



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**STUDI OPTIMISASI DAN METODE VALIDASI UNTUK  
PENENTUAN MELAMIN DAN ASAM SIANURAT DALAM SAMPEL  
SUSU FORMULA DENGAN HPLC**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**BIMMO DWI BASKORO**

**0806452785**

**DEPARTEMEN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS INDONESIA**

**DEPOK**

**JANUARI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Bimmo Dwi Baskoro

NPM : 0806452785

Tanda Tangan : 

Tanggal : 5 Januari 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Bimmo Dwi Baskoro  
NPM : 0806452785  
Program Studi : S-1 Reguler Kimia  
Judul Skripsi : Studi Optimisasi dan Metode Validasi untuk Penentuan  
Melamin dan Asam Sianurat dalam Sampel Susu  
Formula dengan HPLC

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Drs. Sunardi, M.Si. (.....)  
Pembimbing II : AKBP Drs. Masdianto, M.Si. (.....)  
Penguji : Dr. Yoki Yulizar, M.Sc. (.....)  
Penguji : Asep Saefumillah, M.Si., Ph.D. (.....)  
Penguji : Dra. Susilowati Hadi, M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 5 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkah dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit bagi penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis secara khusus mengucapkan terima kasih kepada:

1. Brigjen Pol. Drs. Andayono, selaku kepala Pusat Laboratorium Forensik Mabes Polri;
2. Kombes Pol. Ir. Muchibin Abdul Kadir, selaku kepala unit Kimia Biologi Forensik Puslabfor Mabes Polri;
3. Drs. Sunardi, M.Si., selaku Pembimbing I yang telah membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis selama penelitian;
4. AKBP Drs. Masdianto, M.Si., selaku Pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan pengarahan kepada penulis selama penelitian;
5. AKP Eva Dewi, S.Si., selaku Pembimbing Kuliah Lapangan yang telah memperbolehkan penulis untuk melakukan penelitian di Puslabfor;
6. Para analis dan laboran Laboratorium Kimia Forensik Puslabfor Mabes Polri: Mba Hafid, Mba Aryani, Pak Jon, Pak Sandy, dan Mas Taslim;
7. Bapak Dr. Ridla Bakri, M.Phil., selaku Ketua Departemen Kimia FMIPA UI;
8. Ibu Dr.rer.nat. Widajanti Wibowo, selaku pembimbing akademik yang telah banyak memberikan nasehat selama penulis menempuh pendidikan;
9. Kepada orang tua dan kakak-kakak yang telah banyak memberikan dorongan moril maupun materiil serta doa yang tiada henti untuk keberhasilan penulis;

10. Ahmad Zakaria, S.Pd., M.Si., selaku *extraordinary advisor* yang telah memberikan dorongan moril maupun materiil serta doa untuk keberhasilan penulis;
11. Aisyah Niken Pramiswari, S.Kom., terima kasih karena dirimu telah memotivasi diriku agar menyelesaikan skripsi. Ada cerita cinta, ada puisi cinta, ada lagu, semuanya adalah kata. Walaupun tidak semua kata mampu mewakili gelombang makna-makna cinta, tapi badai itu harus diberi kanal; biar dia mengalir sampai jauh. Cinta membuat makna-makna itu jadi jauh lebih nyata dalam rekaman jiwa kita. *Thanks for the power of your love.*
12. Seluruh teman-teman Kimia Universitas Indonesia (UI) 2008;
13. Seluruh teman-teman Kimia Universitas Brawijaya (UB) 2007;
14. Seluruh teman-teman Teknik Informatika Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) 2007;
15. Seluruh staf pengajar, karyawan, dan laboran Departemen Kimia UI;
16. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kimia.

**Penulis**

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Bimmo Dwi Baskoro  
NPM : 0806452785  
Program Studi : S-1 Reguler  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif (*Non-Exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Studi Optimisasi dan Metode Validasi untuk Penentuan Melamin dan Asam Sianurat dalam Sampel Susu Formula dengan HPLC**

Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 5 Januari 2012

Yang menyatakan,



(Bimmo Dwi Baskoro)

## ABSTRAK

Nama : Bimmo Dwi Baskoro

Program Studi : Kimia

Judul : Studi Optimisasi dan Metode Validasi untuk Penentuan Melamin dan Asam Sianurat dalam Sampel Susu Formula dengan HPLC

Metode sensitif dan tervalidasi untuk penentuan melamin dan asam sianurat dalam susu formula dikembangkan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi-deteksi *diode array* (HPLC-PDA) dengan ekstraksi fasa-padat (*solid-phase extractor*). Kondisi ekstraksi, SPE, dan KCKT diteliti dan dioptimisasi. Linearitas dalam konsentrasi 0,25-5,00 µg/mL memiliki koefisien korelasi 0,9951 untuk asam sianurat standar dan 0,9987 untuk melamin standar. Pada kondisi optimal, batas deteksi (*limit of detection/LOD*) dan batas kuantifikasi (*limit of quantification/LOQ*) untuk asam sianurat adalah 0,668 ppm dan 2,227 ppm; dan untuk melamin adalah 0,280 ppm dan 0,934 ppm. Temu balik melamin pada sampel susu yang ditambahkan dengan 24,7-100,2 mg/L diketahui sebesar 96,73-99,46% dengan SBR ( $n = 3$ ) 6,458-8,745%. Suatu optimisasi dan metode validasi untuk penentuan melamin dan asam sianurat dalam sampel susu formula didapatkan dan telah diterapkan dengan baik.

Kata Kunci : melamin, HPLC, susu formula, SPE, metode validasi

xiv + 74 halaman : 22 gambar, 13 tabel

Daftar Pustaka : 1996-2008

## ABSTRACT

Name : Bimmo Dwi Baskoro

Study Program: Chemistry

Title : An Optimization Study and Validation Method for Determination  
of Melamine and Cyanuric Acid in Formula Milk Sample using  
HPLC

A sensitive and validated method for the determination of melamine and cyanuric acid in formula milk is developed using high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) with solid-phase extraction (SPE). The conditions of the extraction, SPE, and HPLC were investigated and optimized. The linearity of satisfactory in the range of 0,25-5,00  $\mu\text{g/mL}$  with a correlation coefficient of 0,9951 for cyanuric acid standard and 0,9987 for melamine. Under the optimal condition, the method limit of detection (LOD) and method limit of quantification (LOQ) for cyanuric acid were 0,668 ppm and 2,227 ppm; and for melamine were 0,280 ppm and 0,934 ppm, respectively. The recovery of melamine for milk samples spiked with 24,7-100,2 mg/L was in the range of 96,73-99,46% with the RSDs ( $n = 3$ ) of 6,458-8,745%. An optimization and validation method for determination of melamine and cyanuric acid in formula milk samples was achieved and has been applied successfully.

Keyword(s) : melamine, HPLC, formula milk, SPE, validated method

xiv + 74 pages : 22 pictures, 13 table

References : 1996-2008



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR ISTILAH.....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Hipotesis Penelitian.....	5
1.4 Ruang Lingkup Penelitian.....	5
1.5 Tujuan Penelitian.....	5
1.6 Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>7</b>
2.1 Melamin.....	7
2.2 Kegunaan Melamin.....	9
2.3 Metode Analisis Melamin.....	10
2.3.1 HPLC.....	10
2.3.1.1 Parameter Pemisahan.....	11
2.3.1.3 Fasa Diam.....	14
2.3.1.3 Fasa Gerak.....	16
2.4 Metode Validasi.....	17
2.4.1 Linearitas.....	18
2.4.2 Batas Deteksi.....	19
2.4.3 Batas Kuantifikasi.....	20

	2.4.4 Ketepatan (Akurasi).....	20
	2.4.5 Ketelitian (Presisi).....	21
<b>BAB 3</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>23</b>
3.1	Alat dan Bahan.....	23
3.2	Cara Kerja.....	24
	3.2.1 Metode Validasi Penentuan Asam Sianurat dan Melamin....	24
	3.2.1.1 Contoh Uji.....	24
	3.2.1.2 Kondisi HPLC.....	24
	3.2.1.3 Preparasi Larutan Baku Melamin dan Asam Sianurat	25
	3.2.1.4 Penentuan Linearitas.....	26
	3.2.1.5 Penentuan LOD dan LOQ.....	27
	3.2.1.6 Penentuan Ketelitian (Presisi).....	27
	3.2.1.7 Penentuan Ketepatan (Akurasi).....	28
	3.2.2 Identifikasi Contoh Uji.....	28
	3.2.2.1 Preparasi Contoh Uji.....	28
	3.2.2.2 Preparasi SPE.....	29
<b>BAB 4</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>31</b>
4.1	Uji Pendahuluan Analisis Melamin dan Asam Sianurat.....	31
4.2	Penentuan Kondisi Optimum Analisis Melamin dan Asam Sianurat.....	33
	4.2.1 Pengaruh Perubahan pH.....	33
	4.2.2 Optimasi Pemisahan.....	36
	4.2.3 Pengaruh Fasa Gerak.....	38
	4.2.4 Pengaruh Kolom.....	39
	4.2.5 Pengaruh Penggunaan <i>Cartridge SPE</i> .....	40
4.3	Validasi Metode Analisis Melamin dan Asam Sianurat.....	41
	4.3.1 Linearitas.....	41
	4.3.2 Ketelitian.....	42
	4.3.3 Ketepatan.....	45
	4.3.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi.....	46
4.4	Analisis Asam Sianurat dan Melamin dalam Sampel dengan HPLC.....	48
<b>BAB 5</b>	<b>PENUTUP.....</b>	<b>50</b>
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran.....	50
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>52</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>55</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b>	Struktur molekul melamin.....	7
<b>Gambar 2.2</b>	Struktur molekul siromazin.....	8
<b>Gambar 2.3</b>	Hidrolisis senyawa melamin.....	8
<b>Gambar 2.4</b>	Sistem degradasi melamin dan analog yang berhubungan.....	8
<b>Gambar 2.5</b>	Skema instrumentasi HPLC.....	11
<b>Gambar 2.6</b>	Struktur kimia dari silika.....	15
<b>Gambar 2.7</b>	Kolom (fasa diam) C-8 Agilent ZORBAX.....	15
<b>Gambar 2.8</b>	Derajat kepolaran dari kolom dan pelarutnya.....	16
<b>Gambar 3.1</b>	Contoh uji bahan dasar dari susu formula.....	26
<b>Gambar 3.2</b>	<i>Agilent SampliQ SCX SPE cartridges</i> .....	29
<b>Gambar 3.3</b>	Ilustrasi proses ekstraksi fasa padat (SPE).....	30
<b>Gambar 4.1</b>	Kromatogram larutan baku melamin 0,25 mg/L.....	32
<b>Gambar 4.2</b>	Kromatogram larutan baku asam sianurat 0,25 mg/L.....	32
<b>Gambar 4.3</b>	Pemisahan asam sianurat dan melamin pada pH 3 dan variasi konsentrasi serta fasa gerak $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....	34
<b>Gambar 4.4</b>	Pemisahan asam sianurat dan melamin pada pH 5 dengan variasi konsentrasi serta fasa gerak $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....	35
<b>Gambar 4.5</b>	Pemisahan asam sianurat dan melamin pada pH 6,5 dengan variasi konsentrasi serta fasa gerak $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....	36
<b>Gambar 4.6</b>	Hubungan faktor retensi terhadap pH (untuk asam sianurat).....	37
<b>Gambar 4.7</b>	Hubungan faktor retensi terhadap pH (untuk melamin).....	37
<b>Gambar 4.8</b>	Hubungan resolusi terhadap pH variasi konsentrasi fasa gerak.....	38
<b>Gambar 4.9</b>	Perbandingan kromatogram antara contoh uji dengan SPE dan tanpa-SPE.....	40
<b>Gambar 4.10</b>	Kurva baku standar melamin.....	44
<b>Gambar 4.11</b>	Kurva baku standar asam sianurat.....	44

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b>	Gugus fungsional yang terikat secara kimiawi pada silika yang telah dimodifikasi.....	15
<b>Tabel 2.2</b>	Modifikasi silika pada kolom dan aplikasinya.....	16
<b>Tabel 4.1</b>	Kondisi HPLC untuk uji pendahuluan.....	31
<b>Tabel 4.2</b>	Data analisis pemisahan pada kolom C8 dengan fasa gerak NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,005 M dan pH 6,5.....	37
<b>Tabel 4.3</b>	Parameter statistika kurva standar rerata ( $n = 4$ ) asam sianurat dan melamin.....	42
<b>Tabel 4.4</b>	Hubungan antara konsentrasi melamin dengan luas area.....	43
<b>Tabel 4.5</b>	Hubungan antara konsentrasi asam sianurat dengan luas area.....	43
<b>Tabel 4.6</b>	<i>Repeatability</i> melamin pada batasan 0,25-1,00 ppm.....	44
<b>Tabel 4.7</b>	<i>Repeatability</i> asam sianurat pada batasan 0,25-1,00 ppm.....	45
<b>Tabel 4.8</b>	Temu balik rerata metode HPLC untuk asam sianurat.....	46
<b>Tabel 4.9</b>	Temu balik rerata metode HPLC untuk melamin.....	46
<b>Tabel 4.10</b>	Kadar asam sianurat (AC) dan melamin (MM) sampel.....	48
<b>Tabel 4.11</b>	Temu balik ( <i>recovery</i> ) <i>spike</i> asam sianurat dan melamin pada sampel.....	49

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b>	Rangkaian instrumentasi HPLC.....	56
<b>Lampiran 2</b>	Syringe 100 $\mu$ L.....	56
<b>Lampiran 3</b>	Alat sonifikator.....	56
<b>Lampiran 4</b>	Pembuatan Bufer pH 2,2-7,4.....	57
<b>Lampiran 5</b>	Kromatogram larutan baku melamin 0,25 mg/L.....	58
<b>Lampiran 6</b>	Kromatogram larutan baku asam sianurat 0,25 mg/L.....	58
<b>Lampiran 7</b>	Kromatogram tanpa penambahan melamin dan asam sianurat.....	59
<b>Lampiran 8</b>	Pemilihan kondisi optimum analisis melamin dan asam sianurat.....	59
<b>Lampiran 9</b>	Perhitungan persamaan regresi dari kurva kalibrasi melamin.....	60
<b>Lampiran 10</b>	Perhitungan persamaan regresi dari kurva kalibrasi asam sianurat.....	61
<b>Lampiran 11</b>	Penentuan persen temu balik melamin.....	62
<b>Lampiran 12</b>	Perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) asam sianurat.....	63
<b>Lampiran 13</b>	Perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) melamin.....	64
<b>Lampiran 14</b>	Simpangan baku regresi dan <i>slope</i> untuk standar melamin.....	65
<b>Lampiran 15</b>	Simpangan baku regresi dan <i>slope</i> untuk standar asam sianurat.....	65
<b>Lampiran 16</b>	Hubungan waktu retensi terhadap konsentrasi asam sianurat.....	66
<b>Lampiran 17</b>	Hubungan waktu retensi terhadap konsentrasi melamin.....	66
<b>Lampiran 18</b>	Deteksi asam sianurat dan melamin pada susu bubuk A.....	67
<b>Lampiran 19</b>	Deteksi asam sianurat dan melamin pada <i>spike</i> susu bubuk A.....	68
<b>Lampiran 20</b>	Deteksi asam sianurat dan melamin pada susu bubuk B.....	69
<b>Lampiran 21</b>	Deteksi asam sianurat dan melamin pada <i>spike</i> susu bubuk B.....	70
<b>Lampiran 22</b>	Deteksi asam sianurat dan melamin pada susu bubuk C.....	71
<b>Lampiran 23</b>	Deteksi asam sianurat dan melamin pada <i>spike</i> susu bubuk C.....	72
<b>Lampiran 24</b>	Kromatogram standar melamin 0,25 mg/L dengan 3 perulangan.....	73
<b>Lampiran 25</b>	Kromatogram standar melamin 0,50 mg/L dengan 3 perulangan.....	73
<b>Lampiran 26</b>	Kromatogram standar melamin 1,00 mg/L dengan 3 perulangan.....	74

## DAFTAR ISTILAH

No.	Istilah	Penjelasan
1.	Degradasi	Terurainya suatu senyawa melalui beberapa tahap reaksi
2.	Hidrolisis	Reaksi yang terjadi antara suatu senyawa kimia dengan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan; biasanya air merupakan pelarut dimana reaksi tersebut berlangsung.
3.	HPLC-DAD	<i>High-Performance Liquid Chromatography Detector Array Diode</i> (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Detektor Dioda Array)
4.	Kadar	Banyaknya zat yang terdapat di dalam sejumlah total campurannya.
5.	LOD	<i>Limit of Detection</i> (Batas Deteksi)
6.	LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Batas Kuantifikasi)
7.	Mr	Penjumlahan aljabar dari massa atom relatif ( $A_r$ ) dari atom-atom yang menyusun molekul itu.
8.	pH	Ukuran keasaman atau kebasaan suatu larutan.
9.	ppm	Satuan konsentrasi atau kadar yang menunjukkan bahwa 1 bpj (bagian per juta) sama dengan 1 bagian zat yang bersangkutan di dalam 1 juta bagian campurannya. Contoh: Fe 2 ppm dalam air minum berarti setiap 1 liter air minum mengandung 2 mg Fe.
10.	<i>Repeatability</i>	Keterulangan
11.	SPE	<i>Solid-Phase Extractor</i> (Ekstraksi Fasa Padat)

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dalam industri makanan dan minuman salah satu senyawa yang memiliki peranan penting adalah protein. Protein merupakan sumber pertumbuhan dan perkembangan bagi sel-sel mikroorganisme suatu makhluk hidup. Pemenuhan sumber protein yang cukup akan berefek kepada pertumbuhan balita yang baik. Komposisi protein yang tinggi dalam produk susu bubuk menjadi perhatian yang penting dalam industri makanan.

Sumber protein yang tersedia pada umumnya berasal dari protein hewani ataupun nabati. Pengadaan kedua sumber protein ini masih sangat mahal biayanya dikarenakan faktor ketersediaan bahan yang terbatas dan biaya proses yang mahal sehingga sulit untuk mendapatkan nilai jual produk yang kompetitif dengan kandungan protein yang tinggi (Mangisi, 2009).

Pada awal tahun 2008, dunia dihebohkan oleh kasus cemaran bahan kimia melamin pada produk-produk makanan berprotein (khususnya susu dan produk-produk susu) yang diproduksi oleh Cina. Kasus ini cukup mengkhawatirkan mengingat melamin meskipun sifat racun-nya rendah ( $LD_{50}$  terhadap tikus/melalui saluran cerna = 3.161 mg/kg berat badan) dan tidak dapat dimetabolisme oleh tubuh, serta secara cepat diekskresikan melalui urin (waktu paruh di dalam plasma sekitar 3 jam), tetapi data penelitian menunjukkan bahwa senyawa kimia tersebut dapat menimbulkan gangguan fatal pada organ ginjal. Tingginya kasus kegagalan ginjal pada bayi yang mengkonsumsi susu yang mengandung melamine di Cina akhir-akhir ini dianggap merupakan salah satu fakta dampak negatif keberadaan melamin di dalam makanan (WHO/FAO, 2008).

Melamin merupakan senyawa organik polar dengan rangka 1,3,5-triazin. Pada umumnya digunakan sebagai aditif anti api dan sering dikombinasikan dengan formaldehid dalam proses *molding* plastik. Pada akhir-akhir ini, makanan hewan dan produk berbahan baku susu disinyalir terkontaminasi oleh

melamin (2,4,6-triamino-1,3,5-triazin) yang merupakan bahaya bagi keamanan pangan. Kontaminasi melamin dilaporkan telah terdapat dalam beberapa produk seperti susu, makanan hewan, biskuit, permen, dan minuman kopi (WHO/FAO, 2008). Keberadaan senyawa ini dijumpai sebagai aditif nitrogen non-protein (NPN) untuk pakan ternak, akan tetapi penggunaannya berlanjut. Pemalsuan produk makanan dengan melamin yang memiliki kandungan nitrogen tinggi (67%) menyebabkan kandungan protein terlihat tinggi jika diukur dengan uji analisis protein seperti Kjeldahl atau Dumas (Jonathan et al., 2008; Sherri, 2008).

Dalam rangka mengantisipasi dampak negatif cemaran melamin pada bahan makanan, semua negara berupaya memperketat regulasi dan pengujian produk-produk makanan berprotein, khususnya yang berasal dari Cina. Pengetatan pengujian dimaksud tentu saja tidak lepas dari upaya peningkatan kepekaan pengujian melalui pengembangan prosedur dan metode pengujian. Selama ini, parameter uji melamin tidak termasuk salah satu parameter yang dipersyaratkan dalam uji produk-produk makanan. Sehubungan dengan hal itu, berbagai lembaga ilmiah dan penelitian, khususnya yang mempunyai kewenangan dalam pengujian dan pengawasan produk-produk makanan dan kesehatan berupaya mengembangkan metode analisis melamin untuk berbagai jenis makanan, khususnya susu serta produk-produk makanan yang mengandung susu. Sebagai contoh:

- *Food and Drugs Administration* (FDA) mengembangkan metode yang didasarkan pada peralatan LC-MS-MS (*FDA Laboratory Information Bulletin*, LIB No.4422, October 2008) dan GC-MS (*FDA Laboratory Information Bulletin*, LIB No.4423).
- Perusahaan instrumen analisis kimia merek “Agilent” mengembangkan metode analisis (*application note for food safety and health*) dengan HPLC sebagai alat utama untuk penentuan kandungan melamin dalam susu bubuk dan telur dengan menggunakan peralatan HPLC.

Berbagai teknik analisis dapat digunakan untuk penentuan melamin dalam makanan hewan dan produk makanan lainnya. Sebelumnya, melamin



dalam makanan hewan ditentukan oleh Kim et al. (2008) menggunakan *enzyme immunoassay*, *high-performance liquid chromatography* (HPLC), dan *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (UPLC-MS/MS). Analisis melamin dan senyawa yang berhubungan dalam makanan pokok sangat penting untuk keamanan kesehatan. HPLC lebih mudah digunakan dibandingkan GC karena tidak perlu proses derivatisasi terlebih dahulu (Sun et al., 2009). Muniz-Valencia et al. (2008) mengembangkan metode HPLC sederhana untuk penentuan melamin dan produk hidrolisisnya dalam konsentrat tepung beras dengan batas kepercayaan (*decision limit*) sebesar 65 µg/g dan kemampuan deteksinya 75 µg/g untuk melamin. Metode untuk penentuan residu melamin dalam bubuk protein yang berasal dari tanaman dikembangkan oleh Ding et al. (2008) menggunakan HPLC-*diode array detection* (HPLC-DAD) untuk *screening* awal sampel untuk melamin dengan LOQ (*limit of quantification*) atau batas deteksi sebesar 10 mg/kg dan HPLC-MS/MS digunakan dalam konfirmasi melamin dengan LOQ 0,5 mg/kg. Feng et al. (2008) menggunakan metode LC-MS/MS untuk penentuan melamin dan residu *cyromazine* dalam susu dan produk makanan pokok dengan LOD sebesar 10 µg/kg. *Solid-phase extraction* (SPE) dengan kolom OASIS MCX digunakan untuk *clean-up* makanan hewan sebelum diinjeksikan ke HPLC (Wang et al., 2008). Mangisi (2009) menggunakan *solid-phase extraction* (SPE) dengan kolom C-18 untuk *clean-up* pakan hewan sebelum diinjeksikan ke HPLC.

Metode yang banyak digunakan saat ini adalah dengan instrumen GC-MS atau LC-MS dengan biaya analisis atau operasional yang relatif lebih mahal. Instrumen HPLC dapat digunakan sebagai instrumen alternatif di dalam mengidentifikasi kontaminasi melamin. Untuk mendapatkan pengakuan dan kepercayaan yang tinggi terhadap metode ini perlu dilakukan studi optimasi dan validasi dari metode instrumen ini. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan sebagai bagian dari pemecahan terhadap permasalahan tersebut.

## 1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang menjadi dasar penelitian ini adalah penambahan melamin secara sengaja yang tujuannya untuk meningkatkan kadar protein demi keuntungan secara komersial. Penambahan sejumlah tertentu melamin diyakini dapat berefek signifikan terhadap perubahan kandungan total protein. Selain mudah diperoleh, melamin memiliki harga yang relatif lebih murah dibandingkan bahan protein lain yang berasal dari hewani atau nabati. Adapun penyebabnya adalah biaya proses pengadaan melamin yang jauh lebih ekonomis.

Adanya pengotor dari asam sianurat sebagai bentuk lain dari melamin ada akibat proses degradasi melamin yang juga secara alami bertransformasi dari melamin ataupun secara sengaja ditambahkan ke dalam suatu matriks. Reaksi antara melamin dan asam sianurat dapat menghasilkan suatu senyawa baru yang toksik berbentuk kristal yang dapat menimbulkan gangguan serius pada saluran ginjal di dalam metabolisme makhluk hidup. Penambahan melamin dalam suatu susu formula biasanya akan efektif dalam jumlah persen atau *part per million* (ppm) sehingga dalam pengukurannya cukup dilakukan dengan instrumentasi yang memiliki ketelitian minimal pada tingkatan ppm dan tidak perlu sampai tingkat *part per billion* (ppb).

Minimnya pengawasan dan pengontrolan terhadap kontaminasi melamin dikarenakan keterbatasan metode (instrumentasi) yang tepat guna di dalam mengidentifikasi melamin. Metode yang banyak tersedia saat ini dengan menggunakan instrumen GC-MS atau LC-MS. Ketersediaan alat ini masih jarang, begitu juga dengan kemampuan sumber daya manusianya yang masih sangat terbatas dalam pengoperasian instrumen ini dikarenakan sistemnya yang cukup kompleks.

Instrumen HPLC dapat digunakan sebagai alternatif terhadap identifikasi kontaminasi asam sianurat ataupun melamin dikarenakan ketelitiannya mencapai tingkat ppm. HPLC relatif lebih banyak tersedia di banyak laboratorium dan sistemnya pun sudah jauh lebih dikenal dibandingkan instrumen GC-MS atau LC-MS sehingga relatif lebih mudah dalam penyediaan sumber daya manusianya. Biaya operasional dan analisisnya pun jauh lebih

ekonomis dibandingkan dengan GC-MS ataupun LC-MS. Oleh karena itu, studi optimasi dan validasi dari metode identifikasi dengan HPLC ini perlu dilakukan sebagai bukti keakuratan dan ketelitian dari instrumen ini.

### **1.3 Hipotesis Penelitian**

Metode pengukuran dengan HPLC mampu mengidentifikasi melamin dengan akurat dan teliti di dalam contoh uji dari matriks contoh uji berupa susu bubuk. Studi optimasi dengan memvariasikan pH, konsentrasi fasa gerak, dan penggunaan ekstraksi fasa padat pada pengukuran dengan HPLC mampu membedakan dan menghasilkan pemisahan yang baik antara melamin dan asam sianurat.

### **1.4 Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini hanya dilakukan pada 3 (tiga) sampel susu formula yang sumbernya berasal dari pasaran yang siap dijual dan dikonsumsi di dalam pasar industri.

### **1.5 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk mengoptimasi dan memvalidasi metode uji sehingga metode ini dapat diandalkan. Metode uji dioptimasi dengan memperhatikan parameter-parameter kromatografi sebagai acuan di dalam menentukan suatu pemisahan apakah sudah berlangsung secara optimum atau belum. Optimasi bermaksud untuk mendapatkan pemisahan yang baik antara asam sianurat dan melamin yang cukup nyata sehingga kedua senyawa ini kontaminasinya dapat terdeteksi secara akurat dan teliti. Cara yang digunakan diantaranya dilakukan dengan membuat variasi fasa gerak (baik pH ataupun konsentrasinya) lalu dilihat pengaruhnya terhadap pemisahan kedua senyawa tersebut.

Metode uji divalidasi untuk meyakinkan dan membuktikan bahwa analisa berlangsung dengan akurat dan teliti. Data-data yang dihasilkan secara statistik mewakili parameter validasi yang ada, diantaranya tingkat akurasi, presisi, batas deteksi, dan batas kuantifikasi. Data-data inilah yang nantinya

akan digunakan sebagai data pendukung dalam memutuskan apakah metode dengan HPLC ini dapat diandalkan atau tidak di dalam pengidentifikasiannya terhadap kontaminasi asam sianurat dan melamin.

### **1.6 Manfaat Penelitian**

Berdasarkan hasil penelitian ini, diharapkan metode ini mampu mengidentifikasi melamin dengan baik dan akurat. Suatu metode dikatakan akurat apabila menghasilkan suatu data-data yang secara statistik dapat dipertanggungjawabkan dengan batasan-batasan nilai yang sesuai dengan acuan standar yang berlaku.

Metode ini juga diharapkan dapat menjadi metode referensi alternatif untuk penetapan melamin di dalam susu bubuk, dimana saat ini banyak menggunakan instrumen LC-MS atau LC-MS-MS dalam pengidentifikasian senyawa melamin.

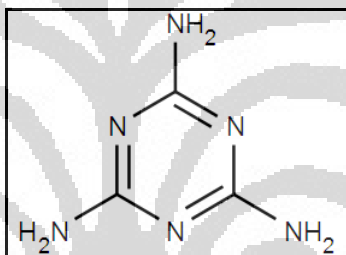
Aplikasi instrumen HPLC sangatlah memungkinkan dalam identifikasi senyawa melamin dan asam sianurat. Hal ini dikarenakan faktor ketersediaan instrumen ini yang cukup banyak pada laboratorium uji yang ada. Pertimbangan nilai ekonomisnya yang meliputi penyediaan sumber daya manusianya ataupun biaya operasional menjadi pertimbangan utama di dalam memanfaatkan instrumen ini dibandingkan dengan instrumen LC-MS ataupun GC-MS.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Melamin

Melamin merupakan suatu senyawa organik dengan rumus kimia  $C_3H_6N_6$  dengan struktur molekul seperti Gambar 2.1. Nama lainnya secara IUPAC adalah 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (CAS #108-78-1), memiliki massa molekul sekitar 126 g/mol, bentuknya serbuk kristal putih, dan hanya sedikit larut dalam air. Melamin memiliki kandungan nitrogen sekitar 66% (Jonathan et al., 2008).

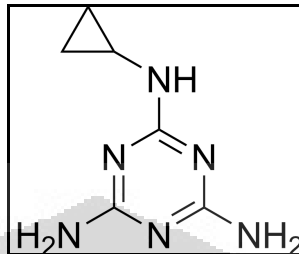


**Gambar 2.1** Struktur molekul melamin (*melamine*)

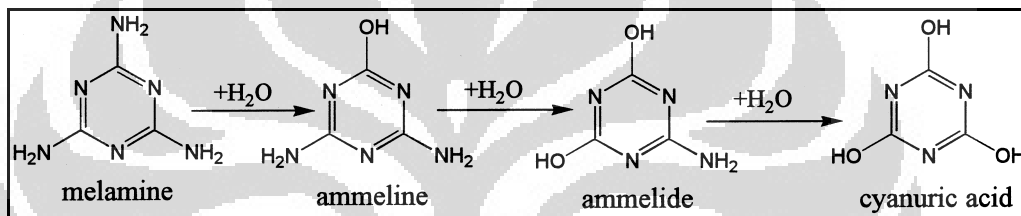
Melamin juga dapat dideskripsikan sebagai penggabungan dari trimer sianamida yakni tiga unit sianamida dalam satu cincin. Melamin juga suatu metabolit dari siromazin (suatu pestisida). Senyawa ini terbentuk dalam tubuh mamalia yang telah memakan siromazin (*cyromazine*) dan dapat terkonversi menjadi melamin pada tanaman. Melalui proses metabolisme pada hewan tikus, kambing, domba, dan ayam betina, senyawa siromazin tersebut diubah menjadi melamin, metil siromazin, dan hidroksi siromazin (Jonathan et al., 2008; Michael dan Alexander, 2008).

Melamin adalah senyawa organik yang sering dikombinasikan dengan formaldehida untuk menghasilkan resin melamin, yakni suatu polimer sintetik dimana memiliki sifat tahan api dan panas. Resin melamin merupakan bahan yang sangat multiguna dengan struktur yang sangat stabil. Melamin mempunyai bentuk lain sebagai senyawa hasil hidrolisis dari melamin

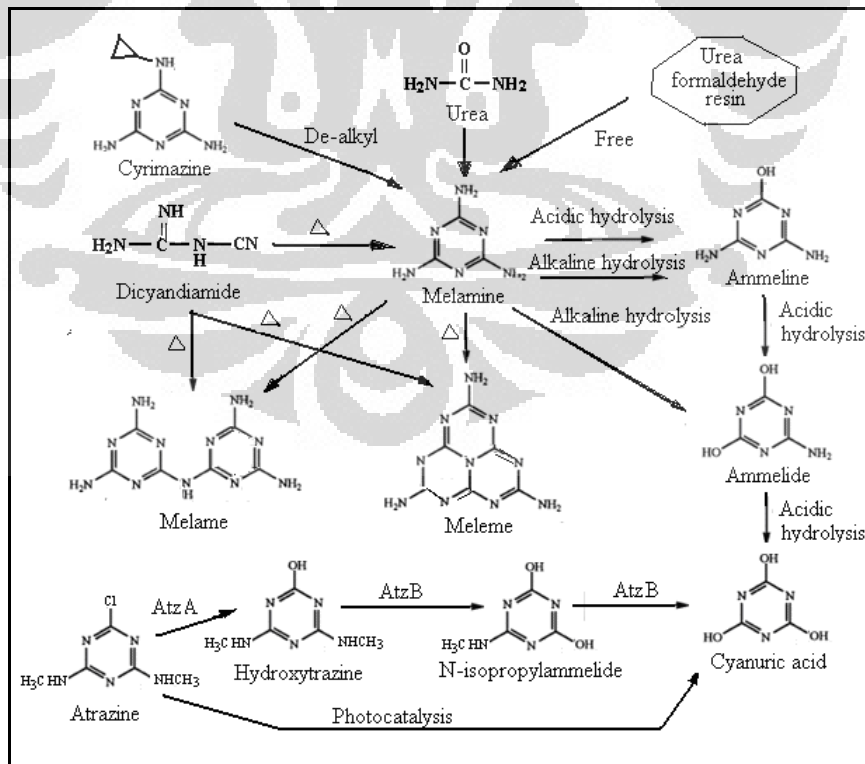
(*melamine*) tersebut, yaitu *ammelin* (*ammeline*), *ammelida* (*ammelide*), dan asam sianurat (*cyanuric acid*) (Jonathan et al., 2008; Min dan Yun, 2008) seperti pada Gambar 2.3.



**Gambar 2.2** Struktur molekul siromazin (*cyromazine*)



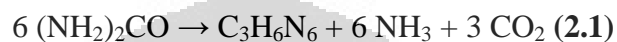
**Gambar 2.3** Hidrolisis senyawa melamin (*melamine*)



**Gambar 2.4** Sistem degradasi melamin dan analog yang berhubungan

### 2.1.1 Sintesis Melamin

Melamin pertama kali disintesis oleh seorang ahli kimia dari Jerman bernama Justus von Liebig (1834). Pada produksi awal, pertama-tama kalsium sianamida dikonversi menjadi disianamida, lalu dipanaskan diatas titik lelehnya untuk menghasilkan melamin. Pada saat ini, kebanyakan industri menggunakan urea pada reaksi berikut ini untuk menghasilkan melamin.



Hal ini dapat dimengerti dalam dua tahapan. Pertama, urea terdekomposisi menjadi asam sianat dan ammonia dalam suatu reaksi endotermik seperti pada reaksi (2.2).



Lalu, asam sianat berpolimerisasi untuk menghasilkan melamin dan karbon dioksida (Sherri, 2008).



### 2.2 Kegunaan Melamin

Melamin adalah senyawa organik yang sering dikombinasikan dengan formaldehida untuk menghasilkan resin melamin, yakni suatu polimer sintetik dimana memiliki sifat tahan api dan panas. Resin melamin dibuat dengan mencampurkan urea dengan formaldehida dibawah panas dan tekanan. Zat-zat tersebut akan mulai terpolimerisasi dan terbawa ke dalam suatu cetakan, lalu akan menghasilkan bentuk sesuai keinginan. Dalam tekanan, melamin melepaskan air yang dapat membuat plastik menjadi tidak stabil. Jika terkena panas yang cukup, maka melamin akan meleleh. Untuk alasan inilah pencucian melamin disarankan jangan terkena panas yang tinggi yang dapat berasal dari oven dan *microwave* (Sherri, 2008 dalam Mangisi, 2009).

Melamin berbahaya jika terminum, terhirup, atau terserap melalui kulit. Paparan secara kronis dapat menyebabkan efek kanker dan kerusakan sistem reproduksi. Para ahli FDA (*Food Drug Administration*) menjelaskan ketika melamin dan asam sianurat terserap dalam darah, maka akan terkonsentrasi dan berinteraksi di dalam saluran kelenjar ginjal saat pengisian urin, lalu akan mengkristal berupa kristal kuning dimana memblok dan merusak sel kelenjar ginjal yang akhirnya menutup saluran ginjal sehingga menyebabkan malfungsi ginjal (WHO/FAO, 2008).

Negara Uni Eropa (UE) menyusun suatu standar bersama untuk keberadaan melamin yang mengkontaminasi manusia pada 0,5 mg per kg dari massa badan. Kanada memberikan batasan pada 0,35 mg per kg dari massa badan (WHO/FAO, 2008).

### **2.3 Metode Analisis Melamin**

Setelah merebaknya kasus kontaminasi melamin pada bahan baku dan produk-produk makanan dari Cina (2007), kebutuhan akan metode analisis kimia secara kuantitatif untuk contoh bahan baku dan produk-produk makanan semakin nyata. Lembaga-lembaga ilmiah/penelitian di berbagai negara berupaya mengembangkan metode analisis kimia untuk tujuan tersebut. Pada saat ini beberapa metode yang dapat digunakan meliputi metode LC-MS, GC-MS, dan HPLC (Jonathan et al., 2008; Sherri, 2008).

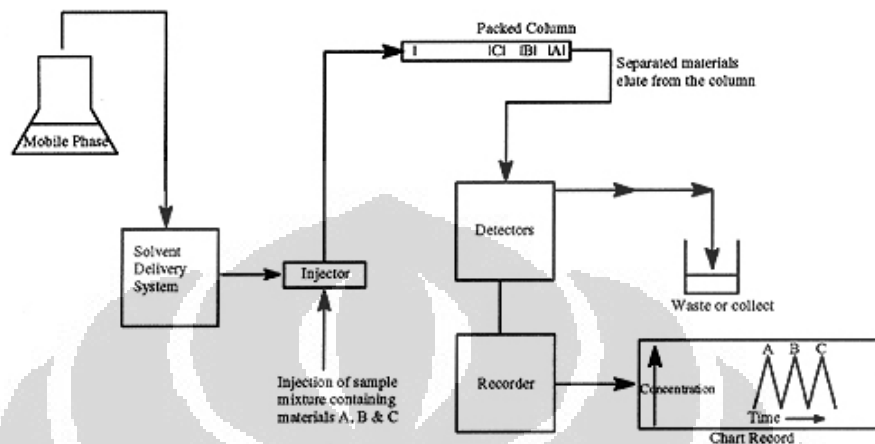
#### **2.3.1 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT/HPLC) merupakan suatu metode kromatografi yang menggunakan suatu padatan, cairan, resin penukar ion (*ion exchange resin*) atau polimer berpori (*porous polymer*) pada kolom sebagai fase diamnya, sedangkan fase geraknya berupa suatu cairan yang melewati kolom pada tekanan tinggi (Sherri, 2008)

HPLC adalah kromatografi cair yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terlarut dalam larutan. Senyawa-senyawa tersebut terpisahkan dengan menginjeksikan suatu contoh uji sejumlah tertentu ke dalam suatu kolom. Pemisahan campuran analit dengan cara mengalirkan fasa



gerak cair bertekanan tinggi dimaksudkan untuk mendorong analit melalui kolom yang berisi fasa diam. Analit terpisah akibat perbedaan afinitasnya terhadap fasa diam dan fasa gerak (Jonathan et al., 2008; Sherri, 2008).



**Gambar 2.5** Skema instrumentasi HPLC

Sejumlah senyawa organik yang tidak stabil dan mudah menguap dapat dianalisis oleh HPLC dengan hasil yang baik tanpa kesulitan. Analisis dengan HPLC dilakukan pada temperatur rendah serta adanya kompetisi 2 (dua) fasa (fasa gerak dan fasa diam) dibandingkan dengan GC yang hanya 1 (satu) fasa (fasa diam). HPLC dapat melakukan pemisahan yang tidak mungkin dilakukan oleh GC (*Gas-Chromatography*). Selain itu, adanya berbagai macam detektor yang dapat dipilih sesuai dengan jenis dan sifat senyawaan menambah selektivitas HPLC (Chen-Hao et al., 2008; Jonathan et al, 2008; Min dan Yun, 2008).

### 2.3.1.1 Parameter Pemisahan

Dalam metode kromatografi, suatu pemisahan dikatakan baik atau tidak biasanya berdasarkan beberapa parameter utama yang dikenal dengan istilah faktor retensi ( $k$ ), faktor pemisahan ( $\alpha$ ), jumlah total pelat ( $N$ ), dan resolusi ( $R$ ). Ketiga faktor ini harus diperhitungkan untuk menggambarkan tingkat resolusinya. Persamaan 2.3 menjelaskan (memprediksi) efek daripada variasi ketiga faktor tersebut dalam mengontrol resolusi pada kolom HPLC (Chen-Hao et al., 2008; Jonathan et al., 2008).

Faktor retensi ( $k$ ) adalah retensi relatif dari masing-masing puncak kromatogram pada kolom. Faktor retensi tidak tergantung kepada panjang kolom dan aliran fasa gerak, namun mewakili rasio molar dari senyawa di dalam fasa diam dan fasa gerak. Faktor retensi biasanya bernilai antara 1 (satu) dan 10 (sepuluh). Jika nilai  $k$  terlalu rendah, maka derajat pemisahan mungkin tidak cukup dikarenakan tidak adanya interaksi antara analit dengan fasa diam dikarenakan analit lewat terlalu cepat. Sebaliknya, jika nilai  $k$  terlalu besar, maka waktu analisis juga akan menjadi terlalu lama (Jeffrey, 1996; Sherri, 2008). Persamaan untuk menghitung nilai  $k$  sebagai berikut:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_R} \quad (2.1)$$

Keterangan:  $k$  = faktor retensi  
 $t_R$  = waktu retensi analit  
 $t_0$  = waktu retensi dari puncak pertama yang keluar dari kolom

Faktor pemisahan (selektivitas,  $\alpha$ ) merupakan besaran yang menunjukkan pemisahan relatif antara dua puncak dalam suatu kromatogram. Dua komponen dalam suatu campuran tidak dapat dipisahkan, kecuali mereka memiliki perbedaan nilai  $k$  dengan nilai  $k_2 > k_1$ . Jika nilai  $\alpha = 1$ , maka artinya tidak terjadi pemisahan atau menunjukkan kedua komponen memiliki waktu retensi yang sama. Faktor pemisahan atau selektivitas ( $\alpha$ ) adalah suatu ukuran dari potensi sistem kromatografi untuk mampu atau tidak memisahkan dua senyawa (Jeffrey, 1996; Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008). Persamaannya sebagai berikut:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2.2)$$

Keterangan:  $\alpha$  = faktor pemisahan  
 $k_1$  = faktor retensi analit 1  
 $k_2$  = faktor retensi analit 2

Resolusi ( $R$ ) dari dua puncak bergantung pada nilai faktor pemisahan ( $\alpha$ ), faktor efisiensi ( $N$ ), dan faktor retensi ( $k$ ). Jika diasumsikan  $N_1 = N_2$  di bawah kondisi pemisahan secara isokratik. Isokratik merupakan cara pemrograman aliran fasa gerak yang hanya memerlukan satu macam komposisi pelarut baik pelarut tunggal maupun pelarut campuran. Jika digunakan dua jenis pelarut, maka diperlukan dua buah pompa untuk mengatur pelarut agar komposisinya tetap hingga selesai pemisahan. (Jeffrey, 1996; Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008). Persamaannya sebagai berikut:

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \left( \frac{k_1}{1+k} \right) = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \sqrt{N} \frac{k_2}{1+k} \quad (2.3)$$

$$\bar{k} = \frac{k_1 + k_2}{2}$$

Keterangan:  $R$  = resolusi  
 $\alpha$  = faktor pemisahan  
 $k_1$  = faktor retensi analit 1  
 $k_2$  = faktor retensi analit 2  
 $\bar{k}$  = nilai rata-rata dari  $k_1$  dan  $k_2$   
 $N$  = jumlah pelat teoritis (faktor efisiensi)

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w^{1/2}_1 + w^{1/2}_2} \quad (2.4)$$

Keterangan:  $R$  = resolusi  
 $k_1$  = faktor retensi analit 1  
 $k_2$  = faktor retensi analit 2  
 $w_1$  = luas area analit 1  
 $w_2$  = luas area analit 2  
 $w^{1/2}_1$  = luas area analit 1 pada  $1/2$  tinggi puncak  
 $w^{1/2}_2$  = luas area analit 2 pada  $1/2$  tinggi puncak

Jumlah pelat teoritis ( $N$ ) atau biasa disebut juga sebagai faktor efisiensi; mengkarakterisasi efisien kolom. Faktor efisiensi ( $N$ ) mengukur derajat ketajaman dari puncak kromatogram yang didapatkan. Nilai faktor efisiensi yang meningkat, menandakan proses pengemasan (*packing*) yang lebih baik,

panjang kolom yang lebih panjang, dan kondisi aliran fasa gerak yang optimum. Kolom dengan nilai efisiensi yang tinggi, berarti dapat memisahkan campuran yang terdiri atas komponen yang memiliki faktor pemisahan ( $\alpha$ ) yang mirip (Jeffrey, 1996; Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008).

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{w^{1/2}} \right)^2 \quad (2.5)$$

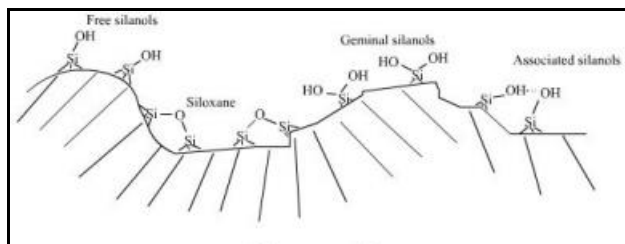
Keterangan:  $N$  = jumlah pelat teoritis (faktor efisiensi)  
 $t_R$  = waktu retensi analit  
 $w$  = luas area analit  
 $w^{1/2}$  = luas area analit pada  $1/2$  tinggi puncak

### 2.3.1.2 Fasa Diam

Kolom pada HPLC tidak memerlukan temperatur yang tinggi karena sifat ikatan kimia terhadap fasa stasioner sangat sensitif terhadap temperatur tinggi. Pemilihan kolom berdasarkan jenis fasa gerak dan sifat-sifat sampel dapat dilihat pada Tabel 2.2 (Jeffrey, 1996; Min dan Yun, 2008, Sherri, 2008).

Sifat bahan pengisi atau fasa diam dalam kolom bervariasi meskipun dari satu produk yang sama (Mangisi, 2009). Variasi fasa diam yang banyak digunakan dapat berdasarkan partikel yang *porous* atau *non-porous* dengan ukuran diameter yang kecil dan permukaan partikel kecil yang *porous*. Biasanya berukuran panjang antara 10-25 cm dengan diameter internal 4-5 mm. Sementara untuk kolom mikro memiliki panjang antara 20-50 cm dengan diameter internal 1-2 mm (Jeffrey, 1996).

Salah satu fasa diam yang digunakan dalam instrumen HPLC adalah silika. Silika adalah suatu adsorben dengan sifat yang terkenal dan banyak digunakan sebagai bahan isian kolom. Silika terdiri dari atom silikon yang dijembatani secara 3 (tiga) dimensi oleh atom oksigen seperti diperlihatkan pada Gambar 2.6 (Jeffery, 1996 dalam Mangisi, 2009).



**Gambar 2.6** Struktur kimia dari silika



**Gambar 2.7** Kolom (fasa diam) C-8 Agilent ZORBAX

Silika mengandung gugus OH (silanol) sehingga permukaannya memungkinkan untuk dimodifikasi untuk memberikan sifat yang spesifik. Modifikasi dari kolom silika sebagai bahan isian kolom telah sangat berkembang, diantaranya dapat dilihat seperti pada Tabel 2.1. Beberapa aplikasi dan jenis pelarut yang sesuai dan umum digunakan pada masing-masing modifikasi silika dapat dilihat pada Tabel 2.2 (Jeffrey, 1996; Sherri, 2008).

**Tabel 2.1** Gugus fungsional yang terikat secara kimiawi pada silika yang telah dimodifikasi (Mangisi, 2009)

Gugus fungsi	Formula	Gugus fungsi	Formula
<i>Triacontyl</i>	$-(\text{CH}_2)_{29}\text{CH}_3$	<i>Phenyl</i>	$-(\text{CH}_2)_{29}\text{CH}_3$
<i>Docosyl</i>	$-(\text{CH}_2)_{21}\text{CH}_3$	<i>Diphenyl</i>	$-(\text{CH}_2)_{21}\text{CH}_3$
<i>Octal</i>	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	<i>Dimethylamino</i>	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
<i>Hexyl</i>	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	<i>Nitro</i>	$-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
<i>Trimethyl</i>	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	<i>Nitrile (Cyano)</i>	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
<i>Alkylcarbamate</i>	$-\text{CO}(\text{CO})\text{NH}-$ $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$	<i>Oxipropionitrile</i>	$-\text{CO}(\text{CO})\text{NH}-$ $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$
<i>Cyclohexyl</i>	$-\text{C}_6\text{H}_{11}$	<i>Fluoroalkyl</i>	$-\text{C}_6\text{H}_{11}$

**Tabel 2.2** Modifikasi silika pada kolom dan aplikasinya (Mangisi, 2009)

Kolom	Fasa	Pelarut	Aplikasi
C <sub>18</sub>	Octydecyl	AN, MeOH, H <sub>2</sub> O	Non-polar umum
C <sub>8</sub>	Octyl	AN, MeOH, H <sub>2</sub> O	Non-polar umum
Phenyl	Styryl	AN, MeOH, H <sub>2</sub> O	Asam lemak, ikatan rangkap
Cyano	Cyanopropil	AN, MeOH, THF, H <sub>2</sub> O	Keton, aldehid
Amino	Aminopropyl	AN, MeOH, THF, H <sub>2</sub> O, CHCl <sub>3</sub> , DCM	Sugar, anion
Diol	Dihydroxyhexyl	AN, MeOH, THF, H <sub>2</sub> O	Protein
SAX	Aromatic Quaternaryamine	Garam buffer AN, MeOH, H <sub>2</sub> O, garam buffer	Anion

Derajat kepolaran masing-masing bahan isian kolom tersebut berbeda satu sama lain tergantung gugus terikatnya pada rantai silika. Derajat polaritasnya dapat dilihat seperti pada Gambar 2.6 (Jeffrey, 1996; Sherri, 2008).

Kepolaran meningkat →								
Kolom:	C <sub>18</sub>	0	C <sub>8</sub>	C <sub>4</sub>	CN	Diol	NH <sub>2</sub>	Si
Pelarut:	Hexane	Benzene	DCM	CHCl <sub>3</sub>	THF	AN	MeOH	H <sub>2</sub> O
Senyawa:		X					Y	

**Gambar 2.8** Derajat kepolaran dari kolom dan pelarutnya (Mangisi, 2009)

### 2.3.1.3 Fasa Gerak

Pada pemilihan fasa gerak yang perlu diperhatikan adalah fasa gerak harus berinteraksi dengan fasa diam yang sesuai; untuk memisahkan suatu campuran secepat dan seefisien mungkin. Secara umum, pemilihan fasa gerak harus memenuhi kriteria viskositas, transparansi UV, titik didih, kemurnian, sifat inert, toksisitas, dan harga (Chen-Hao, 2008; Jeffrey, 1996; Sherri, 2008).

Viskositas yang rendah menghasilkan tekanan yang rendah dibandingkan suatu pelarut dengan viskositas yang lebih tinggi pada suatu aliran tertentu. Untuk transparansi UV, jika serapan UV yang digunakan, maka fasa gerak yang digunakan haruslah transparan pada panjang gelombang yang diinginkan (Jeffrey, 1996; Sherri, 2008).

Untuk mendapatkan temu balik (*recovery*) yang diinginkan, dibutuhkan suatu titik didih yang rendah dari suatu fasa gerak karena fluktuasi derajat titik didih akan mempengaruhi suatu senyawa yang sensitif terhadap perubahan (Jeffrey, 1996 dalam Mangisi, 2009).

Tingkat kemurnian yang tinggi dibutuhkan dalam pemilihan suatu fasa gerak. Tujuannya adalah untuk meminimisasi pengaruh pengotor yang dapat mengaburkan pembacaan (pendeteksian) dari senyawa yang diinginkan. Sifat inert dari fasa gerak juga berpengaruh dalam pemilihan fasa gerak. Suatu fasa gerak yang baik adalah harus tidak bereaksi sama sekali dengan contoh senyawa yang akan diukur (Chen-Hao, 2008; Jeffrey, 1996; Sherri, 2008).

Selain memperhatikan faktor-faktor kualitas yang telah disebutkan di atas, juga perlu diperhatikan untuk menggunakan fasa gerak dengan harga yang terjangkau, tentunya dengan tetap mempertimbangkan parameter-parameter kualitasnya. Dalam penggunaan fasa gerak dalam analisis HPLC dibutuhkan pengetahuan yang cukup untuk memastikan bahwa fasa gerak yang digunakan selalu dalam keadaan baik (Mangisi, 2009).

## **2.4 Metode Validasi**

Validasi menurut Harmita (2004) merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi menurut SK Menkes RI No. 43/Menkes/SK/II/1988 tentang cara pembuatan obat yang baik (CPOB) merupakan suatu tindakan pembuktian dengan cara yang sesuai bahwa tiap bahan, prosedur, kegiatan, sistem, perlengkapan, atau mekanisme yang digunakan dalam produksi dan pengawasan akan senantiasa mencapai hasil yang diinginkan (Depkes RI, 2001). Validasi metode menurut *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) (2002) adalah suatu proses yang menetapkan bahwa karakteristik suatu metode yang ditemukan dapat memenuhi kebutuhan untuk aplikasi analisis yang diharapkan dengan cara studi laboratorium. Validasi menurut Levin (2002) dibagi menjadi empat kelas, yaitu kelas A, B, C, dan D. Kelas A digunakan untuk identifikasi senyawa. Kelas B digunakan untuk mendeteksi

dan menentukan adanya pengotor. Kelas C dapat menentukan senyawa secara kuantitatif. Kelas D untuk mencari ciri suatu senyawa.

Parameter metode validasi dalam penelitian ini meliputi linearitas, ketelitian (presisi), ketepatan (akurasi), batas deteksi (*limit of detection*), dan batas kuantifikasi (*limit of quantification*).

### 2.4.1 Linearitas

Linearitas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam contoh pada kisaran konsentrasi tertentu (Chen-Hao, 2008; Sherri, 2008). Linearitas suatu metode analisis adalah ukuran yang menunjukkan tingkat kesesuaian atau korelasi antaras kadar analit dan respons detektor yang dinyatakan sebagai koefisien korelasi ( $r$ ) (Min dan Yun, 2008). Respons detektor yang digunakan adalah luas area puncak untuk instrumen HPLC. Koefisien korelasi didapat dengan menghitung regresi dari persamaan linearnya, sedangkan perpotongan dengan sumbu  $y$  menyatakan ukuran biasanya. Selang linearitas adalah selang antara konsentrasi tertinggi dan terendah dari analit yang dapat ditetapkan menggunakan suatu metode dengan tingkat, ketelitian, kecermatan, dan koefisien korelasi yang telah dilakukan. Nilai  $r$  yang dihasilkan lebih besar atau sama dengan 0,9900 (Chen-Hao, 2008; Jeffrey, 1996; Sherri, 2008). Secara matematis, nilai  $r$  dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Zamri, 2008).

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x} | y_i - \bar{y})}{\left( \left[ \sum (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum (y_i - \bar{y})^2 \right] \right)^{1/2}} \quad (2.6)$$

Keterangan:  $r$  = koefisien korelasi  
 $x_i$  = konsentrasi analit setiap ulangan  
 $\bar{x}$  = konsentrasi analit rerata  
 $y_i$  = luas area puncak setiap ulangan  
 $\bar{y}$  = luas area puncak rerata



### 2.4.2 Batas Deteksi

Batas Deteksi (*Limit of Detection/LOD*) didefinisikan sebagai konsentrasi minimum dari suatu senyawa yang dapat diukur dan dilaporkan dengan tingkat kepercayaan 99% bahwa konsentrasi analit lebih besar dari nol dan analit tersebut ditetapkan dari analisis suatu contoh dengan matriks tertentu dimana analit tersebut terkandung (Chen-Hao et al., 2008; Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008).

Prosedur ini dirancang untuk diterapkan pada tipe contoh yang bervariasi mulai dari blanko yang mengandung analit hingga air limbah yang mengandung analit. LOD untuk suatu prosedur analisis bervariasi sesuai dengan tipe contoh. Prosedur mempersyaratkan suatu metode analisis yang lengkap, spesifik dan diketahui dengan baik. Semua tahapan proses contoh dari metode analisis dimaksud tercakup di dalam penentuan batas- deteksi- metode ini. LOD yang diperoleh dari prosedur ini digunakan untuk menguji pentingnya suatu pengukuran tunggal dari suatu contoh. Prosedur LOD ini dirancang untuk dapat diterapkan pada suatu variasi sifat fisik dan kimia yang luas. Untuk menyempurnakan hal ini, maka prosedur ini dibuat tidak tergantung pada peralatan (Chen-Hao et al., 2008; Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008). Perhitungan variansi ( $s^2$ ) dan simpangan baku ( $s$ ) dari hasil pengukuran keseluruhan contoh menggunakan persamaan berikut:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \left[ \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2}{n} \right] \quad (2.7)$$

Keterangan:  $x_i$  = hasil analisis contoh yang diperoleh  
 $\Sigma$  = penjumlahan dari nilai  $x$

Batas deteksi dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$SB = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2}} \quad (2.8)$$

$$LOD = \frac{3 \times SB}{Slope} \quad (2.9)$$

Keterangan:  $SB$  = simpangan baku intersep kurva standar  
 $LOD$  = batas deteksi  
 $s$  = simpangan baku dari keseluruhan replikasi

#### 2.4.2 Batas Kuantifikasi

Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification/LOQ*) adalah konsentrasi analit terendah yang terdapat dalam contoh yang dapat diukur secara tepat dan teliti (Chen-Hao et al., 2008; Min dan Yun, 2008). Batas kuantifikasi dapat dihitung sebagai konsentrasi analit yang memiliki respons analit : derau sebesar 10 : 1 (Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008). Batas deteksi dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep kurva standar yang diperoleh (Chen-Hao et al., 2008; Min dan Yun, 2008; Sherri, 2008). Batas kuantifikasi dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut.

$$SB = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} \quad (2.10)$$

$$LOQ = \frac{10 \times SB}{Slope} \quad (2.11)$$

Keterangan:  $SB$  = simpangan baku intersep kurva standar  
 $LOQ$  = batas kuantifikasi

#### 2.4.3 Ketepatan (Akurasi)

Ketepatan suatu prosedur analisis didefinisikan sebagai kedekatan hasil yang diterima (baik sebagai nilai teoritis maupun dengan nilai rujukan yang diterima) dengan nilai yang diperoleh dari hasil pengukuran (Chan, 2004 dalam Zamri, 2008). Ketepatan menurut AOAC (2002) adalah kedekatan nilai hasil percobaan yang diperoleh dari suatu metode terhadap nilai sebenarnya. Ketepatan diukur dengan menghitung temu balik (TB) menggunakan metode penambahan standar. Nilai TB bergantung pada matriks contoh, prosedur proses contoh, dan konsentrasi analit. Batas penerimaan TB menurut AOAC adalah 80-120%

$$\%TB = \frac{a - b}{c} \times 100\% \quad (2.12)$$

dengan:  $a$  = konsentrasi contoh + konsentrasi standar yang terukur  
 $b$  = konsentrasi contoh  
 $c$  = konsentrasi standar teoritis yang ditambahkan

#### 2.4.4 Ketelitian (Presisi)

Ketelitian dapat dinyatakan dengan tiga cara yaitu temu balik (*recovery*), ketelitian intermediet, dan keketiruan. Ketelitian menurut Jonathan et al (2008) adalah kesamaan hasil dari tiap individu ketika metode tersebut diterapkan berulang kali pada berbagai pencuplikan suatu contoh homogen. Ketelitian diukur dengan menghitung simpangan baku relatif (SBR) dari beberapa kali pengukuran ulang. Menurut Jonathan et al (2008) dan Sherri (2008), syarat penerimaan parameter validasi ini sebagai berikut: (a) sangat teliti (% SBR < 1); (b) teliti (% SBR 1–2); (c) sedang (% SBR 2–5); dan (d) tidak teliti (% SBR > 5). Ketelitian diukur dengan menghitung persentase simpangan baku relatif (% SBR) dengan menggunakan rumus:

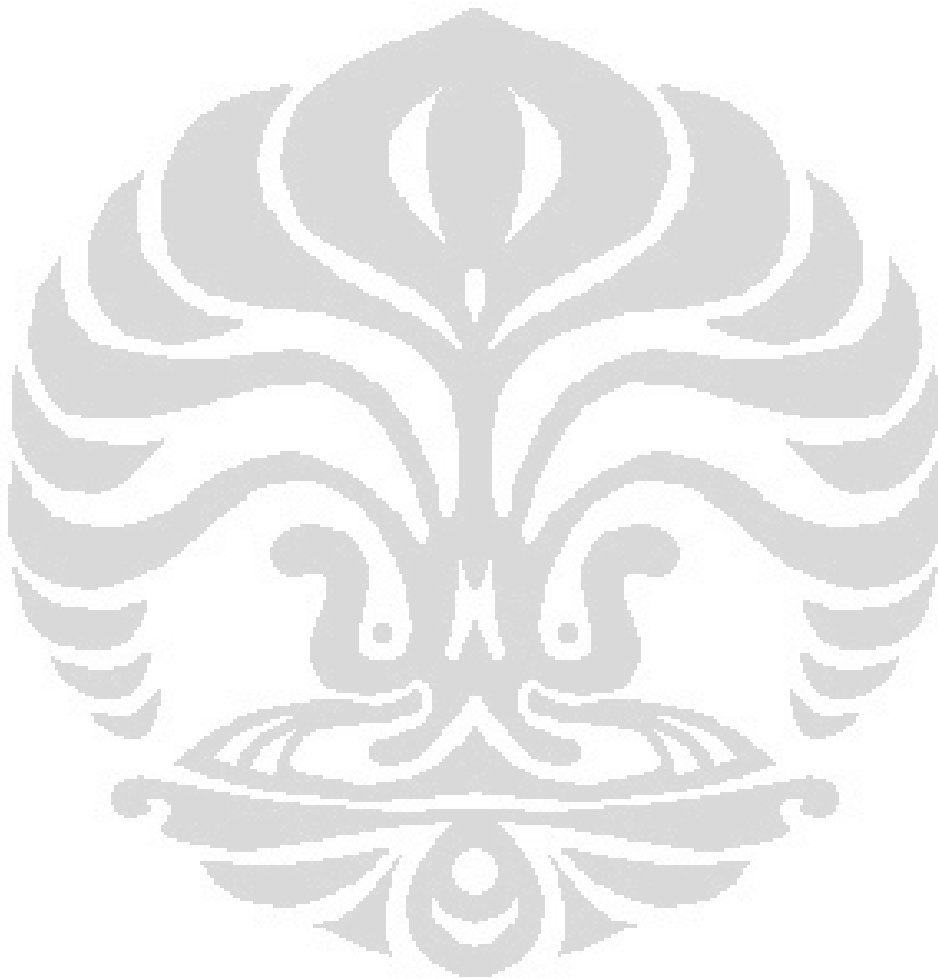
$$SB = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.13)$$

$$\text{Simpangan Baku Relatif (SBR) (\%)} = \frac{100SB}{x} \quad (2.14)$$

dengan:  $x_i$  = persen perolehan kembali ulangan ke- $i$   
 $\bar{x}$  = rerata persen perolehan kembali  
 $n$  = banyaknya ulangan

Beberapa metode analisis menetapkan batasan pengendali (*control limit*) yang sesuai untuk contoh dengan tingkat akurasi (keakuratan) dan presisi (ketelitian) yang rendah. Jika suatu metode analisis tidak menetapkan batasan semacam itu, maka biasanya bermanfaat untuk mengevaluasi persentase temu balik rata-rata dengan menggunakan batasan pengendali yang telah ditetapkan sebelumnya. Batasan pengendali yang sesuai untuk pereaksi blanko (air) yang ditambah analit (*spiked*) dapat menjadi batasan untuk temu balik pada contoh blanko. Jika penentuan suatu analit dilakukan di dalam contoh dengan matriks

selain air, maka digunakan batasan pengendali yang khusus untuk matriks yang ditambahkan analit (*spiked*) (Zamri, 2008). Hasil-hasil yang diperoleh untuk analisis dengan kandungan analit rendah mungkin tidak berada dalam rentang yang dapat diterima, tetapi jika LOD yang telah dihitung dipertanyakan, evaluasi temu balik dengan cara ini dapat mengungkap suatu bias yang dapat mempengaruhi perhitungan (Jonathan et al., 2008; Sherri, 2008).



## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

Dalam penelitian ini, senyawa melamin dan asam sianurat dideteksi secara simultan menggunakan instrumentasi HPLC-PDA (*High-Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array*) dengan teknik isokratik selama kurang dari 15 menit. Contoh uji yang digunakan adalah berasal dari susu bubuk (susu formula) yang dipreparasi dengan metanol 50% (v/v). Lalu contoh uji di-*clean up* lagi lewat *solid-phase extractor* (SPE C<sub>8</sub>). Optimasi pemisahan dilakukan lewat variasi konsentrasi fasa gerak dan variasi pH fasa geraknya. Prinsip kerja dari metode analisis di atas telah diuraikan secara lengkap pada bab II (Tinjauan Pustaka). Demikian pula halnya dengan definisi, prosedur, dan perhitungan dari kedua parameter metode validasi dimaksud di atas. Berikut ini adalah uraian tahapan-tahapan pelaksanaan penelitian.

#### 3.1 Alat dan Bahan

##### 3.1.1 Alat Penelitian

- HPLC (Agilent 1200; Detektor Diode Array; Kolom C<sub>8</sub>)
- Pemusing (*Laboratory Centrifuge*, Kendro)
- Gelas vial bertutup silikon PTFE (12 x 32 mm, Waters)
- pH meter P25 (Ecomet)
- Vortex (Heidolph)
- Tabung *centrifuge* (50 mL, Kendro)
- Pompa vakum
- Pipet tetes
- Vertical Shaker
- *Syringe disposal* plastik (10 mL, Terumo)
- Peralatan gelas (Pyrex)
- SPE *cartridges* (Agilent SimpliQ SCX)

### 3.1.2 Bahan Penelitian

- Kristal melamin 99% (Merck)
- Larutan baku melamin 1.000 µg/mL dibuat dengan melarutkan 100 mg melamin dalam 100 mL 50% metanol p.a. Larutan baku disimpan di dalam lemari pendingin pada temperatur - 4°C. Larutan kerja dibuat dengan mengencerkan larutan tersebut dengan fasa gerak (*eluent*) yang digunakan. Larutan kerja tersebut harus dibuat setiap saat akan digunakan (selalu dalam keadaan segar).
- Metanol (LC grade, Merck)
- Etanol p.a (Merck)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (s) (Merck)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (s) (Merck)
- NaOH (s) (Merck)
- HCl p.a (aq) (Merck)
- 2,6-Diamino-4-chloropyrimidine, CAS 156-83-2, 98%: Cat. C33204-5G, Aldrich (digunakan sebagai standar internal)
- Akuabides
- Akuades

## 3.2 Cara Kerja

### 3.2.1 Metode Validasi Penentuan Asam Sianurat dan Melamin

#### 3.2.1.1 Contoh Uji (Sampel)

Contoh uji (sampel) yang digunakan berupa susu formula dalam bentuk bubuk seperti terlihat pada Gambar 3.1. Contoh uji tersebut relatif umum digunakan konsumen sebagai pemenuhan kecukupan gizi dari balita.

#### 3.2.1.2 Kondisi HPLC

Kondisi *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sebagai berikut:

Kondisi HPLC	
Peralatan	: Agilent 1200 Series HPLC
Detektor	: Dioda Array
Kolom	: Agilent ZORBAX SB-C8, 5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm id (p/n 880975-906)
Laju Alir	: 1,0 mL/menit
Temperatur Kolom	: 40 °C
Panjang Gelombang Detektor	: 190–360 nm
Volume Injeksi	: 20 $\mu$ L
Fasa Gerak	: 5,0–50 mM; pH 3,0–6,5 pada pelarut NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Sistim Kromatografi	: Isokratik (kecepatan aliran fasa gerak tetap)
Total Waktu Analisis	: 15 menit

### 3.2.1.3 Preparasi Larutan Baku Melamin dan Asam Sianurat

Larutan baku melamin 1000  $\mu$ g/mL dibuat dengan menimbang dengan tepat 100 mg kristal melamin p.a., kemudian melarutkan kristal dalam 100 mL pelarut metanol/air (50:50 v/v).

Larutan baku asam sianurat 1000  $\mu$ g/mL dibuat dengan menimbang dengan tepat 100 mg kristal asam sianurat p.a., kemudian melarutkan kristal dalam 100 mL pelarut metanol/air (50:50 v/v).

Larutan stok melamin intermediet 100  $\mu$ g/mL disiapkan dengan mengencerkan 5 mL larutan baku melamin sampai 50 mL dengan pelarut metanol/air (50:50 v/v).

Larutan stok asam sianurat dan melamin intermediet 100  $\mu$ g/mL disiapkan dengan mengencerkan 5 mL larutan baku asam sianurat sampai 50 mL dengan pelarut metanol/air (50:50 v/v).



**Gambar 3.1** Contoh uji bahan dasar dari susu formula

Larutan kerja melamin 100; 10,0; 5,00; 2,50; 1,25; 0,50; 0,25  $\mu\text{g/mL}$  dibuat dengan mengencerkan larutan stok melamin intermediet dengan menggunakan pelarut metanol/air (50:50 v/v) dengan volume tertentu. Larutan kerja dibuat pada saat larutan akan digunakan. Hal ini dilakukan pula pada pembuatan kurva kalibrasi asam sianurat dengan mengencerkan larutan stok melamin intermediet dengan menggunakan pelarut metanol/air (50:50 v/v) dengan volume tertentu.

#### 3.2.1.4 Penentuan Linearitas

Dalam pembuatan kurva standar melamin dan asam sianurat, konsentrasi yang digunakan adalah 0,25; 0,50; 1,25; 2,50; dan 5,0 ppm dianalisis sesuai prosedur kerja. Hasil analisis tersebut kemudian dievaluasi untuk menentukan rentang konsentrasi melamin atau asam sianurat (analit) yang masih menunjukkan sinyal deteksi alat yang meningkat mengikuti garis lurus.

Linearitas metode penentuan melamin dan asam sianurat dengan HPLC ditentukan dengan cara membuat kurva hubungan antara konsentrasi standar pada sumbu  $x$  dan luas area pada sumbu  $y$ . Konsentrasi yang digunakan adalah 0,25; 0,50; 1,25; 2,50; dan 5,0 ppm. Linearitas senyawa asam sianurat dan melamin ditetapkan dengan membuat deret standar sebanyak 5 (lima) konsentrasi pada rentang (0,25–5,00 mg/kg) dengan masing-masing pengulangan pembacaan sebanyak 4 (empat) kali. Hubungan antara konsentrasi melamin antara respon rata-rata diimplementasikan dalam persamaan regresi



linier dan koefisien korelasi. Kurva kalibrasi diperoleh dengan mengencerkan larutan standar induk pada batasan 5–50 µg/mL untuk melamin dan asam sianurat.

### 3.2.1.5 Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Persamaan linear yang diperoleh pada uji linearitas selanjutnya digunakan untuk menghitung batas deteksi dan batas kuantifikasi. LOD dan LOQ dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep kurva standar yang diperoleh dengan rumus:

$$SB = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

$$LOD = \frac{3 \times SB}{Slope}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SB}{Slope}$$

Keterangan:  $SB$  = simpangan baku intersep kurva standar  
 $LOQ$  = batas kuantifikasi  
 $LOD$  = batas deteksi

### 3.2.1.6 Penentuan Ketelitian (Presisi)

Larutan kerja yang telah disiapkan sesuai dengan prosedur preparasi larutan kerja di atas kemudian diukur dengan HPLC sebanyak 4 kali ulangan pada hari yang sama. Nilai presisi diwakilkan oleh nilai simpangan baku dan % simpangan baku relatif (% SBR) dari keterulangan (*repeatability*) masing-masing deret standar melamin atau asam sianurat yang diukur pada suatu konsentrasi dengan multi-replikasi (sebanyak 3 kali pengulangan). Ketelitian diukur dengan menghitung persentase simpangan baku relatif (% SBR) dengan menggunakan rumus:

$$SB = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Simpangan Baku Relatif (SBR) (\%)} = \frac{100SB}{\bar{x}}$$

dengan:  $x_i$  = persen perolehan kembali ulangan ke- $i$

$\bar{x}$  = rerata persen perolehan kembali

$n$  = banyaknya ulangan ( $n = 4$ )

### 3.2.1.7 Penentuan Ketepatan (Akurasi)

Ketepatan metode ini ditentukan dengan metode penambahan standar dan dinyatakan sebagai persen temu balik. Temu balik merupakan jumlah standar yang dapat diperoleh kembali setelah ditambahkan ke dalam contoh. Penentuan persentase temu balik rata-rata dari metode HPLC ini juga berdasarkan pada penentuan kandungan melamin dan asam sianurat pada contoh susu bubuk yang ditambahkan melamin dengan 3 (tiga) variasi konsentrasi masing-masing yaitu 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, dan 1,00 mg/L. Setiap variasi konsentrasi dilakukan 7 (tujuh) replikasi pengukuran. Sebanyak 2 mL larutan dimasukkan ke dalam SPE lalu disaring dengan saringan 0,45  $\mu\text{m}$  sebelum diinjeksikan ke HPLC. Persen temu balik (TB) dihitung dengan rumus:

$$\%TB = \frac{a-b}{c} \times 100\%$$

Keterangan:  $a$  = konsentrasi contoh + konsentrasi standar yang terukur

$b$  = konsentrasi contoh

$c$  = konsentrasi standar teoritis yang ditambahkan

## 3.2.2 Identifikasi Contoh Uji

### 3.2.2.1 Preparasi Contoh Uji

Contoh susu bubuk dihomogenkan dan ditempatkan dalam wadah yang bersih dan tertutup rapat. Contoh susu bubuk ditimbang  $2,0 \pm 0,01$  gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung pemusing (volume 50 mL). Sebanyak 25 mL larutan metanol 50% v/v ditambahkan ke dalamnya lalu diaduk pada 1500 rpm pada kondisi tabung tertutup. Contoh tersebut disonikasi selama 20 menit lalu disentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 5 mL dari

larutan jernih tersebut disaring dengan *glass fiber* dan *PVDF filter* yang masing-masing berukuran pori 1,0  $\mu\text{m}$  dan 0,45  $\mu\text{m}$ . Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  filtrat tersebut diinjeksikan ke dalam instrumen HPLC. Sebagian lagi (5 mL) dari contoh uji dilewatkan pada *cartridge* ekstraksi fasa padat (*Solid Phase Extraction, SPE*) dan selanjutnya disaring dengan cara yang sama seperti diatas lalu diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  filtratnya ke dalam HPLC.

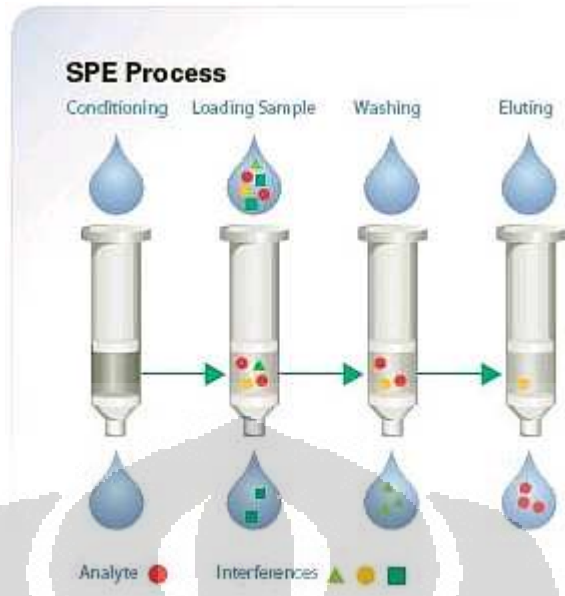
### 3.2.2.2 Preparasi SPE (*Solid Phase Extractor*)

*Agilent SampliQ SCX SPE cartridges* (p/n 5982-3236, 3 mL, 60 mg) digunakan untuk *clean up* ekstrak contoh. Semua tahapan SPE termasuk pengkondisian, pengisian contoh, pencucian, dan elusi akhir dilakukan dengan kecepatan aliran 0,5 s/d 1,0 mL/menit.

*Cartridge* diaktivasi dengan berturut-turut masing-masing 10 mL metanol lalu ditambahkan 10 mL air. Contoh uji sebanyak 10 mL dilewatkan ke dalam kolom *SPE* tersebut lalu dicuci berturut-turut dengan metanol dan air masing-masing 10 mL kemudian dielusi dengan pelarut yang sama pada saat proses ekstraksi contoh uji.



**Gambar 3.2** *Agilent SampliQ SCX SPE cartridges*



**Gambar 3.3** Ilustrasi proses ekstraksi fasa padat (*SPE*)

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

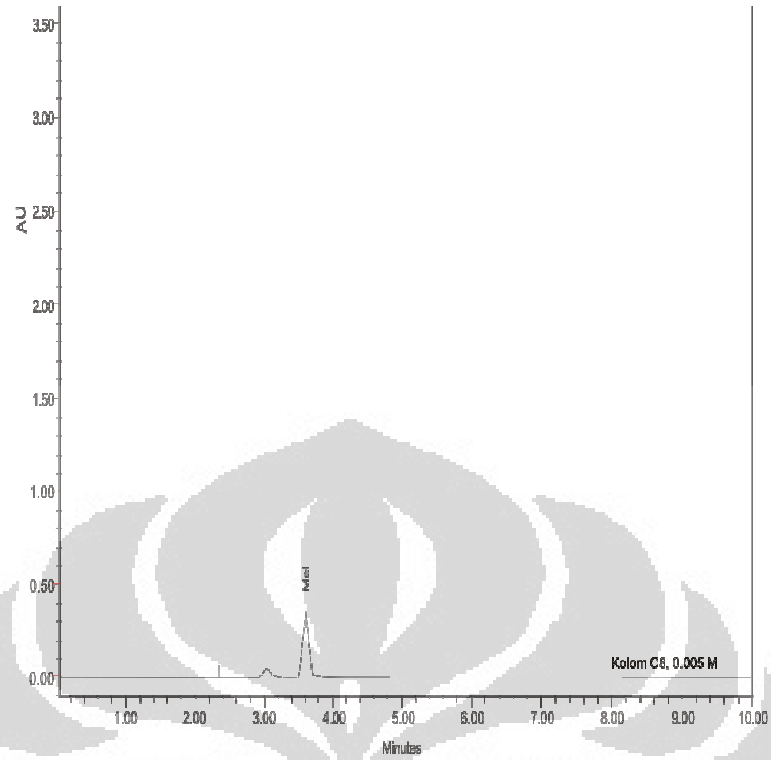
### 4.1 Uji Pendahuluan Analisis Melamin dan Asam Sianurat

Uji pendahuluan analisis melamin dan asam sianurat dilakukan untuk mengetahui waktu retensi senyawa tersebut. Kondisi HPLC yang ditetapkan adalah sebagai berikut.

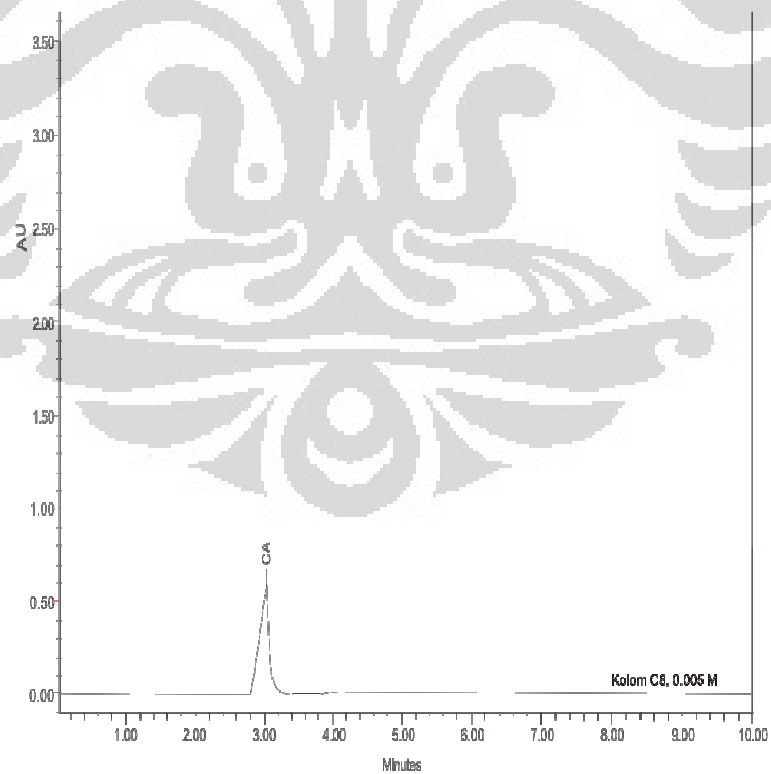
**Tabel 4.1** Kondisi HPLC untuk uji pendahuluan

Kondisi HPLC	
Peralatan	: Agilent 1200 Series HPLC
Detektor	: Diode Array
Kolom	: Agilent ZORBAX SB-C8, 5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm id (p/n 880975-906)
Laju Alir	: 1,0 mL/menit
Temperatur Kolom	: 40 °C
Panjang Gelombang Detektor	: 190–360 nm
Volume Injeksi	: 20 $\mu$ L
Fasa Gerak	: 5,0 mM (0,005 M); pH 6,50 pada pelarut NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Sistim Kromatografi	: Isokratik (kecepatan aliran fasa gerak tetap)
Total Waktu Analisis	: 15 menit

Kromatogram HPLC larutan baku melamin 0,25 mg/L dan larutan baku asam sianurat 0,25 mg/L dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan Gambar 4.2. Pada Gambar 4.1 dan 4.2, puncak melamin dan asam sianurat muncul pada waktu retensi 3,61 menit dan 3,13 menit. Data waktu retensi pada masing-masing komponen dianalisis dengan HPLC dengan kondisi seperti pada Tabel 4.1. Kondisi fasa gerak (*mobile phase*) diatur pada pH 6,50 pada pelarut NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan konsentrasi 5,0 mM atau 0,005 M. Pada kondisi pH dan konsentrasi fasa gerak yang berbeda akan memberikan data waktu retensi yang berbeda pula.



**Gambar 4.1** Kromatogram larutan baku melamin 0,25 mg/L



**Gambar 4.2** Kromatogram larutan baku asam sianurat 0,25 mg/L

## 4.2 Penentuan Kondisi Optimum Analisis Melamin dan Sianurat

### 4.2.1 Pengaruh Perubahan pH

Secara umum kolom C-8 (merek Agilent ZORBAX) stabil pada rentang pH 2,0-8,0. Pada kromatografi memungkinkan kita untuk bekerja pada pH diluar dari batasan itu yaitu lebih kecil dari pH 1,00 atau lebih besar dari pH 8,00 dengan memperhatikan bahan isian dari kolomnya. Menurut Chan (2004), pemisahan sebaiknya dilakukan pada diantara pH 2,0 dan pH 6,8 dengan tujuan untuk memperpanjang umur dari kolom.

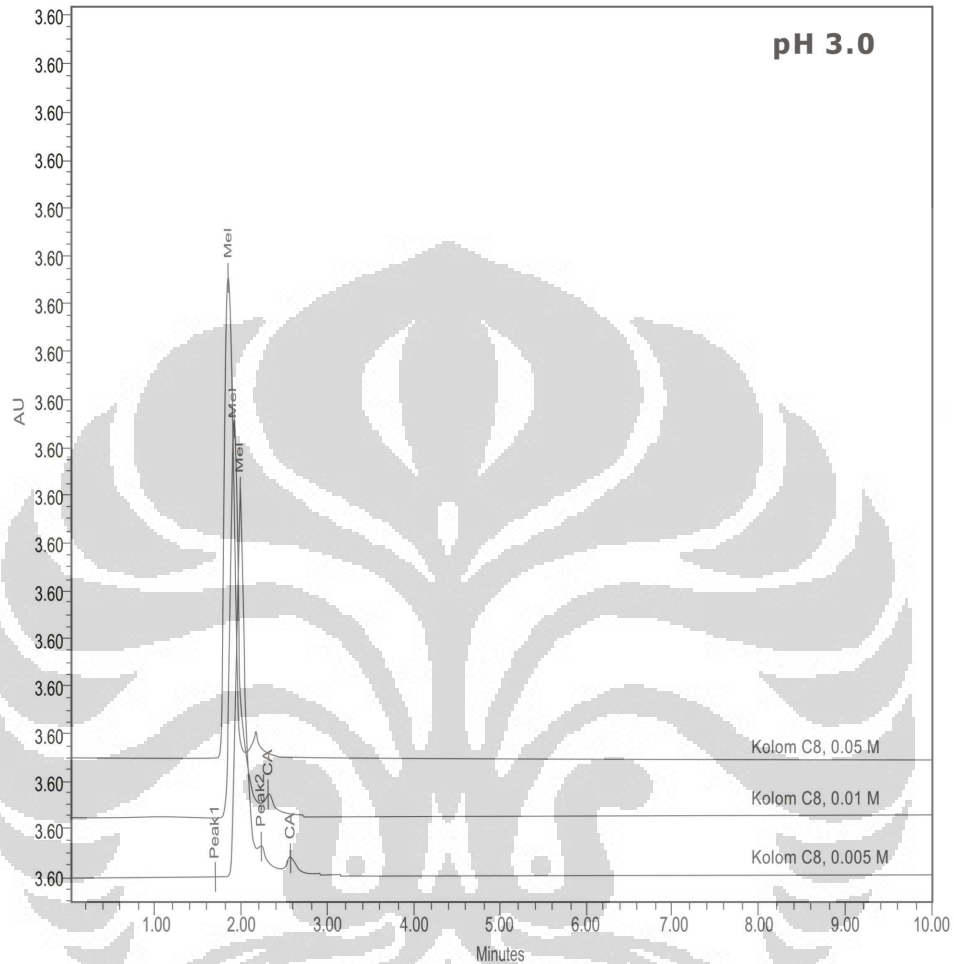
Pada penelitian ini, variasi pH diatur pada pH 3,00; 5,00; dan 6,50 dengan mempertimbangkan aspek pemeliharaan kolom ataupun timbulnya reaksi lain sebagai hasil interaksi dari senyawa melamin dengan senyawa pengotor matriks contoh uji. Jika dilakukan pada pH dibawah 2,00 dikhawatirkan dapat menyebabkan terjadinya pelepasan senyawa silanol bebas yang dapat membuat kolom silika menjadi lebih polar dan meningkatkan karakter penukaran kationnya pada permukaan bahan pengisi kolom tersebut.

Pada pH 3,00 terlihat bahwa hasil pemisahan melamin dan asam sianurat yang kurang baik dikarenakan kedua senyawa tersebut *overlap* (tumpang tindih) satu sama lain. Hal ini dapat dilihat pada kromatogram kolom C8 konsentrasi 0,005 M dimana senyawa pengotornya terdeteksi pada puncak 1 dan puncak 2 yang tingginya cukup signifikan mengganggu kemunculan analit target yang ingin dicapai seperti pada Gambar 4.3.

Pada pH 5,00 terlihat bahwa hasil pemisahan berlangsung lebih baik tetapi senyawa asam sianurat dan melamin masih tumpang tindih satu sama lain seperti terlihat pada kolom C8 konsentrasi 0,05 M yaitu pada puncak CA+Mel dengan faktor pemisahan yang kurang baik (Lampiran 10) dan pemisahan puncaknya dapat dilihat pada Gambar 4.4. Pada pH 5,00 terlihat bahwa puncak kedua senyawa asam sianurat dan melamin teridentifikasi dengan baik dan faktor pengotornya tidak lagi terdeteksi dengan menghasilkan faktor pemisahan yang terbaik seperti pada kolom C8 konsentrasi 0,01 M dan pemisahan puncaknya dapat dilihat pada Gambar 4.4.

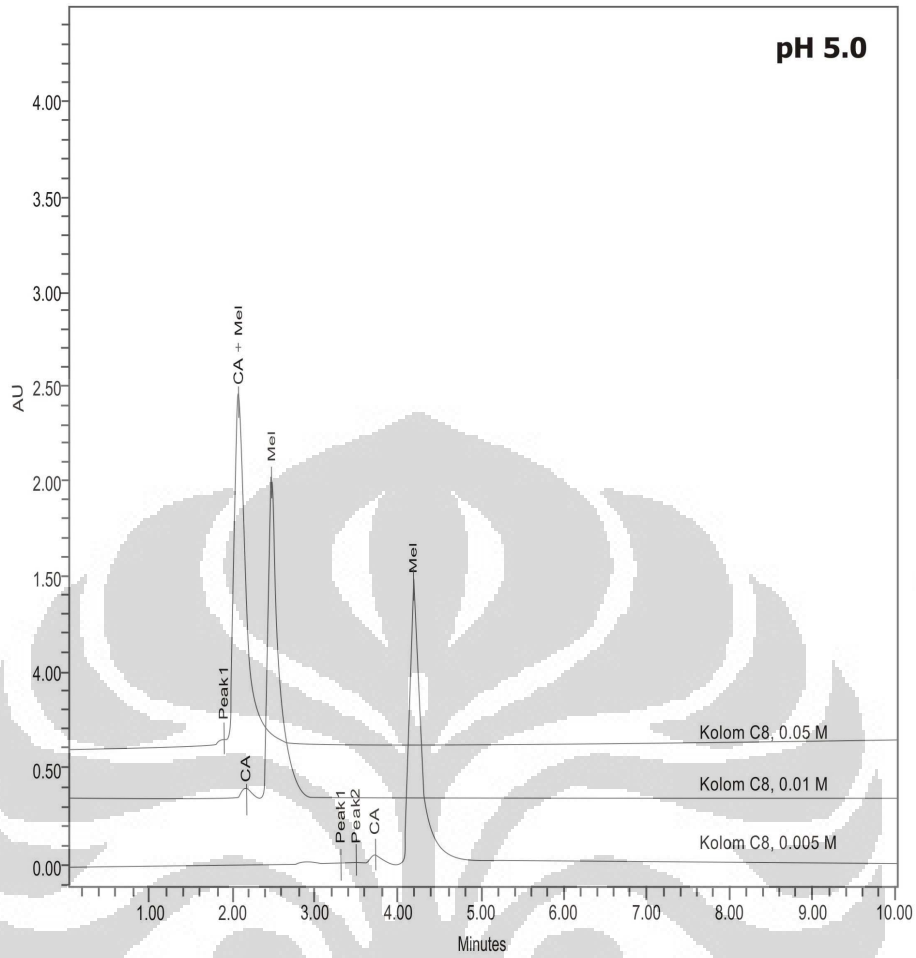
Pada pH 6,50 terlihat bahwa puncak kedua senyawa asam sianurat dan melamin teridentifikasi dengan baik dan faktor pengotornya tidak lagi terdeteksi

dengan menghasilkan faktor pemisahan yang terbaik (Lampiran 8) dan pemisahan puncaknya dapat dilihat pada Gambar 4.5.

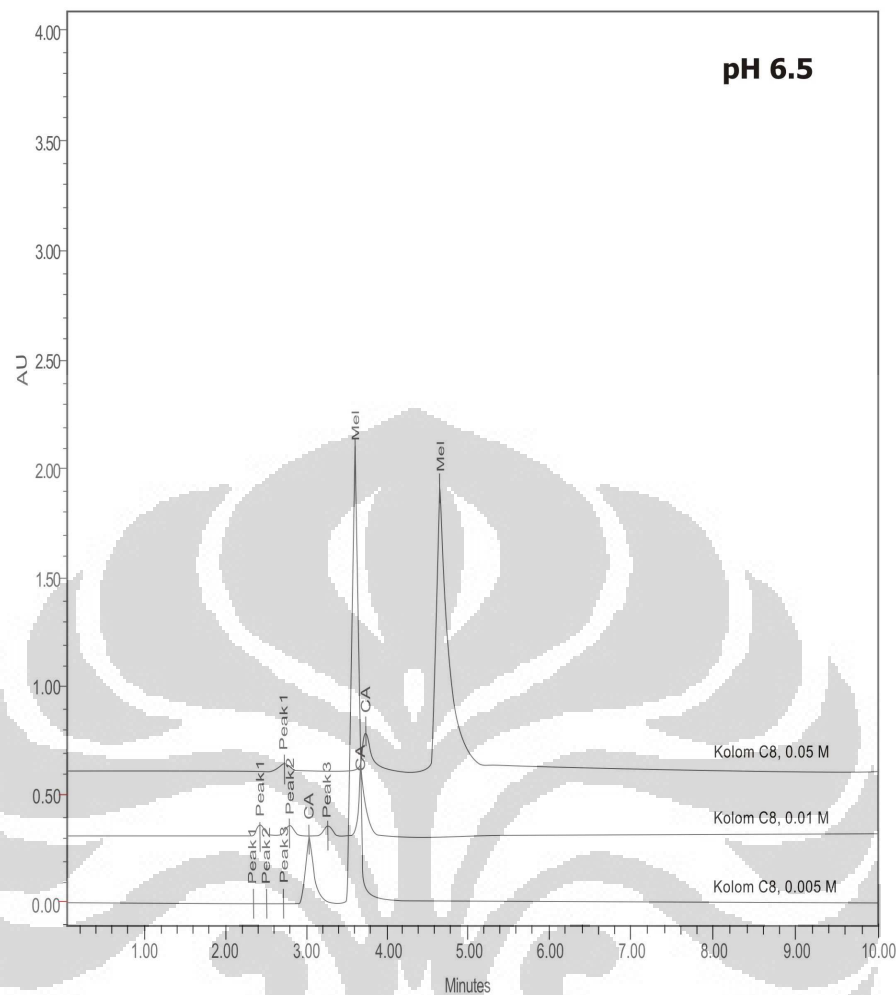


**Gambar 4.3** Pemisahan asam sianurat dan melamin pada pH 3 dengan variasi konsentrasi serta fasa gerak NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>





**Gambar 4.4** Pemisahan asam sianurat dan melamin pada pH 5 dengan variasi konsentrasi serta fasa gerak  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$



**Gambar 4.5** Pemisahan asam sianurat dan melamin pada pH 6,5 dengan variasi konsentrasi serta fasa gerak  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

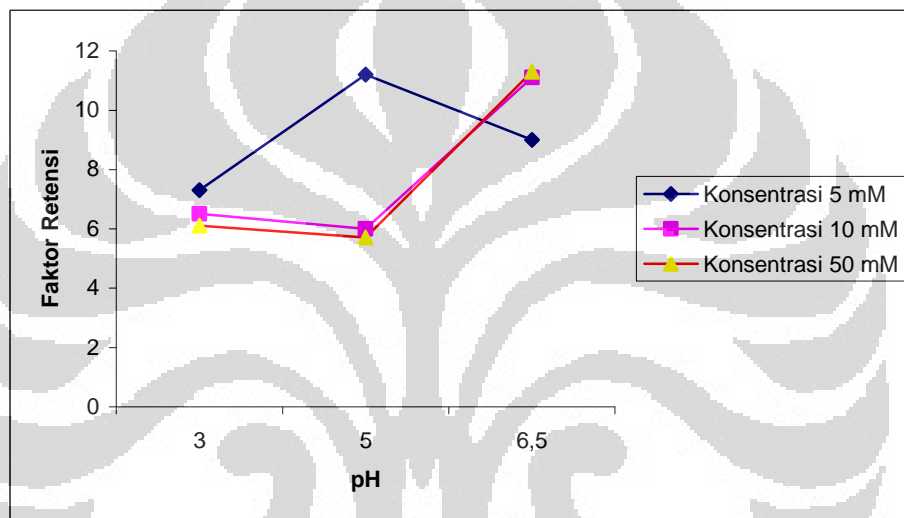
#### 4.2.2 Optimasi Pemisahan

Optimasi pemisahan dengan instrumen HPLC pada penelitian ini dilakukan dengan cara menentukan beberapa parameter kromatografi yang biasa digunakan seperti faktor retensi ( $k$ ), jumlah plat teoritis ( $N$ ), dan faktor pemisahan ( $\alpha$ ). Nilai masing-masing parameter berbeda-beda seperti tercantum pada Lampiran 8.

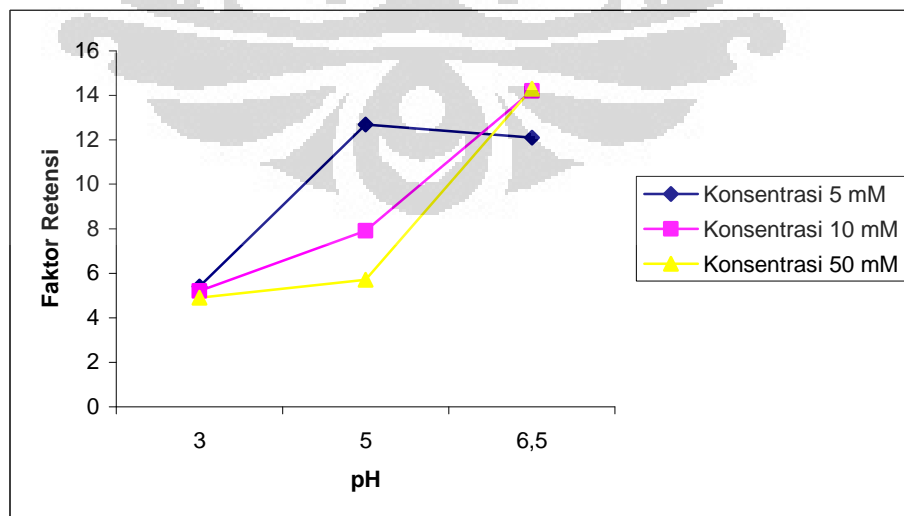
Berdasarkan data pada Lampiran 8, data analisis pemisahan yang terbaik adalah pada fasa gerak  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,005 M dengan pH 6,5 dimana nilainya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2** Data analisis pemisahan pada kolom C8 dengan fasa gerak  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,005 M dan pH 6,5

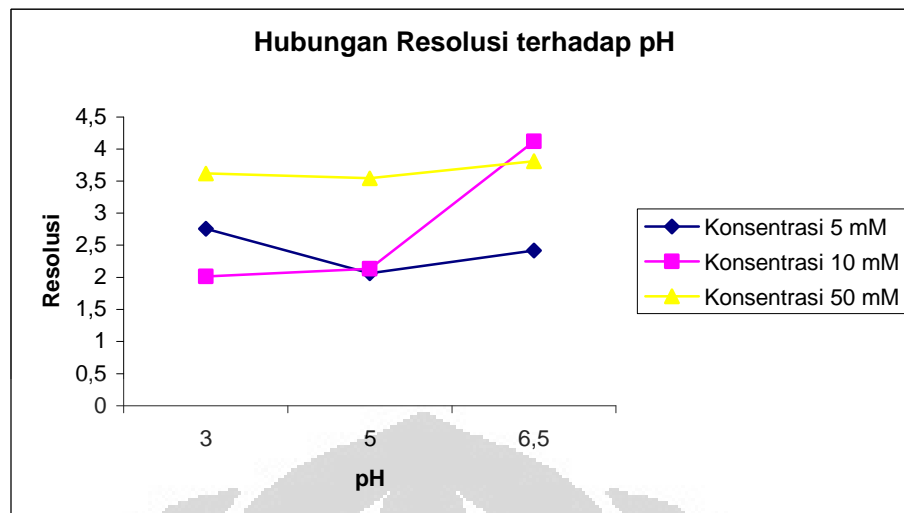
No.	Parameter Kromatografi	Nilai
1.	Faktor retensi asam sianurat ( $k_1$ )	6,0
2.	Faktor retensi melamin ( $k_2$ )	12,1
3.	Faktor pemisahan ( $\alpha$ )	1,46
4.	Jumlah plat teoritis ( $N$ )	5,984
5.	Resolusi ( $R$ )	2,418



**Gambar 4.6** Hubungan faktor retensi terhadap pH (untuk asam sianurat)



**Gambar 4.7** Hubungan faktor retensi terhadap pH (untuk melamin)



**Gambar 4.8** Hubungan resolusi terhadap pH pada konsentrasi berbeda

#### 4.2.3 Pengaruh Fasa Gerak

Pemilihan fasa gerak selain mempertimbangkan sifat kelarutan dibandingkan target analit yang ingin dianalisis juga perlu diperhatikan jenis dan bahan pengisi fasa diam yang akan digunakan. Hal ini berupaya mendapatkan pemisahan yang baik dari target analit yang diinginkan. Senyawa yang akan diukur haruslah larut dalam fasa gerak yang akan digunakan. Jika senyawa tersebut tidak larut dalam fasa gerak, maka senyawa yang kita ukur akan sulit untuk dielusi (dipisahkan) dengan baik. Puncak analitnya pun tidak akan keluar dengan tajam (*shape*) dan cenderung akan melebar puncaknya karena interaksi antara analit dengan fasa diam lebih kuat dibandingkan interaksi antara analit dengan fasa gerak.

Pada penelitian ini digunakan fasa geraknya berupa larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dimana senyawa ini bersifat polar. Senyawa melamin dapat larut dengan baik pada fasa gerak ini. Faktor lain yang juga menjadi bahan pertimbangan pemilihan pelarut ini adalah didasarkan kepada alasan efisiensi dimana harganya ekonomis mengingat penggunaannya sebagai fasa gerak secara kontinyu.

Selain larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dapat juga digunakan pelarut organik lain yang biasa digunakan dalam kromatografi cair kinerja tinggi seperti senyawa asetonitril atau metanol. Kedua senyawa tersebut dengan kualitas untuk HPLC memiliki harga yang relatif mahal dibandingkan pelarut  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mengingat penggunaan

fasa gerak yang terus-menerus dalam sistem HPLC. Penggunaan pelarut organik dapat meningkatkan biaya operasional yang cukup tinggi.

Pelarut  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,005 M pada pH 6,5 (Gambar 4.5) memberikan pemisahan yang lebih baik dibandingkan dengan variasi konsentrasi dan pH yang berbeda lainnya. Hal ini juga dapat dibuktikan dari data parameter kromatografi pada Lampiran 10.

#### 4.2.4 Pengaruh Kolom

Kolom yang digunakan terdiri atas  $\text{C}_8$  atau *octylsilane*. Bahan isian ini memiliki sifat non-polar sehingga di dalam munculnya kromatogram analitnya pun akan sangat berbeda jika digunakan kolom lain. Pada kolom  $\text{C}_8$  senyawa melamin akan terpisahkan lebih cepat dibandingkan kolom yang bersifat polar. Senyawa  $\text{C}_8$  mempunyai struktur rantai karbon yang jauh lebih panjang dibandingkan kolom  $\text{NH}_2$  (amina) sehingga menjadi jauh lebih non-polar dikarenakan perbedaan polaritasnya dimana amina lebih elektronegatif daripada  $\text{C}_8$ .

Sifat kolom berefek terhadap lamanya interaksi antara fasa diam dengan analit yang kita inginkan serta cepat atau lambatnya puncak yang keluar (muncul) ataupun bentuk ketajaman puncak yang terdeteksi.

Pelarut yang digunakan adalah  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dengan derajat kepolaran yang relatif tinggi sehingga berefek kepada efektivitas dari aktivitas kolom  $\text{C}_8$  itu sendiri. Interaksi dengan pelarut yang sangat polar dan terlalu lama dapat mendeaktivasi kolom  $\text{C}_8$  sehingga kemampuannya untuk mengikat analit yang sejenis kepolarannya akan semakin menurun dan dapat menimbulkan pergeseran waktu retensi analit dalam kolom. Menurut Mangisi (2009), kondisi ini dapat diantisipasi dengan mengalirkan fasa gerak organik (misalnya metanol) ke dalam kolom dengan konsentrasi minimal 60% selama beberapa menit saja. Konsekuensi dari perlakuan ini adalah proses analisisnya tidak dijamin secara simultan penuh dilakukan dikarenakan ada waktu jeda pengaliran fasa gerak organik tersebut.

#### 4.2.5 Pengaruh Penggunaan *Cartridge SPE*

*SPE* (*Solid Phase Extraction*) *cartridges* (Agilent SimpliQ SCX) merupakan suatu bahan yang membantu *clean up* dari matriks contoh uji yang akan diukur sehingga contoh uji tersebut memiliki kemurnian dan homogenitas yang jauh lebih baik saat pengidentifikasiannya. Pada penelitian ini digunakan *SPE* dengan bahan C<sub>8</sub> persis dengan bahan isian kolom.

Hasil yang didapatkan bahwa pada contoh uji yang telah dilewatkan *cartridge SPE* memang lebih baik homogenitasnya dilihat dari derajat kemurnian (*purity angle*) pada sistem HPLC yang lebih baik dibandingkan contoh uji yang tanpa dilewatkan *SPE* seperti dijelaskan pada Gambar 4.9.



**Gambar 4.9** Perbandingan kromatogram antara contoh uji dengan ekstraksi fasa padat (*SPE*) dan tanpa ekstraksi fasa padat (*non-SPE*)

### 4.3 Validasi Metode Analisis Melamin dan Asam Sianurat

#### 4.3.1 Linearitas

Uji linearitas merupakan suatu metode analisis yang menggambarkan kemampuan suatu alat untuk memperoleh hasil pengujian yang sebanding dengan kadar analit dalam zat uji pada rentang kadar tertentu. Linearitas metode penentuan melamin dan asam sianurat dengan HPLC ditentukan dengan cara membuat kurva hubungan antara konsentrasi standar pada sumbu  $x$  dan luas area pada sumbu  $y$ . Konsentrasi yang digunakan adalah 0,25; 0,50; 1,25; 2,50; dan 5,0 ppm.

Linearitas senyawa asam sianurat dan melamin ditetapkan dengan membuat deret standar sebanyak 5 (lima) konsentrasi pada rentang (0,25–5,00 mg/kg) dengan masing-masing pengulangan pembacaan sebanyak 4 kali. Hubungan antara konsentrasi melamin antara luas area rerata diimplementasikan dalam persamaan regresi linier dan koefisien korelasi seperti pada Tabel 4.3

Pengujian parameter ini dilakukan sebanyak empat kali pengulangan. Linearitas dinyatakan dalam koefisien korelasi ( $r$ ). Berdasarkan hasil pengujian diperoleh nilai  $R^2$  untuk standar asam sianurat dan melamin berturut-turut 0,9902 dan 0,9975. Nilai ini memenuhi syarat yang ditetapkan AOAC (2002) yaitu 0,9900. Nilai koefisien korelasi yang tinggi menunjukkan hubungan yang linear antara sinyal detektor yang terukur dan jumlah asam sianurat/melamin dalam contoh.

Pengukuran deret larutan baku melamin dengan menggunakan metode HPLC diperoleh puncak luas area dengan pola kenaikan linier (garis lurus) pada rentang konsentrasi melamin 0,25 ppm sampai dengan 5,00 ppm. Data hasil pengukuran ditunjukkan pada Tabel 4.3 dan Tabel 4.4.

Persamaan regresi linier untuk kurva standar asam sianurat adalah  $y = 150,12x + 77,327$ . Persamaan regresi linier untuk kurva standar melamin adalah  $y = 1.053,3x + 147,2$ . Nilai intersep menyatakan adanya pengaruh matriks pada larutan yang dianalisis. Nilai intersep yang semakin jauh dari nol dipengaruhi oleh matriks dalam larutan yang semakin besar. Hal ini dapat mengganggu penentuan analit dalam contoh yang akan dianalisis.

Nilai kemiringan garis menyatakan sensitivitas suatu metode. Nilai kemiringan garis yang besar menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi yang kecil sangat berpengaruh terhadap sinyal detektor yang dihasilkan sehingga suatu metode dapat dikatakan mempunyai sensitivitas yang sangat baik. Nilai kemiringan garis pada kurva standar asam sianurat dan melamin berturut-turut 150,12 dan 1.053,3. Nilai ini sangat besar sehingga perubahan konsentrasi yang sangat kecil akan berpengaruh terhadap perubahan sinyal detektor. Contoh perhitungan parameter statistika kurva standar dapat dilihat pada Lampiran 9 dan 10.

**Tabel 4.3** Parameter statistika kurva standar rerata ( $n = 4$ ) asam sianurat dan melamin

No.	Parameter Statistika	Asam Sianurat	Melamin
		Data Statistik	
1.	Persamaan regresi linier	$Y = 150,12 x + 77,327$	$y = 1.053,3 x + 147,2$
2.	Intersep	77,327	147,2
3.	Kemiringan garis	150,12	1.053,3
4.	Koefisien korelasi	0,9951	0,9987
5.	Simpangan baku regresi	33,439	98,386
6.	Simpangan baku <i>slope</i>	8,612	25,339

#### 4.3.2 Ketelitian (Presisi)

Nilai presisi diwakilkan oleh nilai simpangan deviasi dan % simpangan baku relatif (% SBR) dari keterulangan (*repeatability*) masing-masing deret standar melamin atau asam sianurat yang diukur pada suatu konsentrasi dengan multi-replikasi (sebanyak 3 kali pengulangan). Data hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan 4.7. Data awal dari tabel tersebut dapat dilihat pada Lampiran 3 dan Lampiran 4.

Presisi diwakilkan dengan mengamati nilai % simpangan baku standar (% SBR). Nilai % SBR melamin ataupun asam sianurat dari penelitian ini kurang dari 10% standar SBR yang diizinkan. Nilai % SBR berdasarkan analisis konsentrasi



pada masing-masing senyawa melamin dan asam sianurat berturut-turut adalah 4,355 dan 3,723 pada konsentrasi 0,50 ppm.

**Tabel 4.4** Hubungan antara konsentrasi melamin dengan luas area

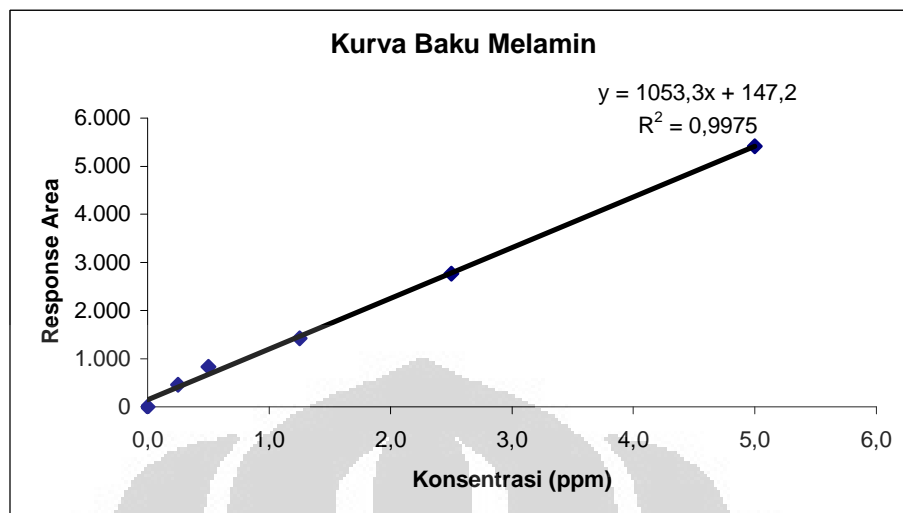
No.	Konsentrasi melamin ( <i>spiked</i> ) (mg/kg)	Waktu Retensi (menit)	Luas Area
1.	0,25	3,61	460,066
2.	0,50	3,62	830,148
3.	1,25	3,62	1.420,059
4.	2,50	3,63	2.764,948
5.	5,00	3,64	5.414,195

Keterangan: Kondisi kolom C8, pH 6,50, dan konsentrasi fasa gerak 0,005 M

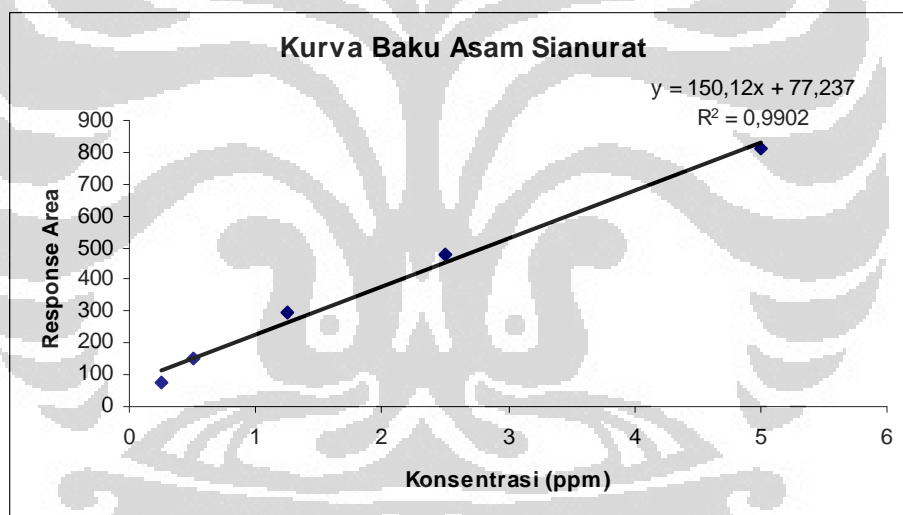
**Tabel 4.5** Hubungan antara konsentrasi asam sianurat dengan luas area

No.	Konsentrasi asam sianurat ( <i>spiked</i> ) (mg/kg)	Waktu Retensi (menit)	Luas Area
1.	0,25	3,13	76,723
2.	0,50	3,14	152,584
3.	1,25	3,13	297,162
4.	2,50	3,15	475,912
5.	5,00	3,16	809,976

Keterangan: Kondisi kolom C8, pH 6,50, dan konsentrasi fasa gerak 0,005 M



**Gambar 4.10** Kurva baku standar melamin



**Gambar 4.11** Kurva baku standar asam sianurat

**Tabel 4.6** *Repeatability* melamin pada batasan 0,25–1,00 ppm

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi Hasil Analisis		
	Rata-rata	SD (SB)	% RSD (% SBR)
0,25	0,229	0,010	4,515
0,50	0,443	0,019	4,355
1,00	0,865	0,069	7,978

**Tabel 4.7** *Repeatability* asam sianurat pada batasan 0,25–1,0 ppm

Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi Hasil Analisis		
	Rata-rata	SD (SB)	% RSD (% SBR)
0,25	0,229	0,010	4,204
0,50	0,469	0,017	3,723
1,00	0,945	0,040	4,253

### 4.3.3 Ketepatan (Akurasi)

Ketepatan metode ini ditentukan dengan metode penambahan standar dan dinyatakan sebagai persen temu balik (*recovery*). Temu balik merupakan jumlah standar yang dapat diperoleh kembali setelah ditambahkan ke dalam contoh. Ketepatan dapat menunjukkan adanya galat sistematis yang dapat mempengaruhi metode analisis. Galat sistematis dapat menyebabkan hasil analisis menjadi lebih besar atau lebih kecil dari nilai yang seharusnya.

Penentuan persentase temu balik rata-rata dari metode HPLC ini juga berdasarkan pada penentuan kandungan melamin pada contoh susu bubuk yang ditambahkan melamin dengan 3 (tiga) variasi konsentrasi masing-masing yaitu 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, dan 1,00 mg/L. Setiap variasi konsentrasi dilakukan 7 (tujuh) replikasi pengukuran seperti pada Tabel 4.8 dan 4.9.

Hasil perhitungan persentase temu balik rata-rata (*average % recovery*) melamin untuk seri konsentrasi 0,25 mg/kg mencapai 91,71%, sedangkan untuk konsentrasi 0,50 mg/kg nilainya menurun menjadi 88,63%. Demikian pula halnya dengan pengukuran untuk contoh *spiked* 1,00 mg/kg nilainya menurun menjadi 86,51%. Nilai ini masih termasuk kategori baik sebagai indikator validitas penentuan melamin dalam susu bubuk dengan metode HPLC.

Hasil perhitungan persentase temu balik rata-rata (*average % recovery*) asam sianurat untuk seri konsentrasi 0,25 mg/kg mencapai 91,66%, sedangkan untuk konsentrasi 0,50 mg/kg nilainya menurun menjadi 93,71%. Demikian pula halnya dengan pengukuran untuk contoh *spiked* 1,00 mg/kg nilainya menurun menjadi 94,53%. Nilai ini masih termasuk kategori baik sebagai indikator validitas penentuan asam sianurat dalam susu bubuk dengan metode HPLC.

**Tabel 4.8** Temu balik rerata metode HPLC untuk asam sianurat

Standar Asam Sianurat (mg)		Temu balik (%)
Ditambahkan	Ditemukan	
0,25	0,229	91,77
0,50	0,443	88,63
1,00	0,865	86,55

**Tabel 4.9** Temu balik rerata metode HPLC untuk melamin

Standar Melamin (mg)		Temu balik (%)
Ditambahkan	Ditemukan	
0,25	0,229	91,77
0,50	0,469	93,77
1,00	0,945	94,51

#### 4.3.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi (*limit of detection*/LOD) dan batas kuantifikasi (*limit of quantification*/LOQ) ditentukan dari persamaan regresi linier kurva standar rerata hasil penentuan uji linearitas. Batas deteksi ditentukan untuk mengetahui konsentrasi analit terendah yang dapat diukur dan antara sinyal derau dengan analit dapat dibedakan. Kedua parameter ini mempunyai nilai yang berbeda bergantung pada metode yang digunakan walaupun peralatan yang digunakan sama.

Penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi dari masing-masing senyawa asam sianurat dan melamin dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier deret standar dengan batasan konsentrasi dari 0,25-5,0 ppm. Kurva baku senyawa asam sianurat dan melamin dapat dilihat pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11.

Kalkulasi batas deteksi asam sianurat berdasarkan persamaan regresi linier kurva baku seperti terlihat pada Lampiran 12. Nilai kemiringan garis regresi linier-nya 150,12 dan nilai simpangan baku-nya 33,439 sehingga nilai batas deteksi-nya 0,668 ppm. Batas deteksi asam sianurat dengan metode ini sebesar 0,668 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa sinyal antara asam sianurat dengan

derau dapat dibedakan pada konsentrasi terendah 0,668 ppm. Instrumen ini tidak dapat lagi membedakan sinyal antara derau dengan asam sianurat pada konsentrasi di bawah ini.

Kalkulasi batas kuantifikasi asam sianurat ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat ditentukan oleh suatu metode pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik. Nilai batas kuantifikasi asam sianurat berdasarkan hasil uji sebesar 2,227 ppm. Konsentrasi analit yang terukur di bawah nilai ini memberikan ketelitian dan ketepatan yang tidak baik. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantifikasi tertera pada Lampiran 12.

Kalkulasi batas deteksi melamin berdasarkan persamaan regresi linier kurva baku seperti terlihat pada Lampiran 13. Nilai kemiringan garis regresi linier-nya 1053,3 dan nilai simpangan baku-nya 98,386 sehingga nilai batas deteksi-nya 0,280 ppm. Batas deteksi melamin dengan metode ini sebesar 0,280 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa sinyal antara melamin dengan derau dapat dibedakan pada konsentrasi terendah 0,280 ppm. Instrumen ini tidak dapat lagi membedakan sinyal antara derau dengan melamin pada konsentrasi di bawah ini.

Kalkulasi batas kuantifikasi melamin ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat ditentukan oleh suatu metode pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik. Nilai batas kuantifikasi melamin berdasarkan hasil uji sebesar 0,934 ppm. Konsentrasi analit yang terukur di bawah nilai ini memberikan ketelitian dan ketepatan yang tidak baik. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantifikasi tertera pada Lampiran 13.

Jika dibandingkan dengan metode-metode lain yang banyak digunakan dalam analisis melamin seperti GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) dan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*), maka batas deteksi ini dirasa cukup memadai mengingat kontaminasi melamin biasanya bukanlah pada konsentrasi yang sangat kecil (level konsentrasi ppb). Melamin memang sengaja ditambahkan dengan tujuan peningkatan kadar ekonomis. Penentuan batas deteksi ini dirasa sudah mencukupi sebagai langkah awal untuk mendeteksi sedini mungkin pencemaran dari senyawa melamin.

#### 4.4 Analisis Asam Sianurat dan Melamin dalam Sampel dengan HPLC

Penghilangan protein dalam produk pangan sering dikaitkan dengan pengendapan protein, misalnya menggunakan asam trikloroasetat, garam logam (sebagai contoh zink asetat), dan pelarut organik (Jonathan et al., 2008). Pada penelitian ini, metanol digunakan sebagai pelarut ekstraksi (*extraction solvent*) dan pengendapan protein (*protein precipitant*).

Pada penetapan terhadap contoh uji (sampel) ditemukan contoh uji positif terkontaminasi asam sianurat dan melamin. Selain itu dilakukan juga penambahan sejumlah tertentu konsentrasi standar asam sianurat ataupun melamin yang telah diketahui untuk memastikan kemunculan puncak senyawa tersebut dan sebagai uji terhadap kemampuan metode seperti pada Lampiran 16. Pada pengukuran contoh uji ditemukan kadar melamin dan asam sianurat yang bervariasi. Kondisi optimum dan metode tervalidasi validasi yang didapat digunakan untuk penentuan asam sianurat dan melamin dalam beberapa produk susu formula. Kromatogram dari beberapa sampel dapat dilihat pada Lampiran 16. Hasil analisis kandungan asam sianurat dan melamin pada sampel susu formula A, B, dan C dapat dilihat pada Tabel 4.10 dan Tabel 4.11.

Hasil pada Tabel 4.10 dan Tabel 4.11 menunjukkan bahwa metode validasi yang digunakan cukup baik dan menghasilkan persen temu balik (*recovery*) yang cukup tinggi. Temu balik *spike* melamin berkisar pada 64-69% (Tabel 4.7) dengan menggunakan metode validasi dengan presisi yang baik. Lampiran 18-23 menunjukkan beberapa kromatogram yang sesuai dengan analisis pada sampel yang di-*spike*.

**Tabel 4.10** Kadar asam sianurat (AC) dan melamin (MM) sampel

No.	Sampel Susu	Kadar		% SBR (n = 3)	
		AC	MM	AC	MM
1.	A	10,21 mg/L	93,42 mg/L	4,206	8,745
2.	B	9,33 mg/L	87,65 mg/L	4,312	7,562
3.	C	6,34 mg/L	78,82 mg/L	4,210	6,458

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemisahan asam sianurat dan melamin berlangsung optimum dengan fasa gerak  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pada pH 6,5 dan konsentrasi 0,005 M.
2. Parameter pemisahan antara asam sianurat dan melamin adalah berturut-turut:  $k_1 = 6,0$ ;  $k_2 = 12,1$ ; faktor pemisahan ( $\alpha$ ) = 1,46; jumlah plat teoritis ( $N$ ) = 5,984; dan resolusi ( $R$ ) = 2,418.
3. Rerata persentase temu balik (*percent recovery*) yang diperoleh masing-masing terhadap asam sianurat dan melamin lebih besar dari 90%.
4. Batas deteksi yang dapat dicapai untuk asam sianurat dan melamin berturut-turut sebesar 0,668 ppm dan 0,280 ppm.
5. Batas kuantifikasi yang dapat dicapai untuk asam sianurat dan melamin berturut-turut sebesar 2,227 ppm dan 0,934 ppm.
6. Contoh uji yang berasal dari susu bubuk positif mengandung melamin dengan kadar yang bervariasi berturut-turut dari 6,34-10,21 ppm.
7. Persentase temu balik (*recovery*) *spike* melamin pada sampel berkisar antara 66,89% - 67,79%.

#### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disarankan beberapa hal sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan uji terhadap parameter validasi yang lain, seperti selektivitas, ketangguhan, dan ketidakrataan.
2. Perlu dilakukan pengembangan metode optimasi, yaitu optimasi untuk fase gerak (eluen) yang digunakan pada HPLC supaya diperoleh waktu retensi yang lebih singkat.

**Tabel 4.11** Temu balik (*recovery*) *spike* asam sianurat dan melamin pada sampel

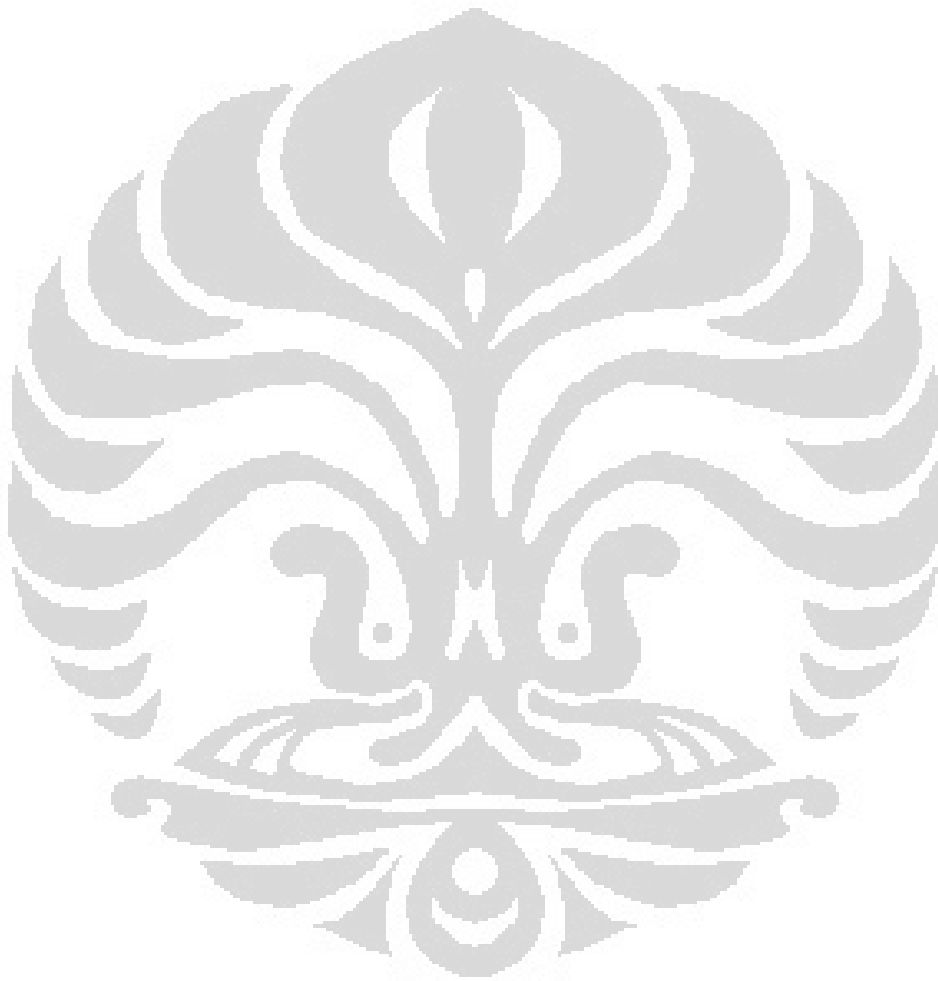
No.	Sampel Susu Formula	Kadar Awal (mg L <sup>-1</sup> )		Kadar MM yang Ditambahkan (mg L <sup>-1</sup> )	Kadar Hasil Analisis (mg L <sup>-1</sup> )*	Temu Balik ( <i>Recovery</i> ) (%)*	Rerata ± SBR (%) (n = 3)*
		AC	MM		MM	MM	MM
1.	A	10,21	93,42	16,7	65,32	68,89	67,41 ± 2,452
					64,24	68,76	
					60,33	64,58	
2.	B	9,33	87,65	24,9	58,42	66,65	67,79 ± 1,013
					60,12	68,59	
					59,72	68,13	
3.	C	6,34	78,82	16,9	53,83	68,29	66,89 ± 1,395
					52,71	66,87	
					51,63	65,50	

(\*): Data diolah dengan melibatkan faktor pengenceran pada SPE (fp = 6)

Perbandingan antara masing-masing kromatogram (Lampiran 18-23) sampel susu formula serta penyesuaian terhadap aspek waktu retensi, ketajaman *peak*, dan lebar *peak* menunjukkan bahwa identifikasi melamin pada sampel susu formula telah benar dilakukan.



3. Perlu dilakukan pengembangan metode optimasi dengan memvariasikan jenis kolom serta laju alir yang digunakan pada HPLC.

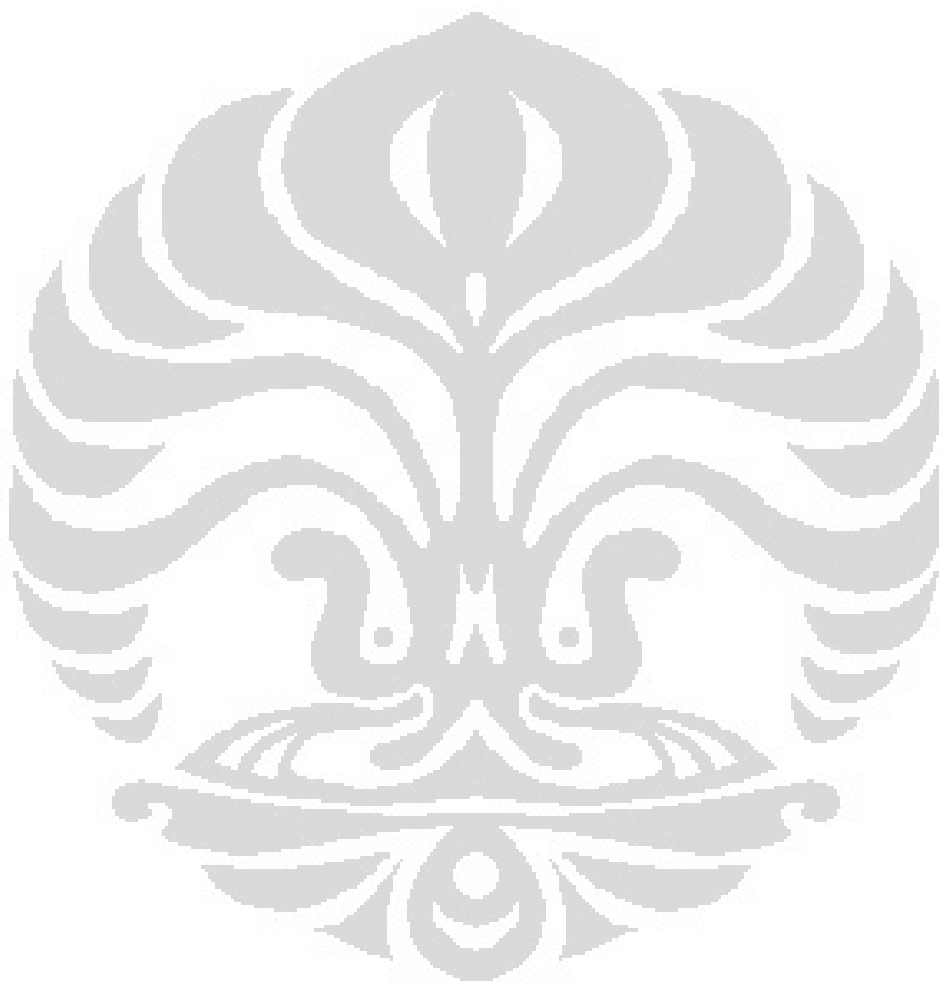


## DAFTAR PUSTAKA

- [1] AOAC. 2002. *AOAC International Method Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis*. J AOAC Int. 85:1-5 [2 September 2011]
- [2] Chan, C.C. 2004. Potency Method Validation dalam: Chan, Lee, Lam, dan Zhang (Editor). *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. New Jersey: Jersey.
- [3] Chen-Hao, Z., et al. 2008. *Determination of Melamine Residu in Milk Powder and Egg Using Agilent SampliQ Polymer SCX Solid Phase Extraction and the Agilent 1200 Series HPLC/UV*. Application Note - Food Safety, Agilent Technologies, Inc., USA.
- [4] Depkes RI. 2001. *Petunjuk Operasional Penerapan CPOB*. Edisi ke-2. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- [5] Dionex Corporation. 2008. *Determination of Melamine in Milk Powder by Reversed-Phase HPLC with UV Detection*. Application Note No. 224.
- [6] Ding, T., et al. 2008. *Determination of Melamine Residue in Plant Origin Protein Powders using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Chinese Journal of Chromatography, 26, 6-9.
- [7] Feng, J.W., et al. 2008. *Determination of Melamine and Cyromazine in Milk and Dairy Products by LC-MS/MS*. Modern Food Science and Technology, 24, 1058-1060.
- [8] Harmita. 2004. *Majalah Ilmu Kefarmasian UI*. Depok: FMIPA UI.
- [9] Jeffery, R. 1996. *Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits*. Laboratory Certification Program, Wisconsin. Departement of Natural Resources (<http://www.dnr.state.wi.us>)
- [10] Jonathan, et al. 2008. *GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, and Cyanuric Acid*. Laboratory Information Bulletin (LIB) No. 4423. Vol.24. U.S Food and Drug Administration.

- [11] Kim, B., et al. 2008. *Determination of Melamine in Pet Food by Enzyme Immunoassay, High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection, Ultra-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*. Journal of AOAC International, 21, 408-413.
- [12] Levin, S. 2002. *Quantitative Work in HPLC*. <http://forumsci.co.il/HPLC>. Diakses 6 Desember 2011.
- [13] Mangisi, R. 2009. *Optimasi dan Validasi Metode Penetapan Melamin dalam Pakan Ternak dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC)*. Skripsi UI. Depok: Departemen Kimia FMIPA UI.
- [14] Michael, S. and Alexander, J.K. 2008. *Interim Method for Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Foods using LC-MS/MS: Version 1.0*. Laboratory Information Bulletin (LIB) No.422. U.S Food and Drug Administration.
- [15] Min, C. and Yun, Z. 2008. *Trace-Level Analysis of Melamine in Milk Products on Agilent 7890A/5975C GC/MSD Using a New Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert Column and SampliQ SCX Cartridges, Application Note*. Agilent Technologies Co. Ltd., Shanghai-Cina.
- [16] Muniz-Valencia, R., et al. 2008. *Method Development and Validation for Melamine and Its Derivatives in Rice Concentrates by Liquid Chromatography*. Application to Animal Feed Samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 392, 523-531.
- [17] Sherri, T. 2008. *Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS*. Laboratory Information Bulletin (LIB) No. 4421. Vol. 24. U.S Food and Drug Administration.
- [18] Sun, H. et al. 2010. *A Sensitive and Validated Method for Determination of Melamine Residue in Liquid Milk by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography with Solid-Phase Extraction*. Food Control 21 (686-691). Elsevier.
- [19] World Health Organization. 2008. *Melamine and Cyanuric Acid : Toxicity*. Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food.

- [20] Zamri, R.J. 2008. *Validasi Metode Penentuan Kadar Apigenin dalam Ekstrak Seledri dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Skripsi IPB. Bogor: Departemen Kimia FMIPA IPB.





**Lampiran 1.** Rangkaian instrumentasi HPLC



**Lampiran 2.** Syringe 100  $\mu$ L



**Lampiran 3.** Alat sonifikator



**Lampiran 4. Pembuatan Bufer pH 2,2 – 7,4 (Bufer Asam Sitrat - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)**

pH	A (mL)	B (mL)
2,2	39,20	0,80
2,4	37,52	2,48
2,6	35,64	4,36
2,8	33,66	6,34
3,0	31,78	8,22
3,2	30,12	9,88
3,4	28,60	11,40
3,6	27,12	12,88
3,8	25,80	14,20

pH	A (mL)	B (mL)
4,0	24,58	15,42
4,2	23,44	16,56
4,4	22,36	17,64
4,6	21,30	18,70
4,8	20,28	19,72
5,0	19,40	20,60
5,2	18,56	21,44
5,4	17,70	22,30
5,6	16,80	23,20

pH	A (mL)	B (mL)
5,8	15,82	24,18
6,0	14,74	25,26
6,2	13,56	26,44
6,4	12,30	27,70
6,6	10,90	29,10
6,8	9,10	30,90
7,0	7,06	32,94
7,2	5,22	34,78
7,4	3,66	36,34

Keterangan:

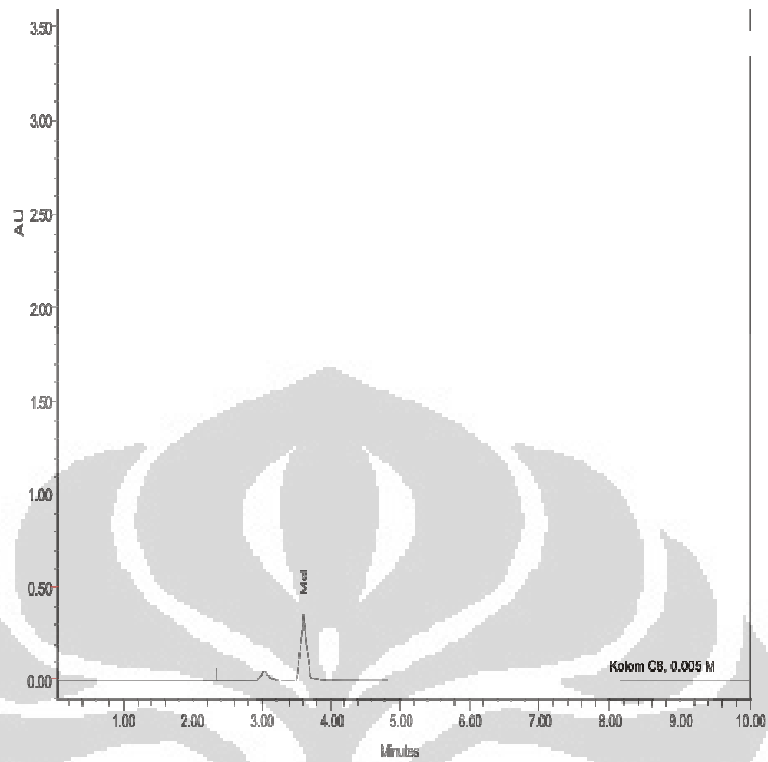
**Larutan A**

(Timbang 10,507 gram C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O; masukkan ke labu takar 500 mL; tuangi akuades 100 mL dan homogenkan; encerkan dengan akuades sampai tanda batas).

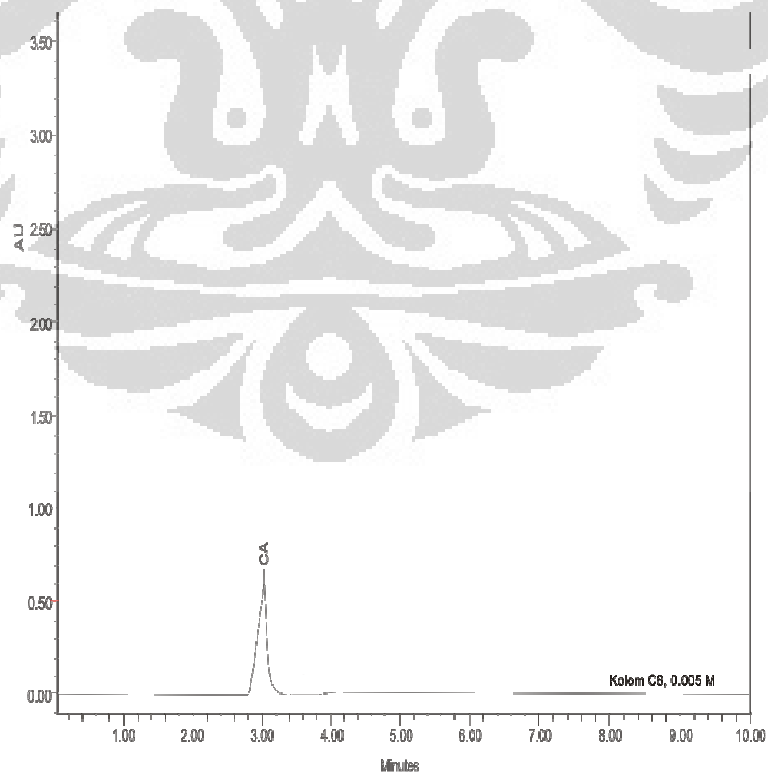
**Larutan B**

(Timbang 26,809 gram Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; masukkan ke labu takar 500 mL; tuangi akuades 100 mL dan homogenkan; tambah lagi akuades sampai tanda batas).

**Lampiran 5.** Kromatogram larutan baku melamin 0,25 mg/L

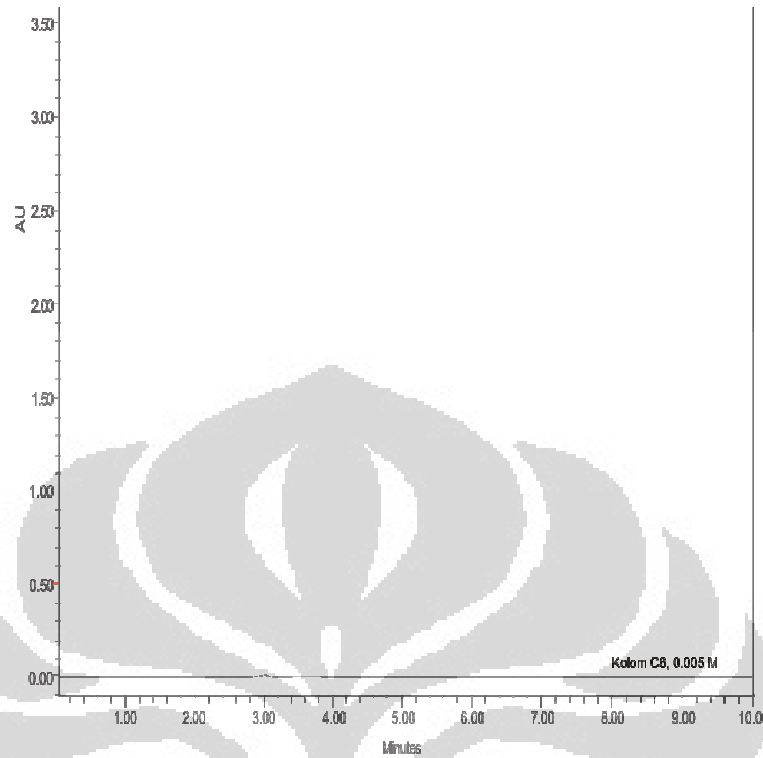


**Lampiran 6.** Kromatogram larutan baku asam sianurat 0,25 mg/L





**Lampiran 7.** Kromatogram tanpa penambahan melamin dan asam sianurat



**Lampiran 8.** Pemilihan Kondisi Optimum Analisis Melamin dan Asam Sianurat

Fase Gerak	Rasio (%)	Kons. (mM)	pH	Waktu Retensi		Faktor Retensi		Parameter Kromatografi		
				CA	MM	CA	MM	Resolusi USP	Selektivitas ( $\alpha$ )	Jumlah Plat (N)
				C8		C8		C8		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	5	3	2,54	1,96	7,3	5,4	2,754	0,74	2,363
			5	3,70	4,16	11,2	12,7	2,065	1,13	5,482
			6,5	3,03	3,20	9,0	12,1	2,418	1,46	5,984
		10	3	2,29	1,88	6,5	5,2	2,012	0,80	1,682
			5	2,14	2,70	6,0	7,9	2,134	1,32	2,171
			6,5	3,65	4,59	11,1	14,2	4,121	1,28	6,186
		50	3	2,14	1,80	6,1	4,9	3,618	0,80	1,975
			5	2,04	2,04	5,7	5,7	3,542	1,00	1,311
			6,5	3,72	4,63	11,3	14,3	3,810	1,27	5,542

**Lampiran 9.** Perhitungan persamaan regresi dari kurva kalibrasi melamin

No.	X	Y	XY	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>
1.	0	0	0	0	0
2.	0,25	460,066	115,017	0,0625	211.661
3.	0,50	830,148	415,074	0,25	689.146
4.	1,25	1.420,059	1.775,07	1,5625	2.016.568
5.	2,50	2.764,948	6.912,37	6,25	7.644.937
6.	5,00	5.414,195	27.071	25	2,9E+07
Σ	9,5	10.889,4	36.288,5	33,125	4E+07

$$y = ax + b$$

$$a = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$= \frac{6(36.288,5) - (9,5)(10.899,4)}{6(33,125) - (9,5)^2}$$

$$= 1.053,3$$

$$b = y - ax$$

$$= 1.420,059 - (1.053,3)(1,25)$$

$$= 147,20$$

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}}$$

$$= \frac{6(36.288,5) - (9,5)(10.899,4)}{\sqrt{[6(33,125) - (9,5)^2][6(4E+07) - (10.899,4)^2]}}$$

$$= 0,9987$$

Persamaan linier yang didapat adalah  $y = 1.053,3x + 147,20$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,9987.

**Lampiran 10.** Perhitungan persamaan regresi dari kurva kalibrasi asam sianurat

No.	X	Y	XY	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>
1.	0	0	0	0	0
2.	0,25	76,723	19,1808	0,0625	5.886,419
3.	0,50	152,584	76,292	0,25	23.281,877
4.	1,25	297,162	371,453	1,5625	88.305,254
5.	2,50	475,912	1.189,78	6,25	226.492,232
6.	5,00	809,976	4.049,88	25	656.061,121
Σ	9,5	1.812,36	5.706,59	33,125	1.000.026,902

$$y = ax + b$$

$$a = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$= \frac{6(5.706,59) - (9,5)(1.812,36)}{6(33,125) - (9,5)^2}$$

$$= 150,12$$

$$b = y - ax$$

$$= 297,162 - (150,12)(1,25)$$

$$= 77,237$$

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}}$$

$$= \frac{6(5.706,59) - (9,5)(1.812,36)}{\sqrt{[6(33,125) - (9,5)^2][6(1.000.026,902) - (1.812,36)^2]}}$$

$$= 0,9951$$

Persamaan linier yang didapat adalah  $y = 150,12x + 77,237$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,9951.

**Lampiran 11.** Penentuan persen temu balik melamin

Standar Melamin (mg)		Temu	Rerata Temu Balik (%)	Batas Galat	SBR (%)
Ditambahkan	Terukur	Balik (%)			
	0,229	91,77			
0,25	0,230	92,00	91,66	0,0025	0,437
	0,228	91,20			
	0,469	93,71			
0,50	0,464	92,80	93,77	0,0124	1,066
	0,474	94,80			
	0,945	94,53			
1,00	0,938	93,80	94,51	0,0174	0,741
	0,952	95,20			

Contoh perhitungan untuk jumlah standar yang ditambahkan 0,25 mg ulangan 1.

$$\begin{aligned} \%PK &= \frac{a-b}{c} \times 100\% \\ &= \frac{0,229}{0,25} \times 100\% \\ &= 91,77\% \end{aligned}$$

dengan

$a$  = konsentrasi contoh + konsentrasi standar yang terukur (mg)

$b$  = konsentrasi contoh (mg)

$c$  = konsentrasi standar teoritis yang ditambahkan (mg)

$$SB = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0,0010$$

$$\text{Simpangan Baku Relatif (SBR) (\%)} = \frac{100SB}{x} = 0,437$$

dengan

$x_i$  = persen temu balik ulangan ke- $i$

$\bar{x}$  = rerata persen temu balik

$n$  = banyaknya ulangan ( $n = 3$ )

$$\begin{aligned}\text{Batas Galat} &= \frac{t \times SB}{\sqrt{n}} \\ &= \frac{4,3030 \times 0,001}{\sqrt{3}} \\ &= 0,0025\end{aligned}$$

**Lampiran 12.** Perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) asam sianurat

No.	Konsentrasi (ppm)	Luas Area	$y_i$	$y - y_i$	$(y - y_i)^2$
1.	0,25	76,723	114,857	- 38,134	1.454,20
2.	0,50	152,584	152,387	0,197	0,04
3.	1,25	297,162	264,977	32,185	1.035,87
4.	2,50	475,912	452,627	23,285	542,19
5.	5,00	809,976	827,927	- 17,951	322,24
Jumlah			$\Sigma$		3.354,54

$$\begin{aligned}SB &= \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} \\ &= \sqrt{\frac{3.354,54}{5 - 2}} \\ &= 33,439\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}LOD &= \frac{3 \times SB}{Slope} \\ &= \frac{3 \times 33,439}{150,12} \\ &= 0,668 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 LOQ &= \frac{10 \times SB}{Slope} \\
 &= \frac{10 \times 33,439}{150,12} \\
 &= 2,227 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

**Lampiran 13.** Perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) melamin

No.	Konsentrasi (ppm)	Luas Area	$y_i$	$y - y_i$	$(y - y_i)^2$
1.	0,25	460,066	410,525	49,541	2.454,31
2.	0,50	830,148	673,85	156,298	24.429,06
3.	1,25	1.420,06	1.463,825	- 43,766	1.915,46
4.	2,50	2.764,95	2.780,45	- 15,502	240,31
5.	5,00	5.414,20	5.413,70	0,495	0,250
Jumlah			$\Sigma$		29.039,40

$$\begin{aligned}
 SB &= \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} \\
 &= \sqrt{\frac{29.039,40}{5 - 2}} \\
 &= 98,386
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 LOD &= \frac{3 \times SB}{Slope} \\
 &= \frac{3 \times 98,386}{1.053,3} \\
 &= 0,280 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 LOQ &= \frac{10 \times SB}{Slope} \\
 &= \frac{10 \times 98,386}{1.053,3} \\
 &= 0,934 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

**Lampiran 14.** Simpangan baku regresi dan *slope* untuk standar melamin

No.	$x$	$y$	$y_i$	$y - y_i$	$(y - y_i)^2$	$(x_i - \bar{x})^2$
1.	0,25	460,066	410,525	49,541	2.454,31	2,723
2.	0,50	830,148	673,85	156,298	24.429,06	1,960
3.	1,25	1.420,06	1.463,825	- 43,766	1.915,46	0,423
4.	2,50	2.764,95	2.780,45	- 15,502	240,31	0,360
5.	5,00	5.414,20	5.413,70	0,495	0,250	9,610
Jumlah	$\Sigma$				29.039,40	15,075

$$\text{Simpangan Baku Regresi } (S_r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y)^2}{n - 2}} = 98,386$$

$$\text{Simpangan Baku Kemiringan } (S_b) = \frac{S_r}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} = 25,339$$

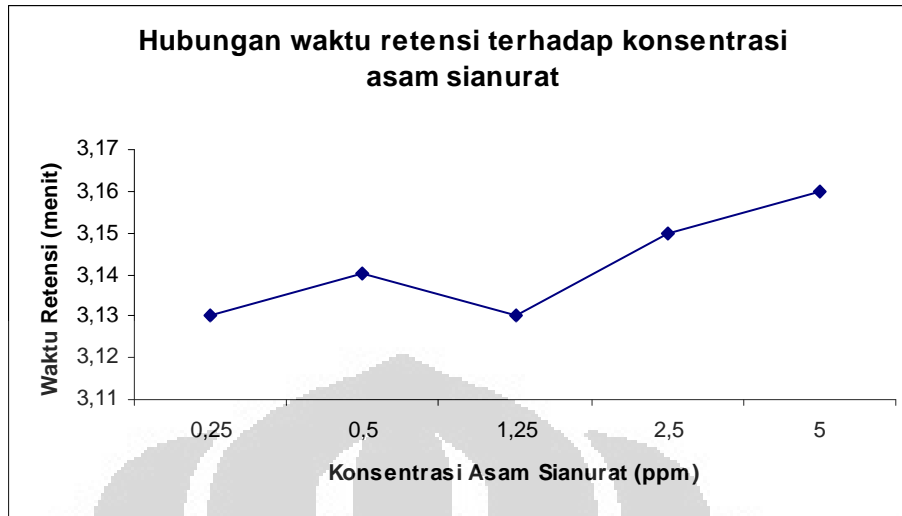
**Lampiran 15.** Simpangan baku regresi dan *slope* untuk standar asam sianurat

No.	$x$	$y$	$y_i$	$y - y_i$	$(y - y_i)^2$	$(x_i - \bar{x})^2$
1.	0,25	76,723	114,857	- 38,134	1.454,20	2,723
2.	0,50	152,584	152,387	0,197	0,04	1,960
3.	1,25	297,162	264,977	32,185	1.035,87	0,423
4.	2,50	475,912	452,627	23,285	542,19	0,360
5.	5,00	809,976	827,927	- 17,951	322,24	9,610
Jumlah	$\Sigma$				3.354,54	15,075

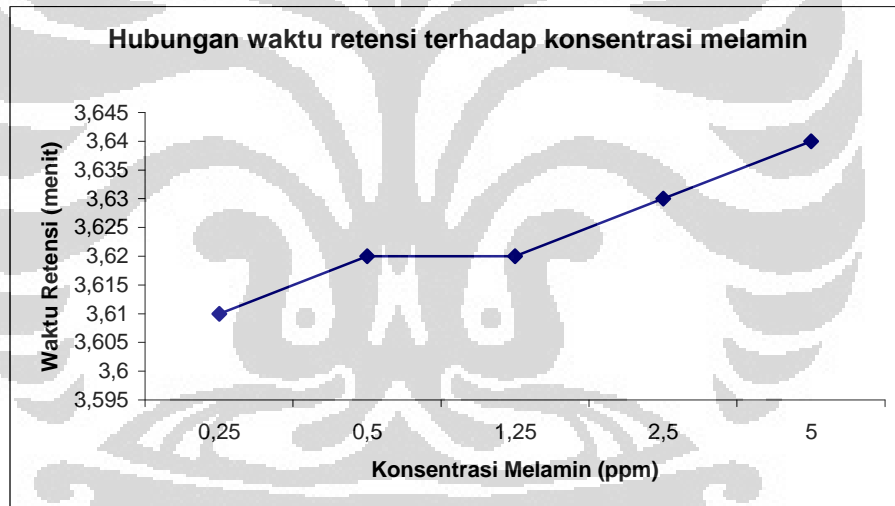
$$\text{Simpangan Baku Regresi } (S_r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y)^2}{n - 2}} = 33,439$$

$$\text{Simpangan Baku Kemiringan } (S_b) = \frac{S_r}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} = 8,612$$

**Lampiran 16.** Hubungan waktu retensi terhadap konsentrasi asam sianurat

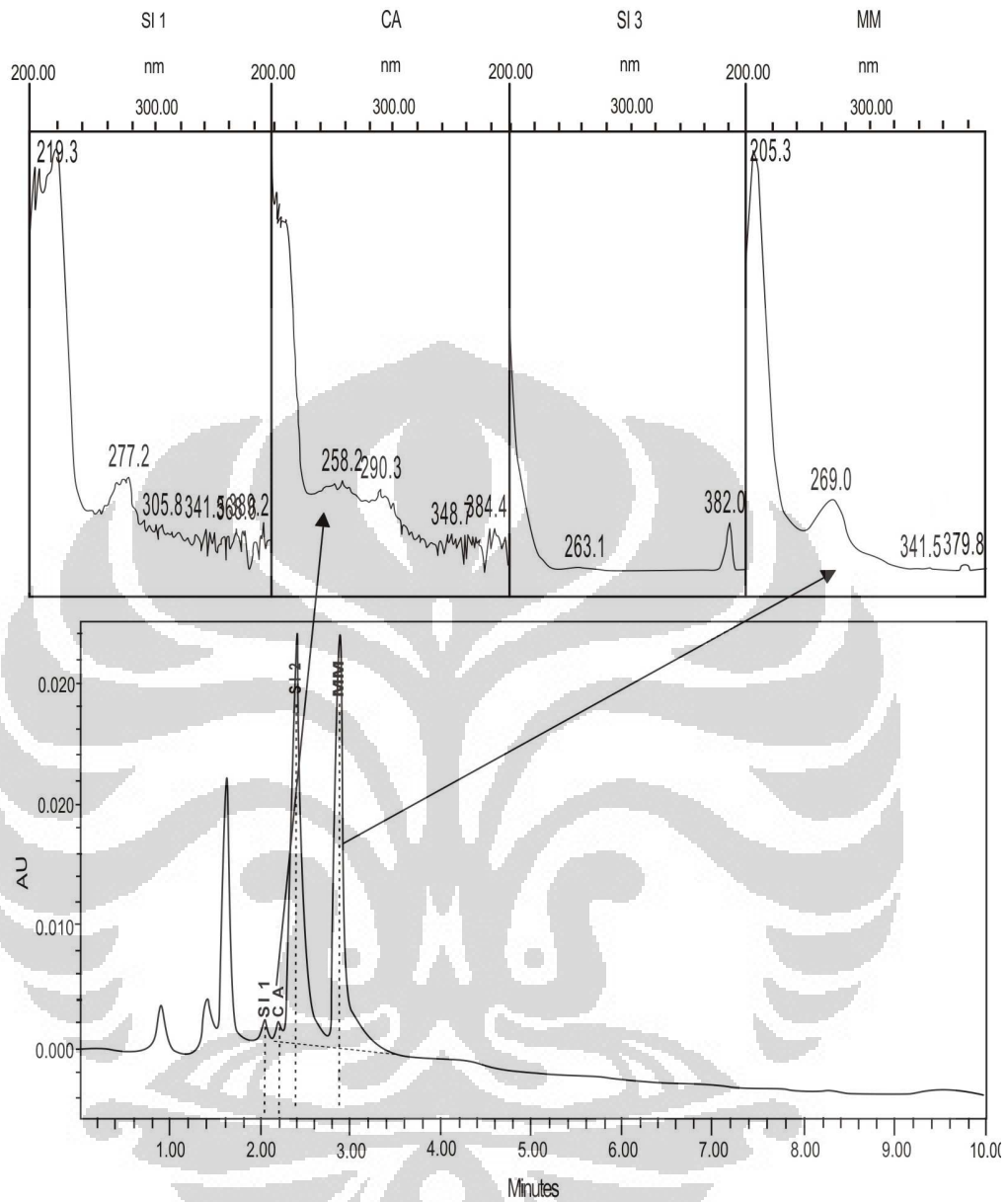


**Lampiran 17.** Hubungan waktu retensi terhadap konsentrasi melamin

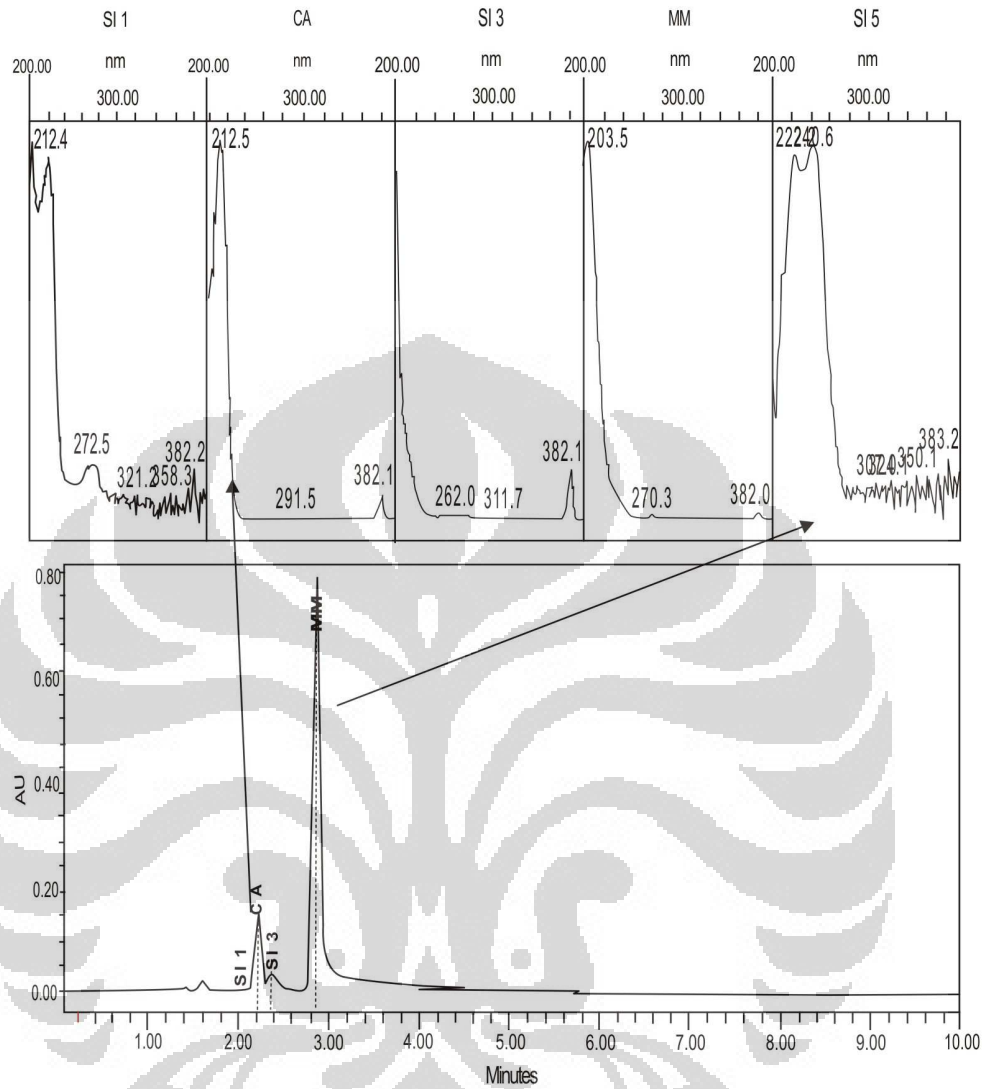




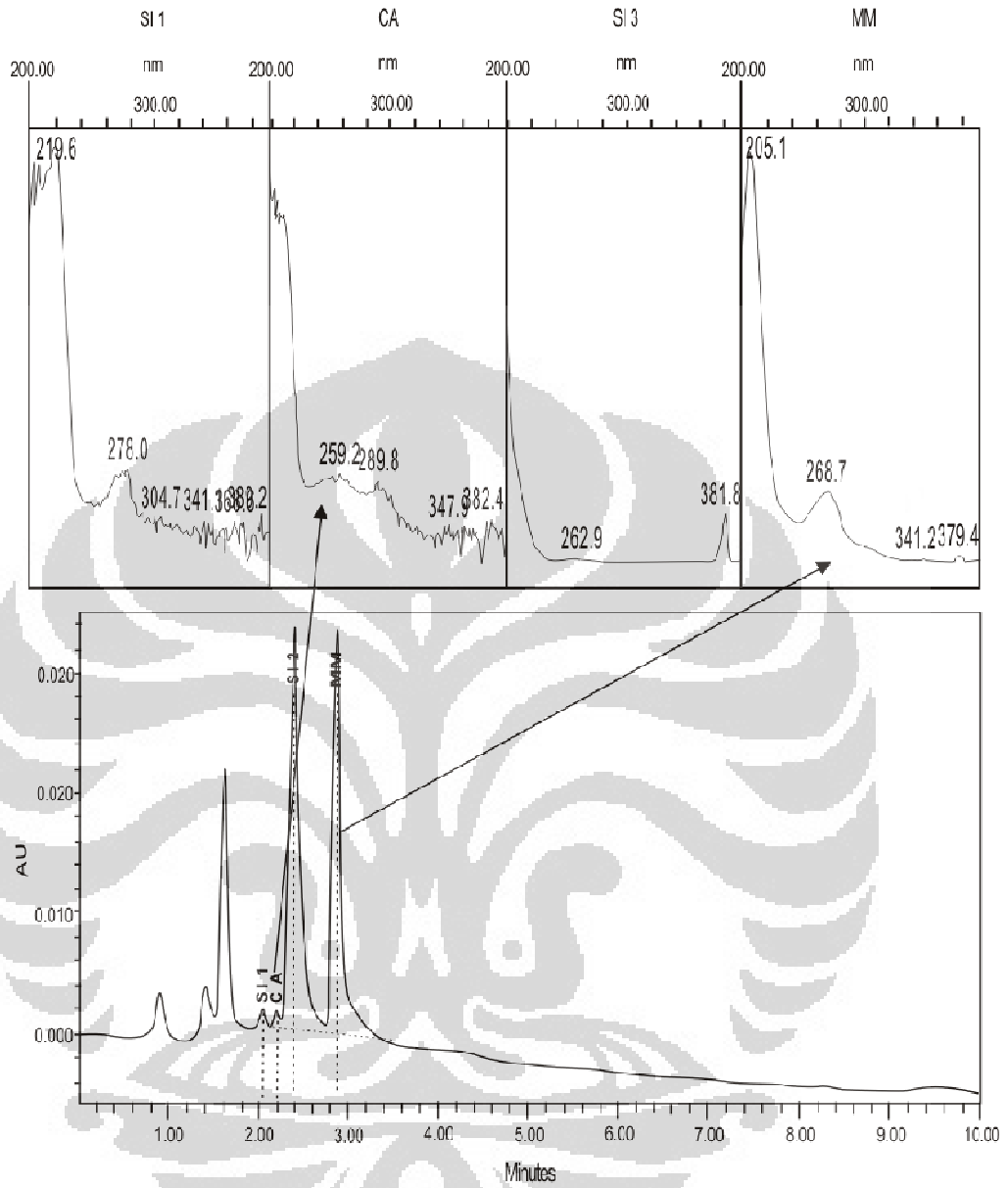
**Lampiran 18.** Deteksi asam sianurat dan melamin pada susu bubuk A



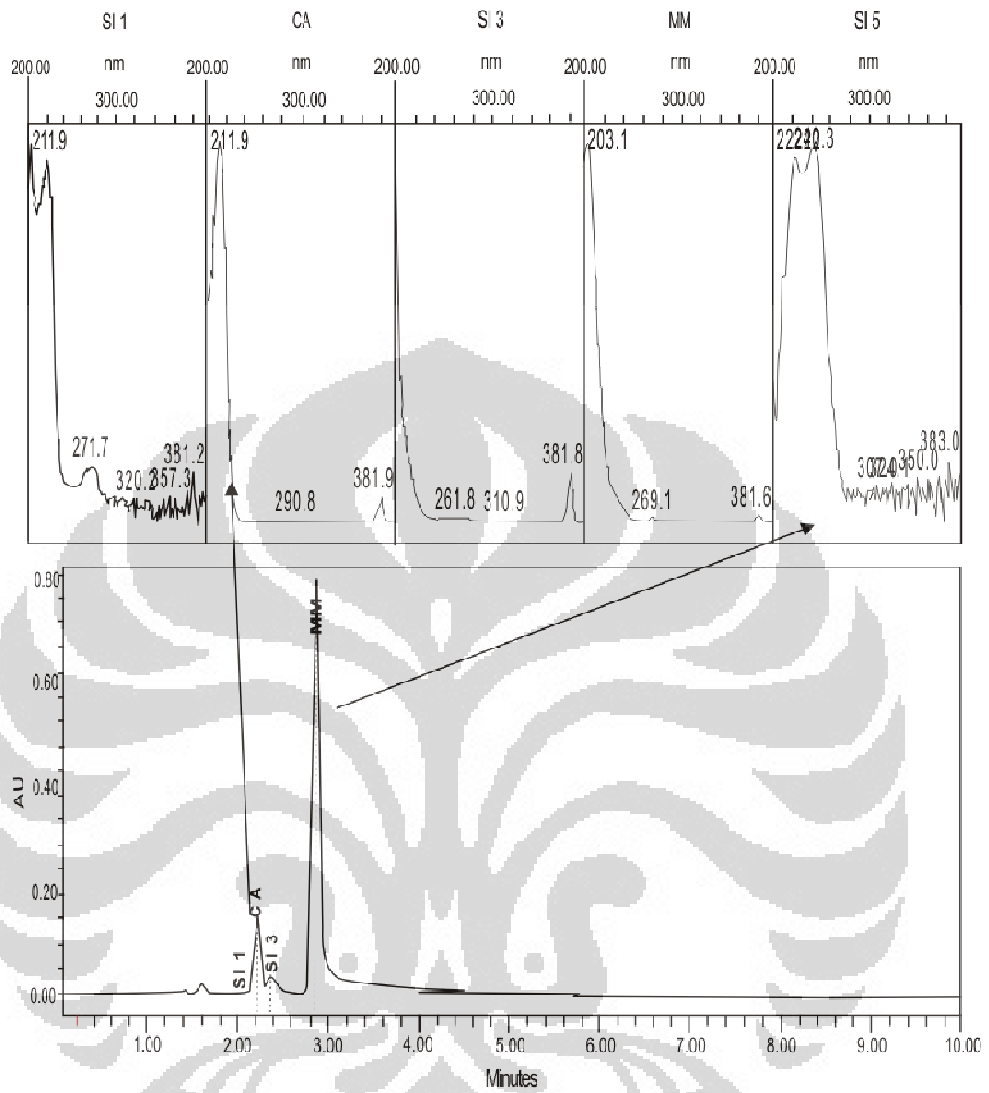
**Lampiran 19.** Deteksi asam sianurat dan melamin pada *spike* susu bubuk A



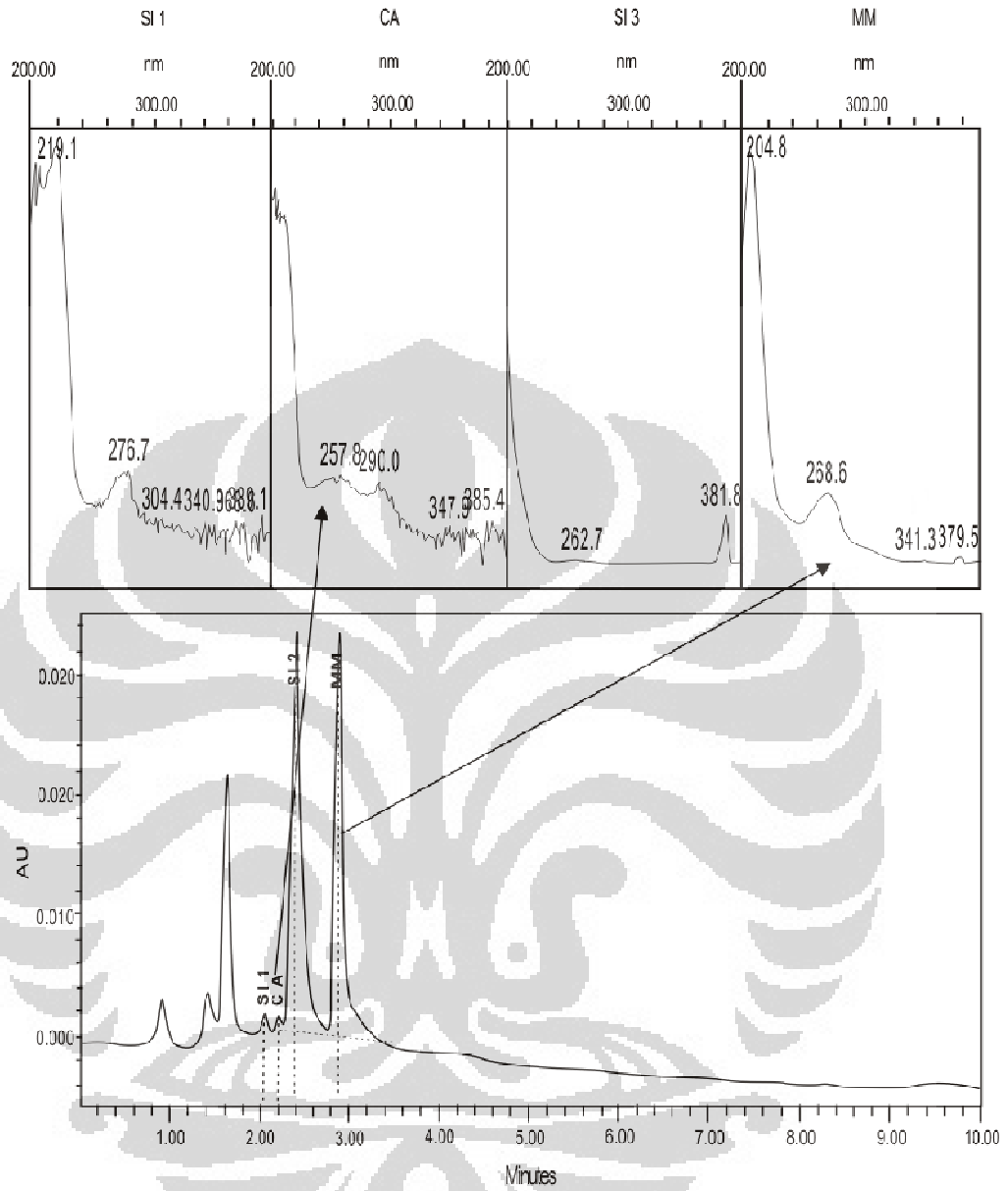
**Lampiran 20. Deteksi asam sianurat dan melamin pada susu bubuk B**



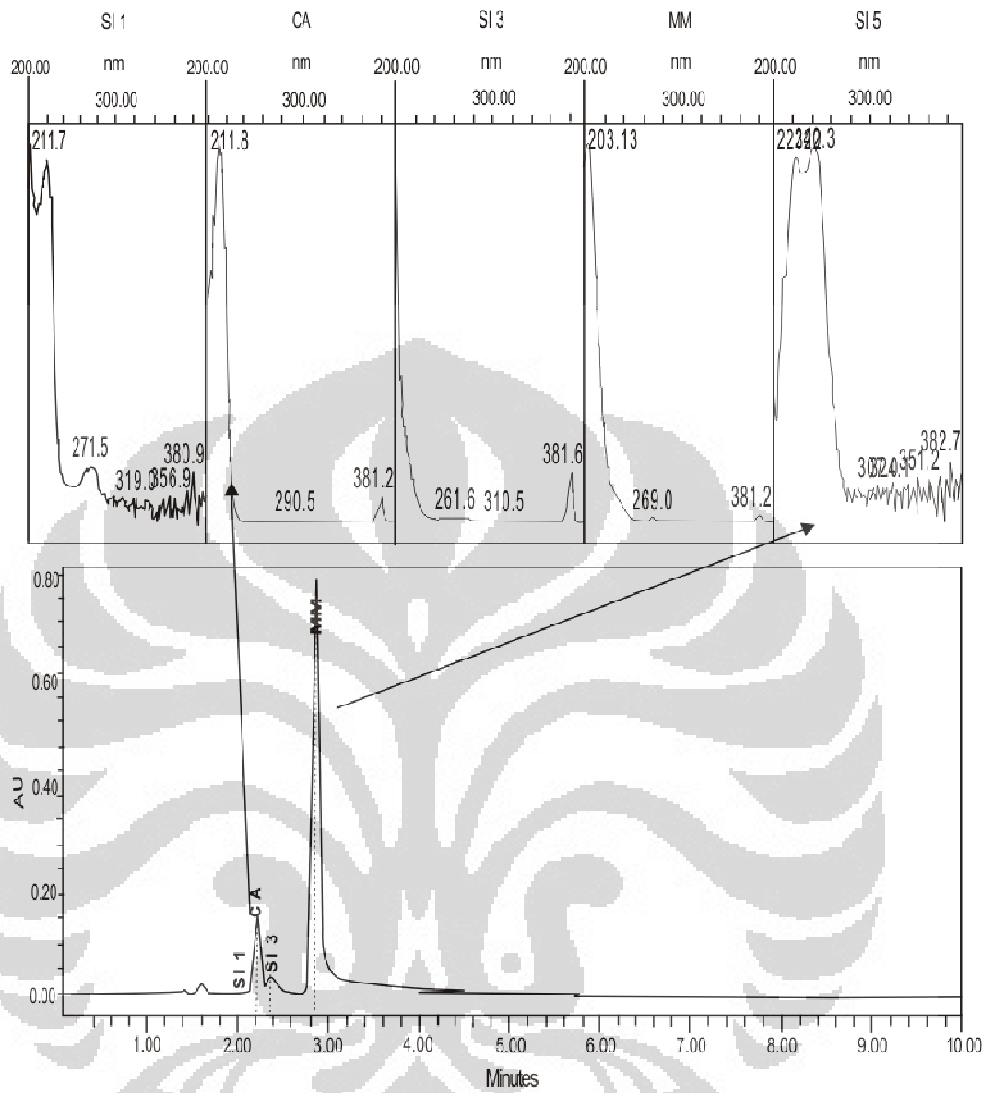
**Lampiran 21.** Deteksi asam sianurat dan melamin pada *spike* susu bubuk B



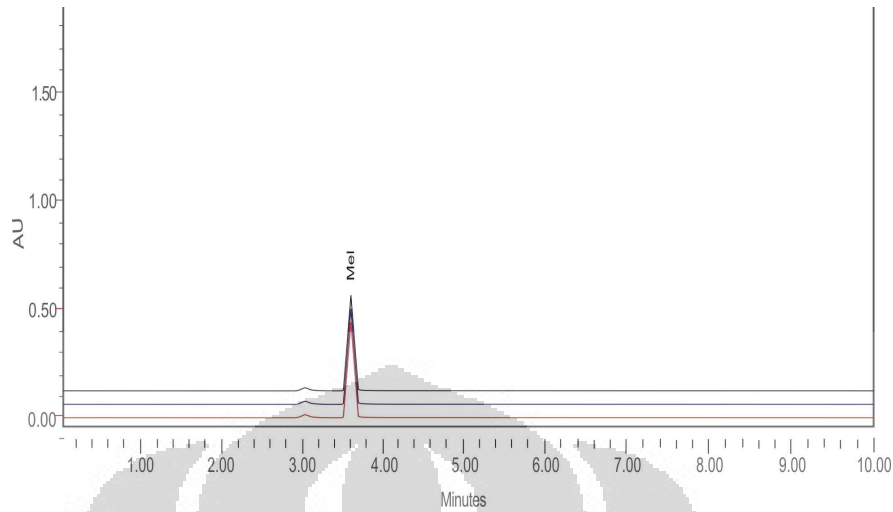
**Lampiran 22. Deteksi asam sianurat dan melamin pada susu bubuk C**



**Lampiran 23.** Deteksi asam sianurat dan melamin pada *spike* susu bubuk C



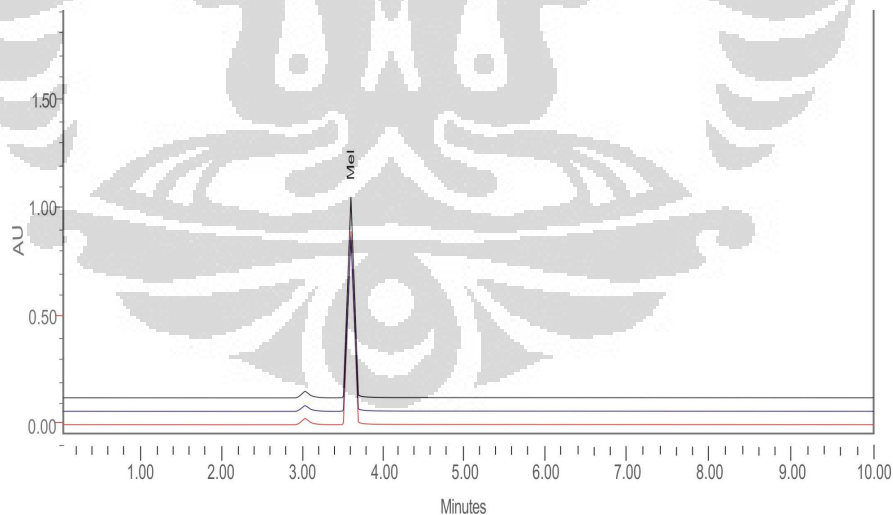
**Lampiran 24. Kromatogram standar melamin 0,25 mg/L dengan 3 perulangan**



ID Sampel	Peak	Luas Area	Kadar Terukur (mg)	Kadar Nyata (mg)*
Melamin 0,25	1	388,406	0,229	1,374
	2	389,459	0,230	1,380
	3	387,352	0,228	1,368

(\*): Kadar nyata adalah kadar terukur dikalikan dengan faktor pengenceran (fp = 6)

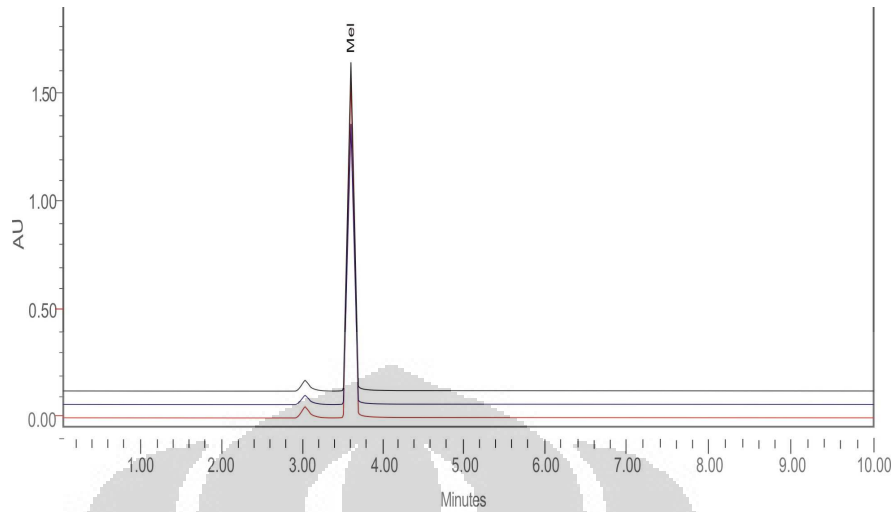
**Lampiran 25. Kromatogram standar melamin 0,50 mg/L dengan 3 perulangan**



ID Sampel	Peak	Luas Area	Kadar Terukur (mg)	Kadar Nyata (mg)*
Melamin 0,50	1	641,198	0,469	2,814
	2	635,931	0,464	2,784
	3	646,464	0,474	2,844

(\*): Kadar nyata adalah kadar terukur dikalikan dengan faktor pengenceran (fp = 6)

**Lampiran 26.** Kromatogram standar melamin 1,00 mg/L dengan 3 perulangan



ID Sampel	Peak	Luas Area	Kadar Terukur (mg)	Kadar Nyata (mg)*
Melamin 1,00	1	1142,569	0,945	5,670
	2	1135,195	0,938	5,628
	3	1149,942	0,952	5,712

(\*): Kadar nyata adalah kadar terukur dikalikan dengan faktor pengenceran (fp = 6)

**Lampiran 27.** Perhitungan faktor pengenceran (*dilution factor*) pada SPE

Proses	<i>Load Sample</i>	<i>Cleaning</i>	Elusi
Volume Sampel	5 mL	5 mL	25 mL
Volume Ditambahkan	-	20 mL	10 mL
Volume Total	5 mL	25 mL	35 mL
<i>Dilution Factor</i>	-	1 : 5	1 : 1,4
Total Faktor Pengenceran			1 : 6

Rumus untuk menentukan faktor pengenceran (*dilution factor*) sebagai berikut:

Faktor Pengenceran (*Dilution Factor*) = (Volume Total / Volume Aliquot)