:10)
Kolom	: silika (25 cm x i.d. 4,6 cm, ukuran partikel 8 µm)
Laju alir	: 2 mL/menit
Suhu	: 50 °C
Detektor	: ELSD (Sedex 55) dengan tekanan gas N ₂ sebesar 2,2 bar, Gain 7.
Volume injeksi	: 20 µL

Sampel diinjeksikan secara terpisah dari injeksi standar dengan menggunakan kondisi HPLC di atas, kemudian luas respons dicatat. Kurva standar yang merupakan hubungan linear antara area dan konsentrasi kolesterol standar dibuat. Selanjutnya luas puncak kolesterol dari kromatogram sampel dibaca dan dihubungkan dengan kurva standar untuk memperoleh konsentrasi kolesterol standar dari kurva (µg/mL). Konsentrasi kolesterol dalam sampel dihitung dengan rumus:

$$\frac{\mu\text{g kolesterol}}{\text{g sampel}} =$$

$$\frac{\text{Konsentrasi dari kurva } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) \times \text{volume larutan sampel (mL)} \times F_p}{\text{berat sampel (g)}}$$

Keterangan:

F_p = faktor pengenceran dari larutan sampel akhir apabila dilakukan pengenceran sebelum larutan diinjeksikan ke HPLC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Presisi Instrumen HPLC

Hasil uji presisi instrumen HPLC dengan menggunakan larutan kolesterol standar 50 µg/mL dapat dilihat pada Tabel 1. Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa presisi luas puncak maupun waktu retensi dari puncak kolesterol masing-masing sebesar 2,23 dan 0,59%. Waktu retensi puncak kolesterol rata-rata 1,52 menit. Apabila merujuk JECFA (2006), batas keberterimaan presisi instrumen adalah 2,0%, maka hasil presisi waktu retensi dapat diterima, sedangkan presisi luas puncak sedikit lebih tinggi daripada batas tersebut.

Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan dengan membandingkan puncak kolesterol yang diperoleh dari hasil injeksi larutan standar kolesterol, injeksi larutan hasil persiapan sampel telur saja, dan injeksi larutan hasil persiapan sampel telur yang diberi tambahan standar kolesterol. Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 1–3. Dalam gambar, kolesterol terdeteksi pada waktu retensi 1,51–1,53 menit. Dalam Gambar 2 terlihat bahwa sampel telur mempunyai puncak kolesterol yang sama dengan standar kolesterol dalam Gambar 1. Tinggi puncak kolesterol tersebut meningkat apabila ke dalam sampel yang sama ditambahkan standar kolesterol (Gambar 3). Dengan demikian, kolesterol dapat terdeteksi dalam matriks sampel telur

dengan baik.

Linearitas Metode

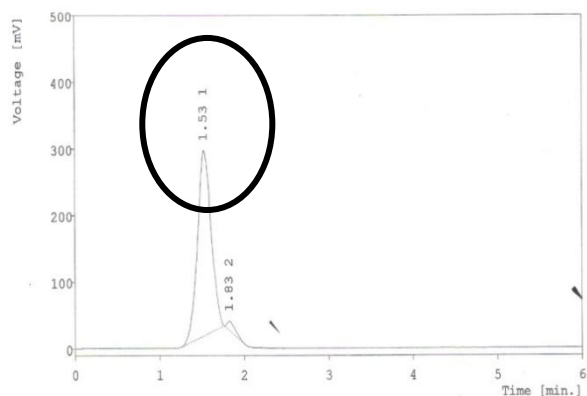
Pengujian linearitas metode analisis kolesterol menggunakan instrumen HPLC – ELSD dan matriks sampel telur menunjukkan linearitas yang baik, yaitu peningkatan respons instrumen yang proporsional dengan peningkatan konsentrasi kolesterol dalam sampel telur. Ini berarti semakin tinggi konsentrasi kolesterol standar yang ditambahkan semakin tinggi dan luas puncak kolesterol yang diperoleh, meskipun tahap persiapan sampel yang dilakukan cukup panjang dan menentukan keakuratan hasil sesuai dengan hasil review.

Konsentrasi kolesterol standar yang ditambahkan pada pengukuran linearitas ini 50–3000 µg/g sampel. Hasil pengukuran linearitas metode dapat dilihat pada Gambar 4. Kurva linearitas metode yang diperoleh mempunyai nilai R^2 sebesar 0,997. Nilai ini masuk dalam batas keberterimaan $R^2 \geq 0,990$ (EMA 1995). Dengan mengetahui nilai R^2 tersebut, disimpulkan bahwa metode analisis kolesterol menggunakan HPLC-ELSD ini memiliki linearitas yang baik.

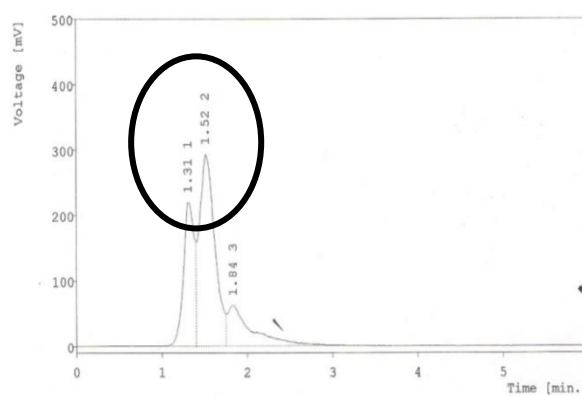
Hasil uji linearitas metode yang dilakukan menggunakan HPLC-ELSD ini menunjukkan nilai R^2 yang lebih baik apabila dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh Osman dan Chin (2006) menggunakan HPLC-UV/Vis. Penelitian mereka membandingkan metode ekstraksi Bohac yang mempunyai nilai R^2 0,993, metode Beyer & Jensen

Tabel 1 Hasil uji kesesuaian sistem analisis kolesterol menggunakan instrumen HPLC-ELSD

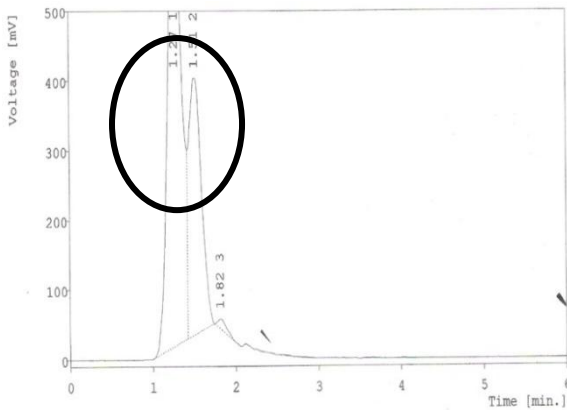
Ulangan	Konsentrasi kolesterol standar (µg/mL)	Luas puncak (mV.s)	Waktu retensi (menit)
1	50	50.1387	1.527
2	50	51.8594	1.520
3	50	52.2730	1.520
4	50	50.0535	1.527
5	50	51.4215	1.540
6	50	51.6683	1.513
7	50	49.2280	1.533
	Rata-Rata	50.9489	1.526
	SD	1,14	0,01
	RSD (%)	2,23	0,59



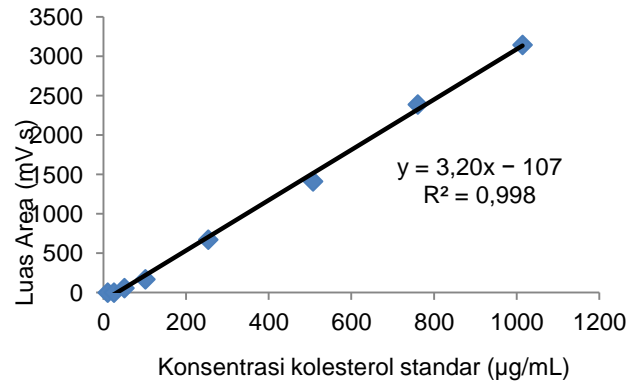
Gambar 1 Hasil injeksi larutan standar kolesterol (konsentrasi 1014 µg/mL) menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan kolom silika (25 cm x i.d. 4,6 cm, ukuran partikel 8 µm).



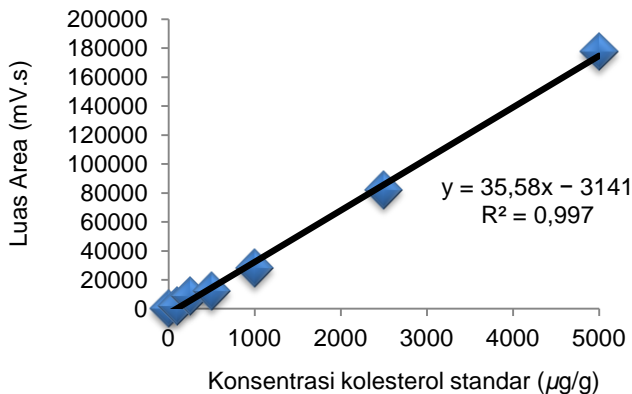
Gambar 2 Hasil injeksi larutan sampel tanpa tambahan kolesterol standar menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan kolom silika (25 cm x i.d. 4,6 cm, ukuran partikel 8 µm).



Gambar 3 Hasil injeksi larutan sampel yang ditambahi kolesterol standar (konsentrasi 507 µg/mL) menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan kolom silika (25 cm x i.d. 4,6 cm, ukuran partikel 8 µm).



Gambar 5 Kurva standar analisis kolesterol 10,14–1014,00 µg/mL tanpa menggunakan matriks telur ayam. Larutan standar kolesterol pada berbagai konsentrasi diinjeksikan ke dalam HPLC-ELSD secara terpisah.



Gambar 4 Kurva linearitas metode analisis kolesterol dengan tambahan standar ke dalam sampel menggunakan HPLC-ELSD dengan kolom silika (25 cm x i.d. 4,6 cm, ukuran partikel 8 µm).

dengan nilai R^2 0,990, dan metode Queensland Health Science Institute mencapai nilai R^2 0,941. Ketiga metode diuji menggunakan instrumen HPLC-UV/VIS detector sebanyak 8 kali ulangan. Fakta ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Avalli dan Contarini (2005), yang menyatakan bahwa HPLC-ELSD dapat menghasilkan respons yang linear untuk mengukur fosfolipid di dalam produk susu.

Limit Deteksi Instrumen

Limit deteksi instrumen (LDI) adalah batas konsentrasi terendah yang dapat dideteksi oleh instrumen. Pengujian ini pertama-tama dilakukan dengan menginjeksikan larutan kolesterol standar dari konsentrasi 10,14–1014 µg/mL. Hasil dari pengukuran ini kemudian diplotkan ke dalam sebuah kurva hubungan antara konsentrasi kolesterol standar dan luas puncaknya. Hasil pengujian ditunjukkan pada Gambar 5. Kurva memiliki persamaan $y = 3,20x - 107$ dengan $R^2 = 0,998$. Diketahui bahwa konsentrasi 10,14 dan 25,35 µg/mL, tidak dapat dideteksi oleh HPLC-ELSD. Kolesterol dapat dideteksi mulai pada konsentrasi 50,7–1014 µg/mL. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi kolesterol terendah yang dapat

dideteksi oleh HPLC-ELSD adalah 50,7 µg/mL. Pengujian LDI dilanjutkan dengan 7 kali penginjeksian standar kolesterol pada konsentrasi 50 µg/mL yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2. LDI dari hasil penelitian ini adalah 1,07 µg/mL.

Limit Kuantitasi (LOQ_{hitung}) merupakan batas terendah konsentrasi kolesterol yang dapat dilaporkan, di bawah konsentrasi ini disebut sebagai ‘tidak terdeteksi’ (Harmita 2004). Nilai LOQ_{hitung} dapat diperoleh dari nilai LDI, yaitu sebesar 10/3 kali LDI, sehingga diperoleh nilai LOQ_{hitung} sebesar 3,57 µg/mL. Nilai ini bila dibandingkan dengan penelitian Osman dan Chin (2006) jauh lebih baik (Tabel 3).

Rekoveri dan Keterulangan

Rekoveri dilakukan pada 3 konsentrasi *spiking* yang berbeda, yaitu rendah (50 µg/g sampel), sedang (250 µg/g sampel), dan tinggi (3000 µg/g sampel). Hasil uji rekoveri pada analisis kolesterol ditampilkan pada Tabel 4, 5, dan 6. Nilai rekoveri ini diperoleh dengan menggunakan persamaan dari kurva linearitas sampel *spiking* dengan kolesterol standar; persamaan yang diperoleh adalah $y = 35,58x - 3141$ dengan nilai R^2 sebesar 0,997.

Rekoveri menunjukkan keakuratan hasil analisis yang diperoleh adalah 122,13% untuk konsentrasi *spiking* rendah. Nilai ini tidak sesuai dengan keberterimaan menurut FDA (2012), yaitu 80–110%. Rekoveri pada konsentrasi *spiking* sedang memperoleh keakuratan sebesar 108,23% dan telah sesuai dengan FDA (2012), yaitu 90–107%. Uji rekoveri konsentrasi *spiking* tinggi hanya memperoleh keakuratan sebesar 44,71%; nilai ini berada di bawah FDA (2012), yaitu 95–105%. Perbedaan hasil ini menunjukkan bahwa pengukuran analisis kolesterol dengan menggunakan HPLC-ELSD hanya dapat dilakukan untuk sampel yang memiliki konsentrasi rendah sampai sedang.

Keterulangan (*ripitabilitas*) ditunjukkan dengan hasil RSD analisis, yaitu 5,26% untuk konsentrasi *spiking* rendah. Nilai ini telah sesuai dengan FDA (2012), yaitu maksimal dalam kisaran 8–11%.

Tabel 2 Hasil pengukuran larutan standar kolesterol konsentrasi 50 µg/mL untuk penentuan limit deteksi instrumen

Ulangan	Konsentrasi Kolesterol Standar (µg/mL)	Konsentrasi Kolesterol yang Terbaca (µg/mL)
1	50	49.1201
2	50	49.6587
3	50	49.7881
4	50	49.0934
5	50	49.5216
6	50	49.5988
7	50	48.8351
Rata-Rata		49.3737
SD		0,36
RSD (%)		0,72
LDI (µg/mL)		1,07
LOQ** _{hitung} (µg/mL)		3,57

Ket : * LDI = Limit deteksi instrumen
 ** LOQ = *Limit of quantification*

Tabel 3 Perbandingan hasil uji LDI dan LOQ penulis dengan Osman dan Chin (2006)

Peneliti	Instrumen	LDI (µg/mL)	LOQ _{hitung} (µg/mL)
Penulis	HPLC-ELSD	1,07	3,57
Osman dan Chin (2006)	Spektrofotometer	14	15
	HPLC-UV	0,08	0,60
	GC	4,00	13

Tabel 4 Hasil uji rekovery analisis kolesterol dalam sampel telur pada konsentrasi *spike* rendah (50 µg/g sampel) menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan kolom silika

Ulangan	Kolesterol yang ditambahkan (µg/g)	Jumlah kolesterol standar yang terbaca (µg/g)	Rekovery (%)
1	50	57,53	115,14
2	50	61,11	122,33
3	50	62,86	125,90
4	50	63,34	126,87
5	50	57,84	115,83
6	50	65,90	131,97
7	50	58,39	116,87
Rata-Rata		60.9957	122.1302
SD		3,21	
RSD (%)		5,26	

Keterulangan pada konsentrasi *spiking* sedang mempunyai nilai RSD sebesar 4,29% dan telah sesuai dengan FDA (2012). Uji riptabilitas konsentrasi *spiking* tinggi hanya memperoleh nilai RSD sebesar

Tabel 5 Hasil uji rekovery analisis kolesterol dalam sampel telur pada konsentrasi *spike* sedang (250 µg/g sampel) menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan kolom silika

Ulangan	Kolesterol yang ditambahkan (µg/g)	Jumlah kolesterol standar yang terbaca (µg/g)	Rekovery (%)
1	250	275,77	109,31
2	250	253,28	100,33
3	250	263,85	104,60
4	250	270,61	107,29
5	250	277,42	110,03
6	250	288,37	114,31
7	250	282,07	111,77
Rata-Rata		273.0542	108.2354
SD		11,72	
RSD (%)		4,29	

Tabel 6 Hasil uji rekovery analisis kolesterol dalam sampel telur pada konsentrasi *spike* tinggi (3000 µg/g sampel) menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan kolom silika

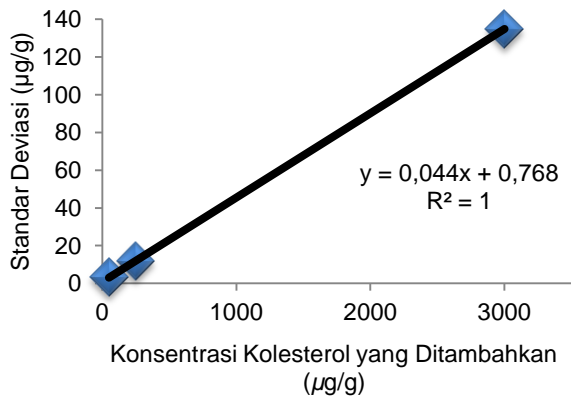
Ulangan	Kolesterol yang ditambahkan (µg/g)	Jumlah kolesterol standar yang terbaca (µg/g)	Rekovery (%)
1	3000	1569,52	52,58
2	3000	1392,04	46,63
3	3000	1147,45	38,47
4	3000	1341,82	44,97
5	3000	1381,48	46,32
6	3000	1251,98	41,95
7	3000	1253,92	42,06
Rata-Rata		1334.0306	44.7118
SD		134,84	
RSD (%)		10,11	

10,11%, dan nilai ini masih berada dalam kisaran FDA (2012).

Dalam penelitian Osman dan Chin (2006), uji rekovery hanya dilakukan pada 1 konsentrasi *spiking*, yaitu pada konsentrasi 300 µg/mL kolesterol standar. Dengan nilai konsentrasi yang terbaik dicapai pada metode Bohac dengan instrumen HPLC UV-VIS yang mencapai nilai rekovery 96,67% dengan RSD 7,50%. Hal ini menunjukkan bahwa metode HPLC-ELSD yang telah dilakukan oleh peneliti memiliki nilai rekovery yang lebih baik, sebagaimana ditunjukkan dengan nilai RSD yang lebih rendah daripada metode yang dilakukan oleh Osman dan Chin (2006).

Limit Deteksi Metode (MDL)

Uji MDL merupakan kelanjutan dari uji rekovery dengan memplotkan nilai standar deviasi (SD) pada setiap konsentrasi *spiking* ke dalam sebuah kurva hubungan antara konsentrasi standar kolesterol yang



Gambar 6 Kurva uji limit deteksi metode (MDL) dalam analisis kolesterol menggunakan instrumen HPLC-ELSD dengan matriks sampel telur.

Tabel 7 Hasil uji reproduibilitas intralab analisis kolesterol pada telur dengan HPLC-ELSD dan kolom silika

Bulan ke-	Hasil analisis (µg/g)*	Rata-rata hasil analisis (µg/g)	SD	RSD	T _{hitung}
1	564,27	562,68	2,25	0,40	0,4079**
2	561,09				

Ket: * = rata-rata dari 3 ulangan analisis
 ** = tidak berbeda nyata

ditambahkan dan nilai SD yang diperoleh. Hasil uji MDL pada 3 konsentrasi yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 6. Dari hasil persamaan $y = 0,042x + 0,741$ dengan nilai R^2 sama dengan 1, diperoleh intersepsi SD_0 ($x = 0$), yaitu $0,741 \mu\text{g/g}$. Nilai MDL dihitung sebesar 3 kali SD_0 ialah $2,30 \mu\text{g/g}$; nilai ini lebih rendah daripada LOQ_{hitung} ($3,57 \mu\text{g/mL}$). Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki tingkat sensitivitas yang baik karena dapat mendeteksi kolesterol dalam maktriks hingga konsentrasi $2,30 \mu\text{g/g}$.

Reproduibilitas Intralab

Hasil uji reproduibilitas intralab dapat dilihat pada Tabel 7. Reproduibilitas Intralab diketahui dari nilai RSD yang dihasilkan, yaitu 0,04%, nilai ini telah memenuhi batas keberterimaan menurut FDA (2012), yaitu tidak lebih dari 8%. Hasil ini menunjukkan bahwa metode yang telah dilakukan memiliki nilai keterulangan yang baik pada selang waktu tertentu. Setelah diuji T , diketahui bahwa antar kedua ulangan tersebut tidak berbeda nyata.

KESIMPULAN

Hasil validasi metode analisis kolesterol menggunakan HPLC-ELSD dengan matriks sampel telur adalah valid untuk konsentrasi kolesterol uji $\leq 3000 \mu\text{g/g}$ sampel. Metode tersebut dapat digunakan untuk analisis rutin di laboratorium pengujian.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada laboratorium terakreditasi LDITP, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor yang telah memberi dana penelitian dan dukungan sarana. Ucapan terima kasih juga disampaikan penulis kepada teknisi Ririn dan Taufik yang telah membantu dalam penggunaan instrumen HPLC-ELSD.

DAFTAR PUSTAKA

Avalli A, Contarini G. 2005. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *J. Chromatogr A*. 1071(1–20): 185–190.

[EMA] The European Agency for the Evaluation of Medical Products. 1995. ICH. Topic Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. [Internet] [diunduh 2010 Nov 2]. Tersedia pada: <http://www.pharmacontract.ch/support/pdf-support/Q2a.pdf>.

[EURACHEM] Working Group. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods –A Laboratory Guide to Methods Validation and related Topics. [Internet] [diunduh 2010 Nov 2]. Tersedia pada: <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>.

FDA. 2012. Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. [Internet] [diunduh 2013 Jan 30]. Tersedia pada: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FIELDScience/UCM298730.pdf>.

Ference BA, Yoo W, Alesh I, Mahajan N, Mirowska KK, Mewada A, Kahn J, Afonso L, Williams KA, Flack JM. 2012. Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: A Mendelian randomization analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 60(25): 2631–2639.

Hadi A. 2007. *Pemahaman dan Penerapan ISO/IEC 17025:2005*. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.

Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan perhitungannya. *Maj Il Kefarm*. 1(3): 117–135.

Huber L. 2001. Validation of Analytical Methods. [Internet] [diunduh 2010 Okt 8]. Tersedia pada: www.labcompliance.com.

[JECFA] Joint Expert Committee on Food Additives. 2006. Combined Compendium of Food Additive Specifications Volume 4. *Analytical Methods, Test Procedures and Laboratory Solutions Used By And Referenced in The Food Additive Specifications*.

- Rome (IT): Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- Letter WS. 1992. A Rapid Method for Phospholipid Class Separation by HPLC using an Evaporative Light-Scattering Detector. *J Liquid Chromatogr.* 15(2): 253–266.
- Min DB, Steenson DF. 1998. *Crude fat analysis*. Dalam: *Food Analysis*. Ed. Ke-3. SS. Nielsen (ed). Maryland (US): Aspen Publ.
- Osman H, Chin YK. 2006. Comparative sensitivities of cholesterol analysis using GC, HPLC and spectrophotometric methods. *The Malay J Anal Sci.* 10(2): 205–210.
- Sullivan DM, Carpenter DE. 1993. *Methods of analysis for nutrition labeling*. Chapter 11, AOAC Official Method 976.26, Cholesterol in Multicomponent Foods, hlm. 177–181.
- USDA. 2011. Cholesterol High Avoid. [Internet] [Diunduh 2011 Feb 10]. Tersedia pada: http://www.dietaryfiberfood.com/cholesterol_high_avoid.php.