

**OPTIMASI ANALISIS DERIVATISASI AKRILAMIDA DENGAN ASAM 2-  
MERKAPTOBENZOAT MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI ULTRAVIOLET**

**VINA NUR 'ASHRI RAHAYU**

**0305250662**



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

2008

**OPTIMASI ANALISIS DERIVATISASI AKRILAMIDA DENGAN ASAM 2-  
MERKAPTOBENZOAT MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI ULTRAVIOLET**

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

Oleh:

**VINA NUR 'ASHRI RAHAYU**

**0305250662**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**DEPARTEMEN FARMASI**

**DEPOK**

**2008**

SKRIPSI : OPTIMASI ANALISIS DERIVATISASI AKRILAMIDA  
DENGAN ASAM 2-MERKAPTOBENZOAT  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI-ULTRAVIOLET

NAMA : VINA NUR 'ASHRI RAHAYU

NPM : 0305250662

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, DESEMBER 2008

DR. YAHDIANA HARAHAP, MS  
PEMBIMBING I

DR. HERMAN SURYADI, MS  
PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana : 22 Desember 2008

Penguji I	: Dr. Jhosita,
Penguji II	: Dr. Abdul Mun'im, MS
Penguji III	: Dra. Sabarijah WittoEng, SKM

## KATA PENGANTAR

*Bismillahirrahmanirrahim,*

Seraya puji dan syukur hanya bagi Allah Azza Wa Jalla, yang menggenggam alam semesta, pemilik jagat raya dan penggenggam seluruh ilmu, sholawat dan salam senantiasa tercurah kepada Muhammad SAW, sang Nabi terpilih, pemimpin umat hingga akhir zaman dan pembawa risalah kebenaran.

Semata-mata atas ridha, petunjuk, rahmat, dan kasih sayang-Nya, skripsi dengan judul **“OPTIMASI ANALISIS DERIVATISASI AKRILAMIDA DENGAN ASAM 2-MERKAPTO BENZOAT MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI-ULTRAVIOLET”** ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, sebagai Pembimbing Pertama atas bantuan, bimbingan, dan saran selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.

2. Bapak Dr. Herman Suryadi, MS, sebagai Pembimbing Pertama atas bantuan, bimbingan, dan saran selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Sutriyo, M. Si, selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
4. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS, selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA-UI
5. Dr. Yahdiana Harahap, M. S, selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA-UI)
6. Bapak Drs. Hayun, MSi, selaku Kepala Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA-UI
7. Seluruh staff pengajar Departemen Farmasi FMIPA-UI
8. Bapak Rustam Paun, dan Bapak Ma'ruf yang telah memberikan bantuan dan dukungannya selama penelitian ini berlangsung
9. Kedua orang tua dan seluruh rekan-rekan penulis, yang telah memberikan bantuan dan semangat selama penelitian ini berlangsung.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan. Oleh karena itu penulis menerima saran-saran dan kritikan yang membangun dari pembaca sekalian.

Depok, 2008

Penulis

## ABSTRAK

Akrilamida telah ditemukan cemaran dalam berbagai produk makanan yang disiapkan pada suhu tinggi (diatas 120 °C). Akrilamida tersebut diketahui dapat menyebabkan kanker pada sekitar 2% kasus tiap tahun (di Swedia). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum dari pembentukan senyawa derivat antara akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat. Reaksi pembentukan senyawa derivat akrilamida optimum pada pH 10 dengan penambahan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 125 µL, direaksikan selama 3 jam menggunakan *magnetic stirrer* dan stabilitas senyawa derivat hingga menit ke 90. Senyawa derivat dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom C<sub>18</sub>, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; dideteksi pada panjang gelombang 254 nm dengan detektor ultraviolet. Waktu retensi akrilamida terderivatisasi pada 5,722 menit, pada rentang konsentrasi 0,4 – 1,0 µg/mL dihasilkan kurva kalibrasi dengan koefisien korelasi (r) 0,99504 dengan LOD 0,09094 µg/mL dan LOQ 0,30313 µg/mL.

Kata kunci : KCKT, akrilamida, derivatisasi, asam 2-merkaptobenzoat

Xvi + 75 hlm.,; gmb.,; tab.,; lamp.

Bibliografi : 21 (1976 – 2007)

## ABSTRACT

Acrylamide had been detected in many food products prepared at high temperature (above 120 °C). Acrylamide is believed to cause cancer at about 2% cases per year (in Sweden). The aim of this research is to obtain optimum condition for forming derivative compound acrylamide with 2-mercaptobenzoic acid. The reaction derivative of acrylamide compound that optimum at pH 10 by added 125  $\mu$ L 2-mercaptobenzoic acid, mixed with magnetic stirrer for 3 hour and derivative of compound was analysed by high performance liquid chromatography method using C<sub>18</sub> column, aetonitril-acetic acid 0,1% ((25% : 75%, v/v) is using as a mobile phase; flow rate 0,8 mL/minute; detection at wavelength 254 nm with ultraviolet detector. Retention time of acrylamide derivative was 5,722 minute, a curve calibration at range concentration 0,4 – 1,0  $\mu$ g/mL with correlation coefficient (r) 0,99504 with give LOD 0,09094  $\mu$ g/mL and LOQ 0,30313  $\mu$ g/mL.

Keyword : HPLC, acrylamide, derivatization, 2-mercaptobenzoic acid

Xvi + 75 pages,;fig.;tab.;appendix.

Bibliography : 22 (1976 – 2007)

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	i
<b>ABSTRAK</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>DAFTAR ISI</b> .....	v
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>A. LATAR BELAKANG</b> .....	1
<b>B. TUJUAN</b> .....	3
<b>C. HIPOTESIS</b> .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>A. AKRILAMIDA</b> .....	4
<b>B. ASAM 2-MERKAPTOBENZOAT</b> .....	12
<b>C. DERIVATISASI</b> .....	12
<b>D. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)</b> .....	19
<b>BAB III TEMPAT, ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA</b> .....	27

<b>A. TEMPAT DAN WAKTU.....</b>	<b>26</b>
<b>B. ALAT.....</b>	<b>26</b>
<b>C. BAHAN.....</b>	<b>26</b>
<b>D. CARA KERJA.....</b>	<b>27</b>
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>33</b>
<b>A. HASIL.....</b>	<b>33</b>
<b>B. PEMBAHASAN.....</b>	<b>39</b>
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	
<b>A. KESIMPULAN.....</b>	<b>45</b>
<b>B. SARAN.....</b>	<b>45</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Struktur kimia akrilamida.....	3
Gambar 2	Metabolisme dan perjalanan akrilamida di dalam tubuh pada keadaan akut dan kronik.....	7
Gambar 3	Mekanisme alkilasi protein oleh akrilamida.....	8
Gambar 4	Proses pembentukan akrilamida dalam makanan dengan pemanasan .....	10
Gambar 5	Mekanisme pembentukan akrilamida dalam makanan dengan pemanasan .....	11
Gambar 6	Struktur asam 2-merkaptobenzoat.....	12
Gambar 7	Skema alat KCKT .....	19
Gambar 8	Kromatogram larutan blanko dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L.....	50
Gambar 9	Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL tanpa derivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat Kromatogram larutan blanko .....	50
Gambar 10	Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada pH 8 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% :	

75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	51
Gambar 11. Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada pH 9 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	51
Gambar 12. Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada pH 10 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	52
Gambar 13. Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 50 $\mu$ L dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	52
Gambar 14. Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 75 $\mu$ L dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	53

- Gambar 15. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$  ..... 53
- Gambar 16. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 125  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$  ..... 54
- Gambar 17. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat selama 2 jam dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$  ..... 54
- Gambar 18. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat selama 3 jam dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$  ..... 55
- Gambar 19. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat selama 4 jam dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% :

75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu$ L ..... 55

Gambar 20. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan waktu selesai reaksi (kestabilan senyawa derivat) pada menit ke 30 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu$ L ..... 56

Gambar 21. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan waktu selesai reaksi (kestabilan senyawa derivat) pada menit ke 60 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu$ L ..... 56

Gambar 22. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan waktu selesai reaksi (kestabilan senyawa derivat) pada menit ke 90 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu$ L ..... 57

Gambar 23. Kromatogram larutan akrilamida 1 µg/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (20% : 80%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 µL .....	57
Gambar 24. Kromatogram larutan akrilamida 1 µg/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 µL .....	58
Gambar 25. Kromatogram larutan akrilamida 1 µg/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 µL .....	58
Gambar 26. Kromatogram larutan akrilamida 1 µg/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,5 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 µL .....	59
Gambar 27. Kromatogram larutan akrilamida 1 µg/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v);	

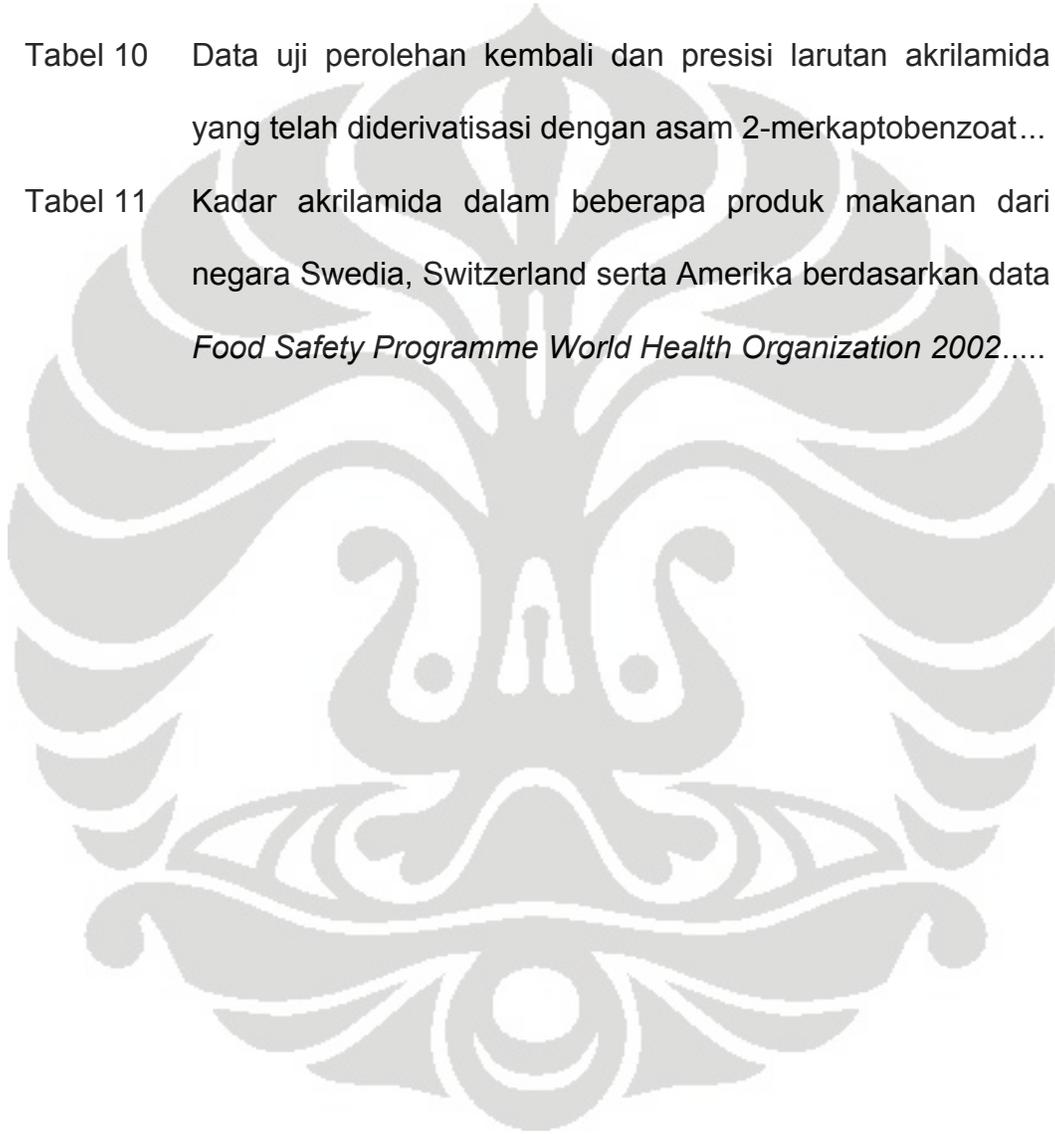
kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	59
Gambar 28. Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 1,0 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	60
Gambar 29. Kromatogram larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 1,2 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20 $\mu$ L .....	60
Gambar 30. Kurva hubungan antara pH derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8 $\mu$ L/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20 $\mu$ L.....	61
Gambar 31. Kurva hubungan antara jumlah penderivat terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1 $\mu$ g/mL diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%);	

kecepatan alir 0,8 $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20 $\mu\text{L}$ .....	61
Gambar 32. Kurva hubungan antara jumlah waktu derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8 $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20 $\mu\text{L}$ .....	62
Gambar 33. Kurva hubungan antara jumlah waktu selesai reaksi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8 $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20 $\mu\text{L}$ .....	62
Gambar 34. Kurva kalibrasi akrilamida yang telah diderivatisasi dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20 $\mu\text{L}$ .....	63

## DAFTAR TABEL

Tabel 1	Data hasil penentuan pengaruh pH derivatisasi terhadap senyawa derivat yang terbentuk .....	65
Tabel 2	Data penentuan jumlah asam 2-merkaptobenzoat terhadap senyawa derivat yang terbentuk .....	65
Tabel 3	Data hasil penentuan pengaruh waktu derivatisasi terhadap hasil derivat yang terbentuk .....	66
Tabel 4	Data hasil penentuan pengaruh kestabilan terhadap senyawa derivat .....	66
Tabel 5	Hubungan waktu retensi, nilai N, HETP dan faktor ikutan terhadap larutan akrilamida konsentrasi 1 µg/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat terhadap perubahan komposisi fase gerak .....	67
Tabel 6	Hubungan waktu retensi, nilai N, HETP dan faktor ikutan terhadap larutan akrilamida konsentrasi 1 µg/mL yang telah diderivatisasi terhadap perubahan kecepatan alir .....	67
Tabel 7	Data uji kesesuaian sistem .....	68

Tabel 8	Data kurva kalibrasi akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat .....	68
Tabel 9	Batas deteksi, batas kuantitasi dan koefisien variasi dari fungsi akrilamida .....	69
Tabel 10	Data uji perolehan kembali dan presisi larutan akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat...	70
Tabel 11	Kadar akrilamida dalam beberapa produk makanan dari negara Swedia, Switzerland serta Amerika berdasarkan data <i>Food Safety Programme World Health Organization 2002</i> .....	71



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Cara Perhitungan Jumlah Asam 2-Merkaptobenzoat .....	71
Lampiran 2 Cara memperoleh persamaan garis linier .....	72
Lampiran 3 Batas deteksi dan batas kuantitasi .....	73
Lampiran 4 Perhitungan uji perolehan kembali dan presisi .....	74
Lampiran 5 Sertifikat analisis akrilamida, <i>reagent grade for synthesis</i> , Merck .....	75

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Produk makanan merupakan kebutuhan primer manusia di dunia. Oleh karenanya banyak sekali ragam makanan olahan yang dapat dikonsumsi, mulai dari makanan tradisional hingga makanan siap saji. Berbagai penelitian telah dilakukan terhadap berbagai jenis makanan baik mengenai senyawa yang berpotensi baik bagi tubuh manusia hingga senyawa yang dapat berpotensi membahayakan bagi tubuh manusia di dalam makanan tersebut. Akrilamida merupakan salah satu contoh senyawa kimia dalam makanan yang berbahaya bagi tubuh manusia (1, 2).

Akrilamida merupakan senyawa organik yang dipercaya dapat menyebabkan penyakit kanker pada sekitar 2% (100-700 dari 45.000) kasus tiap tahun di Swedia, bentuk monomernya bersifat racun terhadap sistem saraf pusat dan paparan akrilamida secara kronik dapat menimbulkan tumor pada hewan coba, sedangkan bentuk polimernya diketahui tidak bersifat toksik (1, 2, 3).

Pada 24 April 2002, peneliti di Badan Pengawas Makanan Nasional Swedia (*Swedish National Food Administration*) dan *Stockholm University* melaporkan penemuan akrilamida dalam berbagai makanan yang

dipanggang dalam tanur atau digoreng. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa pembentukan akrilamida berhubungan dengan proses pemanasan beberapa makanan kaya karbohidrat pada suhu tinggi (  $> 120\text{ }^{\circ}\text{C}$  ) (2, 3, 4).

Akrilamida memiliki sedikit gugus kromofor dan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 197 nm yang berada pada daerah uv jauh. Pada daerah tersebut banyak pelarut dan senyawa organik lain memberikan serapan kuat sehingga panjang gelombang maksimum akrilamida tidak digunakan sebagai panjang gelombang untuk penentuannya. Hal ini berdasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu analisis akrilamida dalam kentang goreng dan kopi (4).

Analisis yang paling sering digunakan adalah dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) karena memiliki tingkat kepekaan yang tinggi, daya pisahnya baik dan waktu analisis yang cepat. Berbagai metode analisis akrilamida yang telah dilakukan dan dipublikasikan antara lain adalah metode KCKT-UV tanpa proses derivatisasi terlebih dahulu. Pada penelitian tersebut terdapat dua puncak berdekatan pada kromatogram akrilamida tersebut, sehingga menyebabkan kurang baiknya sensitifitas dan selektifitas analisis akrilamida. Hal ini disebabkan karena akrilamida dapat bertautomerisasi pada gugus amida dan keto menjadi hidroksil sehingga terdapat dua struktur yang berbeda kepolarnya (4).

Untuk meningkatkan selektifitas dan sensitifitas metode, pada penelitian ini, akan dikembangkan metode analisis dengan menggunakan Asam 2-merkaptobenzoat sebagai penderivat yang kemudian dianalisis secara KCKT-ultraviolet. Derivatisasi ini berdasarkan pada sifat kimia Asam 2-merkaptobenzoat yang dapat bereaksi dengan gugus ikatan rangkap pada akrilamida, menghasilkan senyawa turunan yang cukup stabil dan dapat dideteksi dengan KCKT-ultraviolet (reaksi dapat dilihat pada lampiran 1) (3,5).

## **B. TUJUAN**

1. Memperoleh kondisi reaksi optimum akrilamida dengan Asam 2-merkaptobenzoat
2. Memperoleh kondisi analisis optimum dalam analisis akrilamida dengan cara derivatisasi dengan Asam 2-merkaptobenzoat secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)-ultraviolet.

## **C. HIPOTESIS**

Akrilamida dapat diderivatisasi dengan Asam 2-merkaptobenzoat dan dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran kadar akrilamida.

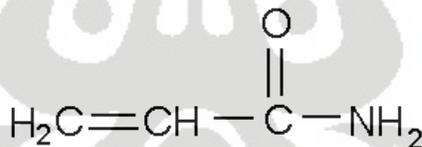
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. AKRILAMIDA

##### 1. Karakteristik Fisik dan Kimia

Akrilamida merupakan senyawa kimia berwarna putih, berbentuk kristal padat, sangat mudah larut dalam air, tidak berbau dan mudah bereaksi melalui gugus amida dan gugus reaktif elektrofilik ikatan rangkapnya. Akrilamida tidak bercampur dengan asam, basa, oksidator, besi dan garam besi. Adanya dekomposisi oleh suhu menghasilkan karbon monoksida, karbon dioksida dan nitrogen (1).



Gambar 1. Struktur kimia akrilamida

Sinonim dari akrilamida adalah 2-propenamida, etilen karboksi amida, akrilik amida, asam propeonik, vinil amida.

Rumus molekul :  $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$

Bobot molekul : 71,08 g/mol

Kelarutan dalam g/100 mL pelarut pada suhu 30 °C: air 215,5; aseton 63,1; benzena 0,346; etanol 86,2; etilasetat 12,6; kloroform 2,66; metanol 15,5; dan n-heptana 0,0068 (6).

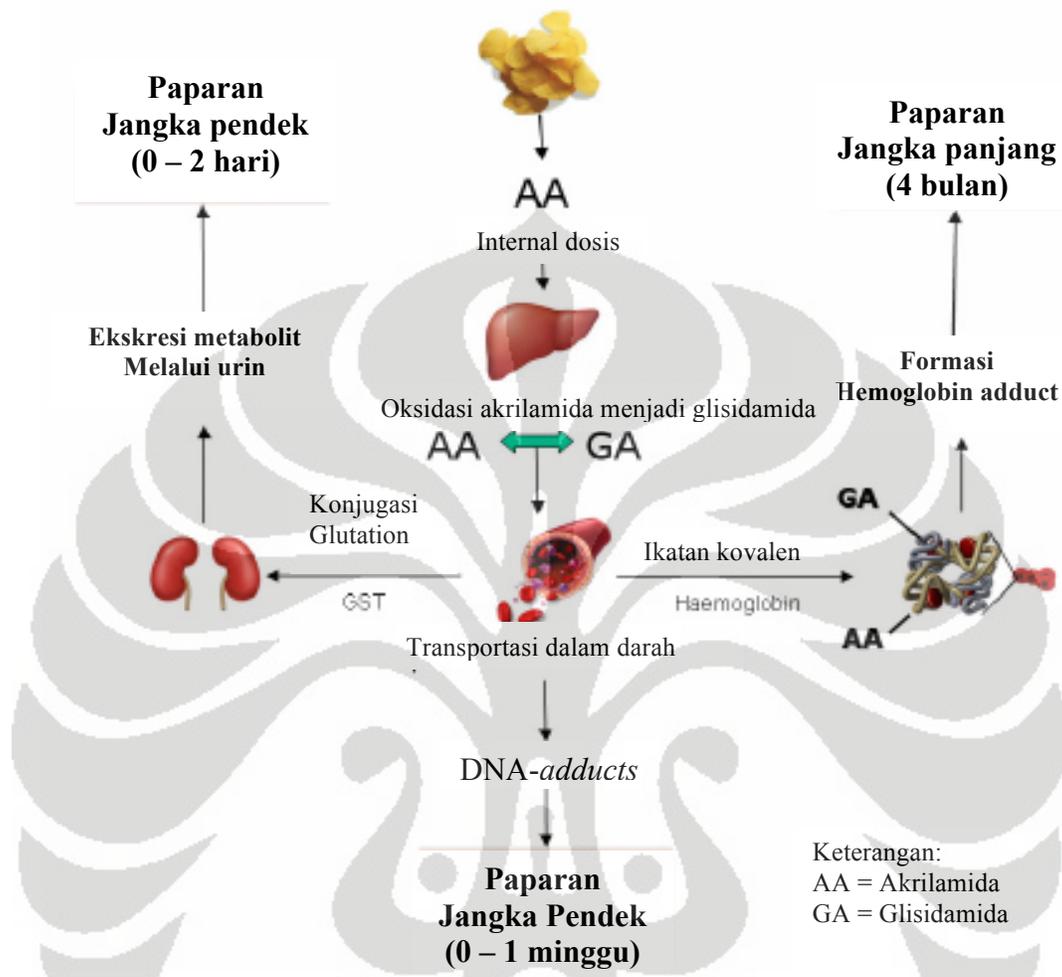
## 2. Sumber, Distribusi dan Kegunaan Akrilamida (1, 7)

Akrilamida telah diproduksi sejak tahun 1950 dengan cara hidrasi akrilonitril dan terdapat dalam bentuk monomer sedangkan poliakrilamida berada dalam bentuk polimer. Sumber akrilamida yang terdapat di alam secara umum adalah buatan manusia, berasal dari residu monomer yang dilepaskan dari poliakrilamida untuk perawatan air minum karena tidak seluruh akrilamida terkoagulasi dan tetap berada di air sebagai pencemar.

Kegunaan utama dari akrilamida adalah untuk memproduksi bentuk polimernya, yaitu poliakrilamida yang digunakan sebagai flokulan dalam pemurnian air minum serta pengolahan limbah industri. Pada umumnya beberapa negara membatasi residu akrilamida yang terdapat dalam air minum hingga 0,25 µg/L dengan menjaga konsentrasi monomer akrilamida. *Food and Drug Administration* (FDA) telah membatasi jumlah monomer dalam poliakrilamida yang digunakan pada kertas atau karbon bersentuhan langsung dengan makanan hingga 0,2% (2g/kg).

### 3. Farmakokinetik Akrilamida

Poliakrilamid merupakan senyawa yang tidak toksik, tetapi monomernya yaitu akrilamida merupakan neurotoksik terhadap manusia dan hewan coba. Akrilamida diabsorpsi melalui saluran cerna, pernafasan dan kulit, pendistribusian dari akrilamida terdapat dalam kompartemen cairan tubuh dan dapat menembus selaput plasenta. Biotransformasi akrilamida pada tikus terjadi dengan cara dekarboksilasi dan berkonjugasi dengan glutation, mekanismenya dapat dilihat pada Gambar 2. Akrilamida mempunyai metabolit utama yaitu glisidamida yang merupakan suatu epoksida yang lebih dicurigai bersifat genotoksik dan penyebab terjadinya kanker pada hewan coba daripada akrilamidanya sendiri, sedangkan akrilamida dicurigai lebih bersifat neurotoksik daripada glisidamida. Akrilamida dan metabolitnya akan terakumulasi dalam sistem saraf dan darah, serta dapat juga terakumulasi pada ginjal dan hati serta sistem reproduksi pria (1, 3, 8).



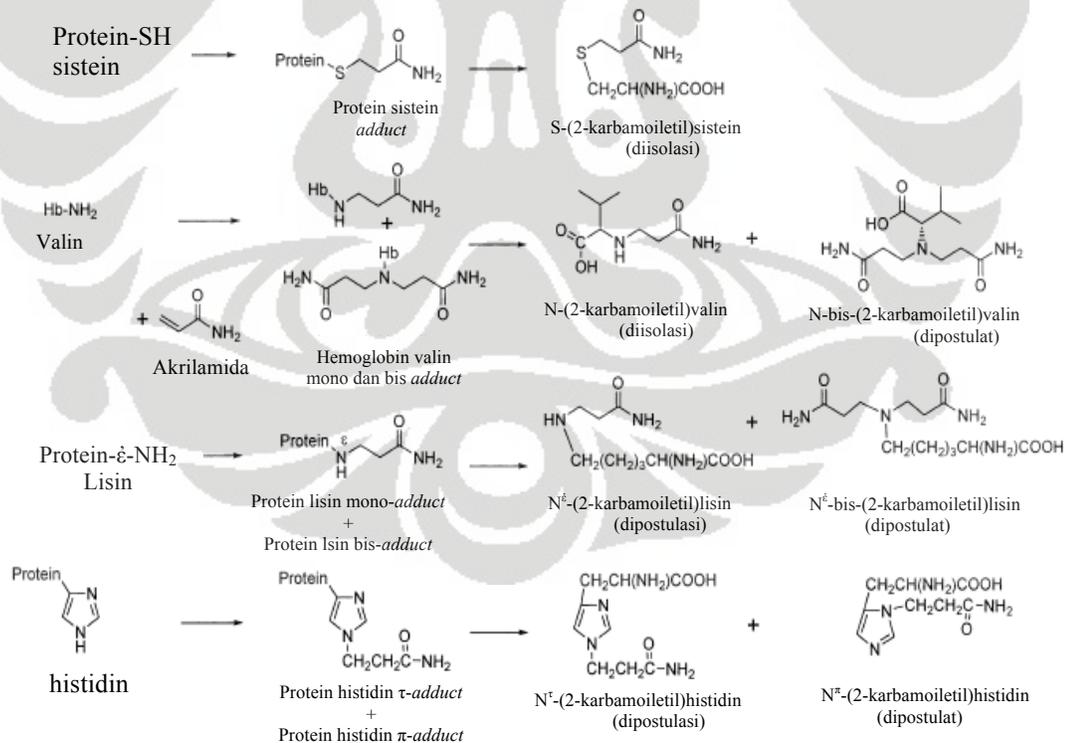
Gambar 2. Metabolisme dan perjalanan akrilamida di dalam tubuh pada keadaan akut dan kronik (8).

#### 4. Efek pada Manusia dan Hewan

Akrilamida mempunyai sifat toksik dan iritan. Akrilamida dimasukkan kedalam kategori grup 2A yaitu senyawa yang hampir dipastikan menyebabkan kanker pada manusia (karsinogenik), namun sampai saat ini belum ada data yang menunjukkan bahwa paparan

akrilamida dapat menyebabkan kanker. Akan tetapi dari hasil percobaan pada tikus betina diketahui akrilamida dapat meningkatkan timbulnya tumor kelenjar payudara, sedangkan pada tikus jantan akrilamida dapat memicu degenerasi tubulus seminiferus serta menurunkan kadar testosteron dan prolaktin (3, 9).

Akrilamida memiliki suatu sistem jenuh elektrofil yang dapat bereaksi dengan pusat nukleofil. Gugus protein dan asam amino menjadi target utama karena mempunyai pusat nukleofil. Pengikatan akrilamida dengan protein pada hemoglobin (pada Gambar 3) menjadi penyebab aksi toksisitas pada jaringan tersebut (3).



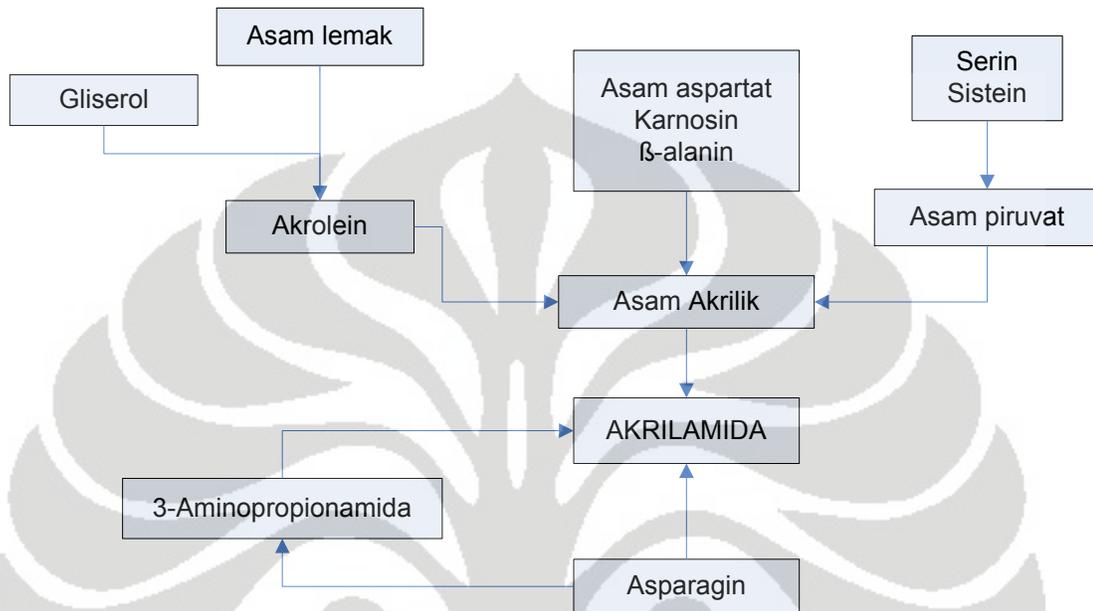
Gambar 3. Mekanisme alkilasi protein oleh akrilamida (9).

Akrilamida dapat menimbulkan efek lokal berupa iritasi pada kulit dan membran mukosa. Iritasi lokal pada kulit ditandai dengan melepuhnya kulit disertai warna kebiruan pada tangan dan kaki, sedangkan efek sistemik berhubungan dengan paralisis susunan saraf pusat, tepi dan otonom sehingga dapat terjadi pusing, kelelahan, mengantuk dan kesulitan mengingat. Paparan akut akrilamida dosis tinggi memicu tanda-tanda dan gejala gangguan sistem saraf pusat, sedangkan paparan akrilamida dengan dosis yang lebih kecil dalam jangka waktu lama dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi pada sistem saraf tepi. Setelah paparan terhadap akrilamida dihentikan, gangguan-gangguan tersebut dapat berkurang, tetapi dapat bertahan hingga berbulan-bulan bahkan bertahun-tahun (2).

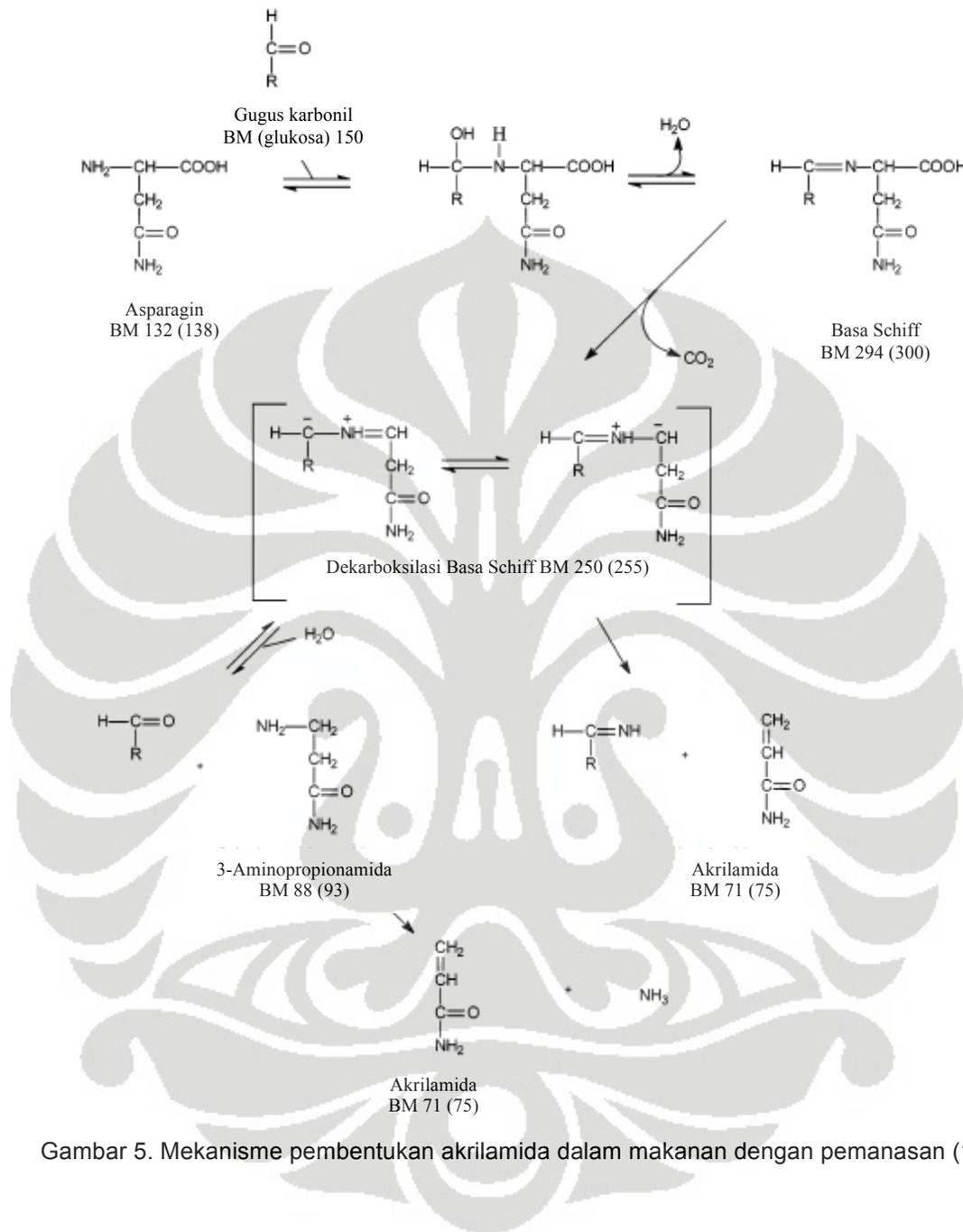
#### 5. Pembentukan Akrilamida dalam Makanan

Peneliti Swedia mendapatkan bahwa konsentrasi akrilamida yang sangat besar pada makanan yang digoreng (keripik kentang, median 1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; kentang goreng, 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), makanan yang dipanggang (sereal dan roti, 100-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Proses pembentukan akrilamida dapat dilihat melalui reaksi Maillard, dimana senyawa gula bereaksi dengan asam amino menghasilkan akrilamida. Ada beberapa prekursor terbentuknya akrilamida dalam makanan, diantaranya yaitu asparagin, 3-aminopropionamida, maleimida, dan akrolein (yang

merupakan hasil degradasi daripada lipid). Proses pembentukan akrilamida dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.



Gambar 4. Proses pembentukan akrilamida dalam makanan dengan pemanasan



Gambar 5. Mekanisme pembentukan akrilamida dalam makanan dengan pemanasan (10).

## B. ASAM 2-MERKAPTOBENZOAT

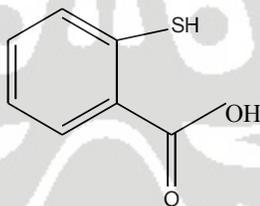
Nama kimia : Asam 2-merkaptobenzoat; asam 2-tiosalisilat; 2-karboksifenol; asam 2-sulfanilbenzoat; o-asam benzoat tiol; o-karboksifenol; asam o-merkaptobenzoat; asam o-sulfhidrilbenzoat; asam o-tiosalisilat..

Berat molekul : 154,18 g/mol

Rumus molekul :  $\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{SH}$

Pemerian : Padatan berwarna kuning, dengan titik leleh 164 - 168°C dan stabil disimpan dalam kondisi normal, cahaya dan sensitif terhadap udara.

Kelarutan : larut dalam alkohol, asam asetat dan eter.



Gambar 6. Struktur Asam 2-Merkaptobenzoat

### c. Derivatisasi

Dalam melakukan analisis obat, detektor yang paling banyak digunakan adalah detektor ultraviolet dan fluoresensi, sehingga banyak metode yang dikembangkan untuk menambah gugus kromofor yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang analisis (11).

Alasan terbanyak dilakukannya derivatisasi adalah untuk meningkatkan respon detektor terhadap sampel dan untuk mengubah respon relatif detektor yang berbeda pada sampel.

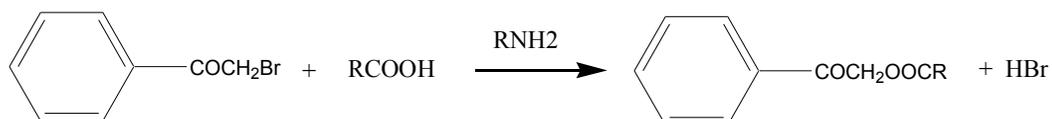
Selain itu, beberapa alasan perlu dilakukannya derivatisasi adalah (12):

1. Memperbaiki kemampuan detektor dalam mendeteksi senyawa yang akan dianalisis.
2. Mengubah struktur molekul atau polaritas dari senyawa yang akan dianalisis.
3. Mengubah matriks untuk pemisahan yang lebih baik.
4. Untuk kestabilan dan kepekaan zat yang akan dianalisis.

Meskipun derivatisasi umumnya untuk meningkatkan sifat kromatografi, tetapi disini ditekankan untuk tujuan kemampuan penyidikan. Uraian akan dikelompokkan menurut gugus fungsi, karena reaksi derivatisasi berciri pada gugus ini.

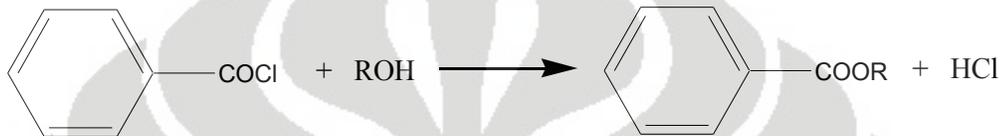
Tetapi hanya terbatas pada gugus fungsi yang berkait dengan bahan farmasi, antara lain (5, 11):

- a. Asam karboksilat suatu reaksi derivatisasi yang umum bagi asam ini adalah pembentukan ester dari reaksinya dengan pereaksi fenil bromida, reaksinya sebagai berikut:



## b. Alkohol

Pembentukan ester juga banyak diterapkan pada derivatisasi alkohol. Derivat asam karboksilat aktif seperti asil klorida merupakan pereaksi yang banyak digunakan. Benzil klorida bereaksi dengan alkohol membentuk ester benzoat, reaksinya sebagai berikut:

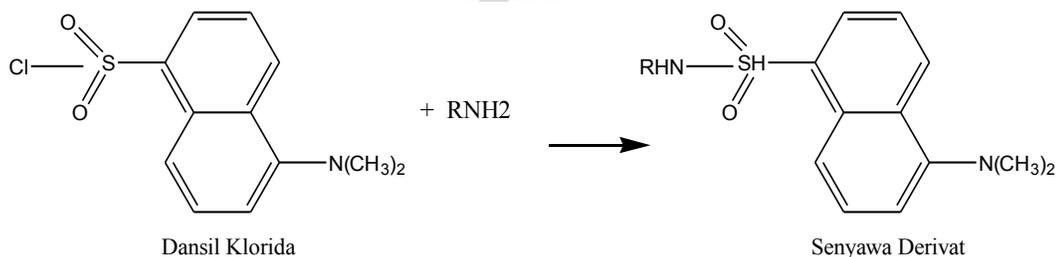


## c. Amina

Pembentukan amida sama dengan pembentukan ester bagi alkohol, merupakan reaksi umum bagi amina, reaksi sebagai berikut:



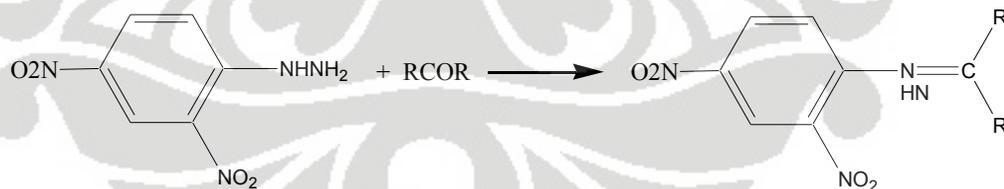
Dansil klorida (5-N,N-dimetilamin naftalen-2-sulfonil klorida) bereaksi dengan amina primer dan sekunder membentuk turunan sulfonamid yang mampu berfluoresensi sehingga bisa dideteksi dengan spektrofotometri. Fenol juga memberi reaksi yang serupa dengan dansil klorida. Reaksi derivatisasi gugus amina oleh dansil klorida adalah sebagai berikut:



Amina tertier dari inti imidazol dari pilokarpin direaksikan dengan p-nitrobenzil-bromida membentuk suatu derivat kuartener yang dapat ditetapkan pada 254 nm. Amfetamina, metamfetamina dan l-efedrina direaksikan dengan  $\beta$ -naftokuinon-4-sulfonat memberikan hasil yang menyerap cahaya pada 451 nm.

d. Aldehida dan keton

Reaksi yang dikenal dengan penambahan nukleofil pada suatu ikatan rangkap karboheteroatom paling banyak digunakan untuk derivatisasi senyawa karbonil. Contoh asli reaksi ini adalah kondensasi suatu keton dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) membentuk hidrazon yang mempunyai serapan molar lebih besar dari  $10^4$  pada 254 nm. Androsteron dan dehidroepiandrosteron telah dianalisis dengan HPLC setelah diderivatisasi dengan 2,4-DNPH ini, reaksi sebagai berikut:



e. Pemisahan isomer optis

Derivatisasi untuk membentuk derivat diastereomeris dari dua senyawa enantiomer telah digunakan untuk memisahkan isomer optis. Pemisahan kedua isomer ini menjadi menonjol bila masing-masing

memang menjadi sasaran. Hal ini lebih lazim bila aktivitas hayati masing-masing isomer berbeda dengan suatu faktor 100. Karprofen rasemis, suatu asam karboksilat, direaksikan dengan (S)-(-)- $\alpha$ -metilbenzilamina membentuk derivat diastereomer amida R,S dan S,S (11).

Derivatisasi melibatkan reaksi kimia antara senyawa yang akan dianalisis dengan senyawa penderivatisasi untuk mengubah sifat fisika dan kimia dari senyawa yang akan dianalisis. Reaksi derivatisasi yang ideal yaitu cepat, tuntas dan memberikan hasil yang sensitif. Selain itu, harus mempunyai sifat spektrum dan kromatografi yang cocok serta sisa pereaksi tidak mengganggu pemisahan kromatografi.

Pereaksi yang digunakan untuk penderivatisasi dibagi menjadi empat kelompok, yaitu (13):

- Pereaksi non-fluoresensi, biasanya digunakan dalam uv-vis.
- Pereaksi fluorogenik, umumnya tidak berfluoresensi tetapi bereaksi dengan campuran yang akan diderivatisasi menjadi bentuk konjugasi molekul siklik yang berfluoresensi.
- Pereaksi fluoresensi, mempunyai cincin aromatis yang dapat berfluoresensi .
- Pereaksi yang termasuk kedalam kelompok yang dapat mengalami reaksi redoks yang biasa digunakan pada elektrokimia.

Suatu reaksi derivatisasi harus mempunyai syarat-syarat sebagai berikut, yakni: produk yang dihasilkan harus mampu menyerap baik sinar ultraviolet atau sinar tampak atau dapat membentuk senyawa berfluoresensi sehingga dapat dideteksi dengan spektrofotometri; proses derivatisasi harus cepat dan menghasilkan produk yang sebesar mungkin (100 %); produk hasil derivatisasi harus stabil selama proses derivatisasi dan deteksi; serta sisa pereaksi untuk derivatisasi harus tidak mengganggu pemisahan kromatografi (5).

Derivatisasi dapat dilakukan prakolom maupun paska-kolom. Pada derivatisasi prakolom, senyawa yang akan dianalisis diderivatisasi terlebih dahulu setelah itu dianalisis secara kromatografi, sedangkan pada derivatisasi paska kolom senyawa dikromatografi terlebih dahulu kemudian diderivatisasi setelah keluar dari kolom, tetapi sebelum mencapai detektor.

#### 1. Derivatisasi prakolom

Derivatisasi prakolom dapat digunakan untuk:

- a. Mengubah respon yang berbeda pada sampel sehingga senyawa dapat dideteksi dan dikuantisasi tanpa ada puncak yang tumpang tindih.
- b. Meningkatkan respon detektor untuk senyawa tertentu dalam sampel.
- c. Meningkatkan prapreparasi dari senyawa matriks sampel.

- d. Meningkatkan pemisahan pada KCKT yaitu dengan mengurangi kepolaran sampel.

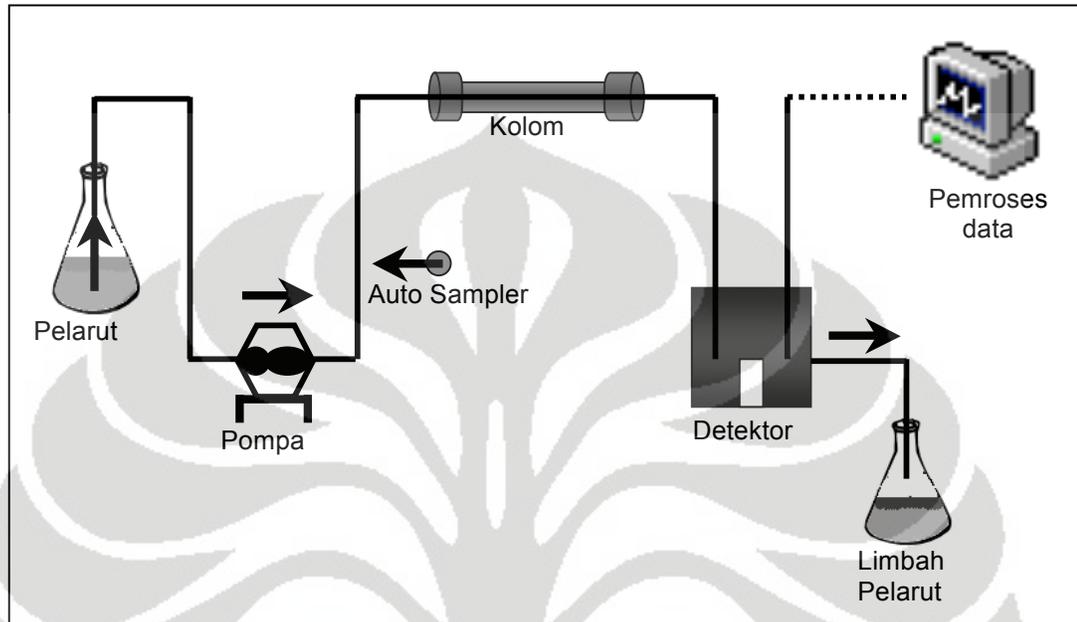
Keuntungan derivatisasi prakolom yaitu derivatisasi mudah dilaksanakan karena penyiapan sampel dan reaksi dapat dilakukan secara manual. Tetapi, derivatisasi memerlukan waktu yang cukup lama, reaksi harus benar-benar sempurna sehingga diperlukan waktu reaksi yang cukup lama serta jika hasil reaksi derivatisasi menghasilkan senyawa lain dapat mengganggu sistem dalam kolom (12).

## 2 Derivatisasi paska kolom

Pada cara ini analit dikromatografikan sebagai bentuk belum direaksikan kemudian diderivatisasi sebelum mencapai detektor. Keuntungan menggunakan cara ini adalah sifat kromatografi bahan dapat digunakan untuk pemisahan, gangguan dari matriks dapat dihindari dan reaksi derivatisasi berlangsung cepat. Kerugian utamanya adalah terjadinya sejumlah pelebaran pita dalam kumparan reaksi. Pada derivatisasi paska kolom senyawa mungkin dirusak dengan oksidasi dan reduksi (11).

## C. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

### 1. Skema alat KCKT



Gambar 7. Skema alat KCKT (14)

### 2. Analisis dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (14)

#### a. Analisis Kualitatif

Cara yang terbaik adalah dengan menggunakan waktu relatif :

$$R_{i\text{st}} = \frac{t_{Ri}}{t_{R\text{st}}}$$

Keterangan :

$t_{Rt}$  = waktu retensi komponen zat

$t_{R\text{st}}$  = 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

Tahapan analisis kuantitatif adalah sebagai berikut :

- 1) Membuat spektrum serapan komponen-komponen yang ada dalam sampel
- 2) Mencari panjang gelombang optimum untuk campuran komponen zat dalam sampel
- 3) Mencari fase gerak yang sesuai agar komponen-komponen tersebut memisah ( $R \geq 1,5$ )

Parameter analisis ini adalah tinggi puncak atau luas puncak pada kondisi kromatografi yang sama. Konsentrasi komponen dapat diperoleh dengan membandingkan tinggi puncak atau luas puncak komponen yang dipisahkan dengan tinggi puncak atau luas puncak senyawa baku. Selain itu, analisis kuantitatif dapat pula dengan menggunakan metode baku eksternal dan metode baku internal (5).

3. Metode Analisis Akrilamida

- a. Metode analisis akrilamida dengan derivatisasi oleh Asam 2-merkaptobenzoat menggunakan LC-MS dengan *stable isotope dilution assay*, dengan kolom Luna Phenyl-Hexyl HPLC (250 x 4,6

mm i.d 5  $\mu$ m, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany), [ $^{13}\text{C}_3$ ]-akrilamida sebagai standar dalam, yang dibandingkan dengan metode GC-MS (15).

- b. Analisis akrilamida dalam produk kakao, kopi dan sereal dengan derivatisasi menggunakan asam 2-merkaptobenzoat, diukur menggunakan metode LC-MS-MS dengan [ $^{13}\text{C}_3$ ]-akrilamida sebagai standar dalam (16).
- c. Analisis menggunakan KCKT model HP1100, detektor yang digunakan adalah VW detektor HP1050, dan kolom yang digunakan adalah kolom eksklusi ion jenis Ion Pac ICE-ASI (250 x 9 mm) (1).
- d. Metode analisis akrilamida menggunakan KCKT HP 1100 liquid chromatography (Hewlett Packard, Waldbron, Germany), detektor yang digunakan adalah fluoresensi, kolom yang digunakan adalah MERCK Lichrosphere 60 Select B 125 x 4 mm i.d., ukuran partikel 5  $\mu$ m (MERCK, Darmstadt, Germany) (1).
- e. KCKT-UV Agilent HP 1100-MS, detektor yang digunakan Diode Array, kolom yang digunakan Synergi 4  $\mu$  Polar-RP 80A, 150 x 4,6 mm i.d. (Phenomenex) dengan prekolom 1 x 4,6 mm (Phenomenex) (1).
- f. Analisis akrilamida dalam air minum, kopi dan *snuff* yang diderivatisasi dengan pentafluorofenil isotiosianat menggunakan metode GC-MS-MS Finnigan TSQ-700 dengan *negative ion*

*chemical ionization mode* (NCI), kolom yang digunakan silika capillary (J & W Scientific, Folsom, CA, USA), helium sebagai gas pembawa, dan ( $^2\text{H}_3$ )-akrilamida sebagai standar dalam (17).

g. Analisis akrilamida dalam air dengan menggunakan metode *isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry* dengan *atmospheric chemical ionization* (LC-APCI-MS/MS) Agilent Series 1100 HPLC (Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, Canada), kolom yang digunakan Genesis C18 (150 x 2,1 mm i.d., ukuran partikel 4- $\mu\text{m}$ , Chromatographic Specialties Inc., Brockville, Canada) dengan prekolom 4 x 2 mm (Phenomenex) (18).

h. Kecepatan dan sensitivitas analisis akrilamida dalam air minum dengan *planar chromatography* dan deteksi fluoresensi setelah diderivatisasi dengan *dansulfinic acid*, menggunakan HPTLC *glass plates silica gel 60* (Merck) 20 x 10 cm, HPLC 1100 *Agilent Technologies* (Palo Alto, USA), MS VG Platform II (MA,USA) (19).

#### 4. Validasi Metode (5, 20, 21)

Validasi metode analisis adalah proses dimana suatu metode ditetapkan melalui serangkaian uji laboratorium bahwa karakter penampilan metode tersebut memenuhi persyaratan untuk penerapan metode yang dimaksudkan. Tujuan utama validasi adalah untuk

menjaminan metode analitik yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal sehingga dapat dipercaya.

Karakter penampilan metode dinyatakan dalam istilah parameter penampilan analisis. Beberapa parameter penampilan analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan di bawah ini.

a. 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 dan metode penambahan bahan baku. Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai ratio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan ratio antara 80-120%. Pada percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan plasebo yang harus disiapkan dengan kadar antara 50-150% dari kandungan yang diharapkan.

b. 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). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

c. Selektifitas (*specificitas*)

Selektifitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur analit tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel.

#### d. Linieritas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. 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 instrument yang digunakan.

Rentang metode adalah pernyataan ras terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linieritas yang dapat diterima.

#### e. 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.

## BAB III

### TEMPAT, ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA

#### A. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA-UI, dalam kurun waktu Januari hingga Desember 2008.

#### B. ALAT

1. KCKT Shimadzu model LC-6A yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis SPD-6AV, dan pemroses data Class-GC10
2. Kolom C18 Kromasil (Akzonobel, TM 5  $\mu$ m) 250 x 4,6 mm
3. Spektrofotometer
4. *Magnetic stirrer*
5. *Syringe* (Hamilton, Co Nevada)
6. pH meter
7. Ultrasonik bronson
8. Botol coklat
9. Alat-alat gelas
10. Transfer pet (*Effendorf*)

#### C. BAHAN

1. Akrilamida, *reagent grade for synthesis*, Merck
2. Aquabidestilata, Otsuka

3. Asam asetat 0,1 % *GR for analysis*, Merck
4. Asetonitril, *gradient grade for liquid chromatography*, Merck
5. Asam 2-merkpto benzoat, Sigma-Aldrich
6. Metanol pro HPLC, Merck
7. Natrium Hidroksida

#### **D. CARA KERJA**

1. Penyiapan Bahan Percobaan
  - a. Penyiapan larutan induk standar akrilamida

Akrilamid ditimbang sebanyak  $\pm 10$  mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dilarutkan dengan pelarut air hingga tanda batas. Didapatkan konsentrasi larutan akrilamida  $100 \mu\text{g/mL}$  = 100 ppm.

- b. Pembuatan larutan asam 2-merkpto benzoat

Asam 2-merkpto benzoat ditimbang sebanyak 154 mg, dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan natrium hidroksida 1 M sehingga konsentrasi larutan  $15,4 \text{ mg/mL}$  ( $15.400 \mu\text{g/mL}$  = 15.400 ppm).

## 2. Pencarian Kondisi untuk Analisis Akrilamida yang Diderivatisasi dengan Asam 2-merkpto benzoat

### a. Pembentukan senyawa derivatisasi

#### 1) Penentuan pH terhadap pembentukan senyawa derivat.

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL, *adjust* hingga pH  $\pm$  8 kemudian ditambah 100  $\mu\text{L}$  asam 2-merkpto benzoat dan asam asetat 0,1% hingga pH tertentu (pH = 8, 9 dan 10). Botol vial 10 mL ditutup rapat dengan aluminium foil (reaksi dilakukan dalam gelap), campur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 3 jam. Larutan hasil derivatisasi diencerkan dengan akuabides (1 : 3), kemudian suntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  pada kolom C18 dengan fase gerak 30% asetonitril dan 70% asam asetat (0,1%) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Intensitas derivat diukur pada panjang gelombang yang telah ditetapkan.

#### 2) Penentuan jumlah asam 2-merkpto benzoat terhadap pembentukan senyawa derivat

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL, *adjust* hingga pH  $\pm$  8 kemudian ditambah asam 2-merkpto

benzoat dengan variasi volume 50, 75, 100 dan 125  $\mu\text{L}$  kemudian *adjust* hingga pH terpilih pada percobaan 1. Botol vial 10 mL ditutup rapat dengan aluminium foil (reaksi dilakukan dalam gelap), campur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 3 jam. Larutan hasil derivatisasi diencerkan dengan akuabides (1 : 3), kemudian disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  pada kolom C18 dengan fase gerak 30% asetonitril dan 70% asam asetat (0,1%) dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Intensitas derivat diukur pada panjang gelombang terpilih.

### 3) Penentuan waktu terhadap pembentukan senyawa derivat

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL, *adjust* hingga pH  $\pm$  8 kemudian ditambah asam 2-merkpto benzoat sebanyak volume terpilih pada percobaan 2 dan *adjust* pH hingga pH terpilih pada percobaan 1. Botol vial 10 mL ditutup rapat dengan aluminium foil (reaksi dilakukan dalam gelap), campur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 2, 3 dan 4 jam. Larutan hasil derivatisasi diencerkan dengan akuabides (1 : 3), kemudian suntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  pada kolom C18 dengan fase gerak 30% asetonitril dan 70% asam asetat (0,1%) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Intensitas derivat diukur pada panjang gelombang terpilih.

#### 4) Penentuan kestabilan senyawa derivatisasi yang terbentuk

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1 µg/mL dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL, *adjust* hingga pH ± 8 kemudian ditambah asam 2-merkpto benzoat sebanyak volume terpilih pada percobaan 2 dan *adjust* pH hingga pH terpilih pada percobaan 1. Botol vial 10 mL ditutup rapat dengan aluminium foil (reaksi dilakukan dalam gelap), campur dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama waktu terpilih pada percobaan 3. Larutan hasil derivatisasi diencerkan dengan akuabides (1 : 3), kemudian suntikkan sebanyak 20 µL pada kolom C18 dengan fase gerak 30% asetonitril dan 70% asam asetat (0,1%) *aqueous solution* dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Intensitas derivat diukur pada panjang gelombang terpilih pada interval waktu 30, 60 dan 90 menit.

#### b. Penentuan komposisi fase gerak

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1 µg/mL dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL, *adjust* hingga pH ± 8. Derivatisasi dengan asam 2-merkpto benzoat sesuai dengan kondisi optimum, kemudian disuntikkan sebanyak

20  $\mu$ L pada kolom C18 dengan komposisi fase gerak sebagai berikut:

- 1) Asetonitril dan asam asetat 0,1% (20%:80%,v/v)
- 2) Asetonitril dan asam asetat 0,1% (25%:75%,v/v)
- 3) Asetonitril dan asam asetat 0,1% (30%:70%,v/v)

Kecepatan alir yang digunakan yaitu 0,8 mL/menit. Kemudian catat waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, HETP dan faktor ikutan.

c. Penentuan kecepatan aliran fase gerak terhadap waktu retensi senyawa derivatisasi

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/mL dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL, *adjust* hingga pH  $\pm$  8. Derivatisasi dengan asam 2-merkpto benzoat sesuai dengan kondisi optimum, kemudian disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ L pada kolom C18 dan alirkan dengan fase gerak terpilih dengan variasi kecepatan (0,5; 0,8; 1 dan 1,2 mL/menit) kemudian catat waktu retensi, jumlah plat teoritis, HETP dan faktor ikutan.

d. Kesesuaian sistem

Larutan standar akrilamida sebanyak 3 mL dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/mL dimasukkan ke dalam botol vial 10 mL,

derivatisasi dengan asam 2-merkapto benzoat sesuai dengan kondisi optimum, kemudian disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  pada kolom C18 dan alirkan dengan fase gerak dan kecepatan terpilih. Diulangi sebanyak 5 kali, catat waktu retensi, jumlah plat teoritis, HETP dan faktor ikutan.

e. Pengujian linearitas

Larutan standar akrilamida diencerkan dengan fase gerak terpilih dengan rentang konsentrasi 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 dan 1  $\mu\text{g/mL}$ , *adjust* hingga pH  $\pm$  8. Kemudian diderivatisasi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan terpilih. Buat kurva persamaan regresi linier melalui perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi akrilamida dalam larutan dari masing-masing konsentrasi. Dihitung nilai r (koefisien korelasi) dari zat tersebut.

f. Pengujian limit deteksi dan limit kuantitatif

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

g. Akurasi dan Presisi

Larutan akrilamida dengan konsentrasi 0,4 dan 1,0  $\mu\text{g/mL}$  disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  kedalam kolom C18 dengan kondisi terpilih diulang sebanyak 5 kali kemudian dicatat luas puncak dan dihitung koefisien variasinya.



## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL**

##### **1. Penentuan Panjang Gelombang**

Analisis pada penelitian ini digunakan pada panjang gelombang 254 nm (1, 15).

##### **2. Pembentukan Senyawa Derivatisasi dengan Asam 2-merkaptobenzoat**

a. Penentuan pH derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat terhadap pembentukan senyawa derivat

Pada proses derivatisasi akrilamida konsentrasi 1 µg/mL digunakan asam asetat 0,1% sebagai pelarut, hasil derivat dideteksi pada panjang gelombang 254 nm dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30%:70%, v/v) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit. Pada pH 8 diperoleh waktu retensi 4,775 menit dengan nilai HETP  $10^{-2}$ , faktor ikutan sebesar 1,17 dan area 10.073. Pada pH 9 diperoleh waktu retensi 4,749 menit dengan nilai HETP 0,0293 faktor ikutan 1,50 dan area 12.896 Pada pH 10 diperoleh waktu retensi 4,753 menit dengan nilai HETP 0,0324; faktor ikutan 1,40 dan area 16.517. Dalam hal ini pH 10 ditetapkan sebagai kondisi analisis terpilih. Data waktu retensi, area, HETP dan faktor ikutan akrilamida pada berbagai kondisi pH derivatisasi

dapat dilihat pada Tabel 1. Kromatogram akrilamida pada berbagai perubahan pH derivatisasi dapat dilihat pada Gambar 10,11 dan 12. Kurva Hubungan antara pH derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 30.

b. Penentuan jumlah asam 2-merkaptobenzoat terhadap pembentukan senyawa derivat

Pada penambahan jumlah asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 50  $\mu\text{L}$  diperoleh waktu retensi 4,794 menit dengan nilai HETP 0,0365; faktor ikutan sebesar 1,75 dan area 13.544. Pada penambahan jumlah asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 75  $\mu\text{L}$  diperoleh waktu retensi 4,804 menit dengan nilai HETP 0,0487 faktor ikutan sebesar 1,33 dan area 14.647. Pada penambahan jumlah asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 100  $\mu\text{L}$  diperoleh waktu retensi 4,734 menit dengan nilai HETP 0,0434; faktor ikutan 1,17 dan area 14.955. Pada penambahan jumlah asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 125  $\mu\text{L}$  diperoleh waktu retensi 4,808 menit dengan nilai HETP 0,0557, faktor ikutan sebesar 1,33 dan area 15.800. Dalam hal ini penambahan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 125  $\mu\text{L}$  ditetapkan sebagai kondisi analisis terpilih. Data waktu retensi, area, HETP dan faktor ikutan akrilamida pada berbagai kondisi penambahan jumlah asam 2-merkaptobenzoat dapat dilihat pada Tabel 2. Kromatogram akrilamida pada berbagai perubahan pH derivatisasi dapat dilihat pada Gambar 13, 14, 15

dan 16. Kurva Hubungan antara pH derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 31.

c. Penentuan waktu terhadap pembentukan senyawa derivat

Pada waktu pembentukan senyawa derivat dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 jam diperoleh waktu retensi 4,734 menit dengan nilai HETP 0,0434; faktor ikutan sebesar 1,33 dan area 14.955. Pada waktu pembentukan senyawa derivat dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 3 jam diperoleh waktu retensi 4,760 menit dengan nilai HETP 0,0221, faktor ikutan 0,80 dan area 15.954. Pada waktu pembentukan senyawa derivat dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 4 jam diperoleh waktu retensi 4,812 menit dengan nilai HETP 0,0204, faktor ikutan 0,87 dan area 15.796. Pada waktu pembentukan senyawa derivat selama 3 jam ditetapkan sebagai kondisi analisis terpilih. Data waktu retensi, HETP, faktor ikutan dan area pada perubahan waktu derivatisasi dapat dilihat pada Gambar 16, 17, dan 18. Kurva Hubungan antara pH derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 32.

d. Penentuan kestabilan senyawa derivat yang terbentuk (waktu selesai reaksi)

Kestabilan senyawa derivat yang terbentuk pada menit ke 30 dengan kondisi analisis pada panjang gelombang 254 nm, fase

gerak yang digunakan asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v), kecepatan alir 0,8 mL/menit diperoleh waktu retensi 4,754 menit dengan nilai HETP 0,0318, faktor ikutan 1,12 dan area 16.745. Pada menit ke 60 diperoleh waktu retensi 4,756 menit dengan nilai HETP 0,0142, faktor ikutan 0,75 dan area 16.196. Pada menit ke 90 diperoleh waktu retensi 4,754 menit dengan nilai HETP 0,0374, faktor ikutan 0,80 dan area 16.770. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa derivat akrilamida stabil hingga menit ke 90. Data waktu retensi, HETP, faktor ikutan dan area pada perubahan waktu derivatisasi dapat dilihat pada Gambar 19, 20, dan 21. Kurva Hubungan antara pH derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 33.

## **2. Penentuan Komposisi Fase Gerak Terhadap Analisis Senyawa Hasil Derivat**

Pada kondisi analisis senyawa hasil derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat pada panjang gelombang 254 nm, pada komposisi fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (20% : 80%, v/v) diperoleh waktu retensi 10,898 menit, jumlah pelat teoritis 686, 44 dan nilai HETP 0,0015 dan faktor ikutan 1,75. Pada komposisi fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v) diperoleh waktu retensi 6,034 menit, jumlah pelat teoritis 576 dan nilai HETP 0,0434 dan faktor ikutan 0,625. Pada komposisi fase gerak asetonitril-asam

asetat 0,1% (30% : 70%, v/v) diperoleh waktu retensi 4,669 menit, jumlah pelat teoritis 291,62 dan nilai HETP 0,0857 dan faktor ikutan 0,17. Komposisi fase gerak asetronitril-asam asetat 0,1% (25% : 70%, v/v) ditetapkan sebagai komposisi fase gerak yang terpilih untuk analisis senyawa hasil derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat. Data waktu retensi, area, HETP dan faktor ikutan pada berbagai kondisi perubahan fase gerak dapat dilihat pada Tabel 4. Kromatogram senyawa derivat akrilamida dapat dilihat pada Gambar 22, 23 dan 24.

### **3. Penentuan Kecepatan Aliran Fase Gerak Terhadap Waktu Retensi Senyawa Derivat.**

Pada analisis senyawa hasil derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat pada panjang gelombang 254 nm, komposisi fase gerak asetronitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v) dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit diperoleh waktu retensi 9,427 menit, jumlah pelat teoritis 455,11, nilai HETP 0,0549 dan faktor ikutan 1,5. Pada kecepatan alir 0,8 mL/menit diperoleh waktu retensi 5,841 menit; jumlah pelat teoritis 1292,01, nilai HETP 0,0193 dan faktor ikutan 1,75. Pada kecepatan alir 1,0 mL/menit diperoleh waktu retensi 4,764 menit, jumlah pelat teoritis 476,03, nilai HETP 0,0525 dan faktor ikutan 1,5. Pada kecepatan alir 1,2 mL/menit diperoleh waktu retensi 4,

760 menit, jumlah pelat teoritis 344, 89, nilai HETP 0,0725 dan faktor ikutan 1,75.

#### **4. Uji Kesesuaian Sistem**

Pada larutan akrilamida yang telah diderivatisasi dengan konsentrasi 1 µg/mL yang disuntikkan sebanyak lima kali, pada larutan senyawa derivat pertama diperoleh waktu retensi 5,722 menit; area 17.245; jumlah pelat teoritis 806,56, nilai HETP 0,0310 dan faktor ikutan 1,33. Pada larutan senyawa derivat kedua diperoleh waktu retensi 5,698 menit; area 17.436; jumlah pelat teoritis 400; nilai HETP 0,0625 dan faktor ikutan 1,5. Pada larutan senyawa derivat ketiga diperoleh waktu retensi 5,729 menit; area 17.813; jumlah pelat teoritis 336,111; nilai HETP 0,0744 dan faktor ikutan 1,0. Pada larutan senyawa derivat keempat diperoleh waktu retensi 5,726 menit; area 17.213; jumlah pelat teoritis 334,3674; nilai HETP 0,0748 dan faktor ikutan 1,0. Pada larutan senyawa derivat kelima diperoleh waktu retensi 5,755m menit; area 17.735; jumlah pelat teoritis 400; nilai HETP 0,0625 dan faktor ikutan 0,75.

#### **5. Uji Linearitas**

Pada larutan akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat diperoleh persamaan garis  $y = 15685x + 2312,3$

dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) 0,99423. Gambar dan data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar. 34 dan Tabel 8.

#### **6. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

Batas deteksi untuk akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada percobaan ini adalah 0,09094  $\mu\text{g/mL}$  dan batas kuantitasnya adalah 0,30313  $\mu\text{g/mL}$ . Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

#### **7. Uji Keterulangan (Presisi)**

Hasil uji keterulangan pada dua konsentrasi yang diuji pada percobaan ini memberikan nilai koefisien variasi kurang dari 2%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10.

#### **8. Uji Perolehan Kembali (Akurasi)**

Hasil uji perolehan kembali akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada konsentrasi 1,012  $\mu\text{g/mL}$  adalah 94,77% dan konsentrasi 0,4048  $\mu\text{g/mL}$  adalah 98,93% dan konsentrasi. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel.10.

### **B. PEMBAHASAN**

Akrilamida ditemukan pada beberapa makanan tertentu yang dalam proses dan pembuatannya menggunakan suhu tinggi (lebih dari

120 °C). Kadar akrilamida akan meningkat dengan meningkatnya pemanasan dan bertambahnya waktu (3).

Penelitian ini bertujuan untuk mencari kondisi optimum analisis akrilamida yang diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Seperti diketahui bahwa gugus nukleofilik seperti tiol secara nyata dapat bereaksi dengan ikatan rangkap pada akrilamida, hal tersebut menjadi dasar digunakannya reaktivitas dengan tiol membentuk senyawa derivat yang stabil untuk analisis akrilamida. Pada analisis derivatisasi ini dilakukan pada panjang gelombang 254 nm (1, 15).

## **1. Pembentukan Senyawa Derivatisasi dengan Asam 2-Merkapto Benzoat**

### **a. Penentuan pH derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat terhadap pembentukan senyawa derivat**

Penentuan pH derivatisasi penting dalam pembentukan senyawa derivat, hal ini agar senyawa derivat yang terbentuk merupakan senyawa yang diharapkan dapat dianalisa bukan hasil samping reaksi. Reaksi derivatisasi berlangsung pada pH basa, senyawa derivat dapat terbentuk pada range pH 8 – 10. Berdasarkan hasil pengamatan pH yang optimum untuk pembentukan senyawa derivat dari akrilamida adalah pH 10, karena pada pH 10 memberikan area yang paling besar. Bila pH derivatisasi bukan pada pH basa, akrilamida dengan asam 2-

merkaptobenzoat sebagai penderivat tidak beraksi secara optimum.

b. Penentuan jumlah asam 2-merkaptobenzoat terhadap pembentukan senyawa derivat

Dalam derivatisasi akrilamida diperlukan jumlah penderivat yang berlebih secara stokiometri, namun kelebihan penderivat juga perlu diperhatikan agar kelebihan reaksi tersebut tidak mengganggu senyawa derivat yang terbentuk. Pada penelitian ini jumlah asam 2-merkaptobenzoat optimum sebanyak 125  $\mu\text{L}$  karena sesuai secara stokiometri dan memberikan area maksimum pada range 50 – 125  $\mu\text{L}$  (dapat dilihat pada lampiran 1) dengan HETP dan faktor ikutan yang cukup baik.

c. Penentuan waktu derivatisasi terhadap pembentukan senyawa derivat

Diperlukan waktu inkubasi agar senyawa derivat yang terbentuk sempurna. Dari hasil percobaan, pembentukan senyawa derivat optimum setelah inkubasi selama 3 jam. Hal ini disebabkan karena pada waktu 3 jam memberikan area lebih besar dari 2 jam, namun jika dibandingkan dengan 4 jam tidak memberikan perubahan area yang signifikan. Pada waktu derivatisasi selama 3 jam tersebut memberikan HETP, nilai jumlah pelat teoritis dan faktor ikutan yang cukup baik. Jika waktu inkubasi kurang dari 3 jam, senyawa derivat

yang terbentuk belum optimum dan apabila waktu inkubasi lebih dari 3 jam (4 jam) tidak terjadi perubahan area secara signifikan. Namun, apabila waktu inkubasi dilakukan semakin lama senyawa derivat yang dihasilkan menjadi kurang baik karena senyawa derivat yang telah terbentuk dapat terhidrolisis kembali.

d. Penentuan kestabilan senyawa derivatisasi yang terbentuk

Senyawa hasil derivat yang terbentuk dari hasil derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat cukup stabil, hal ini dapat dilihat pada menit ke 30, 60 dan 90 waktu retensi dan area yang diperoleh tidak memberikan perubahan yang terlalu signifikan.

## **2. Penentuan Komposisi Fase Gerak Terhadap Analisis Senyawa Hasil Derivat**

Fase gerak atau eluen dalam KCKT berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat-sifat komponen sampel. Deret eluotropik yang disusun berdasarkan polaritas pelarut merupakan panduan yang berguna dalam memilih fase gerak yang akan digunakan dalam KCKT (5).

Kondisi fase gerak optimum pada penelitian ini adalah asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%,v/v). Hal ini didasarkan pada nilai jumlah pelat teoritis, HETP dan faktor ikutan yang cukup baik, selain itu juga memberikan pemisahan yang cukup baik untuk analisis

akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat yaitu pada waktu retensi 6,034 menit. Hal ini disebabkan karena pada perbandingan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 70%, v/v) diperoleh pemisahan senyawa derivat yang paling baik jika dibandingkan dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% perbandingan (20% : 80%, v/v) dan (30% : 70%, v/v). Pada perbandingan (25% : 75%, v/v) membutuhkan waktu keseluruhan analisis (30 menit). Pada perbandingan (20% : 80%, v/v) membutuhkan waktu keseluruhan analisis yang lebih lama (60 menit) dan pada perbandingan (30% : 70%, v/v) membutuhkan waktu keseluruhan analisis (20 menit). Waktu yang dibutuhkan untuk keseluruhan analisis pada penelitian ini lebih lama karena adanya kelebihan dari penderivat (asam 2-merkaptobenzoat) yang keluar pada waktu retensi yang sangat jauh dari senyawa derivat. Oleh karena itu kelebihan penderivat juga menjadi salah satu alasan ditetapkannya fase gerak terpilih selain pemisahan yang baik terhadap senyawa derivat. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

### **3. Penentuan Kecepatan Aliran Fase Gerak Terhadap Waktu Retensi Senyawa Derivat.**

Pemilihan kecepatan alir digunakan untuk menunjukkan kondisi optimal hasil kromatogram yang terbentuk, berdasarkan pengamatan kecepatan 0,8 mL/menit merupakan kecepatan alir optimum. Meskipun

kecepatan alir 0,5 mL/menit memberikan pemisahan, nilai HETP dan faktor ikutan yang baik. Namun pada penelitian ini dipilih kecepatan alir 0,5 mL/menit karena memberikan waktu keseluruhan analisis yang lebih cepat. Dalam hal ini, berhubungan dengan kelebihan penderivat (asam 2-merkaptobenzoat) yang muncul pada waktu retensi yang sangat jauh dengan senyawa derivat akrilamida terhadap waktu keseluruhan analisis. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

#### **4. Uji Kesesuaian Sistem**

Uji kesesuaian sistem merupakan serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Farmakope Amerika (USP) menentukan parameter-parameter yang digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Pada umumnya, paling tidak ada 2 kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk menunjukkan kesesuaian sistem suatu metode (5).

Berdasarkan pengamatan sebanyak 5 kali pada kondisi yang sama diperoleh perubahan waktu retensi, area, jumlah pelat teoritis, HETP dan faktor ikutan yang tidak terlalu signifikan.

#### **5. Uji Linieritas, Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

Linieritas merupakan suatu metode pengukuran untuk melihat seberapa baik hubungan respon dari berbagai konsentrasi pada suatu

kurva kalibrasi untuk menghasilkan suatu garis lurus. Dari hasil uji linieritas larutan akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan rentang konsentrasi 0,4 hingga 1,0  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,99423. Nilai ( $r$ ) tersebut lebih kecil dibandingkan dengan penelitian akrilamida tanpa derivatisasi yaitu 0,9999. Hal ini disebabkan adanya pengaruh dari faktor-faktor yang berhubungan dengan derivatisasi seperti pH, pelarut, suhu, jumlah penderivat yang ditambahkan dan waktu derivatisasi. Selain dari faktor-faktor derivatisasi tersebut, panjang gelombang maksimum juga kemungkinan menjadi salah satu faktor lain penyebab rendahnya nilai koefisien korelasi pada penelitian ini. Karena pada penelitian ini, larutan hasil derivatisasi tidak dapat terukur secara spektrofotometer sehingga digunakan panjang gelombang analisis dari literatur (254 nm). Hal ini dapat disebabkan karena terdapat banyak senyawa yang mempunyai gugus kromofor sehingga puncak panjang gelombang maksimum tidak dapat ditentukan. Walaupun demikian, derivatisasi akrilamida ini memiliki keunggulan daripada analisis akrilamida tanpa derivatisasi yaitu memiliki selektivitas yang lebih baik.

Batas deteksi dan kuantitasi penting untuk mengetahui batas terendah konsentrasi suatu senyawa yang masih dapat ditentukan dengan metode yang digunakan secara akurat dan presisi.

Berdasarkan perhitungan diperoleh batas deteksi sebesar 0,09094  $\mu\text{g/mL}$  dan batas kuantitasi sebesar 0,30313  $\mu\text{g/mL}$ . Batas kuantitasi tersebut masih dapat digunakan untuk analisis akrilamida dalam makanan (kadar akrilamida dalam beberapa produk makanan dapat dilihat pada Tabel 11. Hasil tersebut tidak memberikan perbedaan yang terlalu jauh dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan pada sampel kopi yaitu batas deteksi sebesar 0,157  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,270  $\mu\text{g/mL}$  (1).

#### **6. Uji Perolehan Kembali dan Presisi**

Berdasarkan percobaan dan perhitungan diperoleh uji perolehan kembali (UPK) pada konsentrasi pertama (1,0120  $\mu\text{g/mL}$ ) sebesar 94,77%, konsentrasi kedua (0,4048  $\mu\text{g/mL}$ ) 98,93%. Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa hanya pada satu konsentrasi yang memenuhi persyaratan uji perolehan kembali yaitu 98 – 102%.

Berdasarkan perhitungan pada dua konsentrasi yang berbeda, diperoleh nilai koefisien variasi kurang dari 2% sehingga memenuhi syarat uji presisi yaitu kurang dari 2%.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Kondisi optimum untuk pembentukan senyawa derivat antara akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 125  $\mu\text{L}$  pada pH 10 dicampur dengan *magnetic stirrer* selama 3 jam dan senyawa derivat akrilamida stabil hingga menit ke 90.
2. Kondisi optimum untuk analisis akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat adalah dengan menggunakan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v), kecepatan alir 0,8 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 254 nm dengan menggunakan detektor ultraviolet, waktu retensi akrilamida terderivatisasi adalah 5,722 menit.

#### B. SARAN

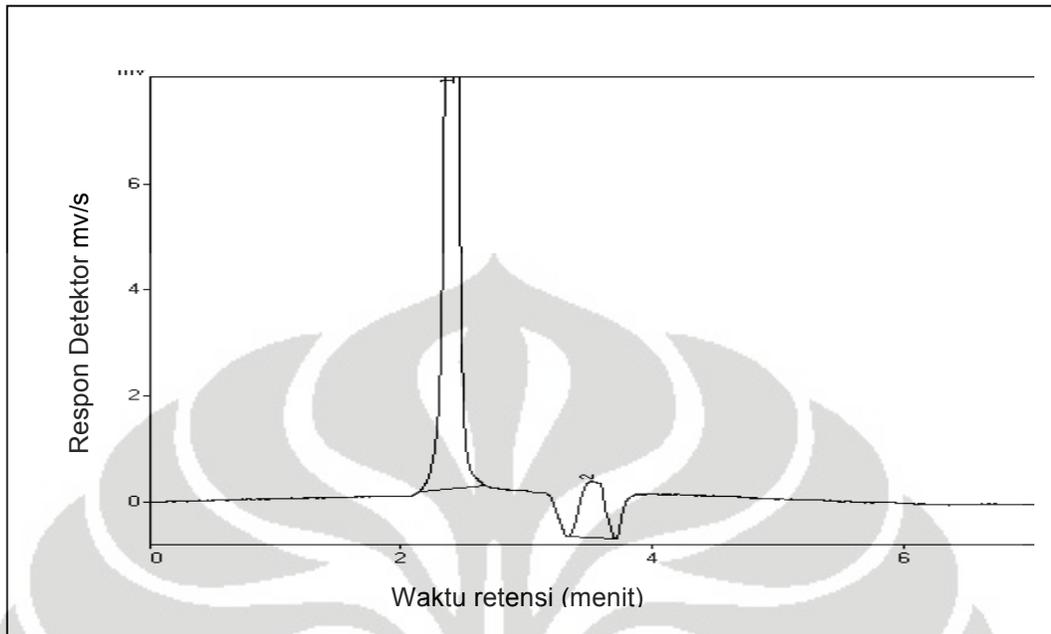
1. Pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan analisis akrilamida yang telah diderivatisasi dalam sampel makanan dengan menggunakan metode KCKT yang telah dioptimasi.
2. Analisis derivatisasi akrilamida dengan asam 2-merkaptobenzoat dalam sampel perlu dilakukan penghilangan sisa penderivat.

## DAFTAR PUSTAKA

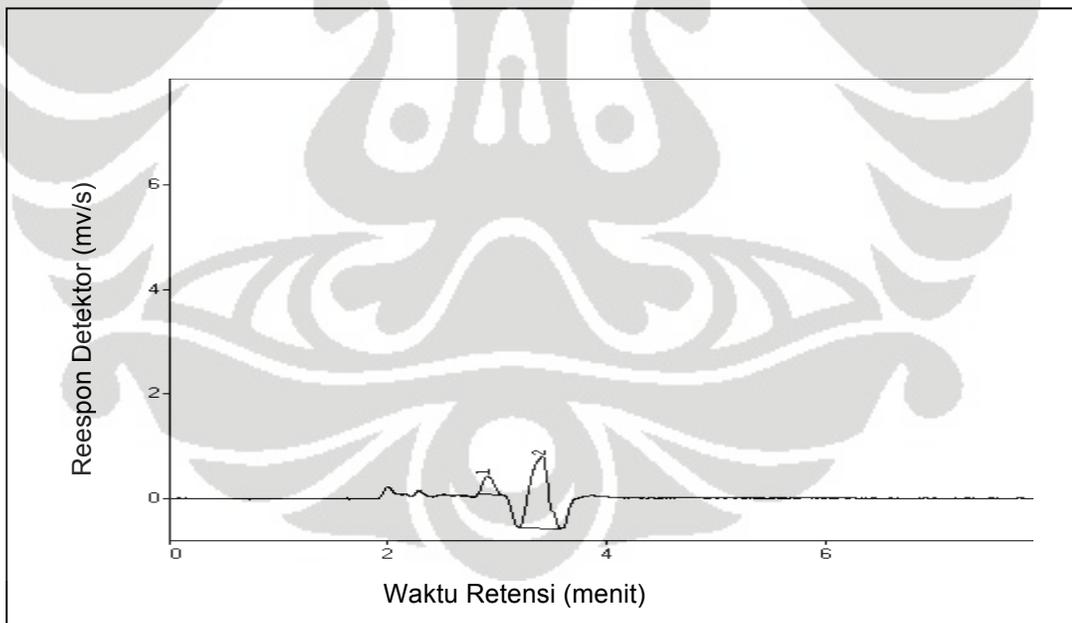
1. Bagdonaite, K. *Formation of Acrylamide during Roasting of Coffee*. Austria: Disertasion of Doctoral Programs. Graz University of Technology, 2007: 58 – 67.
2. Anonim. *Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation*. Geneve, Swiss: World Health Organization (WHO), 2002.
3. Harahap, Y. Pembentukan Akrilamida dalam Makanan dan Analisisnya. Depok: *Majalah Ilmu Kefarmasian* volume III, Departemen Farmasi FMIPA UI, 2006: 107-116.
4. Harahap, Y., Umar M., dan T. Nebrisa Z. Analisis Akrilamida dalam Kentang Goreng dari Beberapa Rumah Makan Cepat Saji secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Bandung: *ACTA Pharmaceutica Indonesia*. Volume XXXI No. 1, Sekolah Farmasi ITB, 2006: 41-46.
5. Rohman, Abdul. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan I. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 2007.
6. Anonim. *The Merck Index 9<sup>th</sup> Edition*. Rahway NJ: Merck & Co. Inc., 1976: 17; 2432.
7. Anonim. *Summary and Conclusion of The Sixty-Fourth Meeting: Report of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Rome, 2005.

8. Anonim. *Heat Generated Food Toxicant: Identification, Characterisation, and Risk Minimization*. LUND University: The Heatox Project, 2007.
9. Friedman, M. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Riview. *J. Agric. Food Chem.* California: American Chemical Society, 2003. 4504-4520.
10. Zyzak, D. V. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods: *J. Agric. Food Chem.* Cincinnati, Ohio: American Chemical Society, 2003.
11. Munson, JW. *Analisis Farmasi Metode Modern*. Surabaya: Airlangga University Press. 1991 (II).
12. Snyder L.R., Kirkland J.J., and Glajch J.L. *Practical HPLC Method Development, Second edition*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1997: 63-71; 76; 205-230; 292-314; 685-713.
13. Coopex, L. *Derivatives for HPLC Analysis*. USA: Diploma Thesis. University of genf, 2000: 4.
14. Harmita. Analisis Fisikokimia Farmasi, edisi pertama. Departemen Farmasi FMIPA-UI, 2006: 115 - 177.
15. Jezussek, Magnus & Peter S. A New LC/MS-Method for the Quantitation of Acrylamide Based on a Stable Isotope Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid. Comparison with Two GC/MS Methods. *J. Agric. Food Chem.* Jerman: American Chemical Society, 2003: 7866 – 7871.

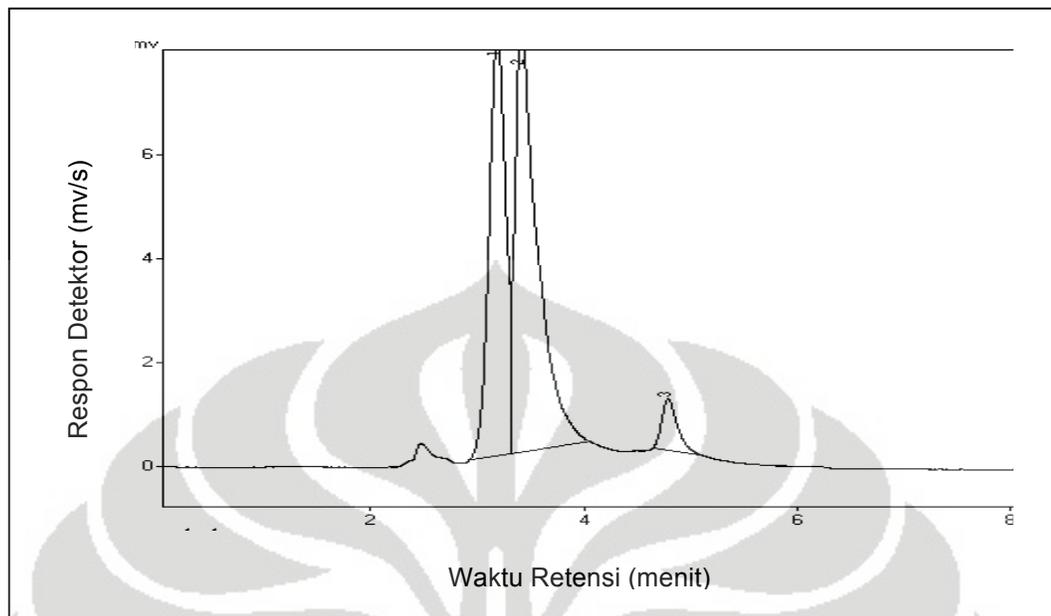
16. Granvogl, M. & Peter S. *Quantitation of 3-Aminopropionamide in Cocoa, Coffee and Cereal products*. Jerman: Chair for Food Chemistry, Technical University of Munich, 2006.
17. Pérez, H. L. & Siv O. G. *A Sensitive Gas Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Method for Detection of Alkylating Agents in Water: Application to Acrylamide in Drinking Water, Coffee and Snuff*. Swedia: Department of Molecular Biology and Functional Genomics, Stockholm University, 2003: 1033 – 1036.
18. Chu, S. & Chris D. M. *Analysis of Acrylamide in Water Using a Coevaporation Preparative Step and Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. Kanada: Worsfold Water Quality Center, Trent University, 2007: 5093 – 5096.
19. Alpmann, A. & Gertrud M. *Rapid and Sensitive Determination of Acrylamide in drinking Water by Planar Chromatography and Fluorescence Detection after Derivatization with Dansulfinic Acid*. Jerman: Institute for Food Chemistry, University of Hohenheim, 2007: 71 – 77.
20. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, I(3). Departemen Farmasi FMIPA-UI, 2004.
21. Harmita. Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi, edisi pertama. Departemen Farmasi FMIPA-UI, 2006: 157-166.



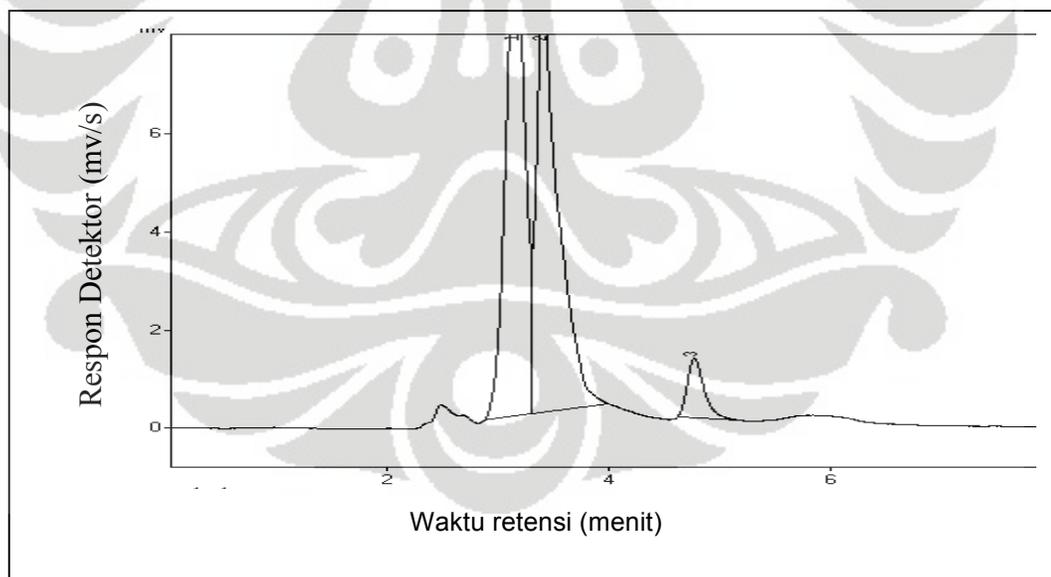
Gambar 8. Kromatogram larutan blanko dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu$ L.



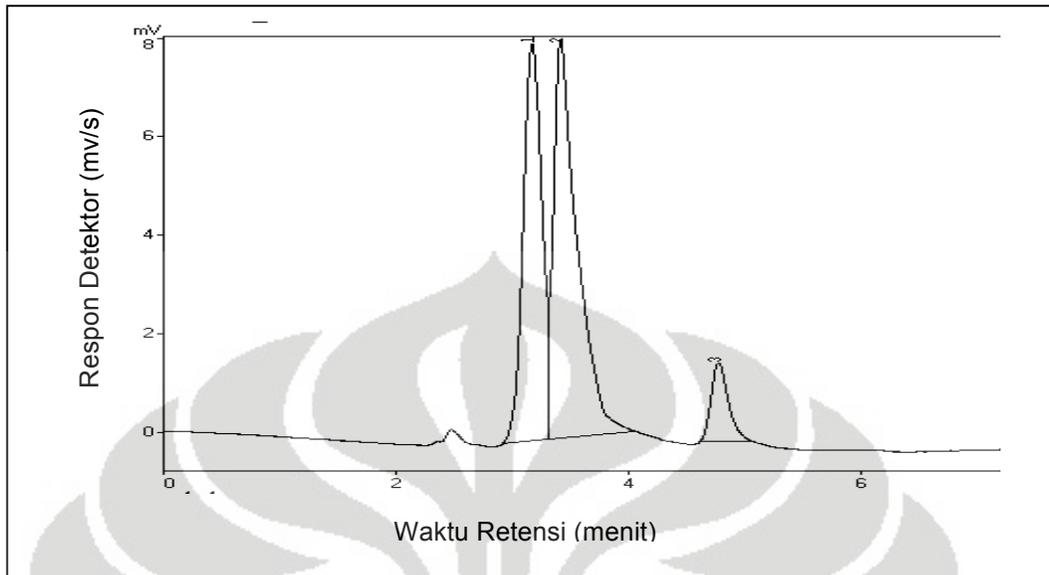
Gambar 9. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu$ g/mL tanpa derivatisasi dengan asam 2-merkpto benzoat



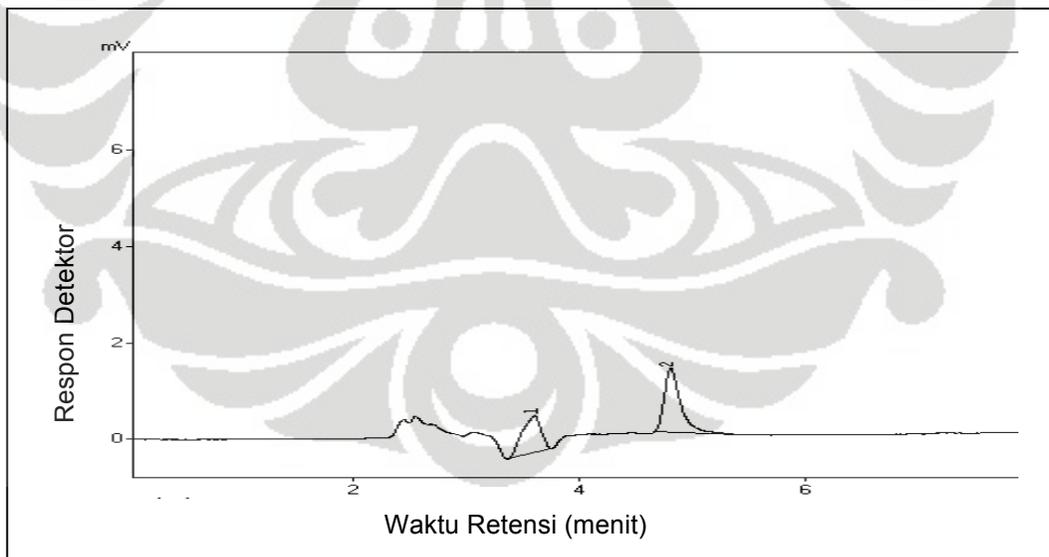
Gambar 10. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada pH 8 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .



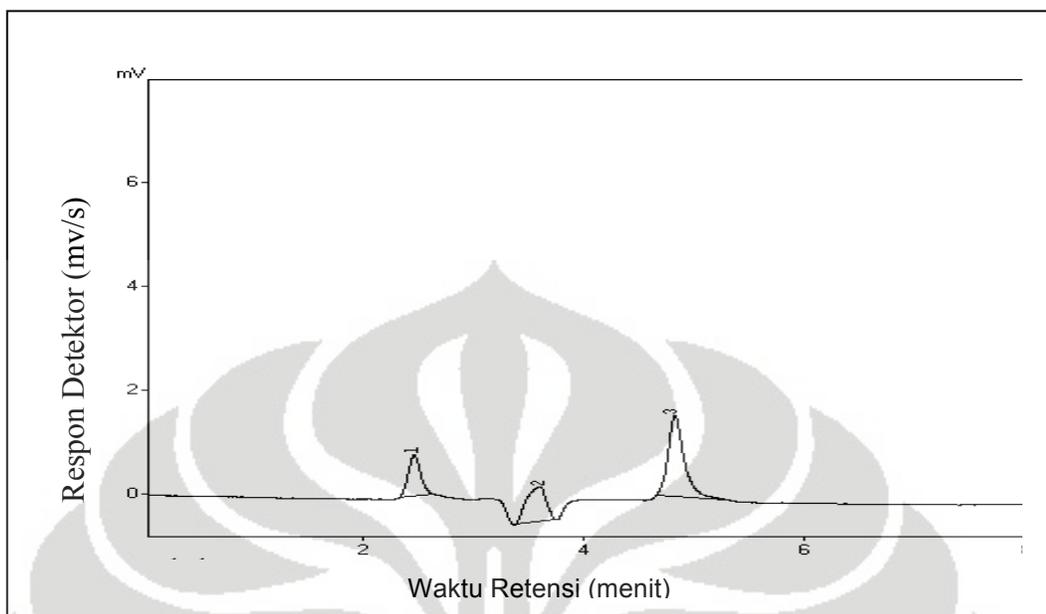
Gambar 11. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada pH 9 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .



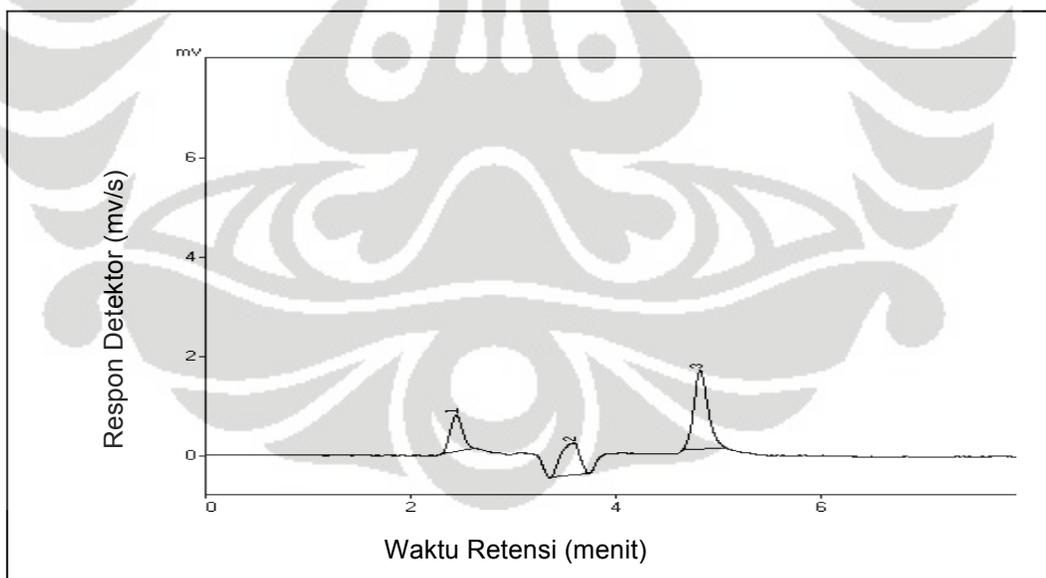
Gambar 12. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat pada pH 10 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .



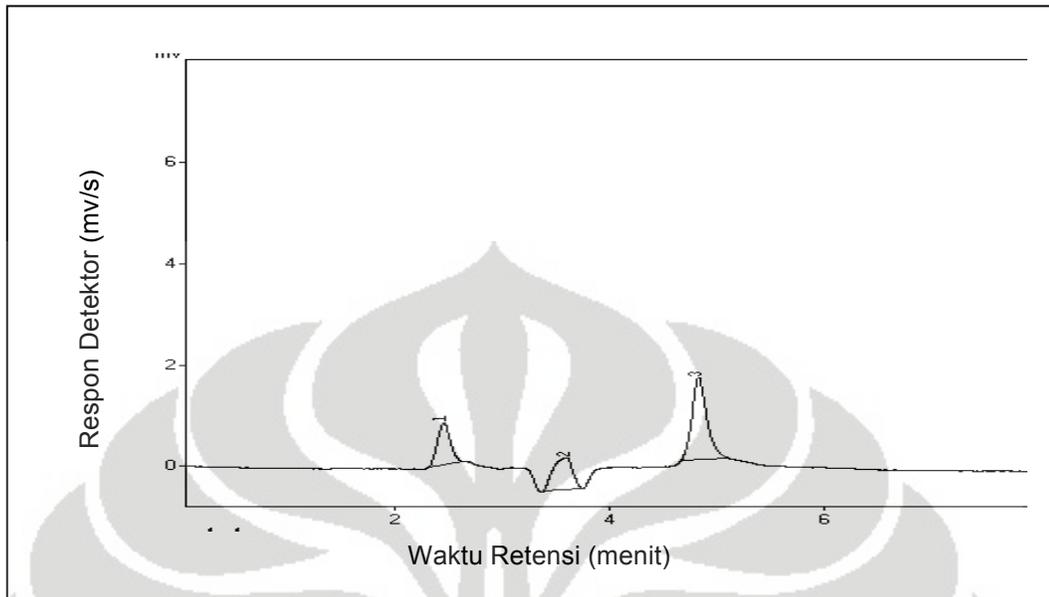
Gambar 13. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 50  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .



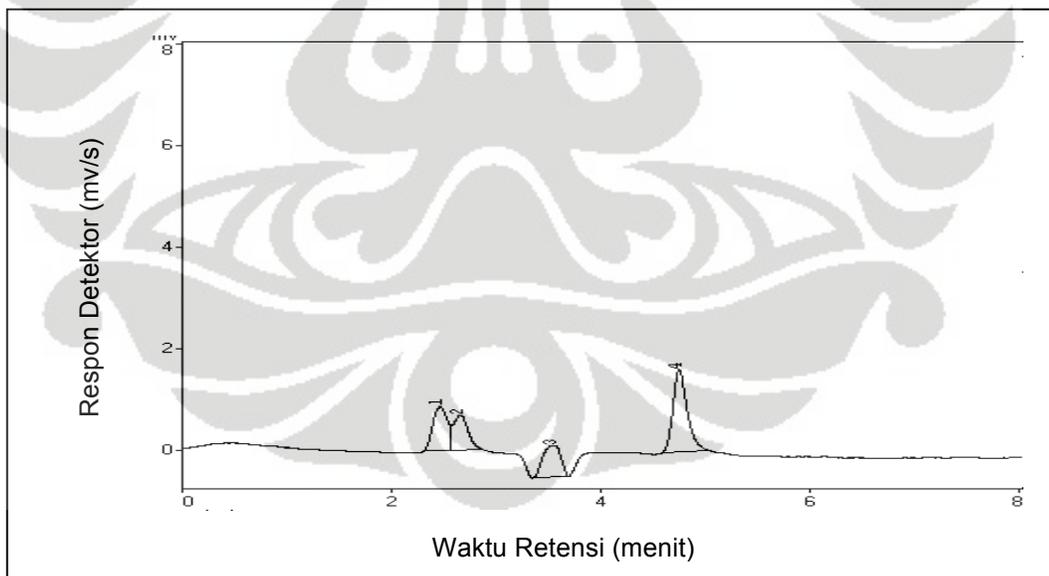
Gambar 14. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 75  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



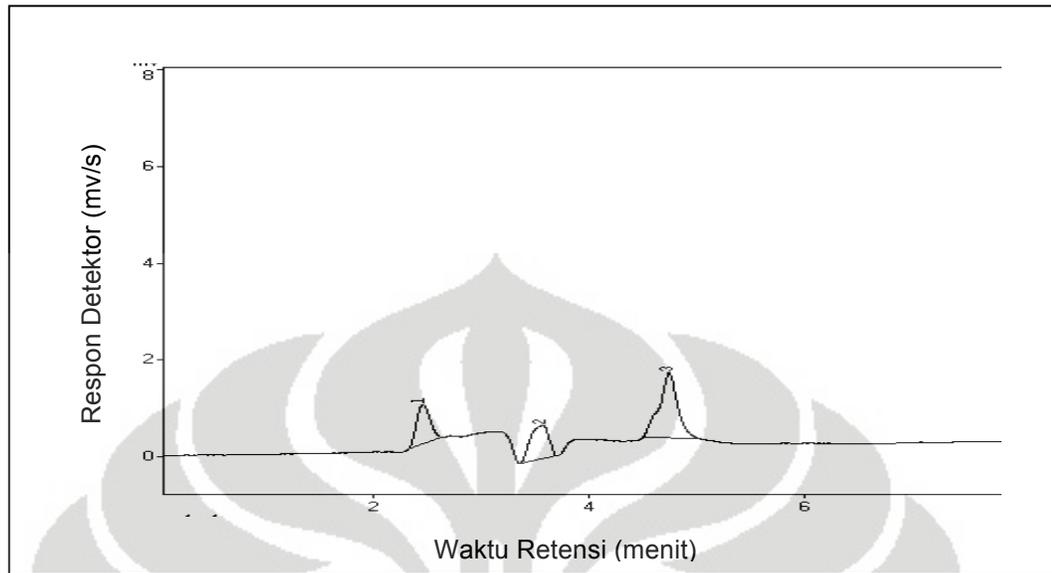
Gambar 15. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



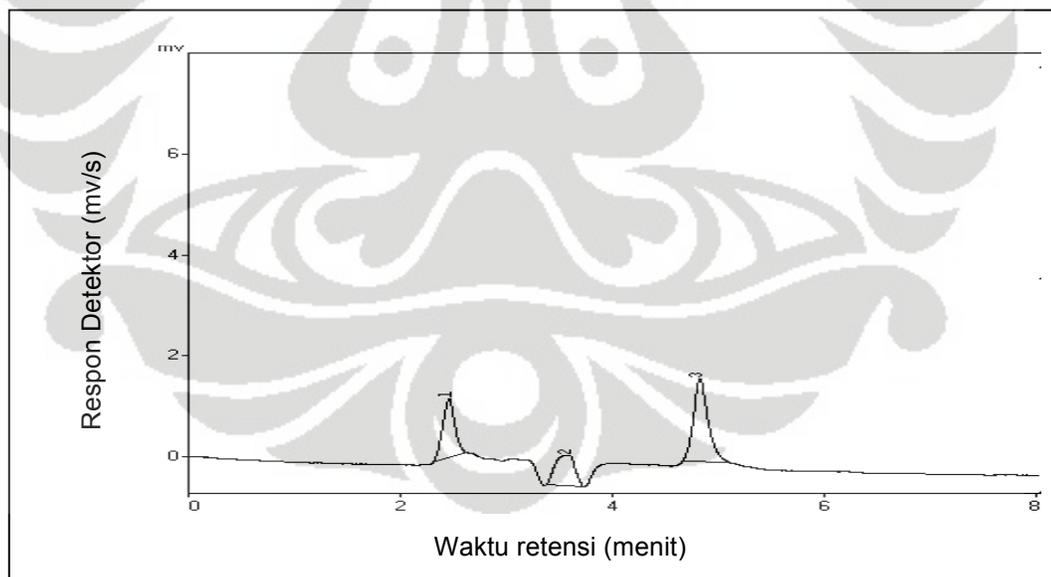
Gambar 16. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat sebanyak 125  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



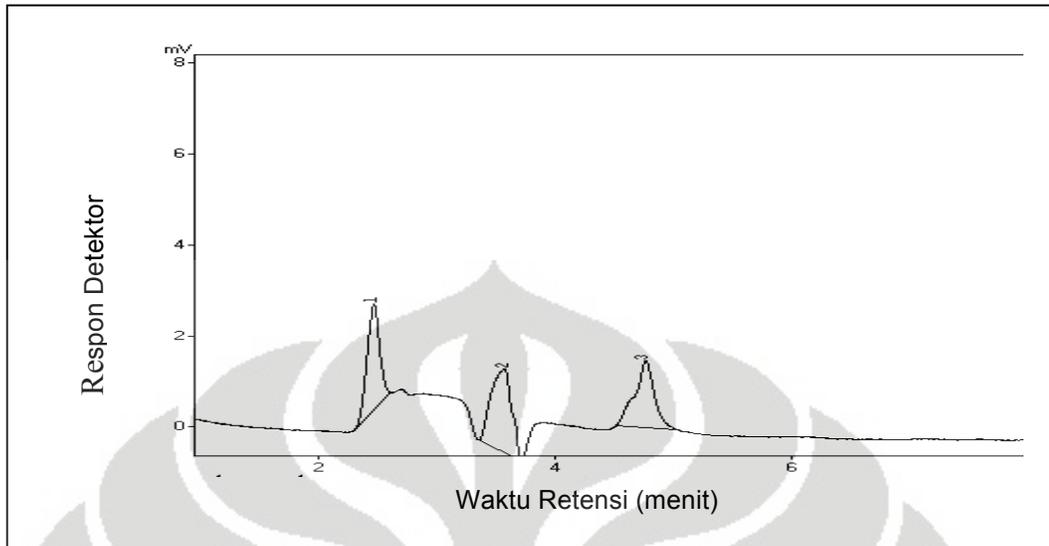
Gambar 17. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat selama 2 jam dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



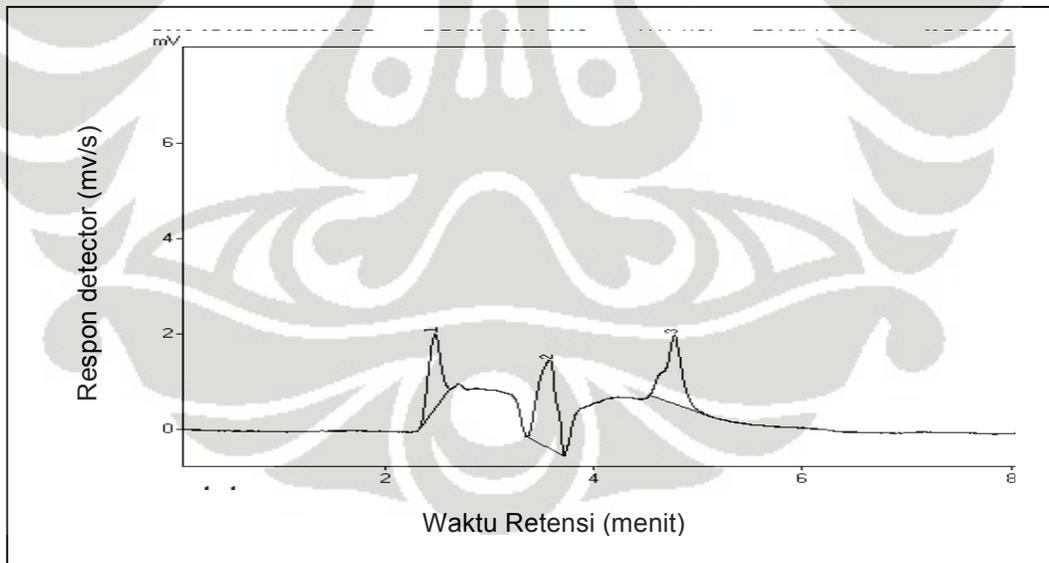
Gambar 18. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat selama 3 jam dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



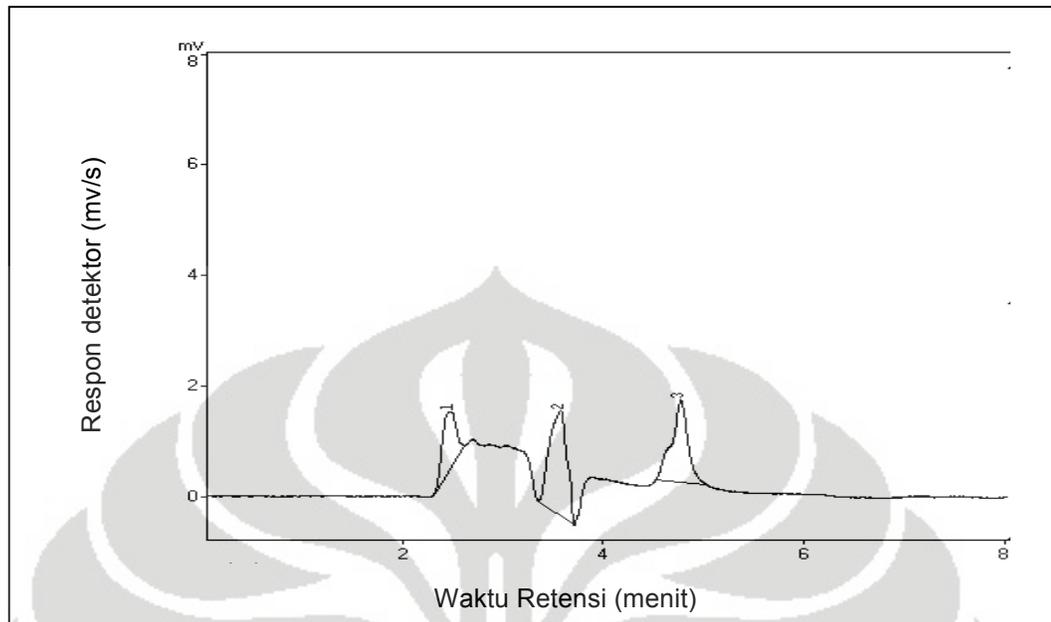
Gambar 19. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat selama 4 jam dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



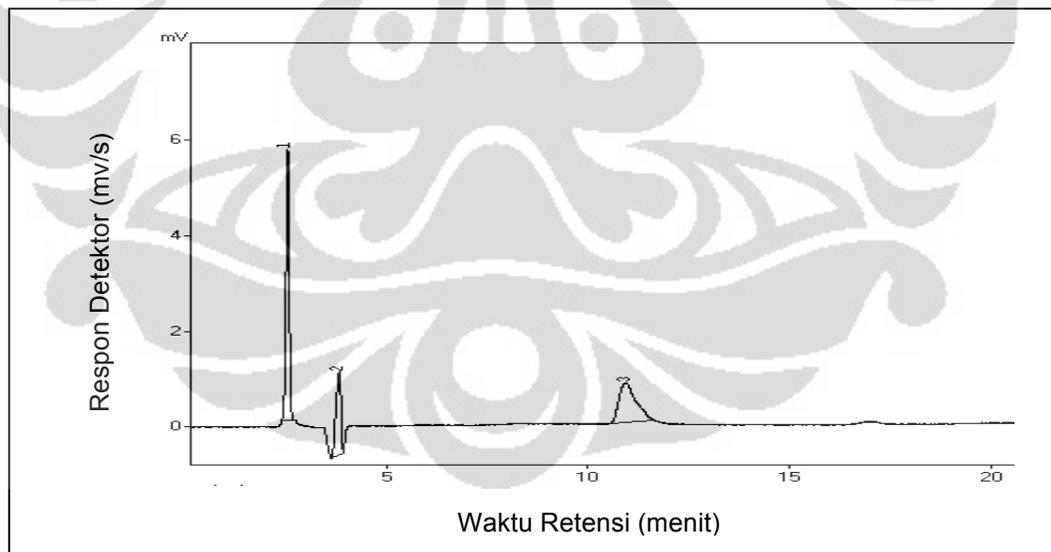
Gambar 20. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan waktu selesai reaksi (kestabilan senyawa derivate) pada menit ke 30 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



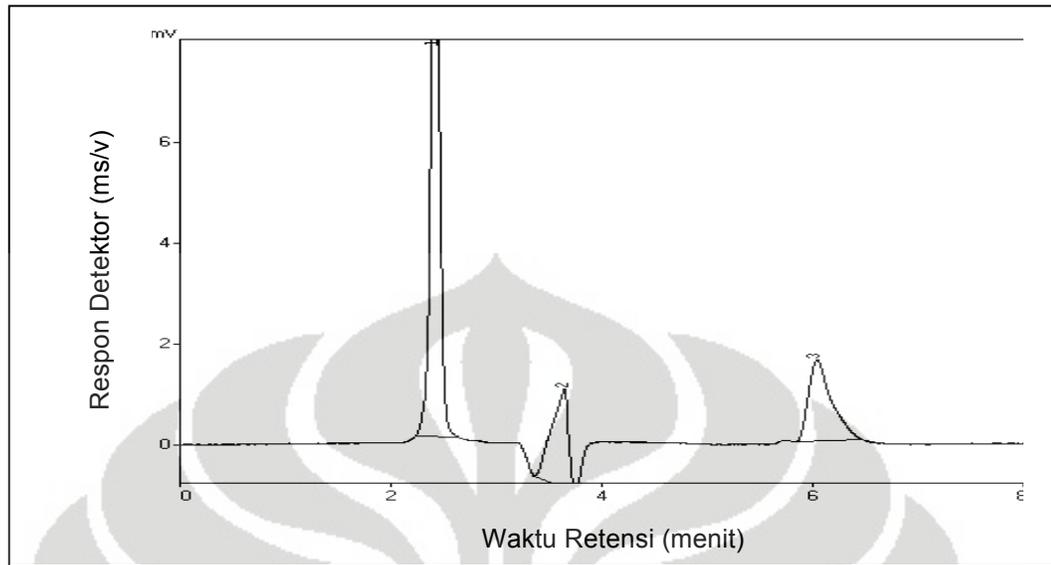
Gambar 21. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan waktu selesai reaksi (kestabilan senyawa derivate) pada menit ke 60 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



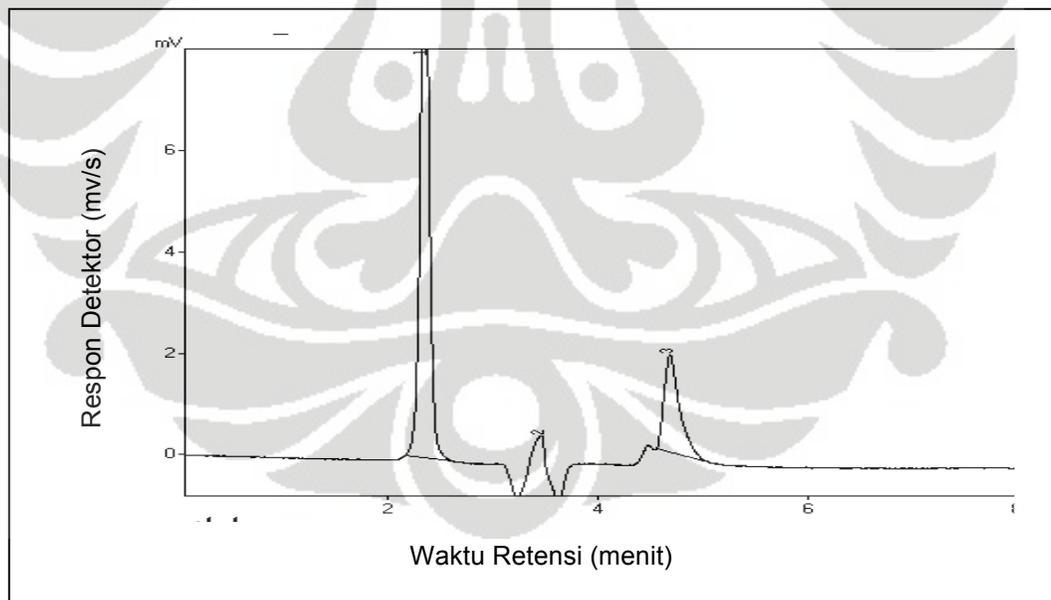
Gambar 22. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan waktu selesai reaksi (kestabilan senyawa derivate) pada menit ke 90 dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



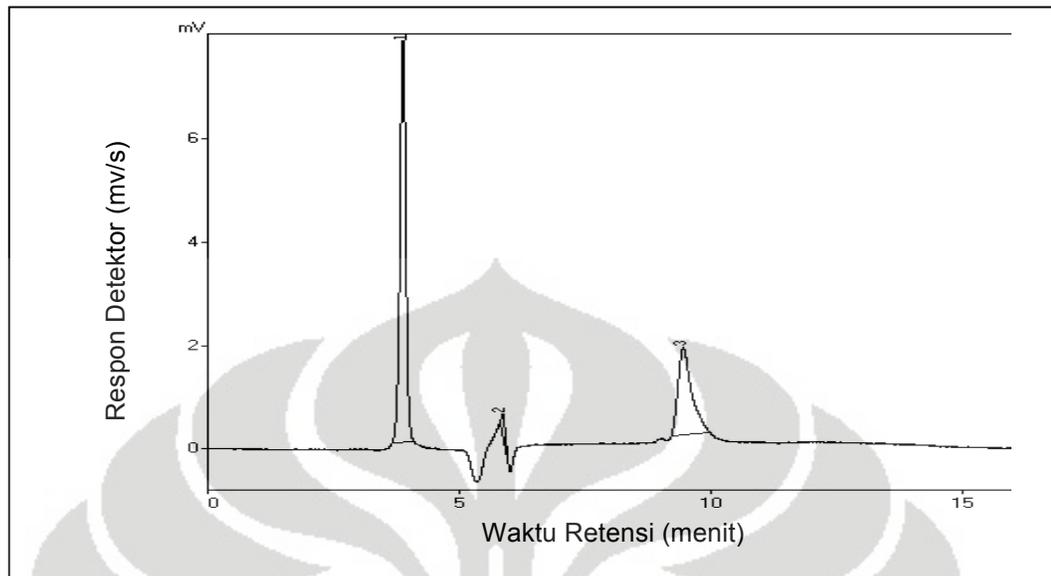
Gambar 23. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (20% : 80%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



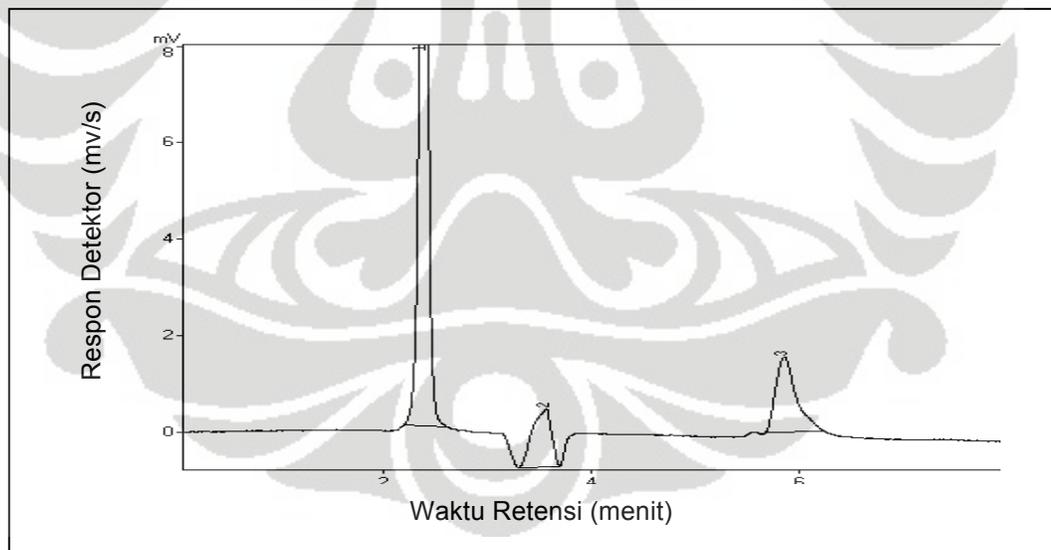
Gambar 24. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



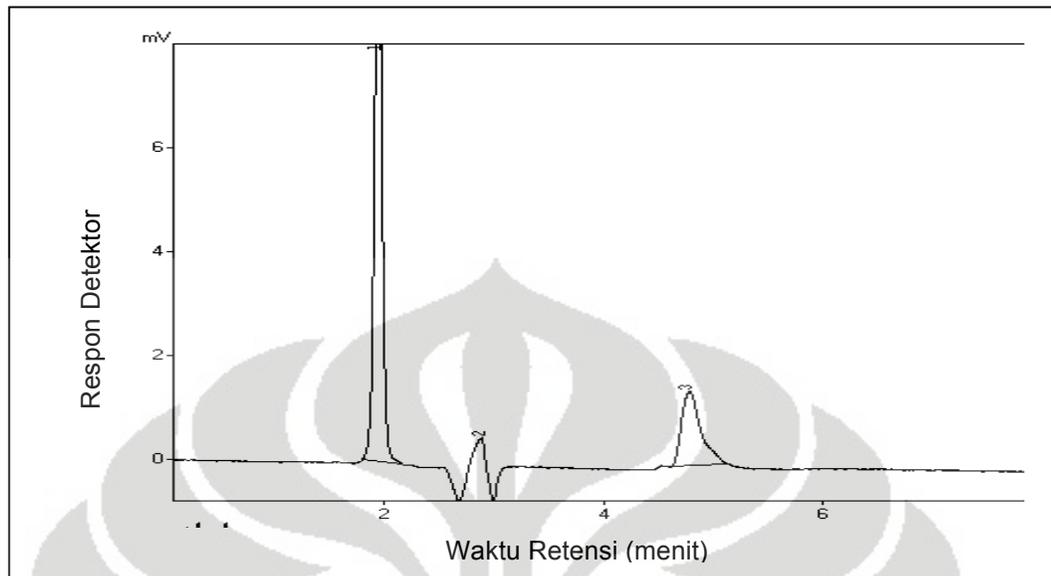
Gambar 25. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



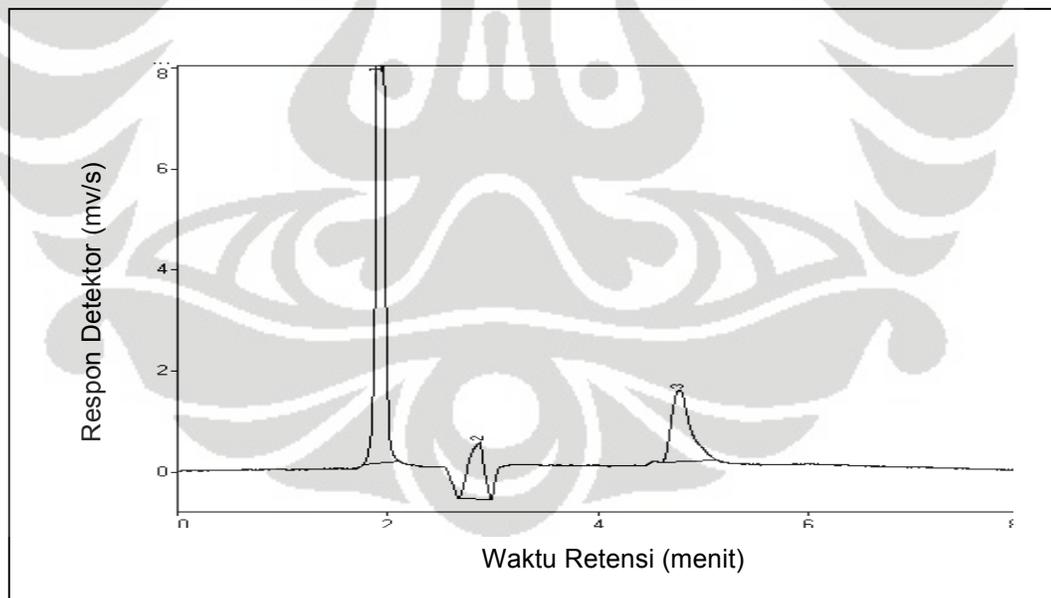
Gambar 26. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,5 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



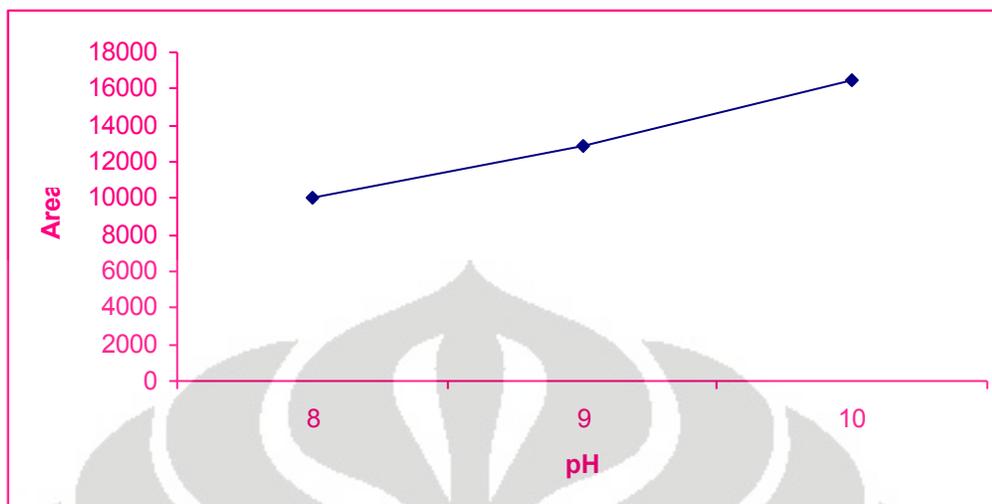
Gambar 27. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



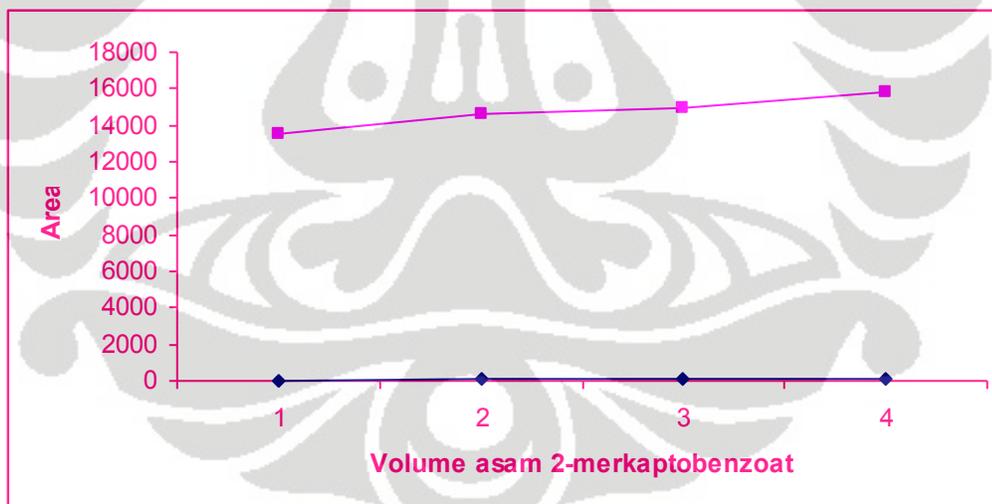
Gambar 28. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 1,0 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



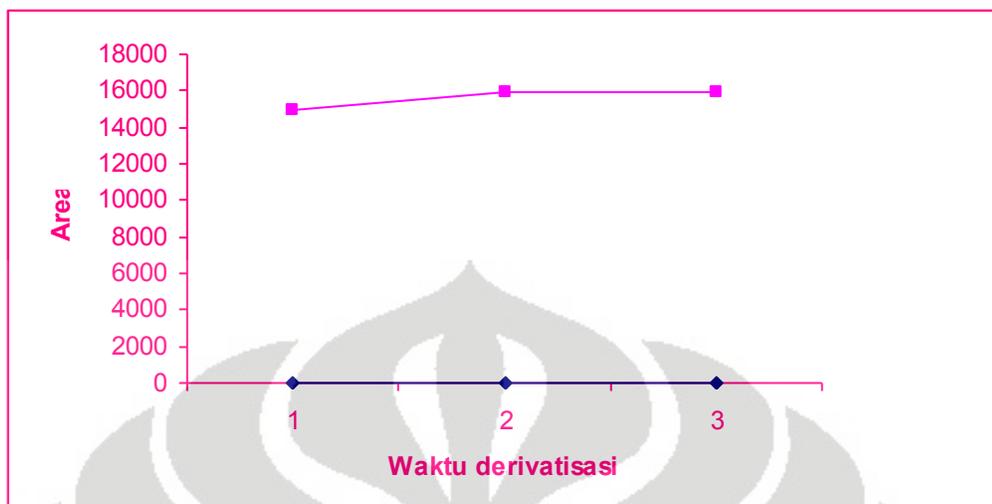
Gambar 29. Kromatogram larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 1,2 mL/menit; panjang gelombang 254 nm dan volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$



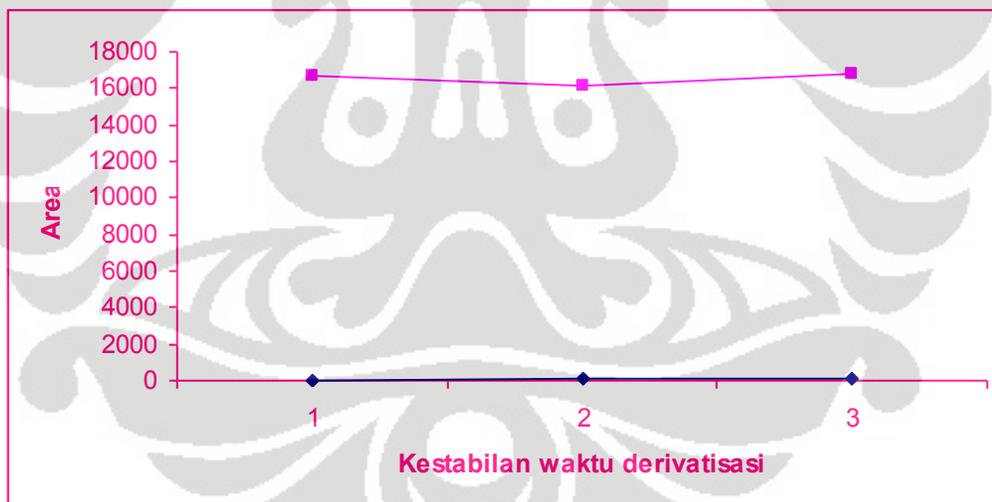
Gambar 30. Kurva hubungan antara pH derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8  $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20  $\mu\text{L}$ .



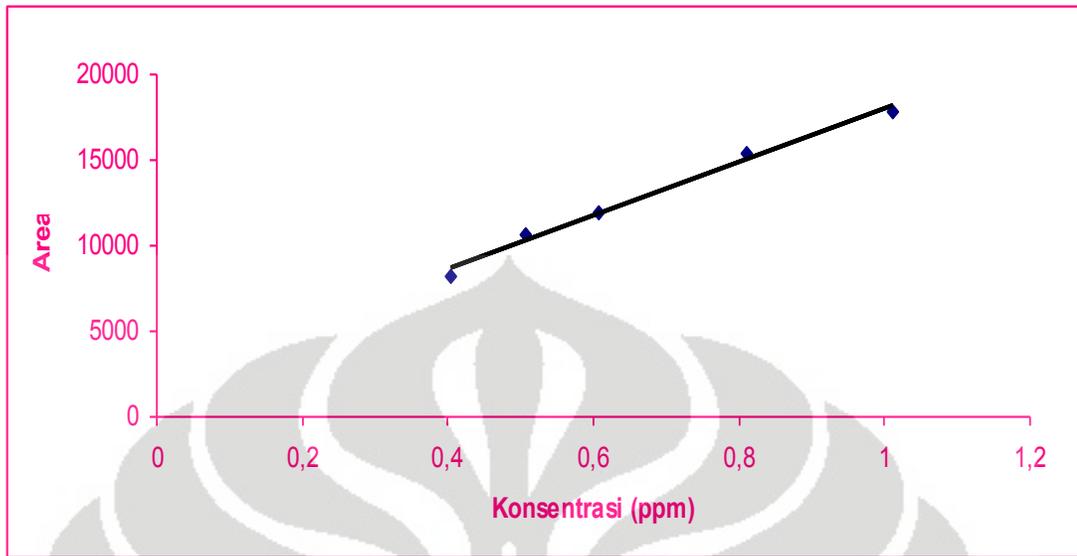
Gambar 31. Kurva hubungan antara jumlah penderivat terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8  $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20  $\mu\text{L}$ .



Gambar 32. Kurva hubungan antara jumlah waktu derivatisasi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkpto benzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8  $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20  $\mu\text{L}$ .



Gambar 33. Kurva hubungan antara jumlah waktu selesai reaksi terhadap area senyawa derivat yang terbentuk, larutan akrilamida 1  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkpto benzoat, fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% : 70%); kecepatan alir 0,8  $\mu\text{L}/\text{menit}$ ; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntian 20  $\mu\text{L}$ .



Gambar 34. Kurva kalibrasi akrilamida yang telah diderivatisasi dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntikan 20  $\mu$ L.

$$y = 15685x + 2312,3$$

$$r = 0,99423$$



Gambar 35. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Tabel 1

Data hasil penentuan pengaruh ph derivatisasi terhadap senyawa derivat yang terbentuk

pH	Waktu Retensi (menit)	HETP	Faktor Ikutan	Area
8	4,775	0,0100	1,17	10.073
9	4,749	0,0293	1,5	12.896
10	4,753	0,0324	1,4	16.517

Kondisi analisis : Akrilamida konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat 15.400  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% :70%); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .

Tabel 2

Data hasil penentuan jumlah asam 2-merkaptobenzoat terhadap senyawa derivat yang terbentuk

Jumlah Penderivat ( $\mu\text{L}$ )	Waktu Retensi (menit)	HETP	Faktor Ikutan	Area
50	4,794	0,0365	1,75	13.544
75	4,804	0,0487	1,33	14.647
100	4,734	0,0434	1,17	14.955
125	4,808	0,0557	1,33	15.800

Kondisi analisis : Akrilamida konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat 15.400  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% :70%); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .

Tabel 3

Data hasil penentuan pengaruh waktu derivatisasi terhadap hasil derivat yang terbentuk

Waktu (menit)	Waktu Retensi (menit)	HETP	Faktor Ikutan	Area
2	4,734	0,0434	1,33	14.955
3	4,760	0,0221	0,80	15.954
4	4,812	0,0204	0,87	15.976

Kondisi analisis : Akrilamida konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat 15.400  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak asetronitril-asam asetat 0,1% (30% :70%); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .

Tabel 4

Data hasil penentuan pengaruh kestabilan terhadap senyawa derivat

Waktu (menit)	Waktu Retensi (menit)	HETP	Faktor Ikutan	Area
30	4,754	0,0318	1,12	16.745
60	4,756	0,0142	0,75	16.196
90	4,754	0,0374	0,80	16.770

Kondisi analisis : Akrilamida konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat 15.400  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak

asetonitril-asam asetat 0,1% (30% :70%); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntikan 20  $\mu$ L.

Tabel 5

Hubungan waktu retensi, nilai N, HETP dan faktor ikutan terhadap larutan akrilamida konsentrasi 1  $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi Fase Gerak	Waktu Retensi (menit)	N	HETP	Faktor Ikutan
Asetonitril-asam asetat 0,1% (20% : 80%, v/v)	10,898	686,44	0,0364	1,75
Asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v)	6,034	576,00	0,0434	0,62
Asetonitril-asam asetat 0,1% (25% : 75%, v/v)	4,669	291,62	0,0303	1,161

Tabel 6

Hubungan waktu retensi, nilai N, HETP dan faktor ikutan terhadap larutan akrilamida konsentrasi 1  $\mu$ g/mL yang telah diderivatisasi terhadap perubahan kecepatan alir

Kecepatan Alir (mL/menit)	Waktu Retensi	N	HETP	Faktor Ikutan
---------------------------	---------------	---	------	---------------

0,5	9,427	455,11	0,0549	1,50
0,8	5,841	393,86	0,0193	1,75
1,0	4,764	476,33	0,0525	1,50
1,2	4,760	344,89	0,0725	1,75

Tabel 7  
Data uji kesesuaian sistem

Waktu Retensi	Area	N	HETP	Faktor Ikutan
5,722	17.245	806,56	0,0310	1,33
5,698	17.436	400,00	0,0625	1,50
5,729	17.813	336,11	0,0744	1,00
5,726	17.213	334,37	0,0748	1,00
5,755	17.735	400,00	0,0625	0,75

Kondisi analisis : Akrilamida konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$  diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat 15.400  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 125  $\mu\text{L}$  dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 0,1% (30% :70%); kecepatan alir 0,8 mL/menit; panjang gelombang 254 nm; volume penyuntikan 20  $\mu\text{L}$ .

Tabel 8

Data kurva kalibrasi akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat

Konsentrasi Akrilamida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area
--	------

1,0120	17.813
0,8096	15.434
0,6072	11.943
0,5060	10.581
0,4048	8.173

Persamaan garis regresi:  
 $y = 15685x + 2312,3$   
 $r = 0,99423$

Tabel 9

Batas deteksi, batas kuantitasi dan koefisien variasi dari fungsi akrilamida

Konsentrasi Akrilamida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area ( Y )	Area ( $\hat{Y}$ )	( Y - $\hat{Y}$ ) <sup>2</sup>
1,0120	17.813	18.640,97	13.8771,15
0,8096	15.434	14.955,06	17.9033,92
0,6072	11.943	11.269,16	11.399,41
0,5060	10.581	10.248,91	110.283,77
0,4048	8.173	7.583,25	238.718,23
$\bar{x} = 0,66792$			$\Sigma = 678206,4774$

**S (Y/X)** = 475,467

**b** = 15685

**Batas deteksi ( LOD)** = 0,09094  $\mu\text{g/mL}$

**Batas kuantitasi (LOQ)** = 0,30313  $\mu\text{g/mL}$

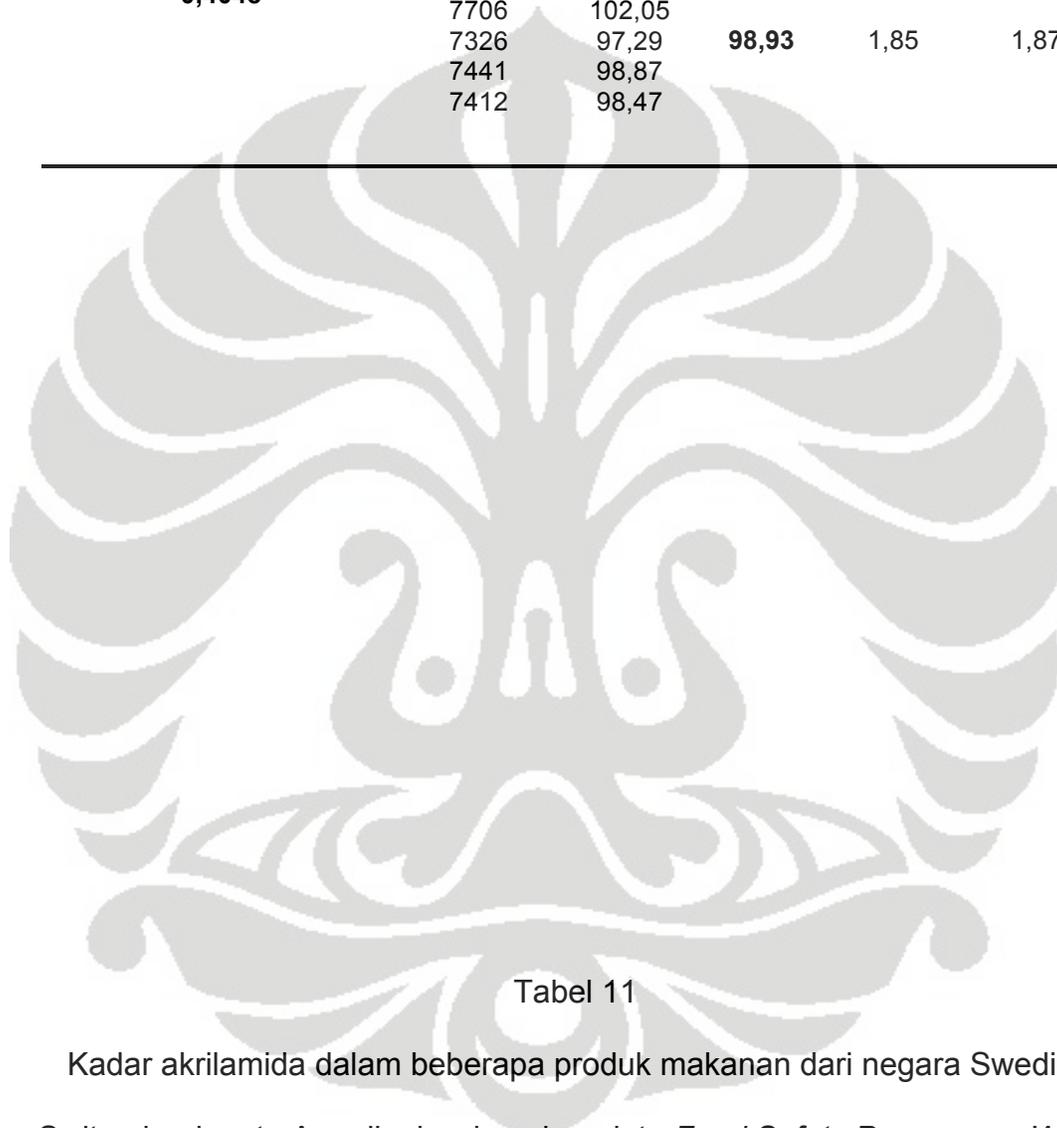
Koefisien variasi dari fungsi (Vxo) % = 4,98%

Konsentrasi Akrilamida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area (Y)	Upk (%)	Rataan (%)	SD (%)	KV (%)
--	-------------	------------	---------------	-----------	-----------

Tabel 10

Data uji perolehan kembali dan presisi larutan akrilamida yang telah diderivatisasi dengan asam 2-merkaptobenzoat

<b>1,0120</b>	17436	94,48	<b>94,77</b>	<b>1,52</b>	<b>1,59</b>
	17213	93,25			
	17735	96,12			
	17245	93,43			
	17813	96,55			
<b>0,4048</b>	7375	97,96	<b>98,93</b>	<b>1,85</b>	<b>1,87</b>
	7706	102,05			
	7326	97,29			
	7441	98,87			
	7412	98,47			



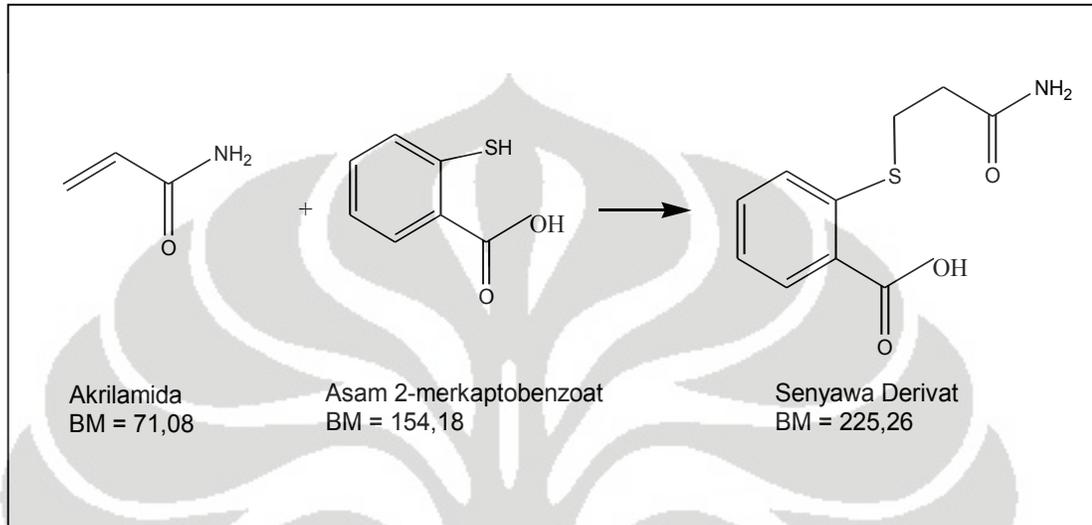
Tabel 11

Kadar akrilamida dalam beberapa produk makanan dari negara Swedia, Switzerland serta Amerika berdasarkan data *Food Safety Programme World Health Organization 2002*

Produk Makanan	Level Akrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	Rata-rata	Nilai Tengah	Minimum- maksimum	Jumlah sampel
Keripik kentang	1312	1343	170-2287	38
Produk roti	112	<50	<50-450	19
<i>Cracker</i>	423	142	<30-3200	58
Sereal	298	150	<30-1346	29
Keripik jagung	218	167	34-416	7
Bubuk coklat	75	75	<50-100	2
Bubuk kopi	200	200	170-230	3

## Lampiran 1

### Cara Perhitungan Jumlah Asam 2-Merkaptobenzoat



Akrlamida + asam 2-merkaptobenzoat  $\longrightarrow$  senyawa derivat

1 mmol Akrlamida = 1 mmol asam 2-merkaptobenzoat

Akrlamida =  $\frac{\text{Berat}}{71,08 \text{ g/mol}}$

Berat asam 2-merkaptobenzoat = 21,6910 mg

Akrlamida 100 ppm =  $\frac{21,6910 \text{ mg}}{15,4 \text{ mg/mL}}$

= 1,4085 mL

Akrlamida 1 ppm =  $\frac{1,4085 \text{ mg}}{100 \text{ mg/mL}}$

= 0,0141 mL

## Lampiran 2

### Cara memperoleh persamaan garis linier

Persamaan garis:  $y = a + bx$

$a$  dan  $b$  adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus:

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

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

Derajat kelinieran ( $r$ ) dihitung dengan rumus:

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

### Lampiran 3

#### Batas deteksi dan batas kuantitasi

Rumus:

a. Batas deteksi (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{3 (S_{y/x})}{b}$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{10 (S_{y/x})}{b}$$

Keterangan:

b = Arah garis linier dari kurva kalibrasi;  $y = a + bx$

$S_{y/x}$  = Simpangan baku residual

Rumus:

$$S_{y/x} = \left( \frac{\sum (\hat{Y} - Y_i)^2}{n - 2} \right)^{1/2}$$

### Lampiran 3

#### Perhitungan uji perolehan kembali dan presisi

$$\text{Rata-rata hitung } (\bar{X}): X = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$\text{Simpangan baku (SD): SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Koefisien variasi (RSD atau KV): KV (\%)} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar hasil analisis}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100\%$$

## Lampiran 5

### Sertifikat analisis akrilamida, *reagent grade for synthesis*, Merck



#### Specification

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 22.06.2005

8.00830.0500 Acrylamide for synthesis

	Spec. Values
Assay (GC, area%)	≥ 99 %
Melting range	≥ 83 °C
lower value	≤ 85 °C
upper value	
Identity (IR)	passes test

Dr. Wolfgang Bolkart

responsible laboratory manager quality control

*This document has been produced electronically and is valid without a signature*