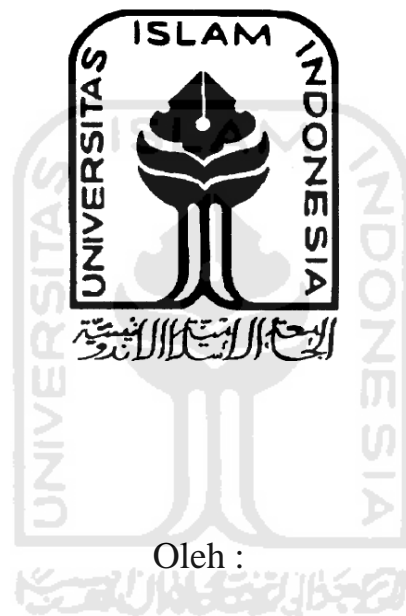


**ANALISIS AKRILAMIDA DALAM KOPI TUBRUK DAN KOPI INSTAN
DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

SKRIPSI



Oleh :

FITRI YULIANI

06613173

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA**

YOGYAKARTA

MEI 2012

**ANALISIS AKRILAMIDA DALAM KOPI TUBRUK DAN KOPI INSTAN
DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S. Farm.)

Program Studi Farmasi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh :

FITRI YULIANI

06613173

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
MEI 2012**


SKRIPSI

**ANALISIS AKRILAMIDA DALAM KOPI TUBRUK DAN KOPI INSTAN
DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**



Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


M. Hatta Prabowo, S.F., M.Si., Apt


Ari Wibowo, S.Farm., Apt

SKRIPSI

ANALISIS AKRILAMIDA DALAM KOPI TUBRUK DAN KOPI INSTAN
DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Oleh :

FITRI YULIANI

06613173

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 12 April 2012

Ketua Penguji : M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt.

Anggota Penguji : 1. Ari Wibowo, S.Farm., Apt.

2. Dr. RR. Endang Lukitaningsih, M.Si, Apt.

3. Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt.



(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Yandi Syukri, M.Si., Apt.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang sepengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.



Yogyakarta, Mei 2012

Penulis,

Fitri Yuliani

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala rasa syukur penulis ke hadirat Allah SWT, berkat Rahmat dan Inayah-Nya yang dilimpahkan penulis memperoleh kekuatan dan kekuatan tenaga dan pikiran, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan segala kenikmatan-Nya. Shalawat dan salam penulis haturkan pada Nabi akhir zaman, Nabi Muhammad SAW yang senantiasa menuntun seluruh umat manusia ke jalan Allah SWT.

Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian penulis dengan judul **“ANALISIS AKRILAMIDA DALAM KOPI TUBRUK DAN KOPI INSTAN DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI”** untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) Program Studi Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

Dalam menyusun Skripsi ini, penulis menyadari telah banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Yandi Syukri, S.Si., M.Si., Apt selaku Dekan FMIPA Universitas Islam Indonesia Yogyakarta
2. Bapak M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt selaku ketua Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Islam Indonesia Yogyakarta dan selaku pembimbing 1, terima kasih untuk semua ilmu, nasehat dan sarannya
3. Bapak Ari Wibowo, S. Farm., Apt selaku pembimbing II, terima kasih untuk bimbingan dan sarannya.
4. Ibu Dr. RR. Endang Lukitaningsih, M.Si., Apt selaku penguji, terima kasih untuk semua ilmu, kritik dan sarannya.
5. Bapak Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt selaku penguji, terima kasih untuk semua ilmu, kritik dan sarannya.
6. Dosen-dosen Program Studi Farmasi FMIPA UII, yang telah memberikan ilmu selama ini kepada penulis.

7. Kedua orang tua, ayahanda Marzuki Norra dan ibunda Sumiati terima kasih atas doa serta restu dan pengorbanannya.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan sehingga penulis mengharapkan masukan dan saran dalam perbaikan Skripsi ini. Sehingga Skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengaplikasian ilmu farmasi di masyarakat.

Yogyakarta, 27 Maret 2012

Penulis,

FITRI YULIANI

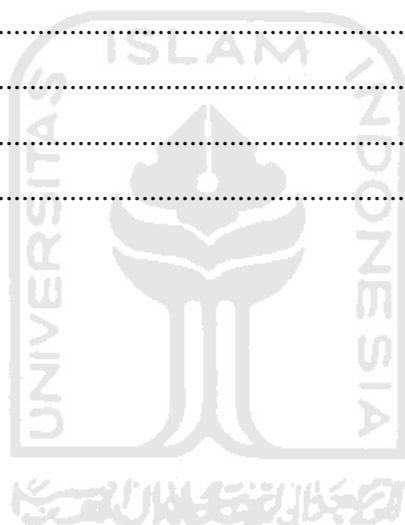


DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan Pembimbing.....	ii
Halaman Pengesahan Penguji.....	iii
Halaman Pernyataan.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II STUDI PUSTAKA	4
A. Tinjauan Putaka.....	4
1. Kopi.....	4
a. Kandungan kopi.....	4
b. Pembuatan kopi.....	6
2. Akrilamida.....	7
a. Karakteristik	7
b. Sifat farmakokinetika	8
c. Efek pada manusia dan hewan.....	9
d. Pembentukan akrilamida pada makanan	10
3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	13
4. Validasi Metode	18

a. Selektivitas.....	19
b. Linieritas	19
c. Batas deteksi dan kuantitasi	19
d. Presisi	20
e. Akurasi	20
B. Landasan Teori	21
C. Hipotesis	21
BAB III METODE PENELITIAN	22
A. Alat dan Bahan	22
1. Alat	22
2. Bahan	22
B. Cara Penelitian	22
1. Optimasi kondisi analisis	22
2. Sampling penelitian	22
3. Preparasi sampel	23
4. Pembuatan larutan standar akrilamida	23
5. Pembuatan kurva kalibrasi	23
6. Uji batas deteksi dan kuantitasi	23
7. Uji presisi	23
8. Uji akurasi	24
9. Uji penetapan kadar akrilamida dalam sampel.....	24
C. Skema Penelitian	25
D. Analisis Hasil	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Sampling penelitian	26
B. Preparasi sampel	26
C. Uji kesesuaian sistem	27
1. Faktor kapasitas	28
2. Presisi	28
3. Resolusi	29

4. Faktor <i>tailing</i>	29
5. Jumlah plat teoritis	30
D. Uji validasi	31
1. Selektivitas	31
2. Linieritas	31
3. Batas deteksi dan kuantitasi	32
4. Presisi	33
5. Akurasi	33
E. Uji kadar akrilamida dalam sampel	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
A. Kesimpulan	38
B. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur kimia akrilamida	8
Gambar 2. Hipotesis mekanisme pembentukan akrilamida dari asam amino dan lipid.....	12
Gambar 3. Diagram instrumen KCKT	14
Gambar 4. Larutan sampel uji yang siap diinjeksikan ke dalam KCKT.....	26
Gambar 5. Kromatogram standar akrilamida dan sampel kopi tubruk dan kopi instan	27
Gambar 6. Kurva kalibrasi	32



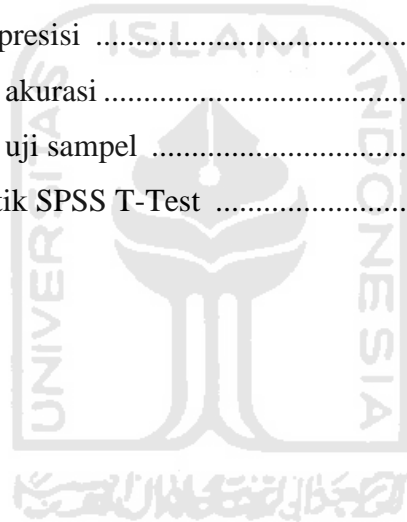
DAFTAR TABEL

Tabel I.	Komposisi senyawa kimia dalam kopi.....	4
Tabel II.	Perbedaan kolom konvensional dan mikrobor	17
Tabel III.	Standar deviasi dan konsentrasi analit berdasarkan persamaan Horwitz.	20
Tabel IV.	Data uji presisi akrilamida 10 ppm	28
Tabel V.	Data jumlah plat teoritis sampel kopi tubruk dan kopi instan	30
Tabel VI.	Parameter uji kesesuaian sistem metode KCKT yang digunakan pada analisis akrilamida dalam kopi	30
Tabel VII.	Kurva kalibrasi akrilamida	32
Tabel VIII.	Uji recovery akrilamida pada kopi tubruk	34
Tabel IX.	Uji recovery akrilamida pada kopi instan	34
Tabel X.	Hasil analisis akrilamida dalam sampel kopi instan dan kopi tubruk	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan faktor kapasitas.....	42
Lampiran 2. Perhitungan resolusi	44
Lampiran 3. Perhitungan faktor tailing	46
Lampiran 4. Perhitungan jumlah plat teoritis.....	48
Lampiran 5. Perhitungan batas deteksi dan kuantitasi	50
Lampiran 6. Perhitungan akurasi	51
Lampiran 7. Perhitungan kadar akrilamida dalam sampel.....	53
Lampiran 8. Kromatogram standar akrilamida	56
Lampiran 9. Kromatogram presisi	58
Lampiran 10. Kromatogram akurasi	59
Lampiran 11. Kromatogram uji sampel	61
Lampiran 12. Data uji statistik SPSS T-Test	63



ANALISIS AKRILAMIDA DALAM KOPI TUBRUK DAN KOPI INSTAN DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

INTISARI

Akrilamida merupakan salah satu zat yang dapat menyebabkan kanker pada manusia dan bersifat neurotoksik. Akrilamida dapat terbentuk akibat pemanasan suhu tinggi terhadap makanan yang mengandung karbohidrat dan asam amino. Karbohidrat dan asam amino merupakan senyawa utama yang terkandung dalam biji kopi. Penelitian ini bertujuan mengetahui kadar akrilamida pada kopi tubruk dan kopi instan yang mengalami proses pengolahan biji kopi yang berbeda. Metode analisa akrilamida dilakukan dengan metode HPLC menggunakan fase gerak asam fosfat : asetonitril : akuabides (1 : 5 : 94 v/v), fase diam kolom C18 (panjang 150 mm x diameter dalam 4,6 mm, ukuran partikel 5 μ m), dan laju alir 0,15 mL/menit dengan detektor UV pada panjang gelombang UV 220 nm. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini, untuk uji validasi metode yang dilakukan memberikan linearitas 0,999 (range 2-20 μ g/mL), LOD 0,942 μ g/mL dan LOQ 2,855 μ g/mL, presisi dengan RSD 0,47 %, dan akurasi kopi tubruk >110% serta kopi instan 103,98%. Kadar yang diperoleh menunjukkan kadar akrilamida kopi tubruk dan kopi instan masing-masing sebesar 7,03 \pm 0,009 μ g/g dan 5,71 \pm 0,025 μ g/g. Kadar ini dinyatakan aman untuk asupan akrilamida hingga konsumsi kopi sebanyak 16 g dengan toleransi asupan akrilamida 2,6 μ g/kg BB/hari untuk orang dewasa.

Kata kunci: akrilamida, kopi tubruk, kopi instan, HPLC, validasi

ANALYSIS OF ACRYLAMIDE IN GROUND COFFEE AND INSTANT COFFEE WITH HIGH PERFORMANCE OF LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

ABSTRACT

Acrylamide is a substance that can cause cancer on human and is neurotoxic. Acrylamide is formed due to high temperature heating of foods that contains carbohydrates and amino acids. Carbohydrates and amino acids are the major compounds that contained in coffee beans. This study aims to determine the levels of acrylamide in ground coffee and instant coffee that have different process of manufacture. Method of analyze of acrylamide were performed by HPLC (High Performance of Liquid Chromatography) method using mobile phase that consists of phosphoric acid : acetonitrile : aquabides (1 : 5 : 94 v/v), the stationary phase was C18 column (length 150 mm x i.d 4,6 mm, partikel size 5 μ m), and the flow rate was 0,15 mL/minute and the detection using UV detector at 202 nm. The result of the study was validation of method that provide the linearity 0,999 (range 2-20 μ g/mL), LOD of 0,942 μ g/mL and LOQ of 2,855 μ g/mL, the precision with RSD of 0,47%, and accuracy for ground coffee of >110% and instant coffee of 103,984% . The study found acrylamide levels in ground coffee and instant coffee were 7,03 \pm 0,009 μ g/g dan 5,71 \pm 0,025 μ g/g respectively. These levels were considered safe for up to 16 g for consume of coffee with tolerance of acrylamide intake of 2,6 μ g/kg BW/day for adults.

Keywords : acrylamide, ground coffee, instant coffee, HPLC

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Akrilamida diklasifikasikan sebagai salah satu zat yang dapat menyebabkan kanker pada manusia berdasarkan penelitian yang dilakukan pada hewan. Penelitian oleh Badan Pengawas Makanan Nasional Swedia (*Swedish National Food Administration*) dan *Stockholm University*, pada April 2002, bahwa akrilamida terdapat pada beberapa makanan berkarbohidrat tinggi yang mengalami pemanasan. Akrilamida dapat berasal dari pemanasan terhadap kandungan karbohidrat dengan suhu tinggi (diatas 120 °C) pada proses pembuatan makanan seperti keripik kentang, kentang goreng, *popcorn*, sereal, biskuit, makanan bayi dan kopi. Namun, hingga sekarang belum ada himbauan yang dikeluarkan *Food and Drug Administration* (FDA) untuk melarang masyarakat mengkonsumsi makanan-makanan tersebut⁽¹⁾. Selain dari karbohidrat, akrilamida dapat terbentuk dari protein, peptida, dan amina biogenik⁽¹⁾. Pembentukan akrilamida juga dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yaitu suhu pemanasan, waktu pemanasan, pH, dan kadar air⁽²⁾.

World Health Organization (WHO) menyatakan bahwa pada populasi umum, rata-rata asupan akrilamida melalui makanan berada pada rentang 0,3–0,8 µg/kg BB/hari. *Environmental Protection Agency* (EPA) pada tahun 1992 dan WHO pada tahun 1985 telah membatasi kadar akrilamida dalam air minum sebesar 0,5 µg/liter (ppb)⁽³⁾. *Office of Environmental Health Hazard Assesment* (OEAHHA), salah satu divisi EPA yang berlokasi di California, Amerika Serikat telah menetapkan bahwa 0,2 µg/hari akrilamida tidak bersifat sebagai agen pencetus kanker⁽⁴⁾.

Kopi merupakan salah satu produk yang paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Produk kopi yang dinikmati dan beredar di pasar saat ini adalah kopi tubruk dan kopi instan. Keduanya memiliki perbedaan pada proses produksi dan kelarutan dalam air. Pada kopi tubruk dilakukan proses *roasting* kemudian dibentuk bubuk dan apabila dilarutkan dalam air maka akan meninggalkan ampas, sedangkan kopi instan dibuat melalui proses *roasting* kemudian dilakukan *grinding* lalu

dilakukan ekstraksi dengan cara perkolasi pada suhu 154-182 °C. Selanjutnya dilakukan pengeringan (*drying*) dengan metode *spray dryer* ataupun *freeze dryer*⁽⁵⁾.

Karbohidrat dan asam amino merupakan senyawa kimia utama pada kopi sebagai prekursor reaksi *Maillard* yang berperan penting dalam menimbulkan aroma pada kopi⁽⁶⁾. Reaksi *Maillard* adalah reaksi antara senyawa amino, biasanya asam amino, peptide, atau protein dengan senyawa karbonil. Reaksi *Maillard* merupakan reaksi reduksi karbohidrat seperti fruktosa, glukosa dan laktosa⁽⁴⁾. Reaksi *Maillard* terjadi pada proses *roasting* yang merupakan proses kompleks yang melibatkan transfer panas melalui transportasi uap air, transportasi CO₂, peningkatan penguapan pada saat *roasting*, perubahan volume, struktur, material dan komposisi kimia pada kopi. Selama reaksi *Maillard* dihasilkan zat yang berbahaya seperti akrilamida atau 5-hidroksimetil-furfural. FDA menemukan residu akrilamid pada beberapa produk kopi di pasaran⁽⁷⁾.

Pengembangan metode analisis akrilamida dalam produk pangan telah banyak dilakukan dengan menggunakan metode *high performance of liquid chromatography* (HPLC) dan kromatografi gas. Analisis dengan menggunakan kromatografi gas membutuhkan tahap derivatisasi akrilamida untuk mengurangi cemaran senyawa lain dan untuk meningkatkan volatilitas, selektivitas dan sensitivitas dari akrilamida. Namun, tahap tersebut membutuhkan waktu berjam-jam. Penelitian menggunakan kromatografi membutuhkan tenaga dan waktu yang banyak. Analisis akrilamida menggunakan metode kromatografi cair, tidak memerlukan tahap derivatisasi akrilamida terlebih dahulu, serta tidak membutuhkan pelarut yang bebas air dan bersifat volatil seperti yang dibutuhkan pada analisis dengan kromatografi gas. Penelitian dengan menggunakan kromatografi cair mampu memberikan hasil dengan sensitivitas yang tinggi dan tidak memakan waktu serta merupakan teknik yang kuat untuk analisis kuantitatif akrilamida⁽⁸⁾.

Biji kopi merupakan salah satu produk pangan yang mengandung karbohidrat dan asam amino yang tinggi sebagai prekursor terbentuknya akrilamida. Adanya variasi pengolahan biji kopi memungkinkan terjadi perbedaan kadar akrilamida pada tiap sediaan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh

proses pengolahan biji kopi terhadap kadar akrilamida dalam produk kopi dengan menggunakan metode kromatografi cair yang memiliki kevalidan dan sensitifitas yang baik.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah metode KCKT yang digunakan pada penelitian ini merupakan metode yang valid berdasarkan *International Conference of Harmonization* (ICH)?
2. Apakah di dalam kopi instan dan kopi tubruk terdapat akrilamida?
3. Apakah terdapat perbedaan kadar akrilamida antara kopi tubruk dan kopi instan?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

1. Tingkat validitas metode KCKT yang digunakan berdasarkan ICH.
2. Kandungan akrilamida yang terdapat dalam kopi tubruk dan instan
3. Perbedaan kadar akrilamida antara kopi tubruk dan kopi instan

D. Manfaat Penelitian

Manfaat untuk penelitian :

1. Memberikan informasi untuk pengembangan metode yang telah divalidasi untuk analisis akrilamida pada produk kopi.
2. Memberikan informasi bahwa proses pembuatan kopi berpengaruh terhadap pembentukan bahan berbahaya seperti akrilamida.

Manfaat untuk masyarakat :

1. Informasi pada masyarakat mengenai keamanan produk kopi yang beredar di pasaran.
2. Informasi mengenai bentuk sediaan yang memiliki residu akrilamid lebih kecil dan lebih aman untuk dikonsumsi.

BAB II

STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Kopi

Kopi adalah minuman yang diseduh dan terbuat dari biji yang dipanggang, biasa disebut biji kopi. Karena kandungan kafeinnya, kopi dapat memiliki efek merangsang pada manusia. Saat ini, kopi merupakan salah satu minuman yang paling populer di seluruh dunia⁽⁹⁾. Tanaman kopi berasal dari famili *Rubiaceae* yang mencakup 500 genus dan 8000 spesies. Spesies yang sering dibudidayakan secara komersial adalah *Coffea arabica* L. atau kopi arabika dan *Coffea canephora* Pierre atau kopi robusta⁽¹⁰⁾.

a. Kandungan kopi

Tabel I. Komposisi senyawa kimia dalam kopi⁽¹⁰⁾

Kandungan	Kopi Arabika			Kopi Robusta		
	Biji mentah (%)	Biji setelah roasting (%)	Kopi instan (%)	Biji mentah (%)	Biji setelah roasting (%)	Kopi instan (%)
Kafein	1,3	1,2	2,4	2,3	2,4	3,8
Trigonelin	0,8	0,3	0,7	0,7	0,3	0,4
Karbohidrat	53,7	38	46,6	50,7	42	44,7
Asam Klorogenat	8,1	2,5	2,6	9,9	3,8	1,6
Lipid	15,2	17	0,11	9,4	11,0	0,26
Asam amino	11,1	7,5	6,2	11,8	7,5	6,0
Asam Organik	2,3	2,4	8,1	1,7	2,6	7,9
Melanoidin	-	25,4	25,1	-	25,9	28,6

Senyawa kimia utama yang terdapat dalam kopi adalah karbohidrat, asam klorogenat, lipid dan asam amino⁽¹¹⁾. Karbohidrat yang terdapat dalam kopi antara

lain adalah sukrosa, arabinogalaktan, galatomannan dan selulosa⁽¹²⁾. Kandungan karbohidrat dalam kopi berkisar 50 %. Asam klorogenat merupakan senyawa fenolik utama dalam kopi dengan jumlah sekitar 8 % dalam biji kopi. Asam amino yang banyak terdapat dalam kopi adalah asam glutamat, prolin, asparagin dan asam aspartat⁽¹¹⁾.

i. Karbohidrat

a. Sukrosa

Sukrosa merupakan oligosakarida yang paling banyak pada biji kopi mentah dengan kandungan sukrosa sebesar 6-8 % dari berat kering biji kopi mentah⁽¹¹⁾. Sukrosa mudah terdegradasi pada saat pemanggangan dan kandungannya sedikit pada derajat *roasting* medium. Kandungan sukrosa menurun hingga mendekati 1 % dari jumlah sebenarnya⁽¹¹⁾.

b. Arabinogalaktan

Arabinogalaktan adalah polisakarida pada kopi yang sifatnya sangat larut dalam air⁽¹⁰⁾. Arabinogalaktan yang terdapat pada kopi merupakan bagian dari arabinogalaktan-protein (AGP)⁽¹¹⁾. Kandungan AGP pada biji kopi sekitar 15 % yang terdiri dari 12 % protein dan 85 % arabinogalaktan. Pada proses *roasting*, arabinogalaktan paling rentan mengalami konversi karena arabinogalaktan memiliki arabinosil yang labil terhadap panas⁽¹¹⁾.

c. Galatomannan

Galatomannan adalah karbohidrat ketiga yang paling banyak yang terdapat dalam biji kopi. Galatomannan merupakan polisakarida yang bersifat kurang larut air dibandingkan dengan arabinogalaktan⁽¹²⁾. Pada proses *roasting* berkurang namun hanya sedikit. Galatomannan lebih resisten terhadap degradasi oleh proses *roasting* karena lebih stabil terhadap panas dibandingkan arabinogalaktan⁽¹¹⁾.

d. Selulosa

Selulosa adalah polisakarida terakhir yang paling banyak pada biji kopi. Kelarutan selulosa dalam air sangat rendah⁽¹²⁾. Selulosa sangat

sulit terdegradasi sehingga pada proses *roasting* karena sifatnya yang sangat stabil terhadap panas⁽¹¹⁾.

ii. Asam klorogenat

Asam klorogenat merupakan ester *trans*-asam sinamat, seperti caffeic, ferulic, *p*-asam kumarat dan asam kuinat. Lebih dari 44 macam asam klorogenat yang teridentifikasi pada biji kopi. Asam klorogenat yang paling banyak ditemukan pada kopi adalah asam 5-caffeoilkuinat⁽¹¹⁾.

iii. Asam Amino dan protein

Kandungan asam amino dalam kopi sekitar 2 % b/b dalam biji kopi. Kandungan protein dalam biji kopi sekitar 8-13 % b/b terdiri dari protein larut air dan tidak larut air. Secara umum, protein pada kopi ini tidak terlalu banyak diteliti walaupun protein ini terlibat pada pembentukan rasa dan warna saat *roasting*⁽¹¹⁾.

b. Pembuatan kopi

i. Pemanggangan (*roasting*)

Proses pemanggangan dilakukan pada suhu yang cukup tinggi yaitu berkisar 240-300 °C. Proses *roasting* dilakukan dalam tiga tahap. Proses *roasting* menyebabkan hilangnya air dari biji hijau dan degradasi dari banyak senyawa termasuk polifenol antioksidan⁽¹⁰⁾.

Pada tahap awal, biji kopi yang masih hijau dipanggang perlahan-lahan untuk mengurangi kelembabannya dan dijaga suhunya sekitar 100 °C. Tahap ini hanya dilakukan beberapa detik hingga kelembaban biji kopi tidak lebih 12 %. Pada tahap ini, reaksi Maillard atau reaksi pencoklatan non-enzimatik terjadi. Karbohidrat dan lipid juga mengalami degradasi pada saat mendekati suhu 180-200 °C⁽¹³⁾. Pada tahap ini, biji menjadi warna coklat muda, dan mengalami penurunan massa sekitar 5 %. Langkah berikutnya suhu naik dari 205 °C sampai kira-kira 220 °C, terjadi perubahan warna menjadi coklat medium, dan penurunan massa sekitar 13

%⁽¹³⁾. Tahap ketiga adalah tahap pendinginan yaitu biji kopi didinginkan dengan udara dingin atau dengan air⁽¹³⁾.

ii. Grinding

Untuk memaksimalkan ekstraksi atau pembuatan minuman kopi, maka dilakukan penggilingan yang ditujukan untuk menghancurkan biji kopi menjadi serbuk dengan ukuran partikel yang lebih kecil⁽¹⁵⁾.

iii. Perkolasi (ekstraksi)

Umumnya air ditambahkan dalam 5-10 kolom perkolasi pada temperatur 154-182 °C. Konsentrasi larutan kopi yang dihasilkan sekitar 15-30 % b/v⁽¹⁶⁾.

iv. Pengeringan (*drying*)

Pengeringan dapat dilakukan dengan *freeze dryer* atau *spray dryer*. Metode *spray dryer* lebih disukai dibandingkan *freeze dryer* dikarenakan efektivitas pengeringan dan biaya. Metode ini menghasilkan partikel sferis yang berukuran kira-kira 300µm dengan kepadatan 0.22g/cm³⁽¹⁶⁾.

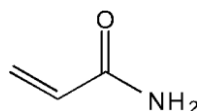
2. Akrilamida

Akrilamida (sinonim: 2-Propenamida, etilen karboksiamida, akrilik amida, asam propeonik amida, vinil amida) adalah salah satu bahan organik yang biasa digunakan manusia dalam kehidupan sehari-hari, untuk memproduksi plastik dan bahan pewarna.⁽¹⁾ Zat ini juga biasa digunakan untuk menjernihkan air minum dan dikenal sebagai kandungan yang terdapat dalam asap tembakau⁽²⁾. Selain itu, sebagai stabilisator tanah di jalan raya konstruksi, sebagai pengikat kertas, aspal dan sebagai aditif / perekat / fiksatif untuk manufaktur produk industri dan berbagai kosmetik⁽¹⁷⁾. Sejak tahun 1950, akrilamida diproduksi dengan cara hidrasi akrilonitril dan terdapat dalam bentuk monomer sedang poliakrilamida ada dalam bentuk polimer⁽¹⁾.

a. Karakteristik

Akrilamida merupakan senyawa kimia berwarna putih, tidak berbau, berbentuk kristal padat yang sangat mudah larut dalam air, juga pelarut lain seperti aseton, metanol, etanol, dan dapat membentuk acrylic apabila terhidrolisis

⁽¹⁷⁾ serta mudah bereaksi melalui reaksi amida dan pada ikatan rangkapnya. Kelarutan dalam g/l pelarut pada suhu 30°C : air 215,5, aseton 63,1, benzen 0,346, etanol 66,2, kloroform 2,66, metanol 15,5, n-heptan 0,0068. Titik lebur: 84,5 °C, titik didih: 87 °C (2 mmHg), 105 °C (5mmHg), 125 °C (25 mmHg), tekanan penguapan 0,009 kPa (25 °C), 0,004 kPa (40 °C), 0,09 kPa (50 °C) ^(1, 2). Monomer akrilamida cepat berpolimerisasi pada titik leburnya atau di bawah sinar ultraviolet. Akrilamida dalam larutan bersifat stabil pada suhu kamar dan tidak berpolimerisasi secara spontan ⁽¹⁾.



Gambar 1. Struktur kimia akrilamida

Pada umumnya, akrilamida yang terdapat di alam adalah buatan manusia, berasal dari residu monomer yang dilepaskan dari poliakrilamida untuk perawatan air minum karena tidak seluruh akrilamida terkoagulasi dan tetap berada di air sebagai pencemar. Selain itu, akrilamida dapat terbentuk dalam makanan berkarbohidrat tinggi selama menggoreng dan pemanggangan. Dalam makanan olahan, jumlah akrilamida meningkat oleh adanya peningkatan suhu dan waktu pemanasan⁽¹³⁾.

Akrilamida terdistribusi dengan baik dalam air karena kelarutannya yang tinggi dalam air. Akrilamida dapat menetap hingga berhari-hari, berminggu-minggu, bahkan berbulan-bulan di daerah sungai atau pesisir pantai dengan aktivitas mikroba yang rendah.⁽¹⁾

b. Sifat farmakokinetika akrilamida

Akrilamid diabsorpsi melalui saluran pernafasan, saluran cerna, dan kulit. Pada pendistribusiannya, akrilamida terdapat dalam kompartemen sistem tubuh dan dapat menembus selaput plasenta. Akrilamida dan metabolitnya terakumulasi dalam sistem saraf, darah, ginjal, hati dan sistem reproduksi pria. Akrilamida dicurigai lebih bersifat neurotoksik dibandingkan dengan glisidamida. Berdasarkan percobaan pada hewan, akrilamida diekskresikan dalam jumlah besar

melalui urin dan empedu sebagai metabolitnya. Diketahui terdapat akrilamida dalam air susu tikus yang sedang menyusui. Data-data farmakokinetika akrilamida pada manusia masih sedikit, namun antara manusia dan hewan mamalia belum terdapat data yang dengan pasti menunjukkan perbedaan dari keduanya. ^(19, 20)

c. Efek pada manusia dan hewan

Akrilamida bersifat iritan dan toksik. Efek lokal berupa iritasi pada kulit, dan membran mukosa. Iritasi lokal pada kulit ditunjukkan dengan melepuhnya kulit disertai dengan warna kebiruan pada tangan dan kaki, efek sistemik berhubungan dengan paralisis susunan saraf pusat, tepi, dan otonom sehingga dapat terjadi kelelahan, pusing, mengantuk, dan kesulitan dalam mengingat. Berdasarkan uji klinis, ditunjukkan bahwa paparan akut dosis tinggi akrilamida memicu tanda-tanda dan gejala gangguan saraf pusat, sedangkan paparan akrilamida dalam jangka waktu yang lama dengan dosis yang lebih kecil dapat memicu gangguan pada sistem saraf tepi. Setelah paparan akrilamida dihentikan, gangguan-gangguan tersebut dapat berkurang, tetapi dapat bertahan hingga berbulan-bulan bahkan bertahun-tahun ⁽³⁾.

Akrilamida meningkatkan kemungkinan terjadinya tumor paru-paru pada tikus dan meningkatkan timbulnya tumor kelenjar payudara pada tikus betina. Pada tikus jantan, dapat memicu degenerasi tubulus seminiferus dan aberasi kromosom spermatosit serta menurunkan kadar testoteron dan prolaktin. Namun, uji fertilitas belum dilaporkan. Pemberian secara oral, topikal, dan intraperitoneal akrilamida dapat memicu kanker kulit ⁽³⁾. Akrilamida, dimasukkan dalam kategori grup 2A yaitu senyawa yang hampir dipastikan menyebabkan kanker pada manusia (karsinogenik) ^(18,1). Hal tersebut dikarenakan jumlah peserta yang diikutsertakan dalam penelitian masih belum memadai untuk suatu uji epidemiologik. Berdasarkan data yang ada, belum ada data epidemiologik yang menunjukkan bahwa paparan akrilamida dapat menyebabkan kanker. ⁽¹⁾

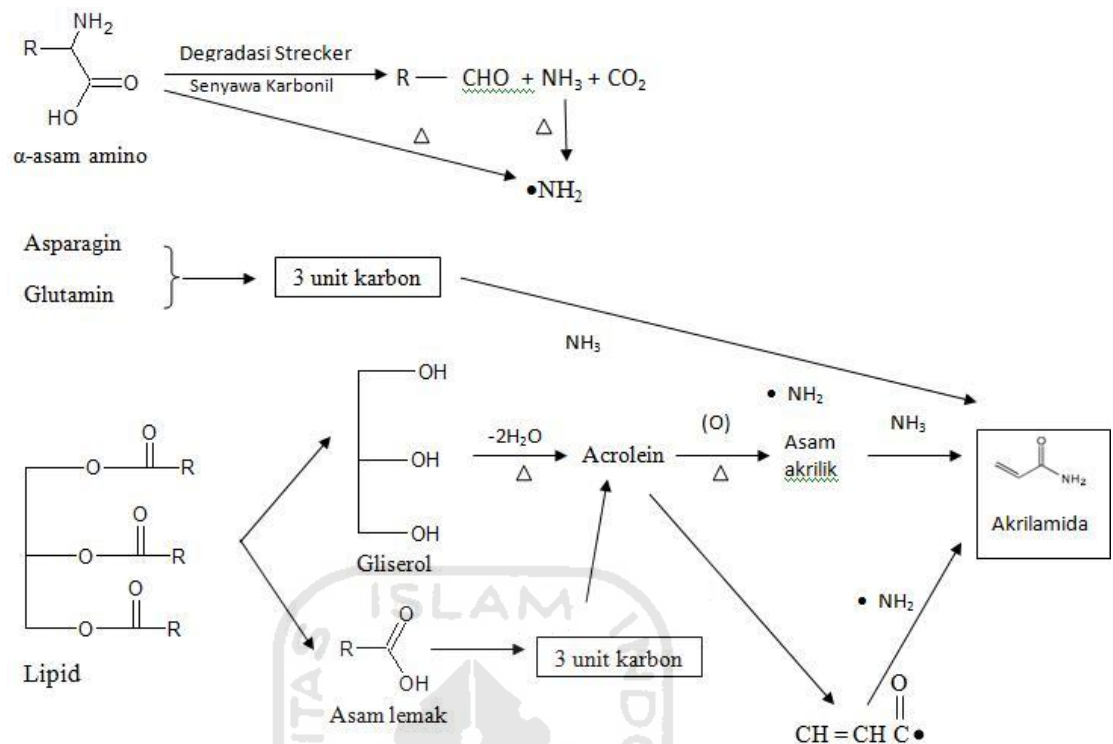
FAO dan WHO memberikan arahan sementara untuk mencegah kemungkinan terjadinya risiko akibat akrilamida, meskipun informasi tentang akrilamida dan dampaknya dalam makanan belum lengkap, diantaranya :

- (1) Pola makan yang seimbang dan bervariasi, seperti sayur-mayur dan buah-buahan, dan menghindari atau mengurangi makanan yang diduga mengandung akrilamida.
- (2) Makanan tidak dimasak dengan suhu yang terlalu tinggi, hanya dengan suhu yang cukup untuk menghancurkan mikroorganisme patogen.⁽²¹⁾

d. Pembentukan akrilamida dalam makanan

Peneliti Swedia mendapatkan bahwa terdapat konsentrasi akrilamida yang sangat besar pada makanan yang digoreng (keripik kentang 1200 µg/kg; kentang goreng 450 µg/ kg), dan makanan yang dipanggang (sereal dan roti, 100-200 µg/kg)⁽¹⁾. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa pada populasi umum, rata-rata asupan akrilamida melalui makanan berada pada rentang 0,3–0,8 µg/kg BB/hari. *Environmental Protection Agency* (EPA) pada tahun 1992 dan WHO pada tahun 1985 telah membatasi kadar akrilamida dalam air minum sebesar 0,5 µg/liter (ppb)⁽³⁾. *Office of Environmental Health Hazard Assessment* (OEAHHA), salah satu divisi EPA yang berlokasi di California, Amerika Serikat telah menetapkan bahwa 0,2 µg/hari akrilamida tidak bersifat sebagai agen pencetus kanker⁽⁴⁾. Akrilamida ditemukan pada beberapa makanan tertentu yang dalam proses dan pembuatannya menggunakan suhu tinggi, dengan meningkatnya pemanasan dan bertambahnya waktu, dapat meningkatkan kadar akrilamida. Akrilamida tidak terbentuk pada suhu di bawah 120 °C. Mekanisme terbentuknya belum dapat diketahui dengan pasti, diperkirakan meliputi reaksi dari berbagai macam kandungan dalam makanan, seperti karbohidrat, lemak, protein dan asam amino, serta berbagai macam komponen lainnya dalam jumlah yang kecil^(1, 2). Mekanisme pembentukan akrilamida yang mungkin dan telah dikemukakan oleh peneliti antara lain:

1. Terbentuk dari akrolein atau asam akrilat hasil degradasi karbohidrat, lemak, atau asam amino bebas, seperti alanin, asparagin, glutamin, dan metionin yang memiliki stuktur mirip dengan akrilamida. Akrolein (2-propenal, $\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) merupakan suatu aldehid 3 karbon dan menyebabkan adanya struktur akrilamid ($\text{CH}_2=\text{CHC}(\text{O})\text{NH}_2$). Pada tahap pemanasan dengan minyak, minyak merupakan yang pertama kali terhidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak dan kemudian akrolein diproduksi dengan eliminasi air dari gliserol. Beberapa sumber untuk pembentukan akrolein mungkin muncul dari degradasi asam amino dan protein, degradasi karbohidrat, dan reaksi Mailard antara asam amino atau protein dan kabohidrat. Banyak kemungkinan rute untuk pembentukan akrilamida ini, dengan permulaan dari gula atau asam amino yang berbeda, dapat terbentuk. Pembentukannya dari metionin oleh degradasi Strecker pada bingkai reaksi Maillard merupakan salah satu contohnya. Alanin, dengan skeleton tiga karbonnya, juga telah menjadi suatu kemungkinan sumbernya. Bagaimanapun, bagian dari reaksi karbon rantai panjang merupakan hal yang umum dan terkenal, maka tidak ada dasar yang prioritas untuk setiap rute reaksi spesifik^(2, 22).
2. Terbentuk langsung dari asam amino. Terdapat banyak jalur reaksi lain yang dipercaya dapat membentuk akrilamid tanpa melalui akrolein yaitu asam amino atau protein Dalam rangkaian yang kompleks dengan mekanisme reaksi bertahap, meliputi hidrolisis, perubahan bentuk, dekarboksilasi, deaminasi, dan lain-lain. Banyak jalur reaksi spesifik yang dapat terjadi. Dekarboksilasi dan deaminasi dari asparagin, dan transformasi dari dehidroalanin (dari bentuk seperti serin atau sistein) merupakan beberapa contoh jalur reaksi yang memungkinkan pembentukan akrilamida^(2, 22).
3. Terbentuk dari dehidrasi atau dekarboksilasi beberapa asam organik tertentu seperti asam laktat, asam malat, dan asam sitrat^(1, 2).



Gambar 2. Hipotesis mekanisme pembentukan akrilamida dari asam amino dan lipid⁽²²⁾

Studi sistematis tentang pembentukan akrilamida belum dapat dipastikan, kemungkinan terbesar melalui reaksi campuran. Studi juga dipersulit dengan sifat dari akrilamida yang mudah menguap dan mudah bereaksi sehingga dapat hilang setelah terbentuk. Akrilamida dianggap reaksi samping dari reaksi Maillard, yakni reaksi yang berlangsung antara asam amino dengan gula pereduksi (glukosa, fruktosa, ribosa, dan lain-lain) atau sumber karbonil lainnya. Asparagin, merupakan asam amino dalam makanan yang bereaksi dengan gula pada suhu tinggi⁽²⁾. Asparagin yaitu asam amino utama mempunyai struktur mirip dengan akrilamida, dan diduga senyawa tersebut yang paling berperan dalam pembentukan akrilamida. Hasil penelitian yang sama juga ditemukan oleh pemerintah Kanada dan pabrik *Procter and Gamble Co.* Keduanya sama-sama mencurigai adanya hubungan antara asparagin dengan pencetus kanker⁽²⁰⁾.

Dalam kopi, akrilamida terbentuk dalam konsentrasi tinggi pada menit pertama saat *roasting* yang menghasilkan lebih dari 7 mg/kg. Peningkatan waktu *roasting* akan meningkatkan reaksi degradasi akrilamida⁽¹³⁾.

3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT atau biasa juga disebut dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis; analisis ketidakmurnian (*impurities*); analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (non-volatil); penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun zwitter ion; isolasi dan pemurnian senyawa; pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hamper sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif⁽²³⁾.

Keterbatasan metode KCKT adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrometer massa (MS). Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh⁽²³⁾.

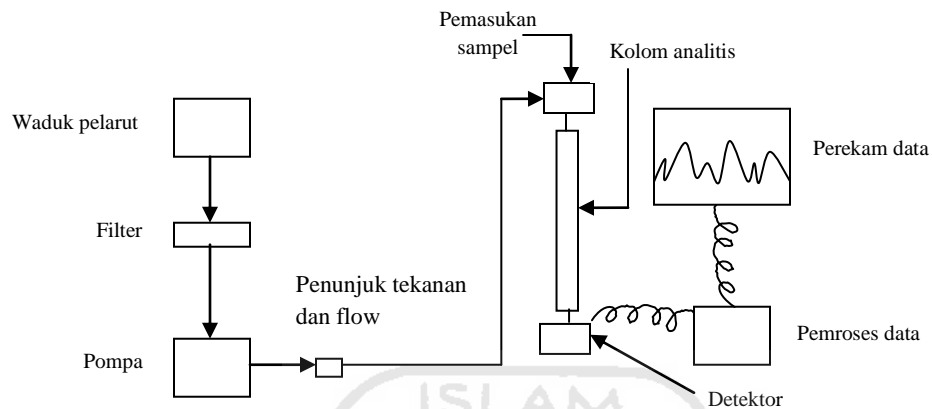
a. Prinsip KCKT

Kromatografi merupakan teknik dengan solute atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solute ini diatur oleh distribusi solute dalam fase gerak dan fase diam⁽²⁴⁾.

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok:

1. Wadah fase gerak
2. Sistem penghantaran fase gerak
3. Alat untuk memasukkan sampel
4. Kolom
5. Detektor

6. Wadah penampung buangan fase gerak
7. Tabung penghubung
8. Suatu komputer atau integrator atau perekam.



Gambar 3. Diagram Instrumen KCKT⁽²³⁾

i. Wadah fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan inert. Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis⁽²⁴⁾. Pada saat membuat pelarut untuk fase gerak, maka sangat dianjurkan untuk menggunakan pelarut, buffer, dan reagen dengan kemurnian yang sangat tinggi, dan lebih terpilih jika pelarut-pelarut yang akan digunakan untuk KCKT berderajat KCKT (HPLC *grade*). Adanya pengotor dalam reagen dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi. Adanya partikel yang kecil dapat terkumpul dalam kolom atau dalam tabung yang sempit, sehingga dapat mengakibatkan suatu kekosongan pada kolom atau tabung tersebut. Karenanya, fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil ini⁽²³⁾.

ii. Fase Gerak pada KCKT

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut⁽²³⁾.

Deret eluotrofik yang disusun berdasarkan polaritas pelarut merupakan panduan yang berguna dalam memilih fase gerak yang akan digunakan dalam KCKT. Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi). Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas⁽²³⁾.

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol. Pemisahan dengan fase normal ini kurang umum dibandingkan dengan fase terbalik⁽²³⁾.

iii. Pompa pada KCKT

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat wadah pelarut yakni pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang diberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir

3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit⁽²³⁾.

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada dua jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan⁽²³⁾.

iv. Penyuntikan sampel pada KCKT

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup Teflon yang dilengkapi dengan *sample loop* internal dan eksternal⁽²³⁾.

Pada saat pengisian sampel, sampel dialirkan melewati *sample loop* dan kelebihan dikeluarkan ke pembuang. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan menggelontor sampel ke kolom. Presisi penyuntikan dengan *sample loop* ini dapat mencapai nilai RSD (*Relative Standard Deviation*) 0,1%. Penyuntik ini mudah digunakan untuk otomatisasi dan sering digunakan untuk *autosampler* pada KCKT⁽²³⁾.

v. Kolom

Ada 2 jenis kolom pada KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Perbedaan keduanya dapat dilihat pada Table 2.

Tabel II. Perbedaan kolom konvensional dan mikrobor⁽²³⁾

Parameter	Kolom konvensional	Kolom mikrobor
Tekanan operasional	500-3000 psi (35-215 bar)	1000-5000 psi (70-350 bar)
Fase gerak	Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alkohol untuk fase normal. Untuk fase terbalik (<i>reversed phase</i>) digunakan metanol atau asetonitril + air atau buffer. Kecepatan alir : 1-3 mL/menit	Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alkohol untuk fase normal. Untuk fase terbalik (<i>reversed phase</i>) digunakan metanol atau asetonitril + air atau buffer. Kecepatan alir : 10-100 μ L/menit <i>Modifikasi instrument</i> Sistem penghantaran pelarut yang mampu memberikan kontrol aliran di bawah 10 μ L/menit. Katup injeksi sampel bervolume kecil; Sel detektor bervolume kecil.
Kinerja	Efisiensi meningkat dengan berkurangnya ukuran partikel fase diam, akan tetapi umur kolom dengan ukuran partikel 3 μ m lebih pendek	Sangat efisien dan sensitif, akan tetapi lambat. Konsumsi fase gerak hanya $\frac{1}{4}$ dari kolom konvensional.

vi. Detektor

Detektor dalam KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal (yang mampu mendeteksi secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa, dan golongan detektor yang spesifik yang hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, fluoresensi, dan elektrokimia⁽²⁴⁾.

1) Detektor spektrofotometri UV-Vis

Detektor jenis ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi UV dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur-struktur atau gugus-gugus kromoforik^(23,24).

2) Detektor Photodiode-array (PDA)

Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam

sekali proses. PDA memberikan lebih banyak informasi komposisi sampel dibandingkan UV-Vis⁽²³⁾.

3) Detektor Fluoresensi

Fluoresensi merupakan fenomena luminisensi yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap sinar UV atau visible lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar. Pemilihan fase gerak pada deteksi dengan fluoresensi ini sangat penting karena fluoresensi sangat sensitif terhadap peredaman fluoresensi^(23,24).

4) Detektor indeks bias

Detektor indeks bias merupakan detektor universal yang mampu memberikan respon pada setiap zat terlarut. Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analit (zat terlarut) dengan pelarutnya (fase geraknya)^(23,24).

5) Detektor elektrokimia

Banyak senyawa organik (termasuk obat) dapat dioksidasi atau direduksi secara elektrokimia pada elektroda yang cocok. Arus yang dihasilkan pada proses ini dapat diperkuat hingga memberikan respon yang sesuai. Kepekaan detektor elektrokimia umumnya tinggi. Detektor elektrokimia yang paling banyak digunakan adalah detektor konduktivitas dan detektor amperometri.^(23,24)

4. Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya⁽²⁵⁾. Validasi harus dilakukan karena validasi merupakan komponen yang harus diimplementasikan agar hasil yang diperoleh dapat diandalkan kebenarannya⁽²⁶⁾.

a. Selektivitas

Selektivitas metode adalah kemampuan suatu metode yang hanya mengukur zat tertentu saja secara seksama dengan adanya komponen lain yang terdapat dalam sampel. Selektivitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan kemudian dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan⁽²⁵⁾. Pada metode kromatografi selektivitas ditunjukkan oleh kromatogram dengan melihat nilai resolusi antara puncak yang berdekatan⁽²⁷⁾.

b. Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang sesuai terhadap konsentrasi analit dalam sampel⁽²⁵⁾. Adanya hubungan linier dari konsentrasi analit, maka hasil uji dievaluasi dengan metode statistik misalnya dengan perhitungan regresi linier⁽²⁸⁾.

c. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan blangko. Batas kuantitasi adalah batas kuantitas terkecil yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi^(25,27).

a. Batas deteksi (*Limit of Detection*)

$$\text{LOD} = 3,3 \frac{\sigma}{b}$$

b. Batas kuantitasi (*Limit of Quantitation*)

$$\text{LOQ} = 10 \frac{\sigma}{b}$$

Keterangan : σ = standar deviasi dari intersep; b = *slope*

d. Presisi

Presisi adalah pengukuran terhadap seberapa dekat nilai-nilai antara satu dengan lainnya untuk sejumlah pengukuran dalam kondisi analitis yang sama. ICH telah menentukan presisi mengandung tiga komponen yaitu *repeatability*, *intermediate precision* dan *reproducibility*⁽²⁷⁾.

Repeatability dilakukan dengan menggunakan 3 konsentrasi larutan yang berbeda dan dilakukan pengukuran masing-masing 3 kali replikasi atau 6 kali replikasi dari satu konsentrasi larutan. Presisi dari komponene ini, diukur dengan menggunakan nilai standar deviasi. *Intermediate precision* dilakukan dengan variasi khusus meliputi hari, peneliti, alat dan lain-lain. Namun, *intermediate* tidak selalu harus dilakukan. Ini tergantung tujuan dari penelitian dilakukan. *Reproducibility* merupakan presisi yang dilakukan apabila penelitian dilakukan antar laboratorium yang berbeda⁽²⁷⁾. Hubungan teoritis standar deviasi *repeatability* dan *reproducibility* dapat dihitung dari persamaan Horwitz.

$$\%RSD = 2^{1-0.5 \log C}$$

C = fraksi konsentrasi

Tabel III. Standar deviasi relatif dan konsentrasi analit berdasarkan persamaan Horwitz

Kadar Analit	%RSD Horwitz
100%	2
10%	2,8
1%	4
0,1%	5,7
100 ppm	8
10 ppm	11,3
1 ppm	16
100 ppb	22,6
10 ppb	32
1 ppb	45,6

e. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan^(25, 27).

$$\% \text{Perolehan kembali} = \frac{\text{Konsentrasi sampel yang diperkaya standar} - \text{Konsentrasi sampel}}{\text{Konsentrasi standar yang ditambahkan}} \times 100\%$$

B. Landasan Teori

Akrilamida dapat terbentuk dalam produk olahan pangan dikarenakan adanya proses pemanasan lebih dari 120°C, khususnya produk pangan yang memiliki kandungan karbohidrat, protein, peptida, dan amina biogenik yang tinggi. Salah satu komoditi pangan yang memiliki kandungan karbohidrat, asam klorogenat, lipid dan asam amino yang cukup tinggi adalah biji kopi. Produk olahan biji kopi, kopi tubruk maupun kopi instan, keduanya mengalami proses pemanggangan dengan suhu tinggi berkisar 240-300°C. Jumlah akrilamida pada kopi tubruk maupun kopi instan dimungkinkan berbeda karena setelah mengalami pemanggangan, kopi instan mengalami proses perkolasi dan pengeringan (*freeze/spray dry*). Adapun mekanisme pembentukan akrilamida yaitu terbentuk dari akrolein atau asam akrilat hasil degradasi karbohidrat, lemak, atau asam amino bebas, seperti alanin, asparagin, glutamin, dan metionin yang memiliki stuktur mirip dengan akrilamida atau terbentuk langsung dari asam amino melalui reaksi bertahap meliputi hidrolisis, perubahan bentuk, dekarboksilasi, deaminasi, dan lain-lain. Akrilamida juga dapat terbentuk dari dehidrasi atau dekarboksilasi beberapa asam organik tertentu seperti asam laktat, asam malat, dan asam sitrat.

C. Hipotesis

1. Metode KCKT yang digunakan dalam penelitian merupakan metode yang memberikan sensitivitas yang baik dan memiliki validasi yang memenuhi kriteria *International Conference of Harmonization* (ICH).
2. Kopi mengandung akrilamida akibat adanya proses pemanasan biji kopi pada suhu tinggi (>120°C).
3. Bentuk sediaan kopi tubruk dan kopi instan mengalami proses pengolahan yang berbeda dengan suhu tinggi sehingga kedua bentuk sediaan ini memiliki perbedaan kandungan akrilamida yang merupakan senyawa berbahaya karena sifatnya yang neurotoksik dan dapat memicu terjadinya kanker (karsinogenik).

BAB III METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Seperangkat alat gelas (Pyrex); ultrasonik (Branson[®], USA); timbangan analitik macrobalance (Metler Toledo[®], USA); timbangan analitik semimikrobalance (Metler Toledo[®], USA); cawan porselen; corong *Buchner*; *vacuum manifold*; kaca arloji; detektor UV-Vis (Waters[®] 2489, USA); panjang gelombang 190- 330; kolom C18 (Sunfire[™], USA) panjang 150 mm x diameter dalam 4,6 mm, ukuran partikel 5 μ m; injektor, (Waters[®] SM7, USA); KCKT (Waters[®] e2695, USA).

2. Bahan

Kertas saring, serbuk kopi tubruk dan serbuk kopi instan tanpa tambahan gula yang beredar di pasaran; akrilamida (pro analisis, Merck, Germany); aseton (pro analisis, Merck, Germany); n-heksana (pro analisis, Merck, Germany); asam Fosfat (pro analisis, Merck, Germany); asetronitril (HPLC grade, Merck, Germany); akuabides (PT. Ikapharmindo Putramas, Indonesia).

B. Cara Penelitian

1. Optimasi kondisi analisis

Sebanyak 20 μ L larutan standar akrilamida 10 ppm diinjeksikan ke dalam kolom. Fase gerak yang digunakan adalah asam fosfat, asetronitril dan akuabides dengan perbandingan 1: 5: 94 v/v dan laju alir 0,15 mL/menit pada panjang gelombang 202 nm. Selanjutnya sebanyak 20 μ L sampel diinjeksikan ke dalam kolom dengan kondisi fase gerak, laju alir dan panjang gelombang yang sama.

2. Sampling

Sampel diambil secara acak atau digunakan metode *convenience sampling*. Sampel yang dipilih adalah produk kopi robusta dengan bentuk sediaan yang

berbeda yaitu kopi tubruk dan kopi instan. Kedua sampel dibeli dari supermarket yang ada di wilayah Jalan Kaliurang Yogyakarta dengan batas kadaluarsa yang sama.

3. Preparasi sampel

Sebanyak 2,2 g bubuk kopi ditimbang dan dilakukan penghilangan kandungan lemak dengan menambahkan 10 mL n-heksana pada sampel dan di-*vortex* selama 5 menit. Setelah didekantasi, residu dikeringkan dengan *vacuum manifold*. Tahap ini dilakukan sebanyak 2 kali. Untuk mengekstraksi akrilamida, filtrat kopi yang telah didefatisasi ditambahkan aseton sebanyak 20 mL dan 100 μ L aquabides dan di-*ultrasonic* selama 20 menit pada suhu 40°C. Lapisan aseton disaring dengan menggunakan kertas saring dan kemudian diuapkan dengan waterbath. Kemudian residunya ditambahkan dengan 2 mL fase gerak dan dikocok untuk melarutkan dan disaring.

4. Pembuatan standar akrilamida

Sebanyak 10 mg standar akrilamida ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Standar akrilamida dilarutkan dengan asam fase gerak sampai batas. Larutan standar akrilamida konsentrasi 2; 5; 10; 15 dan 20 ppm dibuat dengan mengencerkan larutan stok menggunakan fase gerak.

5. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan standar 2; 5; 10; 15 dan 20 ppm masing-masing diinjeksikan sebanyak 20 μ l ke dalam kolom pada kondisi terpilih. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan dibuat kurva perbandingan luas puncak dengan konsentrasi larutan.

6. Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi.

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sebanding dengan nilai b pada garis linier $Y = aX + b$

7. Uji keterulangan

Sebanyak 20 μ l larutan standar 10 ppm diinjeksikan ke dalam kolom menggunakan fase gerak dan kecepatan alir yang terpilih, diulang sebanyak 6

kali, kemudian dicatat luas puncaknya dan dihitung koefisien variasinya.

8. Uji Akurasi

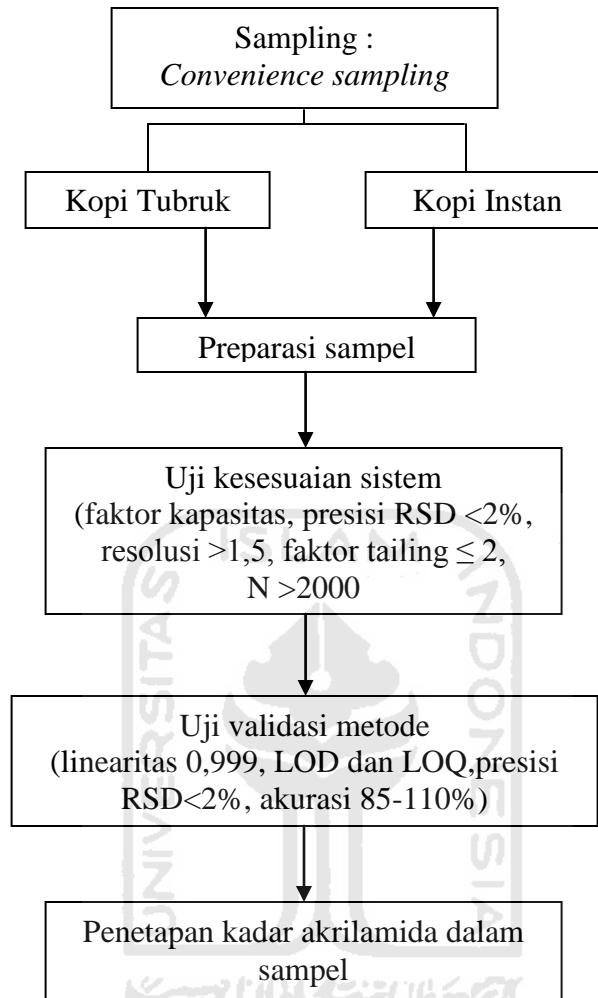
Sebanyak 22 gram sampel ditimbang dan ditambahkan 0,1 mg standar akrilamida. Campuran tersebut kemudian dilakukan defatisasi dengan menggunakan 100 mL n-hexana dan di-*vortex* selama 30 menit. Setelah didekantasi, residu dikeringkan dengan *vacuum manifold*. Defatisasi dilakukan 2 kali. Selanjutnya, campuran yang telah didefatisasi diekstraksi dengan menggunakan 200 mL aseton, di-*ultrasonic* selama kurang lebih 1 jam pada suhu 40°C. Lapisan aseton disaring dengan menggunakan kertas saring dan kemudian diuapkan dengan waterbath. Kemudian residunya ditambahkan fase gerak hingga 20 mL dan dikocok untuk melarutkan. Sebelum diinjeksikan, larutan uji disaring terlebih dahulu. Konsentrasi akrilamida dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi dan dihitung uji perolehan kembalinya.

$$\% \text{Perolehan kembali} = \frac{\text{Konsentrasi sampel yang diperkaya standar} - \text{Konsentrasi sampel}}{\text{Konsentrasi standar yang ditambahkan}} \times 100\%$$

9. Uji kadar akrilamida dalam sampel

Larutan uji hasil preparasi disaring menggunakan microfilter 0,45 µm dan diinjeksikan ke dalam kolom sebanyak 20 µL pada kondisi analisis yang sesuai dan ditentukan luas area puncaknya. Konsentrasi akrilamida dalam sampel dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi.

C. Skema Penelitian



D. Analisis Hasil

1. Hasil analisis kadar akrilamida kopi tubruk dan kopi instan dihitung menggunakan persamaan kurva baku dan ditentukan keamanan kopi untuk dikonsumsi berdasarkan kadar tersebut.
2. Hasil analisa residu akrilamida pada kopi berampas dan kopi tidak berampas dibandingkan secara statistik menggunakan SPSS T-Pairs.
3. Validasi metode ditetapkan menggunakan parameter yang telah ditetapkan oleh *International Conference of Harmonization*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Sampling penelitian

Pemilihan sampel dilakukan secara *convenience sampling*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini dibatasi pada jenis kopinya yaitu kopi robusta dalam bentuk kopi tubruk dan kopi instan kemasan sachet. Sampel berjumlah enam sachet terdiri dari, tiga sachet kopi tubruk dengan merek A dan 3 sachet lainnya kopi instan dengan merek B. Kopi tubruk dan kopi instan dipilih dari merek yang berbeda dikarenakan tidak terdapat pabrik yang memproduksi kopi instan dan kopi tubruk sekaligus. Masa kadaluarsa dari masing-masing sampel sama (Oktober 2012).

B. Preparasi sampel

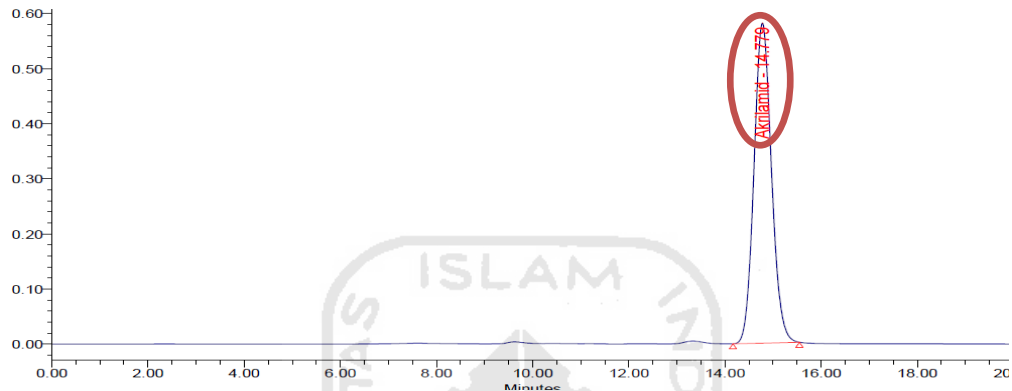
Preparasi sampel dilakukan sebagaimana yang dilakukan oleh Khoshnam dkk. pada keripik kentang menggunakan aseton untuk ekstraksinya. Hasil ekstraksi akrilamida menggunakan aseton, menghasilkan larutan uji berwarna coklat bening. Kedua jenis sampel memiliki warna yang terlihat sama setelah mengalami penyaringan. Penyaringan ini dilakukan untuk mencegah adanya partikel-partikel terutama lemak yang masih terdapat dalam sampel agar tidak melewati kolom yang menyebabkan tertahannya partikel dalam kolom. Larutan uji yang digunakan dapat dilihat pada **Gambar 4**.



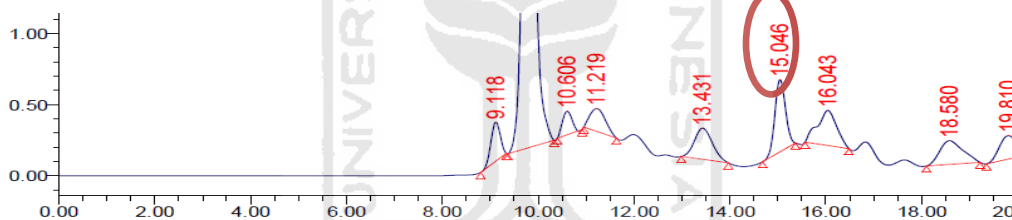
Gambar 4. Larutan sampel uji yang siap diinjeksikan ke dalam KCKT

C. Uji kesesuaian sistem

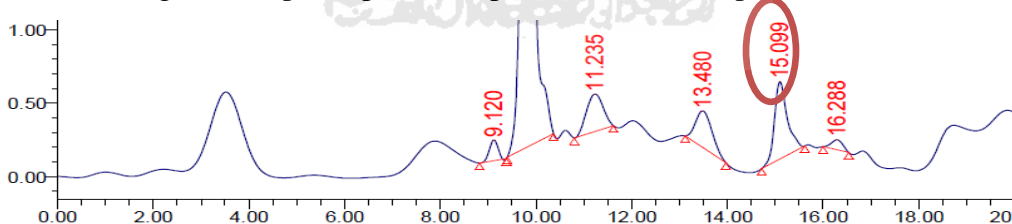
Uji kesesuaian sistem bertujuan untuk memastikan sistem operasi secara lengkap mulai dari instrumen, kolom, reagen dan kolom telah cocok untuk penggunaannya. Uji kesesuaian sistem merupakan bagian integral dari kromatografi cair dan gas⁽²⁷⁾. Uji ini digunakan untuk memverifikasi resolusi dan reproduktifitas dari sistem kromatografi untuk analisis yang dilakukan.



5A. Kromatogram standar akrilamida 10 ppm pada menit ke-14,776



5B. Kromatogram sampel kopi instan (puncak akrilamida pada menit ke-15,046)



5C. Kromatogram sampel kopi tubruk (puncak akrilamida pada menit ke-15,099)

Gambar 5. Kromatogram standar akrilamida dan sampel kopi tubruk dan kopi instan. Metode analisis menggunakan fase gerak asam fosfat: asetonitril : air (1 : 5 : 94 v/v), laju alir 0,15 mL/menit dan detektor UV pada panjang gelombang 202 nm.

1. Faktor kapasitas (k')

Faktor kapasitas adalah ukuran suatu puncak tertentu berhubungan dengan *void volume*, yaitu waktu elusi dari komponen *unretained*⁽²⁹⁾. Nilai ini memberi indikasi waktu yang dibutuhkan masing-masing komponen tertahan pada kolom. Faktor kapasitas lebih sering digunakan sebagai parameter kesesuaian sistem dibandingkan waktu retensi dikarenakan tidak terlalu sensitif terhadap fluktuasi kondisi kromatografi seperti laju aliran dan dikarenakan ketepatan dalam memastikan reproduksifitas lebih besar dalam tiap pembacaan⁽²⁸⁾.

Berdasarkan perhitungan pada lampiran 1, maka didapatkan nilai k' dari penelitian ini adalah 26,018 untuk kopi instan dan 26,752 untuk kopi tubruk. Menurut *Food and Drug Administration* (FDA), nilai faktor kapasitas akan lebih baik apabila > 2 . Nilai faktor kapasitas lebih dari 2. Berdasarkan data tersebut, maka faktor kapasitas untuk metode ini dikatakan cukup baik dengan nilai yang cukup besar dikarenakan laju alir yang lambat.

2. Presisi

Presisi injeksi yang dinyatakan sebagai RSD (standar deviasi relatif) menunjukkan kinerja dari KCKT, termasuk pipa kolom dan kondisi lingkungan, pada saat sampel dianalisis. Perlu diketahui, persiapan dan pembuatan sampel dalam hal ini tidak dipertimbangkan⁽²⁸⁾.

Tabel IV. Data uji presisi akrilamida 10 ppm

Analit Presisi	Luas Area	Kadar (ppm)	Waktu Retensi
1	15024858	10,62	14,832
2	15131724	10,69	14,827
3	14938737	10,56	14,819
4	15031849	10,62	14,825
5	14906115	10,54	14,824
6	14953359	10,57	14,835
Rata-rata	14997774	10,60	14,827
SD	82093,46	0,05	0,005
RSD (< 2%)	0,54	0,47	0,03

Hasil perhitungan RSD dari uji presisi yang dilakukan dapat dilihat pada **Tabel IV** yaitu 0,54%. Menurut FDA, untuk uji kesesuaian sistem batas nilai RSD dari uji presisi adalah $< 1\%$ untuk jumlah sampel ≥ 5 .

3. Resolusi

Resolusi adalah ukuran untuk menentukan seberapa baik pemisahan dua puncak yang saling berdekatan. Tujuan dari penentuan resolusi ini adalah agar nilai kuantitasi yang dihasilkan dapat dipercaya. Resolusi setidaknya dipengaruhi oleh perbandingan antara dua puncak yang terukur⁽²⁹⁾.

Akrilamida muncul pada menit ke 14,7 hingga 15,5 seperti yang terlihat pada **Gambar 5**. Terdapat 2 puncak yang berdekatan pada analit. Berdasarkan rumus di atas, resolusi masing-masing pada sampel kopi tubruk dan kopi instan, pada analisis ini sedikit berbeda. Hasil perhitungan pada masing-masing sampel dapat dilihat pada lampiran 2.

Pada kopi tubruk, menunjukkan nilai resolusi rata-rata puncak akrilamida terhadap puncak yang muncul pada menit ke-16,2 adalah 1,54. Di sisi lain, nilai resolusi rata-rata puncak akrilamida pada kopi instan terhadap puncak yang muncul pada menit ke-16,04 adalah 1,45. Menurut FDA, untuk uji kesesuaian sistem nilai resolusi yang harus dicapai adalah > 2 , sedangkan menurut ICH resolusi yang harus dicapai adalah $> 1,5$. Berdasarkan data yang diperoleh, resolusi dari akrilamida masih sudah baik.

4. Faktor *tailing*

Faktor *tailing* adalah pengukuran keasimetrian puncak. Semakin tinggi faktor *tailing*, maka semakin menurun keakuratan pengukuran. *Tailing* terjadi dikarenakan kesulitan yang dialami integrator untuk menentukan kapan atau di mana puncak tersebut berakhir. Pengaruh dari faktor *tailing* terhadap keakuratan pengukuran dikarenakan pengukuran didasarkan pada perhitungan luas area di bawah puncak⁽²⁹⁾.

Berdasarkan hasil perhitungan pada lampiran 3, faktor *tailing* pada kopi instan lebih kecil dibandingkan pada kopi tubruk. Faktor *tailing* pada kopi tubruk adalah 0,140, sedangkan pada kopi instan faktor *tailing*nya adalah

0,096. Menurut FDA, faktor tailing sebaiknya ≤ 2 . Dalam hal ini, kopi tubruk dan kopi instan memiliki faktor tailing yang dapat diterima sehingga pengukuran area puncak dapat dikatakan akurat.

5. Jumlah plat teoritis

Jumlah plat teoritis (N) adalah ukuran efisiensi kolom, yaitu banyaknya puncak yang dapat ditemukan dalam tiap unit *run-time* dari kromatogram. Parameter yang dapat mempengaruhi N meliputi posisi puncak, ukuran partikel dalam kolom, tingkat aliran fase gerak, suhu kolom, viskositas fase gerak dan berat analit molekuler.

Tabel V. Data jumlah plat teoritis sampel kopi tubruk dan kopi instan

	Kopi Tubruk	Kopi Instan
Jumlah plat teoritis	4503	7741
	7819	12064
	5514	8642
Rata-rata	5945,68	9483,16

Berdasarkan hasil perhitungan, nilai jumlah plat teoritis untuk kopi tubruk dan kopi instan dapat dilihat pada tabel II. Menurut FDA, efisiensi kolom akan dikatakan baik apabila nilai $N > 2000$. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel VI. Parameter uji kesesuaian sistem metode KCKT yang digunakan pada analisis akrilamida dalam kopi

No.	Variabel	Hasil
1	Fase gerak	Asam fosfat : asetonitril : aqubides (1:5:94)
2	Fase diam	C-18 (150 mm x 4,6 mm) 5 μ m
3	Kecepatan alir	0,15 mL/menit
4	Panjang gelombang	202 nm
5	Faktor kapasitas	0,65 (kopi tubruk); 0,65 (kopi instan)
6	Presisi	RSD 0,54 %
7	Resolusi	1,9 (kopi tubruk); 2,04 (kopi instan)
8	Faktor tailing	0,140 (kopi tubruk); 0,096(kopi instan)
9	Efisiensi kolom	>4000 (kopi tubruk); >7000 (kopi instan)

D. Uji Validasi

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian yang harus dilakukan terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya agar dapat diandalkan kebenarannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis didefinisikan dan diuraikan sebagaimana cara penentuannya.

1. Selektivitas

Selektivitas metode adalah kemampuan suatu metode yang hanya mengukur zat tertentu saja secara seksama dengan adanya komponen lain yang terdapat dalam sampel. Penentuan selektivitas harus dilakukan selama validasi dari uji identifikasi, penentuan cemaran dan pengujian.

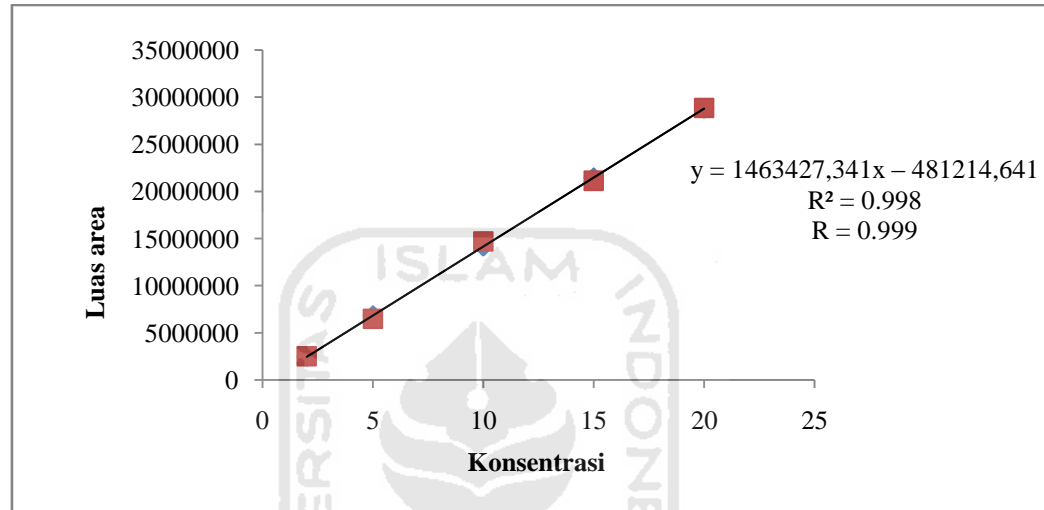
Prosedur yang digunakan untuk menunjukkan selektivitas tergantung pada tujuan yang ingin dicapai dari analisis. Prosedur dengan kromatografi digunakan kromatogram standar sebagai pembanding. Kemudian ditentukan resolusi dari dua puncak yang terelusi berdekatan. Resolusi masing-masing pada sampel kopi tubruk dan kopi instan, pada analisis ini sedikit berbeda. Pada kopi tubruk, resolusi rata-rata puncak akrilamida terhadap puncak yang muncul pada menit ke-13,4 adalah 1,9, sedangkan resolusi rata-rata puncak akrilamida pada kopi instan terhadap puncak yang muncul pada menit ke-13,4 adalah 2,04. Berdasarkan nilai resolusi tersebut, maka spesifisitas metode yang digunakan sudah baik.

2. Linieritas

Linearitas ditujukan untuk mengetahui kemampuan metode analisis untuk memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang sesuai terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Data dari regresi tersebut akan memberikan perkiraan tingkat linieritas. Seringkali koefisien regresi atau r adalah 0,999.

Tabel VII. Kurva kalibrasi akrilamida

Konsentrasi standar	Luas area	
Standar akrilamida 2 ppm	2522285,061	$y = 1463427,341x - 481214,641$ $R = 0,999$
Standar akrilamida 5 ppm	6497737,692	
Standar akrilamida 10 ppm	14689634,577	
Standar akrilamida 15 ppm	21135674,926	
Standar akrilamida 20 ppm	28846816,294	

**Gambar 6.** Grafik kurva kalibrasi akrilamida

Berdasarkan **Tabel VII** dan **Gambar 6**, secara visual hubungan terhadap konsentrasi analit tampak linier. Berdasarkan data tersebut maka dilakukan perhitungan regresi linier untuk menentukan linieritasnya. Perhitungan secara regresi terhadap data tersebut adalah persamaan garis $y = bx + a$, $y = 1463427,341x - 481214,641$ dengan nilai korelasi 0,999 dengan y adalah luas area, x adalah konsentrasi, b adalah *slope*, dan a adalah intersep.

3. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung dengan cara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama

dengan nilai slope (b) pada persamaan garis $y = bx + a$. Simpangan blangko akan sama dengan simpangan baku residual (σ).

Berdasarkan rumus tersebut maka diperoleh nilai batas deteksi akrilamida adalah 0,792 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai batas kuantitasnya adalah 2,401 $\mu\text{g/mL}$.

4. Presisi

Pengukuran presisi dilakukan dengan membandingkan 6 larutan standar dari akrilamida dengan konsentrasi yang sama. Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang dianalisis, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwasannya koefisien variasi meningkat dengan menurunnya konsentrasi analit yang dianalisis. Pada metode yang sangat kritis, secara umum RSD diterima lebih dari 2 %.

Data hasil perhitungan presisi pada **Tabel IV** menunjukkan bahwa nilai standar deviasi relatif (RSD) dari kadar 6 analit yang dibandingkan adalah 0,47%. Nilai RSD Horwitz untuk konsentrasi analit 10 ppm adalah 11,3%. Berdasarkan hasil tersebut, nilai RSD analit yang telah diperoleh lebih kecil dari nilai RSD Horwitz. Ini menunjukkan %RSD analit telah memenuhi kriteria yang ditetapkan untuk pengukuran presisi.

5. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan dari suatu cemar seperti akrilamida dalam suatu sampel dilakukan dengan cara menambahkan cemar yang diketahui jumlahnya. Harus jelas bagaimana cemar tersebut ditentukan persennya⁽²⁷⁾.

a. Kopi Tubruk

Tabel VIII. Uji recovery akrilamida pada kopi tubruk

Replikasi	Kadar sampel	Kadar analit yang ditambahkan	Kadar sampel yang diperkaya standar	% Recovery
1	7,044	4,769	12,925	123,31
2	7,044	4,769	12,940	123,69
3	7,044	4,769	12,011	104,14
Rata-rata				117,03
SD				11,16
RSD (%)				9,54

Menurut *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* persen *recovery* yang dapat diterima untuk konsentrasi 1-10 ppm adalah 85-110 %. Pada uji *recovery* yang dilakukan terhadap sampel, uji *recovery* rata-rata akrilamida dalam campuran adalah 117,03%. Ini menunjukkan nilai %*recovery* dari kopi tubruk dengan metode ini tidak baik. Nilai RSD yang diperoleh lebih dari 2 % yaitu 9,54%. Nilai ini menggambarkan keterulangan dari data akurasi ini kurang baik. Berdasarkan data tersebut, nilai akurasi yang kurang baik dapat diperoleh akibat metode ekstraksi yang tidak optimal. Keterbatasan dari metode ekstraksi ini dimungkinkan karena sampel masih mengandung banyak senyawa pengotor lainnya sehingga menyebabkan ekstraksi untuk akrilamida dari sampel tidak stabil.

b. Kopi Instan

Tabel IX. Uji recovery akrilamida pada kopi instan

Replikasi	Kadar sampel	Kadar analit yang ditambahkan	Kadar sampel yang diperkaya standar	% Recovery
1	5,744	7,767	13,871	104,64
2	5,744	7,767	13,853	104,41
3	5,744	7,767	13,736	102,90
Rata-rata				103,98
SD				0,01
RSD (%)				0,91

Menurut AOAC persen *recovery* yang dapat diterima untuk konsentrasi 1-10 ppm adalah 85-110 %. Pada uji *recovery* yang dilakukan terhadap sampel, uji *recovery* rata-rata akrilamida dalam campuran telah mencakupi dalam rentang yang dapat diterima yaitu 103,984%. Berdasarkan hasil tersebut, maka % *recovery* yang diperoleh pada kopi instan dengan menggunakan metode ini dapat diterima dan cukup baik.

E. Penentuan kadar akrilamida pada kopi instan dan kopi tubruk

Teknik yang digunakan dalam analisis ini adalah metode standar eksternal, yaitu metode dengan membuat seri kadar larutan standar dengan berbagai konsentrasi dan absorbansi dari larutan tersebut yang kemudian diukur dengan KCKT. Menggunakan program regresi linier akan didapatkan persamaan $y = bx + a$. dari hasil analisis yang dilakukan data absorbansi dan konsentrasi sampel untuk sampel kopi instan dan kopi tubruk.

Tabel X. Hasil analisis akrilamida dalam sampel kopi instan dan kopi tubruk

Sampel	Replikasi	Area	Kadar (ppm)	SD	RSD (%)	Kandungan rata-rata dalam tiap sachet (g)
Kopi Tubruk	1	9793960	7,02	0,01	0,14	7,03 µg
	2	9827634	7,04			
	3	9803182	7,03			
Kopi Instan	1	7852027	5,69	0,02	0,44	5,71 µg
	2	7924334	5,74			
	3	7887213	5,72			

Berdasarkan uji statistika dengan menggunakan SPSS T-test, nilai korelasi 0,971 dengan probabilitas 0,153. Nilai probabilitas $> 0,05$ menunjukkan hubungan kadar akrilamida antara kopi tubruk dan kopi instan adalah tidak berhubungan satu sama lain. Pada output bagian 3 nilai probabilitas $< 0,05$, artinya

rata-rata kadar kopi tubruk dan kopi instan tidak identik. Data uji statistik t-test dapat dilihat pada lampiran 12.

Pada dasarnya, pembentukan akrilamida dikarenakan pemanasan makanan dengan kandungan karbohidrat, protein, peptida, dan amina biogenik yang merupakan substrat untuk akrilamida, pada suhu tinggi ($>120^{\circ}\text{C}$)^(2,21). Kopi merupakan salah satu produk yang memiliki kandungan senyawa kimia utama yaitu karbohidrat, asam klorogenat, lipid dan asam amino⁽⁹⁾. Menurut teori tersebut dan dengan adanya langkah-langkah pada pengolahan biji kopi, maka dapat disimpulkan kopi dapat mengandung akrilamida.

Produk kopi tubruk dan kopi instan mengalami langkah pengolahan biji kopi yang berbeda untuk pembuatannya. Kopi tubruk pada umumnya dibuat dari biji kopi yang dipanggang dan kemudian dihaluskan, sedangkan kopi instan dibuat dari biji kopi yang juga mengalami pemanggangan dan dihaluskan dan setelah itu dilakukan percolasi pada suhu tinggi dengan menggunakan air. *Food and Drug Administration* (FDA) telah melakukan uji di beberapa negara untuk menentukan konsentrasi kopi tubruk maupun kopi instan. Hasil yang diperoleh dari uji tersebut yaitu kopi instan memiliki konsentrasi akrilamida yang lebih tinggi. Hal ini dikarenakan pemanasan bertingkat yang dialami biji kopi.

Berbeda dari hasil yang diperoleh FDA, berdasarkan hasil analisis dengan KCKT, dapat dilihat pada **Tabel X** bahwasannya kandungan akrilamida pada kopi instan lebih kecil dibandingkan kopi tubruk. Ada beberapa faktor yang memungkinkan terjadinya penurunan akrilamida dalam proses pembuatan bubuk kopi ini antara lain adalah penyimpanan dan penambahan air pada tahap percolasi. Diketahui bahwasannya, penyimpanan makanan atau minuman yang mengandung akrilamida pada suhu $>4^{\circ}\text{C}$ akan menyebabkan penurunan konsentrasi akrilamida. Selain itu, disebutkan oleh Friedman dalam *Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide*, peningkatan kelembaban dengan adanya air menyebabkan penekanan pembentukan akrilamida dan menurunkan kadar senyawa prekursor akrilamida tersebut⁽²⁰⁾.

FDA memperkirakan jumlah asupan akrilamida yang masih memberikan tingkat risiko yang rendah adalah 1 $\mu\text{g}/\text{hari}$. Kadar tersebut diperkirakan memberikan efek karsinogenik 100.000 kali lebih rendah dibandingkan rata-rata asupan per hari⁽⁴⁾. Suatu studi toksikologi dari Amerika Serikat menyatakan bahwa asupan akrilamida yang dapat di toleransi adalah 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BB/hari untuk menghindari efek karsinogeniknya. Jika diasumsikan berat rata-rata laki-laki dan perempuan dewasa sekitar 40-80 kg, maka asupan akrilamida yang diperbolehkan adalah 80 - 160 μg tiap harinya. Pada penelitian ini, diperoleh hasil yaitu kopi instan mengandung akrilamida $7 \pm 0,009$ $\mu\text{g}/\text{g}$ dan kopi tubruk mengandung akrilamida $5 \pm 0,025$ $\mu\text{g}/\text{g}$. Berdasarkan data tersebut, maka asupan akrilamida yang diperoleh dari masing-masing kopi dapat dikatakan aman untuk dikonsumsi hingga 16 g dalam sehari (88-112 μg) pada orang dewasa.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Berdasarkan parameter ICH, metode yang digunakan pada penelitian ini secara keseluruhan merupakan metode yang valid. Namun, nilai akurasi untuk kopi tubruk yang dihasilkan tidak memenuhi kriteria valid.
2. Kopi tubruk mengandung akrilamida $7,03 \pm 0,009 \mu\text{g/g}$ dan kopi instan mengandung akrilamida $5,71 \pm 0,025 \mu\text{g/g}$.
3. Terdapat perbedaan kadar akrilamida antara kopi tubruk dan kopi instan. Kandungan akrilamida dalam kopi instan lebih kecil dibandingkan kopi tubruk dimungkinkan adanya proses penyimpanan sebelumnya pada suhu $>4^{\circ}\text{C}$ dan adanya proses penambahan air yang menyebabkan terjadinya peningkatan kelembapan sehingga terjadi penekanan pembentukan akrilamida dengan menurunkan kadar senyawa prekursor akrilamida.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka saran yang dapat diberikan, yaitu :

1. Bagi peneliti, nilai akurasi yang kurang baik dimungkinkan karena proses ekstraksi sampel yang kurang optimal. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan metode untuk analisis ini dengan menggunakan metode ekstraksi yang lebih spesifik terhadap akrilamida.
2. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya terhadap jenis kopi lainnya untuk mengetahui pengaruh proses yang berbeda, seperti dekafeinisasi dan fermentasi, terhadap kadar akrilamida.
3. Bagi masyarakat, diharapkan dapat mengurangi konsumsi makanan ataupun minuman yang mengandung akrilamida untuk menghindari terjadinya peningkatan risiko paparan akibat akumulasi senyawa akrilamida.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) Harahap, Y., Harmita, Simajuntak, B., 2005, Optimasi Penetapan Kadar Akrilamida yang Ditambahkan ke dalam Keripik Kentang Simulasi Secara Kromatografi Cair Kinerja tinggi, *Indonesian J. Pharm.*, Vol. II No. 3: 154-163.
- (2) Lingnert, H., Grivas, S., Jagerstad, M., Skog, K., Tornqvist, M., Aman, P., 2002, Acrylamide in Food : Mechanisms of Formation and Influencing Factor during heating of foods, *Scand. J. Nutr.*, No. 46: 4, 159–172.
- (3) Anonim, 1985. Environmental Health Criteria 49 Acrylamide. International Programme on Chemical safety: the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc49.htm>
#SubSectionNumber:1.1.5, 13 Juni 2010 22.00 WIB.
- (4) Anonim, 2005. Intake of Acrylamide in Food. Office of Environmental Health Hazard Assesment (OEAHHA). http://oehha.ca.gov/prop65/law/pdf_zip/acrylamideintakeReport.pdf, 22 Juni 2010 21.00 WIB.
- (5) Anonim. Processing Lines and Equipment for Instant Coffee Powder. Anhydro. [http://www.anhydro.com/media\(257,1033\)/Processing_Lines_and_Equipment_for](http://www.anhydro.com/media(257,1033)/Processing_Lines_and_Equipment_for), 13 Juni 19.27.
- (6) Seal, C. J., de Mul, A., Haverkort, A.J., Franke, K., Lalljie, S.P.D., Mykkanen, H., Reimerdes, E., Scholz, G., Somoza, V., Tuijtelaars, S., van Boekel, M., van Klaveren, J., Wilcockson, S.J., Wilms, L., 2008, Risk-Benefit Considerations of Mitigation Measures on Acrylamide Content of Foods – A Case Study on Potatoes, Cereals and Coffee, *Brit. J. Nutr.*
- (7) Nursten, H., 2005. The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and Implications. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- (8) Liu, J., Zhao, G., Yuan, Y., Chen, F., Hu, X., 2008, Quantitative Analysis of Acrylamide in Tea by Liquid Chromatography Coupled with

- Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Food Chem.*, No. 108. 760-767.
- (9) Anonim, 2010. Coffee. <http://en.wikipedia.org/wiki/Coffee>, 13 Juni 2010 pkl. 7.50 WIB.
- (10) Oesterich, S., Janzen. 2010. Chemistry of Coffee. *Elsevier Ltd.* 1094.
- (11) Bedekam, E., 2008, Coffee Brew Melanoidins : Structural and Functional Properties of Brown-Colored Coffee Compounds, Thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- (12) Redgwell, R., Fischer, M., 2006, Coffee Carbohydrate, *Braz. J. Plant Physiol*, No. 18:3, 165-174.
- (13) Kristina, B., 2007, Formation of Acrylamide during Roasting of Coffee, Dissertation, Graz University of Technology.
- (14) Anonim. Coffee Roasting, Coffeeresearch [.http://www.coffeeresearch.org/coffee/roasting.htm](http://www.coffeeresearch.org/coffee/roasting.htm), 9 Juni 2010 23.00 WIB.
- (15) Anonim. Coffee Grinding, Coffeeresearch. <http://www.coffeeresearch.org/coffee/grinding.htm>, 9 Juni 2010 23.36 WIB.
- (16) Anonim, 2004. Instant Coffee. The Indological Knowledgebase. http://www.indopedia.org/index.php?title=Instant_coffee. 13 Juni 2010 pkl. 15.00 WIB.
- (17) Besaratinia, A., Pfeifer, G., 2007. A Review of Mechanisms of Acrylamide Carcinogenicity. *Carcinogenesis*, Vol.28: 3. 519–528.
- (18) Yener, Y., Kalipet, Erkan, 2009. The carcinogenic Effects of Acrylamide Formed During Cooking of Some Foods. *Academic J. Cancer Res.*, Vol 2: 1. 25-32.
- (19) Anonim, 2010. Toxicology of Acrylamide (CAS No. 79-06-1) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC
- (20) Friedman, M., 2003. Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *J. Agric. Food Chem.* Vol 51: 16. 4504-4526.

- (21) Anonim, 2002. Consultation on the Health Implications of Acrylamide in Food. Geneva: World Health Organization dan Food and Agriculture Organization 25-27 June 2002 hal. 5.
- (22) Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M., dan Shibamoto, T., 2003. Gas Chromatographic Investigation of Acrylamide Formation in Browning Model Systems. *J. Agric. Food Chem.*, vol 51 : 4002-4003.
- (23) Gandjar, Ibnu Gholib, 2007, Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar: Yogyakarta, 378-418.
- (24) Robards, K., Haddad, P. R., dan Jackson, P.E., 2001, Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, Academic Press : London, 2, 227-277.
- (25) Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya, *Indonesian J. Pharm.*, Vol 1 No.3 : 117-121.
- (26) Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R. , 2002, Harmonized Guidelines For Singlelaboratory Validation Of Methods Of Analysis. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74 No. 5 : 837
- (27) Anonim, 2005, Validation of Analytical Procedures: Methodology, adopted in 1996, International Conference of Harmonization Q2(R1), Geneva.
- (28) Hearn, G. M., 1992, A Guide to Validation in HPLC, Perkin-Elmer Corp. : Norwalk, USA.
- (29) Anonim, 1994, Reviewer Guidance : Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 22.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Faktor kapasitas

$$k' = \frac{T_R - T_M}{T_M}$$

k' = faktor kapasitas

T_R = waktu retensi komponen yang dicari

T_M = waktu dari komponen *unretained*

1. Kopi Tubruk

Replikasi 1

$$\begin{aligned} k' &= \frac{T_R - T_M}{T_M} \\ &= \frac{15,099 - 0,545}{0,545} \\ &= 26,704 \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\begin{aligned} k' &= \frac{T_R - T_M}{T_M} \\ &= \frac{15,099 - 0,547}{0,547} \\ &= 26,603 \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$\begin{aligned} k' &= \frac{T_R - T_M}{T_M} \\ &= \frac{15,093 - 0,540}{0,540} \\ &= 26,950 \end{aligned}$$

k' rata-rata = 26,752



Lampiran 1 (lanjutan)

2. Kopi Instan

Replikasi 1

$$\begin{aligned}k' &= \frac{T_R - T_M}{T_M} \\ &= \frac{15,046 - 0,557}{0,557} \\ &= 26,012\end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\begin{aligned}k' &= \frac{T_R - T_M}{T_M} \\ &= \frac{15,103 - 0,559}{0,559} \\ &= 26,018\end{aligned}$$

Replikasi 3

$$\begin{aligned}k' &= \frac{T_R - T_M}{T_M} \\ &= \frac{15,107 - 0,559}{0,559} \\ &= 26,025\end{aligned}$$

k' rata-rata = 26,018



Lampiran 2

Perhitungan Resolusi

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}}$$

R_s = resolusi

T_{R1} = waktu retensi puncak 1 (menit)

T_{R2} = waktu retensi puncak 2 (menit)

T_{W1} = lebar puncak 1 (menit)

T_{W2} = lebar puncak 2 (menit)

1. Kopi tubruk

Replikasi 1

(15,099 ; 16,288)

$$\begin{aligned} R_s &= 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}} \\ &= 2 \frac{16,288 - 15,099}{0,548 + 0,9} \\ &= 1,642 \end{aligned}$$

Replikasi 2

(15,099 ; 16,304)

$$\begin{aligned} R_s &= 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}} \\ &= 2 \frac{16,304 - 15,099}{0,9 + 0,634} \\ &= 1,665 \end{aligned}$$

Replikasi 3

(15,093 ; 15,843)

$$\begin{aligned} R_s &= 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}} \\ &= 2 \frac{15,843 - 15,093}{0,683 + 0,466} = 1,305 \end{aligned}$$



Lampiran 2 (lanjutan)

Resolusi rata-rata = 1,9

2. Kopi instan

Replikasi 1

(15,046 ;16,043)

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}}$$

$$= 2 \frac{16,043 - 15,046}{0,9 + 1,067}$$

$$= 1,138$$

Replikasi 2

(15,103 ; 16,079)

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}}$$

$$= 2 \frac{16,079 - 15,103}{0,602 + 0,55}$$

$$= 1,694$$

Replikasi 3

(15,107 ; 16,083)

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{T_{W1} + T_{W2}}$$

$$= 2 \frac{16,083 - 15,107}{0,65 + 0,619}$$

$$= 1,538$$

Resolusi rata-rata = 1,457



Lampiran 3

Faktor tailing (T)

$$T = \frac{W_{5\%}}{2f}$$

T = faktor *tailing*

$W_{5\%}$ = lebar puncak yang terukur 5% dari tinggi puncak

f = jarak antara titik awal puncak dan titik maksimum puncak

1. Kopi Tubruk

Replikasi 1

$$\begin{aligned} T &= \frac{W_{5\%}}{2f} \\ &= \frac{(15,617 - 14,717)}{2(15,099 - 14,717)} \\ &= 0,172 \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\begin{aligned} T &= \frac{W_{5\%}}{2f} \\ &= \frac{(15,500 - 14,817)}{2(15,099 - 14,817)} \\ &= 0,096 \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$\begin{aligned} T &= \frac{W_{5\%}}{2f} \\ &= \frac{(15,530 - 14,717)}{2(15,093 - 14,717)} \\ &= 0,152 \end{aligned}$$

T rata-rata = 0,140



Lampiran 3 (lanjutan)

2. Kopi Instan

Replikasi 1

$$T = \frac{W_{5\%}}{2f}$$

$$= \frac{(15,367 - 14,683)}{2(15,046 - 14,683)}$$

$$= 0,124$$

Replikasi 2

$$T = \frac{W_{5\%}}{2f}$$

$$= \frac{(15,417 - 14,867)}{2(15,103 - 14,867)}$$

$$= 0,065$$

Replikasi 3

$$T = \frac{W_{5\%}}{2f}$$

$$= \frac{(15,450 - 14,800)}{2(15,107 - 14,800)}$$

$$= 0,099$$

T rata-rata = 0,096



Lampiran 4

Jumlah plat (N)

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

N = jumlah plat teoritis

T_R = waktu retensi puncak

T_W = lebar puncak

1. Kopi tubruk

Replikasi 1

$$\begin{aligned} N &= 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2 \\ &= 16 \left[\frac{15,099}{0,9} \right]^2 \\ &= 4503,305 \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\begin{aligned} N &= 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2 \\ &= 16 \left[\frac{15,099}{0,683} \right]^2 \\ &= 7819,427 \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$\begin{aligned} N &= 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2 \\ &= 16 \left[\frac{15,093}{0,813} \right]^2 \\ &= 5514,296 \end{aligned}$$



Lampiran 4 (lanjutan)

2. Kopi Instan

Replikasi 1

$$\begin{aligned} N &= 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2 \\ &= 16 \left[\frac{15,046}{0,684} \right]^2 \\ &= 7741,942 \end{aligned}$$

Replikasi 2

$$\begin{aligned} N &= 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2 \\ &= 16 \left[\frac{15,103}{0,55} \right]^2 \\ &= 12064,83 \end{aligned}$$

Replikasi 3

$$\begin{aligned} N &= 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2 \\ &= 16 \left[\frac{15,107}{0,65} \right]^2 \\ &= 8642,706 \end{aligned}$$



Lampiran 5

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Konsentrasi standar (ppm)	Luas area (y)	$y = (1463427,341 \pm 28611)x - (481214,641 \pm 351355)$
2	2522285	
5	6497738	
10	14689635	
15	21135675	
20	28846816	

1. Batas Deteksi

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= 3,3 \frac{\sigma}{b} \\ &= 3,3 \frac{351355}{1463427} \\ &= 0,792 \text{ ppm} \end{aligned}$$

2. Batas Kuantitasi

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= 10 \frac{\sigma}{b} \\ &= 10 \frac{351355}{1463427} \\ &= 2,401 \text{ ppm} \end{aligned}$$



Lampiran 6

Akurasi (kecermatan)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Konsentrasi sampel yang diperkaya standar} - \text{Konsentrasi sampel}}{\text{Konsentrasi standar yang ditambahkan}} \times 100\%$$

1. Kopi Tubruk

Standar yang ditambahkan = 100 μg

Konsentrasi sampel tanpa standar = 7,044 ppm

Konsentrasi standar yang ditambahkan = 4,769 ppm

Replikasi 1

Konsentrasi sampel + analit = 12,925 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{12,925 - 7,044}{4,769} \times 100 \% \\ &= 123,315 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

Konsentrasi sampel + analit = 12,940 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{12,940 - 7,044}{4,769} \times 100 \% \\ &= 123,687 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

Konsentrasi sampel + analit = 12,011 ppm

$$\% \text{ recovery} = \frac{12,011 - 7,044}{4,769} \times 100 \% = 104,139 \%$$

% recovery rata-rata = 117,03 %

Lampiran 6 (lanjutan)

2. Kopi Instan

Standar yang ditambahkan= 140 µg

Konsentrasi sampel tanpa standar= 5,744

Konsentrasi analit yang ditambahkan= 7,676

Replikasi 1

Konsentrasi sampel + standar = 13,871

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{13,871 - 5,744}{7,676} \times 100 \% \\ &= 104,641 \% \end{aligned}$$

Replikasi 2

Konsentrasi sampel + analit = 19791836

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{13,853 - 5,744}{7,676} \times 100 \% \\ &= 104,409 \% \end{aligned}$$

Replikasi 3

Konsentrasi sampel + analit = 19620644

$$\begin{aligned} \% \text{ recovery} &= \frac{13,736 - 5,744}{7,676} \times 100 \% \\ &= 102,903 \% \end{aligned}$$

% recovery rata-rata = 103,984 %

Lampiran 7

Sampel		Area
Kopi Tubruk	1	9793960
	2	9827634
	3	9803182
Kopi Instan	1	7852027
	2	7924334
	3	7887213

Persamaan regresi yang menggambarkan hubungan luas area dan konsentarsi adalah:

$$y = 1463427x - 481214$$

y = luas area; x = konsentrasi larutan (ppm)

Perhitungan kadar akrilamida dalam sampel

1. Kopi Tubruk

Replikasi 1

Luas area puncak (y) = 9793960

$$y = 1463427x - 481214$$

$$9793960 = 1463427x - 481214$$

$$9793960 + 481214 = 1463427x$$

$$x = \frac{9793960 + 481214}{1463427}$$

$$x = 7,021 \mu\text{g/mL}$$

Dalam 2 mL sampel = $7,021 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL}$

$$= 14,042 \mu\text{g}$$

Dalam 2 gram sampel terdapat 14,042 μg akrilamida, maka konsentrasi akrilamida dalam tiap sampel 7,021 $\mu\text{g/g}$.

Replikasi 2

Luas area puncak (y) = 9827634

$$y = 1463427x - 481214$$

$$9827634 = 1463427x - 481214$$

$$9827634 + 481214 = 1463427x$$

$$x = \frac{9827634 + 481214}{1463427} = 7,044 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 7 (lanjutan)

Dalam 2 mL larutan sampel= $7,044 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL}$
 $= 14,088 \mu\text{g}$

Dalam 2 g sampel terdapat $14,088 \mu\text{g}$ akrilamida, maka konsentrasi akrilamida dalam sampel adalah $7,044 \mu\text{g/g}$.

Replikasi 3

Luas area puncak (y) = 9803182

$$y = 1463427x - 481214$$

$$9803182 = 1463427x - 481214$$

$$9803182 + 481214 = 1463427x$$

$$x = \frac{9803182 + 481214}{1463427}$$

$$x = 7,028 \mu\text{g/mL}$$

2. Kopi instan

Replikasi 1

Luas area puncak (y) = 7852027

$$y = 1463427x - 481214$$

$$7852027 = 1463427x - 481214$$

$$7852027 + 481214 = 1463427x$$

$$x = \frac{7852027 + 481214}{1463427}$$

$$x = 5,694 \mu\text{g/mL}$$

Dalam 2 mL sampel= $5,694 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL}$
 $= 11,388 \mu\text{g}$

Dalam 2 gram sampel terdapat $11,388 \mu\text{g}$ akrilamida, maka konsentrasi akrilamida dalam tiap sampel $5,694 \mu\text{g/g}$.

Lampiran 7 (lanjutan)

Replikasi 2

Luas area puncak (y) = 7924334

$$y = 1463427x - 481214$$

$$7924334 = 1463427x - 481214$$

$$7924334 + 481214 = 1463427x$$

$$x = \frac{7924334 + 481214}{1463427}$$

$$x = 5,744 \mu\text{g/mL}$$

Dalam 2 mL sampel = $5,744 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL}$

$$= 11,488 \mu\text{g}$$

Dalam 2 gram sampel terdapat 11,488 μg akrilamida, maka konsentrasi akrilamida dalam tiap sampel 5,744 $\mu\text{g/g}$.

Replikasi 3

Luas area puncak (y) = 7887213

$$y = 1463427x - 481214$$

$$7887213 = 1463427x - 481214$$

$$7887213 + 481214 = 1463427x$$

$$x = \frac{7887213 + 481214}{1463427}$$

$$x = 5,718 \mu\text{g/mL}$$

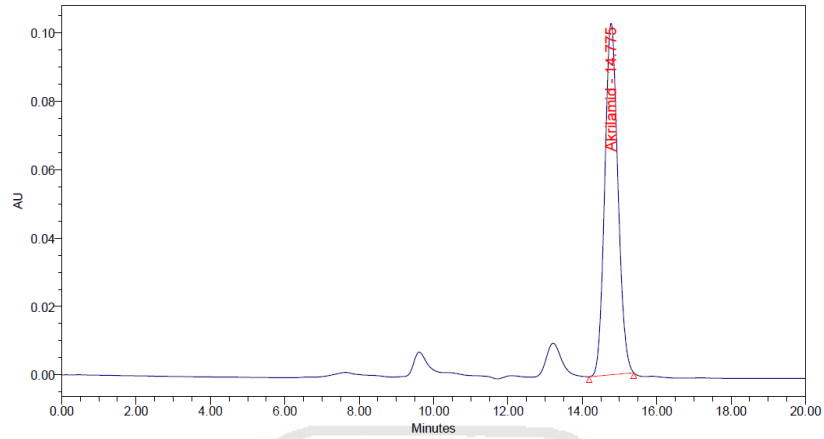
Dalam 2 mL sampel = $5,718 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL}$

$$= 11,436 \mu\text{g}$$

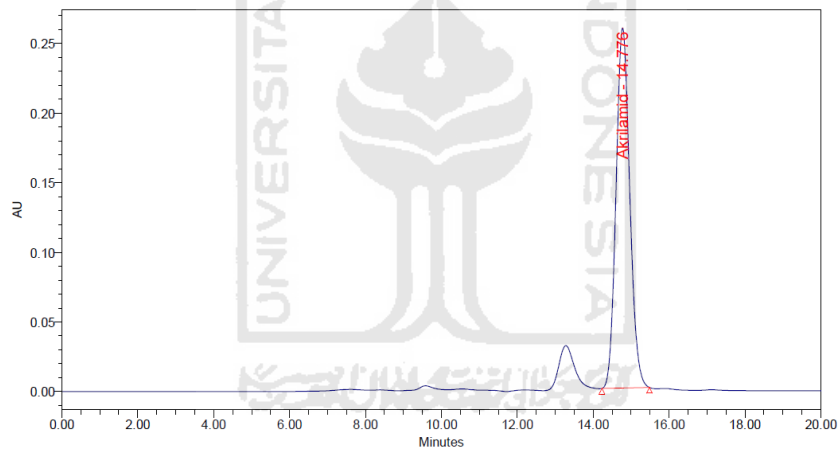
Dalam 2 gram sampel terdapat 11,436 μg akrilamida, maka konsentrasi akrilamida dalam tiap sampel 5,718 $\mu\text{g/g}$.

Lampiran 8

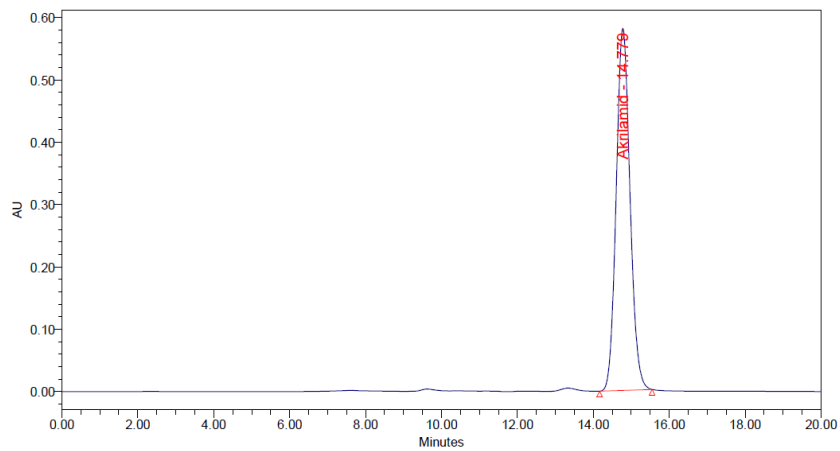
1. Standar akrilamida konsentrasi 2 ppm



2. Standar akrilamida konsentrasi 5 ppm

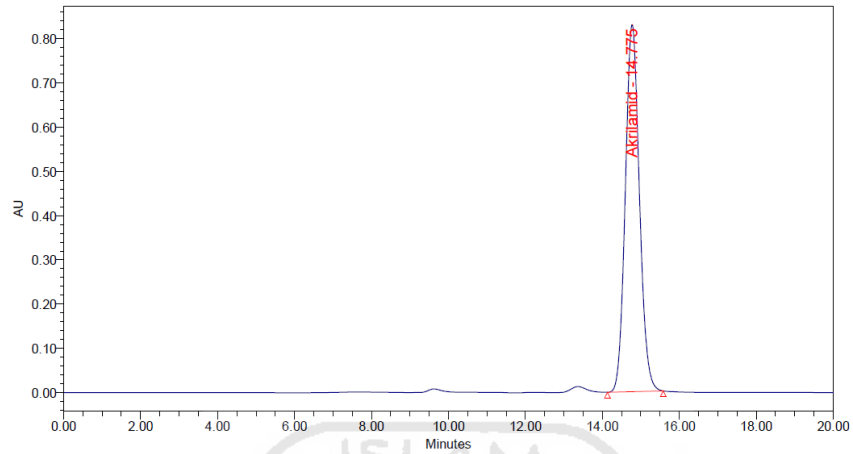


3. Standar akrilamida konsentrasi 10 ppm

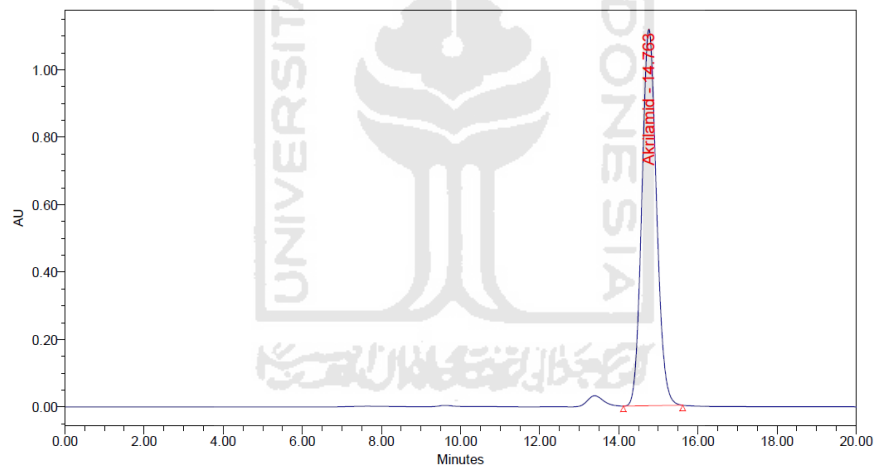


Lampiran 8 (lanjutan)

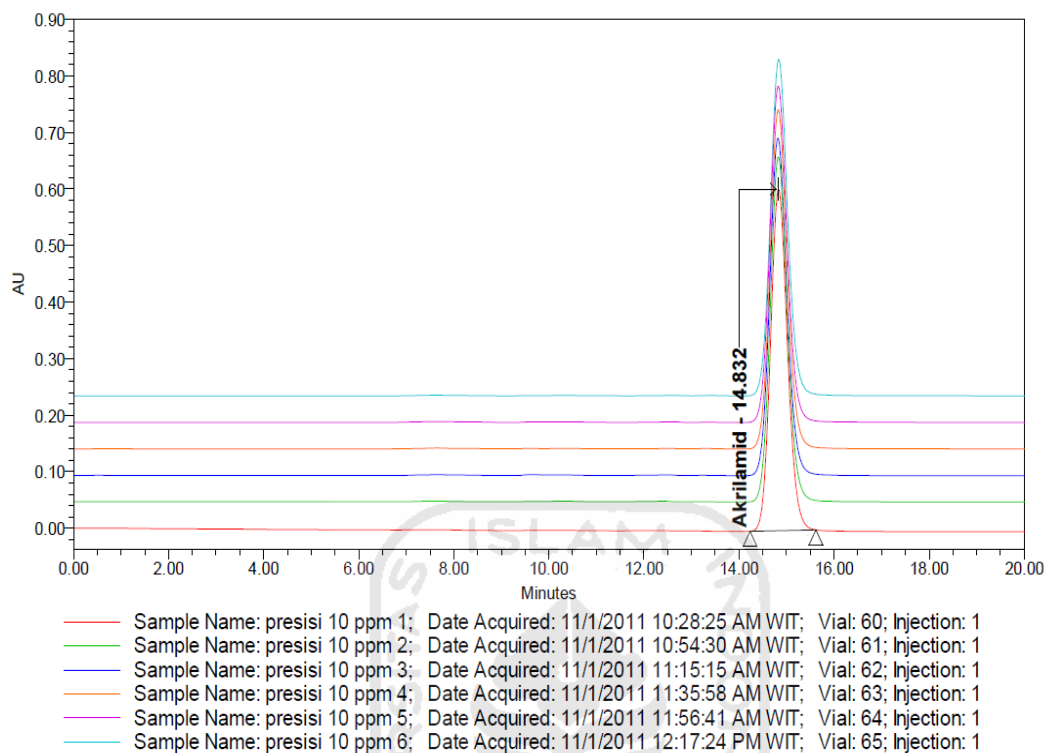
4. Standar akrilamida konsentrasi 15 ppm



5. Standar akrilamida konsentrasi 20 ppm



Lampiran 9

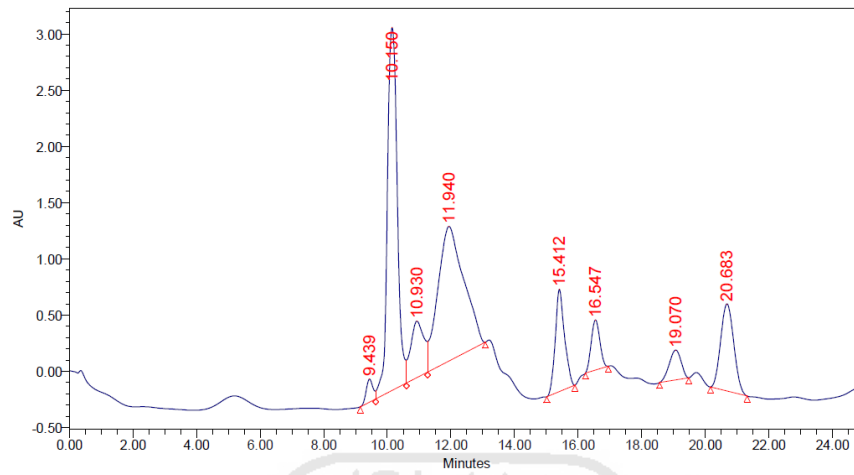


Peak Summary with Statistics
Name: Akrilamid

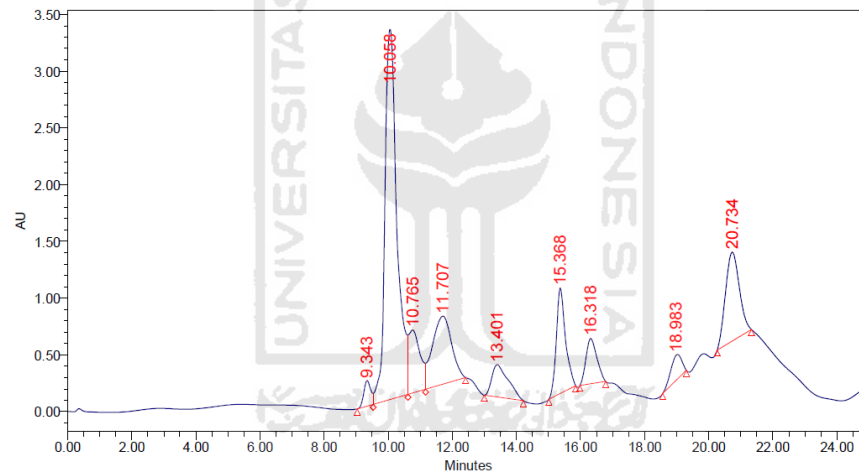
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	presisi 10 ppm 1	60	1	Akrilamid	14.832	15024858	100.00	604222	20.0	ppm
2	presisi 10 ppm 2	61	1	Akrilamid	14.827	15131724	100.00	609153		
3	presisi 10 ppm 3	62	1	Akrilamid	14.819	14938737	100.00	595599		
4	presisi 10 ppm 4	63	1	Akrilamid	14.825	15031849	100.00	598694		
5	presisi 10 ppm 5	64	1	Akrilamid	14.824	14906115	100.00	593690		
6	presisi 10 ppm 6	65	1	Akrilamid	14.835	14953359	100.00	593955		
Mean					14.827					
Std. Dev.					0.006					
% RSD					0.04					

Lampiran 10

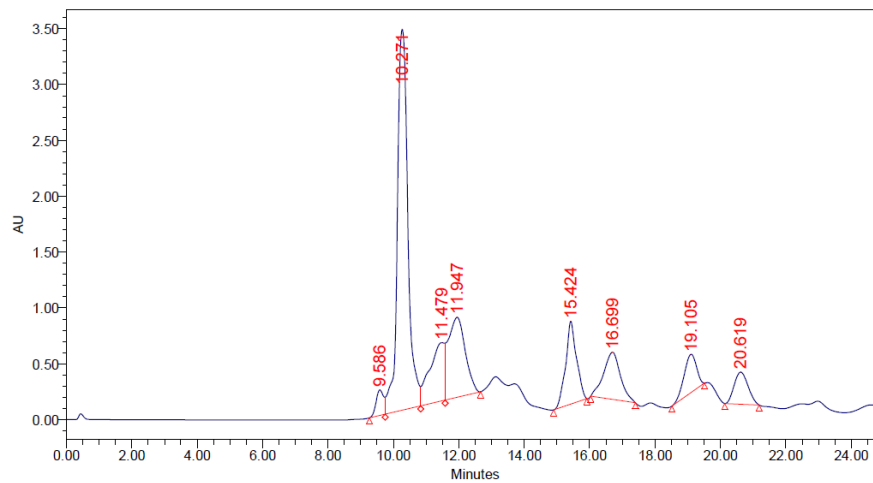
1. Akurasi kopi tubruk 1



2. Akurasi kopi tubruk 2

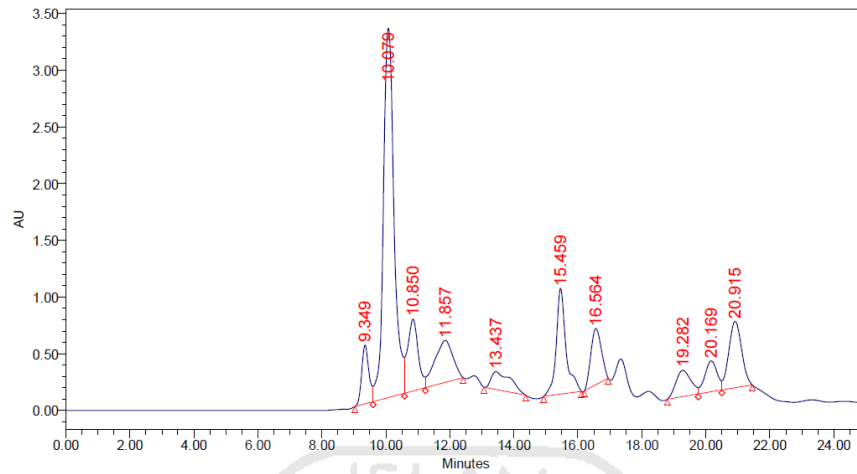


3. Akurasi kopi tubruk 3

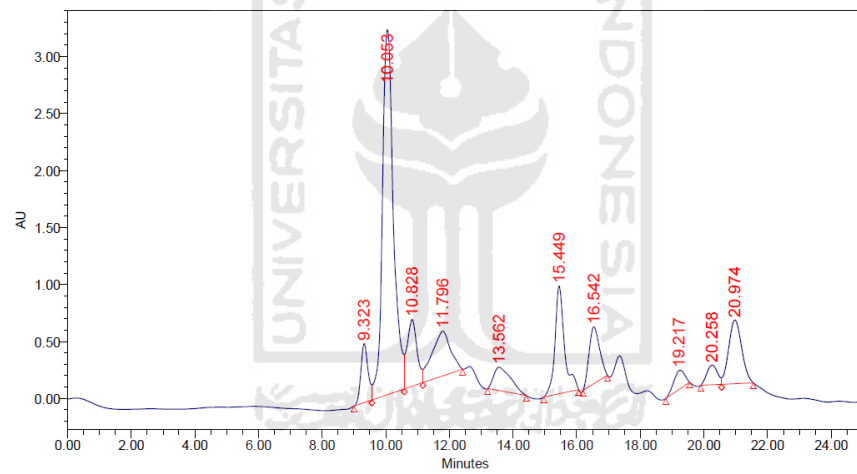


Lampiran 10 (lanjutan)

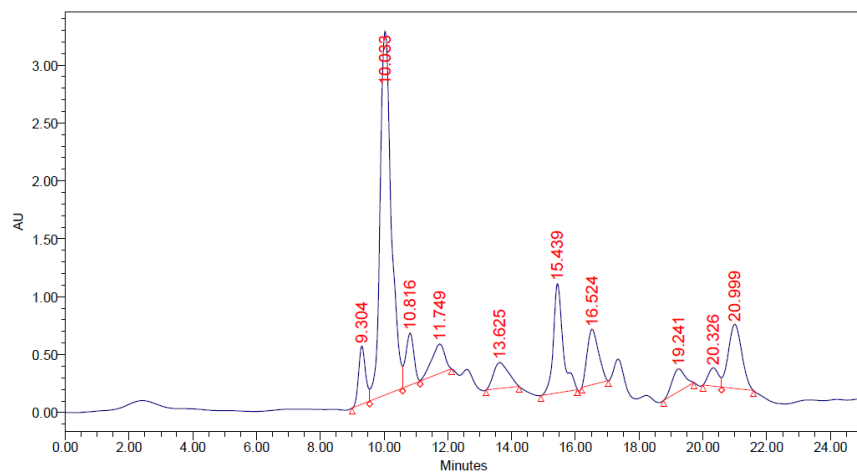
4. Akurasi kopi instan 1

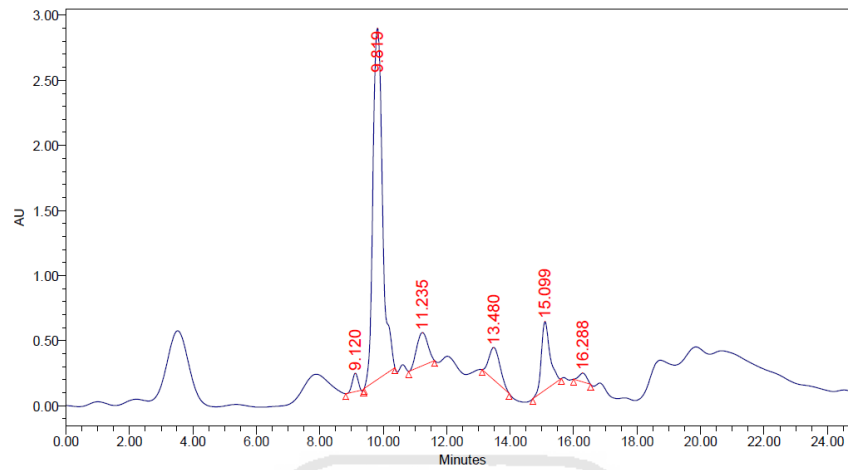
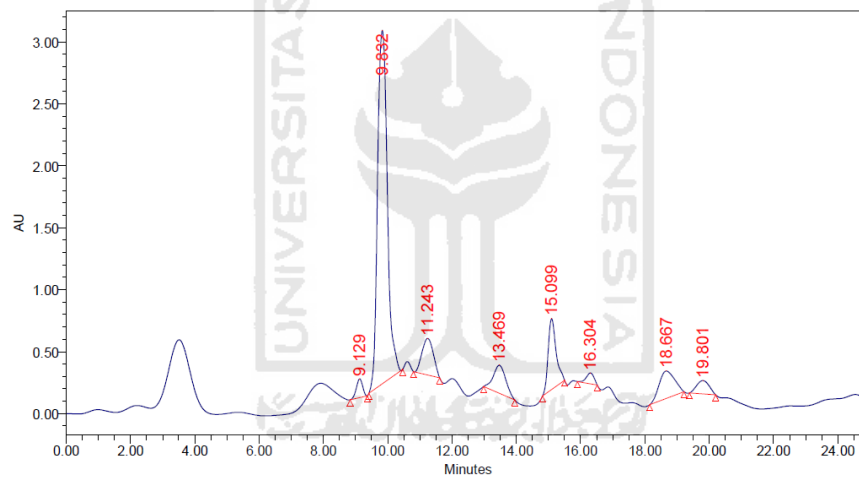
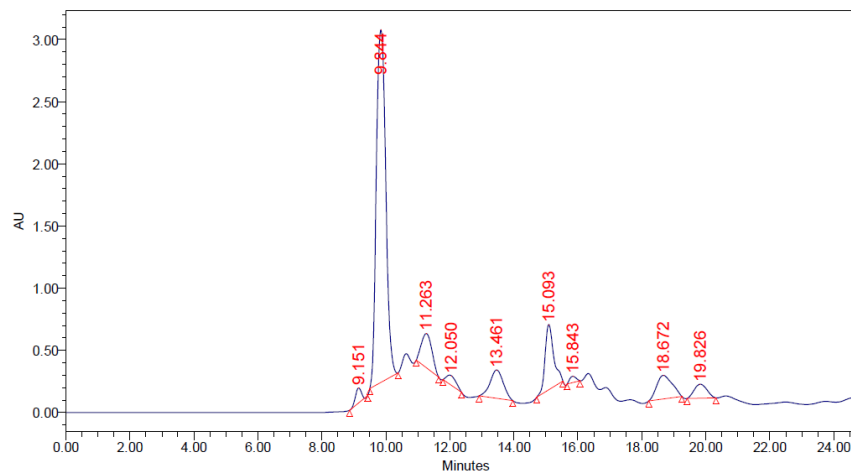


5. Akurasi kopi instan 2



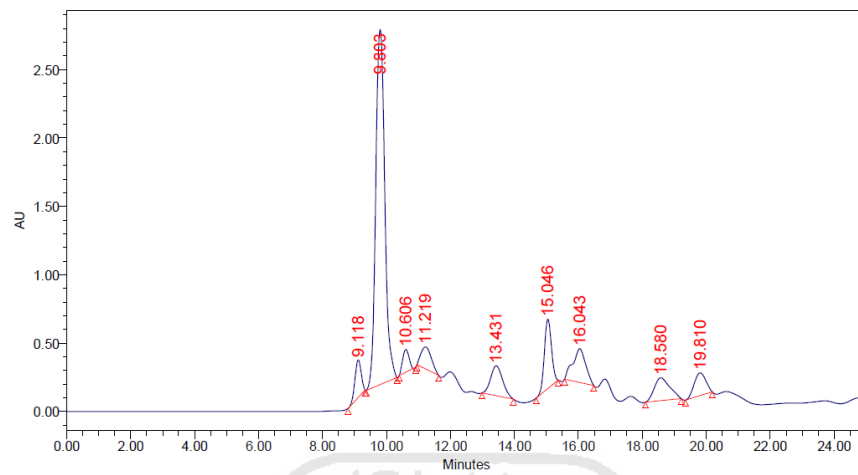
6. Akurasi kopi instan 3



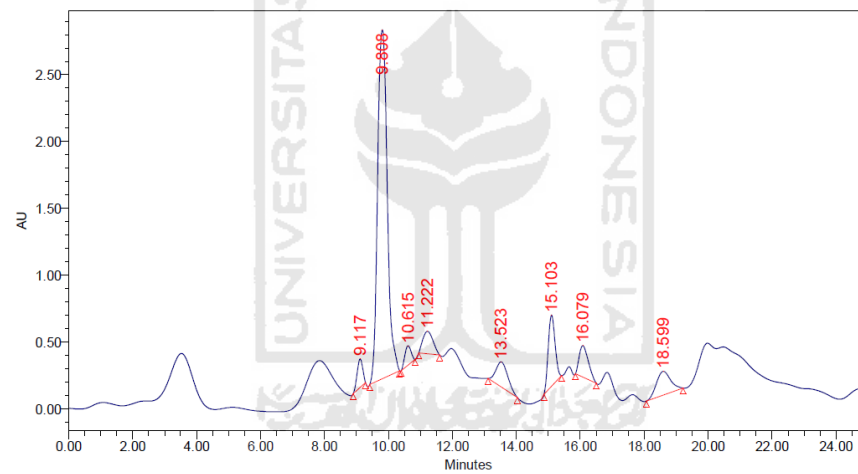
Lampiran 11**1. Kopi tubruk 1****2. Kopi tubruk 2****3. Kopi tubruk 3**

Lampiran 11 (lanjutan)

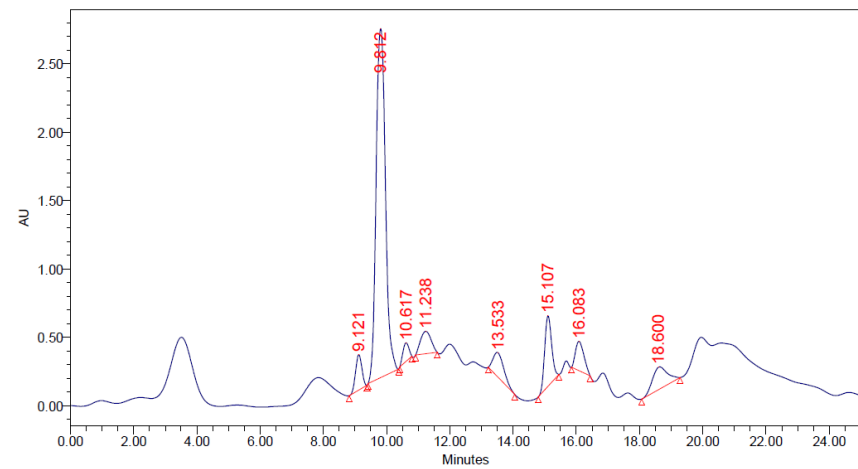
4. Kopi instan 1



5. Kopi instan 2



6. Kopi instan 3



Lampiran 12

T-Test

[DataSet0] C:\Users\fitri\Documents\uji t paired kopi.sav

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 KopiTubruk	9.80826E6	3	1.740155E4	1.004679E4
KopiIstan	7.88786E6	3	3.615781E4	2.087572E4

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 KopiTubruk & KopiIstan	3	.971	.153

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 KopiTubruk - KopiIstan	1.920401E6	1.969408E4	1.137038E4	1.871478E6	1.969323E6	168.895	2	.000