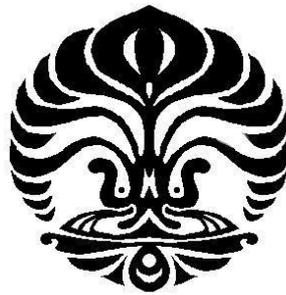


**ANALISIS AKRILAMIDA DALAM MINYAK JELANTAH SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

NUR SAMSIYAH

030505045Y



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2009**

**ANALISIS AKRILAMIDA DALAM MINYAK JELANTAH SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

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

Oleh:

NUR SAMSIYAH

030505045Y



DEPOK

2009

SKRIPSI : ANALISIS AKRILAMIDA DALAM MINYAK JELANTAH
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

NAMA : NUR SAMSIYAH

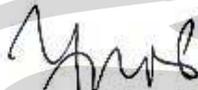
NPM : 030505045Y

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JUNI 2009


Drs. UMAR MANSUR, M.Sc.

PEMBIMBING I


Dr. YAHDIANA HARAHAP, M.S.

PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana: 10 Juli 2009

Penguji I : Drs. Hayun, M.Si. 

Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si. 

Penguji III : Dra. Rosmaladewi. 

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, kiranya sulit bagi penulis untuk menyelesaikan penulisan ini tepat pada waktunya. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI
2. Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc., selaku Pembimbing I, dan Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku pembimbing II, yang dengan tulus dan sabar memberi bimbingan, pengarahan, bantuan, dan saran-saran yang sangat bermanfaat selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya skripsi ini
3. Ibu Dra. Azizahwati, M.S., selaku pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama masa pendidikan di Farmasi FMIPA UI
4. Seluruh dosen KBI Kimia Farmasi atas semua masukan, saran dan bantuan selama penelitian berlangsung
5. Seluruh staf pengajar, laboran, dan karyawan Departemen Farmasi yang telah membantu penulis selama masa pendidikan dan penelitian

6. Keluarga tercinta yang senantiasa memberi dukungan, semangat, dan kasih sayang tiada hentinya
7. Teman-teman KBI Kimia Farmasi 2009; Widia, Ventry, Ndut, terima kasih atas persahabatannya; dan seluruh rekan Farmasi angkatan 2005 untuk keceriaannya yang tidak terlupakan
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dan semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Depok, Juni 2009

Penulis

ABSTRAK

Akrilamida diketahui terdapat pada makanan tertentu, khususnya makanan dengan karbohidrat tinggi yang dalam proses dan pembuatannya menggunakan suhu lebih dari 120°C. Telah dilaporkan juga bahwa terjadi penurunan kualitas fisik dan kimia, bahkan terbentuknya senyawa toksik bila minyak goreng dipanaskan terus-menerus. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menetapkan kadar akrilamida dalam minyak jelantah yang berasal dari pedagang makanan kaki lima dan warung makan. Analisis dilakukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, menggunakan kolom Kromasil®-100 5C18 RP 5 µm, 250 x 4,6 mm; fase gerak 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetone-nitril-air (5:95) pH = 2,50; laju alir 0,5 mL/menit; dan dideteksi pada panjang gelombang 210 nm dengan detektor ultraviolet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa akrilamida terdapat pada kedua sampel minyak jelantah yang dianalisis, yaitu dengan kadar rata-rata $2,64 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$ untuk Sampel I dan $19,32 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$ untuk Sampel II.

Kata kunci: akrilamida, KCKT, minyak goreng, minyak jelantah, toksik

ix + 68 hlm; gbr; tab; lamp

Bibliografi: 19 (1991-2008)

ABSTRACT

Acrylamide has been found in some food, especially food is rich in carbohydrate and treated in more than 120°C. It also has been reported that quality of frying oil was decreased, even toxic substances was formed when the oil was heated continuously. The purpose of this research is to identification and quantification acrylamide content of waste frying oil from foodstall and small food stand. Analysis was done by High Performance Liquid Chromatography, using Kromasil®-100 5C18 RP 5 µm, 250 x 4.6 mm column; mobile phase consisted of 3.5 mM phosphoric acid 85% in acetonitrile-water (5:95) pH = 2.50; flow rate of 0.5 mL/minute; and was detected at wavelength 210 nm with ultraviolet detector. The result showed that samples were positively contained acrylamide, and the content was found to range from 2.64 ± 0.11 µg/g of Sample I to 19.32 ± 0.31 µg/g of Sample II.

Keywords: acrylamide, frying oil, HPLC, toxic, waste frying oil

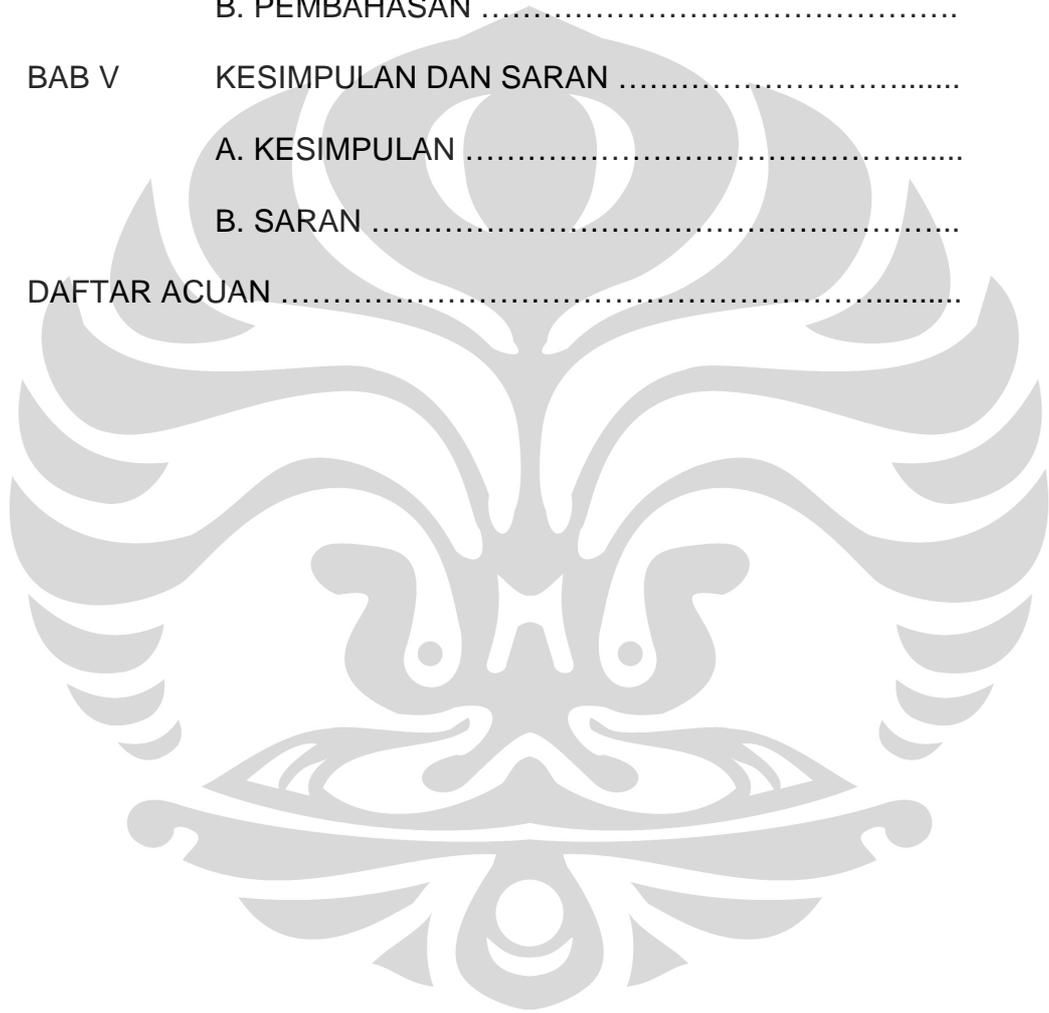
ix + 68 pages; figures; tables; appendixes

Bibliography: 19 (1991-2008)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN	3
C. HIPOTESIS	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. AKRILAMIDA	4
B. PEMBENTUKAN AKRILAMIDA DALAM MINYAK JELANTAH	5
C. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI	7
D. VALIDASI METODE ANALISIS	15
E. METODE ANALISIS AKRILAMIDA	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	23
A. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	23

	B. ALAT DAN BAHAN	23
	C. CARA KERJA	25
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
	A. HASIL	30
	B. PEMBAHASAN	33
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	40
	A. KESIMPULAN	40
	B. SARAN	40
DAFTAR ACUAN		41



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia akrilamida	4
2. Mekanisme pembentukan akrilamida melalui reaksi Maillard	7
3. Foto sampel minyak jelantah	45
4. Foto alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	46
5. Spektrum serapan larutan baku akrilamida 10 µg/mL dengan pelarut fase gerak	47
6. Kromatogram baku akrilamida 0,4 µg/mL dengan pelarut fase gerak	48
7. Kurva kalibrasi larutan baku akrilamida	49
8. Kromatogram akrilamida dalam Sampel I	50
9. Kromatogram akrilamida dalam Sampel II	51

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data uji kesesuaian sistem	53
2. Data kurva kalibrasi larutan baku akrilamida	54
3. Data batas deteksi, batas kuantitasi, dan koefisien variasi dari larutan baku akrilamida	55
4. Data presisi larutan baku akrilamida	56
5. Data persen perolehan kembali akrilamida dalam 15 g Sampel I	57
6. Data persen perolehan kembali akrilamida dalam 15 g sampel II	58
7. Data kadar akrilamida dalam Sampel I	59
8. Data kadar akrilamida dalam Sampel II	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan garis linier	62
2. Cara memperoleh simpangan baku dan koefisien variasi	63
3. Cara memperoleh batas deteksi dan batas kuantitasi	64
4. Cara perhitungan persen perolehan kembali sampel minyak jelantah menggunakan metode adisi	65
5. Cara perhitungan kadar akrilamida dalam sampel minyak jelantah....	66
6. Cara memperoleh konsentrasi baku akrilamida sebenarnya di- tambahkan pada uji perolehan kembali	67
7. Sertifikat analisa akrilamida	68

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Akrilamida merupakan bentuk monomer dari poliakrilamida, suatu polimer yang biasa digunakan untuk menjernihkan air minum dan memproduksi kertas (1,2). Akrilamida telah diproduksi sejak tahun 1950 dengan cara hidrasi akrilonitril (3). Poliakrilamida juga telah diaplikasikan secara luas pada pengolahan tanah dan pasir; produksi beton, minyak mentah, tekstil; dan sebagai zat aditif pada kosmetik (2).

Keberadaan akrilamida pada makanan, khususnya makanan dengan karbohidrat tinggi, yang diproses dengan pemanasan suhu tinggi sudah dilaporkan sejak tahun 2002. Peneliti di Swedia melaporkan bahwa sejumlah akrilamida terbentuk ketika makanan digoreng, dipanggang, atau dibakar pada suhu di atas 120°C, seperti pada kentang goreng, keripik kentang, produk sereal, dan kopi. Mekanisme pembentukannya diketahui terutama berasal dari reaksi antara asam amino asparagin dengan gula pereduksi (2,3).

Akrilamida berpotensi menimbulkan efek toksik, termasuk diantaranya bersifat neurotoksik pada manusia (2). Berdasarkan beberapa penelitian

yang telah dilakukan secara *in vitro* pada kultur sel mamalia dan *in vivo* pada mencit dan tikus, akrilamida diketahui dapat merusak materi genetik. Akrilamida dapat menginduksi tumor pada tikus pada pemberian jangka panjang. *International Agency for Research on Cancer (IARC)* mengklasifikasikan akrilamida sebagai senyawa yang mungkin menyebabkan kanker atau berpotensi karsinogenik pada manusia (*probable human carcinogen*) (1).

Masyarakat cenderung memakai kembali minyak jelantah untuk menggoreng atau memasak demi penghematan, tanpa mempertimbangkan resiko bagi kesehatan (4). Padahal, telah diketahui bahwa terdapat penurunan kualitas fisik dan kimia bila minyak goreng terus-menerus dipanaskan atau dipakai berulang-ulang (5). Beberapa reaksi kimia, seperti oksidasi dan hidrolisis, berlangsung lebih cepat ketika minyak goreng dipanaskan dengan suhu yang semakin tinggi, menghasilkan senyawa-senyawa tertentu yang bersifat toksik (5,6,7).

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan menetapkan kadar akrilamida dalam minyak jelantah yang diambil dari beberapa sumber, yaitu warung makan dan pedagang makanan kaki lima secara KCKT. Sampel minyak jelantah dipilih karena selain pada beberapa makanan, akrilamida diduga juga terdapat dalam minyak jelantah. Akrilamida dalam minyak jelantah terbentuk melalui reaksi antara asam amino dalam makanan dengan senyawa karbonil hasil oksidasi minyak goreng yang terbentuk selama penggorengan berlangsung (8).

Sistem kromatografi yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan kolom C18-RP, detektor UV-Vis pada panjang gelombang 210 nm, fase gerak 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetonitril-air dengan perbandingan 5:95, laju alir 0,5 mL/menit, dan fase gerak tersebut digunakan sebagai pelarut (9). Sampel diekstraksi dengan menggunakan heksan dan air (50:75), kemudian lapisan fase air dikumpulkan dan dianalisis (2).

B. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan kadar akrilamida dalam minyak jelantah dari beberapa sumber, yaitu pedagang makanan kaki lima dan warung makan.

C. HIPOTESIS

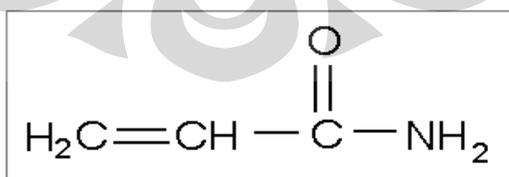
Akrilamida terdapat dalam minyak jelantah dan dapat ditentukan kadarnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. AKRILAMIDA

Akrilamida (sinonim: 2-Propenamida, etilen karboksiamida, akrilik amida, vinil amida) merupakan senyawa kimia berwarna putih, berbentuk kristal padat, dan memiliki bobot molekul 71,08. Akrilamida memiliki titik lebur $84,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, tekanan uap yang rendah (0,007 mmHg pada suhu 25°C ; 0,03 mmHg pada suhu 40°C ; 0,07 mmHg pada suhu 50°C , dan 0,14 mmHg pada suhu 55°C), titik didih yang tinggi (136°C pada tekanan 3,3 kPa/25 mmHg). Kelarutan akrilamida dalam g/100 ml pelarut pada suhu 30°C : 215,5 (air); 155 (metanol); 86,2 (etanol); 63,1 (aseton); 39,6 (asetonitril); 0,35 (benzen); dan 0,0068 (n-Heptan). Akrilamida padat bersifat stabil pada temperatur ruangan, tetapi dapat berpolimerisasi dengan cepat pada titik leburnya atau apabila terpapar sinar UV dan agen pengoksidasi (1,2).



Gambar 1: Struktur Kimia Akrilamida

Absorpsi akrilamida dapat melalui saluran pernafasan, saluran cerna, dan kulit. Akrilamida didistribusikan secara luas ke dalam jaringan, termasuk plasenta dan air susu. Metabolisme akrilamida dikatalisis oleh enzim CYP2E1 dengan metabolit glisidamida, suatu epoksida reaktif. Jalur alternatif lainnya adalah melalui konjugasi dengan glutathion (GSH). Akrilamida dan metabolitnya diekskresikan dengan cepat melalui urin. Lebih dari 60% akrilamida yang masuk ke dalam tubuh dapat ditemukan kembali di urin, yaitu 86% berkonjugasi dengan GSH. Rasio antara glisidamida dengan konjugat akrilamida-GSH di dalam urin manusia $\pm 0,1$ (10,11).

Aktivitas akrilamida dipengaruhi oleh adanya ikatan rangkap tidak jenuh α, β . Pengaruh penting yang terlihat antara lain terbentuknya metabolit glisidamida yang sangat reaktif terhadap elektrofil seperti DNA dan reaksi antara β -karbon dengan nukleofil seperti protein (*Michael type-reaction*). Kedua reaksi tersebut penting karena menjelaskan target utama akrilamida (protein) dan glisidamida (DNA) (3).

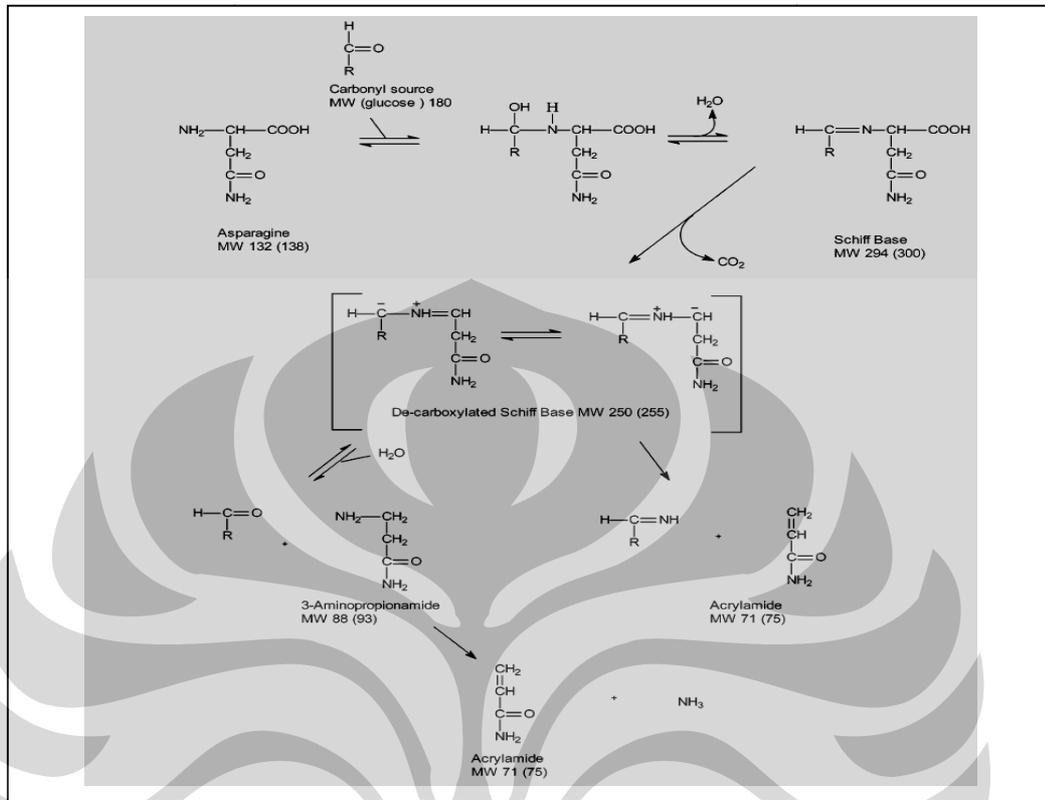
B. PEMBENTUKAN AKRILAMIDA DALAM MINYAK JELANTAH

Minyak jelantah adalah minyak goreng sisa, bekas dipakai untuk menggoreng. Minyak jenis ini mudah dikenal karena warnanya tidak jernih lagi, bisa coklat bahkan hitam bila dibandingkan dengan minyak goreng yang

belum dipakai (4). Nagao *et.al.* melaporkan bahwa telah terjadi penurunan kualitas fisik dan kimia pada minyak jelantah (5).

Hidrolisis, oksidasi, dan polimerisasi pada minyak goreng merupakan reaksi kimia yang umum terjadi selama proses menggoreng berlangsung dan menghasilkan senyawa volatil dan nonvolatil. Sebagian besar senyawa volatil menguap di atmosfer dan sisanya akan mengalami reaksi kimia lebih lanjut atau terabsorpsi ke dalam makanan yang digoreng, sedangkan senyawa nonvolatil menyebabkan perubahan fisiko-kimia, baik pada makanan yang digoreng maupun minyak yang dipakai sebagai media untuk menggoreng/memanaskan (6). Perubahan warna minyak goreng menjadi kecoklatan diketahui akibat dari reaksi antara asam amino dalam makanan dengan senyawa karbonil hasil oksidasi minyak goreng yang terbentuk selama penggorengan berlangsung (8).

Akrilamida dianggap sebagai produk samping dari reaksi Maillard, yaitu reaksi yang berlangsung antara asam amino asparagin dengan gula pereduksi seperti glukosa (senyawa karbonil), kemudian terbentuk basa Schiff, lalu terjadi dekarboksilasi, dan terbentuklah akrilamida. Selama proses menggoreng, diketahui bahwa asparagin dan gula yang berasal dari makanan dapat terlepas ke dalam minyak, dan selanjutnya membentuk akrilamida. Mekanisme pembentukan akrilamida lainnya dihubungkan dengan terlepasnya akrilamida, yang terkandung di dalam makanan seperti kentang goreng dan keripik kentang yang diproses dengan pemanasan, ke dalam minyak goreng (2,8).



Gambar 2: Mekanisme pembentukan akrilamida melalui reaksi Maillard (2)

C. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

1. Teori Dasar

Kromatografi adalah istilah umum untuk berbagai cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara dua fase, yakni fase gerak, dapat berupa gas atau zat cair, dan fase diam, dapat berupa zat cair atau zat padat (12). Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan suatu teknik pemisahan sampel

dalam fase diam berupa zat padat dan fase gerak berupa zat cair dimana pompa KCKT dilengkapi dengan suatu tekanan tinggi yang lebih dari 6000 psi (400 bar) untuk menghantarkan eluen pada kecepatan optimal (13).

Keuntungan KCKT antara lain:

- a. Waktu analisis cepat.
- b. Daya pisahnya baik.
- c. Peka
- d. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi.
- e. Kolom dapat dipakai kembali.
- f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil.
- g. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan.
- h. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (14).

2. Instrumentasi

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu:

a. Pompa

Fungsi pompa pada KCKT yaitu untuk mengalirkan fase gerak melalui kolom pada laju alir yang dikontrol (13). Pompa, segel-segel pompa, dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, baja nirkarat, teflon, dan batu nilam. Jenis-jenis pompa yang

digunakan yaitu pompa tekanan tetap, pompa semprit, dan pompa tekanan uap (14).

Agar dapat mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi dan laju alir yang konstan, pompa sebaiknya memiliki karakteristik sebagai berikut:

- Interior pompa harus tahan terhadap pelarut yang digunakan.
- Adanya rentang laju alir dan mudah untuk mengaturnya.
- Aliran pelarut tanpa pulsa.
- Perubahan pelarut dapat dilakukan secara mudah.
- Pembongkaran dan perbaikan pompa dapat dilakukan secara mudah (15).

b. Injektor (14)

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Jenis-jenis injektor:

- Aliran henti
Aliran dihentikan, penyuntikan dilakukan pada tekanan atmosfer, setelah sistem ditutup aliran dilanjutkan kembali.
- Septum
Septum merupakan injektor langsung pada aliran, dapat dipakai pada tekanan sampai 60-70 atm, tetapi tidak dapat dipakai untuk pelarut kromatografi cair.
- Katup jalan kitar

Katup jalan kitar biasa dipakai untuk menyutikkan volume yang lebih dari 10 μL .

- Auto injektor

Auto injektor merupakan otomatisasi dari katup jalan kitar.

c. Kolom (14)

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Untuk menahan tekanan tinggi, kolom dibuat dari bahan yang kokoh seperti stainless steel atau campuran logam dengan gelas. Kolom standar mempunyai diameter dalam antara 4-5 mm. Isi kolom harus berukuran homogen dan stabil secara mekanik. Diameter partikel berkisar antara 4-7 μm . Panjang kolom standar berkisar antara 10-30 cm.

d. Detektor (14)

Detektor berfungsi untuk mengidentifikasi komponen-komponen sampel di dalam fase gerak dan mengukur jumlahnya. Macam-macam detektor yang dapat digunakan yaitu :

- Detektor serapan

Digunakan untuk mendeteksi komponen zat yang menyerap cahaya atau memberikan serapan pada panjang gelombang analisis.

- Detektor fluoresensi

Digunakan untuk mendeteksi komponen-komponen zat yang dapat berfluoresensi. Akan tetapi dapat juga digunakan untuk komponen yang

tidak berfluoresensi, namun komponen tersebut harus diderivatisasi terlebih dahulu dengan penggunaan reagen yang sesuai.

- Detektor indeks bias

Digunakan untuk mendeteksi senyawa yang memiliki indeks bias tertentu.

- Detektor penguapan penghamburan cahaya (*evaporative light scattering detector*)

Kelebihan utama detektor ini adalah dapat memberikan respon yang relatif sama untuk semua senyawa yang tidak menguap. Detektor ini lebih sensitif dibandingkan dengan detektor indeks bias.

- Detektor elektrokimia

Detektor ini didasarkan pada empat metode elektroanalitik meliputi amperometri, voltametri, coulometri dan konduktometri.

e. Integrator (14)

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada dua macam integrator, yaitu:

- Integrator piringan yang bekerja secara mekanik
- Integrator digital/elektronik, dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

3. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif (15)

Analisis KCKT dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.

a. Analisis Kualitatif

Cara yang terbaik adalah dengan menggunakan metode waktu relatif:

$$Ri\ st = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

Keterangan: t_{Ri} = waktu retensi komponen zat

t_{Rst} = waktu retensi standar

Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama.

b. Analisis Kuantitatif

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

- Baku luar

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

$$Cs = \frac{As}{Ast} \times Cst$$

Keterangan: Cs = konsentrasi sampel

As = luas puncak sampel

Cst = konsentrasi standar

Ast = luas puncak standar

- Baku dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Buat kurva baku antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar.

4. Teori Kolom (15)

Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom, yaitu:

a. Efisiensi kolom

Efisiensi kolom menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom diketahui dengan menghitung jumlah plat teori (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan theoretical plate (Height Equivalent to a Theoretical Plate, HETP). Yang dimaksud dengan HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom. Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Keterangan: N = Jumlah pelat teoritis

HETP = Panjang lempeng teoritik

t_R = Waktu retensi

W = Lebar puncak

L = Panjang kolom

b. Resolusi

Resolusi merupakan suatu ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lainnya. Resolusi didefinisikan sebagai jarak (t_R) antara dua puncak dibagi rata-rata lebar (W) dua puncak yang diukur pada alas puncak.

$$R = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{W_A + W_B}$$

Keterangan: R = Resolusi

t_{RB} = Waktu retensi spesi B

t_{RA} = Waktu retensi spesi A

W_B = Lebar puncak spesi B

W_A = Lebar puncak spesi A

Pemisahan dapat dikatakan baik apabila nilai resolusi lebih besar dari 1,5.

D. VALIDASI METODE ANALISIS (16)

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

Parameter tersebut meliputi:

1. Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (placebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel placebo (eksipien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi

tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

2. Keseksamaan (*Precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

3. Selektivitas (*Spesifisitas*)

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

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis, sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{x_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}).

Syarat-syarat dari kelinearan garis yaitu :

- a. Koefisien korelasi ($r \geq 0,9990$)
- b. Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), $(r_i)^2$ sekecil mungkin ≈ 0 . r_i diperoleh dari :

$$r_i = y_i - (bx_i + a)$$

- c. Koefisien fungsi regresi ($V_{x_0} \leq 2,0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5,0\%$ untuk sediaan biologi).

- d. Kepekaan analisis ($\Delta y/\Delta x$)

$$\Delta y/\Delta x = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_1} \approx \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

5. Batas deteksi dan batas kuantitasi

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

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$).

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

Keterangan:

Q = batas deteksi atau batas kuantitasi

k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

S_b = simpangan baku respon analitik dari blanko = $S_{y/x}$

S_l = arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

6. Ketangguhan metode (*Ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dan lain-lain. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analisis.

7. Kekuatan (*Robustness*)

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

E. METODE ANALISIS AKRILAMIDA

Beberapa metode analisis akrilamida antara lain:

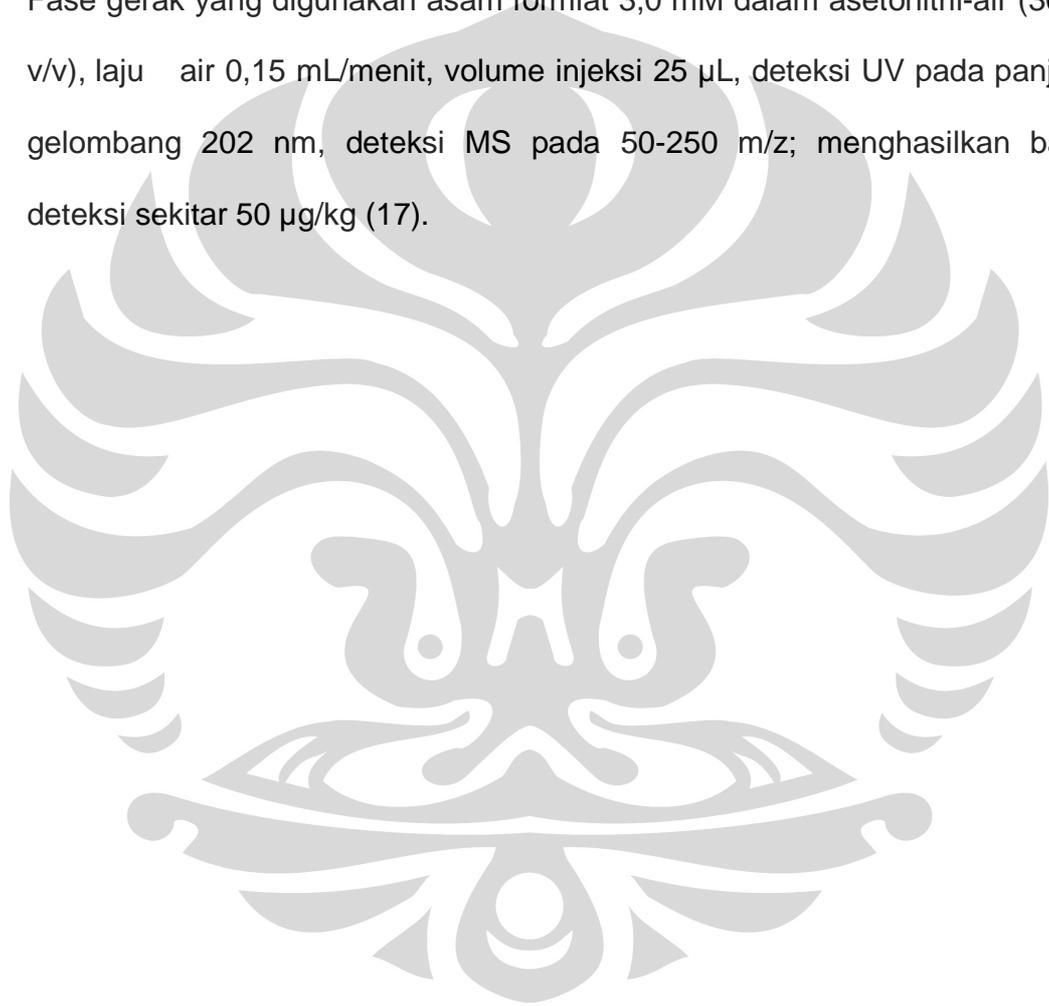
1. Metode yang sensitif telah dikembangkan dan divalidasi untuk analisis akrilamida dalam minyak goreng, yaitu menggunakan GC/MS-SIM, 6890/5973N (Agilent Technologies, Inc.), kolom DB-5 MS (Agilent Technologies, Inc.) berukuran 0,25 mm x 30 m, tebal 0,25 μm ; suhu oven diatur pada 20°C/menit dari 250°C (2 menit) hingga 300°C. Laju alir gas pembawa helium 1 mL/menit. Spektrometri massa menggunakan pengionisasi ion elektro positif (EI). Sumber ion pada 230°C (17).

2. Kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS), dengan baku dalam akrilamida, 8000 *Gas Chromatograph* dengan injektor *on-column* (Thermo Quest, Milan, Italia) dan spektrometer massa *SSQ7000 Quadrupole* (Finnigan, San Jose, Amerika Serikat). Sebanyak 1 μL sampel disuntikkan ke dalam kolom berukuran 10 m x 0,25 mm dan pemisahan kolom dengan 0,4 μm pelat Carbowax 20M (yang dapat meningkatkan sampel hingga 5 μL bila diperlukan). Gas pembawa helium dengan tekanan 40 kPa; suhu oven diatur pada 15 $^{\circ}$ /menit dari 70 $^{\circ}\text{C}$ (1 menit) hingga 220 $^{\circ}\text{C}$ (2 menit). Spektrometri massa menggunakan pengionisasi kimia ion positif (CI) dengan metana sebagai gas pembawa. Sumber ion pada 100 $^{\circ}\text{C}$, spektrum massanya adalah m/z 72 (akrilamida), 86 (metaakrilamida), dan 88 (butiramida) (17).

3. Kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS), Mega 5300 *Gas Chromatograph* dengan *on-column* dan sebuah injektor *split/splitless* (Fison, Milan, Italia) dan sebuah spektrometer massa ITD 400 (Finnigan, San Jose, Amerika Serikat). Sebanyak 1-2 μL sampel disuntikkan ke dalam kolom berukuran 100 cm x 0,32 mm (ID) prakolom deaktivasi dengan difenil tetrametil disilazan (BGB Analytik AG, Anwil, Swiss), dihubungkan ke dalam kolom separasi berukuran 30 m x 0,32 mm (ID) dengan 0,25 μm pelat FFAP (BGB Analytik). Gas pembawa helium dengan tekanan 75 kPa. Suhu oven diatur pada 10 $^{\circ}\text{C}$ /menit dari 110 $^{\circ}\text{C}$ hingga 230 $^{\circ}\text{C}$ dan 25 $^{\circ}\text{C}$ /menit hingga 250 $^{\circ}\text{C}$ (1 menit). Spektrometri massa menggunakan pengionisasi ion elektro positif (EI). Sumber ion pada 200 $^{\circ}\text{C}$ (17).

4. Kromatografi gas (GC) dengan detektor FID, kolom Stabilwax[®] berukuran 15 meter, diameter dalam 0,53; 0,50 μm film, gas pembawa adalah helium dengan suhu injeksi 260°C (17).
5. Kromatografi cair-spektrometri massa tandem (LC/MS/MS). Kolom C-18 RP dan fase mobil yang sangat polar (asam asetat 0,1% dan metanol 0,5%) (17).
6. Kromatografi cair kinerja tinggi-spektrometri massa tandem (HPLC/MS/MS), dengan kolom Agilent 1100 sistem LiChrosphere[®] CN (250 x 4 mm, 5 μm), Merck, Darmstadt. Fase gerak A: asam asetat 1%, fase gerak B: asetonitril, suhu oven 25°C. Laju alir 700 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Baku dalam d3-akrilamida (AA-d3) (17).
7. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor UV (DX- 600 dan PDA-100, Dionex), fase gerak 3,5 mmol/liter asam formiat dalam air-asetonitril (93% : 7% v/v). Kolom Dionex ICE-AS-I (9 mm x 25 cm), laju alir 1 mL/menit dan deteksi UV pada 202 nm. Volume sampel 25 atau 50 μL disuntikkan ke dalam kolom. Dengan kondisi ini, akrilamida terelusi selama 23 menit (17).
8. Penetapan kadar akrilamida menggunakan pelarut ekstraksi dipercepat yang dilanjutkan dengan kromatografi ion dengan detektor UV atau MS. Metode yang digunakan berlangsung cepat dengan menggunakan metode ekstraksi *accelerated solvent extraction* (ASE) 100 atau 200 (Dimex, Surnyvale, California, Amerika Serikat) dengan 34 mL sel untuk ASE 100, dan 33 mL untuk ASE 200. Sampel diekstraksi selama 20 menit

menggunakan air atau air dengan tambahan asam formiat 10 mM. Ekstrak segera dianalisis dengan menggunakan kromatografi ion (IC) dan menggunakan kolom elusi ion 4 mm dan dua detektor UV dan MS. Kondisi kromatografi adalah dengan kolom IonPac[®] ICE-AS 4 x 250 mm; 7,5 µm. Fase gerak yang digunakan asam formiat 3,0 mM dalam asetonitril-air (30:70 v/v), laju air 0,15 mL/menit, volume injeksi 25 µL, deteksi UV pada panjang gelombang 202 nm, deteksi MS pada 50-250 m/z; menghasilkan batas deteksi sekitar 50 µg/kg (17).



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA UI, dalam kurun waktu Februari hingga Mei 2009.

B. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

- a. Seperangkat alat KCKT yang terdiri dari kolom (Kromasil-100 5C18 RP 5 μ m, 250 x 4,6 mm, Akzonobel), pompa (LC-6A, Shimadzu), detektor (SPD-6A UV, Shimadzu), dan pemroses data (CBM-102)
- b. Syringe 25 μ L (Hamilton)
- c. Filter eluen dan sampel 0,45 μ m (Whatman)
- d. Pengaduk ultrasonik (Elmasonic S 60 H)
- e. Laboratory shaker (Orbit Shaker)
- f. pH-meter (Eutech pH 510)

g. Alat-alat kimia

2. Bahan

a. Sampel minyak jelantah

Sampel minyak jelantah yang digunakan dipilih dari beberapa sumber yaitu pedagang makanan kaki lima dan rumah makan. Sampel yang dipilih dikhawatirkan memiliki kandungan akrilamida yang tinggi.

- Sampel I

Sampel ini berasal dari pedagang jajanan gorengan di sekitar Jl. Raya Margonda, Depok. Jajanan gorengan tersebut antara lain tempe, tahu, dan pisang goreng.

- Sampel II

Sampel ini berasal dari warung makan khas salah satu propinsi di Indonesia.

b. Bahan kimia

- Akrilamida (*reagent grade for synthesis*, Merck)
- Aquabides (Otsuka)
- Asam fosfat 85% (*reagent grade for analysis*, Merck)
- Asetonitril (*gradient grade for liquid chromatography*, Merck)
- Heksan (*reagent grade for analysis*, Merck)
- Metanol (*gradient grade for liquid chromatography*, Merck)

C. CARA KERJA

1. Pembuatan fase gerak asetonitril-air (5:95) pH 2,50

Sebanyak 50 mL asetonitril dan 950 mL air dimasukkan ke dalam botol 1000 mL, lalu ditambahkan asam fosfat 85% hingga pH 2,50; dan dikocok hingga homogen. Kemudian fase gerak disaring dengan filter eluen dan udara dalam fase gerak dihilangkan dengan pengaduk ultrasonik.

2. Pembuatan larutan baku akrilamida dengan pelarut fase gerak yang digunakan

Baku akrilamida ditimbang secara seksama sebanyak 25,0 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, dan dilarutkan dengan pelarut fase gerak yang digunakan sampai tanda batas (Larutan A). Sebanyak 1,0 mL Larutan A dipipet, dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, kemudian ditambahkan dengan pelarut fase gerak yang digunakan sampai tanda batas (Larutan B). Buat larutan baku akrilamida dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; dan 1,2 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan B secara kuantitatif dan bertahap.

3. Pembuatan spektrum serapan akrilamida

Larutan baku akrilamida dengan konsentrasi 10 µg/mL dibuat, diukur serapannya pada panjang gelombang 190-250 nm secara spektrofotometri, dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

4. Uji kesesuaian sistem

Sistem kromatografi yang digunakan adalah menggunakan kolom C18-RP, detektor UV-Vis pada panjang gelombang 210 nm, fase gerak 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetonitril-air dengan perbandingan 5:95, laju alir 0,5 mL/menit, dan fase gerak tersebut digunakan sebagai pelarut (9). Larutan baku akrilamida dengan konsentrasi 0,4 µg/mL disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam KCKT pada kondisi tersebut. Prosedur diulang sebanyak lima kali. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan waktu retensi; efisiensi kolom (N dan HETP); faktor ikutan; dan koefisien variasinya.

5. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan baku akrilamida dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; dan 1,2 µg/mL masing-masing disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam KCKT

pada kondisi terpilih. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya.

6. Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis regresi linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

7. Uji keterulangan (Presisi)

Larutan baku akrilamida dengan konsentrasi 0,05; 0,4; 1,0 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20 μL ke dalam kolom pada kondisi terpilih. Ulangi prosedur sebanyak enam kali. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan dihitung nilai koefisien variasinya.

8. Uji perolehan kembali (Akurasi)

Baku akrilamida ditimbang secara seksama sebanyak 25,0 mg. Tambahkan Sampel X sampai 25 gram, kemudian homogenkan (Sampel A). Timbang 0,375 gram Sampel A, tambahkan Sampel X sampai 15 gram, dan homogenkan (Sampel B). Kemudian ditambahkan 50 mL heksan dan 75 mL air, kocok dengan *laboratory shaker* pada kecepatan 200 RPM selama 60 menit. Lapisan fase air yang terbentuk dikumpulkan, kemudian dipipet sebanyak 5,0 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL, dan ditambahkan fase gerak yang digunakan sampai tanda batas. Saring larutan sampel dengan penyaring sampel Whatman. Sampel disuntikkan sebanyak 20 μ L ke dalam KCKT kemudian dicatat luas puncaknya. Lakukan perlakuan yang sama terhadap Sampel X tanpa penambahan baku dalam. Ulangi prosedur sebanyak tiga kali. Kadar dihitung dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi dan dihitung uji perolehan kembalinya.

9. Penetapan kadar akrilamida dalam sampel minyak jelantah

Sebanyak 15 gram Sampel X ditimbang, kemudian ditambahkan 50 mL heksan dan 75 mL air, kocok dengan *laboratory shaker* pada kecepatan 200 RPM selama 60 menit. Lapisan fase air yang terbentuk dikumpulkan, kemudian dipipet sebanyak 5,0 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL, dan ditambahkan fase gerak yang digunakan sampai tanda batas. Saring larutan sampel dengan penyaring sampel Whatman. Sampel disuntikkan

sebanyak 20 μL ke dalam KCKT kemudian dicatat luas puncaknya. Ulangi prosedur sebanyak tiga kali. Kadar dihitung dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Spektrum serapan

Serapan maksimum akrilamida dengan pelarut fase gerak yang digunakan adalah pada panjang gelombang 197,2 nm, konsentrasi akrilamida dalam larutan yang diukur adalah 10 µg/mL. Spektrum serapan dapat dilihat pada gambar 5.

2. Uji kesesuaian sistem

Kondisi percobaan yang digunakan:

Kolom	: Kromasil-100 5C18 RP 5 µm, 250 x 4,6 mm, Akzonobel
Pompa	: LC-6A, Shimadzu
Detektor	: SPD-6A UV, Shimadzu
Fase gerak	: 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetonitril-air (5:95) pH = 2,50

Pelarut : fase gerak yang digunakan, 3,5 mM asam fosfat 85%
dalam asetonitril-air (5:95) pH = 2,50

Panjang gelombang: 210 nm

Laju alir : 0,5 mL/menit

Volume injeksi : 20 μ L

Data yang diperoleh sebagai hasil dari uji kesesuaian sistem untuk larutan baku akrilamida selengkapnya dapat dilihat pada tabel 1.

3. Kurva kalibrasi (Linieritas)

Kurva kalibrasi akrilamida:

Persamaan garis : $Y = 182890,1449X - 1385,9136$

Koefisien korelasi (r): 0,9999

Data selengkapnya dapat dilihat pada gambar 7 dan tabel 2.

4. Batas deteksi, batas kuantitasi, dan koefisien variasi dari fungsi

Batas deteksi akrilamida pada percobaan ini adalah 0,0135 μ g/mL, batas kuantitasnya adalah 0,0451 μ g/mL, dan koefisien variasi dari fungsi sebesar 0,97%. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 3.

5. Uji keterulangan (Presisi)

Hasil uji keterulangan dari tiga konsentrasi larutan akrilamida yang diuji pada percobaan ini memberikan nilai koefisien variasi kurang dari 1%. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.

6. Uji perolehan kembali (Akurasi)

Persen perolehan kembali untuk analisis akrilamida dalam sampel minyak jelantah pada 2 sampel adalah:

- a. Pada sampel I, untuk konsentrasi 0,1704 $\mu\text{g/mL}$ adalah $84,40\% \pm 0,58$; konsentrasi 0,3181 $\mu\text{g/mL}$ adalah $87,06\% \pm 0,68$; dan konsentrasi 1,0272 $\mu\text{g/mL}$ adalah $90,00\% \pm 0,14$.
- b. Pada sampel II, untuk konsentrasi 0,1003 $\mu\text{g/mL}$ adalah $86,23\% \pm 0,78$; konsentrasi 0,3035 $\mu\text{g/mL}$ adalah $89,27\% \pm 0,71$; dan konsentrasi 1,1163 $\mu\text{g/mL}$ adalah $90,87\% \pm 0,45$.

Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 5.dan 6.

7. Kadar akrilamida dalam sampel minyak jelantah dengan menggunakan kurva kalibrasi

a. Kadar rata-rata akrilamida dalam sampel I adalah $2,64 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$

Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 7.

b. Kadar rata-rata akrilamida dalam sampel II adalah $19,32 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$

Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 8.

8. Kadar akrilamida dalam sampel minyak jelantah dengan menggunakan faktor persen perolehan kembali

a. Kadar rata-rata akrilamida dalam sampel I adalah $3,02 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$

b. Kadar rata-rata akrilamida dalam sampel II adalah $21,75 \pm 0,34 \mu\text{g/g}$

B. PEMBAHASAN

Seperti diketahui, akrilamida secara nyata ditemukan dalam makanan tertentu yang dalam proses dan pembuatannya (digoreng, dipanggang, dan dibakar) menggunakan suhu lebih dari 120°C . Kadar akrilamida akan meningkat dengan meningkatnya pemanasan dan bertambahnya waktu (17).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan akrilamida dalam minyak jelantah sekaligus menentukan kadar senyawa kimia tersebut menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pada penelitian sebelumnya (9,18) telah dilakukan analisis akrilamida dalam makanan dan

berhasil mendeteksi sejumlah akrilamida didalamnya. Oleh karena itu, penelitian tersebut dilanjutkan dengan menganalisis akrilamida yang diduga juga terdapat dalam minyak jelantah agar hasilnya kemudian dapat digunakan sebagai informasi kepada masyarakat guna menekan efek karsinogenik yang mungkin ditimbulkan. Metode KCKT dipilih karena cara kerjanya relatif sederhana, waktu analisisnya cepat, dan relatif murah.

Penelitian dimulai dengan mencari spektrum serapan larutan baku akrilamida, dilihat panjang gelombang dimana akrilamida memberi serapan maksimum dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Akrilamida dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV-Vis karena mempunyai gugus kromofor dan auksokrom. Panjang gelombang maksimum akrilamida yang diperoleh adalah 197,2 nm dengan konsentrasi larutan baku 10 µg/mL. Namun demikian analisis dengan KCKT tidak dilakukan pada panjang gelombang maksimum, melainkan pada panjang gelombang 210 nm karena pada panjang gelombang di bawah 210 nm pelarut dapat memberikan serapan dan pengotor akan menyerap lebih kuat sehingga akan mengganggu analisis.

Sistem kromatografi yang digunakan pada penelitian ini didasarkan pada penelitian-penelitian sebelumnya (9,18), yaitu menggunakan metode KCKT dengan kolom C18-RP, detektor UV-Vis pada panjang gelombang 210 nm, fase gerak 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetonitril-air dengan perbandingan 5:95, laju alir 0,5 mL/menit, dan fase gerak tersebut digunakan sebagai pelarut. Oleh karena itu, untuk mengetahui apakah metode tersebut

dapat dipakai pada penelitian ini, maka dilakukan uji kesesuaian sistem terlebih dahulu. Kesesuaian sistem dapat dilihat dari beberapa parameter, yaitu waktu retensi; efisiensi kolom (N dan HETP), faktor ikutan, dan koefisien variasinya. Berdasarkan data yang dapat dilihat pada tabel 1 terlihat bahwa metode analisis yang digunakan masih menghasilkan waktu retensi ideal, jumlah pelat teoritis diatas 2500, dan keterulangan yang baik (nilai koefisien variasinya di bawah 2%). Hasil ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan dapat digunakan untuk menganalisis komponen dalam sampel. Adapun kromatogram baku akrilamida dapat dilihat pada gambar 6.

Berdasarkan pembuatan kurva kalibrasi larutan baku akrilamida, didapat linieritas; koefisien fungsi regresi; batas deteksi; dan batas kuantitasi. Kurva kalibrasi terdiri atas enam konsentrasi larutan baku akrilamida rentang 0,05 sampai 1,2 $\mu\text{g/mL}$. Kurva kalibrasi menghasilkan koefisien korelasi yang baik, yaitu 0,9999. Hasil ini menunjukkan bahwa pada rentang konsentrasi yang digunakan, diperoleh suatu korelasi linier antara konsentrasi dan luas puncak yang diperoleh. Selain itu, diperolehnya nilai koefisien fungsi regresi lebih kecil dari 2% menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan menghasilkan linieritas yang baik. Hasil uji batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) yang diperoleh dari perhitungan secara statistik relatif cukup rendah, yaitu LOD sebesar 0,0135 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ sebesar 0,0451 $\mu\text{g/mL}$.

Penelitian dilanjutkan dengan uji presisi. Larutan baku akrilamida yang sama disuntikkan sebanyak enam kali dari tiga konsentrasi yang

berbeda, yaitu 0,05; 0,4; dan 1 $\mu\text{g/mL}$. Hasil data keterulangannya menunjukkan hasil koefisien variasi yang baik, yaitu di bawah 1%.

Metode penambahan baku (metode adisi) digunakan pada uji perolehan kembali (akurasi), yaitu sampel yang diduga mengandung akrilamida ditambahkan baku akrilamida yang telah diketahui kadarnya. Hasil uji perolehan kembali diketahui dengan mengurangi sampel yang ditambahkan baku akrilamida tersebut dengan sampel yang sama tanpa penambahan baku akrilamida. Metode penambahan baku dilakukan karena sulitnya membuat minyak jelantah yang matriksnya tidak dapat diketahui secara pasti. Uji perolehan kembali dimaksudkan untuk menyelidiki kesalahan ekstraksi yang dilakukan, bilamana sampel tidak terekstraksi dengan sempurna.

Proses ekstraksi sampel dilakukan dengan pelarut heksan-air (50:75) menggunakan *laboratory shaker* berkecepatan 200 RPM selama 60 menit, kemudian lapisan fase air dikumpulkan, dan selanjutnya dianalisis. Pelarut air digunakan untuk menarik akrilamida dari sampel. Sementara itu pelarut heksan digunakan untuk melarutkan pengotor-pengotor yang bersifat non polar dalam minyak jelantah yang mungkin dapat menghalangi terekstraksinya akrilamida dari sampel dengan sempurna. Jika diekstraksi dengan pelarut air saja, maka setelah dikocok dengan *laboratory shaker* akan terbentuk satu lapisan emulsi sehingga sulit menentukan dimana akrilamida berada.

Uji perolehan kembali (UPK) dilakukan pada kedua sampel yang dianalisis. Perlakuan UPK pada kedua sampel dikarenakan sumber minyak jelantah tersebut berbeda. Hasil UPK pada kedua sampel memberikan nilai sebesar 87,15% untuk Sampel I dan 88,79% untuk Sampel II.

Minyak jelantah yang digunakan sebagai sampel berjumlah dua sampel. Kriteria yang digunakan adalah minyak jelantah yang berasal dari pedagang makanan kaki lima dan warung makan yang diduga memiliki kandungan akrilamida yang tinggi. Salah satu cirinya adalah warnanya yang berubah dari kuning bening menjadi coklat tua sampai hitam.

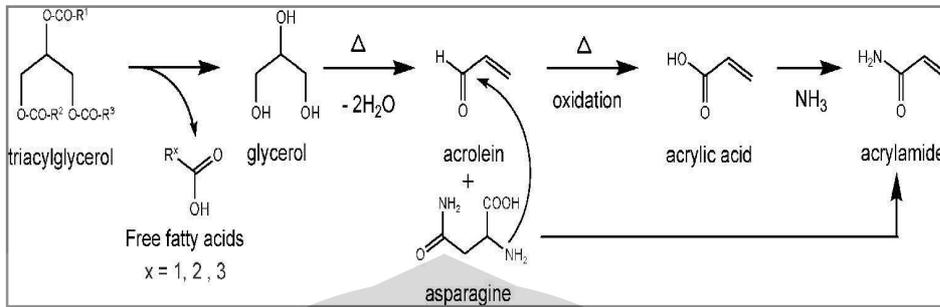
Pedagang jajanan gorengan pinggir jalan, misalnya, disinyalir banyak yang menggunakan minyak goreng bekas pakai. Pada umumnya mereka beralasan demi penghematan, bahkan ada yang berpendapat bahwa dengan menggunakan minyak jelantah maka gorengan yang dihasilkan lebih gurih dan renyah. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk menjadikannya sebagai salah satu sampel.

Kadar akrilamida berdasarkan persamaan kurva kalibrasi dalam Sampel I adalah $2,64 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$ dan dalam Sampel II adalah $19,32 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$. Nilai koefisien variasi yang besar pada pengukuran sampel dapat dimengerti karena akrilamida yang dianalisis merupakan cemaran dan termasuk analit dalam kategori 2, dan uji keterulangan tidak diperhatikan pada kategori tersebut (16).

Terbentuknya akrilamida dalam minyak jelantah dapat dihubungkan dengan terjadinya perubahan warna minyak goreng menjadi kecoklatan, yaitu

akibat bereaksinya asam amino dalam makanan dengan senyawa karbonil hasil oksidasi minyak goreng yang terbentuk selama penggorengan berlangsung (8). Oleh karena itu, pemakaian minyak jelantah yang berulang-ulang disyalir akan meningkatkan akrilamida yang terbentuk.

Variasi kadar akrilamida yang didapat selain disebabkan oleh pemakaian minyak yang berulang-ulang, kandungan dari bahan makanan yang digoreng juga menjadi faktor dalam pembentukan akrilamida dalam minyak jelantah. Kadar akrilamida dalam Sampel I lebih kecil bila dibandingkan dengan kadar akrilamida dalam Sampel II. Salah satu penyebabnya kemungkinan karena adanya kandungan lipid yang cukup tinggi sehingga mempengaruhi terbentuknya prekursor bagi pembentukan akrilamida pada Sampel II. Walaupun telah dibuktikan bahwa asam lemak yang terkandung di dalam minyak jelantah tidak berpengaruh secara signifikan terhadap akrilamida yang terbentuk, adanya mekanisme tambahan, diawali dari lipid, dapat ikut berpengaruh. Proses terbentuknya akrilamida tersebut diawali ketika triasilgliserol mengalami hidrolisis parsial selama menggoreng, dilanjutkan dengan terdehidrasinya gliserol sehingga terbentuk akrolein. Akrolein mengalami oksidasi dan dihasilkan asam akrilat, yang pada akhirnya bereaksi dengan amoniak membentuk akrilamida (19).



Gambar 3. Mekanisme pembentukan akrilamida dari triasilgiserol



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, didapatkan hasil bahwa akrilamida terdapat pada kedua sampel minyak jelantah yang dianalisis, yaitu dengan kadar rata-rata $2,64 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$ untuk Sampel I dan $19,32 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$ untuk Sampel II.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai akrilamida dalam minyak jelantah dari sumber lain, antara lain minyak jelantah yang berasal dari rumah makan cepat saji dan rumah tangga.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh beberapa parameter spesifik seperti suhu, frekuensi, dan lama pemanasan terhadap kadar akrilamida dalam minyak jelantah.

DAFTAR ACUAN

1. Anonim. 2002. Food standards agency study of acrylamide in food background information & research findings. 17 Mei: 6 hal. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acrylamideback.pdf>, 2 November 2008, pk. 16.15.
2. Eriksson, S. 2005. Acrylamide in food products: identification, production, and analytical methodology. 91 hal. <http://www.diva-portal.org/su/abstract.xsql?dbid=700>, 2 November 2008, pk. 16.11.
3. Carere, A. 2006. Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann Ist Super Sanita*. **42**(2): 144-155.
4. Anonim. 2007. Minyak jelantah pincu kanker. 21 April: 1 hal. <http://www.indonesia.com/bpost/042007/21/ragam/art-6.htm>, 21 Januari 2009, pk. 14.19.
5. Totani, N., C. Ohno & A. Yamaguchi. 2006. Is the frying oil in deep-fried foods safe?. *Journal of Oleo Science*. **55**(9) 449-456.
6. Choe, E., D.B. Min. 2007. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*. **72**(5) 77-86.
7. Anonim. Minyak jelantah berbahaya?. 1 hal. http://www.geocities.com/anandito2000/special/minyak_jelantah.htm. 20 Januari 2009, pk.16.36.
8. Totani, N., M. Yawata, M. Takada, & M. Moriya. 2007. Acrylamide content of commercial frying oil. *Journal of Oleo Science*. **56**(2): 103-106.
9. Harahap, Y. 2006. Analisis akrilamida dalam sediaan kentang goreng (french fries) dari beberapa rumah makan cepat saji secara

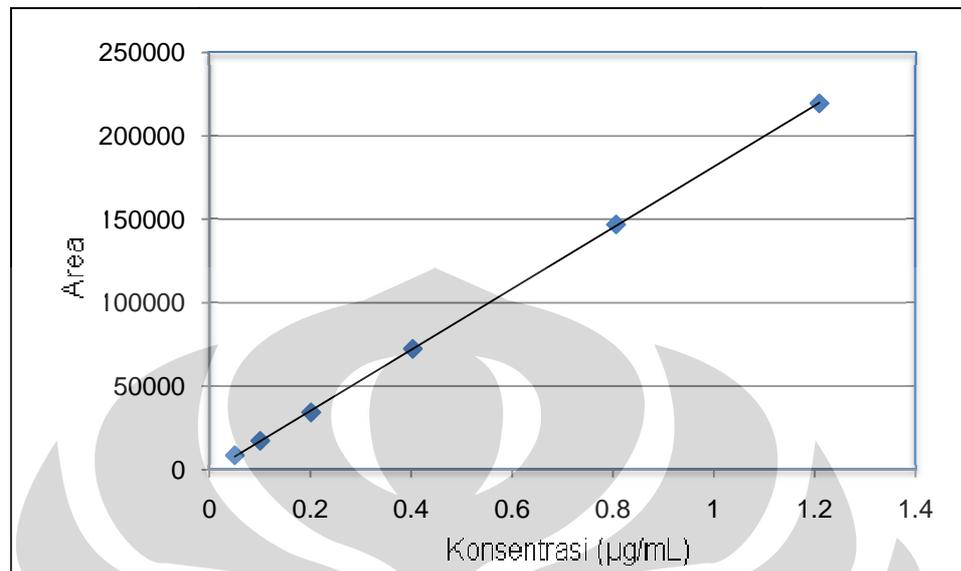
- Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Acta Pharmaceutical*. **31**(1): 40-45.
10. Besaratinia, A., & Pfeifer, G. P. 2007. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*. **28**(3): 519 -528.
 11. Anonim. 2005. Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf, 13 Oktober 2008, pk. 15.14.
 12. Johnson, E.C., & R. Stevenson. 1991. *Dasar kromatografi cair*. Bandung: Penerbit ITB.
 13. Poole, C.F., & S.F., Poole. 1991. *Instrumental aspects of High Pressure Liquid Chromatography, in chromatography today*. Amsterdam: Elsevier B.V.
 14. Lindsay, S. 1992. *High Pressure Liquid Chromatography*. 2nd ed. London: John Willey & Sons Inc.
 15. Harmita. 2006. *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
 16. Harmita. 2006. *Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
 17. Harahap, Y. 2006. Pembentukan akrilamida dalam makanan, efek toksik terhadap manusia dan analisisnya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. **3**(3): 40-45
 18. Maria, R. 2006. *Analisis akrilamida dalam beberapa sediaan sereal yang beredar di pasaran secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Depok: Skripsi Sarjana Farmasi FMIPA- UI.

19. Mestdagh, F., P. Castelein, C.V. Peteghem, & B. De Meulenaer. 2008. Importance of oil degradation in the formation of acrylamide in fried foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**(56): 6141-6144.

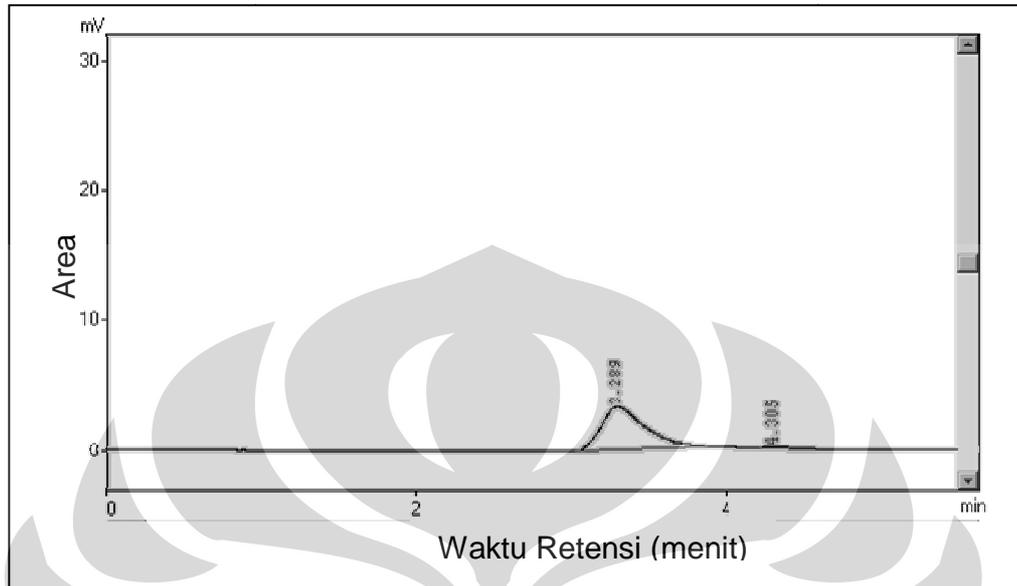


GAMBAR





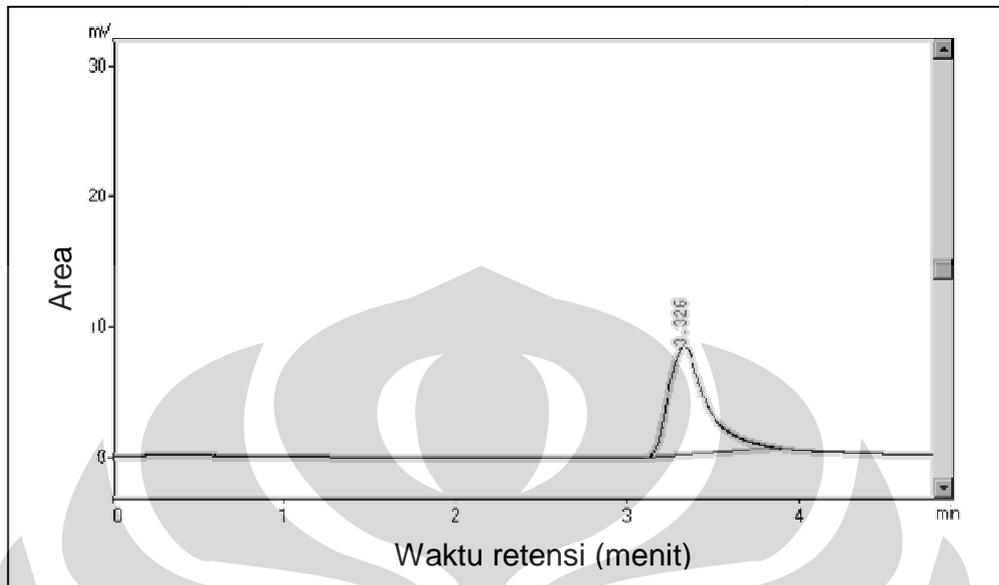
Gambar 7. Kurva kalibrasi larutan baku akrilamida



Gambar 8. Kromatogram akrilamida dalam Sampel I

Kondisi analisis: kolom Kromasil-100 5C18 RP 5 μm , 250 x 4,6 mm; fase gerak 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetonitril-air (5:95) pH = 2,50; detektor ultraviolet pada panjang gelombang 210 nm; laju alir 0,5 mL/menit; volume injeksi 20 μL

Keterangan: Atenuasi 5



Gambar 9. Kromatogram akrilamida dalam Sampel II

Kondisi analisis: kolom Kromasil-100 5C18 RP 5 μm , 250 x 4,6 mm; fase gerak 3,5 mM asam fosfat 85% dalam asetonitril-air (5:95) pH = 2,50; detektor ultraviolet pada panjang gelombang 210 nm; laju alir 0,5 mL/menit; volume injeksi 20 μL

Keterangan: Atenuasi 5