

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Deskripsi Metode Pendekatan Kajian**

Kajian adalah salah satu upaya untuk merangkum berbagai hasil penelitian secara kuantitatif. Kajian merupakan suatu studi observasional retrospektif. Dalam penelitian ini peneliti membuat rekapitulasi data tanpa melakukan manipulasi eksperimental.

Proses dalam melakukan kajian adalah sebagai berikut:

1. Mencari jurnal penelitian yang terkait dengan “Kandungan Akrilamida Dalam Biji Kopi (*Coffea sp.*)”, pencarian jurnal menggunakan situs *Google Scholar* dan *Science Direct*.
2. Melakukan identifikasi status jurnal penelitian dengan menggunakan SINTA RISTEKDIKTI untuk jurnal nasional dan *Scimago Journal Rank* untuk jurnal internasional.
3. Melakukan perbandingan dari jurnal penelitian sebelumnya dengan merujuk pada simpulan umum masing-masing jurnal tanpa melakukan analisis statistik atau analisis mendalam pada data dan hasil penelitiannya
4. Menyimpulkan hasil perbandingan jurnal disesuaikan dengan tujuan penelitian.

### **B. Informasi Jumlah Dan Jenis Jurnal**

Jurnal penelitian yang digunakan yaitu 5 jurnal, yang terdiri dari 2 jurnal nasional dan 3 jurnal internasional. Semua jurnal merupakan original artikel atau hasil dari penelitian.

**Tabel 3.1. Informasi dan Jenis Jurnal**

No.	Penulis, tahun	Jurnal	H-index	Impact Factor	Quartil	SJR	SINTA Score	ISSN
1	Asra <i>et al.</i> , 2019	Jurnal Katalisator	7	1	-	-	S3	2502-0943
2	Swandi <i>et al.</i> , 2020	Ekologia : Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup	-	-	-	-	-	2686-4894
3	Wawrzyniak & Jasiewicz, 2019	Food Chemistry	242	6,810	Q1	1,78	-	0308-8146
4	Bertolomeazzi <i>et al.</i> , 2012	Food Chemistry	242	6,810	Q1	1,78	-	0308-8146
5	Esposito <i>et al.</i> , 2020	Food Chemistry	242	6,810	Q1	1,78	-	0308-8146

### C. Isi Jurnal

Memaparkan isi dari jurnal yang ditelaah dengan isi sebagai berikut:

#### 1. Jurnal Pertama (Jurnal Nasional)

Judul Jurnal : Perbandingan Akrilamida Kopi Bubuk Tradisional Dan Luwak Dengan Metode HPLC

Nama Jurnal : Jurnal Katalisator

Penerbit : LLDIKTI

Volume & Halaman : Vol 4 No. 2 Hal. 61-71

Tahun Terbit : 2019

Penulis Jurnal : Ridho Asra, Rusdi, Sofia Nofianti, dan Nessa Nessa

ISI JURNAL :

##### a. Tujuan Penelitian

Untuk membandingkan kandungan akrilamida dalam kopi bubuk tradisional dan kopi luwak dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

## b. Metode Penelitian

1) Desain : Eksperimental

2) Populasi & Sampel

Sampel bubuk kopi yang digunakan adalah tiga kopi bubuk tradisional (A,B,C) dan tiga kopi luwak bubuk (D,E,F) yang beredar di Kota Padang Sumatera Barat.

3) Instrumen

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu LC-6AD®), kolom ODS C18 (250 × 4,6 mm) (Shimadzu Shimpack®), detektor *Photodiode-Array* (PDA) (Shimadzu®), timbangan analitik (Precisa XB 220A®), *laboratory shaker* (Orbital shaker®), *Waterbath* (Mettler®), labu ukur (Iwaki®), gelas piala (Iwaki®), erlenmeyer (Iwaki®), gelas ukur (Iwaki®), membran filter 0,45 µm, kertas saring, cawan penguap, aluminium foil, dan alat-alat gelas yang menunjang penelitian.

4) Metode Analisis

a) Pengambilan Sampel

Sampel kopi bubuk yang digunakan adalah tiga kopi bubuk tradisional (A, B, C) dan tiga kopi bubuk luwak (D, E, F) yang beredar di Kota Padang Sumatera Barat.

b) Pembuatan Larutan Uji Sampel

Sejumlah 2,2 gram kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak masing-masing ditimbang dan dilakukan penghilangan kandungan lemak dengan menambahkan 10 ml heksana lalu dihomogenkan menggunakan *orbital shaker* kecepatan 350 rpm selama 5 menit

c) Optimasi Fase Gerak dan Kondisi Analisis

Menyiapkan perbandingan larutan antara asetonitril: aquabidest: metanol (5:5:95, v/v/v), aquabidest 100%, asetonitril : aquabidest (10:90, v/v), asetonitril : aquabidest (5:95, v/v), asetonitril : aquabidest (2:98, v/v), dan asetonitril: aquabidest (15:85, v/v). Kemudian alirkan fase gerak dengan konsentrasi standar akrilamida 10 µg/mL dengan variasi laju alir 1,5 mL/menit, 1 mL/menit, dan 0,5 mL/menit ke dalam kolom yang berisi fase diam oktadesilsilika (ODS atau C18) dengan volume penyuntikan 20 µL. Selanjutnya dipilih kombinasi fase gerak dan laju alir yang memberikan pemisahan terbaik.

d) Identifikasi Akrilamida

Analisis kualitatif akrilamida dapat dilakukan dengan membandingkan waktu tambat yang sama (identik) dari kromatogram pada penyuntikan larutan sampel dengan kromatogram pada penyuntikan larutan baku pembanding

akrilamida pada kondisi KCKT yang sama. Larutan uji dikatakan mengandung akrilamida jika waktu retensi larutan uji sama atau mendekati dengan waktu retensi larutan standar.

e) Validasi Metode Analisis

Meliputi pembuatan standar dan kurva kalibrasi akrilamida, uji linearitas, pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi, uji presisi keterulangan, dan uji akurasi.

f) Penetapan Kadar Akrilamida dengan KCKT

Masing-masing larutan uji hasil preparasi dipipet 0,5 mL diencerkan dengan fase gerak ke dalam labu ukur 5 mL. Lalu masing-masing larutan disaring menggunakan membran filter 0,45  $\mu\text{m}$  dan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT sebanyak 20  $\mu\text{L}$  pada kondisi analisis yang sesuai dan ditentukan luas area puncaknya.

c. Hasil Penelitian

1) Optimasi Fase Gerak dan Kondisi Analisis

Fase gerak yang dipilih yaitu perbandingan asetonitril: aquabidest (15:85, v/v) dengan laju alir 0,5 mL/menit pada panjang gelombang 200 nm. Didapat puncak akrilamida pada waktu retensi  $\pm 6,8$  menit. Fase gerak dan laju alir ini dipilih sebagai analisis akrilamida karena pada kromatogram sampel dan kromatogram standar terdapat satu puncak yang artinya resolusinya yang lebih baik, tidak terdapat puncak yang

bertumpuk serta bentuk kromatogramnya simetris, *baseline* yang stabil dan lurus sehingga pembacaan luas area puncak tidak terganggu.

## 2) Identifikasi Akrilamida

Identifikasi akrilamida menunjukkan bahwa keenam sampel kopi bubuk positif mengandung akrilamida. Semua sampel memberikan waktu retensi yang sama dengan baku akrilamida yaitu  $\pm 6,8$  menit.

**Tabel 3.2..** Data Identifikasi Akrilamida

<b>Kopi</b>	<b>Sampel</b>	<b>Waktu retensi (<math>t_R</math>)</b>
<b>Kopi Tradisional</b>	Standar akrilamida 10 $\mu\text{g/mL}$	6,866
	Sampel A	6,855
	Sampel B	6,876
	Sampel C	6,865
<b>Kopi Luwak</b>	Sampel D	6,873
	Sampel E	6,837
	Sampel F	6,827

## 3) Validasi Metode Analisis

Parameter validasi yang telah diujikan adalah uji linearitas, batas deteksi batas kuantitasi, presisi (keseksamaan), dan akurasi (kecermatan).

Pengukuran seri larutan standar akrilamida pada panjang gelombang 200 nm dengan konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 30  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , dan 50  $\mu\text{g/mL}$ , diperoleh persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi akrilamida  $y = 356468 + 293761 x$  dengan koefisien korelasinya ( $r$ ) sebesar 0.9993.

Pada penelitian ini, akrilamida didalam sampel kopi bubuk memiliki nilai batas deteksi 1,9901  $\mu\text{g/mL}$  dan batas kuantifikasi

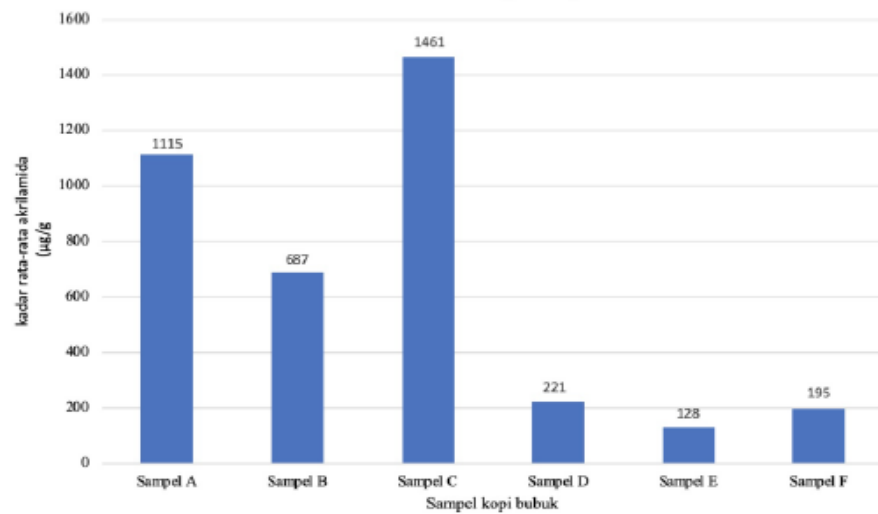
6,6337  $\mu\text{g/mL}$  sehingga dapat ditentukan dalam akurasi dan presisi.

Dari hasil uji presisi yang didapatkan pada konsentrasi 30  $\mu\text{g/mL}$  ini memberikan nilai koefisien variasi atau simpangan baku relatif kurang dari 1 % yaitu sebesar 0,213 %.

Didapatkan rata-rata % perolehan kembali pada kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak masing-masing sebesar 99 % dan 104 %. Hasil yang didapat telah memenuhi kriteria validasi metode analisis yaitu berada pada rentang 85 % - 110 %.

#### 4) Penetapan Kadar Akrilamida Pada Kopi Bubuk Tradisional dan Kopi Bubuk Luwak

*World Health Organization* (WHO) menyatakan rata-rata asupan akrilamida melalui makanan yang dapat ditoleransi berada pada rentang 0,3-0,8  $\mu\text{g/kg BB/hari}$ . Kadar akrilamida tertinggi terdapat pada sampel kopi bubuk tradisional C sebesar  $1461 \pm 63,89 \mu\text{g/g}$ , sedangkan kadar akrilamida terendah terdapat pada sampel kopi bubuk luwak E sebesar  $128 \pm 3,24 \mu\text{g/g}$ . Rendahnya kadar akrilamida pada kopi bubuk luwak mungkin terjadi karena proses fermentasi alami didalam pencernaan hewan luwak.



**Gambar 3.1.** Kadar Akrilamida Pada Enam Sampel Kopi Bubuk

#### d. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kandungan akrilamida dalam sampel A sampai F berturut-turut adalah  $1115 \pm 12,17 \mu\text{g/g}$  sampel (A);  $687 \pm 7,58 \mu\text{g/g}$  sampel (B);  $1461 \pm 63,89 \mu\text{g/g}$  sampel (C);  $221 \pm 3,54 \mu\text{g/g}$  sampel (D);  $128 \pm 3,24 \mu\text{g/g}$  sampel (E);  $195 \pm 1 \mu\text{g/g}$  sampel (F). Dari keenam sampel kopi bubuk menunjukkan bahwa kadar akrilamida masing-masing sampel melebihi batas aman konsumsi akrilamida yang dikeluarkan oleh WHO.

#### 2. Jurnal Kedua (Jurnal Nasional)

Judul Jurnal : Validasi Dan Analisis Kadar Akrilamida Pada Kopi Tunggal Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Nama Jurnal : Ekologia : Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup



Penerbit : Universitas Pakuan  
Volume & Halaman : Volume 20, Nomer 1, Hal 40-44  
Tahun Terbit : 2020  
Penulis Jurnal : Harmita Swandi, Armini Hadriyati, dan  
Mukhlis Sanuddin

ISI JURNAL :

a. Tujuan Penelitian

Untuk menentukan kandungan akrilamida kopi bubuk tradisional dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

b. Metode Penelitian

1) Desain : Eksperimental

2) Populasi & sampel

Sampel bubuk kopi liberika. Sampel yang dipilih adalah produk kopi bubuk yang dijual di pasar tradisional tungkal.

3) Instumen

Alat yang di gunakan adalah seperangkat alat kromatografi cairan kinerja tinggi (KCKT) (Shimadzu LC-6AD®), kolom ODS C18 (250 × 4,6 mm) (Shimadzu Simpack®), detektor *Genesys* 10S UV-vis, timbangan analitik (Precisa XB 220A®), *laboratory shaker* (Orbital Shaker®), labu ukur (Iwaki®), Erlenmeyer (Iwaki®), gelas ukur (Iwaki®), membran filter 0,45 µm, kertas saring dan alat-alat gelas yang menunjang penelitian

#### 4) Metode Analisis

##### a) Pengambilan Sampel

Sampel bubuk kopi liberika. Sampel yang dipilih adalah produk kopi bubuk yang dijual di pasar tradisional tungkal.

##### b) Pembuatan Larutan Standar Akrilamida

25,0 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur 50,0 ml, dilarutkan dengan fase gerak (asetonitril:air) sampai tanda batas, dikocok hingga homogen (larutan A). 1,0 ml larutan A dipipet, dan dimasukan kedalam labu ukur 50,0 ml kemudian ditambahkan dengan fase gerak yang digunakan sampai tanda batas (larutan B). Pada larutan B dibuat larutan akrilamida dengan konsentrasi 1,2,4,8, ppm.

##### c) Mencari Kondisi Analisis Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan untuk optimasi adalah asetonitril : asam fosfat 0,2% (70:30 v/v), asetonitril : asam fosfat 0,2% (80:20 v/v) dan asetonitril : asam fosfat 0,2% (90:10). Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan harga efisiensi yang tinggi dan waktu retensi yang relatif singkat.

##### d) Validasi Metode Analisis

Tahap validasi metoda meliputi pembuatan kurva kalibrasi, pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi, dan uji keterulangan (presisi).

Pembuatan kurva kalibrasi : larutan standar 1,2,4,8 ppm masing-masing disuntikkan sebanyak 20 µl kedalam kolom pada kondisi terpilih. Luas puncak dicatat dan dibuat kurva perbandingan luas puncak dengan konsentrasi larutan.

Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi. Batas deteksi dan kuantitasi dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada garis linier  $y = ax + b$ .

Uji keterulangan (presisi). Larutan standar 1,2,4,8 ppm disuntikkan sebanyak 20 µl dalam kolom menggunakan fase gerak dan kondisi alir yang terpilih, diulang sebanyak 5 kali, kemudian dicatat luas puncaknya dan dihitung koefisien variasinya.

#### e) Penetapan Kadar Akrilamida Dalam Kopi

Sampel bubuk kopi yang sudah halus ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 10 mL diklormetan, dikocok dan disentrifus lalu ampas disaring (larutan A). Ampas diekstraksi sebanyak 2 kali dengan diklorometan 3 ml, disaring (larutan B). Larutan A dan larutan B digabung dan ditambahkan Asetonitril ad 25 ml didalam labu ukur. Larutan diinjeksi kedalam kolom HPLC sebanyak 20 µl, kemudian dicatat luas puncaknya. Percobaan diulang sebanyak 3 kali.

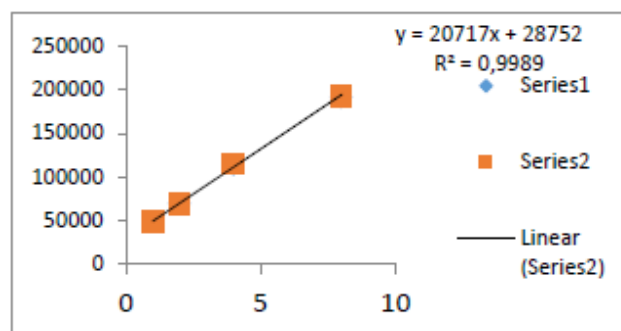
### c. Hasil Penelitian

#### 1) Mencari Kondisi Analisis Fase Gerak

Fase yang digunakan yaitu fase terbalik, dikarenakan senyawa yang digunakan yaitu akrilamida bersifat polar sehingga kolom yang digunakan harus polar juga agar penarikannya optimal. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah asetonitril dan asam fosfat 0,2 % dengan perbandingan (80:20), berdasarkan uji panjang gelombang akrilamida didapatkan hasil panjang gelombang 203 nm menggunakan detektor *Genesys 10S* UV-Vis.

#### 2) Validasi Metode Analisis

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara luas puncak zat dengan konsentrasi analit yang diketahui. Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan regresi linier dan dihasilkan persamaan garis kurva kalibrasi  $y = 20717x + 28752$ , dimana  $x$  merupakan konsentrasi akrilamida dan  $y$  merupakan perbandingan luas puncak akrilamida.



**Gambar 3.2.** Grafik Kurva Kalibrasi Akrilamida

Pada *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantitation* (LOQ) ditentukan dari persamaan regresi linier kurva kalibrasi. LOD ditentukan untuk mengetahui konsentrasi analit terendah yang dapat diukur, limit deteksi metode ini adalah 0,32109 µg/ml, LOQ ditentukan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat ditentukan oleh suatu metode pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik, didapatkan nilai LOQ berdasarkan hasil uji adalah 1,07031 µg/ml. Uji presisi dilakukan dengan menyuntikkan berulang larutan standar akrilamida yang diketahui konsentrasinya untuk menentukan kinerja alat pada kondisi dengan batas presisi RSD ≤ 2 %. Ketelitian metode dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

### 3) Penetapan Kadar Akrilamida Dalam Kopi

Dari hasil analisis diketahui bahwa kadar akrilamida pada sampel kopi tunggal I sebesar 72,065 µg/g, sampel kopi tunggal II sebesar 66,922 µg/g, sampel kopi tunggal III sebesar 60,215 µg/g dan sampel kopi tunggal IV yang itu kopi pembanding sebesar 61,422 µg/g.

**Tabel 3.3.** Hasil Penetapan Kadar Akrilamida Pada Kopi

Sampel	Larutan uji (µg/ml)	Kadar sampel (µg/g)
Kopi 1	2,8826	72,065
Kopi 2	2,6769	66,922
Kopi 3	2,4086	60,215
Kopi 4	2,4569	61,422

Berdasarkan data tersebut, maka kadar akrilamida yang diperoleh dari keempat sampel dikatakan sangat tidak aman untuk dikonsumsi hingga 15 g dalam sehari (1920-21915 µg) pada orang

dewasa berdasarkan *World Health Organization* (WHO) tahun 2002.

d. Kesimpulan

Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dalam menganalisis akrilamida dalam kopi bubuk tunggal memberi kondisi optimum dengan kolom fase terbalik C18 dengan panjang kolom 250 mm, diameter 4,6 mm, volume injeksi 20 µl, kecepatan alir 0,5 ml/menit, fase gerak asetonitril : asam fosfat 0,2% (80:20), detektor *Genesys 10S UV-vis* dengan panjang gelombang 203 nm dengan uji validasi : LOD dan LOQ, uji presisi, uji batas deteksi dan batas kuantitasi. Maka Dari keempat sampel kopi Tungkal yang di uji mengandung akrilamida di atas ambang batas aman menurut *Food and Drugs Administration* (FDA) yaitu 2µg/g.

3. Jurnal Ketiga (Jurnal Internasional)

Judul Jurnal	: Straightforward and rapid determination of acrylamide in coffee beans by means of HS- SPME/GC-MS
Nama Jurnal	: Food Chemistry
Penerbit	: Elsevier
Volume & Halaman	: Vol. 301 125264 Hal. 1-6
Tahun Terbit	: 2019
Penulis Jurnal	: Rafal Wawrzyniak dan Beata Jasiewicz

ISI JURNAL :

a. Tujuan Penelitian

Untuk mengembangkan prosedur analisa akrilamida dalam kopi yang lebih murah

b. Metode Penelitian

1) Desain : Eksperimental

2) Populasi & sampel

Biji kopi arabika dan robusta yang tidak dipanggang serta kopi yang disangrai diperoleh dari supermarket setempat. Sampel dikemas kedap udara dan disimpan pada suhu 4°C.

3) Instrumen

Sampel dianalisis pada Trace 1310 GC yang dilengkapi dengan *autosampler* TriPLUS RSH (Thermo Fisher Scientific, USA) dan dipasang SPME *holder* Thermo Fisher Scientific, USA) yang dilengkapi dengan serat 100 µm polidimetilsiloksan (PDMS) digabungkan dengan spektrometer massa ISQ QD.

4) Metode Analisis

Bahan kimia yang digunakan adalah akrilamida (Sigma-Aldrich, USA, kemurnian 99%), d<sub>3</sub>-akrilamida-2,3,3 (d<sub>3</sub>-AA) larutan standar 500 mg/L dalam asetonitril (Sigma-Aldrich, USA, kemurnian 98%) dan N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (Supelco, USA) disimpan pada suhu 4°C.

a) Sililasi Akrilamida

Reaksi sililasi dibuat dengan menggunakan pipet volumetrik yang disalurkan langsung ke vial tutup ulir 1,5 mL dengan PTFE/*silicone septa* (Lab Logistic Group GmbH, Germany). BSTFA telah ditambahkan melalui septum menggunakan jarum suntik kaca 100 $\mu$ L (Hamilton, USA). Karena kapasitas botol dan analisis *headspace* yang dipilih, diputuskan bahwa jumlah larutan yang optimal adalah 250  $\mu$ L.

b) Analisis HS-SPME/GC-MS

Sampel dianalisis pada Trace 1310 GC yang dilengkapi dengan *autosampler* RSH TriPLUS (Thermo Fisher Scientific, USA) dengan SPME *holder* yang dipasang (Thermo Fisher Scientific, USA) dilengkapi dengan Serat polydimethylsiloxane (PDMS) 100  $\mu$ m digabungkan dengan massa QD ISQ Spektrometer. Sebelum dan setelah melakukan pengukuran masing-masing analisis, serat dikondisikan sesuai dengan rekomendasi pabrikan. GC-MS dikendalikan oleh *Excalibur* perangkat lunak (Thermo Fisher Scientific, USA).



### c) Validasi Metode

Validasi metode didasarkan pada parameter berikut: linearitas, selektivitas, presisi dan akurasi, dan HORRAT *value*, yang semakin umum dalam standar.

### c. Hasil Penelitian

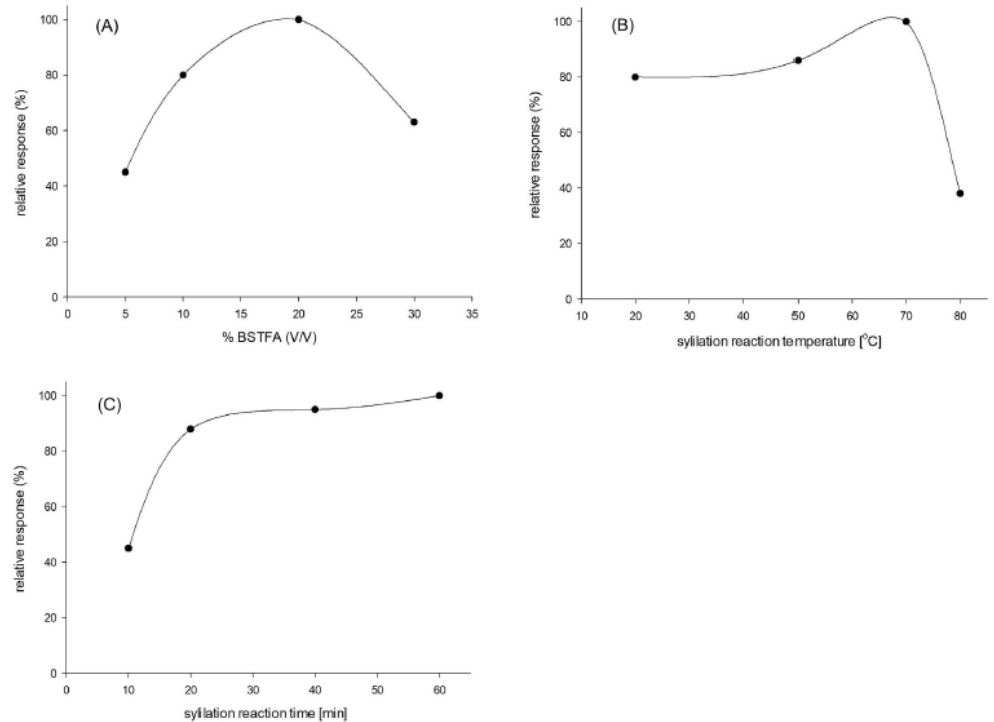
#### 1) Optimasi Kualitatif Dan Kuantitatif Analisis Pada Spektrometer Massa

Intensitas dari ion molekuler ( $M^+$ ) untuk sililasi AA pada  $m/z$  200 dan  $d_3$ -AA pada  $m/z$  203 diperoleh dari 70 eV energi ionisasi sangat kecil dan tidak dapat digunakan untuk analisis kuantitatif. Sehingga ion yang paling intens pada  $m/z$  128 untuk BTMSAA dan  $m/z$  131 untuk  $d_3$ -BTMSAA dipilih untuk dihitung kadar akrilamidanya. Fragmen ion yang dipilih direkam dalam mode SIM untuk memaksimalkan analisis sensitivitas. Hasil dari TIC dan SIM kromatogram diperoleh untuk *green coffe* yang tidak dipanggang meruncing  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  AA dan  $10\mu\text{g}/\text{kg}$   $d_3$ -AA.

#### 2) Optimasi Kondisi Sililasi Akrilamida

Pengaruh jumlah BSTFA yang ditambahkan, suhu dari proses dan waktu reaksi yang berlangsung di sililasi telah diperiksa. Setiap pengukuran diulang tiga kali. Hasil penelitian disajikan dalam Gambar 3.3. A–C. Ini menunjukkan bahwa untuk mendapatkan kinerja terbaik dari reaksi, proses harus dilakukan

selama 1 jam pada 70° C pada volume 20% BSTFA sehubungan dengan volume larutan akrilamida.



**Gambar 3.3.** Optimasi Kondisi Sililasi Akrilamida: (A) optimasi V/V BSTFA – kondisi sililasi: 70°C, 60 menit; (B) optimasi reaksi suhu – kondisi sililasi: 20% V/V BSTFA, 60 menit; (C) optimasi waktu reaksi – kondisi sililasi: 20% V/V BSTFA, 70°C.

#### 4) Optimasi Kondisi Sorpsi/Desorpsi

Kondisi proses sorpsi/desorpsi pada serat SPME juga dioptimalkan. Dianalisis bagaimana waktu dan suhu mempengaruhi prosesnya. Hasil terbaik untuk proses sorpsi pada serat SPME diperoleh selama 10 menit pada 60° C. Untuk memaksimalkan sensitivitas metode yang dikembangkan, proses desorpsi harus dilakukan pada 250°C. Suhu maksimum yang

disarankan oleh pabrikan serat dan waktu desorpsi yang panjang 10 menit. Karena lompatan kromatografi yang diamati sinyal yang terkait dengan menghilangkan serat dari injektor, sehingga perlu untuk mempersingkat waktu desorpsi. Kemudian waktu yang optimal tampaknya 2 menit.

#### 5) Analisis Validasi Metode

Kurva kalibrasi telah ditentukan untuk dua rentang: konsentrasi rendah (3–150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) untuk 6 titik dan konsentrasi tinggi (150–5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) untuk 7 poin. Untuk menilai kualitas kurva kalibrasi yang diperoleh  $r$  dihitung dan sama dengan 0,99971 dan 0,99980 untuk konsentrasi rendah dan tinggi.

Berdasarkan rasio sinyal analitik yang dihasilkan oleh lonjakan akrilamida dalam asetonitril terhadap (S/N) sebagai batas deteksi (LOD) ( $S/N = 3$ ) 1  $\mu\text{g} / \text{kg}$  diasumsikan dan batas kuantifikasi (LOQ) ( $S/N = 10$ ) 3  $\mu\text{g}/ \text{kg}$  diperhitungkan.

Pengulangan dan presisi intermediet diperiksa untuk *green coffee* yang tidak dipanggang akrilamida dengan tingkat yang sesuai dengan LOQ (untuk pengulangan  $RSD = 2,6\%$  dan untuk presisi menengah  $RSD = 9,4\%$ ).

HORRAT *value* antara 1,00 dan 1,20 menunjukkan bahwa metode yang dijelaskan ditandai dengan ketepatan yang baik

**Tabel 3.4.** Parameter Seleksi Dari Metode HS-SPME/GC-MS Untuk Penentuan Akrilamida Dalam Biji Kopi Yang Belum Dipanggang

Analisis Prosedur Parameter	Kriteria	HS-SPME/GC-MS
<i>limit of determination (LOD)</i> [ $\mu\text{g/kg}$ ]	$S/N \geq 3$	1
<i>limit of quantification (LOQ)</i> [ $\mu\text{g/kg}$ ]	$S/N \geq 10$	3
<b>konsentrasi rendah akrilamida:</b>		
rentang kerja metode [ $\mu\text{g/kg}$ ]	-	$3 \div 150$ (6 poin)
linearitas	$r \geq 0.995$	$r = 0.99971$
<i>slope of the line</i>	-	$8.53 \cdot 10^{-4}$
<i>y-intercept</i>	-	$2.65 \cdot 10^{-2}$
<b>konsentrasi tinggi akrilamida:</b>		
rentang kerja metode [ $\mu\text{g/kg}$ ]	-	$150 \div 5000$ (7 poin)
Linearitas	$r \geq 0.995$	$r = 0.99980$
<i>slope of the line</i>	-	$8.79 \cdot 10^{-4}$
<i>y-intercept</i>	-	$7.37 \cdot 10^{-3}$
keterulangan – RSD [%]	RSD < 10%	2.6% (n = 3)
presisi antara – RSD [%]	RSD < 10%	9.4% (n = 6)

Nilai relatif dari ketidakpastian yang diperluas dari hasil penentuan akrilamida dalam kopi antara  $\pm 2,7$ – $3,5\%$  dan disajikan pada Tabel 3.5.

**Tabel 3.5.** Parameter Seleksi Dari Metode HS-SPME/GC-MS Untuk Penentuan Akrilamida Dalam Kopi Panggang

Analisis Prosedur Parameter	Sampel*			
	1	2	3	4
rata-rata [ $\mu\text{g/kg}$ ]	212.5	77.7	145.4	189.7
rentang hasil [ $\mu\text{g/kg}$ ]	$209 \div 219$	$75 \div 79$	$144 \div 149$	$187 \div 195$
ketidakpastian (k = 2, p < 95) [%]	$\pm 3.0$	$\pm 3.5$	$\pm 2.7$	$\pm 2.8$
<b>Koefisien HORRAT</b>	1.20	1.16	1.00	1.09
<b>Pemulihan pada</b> 100	105 (5.3)	104 (4.9)	102 (4.6)	103 (4.5)
<b>berbagai</b> [ $\mu\text{g/kg}$ ]				
<b>tingkat</b> 500	104 (3.6)	101 (4.1)	104 (4.3)	104 (3.2)
<b>penambahan</b> [ $\mu\text{g/kg}$ ]				
<b>akrilamida</b> [%] 2500	102 (3.4)	99 (4.2)	101 (4.1)	101 (3.2)
<b>(RSD, %)</b> [ $\mu\text{g/kg}$ ]				

\*\* sampel : 1 Arabika – pemanggangan tinggi ; 2 Arabika – pemanggangan sedang; 3 Robusta – pemanggangan sedang; 4 Robusta, pemanggangan sedang

Berdasarkan hasil yang diberikan pada Tabel 3.4 dan 3.5 dapat disimpulkan bahwa metode ini selektif, memiliki presisi, pengulangan dan akurasi yang baik.

#### d. Kesimpulan

Validasi metode mengkonfirmasi efektivitas prosedur HS-SPME untuk mengisolasi akrilamida dari biji kopi dan ditetapkan dengan GC-MS. LOQ menerapkan metode penentuan akrilamida dalam biji kopi. Estimasi presisi 3µg/kg sejalan dengan kriteria yang ditentukan oleh *EU Commission Recommendations*, tentang pemantauan kadar akrilamida dalam makanan. Metode pengulangan menunjukkan (RSD = 2,6%) dan presisi termediate (rata-rata RSD = 9,4%) untuk biji kopi yang tidak dipanggang dan akurasi yang baik untuk kopi (*recovery* 99-105%).

#### 4. Jurnal Keempat (Jurnal Internasional)

Judul Jurnal : Rapid mixed mode solid phase extraction  
method for the determination of acrylamide  
in roasted coffee by HPLC MS/MS

Nama Jurnal : Food Chemistry

Penerbit : Elsevier

Volume & Halaman : Vol. 135 Hal. 2687-2693

Tahun Terbit : 2012

Penulis Jurnal : Renzo Bortolomeazzi, Marina Munari,  
Monica Anese, dan Giancarlo Verardo

ISI JURNAL

a. Tujuan Penelitian

Untuk mengembangkan prosedur persiapan sampel pada penentuan akrilamida dalam kopi berdasarkan campuran tunggal yang dibuat khusus fase SPE meliputi C18, kation dan anion kuat bertukar sorbent.

b. Metode Penelitian

1) Desain : Eksperimental

2) Populasi & sampel

Empat sampel kopi bubuk dengan merek dan komposisi berbeda dibeli di pasar lokal dan dua sampel kopi disediakan oleh perusahaan penyangraian. Informasi, diambil dari label komersial dan berguna untuk mengkarakterisasi sampel.

3) Instrumen

Digunakan Syringe filter GD/X, 25 mm, dengan 0,45  $\mu$ m membran PVDF dan penyaring serat mikro kaca (Whatman, UK). Strata SCX 500 mg, 6 mL, dan Strata C18-U 1 g, 6 mL kolom SPE, fase besar Septra SAX, tabung polypropylene kosong SPE 3 mL dengan 20  $\mu$ m polietilen *frit* berasal dari Phenomenex (Italia).

4) Metode Analisis

Metode analisis yang dilakukan meliputi persiapan kolom SPE fase campuran, ekstraksi sampel dan pemurnian SPE, analisis HPLC-MS/MS, serta validasi metode.

a. Persiapan Kolom SPE Fase Campuran

Sejumlah fase campuran SPE, cukup untuk membuat sekitar 60 kolom, disiapkan dengan *gentle hand mixing* 12 g dari C18 fase, 9 g fase SAX dan 9 g fase SCX dalam botol kaca (fase 2,0/1,5/1,5 w/w/w). Kolom SPE disiapkan dengan mengemas 0,5 g campuran ini dalam tabung SPE polipropilena kosong dengan 20  $\mu\text{m}$  *frits*.

b. Ekstraksi Sampel Dan Pemurnian SPE

250  $\mu\text{L}$  dari larutan  $\text{d}_3$ -akrilamida ( $1084 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sebagai standar internal dan 10 mL air ditambahkan ke 1 g kopi bubuk, dalam tabung reaksi 30 mL. Sampel divortex selama sekitar 30 menit lalu diekstraksi dalam penangas ultrasonik selama 1 menit. Sekitar 4 mL dari keruh supernatan disaring melalui filter membran 0,45  $\mu\text{m}$ . 1 mL sampel yang difilter dimuat ke kolom SPE yang dikondisikan dengan 3 mL metanol dan 3 mL air. Sampelnya didorong dengan menerapkan sedikit tekanan dan eluat. Akrilamida kemudian dielusi dengan 1 mL air, dengan menerapkan kembali sedikit tekanan dan mengumpulkan semua pelarut ke dalam *autosampler* 1,5 mL untuk analisis LC-MS/MS.

c. Analisis HPLC-MS/MS

Analisis LC-ESI-MS/MS dalam mode ion positif ( $\text{ESI}^+$ ) dilakukan oleh spektrometer massa perangkap linear LXQ Finnigan (Thermo Electron Corporation, San Josè, CA, USA)

digabungkan dengan Finnigan Surveyor LC Pump Plus dilengkapi dengan *thermostated autosampler* dan kolom *thermostat oven*. Kolom analitik adalah Synergi Hydro, 4  $\mu\text{m}$ , 250 x 2,0 mm (Phenomenex, Italia) dipertahankan pada 30° C. Elusi berada dalam mode isokratik menggunakan campuran 0,1% (v/v) asam format encer dan metanol (97/3, v/v) sebagai fase gerak pada laju aliran 0,1 mL min<sup>-1</sup>. Volume injeksi sampel adalah 5  $\mu\text{L}$ . Dalam kondisi ini waktu retensi akrilamida dan d<sub>3</sub>-akrilamida sekitar 11 menit. Katup yang diprogram waktu digunakan untuk mengalihkan limbah dari kolom ke limbah untuk 8 menit pertama untuk menghilangkan senyawa dengan retensi kali lebih pendek dari akrilamida.

Analisis HPLC-MS/MS dilakukan dalam mode ion positif menggunakan pemantauan MS<sup>2</sup> penuh dengan produk tambahan terprotonasi dari akrilamida dan d<sub>3</sub>-akrilamida masing-masing pada m/z 72 dan m/z 75. Area puncak kromatografi dari ion yang diekstraksi pada m/z 55, karena transisi 72>55, dan pada m/z 58 karena transisi 78>58 digunakan untuk analisis kuantitatif.

#### d. Kurva Kalibrasi

Enam larutan standar akrilamida pada tingkat konsentrasi 2.1, 5.2, 10.4, 26.1, 52.2 dan 104.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  yang berisi standar internal pada konsentrasi 27,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  disiapkan. Setiap standar



larutan dianalisis tiga kali dan puncak rata-rata rasio area akrilamida (m/z 55) dan d<sub>3</sub>-akrilamida (m/z 58) diplot terhadap rasio konsentrasi yang sesuai.

e. *Recovery*

Pemulihan metode dilakukan dengan *spiking* sampel kopi dengan tiga tingkat akrilamida. Untuk 1 g kopi sampel ditambahkan 50, 100 dan 150 µL akrilamida encer solusi standar (2086 µg L<sup>-1</sup>) sesuai dengan masing-masing 104.3, 208.6 dan 312.9 ng. 100 dan 50 µL air ditambahkan ke *spiked* sampel dengan 50 dan 100 µL larutan standar secara berurutan untuk menyamakan jumlah air tambahan dalam semua sampel. Tiga replikasi dilakukan untuk setiap tingkat pemulihan.

f. Referensi Validasi Metode

Dua sampel kopi, yaitu yang terendah dan tertinggi dalam konsentrasi akrilamida, dianalisis juga dengan menggunakan validasi metode untuk penentuan akrilamida dalam kopi panggang (Wenzl *et al.*, 2008). Wenzl *et al.* (2009) melaporkan bahwa partisi ekstrak kopi dengan n-hexane bermanfaat untuk penekanan efek matriks yang ditemui selama analisis HPLC–MS/MS. Penulis yang sama mencatat bahwa efek matriks ini mungkin terkait dengan karakteristik konstruktif dari instrumen HPLC–MS/MS. Karena kami tidak

mengamati efek matriks, langkah partisi dengan n-hexane dihilangkan. Tiga replikasi dilakukan untuk setiap sampel.

c. Hasil Penelitian

1) Purifikasi SPE

Kolom SPE yang dikemas dengan 0,5 g fase pra-campuran yang berbeda, disiapkan dengan memvariasikan proporsi fase C18, SAX dan SCX. Kompromi yang baik, yang menghasilkan sampel bersih, tanpa gangguan besar, dan menghasilkan pemulihan akrilamida yang baik diperoleh dengan menggunakan 0,5 g fase campuran yang dibuat dengan mencampurkan fase C18, SAX dan SCX dalam rasio 2.0/1.5/1.5 (w/w/w).

2) Performa Metode

Kurva kalibrasi linier pada kisaran 2-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  dengan koefisien korelasi ( $R^2$ ) dari 0,9997. Pemulihan akrilamida dan  $d_3$ -akrilamida masing-masing  $82 \pm 5,4\%$  dan  $83 \pm 4,3\%$ , partisi yang sama dari analit dan *isotopically* berlabel standar internal dengan fase stasioner SPE kolom.

**Tabel 3.6.** *Recovery* Akrilamida Dalam Kopi Panggang Dalam Tiga Level

<i>Level</i>	<b>Penambahan Akrilamida (ng)</b>	<b><i>Recovery</i> (% <math>\pm</math> SD<sup>a</sup>)</b>
<b>1</b>	104.3	$94 \pm 10.1$
<b>2</b>	208.6	$92 \pm 1.5$
<b>3</b>	312.9	$95 \pm 3.1$

<sup>a</sup> standar deviation (n = 3)

Konsentrasi akrilamida dalam sampel kopi (Tabel 3.7) berkisar antara 150 hingga 327  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , sesuai dengan konsentrasi

dari sekitar 15 hingga 33  $\mu\text{g L}^{-1}$  dalam ekstrak yang disuntikkan..  
 LOD (S/N = 3) dan LOQ (S/N = 10) diperoleh masing-masing 5  
 dan 16  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Tabel 3.7.** Konsentrasi Akrilamida Dalam Sampel Kopi Panggang

Sampel	Akrilamida ( $\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{b}}$ )	Akrilamida (validasi metode) <sup>a</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{c}}$ )
1	150 $\pm$ 1.4	150 $\pm$ 3.0
2	206 $\pm$ 5.8	-
3	277 $\pm$ 6.4	-
4	327 $\pm$ 7.3	331 $\pm$ 8.4
5	199 $\pm$ 9.3	-
6	182 $\pm$ 6.9	-

<sup>a</sup> Wenzl *et al.* (2008).

<sup>b</sup> Standar deviasi (n = 6).

<sup>c</sup> Standar deviasi (n = 3).

### 3) Perbandingan Dengan Validasi Metode

Kromatografi jejak yang diperoleh dengan dua metode tersebut serupa, keduanya puncaknya muncul setelah puncak  $\text{d}_3$ -akrilamida. Konsentrasi akrilamida yang diperoleh dengan dua metode memberikan hasil yang sebanding seperti yang dilaporkan dalam Tabel 3.7

### d. Kesimpulan

Penelitian ini melaporkan prosedur persiapan sampel baru yang sederhana dan cepat untuk penentuan akrilamida dalam matriks yang sangat kompleks, seperti kopi. Kolom SPE fase campuran tunggal yang dibuat khusus yang digabungkan dengan spektrometri massa tandem kromatografi cair dikembangkan. Kolom SPE, terdiri dari campuran sorben C18, kation kuat (SCX) dan pertukaran anion (SAX) dalam rasio 2/ 1,5/1,5 (w/w/w), diperbolehkan dalam satu langkah untuk mempertahankan sebagian besar bahan kimia LOD

dan LOQ masing-masing adalah 5 dan 16  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dan deviasi standar relatif kurang dari 5%.

#### 5. Jurnal Kelima (Jurnal Internasional)

Judul Jurnal : Processing effects on acrylamide content in roasted coffee production

Nama Jurnal : Food Chemistry

Penerbit : Elsevier

Volume & Halaman : Vol. 319 126550 Hal. 1-7

Tahun Terbit : 2020

Penulis Jurnal : Francesco Espositoa, Evelina Fasanoa, Angela De Vivoa, Salvatore Velottob, Fabrizio Sarghinia, dan Teresa Cirilloa

#### ISI JURNAL

##### a. Tujuan Penelitian

Untuk menemukan kondisi pemanggangan terbaik untuk mengurangi terbentuknya akrilamida

##### b. Metode Penelitian

1) Desain : Eksperimen

2) Populasi & sampel

Untuk setiap jenis (robusta dan arabika) 30 kg kopi disediakan oleh dua produsen kopi Italia, dengan total enam varietas dari beberapa negara: Peru dan Kolumbia (keduanya proses pengolahan basah) dan Brazil (pengolahan kering) untuk

Arabika dan Uganda, Vietnam dan India (semuanya pengolahan basah) jenis robusta. Sampel disimpan pada suhu ruang di tempat yang kering sampai proses pemanggangan di wadah plastik yang tertutup rapat.

### 3) Instrumen

Preparatif C18 (125 Å 55-105 µm) disediakan oleh Waters (Milford, MA, USA), anion kuat (SAX) dan kation (SCX) pertukaran fase bulk diberikan oleh *Agilent Technologies* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), agilent 7890A sistem GC digabungkan dengan *agilent 5975C* detektor selektif (MSD).

### 4) Metode Analisis

Metode analisis yang dilakukan meliputi proses *roasting*, penentuan warna, penyimpanan, persiapan analisis standar, prosedur analisis (metode A dan B), brominasi, deteksi GC-MS, performa metode dan analisis data, perbandingan metode, serta proses optimasi dalam pabrik pemanggang industri.

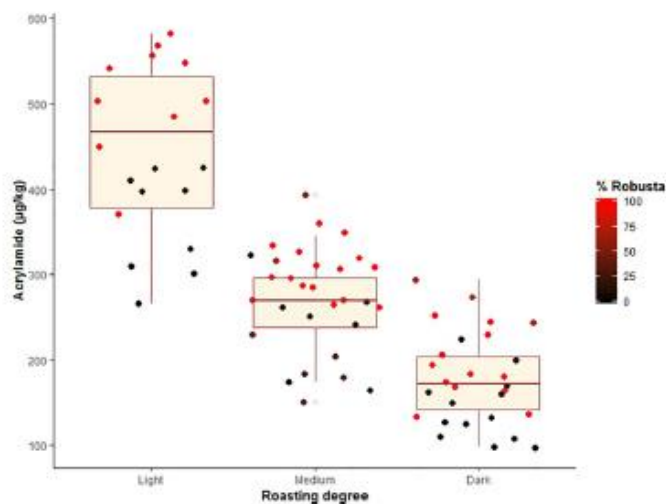
### c. Hasil Penelitian

Beberapa waktu pemanggangan kopi arabika adalah:  $560,00 \pm 10,00$  dtk,  $606,67 \pm 20,82$  dtk dan  $666,67 \pm 20,61$  dtk; sedangkan untuk robusta:  $583,34 \pm 15,27$  dtk,  $615,00 \pm 15,03$  dtk dan  $650,09 \pm 17,32$  dtk. Dalam penelitian ini, 100% sampel menunjukkan tingkat

akrilamida yang dapat dikuantifikasi dan konsentrasi median terletak pada kisaran 170–484  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Untuk setiap jenis kopi, perbedaan yang signifikan secara statistik ditemukan dalam konsentrasi akrilamida diantara setiap tingkat pemanggangan (*Mann Whitney test*, signifikansi  $p < 0,05$ ).

Menurut data, baik arabika *light* maupun robusta *light* dan beberapa sampel robusta *medium* melebihi batas regulasi EC 2017/2158. Gambar 3.4. menyoroti bagaimana persentase robusta memiliki pengaruh pada kandungan akhir akrilamida.



**Gambar 3.4.** Persentase Efek Total Konsentrasi Akrilamida Pada Robusta

Untuk mengoptimalkan kondisi pemanggangan campuran komersial yang ada, menurunkan kandungan AA, mempertahankan karakteristik yang diperlukan secara utuh. Parameter proses dioptimalkan sesuai dengan persentase robusta *beans* yang digunakan dalam campuran (Tabel 3.8).

**Tabel 3.8.** Suhu Awal Dan Suhu Akhir Pemanggangan (dalam *italic*) Biji Kopi Sesuai Dengan Persentase Dari Robusta (suhu dalam °C).

<b>Tingkat Pemanggangan</b>	<b>Persentase Robusta (%)</b>					
	0	20	40	60	80	100
<b>Rendah</b>	235	235	235	235	236	236
	<i>216</i>	<i>218</i>	<i>220</i>	<i>222</i>	<i>222</i>	<i>224</i>
<b>Sedang</b>	235	235	235	236	238	238
	<i>224</i>	<i>226</i>	<i>227</i>	<i>228</i>	<i>230</i>	<i>230</i>
<b>Tinggi</b>	235	236	236	238	238	242
	<i>233</i>	<i>233</i>	<i>234</i>	<i>236</i>	<i>238</i>	<i>240</i>

d. Kesimpulan

Hasil pada penelitian ini adalah memperkuat peran penting dari proses pemanggangan kopi dengan tujuan untuk lebih mengontrol kontaminan oleh industri makanan, masih memenuhi persyaratan produk dan sekaligus menjaga baik kebutuhan teknologi proses pemanggangan maupun implikasi kesehatan konsumen.