

BAB III

METODE

A. Deskripsi Metode Pendekatan Review Artikel

Review artikel merupakan suatu metode penelitian untuk pengambilan kesimpulan yang menggabungkan beberapa penelitian yang sejenis sehingga diperoleh paduan data secara kuantitatif. Dilihat dari prosesnya, review artikel merupakan suatu studi observasional retrospektif, dalam artian peneliti membuat rekapitulasi data tanpa melakukan manipulasi eksperimen.

Proses dalam melakukan review artikel pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mencari artikel penelitian yang terkait dengan penelitian yang dilaksanakan. Pada tahap ini pencarian artikel dilakukan secara elektronik dengan menggunakan kata kunci “Kandungan melamin dalam susu” pada situs jurnal ilmiah seperti Google scholar. Artikel yang digunakan merupakan artikel yang diterbitkan dalam kurun waktu 10 tahun terakhir, artikel nasional yang terakreditasi SINTA RESDIKTI (Science and technology Index), artikel internasional yang terdaftar dalam *Schicago Jurnal Rank*.
2. Melakukan perbandingan dari artikel-artikel penelitian-penelitian sebelumnya dengan merujuk pada simpulan umum pada masing

masing artikel tanpa melakukan analisis statistik atau analisis mendalam pada data dan hasil penelitiannya.

3. Menyimpulkan hasil perbandingan artikel disesuaikan dengan tujuan penelitian.

B. Informasi Jumlah Dan Jenis Artikel

Jumlah artikel yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebanyak 5 jenis artikel yang terdiri dari 2 artikel internasional dan 3 artikel nasional. Artikel inti merupakan artikel internasional dan nasional terakreditasi SINTA RESDIKTI (*Science and technology Index*), dari 5 artikel yang digunakan 3 diantaranya merupakan artikel inti dan 2 diantaranya merupakan artikel pendukung. Pencarian artikel dilakukan secara elektronik dengan kata kunci “Analisis kandungan melamin dalam susu” melalui *google scholar*. Jenis artikel yang digunakan yaitu *original article*. Berikut keterangan identitas setiap artikel dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 3.1 Informasi dan jenis artikel

No	Jurnal	Tahun Terbit	H-index	Impact Factor	Quartil	SJR	SINTA Score	ISSN
1	PHARMACY	2011	12	-	-	-	S3	1693-3591
2	<i>JITV</i> (Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner)	2013	-	-	-	-	-	-
3	Jurnal Sains dan Teknologi Kimia	2013	-	-	-	-	-	-
4	Journal of Dairy Science	2012	180	-	Q1	1.443	-	15253198, 00220302
5	Iranian Journal of Pharmaceutical Research	2018	40	-	Q2	0.402	-	17266890, 17350328

C. Isi Artikel

Memaparkan isi dari artikel yang ditelaah dengan isi sebagai berikut:

1. Artikel pertama

Judul Artikel : Identifikasi melamin dalam susu impor yang beredar di swalayan brebes dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi

Nama Jurnal : PHARMACY

Penerbit : Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Volume & Halaman : Vol.08 No.01 & Hal. 84-92
Tahun Terbit : April 2011
Penulis Artikel : Indah Puji Lestari, Wiranti Sri Rahayu, Pri
Iswati Utami

ISI ARTIKEL

a. Tujuan Penelitian :

Untuk mengidentifikasi apakah susu impor yang beredar di swalayan Brebes terdapat kandungan melamin dan bagaimana validasi metode analisis melamin menggunakan metode KCKT dengan detektor Ultra Violet

b. Metode Penelitian

- 1) Disain : Eksperimental Laboratorium
- 2) Populasi dan sampel : Sampel susu 1, 2, 3 dan 4 (Merek)
- 3) Instrumen :

Seperangkat alat KCKT Shimadzu LC yang dilengkapi dengan detektor UV Shimadzu SPD-6A, pemroses data Shimadzu SCL-6B, Kolom Shimpack Chloro Carbon Okta desil silane (CLSODS) dengan panjang 15 cm dan diameter 6,0 mm, autoinjektor Shimadzu SIL-6B; neraca analitik Shimadzu AUY 220; alat-alat gelas (labu ukur, gelas ukur, pipet volume, pipet tetes, tabung reaksi); ultrasonic bath; vortex; sentrifugator; kertas saring Whatmann

4) Metode analisis

a) Pembuatan Fase Gerak

Dibuat campuran asetonitril-air dengan perbandingan 50:50 (v/v).

b) Pembuatan Larutan Baku Melamin

Melamin baku ditimbang 50 mg dan dimasukkan ke dalam labu takar 500 mL, kemudian dilarutkan dengan fase gerak sampai garis tanda, lalu disonikator hingga larut. Larutan tersebut mempunyai konsentrasi 100 µg/ml.

c) Pembuatan Kurva Baku Melamin

Dari larutan baku melamin 100 µg/ml dipipet sebanyak 1 mL, dimasukkan ke labu takar 10 mL dan ditambahkan fase gerak sampai garis tanda, diperoleh larutan dengan konsentrasi 10 µg/ml. Kemudian dipipet sebanyak 2, 4, 6, dan 8 mL, masing-masing dimasukkan ke labu takar 10 mL dan ditambahkan fase gerak sampai garis tanda, diperoleh larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 µg/ml, sonikasi selama 15 menit. Pada Kolom KCKT dijenuhkan dengan fase gerak selama 20 menit. Detektor diatur pada panjang gelombang 240 nm. Kemudian larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 µg/ml disuntikkan sebanyak 200 µL ke dalam loop injektor KCKT dengan kecepatan alir fase gerak 1mL/menit.

d) Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan memasukkan 2 g serbuk susu kedalam labu takar 50 mL, dan ditambahkan 15 mL TCA (1%), serta 5 mL asetonitril. Pada larutan tersebut di vortex selama 1 menit, di ultrasonik selama 30 menit, kocok 10 menit, dan sentrifuge selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke wadah lain dengan melewati di kertas saring. Larutan supernatan sebanyak 10 mL dimasukkan ke labu takar 25 mL dan ditambahkan fase gerak sampai garis tanda.

e) Analisis Sampel dengan KCKT

Kolom KCKT dijenuhkan dengan fase gerak selama 20 menit. Detektor diatur pada panjang gelombang 240 nm. Larutan sampel sebanyak 200 μ l disuntikkan ke dalam loop injektor KCKT dengan kecepatan alir fase gerak 1 mL/menit.

f) Validasi Metode Analisis Melamin secara KCKT

(1) Linearitas

Larutan baku yang telah dibuat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 μ g/ml disuntikkan sebanyak 200 μ L ke alat KCKT.

(2) LOD/ LOQ

Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistika melalui persamaan garis linear dari kurva kalibrasi.

(3) Presisi

Dari larutan baku melamin konsentrasi 6 $\mu\text{g/mL}$, disuntikkan sebanyak 200 μL ke alat KCKT. Percobaan diulangi sebanyak lima kali.

(4) Ketepatan (akurasi)

Larutan sampel dari ekstraksi sampel diambil sebanyak 200 μL , kemudian ada yang tidak ditambahkan baku dan ada yang ditambahkan baku melamin dengan konsentrasi 4, 6 dan 8 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 200 μL . Kemudian larutan dikocok kuat, diultrasonik sampai homogen, didiamkan dan disaring dengan kertas saring. Dari filtrat tersebut diambil 200 μL dan disuntikkan ke alat KCKT dengan pengukuran 3 kali.

c. Hasil Penelitian :

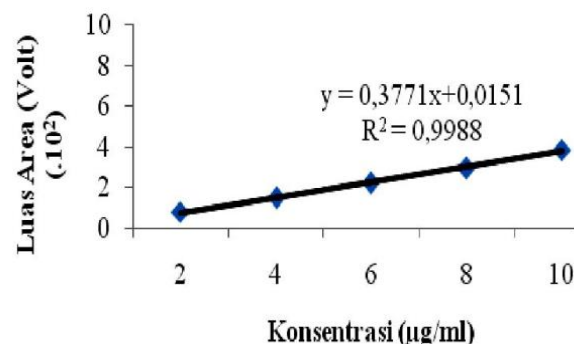
1) Analisis Sampel Dengan KCKT

Pada analisis sampel dengan KCKT diperoleh waktu retensi melamin standar 1,823 menit. Pada keempat sampel susu impor tidak menghasilkan puncak kromatogram pada waktu retensi standar tersebut. Waktu retensi sampel 1, 2, 3, dan 4 masing 1,276; 1,166; 1,626; dan 1,626 menit. Hal ini menunjukkan

bahwa pada semua sampel yang diteliti tidak terdeteksi adanya melamin.

2) Hasil Uji Linieritas

Persamaan kurva baku yang diperoleh $y = 0,377172x + 0,0151$ dengan nilai koefisien korelasi atau $r = 0,9988$. Nilai r mendekati $+1$, yang menunjukkan adanya hubungan yang linier antara konsentrasi dengan luas area yang dihasilkan. Harga r diterima, karena $r\text{-tabel} < r\text{-hitung}$, yaitu $0,878 < 0,9988$ dengan derajat bebas (db) sebesar 3, nilai α sebesar 5% dan taraf kepercayaan 95%. Hal ini menunjukkan bahwa kurva kalibrasi melamin memberikan linieritas yang baik.



Gambar 3.1 Kurva kalibrasi melamin baku (konsentrasi vs luas area)
(Lestari *et al.*, 2011)

Tabel 3.2 Hasil uji linearitas larutan baku melamin (Lestari *et al.*, 2011)

No	Konsentrasi (µg/ml)	Waktu Retensi (menit)	Luas Area (Volt) (.10 ²)
1	2	1,816	0,8126
2	4	1,803	1,5192
3	6	1,803	2,2283
4	8	1,796	2,9732
5	10	1,783	3,8573

3) Hasil Uji LOD & LOQ

Penentuan limit deteksi yang diperoleh 0,5194 $\mu\text{g/ml}$ dan limit kuantitasi sebesar = 1,7316 $\mu\text{g/ml}$.

4) Hasil Uji Ketelitian (Presisi)

Hasil presisi konsentrasi 6 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh nilai KV= 4,263%.

5) Hasil Uji Ketepatan (*Accuracy*)

Dari hasil uji akurasi diperoleh %*recovery* rata-rata pada konsentrasi 4 $\mu\text{g/ml}$ adalah 103,60%, *recovery* rata-rata pada konsentrasi 6 $\mu\text{g/ml}$ adalah 65,81% dan *recovery* rata-rata pada konsentrasi 8 $\mu\text{g/ml}$ adalah 125,28%.

d. Kesimpulan dan Saran :

- 1) Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tidak terdeteksi adanya melamin dalam sampel susu impor I, II, III dan IV yang diambil dari beberapa produk susu impor yang beredar di Swalayan brebes.
- 2) Metode analisis yang digunakan mempunyai nilai linearitas, ketelitian, LOD, LOQ dan ketepatan yang memenuhi persyaratan parameter validasi metode analisis.

2. Artikel Kedua

Judul Artikel : Kadar melamin pada produk berbahan susu dan susu bubuk yang dianalisis secara *liquid*

chromatography mass spectrometry (LC-MS)

Nama Jurnal : *JITV* (Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner)
Penerbit : Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor
Volume & Halaman : Vol. 18 No 1 & Hal. 63-69
Tahun Terbit : 2013
Penulis Artikel : Rachmawati S, Widiyanti PM

ISI ARTIKEL

a. Tujuan Penelitian :

Untuk mengembangkan metode analisis melamin secara LC-MS dan menganalisa cemaran melamin pada susu bubuk.

b. Metode Penelitian

1) Disain : Eksperimental Laboratorium

2) Populasi dan sampel :

Pengumpulan sampel berupa produk impor dilakukan bekerjasama dengan Karantina Hewan Tanjung Priok dan pengambilannya dilakukan secara periodik. Sampel dari Karantina Hewan Tanjung Priok (46 sampel) berupa produk berbahan dasar susu, susu bubuk, *whey*, keju dan produk lain seperti (kasein, yogurt, mentega). Sementara itu, sebanyak 35 sampel susu bubuk dikumpulkan dari swalayan besar di daerah Bandung dan Jakarta.

3) Instrumen :

Alat LC-MS (LC-MS 2010 EV, Shimadzu), pompa LC (LC-10 ADVP) dan pompa vakum, kolom C18 shimadzu shimpack, volume injeksi 10 μ l, generator nitrogen, detektor spektrometri massa (SPD-10 AVP)

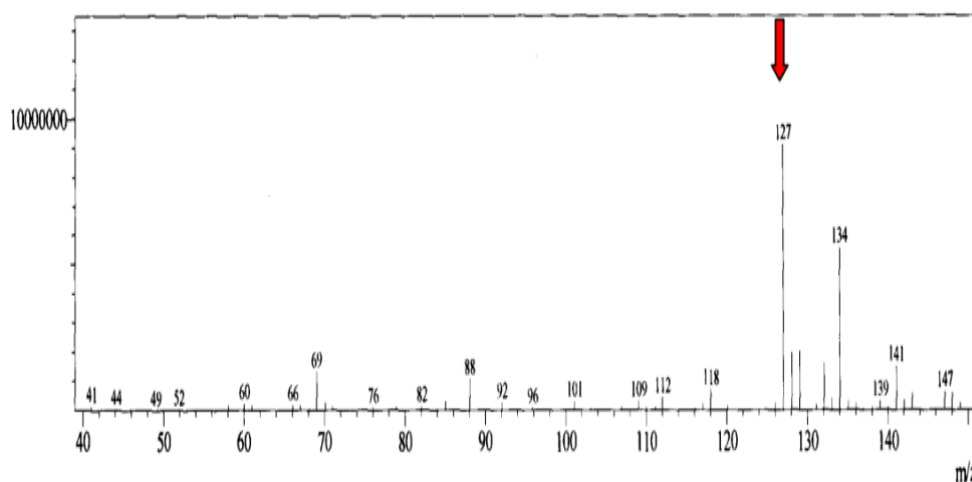
4) Metode analisis :

Sampel-sampel disimpan dalam tempat penyimpanan *freezer* (-20°C). Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel dikeluarkan dari *freezer*, didiamkan beberapa saat sampai suhu sampel sesuai dengan suhu ruang, selanjutnya masing-masing sampel ditimbang sebanyak ± 2 g, diekstrak dengan 14 ml asam format 2,5%, selanjutnya dikocok selama 30 menit. Hasil ekstrak disentrifus pada 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipisahkan, diambil sebanyak 1,4 ml selanjutnya disentrifus ulang pada 13.000 rpm selama 30 menit. Hasil ekstrak disaring dengan PVDF (13 mm; 0,22 μm), sebanyak 50 μ l ekstrak diencerkan dengan 950 μ l acetonitril, kemudian di vortek (dikocok) selama 30 detik dan disentrifus pada 13.000 rpm selama 30 menit, lalu pindahkan ke *autosampler vial*. Cairan jernih siap untuk pendeteksian dengan LC MS.

c. Hasil Penelitian :

Analisa melamin pada produk berbahan susu dan susu bubuk dilakukan dengan menggunakan LC-MS. Uji konfirmasi pada LC-MS dilakukan untuk mengetahui fragmentasi ion dari

senyawa yang dianalisis. Uji konfirmasi merupakan uji kualitatif pada LC-MS dengan mengetahui fragmentasi ion dari senyawa, dilakukan sebelum uji kesesuaian sistem untuk memperkuat identifikasi kualitatif dari melamin dengan melihat perbandingan massa terhadap muatan, senyawa melamin pada kromatogram dapat diketahui dari terbentuknya fragmen-fragmen ion pada perbandingan massa terhadap muatan (m/z) 127, memberikan signal yang tertinggi. Gambar 3.2 adalah hasil *scanning* yang menunjukkan (m/z) 127 yang dideteksi dengan alat LC-MS.



Gambar 3.2 Hasil scanning melamin dengan alat LC-MS, terlihat sinyal tertinggi pada (m/z) 127 (Rachmawati & Widiyanti, 2013)

Pada penelitian ini digunakan data kromatogram tujuh kali hasil pengulangan standar melamin 0,5 ppm. Hasil pengujian dari 7 kali ulangan standar melamin 0,5 ppm yang diperoleh adalah rata-rata luas puncak 1297169,6 dengan standar deviasi 15361,5 dan RSD 1,18%. Kondisi penetapan tersebut sesuai untuk analisis

melamin. Uji linearitas variasi standar melamin 0,25 ppm sampai 5,0 ppm versus luas area kromatogram memberikan nilai $R = 0,97$. Hasil uji akurasi melamin pada konsentrasi *spike* 0,5 ppm diperoleh rata-rata perolehan kembali 89,4% dengan ulangan 3 kali, sehingga nilai akurasi yang diperoleh dapat diterima.

Pada penelitian ini, cara yang digunakan untuk menentukan batas deteksi, yaitu secara visualisasi. Batas deteksi ditentukan dengan melakukan analisis terhadap zat uji yang diketahui konsentrasinya dan menetapkan kadar terendah yang dapat dideteksi dengan baik. Ternyata 5 ppb adalah konsentrasi terendah yang masih dapat dideteksi, karena kromatogram melamin 2,5 ppb, memberikan *tailing* yang besar.

Batas kuantitasi adalah konsentrasi analit terkecil yang dapat dikuantitasi secara cermat dan seksama. Batas kuantitasi dihitung dari rata-rata konsentrasi melamin yang terendah ditambah 10 kali standar deviasi dari 6-10 ulangan. Hasil yang diperoleh adalah 7 ppb. Yu et al., 2010 melaporkan nilai LOD dan LOQ melamin yang ditetapkan secara LCMS/MS sebesar 5 ppb dan 15 ppb.

1) Hasil analisis melamin sampel-sampel lapang

Hasil analisis melamin dari sampel-sampel ternyata 4 sampel (*whey* dan susu bubuk) atau 8,7% sampel tidak terdeteksi adanya melamin (kadar melamin < dari 5 ppb)

sedangkan sebanyak 91,3% terdeteksi adanya melamin dengan kadar dalam kisaran 6,7 ppb sampai 61,5 ppb.

Pengujian melamin dari 35 sampel susu bubuk yang dikumpulkan dari swalayan di daerah Bandung dan DKI Jakarta, sebanyak 14 sampel (40%) tidak terdeteksi adanya melamin (kadar melamin lebih kecil dari 5 ppb), sedangkan sebanyak 21 sampel (60%) terdeteksi adanya melamin, namun dalam konsentrasi yang sangat kecil yaitu dalam kisaran 5,1 ppb sampai 26,5 ppb. Jika dibandingkan dengan batas limit melamin yang dianggap aman/dapat ditoleransi dalam susu bubuk yang dipersyaratkan WHO/FAO yaitu 1 ppm (1000 ppb), nilai kadar melamin dalam sampel tersebut hanya 1/200 kali sampai 1/38 kali batas limit.

Tabel 3.3 Kandungan melamin sampel susu bubuk import dari swalayan daerah Bandung dan Jakarta (Rachmawati & Widiyanti, 2013)

Jenis Sampel	Konsentrasi (ppb)	Jumlah Sampel	%
Susu bubuk	Tt	14	41
Susu bubuk	5,1-26,5	20	59

Jika dibandingkan dengan kadar melamin yang diperoleh pada sampel dari karantina Tanjung Priok, kadar melamin sampel susu bubuk dari swalayan lebih kecil. Keadaan ini dapat dimengerti karena umumnya bahan yang dianalisis pada sampel dari karantina adalah produk berbahan susu. Kadar melamin yang tertinggi terdeteksi pada sampel keju yaitu sebesar 61,5 ppb. Namun demikian kadar melamin dalam

sampel yang dikumpulkan dari karantina juga masih jauh lebih rendah kadarnya jika dibandingkan dengan batas limit yaitu sebesar 1/49 kali sampai 1/16 kali lebih kecil.

Tabel 3.4 Hasil analisis melamin dari Karantina Tanjung Priok (Rachmawati & Widiyanti, 2013)

Jenis Sampel	Konsentrasi (ppb)	Jumlah Sampel (total 46 sampel)
Susu bubuk (susu skim, <i>full cream</i>)	Tt-29,0	24
Whey	Tt-23,5	10
Keju	23,3-61,5	8
Produk lain (kasein, yogurt, mentega)	7-27,5	4

Terdeteksinya melamin dalam jumlah kecil pada produk berbasis susu dan susu bubuk kemungkinan besar disebabkan adanya migrasi dari peralatan pada saat proses produksi dan kemasan selain dari lingkungan.

d. Kesimpulan dan Saran :

Hasil validasi metoda analisis melamin secara LCMS diperoleh konfirmasi melamin dengan alat LC-MS pada (m/z) 127, kesesuaian sistem baik dengan nilai RSD 1,18% (< 2,0 %) yang diperoleh dari pengujian 7 kali standar melamin 0,5 ppm. Uji akurasi memberikan nilai perolehan kembali sebesar rata-rata 89,1%. Limit deteksi melamin 5 ppb dan limit kuantitasi 7 ppb. Sebanyak 91,3% (n = 46) sampel dari karantina hewan Tanjung Priok, terdeteksi adanya melamin dengan kadar dalam kisaran 6,7 ppb sampai 61,5 ppb (1/49 kali sampai 1/16 kali lebih kecil batas

limit), sedangkan kadar melamin pada 35 sampel susu bubuk yang dikumpulkan dari swalayan di daerah Bandung dan Jakarta, sebanyak 40% (14 sampel) tidak terdeteksi, sedangkan 60% sampel terdeteksi adanya melamin dengan kadar sangat kecil dalam kisaran 5,1 ppb sd 26,5 ppb (1/200 sd 1/38 kali batas limit). Namun demikian, semua sampel yang dianalisis, kadar melamin yang diperoleh hasilnya dibawah batas limit aman 1 ppm.

3. Artikel Ketiga

Judul Artikel : Validasi Metode Penentuan Cemaran Melamin Dalam Susu Formula Menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* HITACHI D 7000

Nama Jurnal : Jurnal Sains dan Teknologi Kimia

Penerbit : Universitas Pendidikan Indonesia

Volume : Vol. 4 No. 1

Tahun Terbit : 2013

Penulis Artikel : Dian Novita Zebua, Soja Siti Fatimah, dan Hokcu Suhandu

ISI ARTIKEL

a. Tujuan Penelitian :

Untuk menguji validitas (keabsahan) metode pengujian melamin dalam susu formula menggunakan HPLC Hitachi D-7000 sehingga diperoleh metode yang valid.

b. Metode Penelitian

1) Disain : Eksperimental Laboratorium

2) Populasi dan sampel :

Susu formula bayi.

3) Instrumen :

Alat yang digunakan peralatan gelas, sentrifugasi, ultrasonic vibrator, instrumen HPLC Hitachi D-7000, kolom C18 dengan spesifikasi *column oven* L-7300, detektor UV L-7400 dan pompa L-7100.

4) Metode analisis :

a) Preparasi sampel

Sebanyak 0,1 gram sampel susu formula dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Kemudian sampel tersebut ditambahkan 2 mL larutan TCA 5%, diencerkan dengan methanol 50%, dihomogenkan selama 30 menit. Sampel didinginkan pada suhu ruang, lalu ditambahkan metanol 50% hingga tanda batas. Dikocok dengan hati-hati. Larutan sampel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang belum jernih disaring terlebih dahulu menggunakan kertas saring Whatman, selanjutnya

menggunakan membrane PTFE. Sementara supernatan jernih secara langsung difiltrasi menggunakan membran PTFE.

b) Penentuan kondisi analisis

Dalam penelitian ini digunakan HPLC Hitachi D-7000 fase terbalik, kolom C18 (5 μm), panjang kolom 12,5 cm, suhu kolom 26°C, dan fase gerak 0,1% TFA/metanol. Volume injeksi sebanyak 10 μL dan dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 240 nm.

(1) Penentuan pH

Larutan stok melamin 500 ppm disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam HPLC pada pH fase gerak 0,1% TFA 2,4 dan 2,8.

(2) Penentuan komposisi fase gerak

Larutan stok melamin 500 ppm disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam HPLC pada komposisi fase gerak 0,1% TFA:metanol 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 50:50.

(3) Penentuan laju alir

Larutan stok melamin 500 ppm disuntikkan sebanyak 10 μL ke dalam HPLC pada laju alir 1 mL/menit dan 0,75 ml/menit.

c) Validasi metode

(1) Penentuan linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan cara membuat 7 konsentrasi larutan deret standar 1, 10, 20, 40, 50, 60, dan 70 ppm.

(2) Penentuan LOD dan LOQ

Batas deteksi dan batas kuantisasi ditentukan secara statistik dari hasil pengukuran linearitas berdasarkan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi.

(3) Penentuan presisi

Sampel susu formula diadisi dengan larutan standar melamin 40 ppm. Larutan tersebut diinjekkan sebanyak 6 kali ulangan pada hari yang sama sehingga diperoleh simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (%RSD).

(4) Penentuan akurasi

Sampel susu formula diadisi dengan larutan standar melamin 40 ppm dan 70 ppm. Pengukuran diulangi sebanyak 3 kali.

c. Hasil Penelitian :

1) Penentuan kondisi analisis

Penentuan pH fase gerak 0,1% TFA Pada RP-HPLC pH fase gerak mempengaruhi retensi analit. TFA memiliki kapasitas buffer maksimum pada daerah kerja pH 2-3.

Tabel 3.5 Penentuan Ph 0,1% TFA (Zebua *et al.*, 2013)

pH	RT	Luas Puncak
2,4	1,88	21098035
2,8	1,86	21629094

Kondisi analisis dipilih pada pH 2,8 karena memberikan RT yang lebih cepat dan luas puncak yang lebih besar dibanding pada pH 2,4.

2) Penentuan komposisi fase gerak

Berkurangnya komposisi fase gerak 0,1% TFA menyebabkan waktu analisis yang semakin cepat. Hal ini disebabkan pada fase gerak yang mengandung 50% metanol secara signifikan memiliki viskositas yang lebih besar dan berdampak pada tingginya tekanan. sehingga melamin terelusi lebih cepat. Pada komposisi fase gerak 50:50, luas puncak kromatogram yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan komposisi yang lain. Bentuk puncak melamin pada komposisi tersebut juga memiliki puncak yang paling tajam dan simetris.

3) Penentuan laju alir

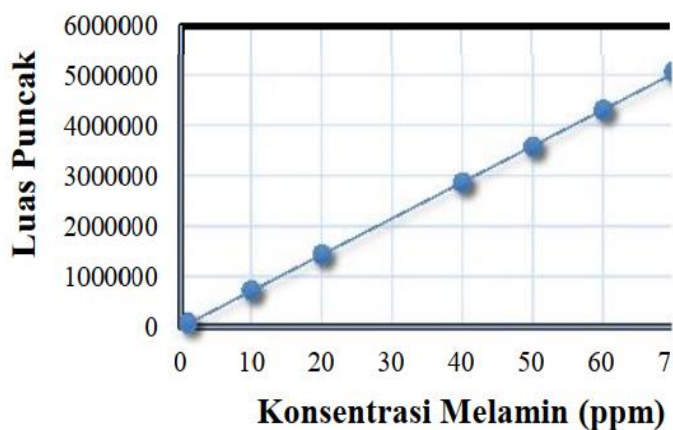
Analisis dilakukan pada laju alir karena 0,75 mL/menit Karena puncak kromatogram melamin memiliki luas area lebih

besar dan bentuk puncak yang lebih tajam, simetris, serta intensitas lebih tinggi dibandingkan laju alir 1 mL/menit.

4) Validasi metode

a) Penentuan Linearitas

Linearitas ditentukan dengan membuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi larutan standar melamin 1 ppm sampai 70 ppm terhadap luas puncak pada kromatogram. Berdasarkan perhitungan statistic regresi linear, diperoleh nilai koefisien korelasi (r) 0,9999 dan persamaan garis linear $y = 71986x - 1347x$.



Gambar 3.3 Kurva Kalibrasi larutan standar melamin (Zebua *et al.*, 2013)

Metode yang digunakan memenuhi persyaratan metode yang baik dari segi linearitas, yaitu koefisien korelasi lebih dari 0,999.

b) Penentuan batas deteksi (LOD)

Berdasarkan kurva linearitas diperoleh LOD sebesar 0,76 ppm.

c) Penentuan batas kuantisasi (LOQ)

LOQ yang diperoleh sebesar 2,5 ppm.

d) Penentuan presisi

Nilai RSD hasil pengukuran adalah 1,13%.

e) Penentuan akurasi

Hasil persen perolehan kembali ditentukan dari larutan sampel yang ditambahkan standar melamin 40 ppm dan 70 ppm.

Tabel 3.6 Penentuan persen perolehan kembali (Zebua *et al.*, 2013)

Penambahan Standar Melamin (Ppm)	Konsentrasi Sampel (ppm)		Perolehan Kembali
	Tanpa Penambahan Standar	Setelah Penambahan Standar	
40	30,81	71,09	100,7
70	30,81	114,72	119,8

Berdasarkan metode yang digunakan diperoleh persen perolehan kembali sebesar 100,7-119,8%.

d. Kesimpulan dan Saran :

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa kondisi analisis cemaran melamin dalam susu formula menggunakan HPLC Hitachi D-7000 diperoleh pada komposisi fase gerak 0,1% TFA (pH 2,8):metanol(50:50), laju alir 0,75 mL/menit, kolom C 18, volume injeksi 10 μ L dan panjang gelombang 240 nm. Berdasarkan hasil uji lima parameter validasi diperoleh linearitas (r) 0,9999, batas deteksi 0,76 ppm, batas kuantisasi 0,25 ppm, presisi berdasarkan uji repetabilitas dengan RSD sebesar 1,31%, dan akurasi berdasarkan uji perolehan kembali sebesar 100,7-

119,8% dengan batas keberterimaan 80-120%. Semua parameter tersebut telah memenuhi persyaratan validasi metode analisis sehingga metode analisis menggunakan HPLC Hitachi D-7000 layak digunakan untuk menentukan cemaran melamin dalam susu formula.

4. Artikel Keempat

Judul Artikel : Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography

Nama Jurnal : Journal of Dairy Science

Penerbit : American Dairy Science Association

Volume & Halaman : Vol. 95 No. 2 & Hal. 602-608

Tahun Terbit : 2012

Penulis Artikel : A. Filazi, U.T. Sireli, H. Ekici, H.Y. Can, and A. Karagoz

ISI ARTIKEL

a. Tujuan Penelitian :

Untuk menganalisis 300 sampel susu dan produk susu yang dibeli dari pengecer besar di Turki

b. Metode Penelitian

- 1) Disain : Eksperimental Laboratorium
- 2) Populasi dan sampel :

Total 300 produk susu dalam negeri dan impor (Susu UHT, susu pasteurisasi, yogurt buah, susu bubuk, susu formula bubuk bayi, dan keju lunak, masing-masing 50 sampel) dibeli dari toko grosir nasional di Ankara, Turki

3) Instrumen :

Filter jarum suntik sekali pakai (Chromafil Xtra PVDF-45/25 ukuran 0,45 μm , diameter membran 25 mm). Waterbath ultrasonik (Bandelin Sonorex, Berlin, Jerman), centrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Jerman), dan HPLC (Shimadzu, Tokyo, Jepang).

4) Metode analisis :

a) Persiapan standar

Larutan standar stok melamin disiapkan pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ dalam air, disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C. Setiap larutan standar diinjeksikan ke dalam sistem HPLC sebanyak 6 kali.

b) Persiapan Sampel

Setiap susu atau produk susu yang dihomogen ditimbang ($1 \pm 0,01$ g) ke dalam tabung sentrifus polipropilen dan ditambahkan 5 mL asetonitril:air (50:50, vol/vol). Tabung dicampur selama 1 menit, disonikasi selama 30 menit dalam wadah ultrasonik, dan dicampur lagi pada mixer Vortex selama 1 menit. Homogenat

disentrifugasi pada $13.200 \times g$ selama 5 menit pada suhu kamar, dan supernatan disaring melalui syring filter 0,45- μm ke dalam botol autosampler 2-mL. Kemudian, 250 μL filtrat ini ditambahkan ke 750 μL air dan disuntikkan.

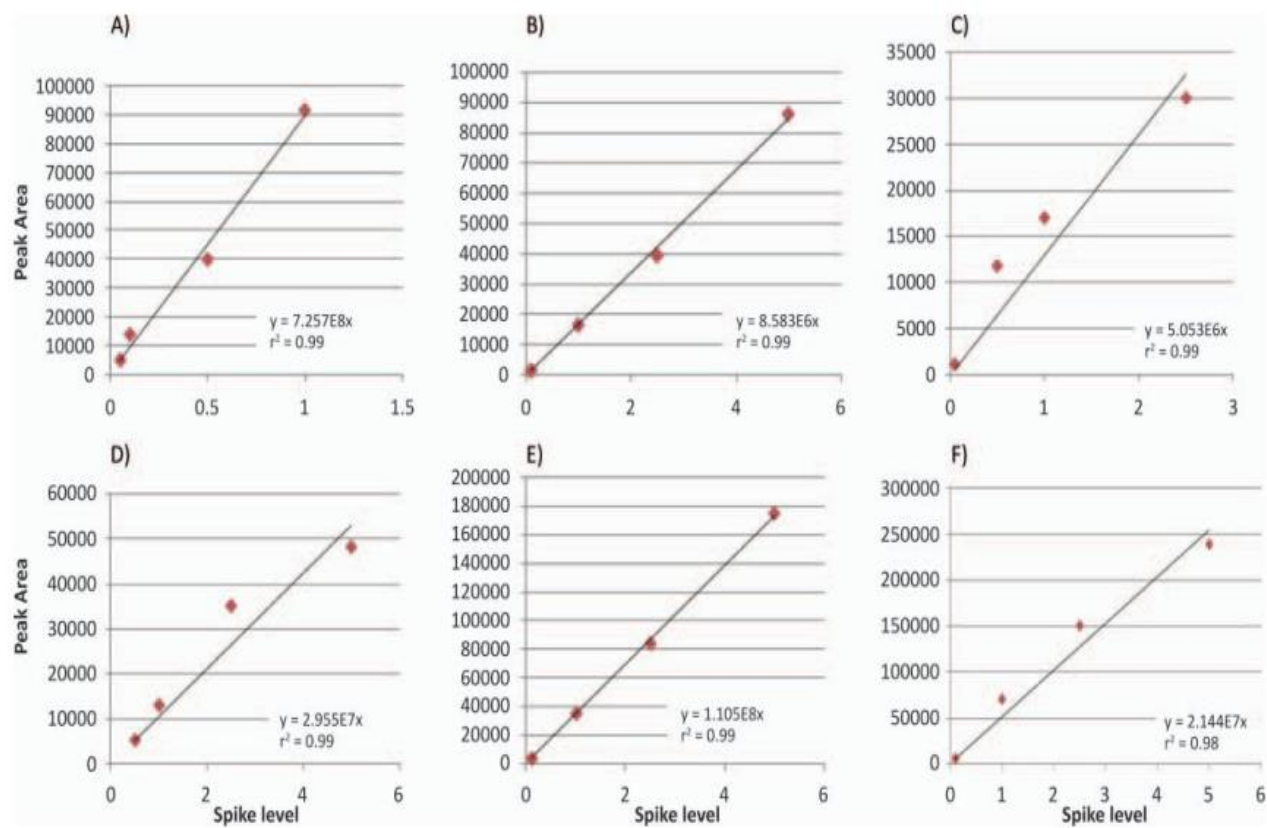
c) Persiapan sampel untuk validasi metode

Kuantitas 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1; 2,5 dan 5 μg melamin ditambahkan ke 1 g susu atau produk susu, dan sampel tambahan standar diperlakukan seperti yang dijelaskan di atas pada Preparasi Sampel. Untuk penilaian presisi dan akurasi, 4 tingkat lonjakan ditambahkan ke 1 g sampel (6 ulangan dilakukan untuk setiap tingkat). Pemulihan melamin dari susu dan produk susu pada setiap konsentrasi dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar dengan luas puncak.

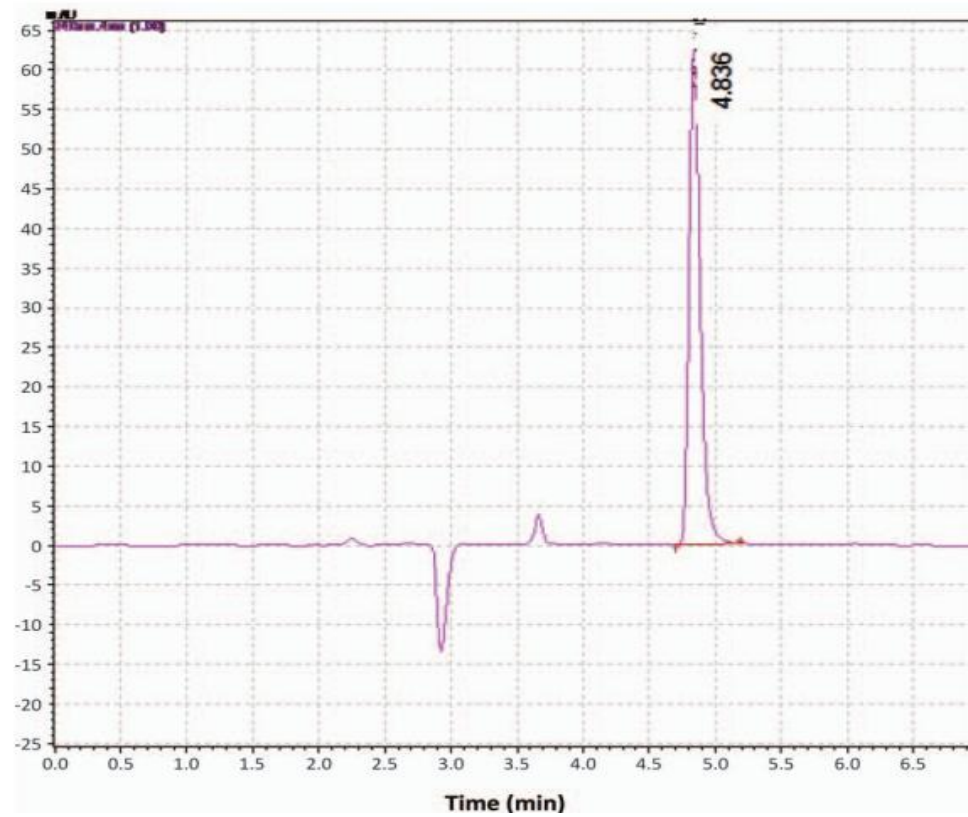
c. Hasil Penelitian :

Melamin adalah senyawa basa lemah yang dapat menghidrolisis dalam larutan asam kuat atau alkali. Melamin ekstraksi dapat dilakukan dalam kondisi netral, asam, atau alkali, tetapi kondisi ekstraksi asam ($\text{pH} \leq 3$) dan netral paling umum untuk makanan. Ekstraksi netral dapat dilakukan dengan menggunakan asetonitril: air atau metanol:campuran air. Dalam studi ini, campuran asetonitril: air digunakan.

Penelitian ini, kolom Nucleosil C8 digunakan untuk pemisahan melamin dalam susu dan produk susu. Mekanisme pemisahannya adalah pasangan ion dengan natrium oktan sulfonat. Karena ukuran partikel kolom kecil (3 μm), laju aliran disesuaikan menjadi 1,0 mL / menit untuk mengkompensasi tekanan balik yang lebih tinggi. Kurva kalibrasi menunjukkan tidak ada gangguan dari susu dan produk susu, dan sinyal melamin dengan jelas dibedakan pada menit 4,836. Selain itu, sampel yang ditambahkan 0,05 hingga 5 mg/kg melamin menunjukkan pemulihan mulai dari 95 hingga 109%, dengan nilai deviasi standar relatif mulai dari 0,8 hingga 2%, menunjukkan bahwa metode tersebut akurat selama rentang konsentrasi yang diuji.



Gambar 3.4 Kurva kalibrasi untuk melamin (Filazi *et al.*, 2012)



Gambar 3.5 Kromatogram diperoleh dengan menginjeksikan 20 μL larutan standar melamin 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Filazi *et al.*, 2012)

Tabel 3.7 *Recovery*, LOD, LOQ, dan RSD untuk validasi metode melamin dalam susu dan produk susu (Filazi *et al.*, 2012)

Produk	Berduri kandungan (mg / kg)	Persentase pemulihan (CV)	Rata-rata persentase pemulihan (CV)	LOD ($\mu\text{g} / \text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g} / \text{kg}$)	RSD (%)
Yoghurt buah	0,1	104 (3,85)	95 (11,30)	110	330	1,5
	1	90 (1,02)				
	2,5	82 (0,89)				
	5	102 (0,91)				
Keju lembut	0,5	93 (0,49)	97 (11,44)	35	105	0,8
	1	85 (0,18)				
	2,5	112 (0,005)				
	5	98 (0,03)				
Susu pasteurisasi	0,05	88 (0,63)	95 (9,01)	70	200	1,5
	0,5	88 (0,1)				
	1	106 (0,05)				
	2,5	98 (0,005)				
Susu UHT	0,1	116 (0,58)	103 (8,88)	110	320	1,5
	1	95 (0,16)				
	2,5	101 (0,13)				
	5	100 (0,02)				
Bubuk susu	0,1	110 (0,17)	101 (6,47)	110	340	2,0
	1	95 (0,01)				
	2,5	101 (0,01)				
	5	100 (0,01)				
Formula bayi	0,05	122 (0,01)	109 (9,33)	90	280	1,0
	0,1	108 (0,01)				
	0,5	97 (0,1)				
	1	110 (0,01)				

† LOD = batas deteksi; LOQ = batas penghitungan; RSD = deviasi standar relatif.

LOD, LOQ, dan pemulihan metode ini untuk penentuan melamin dalam beberapa produk susu dibandingkan dengan metode lain yang dilaporkan pada tabel diatas. Metode HPLC sensitif dan tervalidasi untuk penentuan residu melamin dalam susu dan produk susu dikembangkan. Metode yang diusulkan sensitif dapat diandalkan, dan akurat,

dan memungkinkan deteksi residu melamin pada tingkat serendah 105 hingga 340 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dalam produk susu yang berbeda. Metodenya bisa digunakan untuk penentuan rutin residu melamin diproduk susu yang berbeda.

Melamin tidak ditemukan dalam susu formula bayi dan sampel susu pasteurisasi atau UHT, sedangkan sampel keju 2% (1 sampel), 8% sampel susu bubuk (4 sampel) dan 44% sampel yogurt (22 sampel) mengandung melamin, pada kadar masing-masing 121, 694 ± 146 , dan 294 ± 98 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Temuan ini berada di bawah batas yang ditetapkan oleh *Codex Alimentarius Commission* dan 2 undang-undang Uni Eropa. Ini adalah studi pertama yang mengkonfirmasi keberadaan melamin dalam susu dan produk susu di Turki.

d. Kesimpulan dan Saran :

Metode HPLC fase terbalik dikembangkan untuk penentuan melamin dalam UHT dan susu pasteurisasi serta susu formula bubuk, yogurt buah, keju lunak, dan susu bubuk. Metode LOD dan LOQ cukup untuk mendeteksi melamin dalam susu dan produk susu di bawah batas keamanan yang direkomendasikan oleh *Codex Alimentarius Commission*. Metode yang diusulkan dapat digunakan untuk penentuan rutin residu melamin dalam susu dan produk susu

5. Artikel Kelima

Judul Artikel	: Determinations of Melamine Residue in Infant Formula Brands Available in Iran Market Using by HPLC Method
Nama Jurnal	: Iranian Journal of Pharmaceutical Research
Penerbit	: University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
Volume & Halaman	: 17(2) & 563-570
Tahun Terbit	: 2018
Penulis Artikel	: Javad Maleki,, Firouzeh Nazari, Jamal Yousefi, Roya Khosrokhavar and Mir-Jamal Hosseini

ISI ARTIKEL

a. Tujuan Penelitian :

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi keberadaan dan tingkat melamin di semua merek formula bayi yang tersedia dan menindaklanjuti di Iran menggunakan kolom SPE dan analisis HPLC.

b. Metode Penelitian

1) Disain : Eksperimental Laboratorium

2) Populasi dan sampel :

Sebanyak 48 susu formula bayi (dari lahir hingga 6 bulan) dan 21 sampel formula lanjutan (dari lahir hingga 12 bulan)

dari 11 merek yang berbeda (5 merek domestik dan 6 impor) dikumpulkan secara acak dari toko obat di Zanzan, Iran, selama April hingga November. Sampel disimpan pada suhu kamar sampai dilakukan analisis.

3) Instrumen :

Deteksi dan kuantifikasi dilakukan menggunakan sistem HPLC (KNAUER, Berlin, Jerman) yang dilengkapi dengan pompa isokratis Model 1000 (KNAUER, Smartline, Jerman) dan detektor UV Model 2600 (KNAUER, Smartline, Jerman).

4) Metode analisis :

a) Standar, preparasi sampel, dan pelarut

Standar stok melamin 1000 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan dengan menimbang 100 mg melamin secara akurat ke dalam labu ukur 100 mL. Melamin dilarutkan dengan air deionisasi dengan bantuan sonikasi dan pemanasan selama 15 menit. Standar stok diencerkan dengan tepat dengan konsentrasi mulai dari 0,1-10 $\mu\text{g/mL}$ untuk mendapatkan kurva kalibrasi. Prosedur ekstraksi dan pembersihan dilakukan dengan menggunakan lima belas mL TCA (1% v/v) dan 5 mL ACN ditambahkan ke 2 g sampel susu bayi atau formula dalam tabung sentrifuge 50 mL. Setelah 1 menit pusaran dan pengocokan dan 30 menit ultra-sonikasi, sampel disentrifugasi selama 10 menit (10000 rpm).

Supernatan diencerkan dengan TCA (1% v/v) hingga mencapai 25 mL.

b) Penetapan kadar melamin dalam sampel

Pembersihan sampel dilakukan dengan ekstraksi fase padat (SPE) CHROMABOND® HR-XC polipropilena kolom (85 µm/mL/200 mg). Kolom SPE awalnya diaktivasi dengan melewati 5 mL CH₃OH dan 5 mL H₂O. Setelah sampel ditambahkan kekolom SPE, kolom dielusi dengan 6 mL larutan metanol amoniasi (campuran 5 mL larutan amonia dan 95 mL metanol). Kemudian, sampel yang dikumpulkan dikeringkan di bawah aliran gas nitrogen dan dilarutkan dalam 1 mL fase gerak dan disaring sebelum injeksi. Akurasi dan presisi metode ditentukan dengan spiking sampel formula bayi dengan konsentrasi melamin yang berbeda (1; 2,5 dan 5 mg/kg, n = 3 replikasi).

c) Analisis statistik

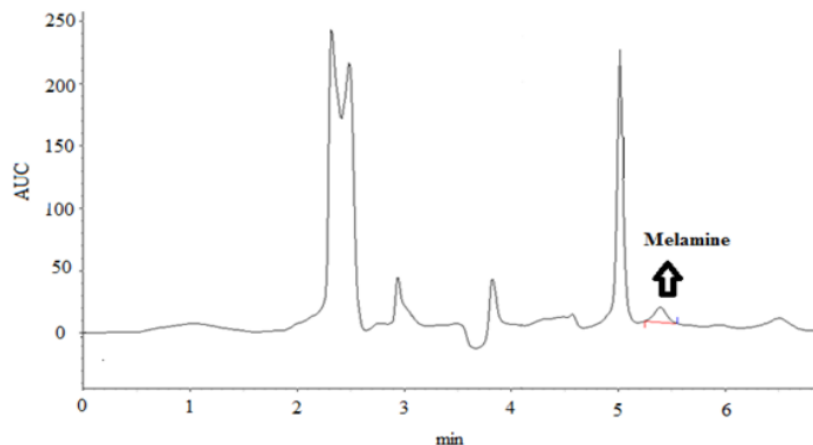
Semua analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS dan perangkat lunak Excel 2007 digunakan untuk analisis data. Nilai probabilitas $p < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik dalam penelitian ini.

c. Hasil Penelitian :

Melamin diukur pada formula bayi dan menindaklanjuti sampel rumus (n = 69) menggunakan kurva kalibrasi eksternal.

Berdasarkan metode validasi, kami mengkonfirmasi bahwa hasil metode kami cocok dalam hal keandalan, reproduksi, dan kegunaan untuk pemantauan rutin melamin pada formula bayi dan formula lanjutan. Keakuratan metode diperiksa menggunakan tes uji pemulihan. Batas kuantifikasi (LOQ) dan batas deteksi (LOD) diperkirakan pada konsentrasi terendah dalam sampel yang sesuai dengan *signal-to-noise ratio* (S/N) masing-masing 10:1 dan 3:1.

Karakteristik kinerja metode dari metode analisis yang ditetapkan ditunjukkan pada Tabel 13. LOD dan LOQ masing-masing 0,03 dan 0,1 mg/kg. Pemulihan mencerminkan rata-rata tiga kali lipat dari 3 analisis pada setiap konsentrasi. Keakuratan metode ini dinilai dengan melakukan eksperimen pemulihan dalam tiga tingkat berpaku dalam kisaran yang dapat diterima dengan % RSD yang diizinkan. Untuk mengevaluasi keandalan hasil, sampel kosong dan berduri juga dianalisis di setiap hari kerja. Waktu retensi melamin dalam sampel melamin standar dan berduri adalah $5,30 \pm 0,1$ menit (Gambar 13).



Gambar 3.6 Kromatogram HPLC Formula bayi dengan kandungan melamin 0,39 mg/kg (Maleki *et al.*, 2018)

Berdasarkan hasil penelitian, melamin ditemukan dalam 71,7%, 58,8%, dan 50% formula bayi domestik, formula tindak lanjut domestik dan formula tindak lanjut impor. Kadar rata-rata dan maksimum melamin pada sampel positif masing-masing adalah $0,73 \pm 0,71$ dan 3,63 mg/kg. Tingkat maksimum kontaminasi melamin diamati pada susu formula bayi domestik dengan hasil yang ditunjukkan pada Tabel 13. Kisaran kontaminasi melamin dalam sampel ditunjukkan dalam Tabel 14.

Tabel 3.8 Kandungan melamin pada susu bayi dan sampel formula lanjutan (Maleki *et al.*, 2018)

Sample Code	Melamine Concentration (mg/kg)	Sample Code	Melamine Concentration (mg/kg)	Sample Code	Melamine Concentration (mg/kg)
1	0.32	24	ND	47	0.11
2	0.58	25	ND	48	0.22
3	0.64	26	0.55	49	ND
4	ND	27	0.12	50	0.46
5	0.86	28	ND	51	ND
6	1.48	29	ND	52	0.11
7	1.37	30	ND	53	0.12
8	0.33	31	0.49	54	0.60
9	0.70	32	ND	55	0.48
10	0.28	32	0.22	56	0.28
11	ND	34	ND	57	1.13
12	0.73	35	0.65	58	0.31
13	0.55	36	0.13	59	0.49
14	1.38	37	1.66	60	0.18
15	2.48	38	0.72	61	0.82
16	ND	39	ND	62	0.13
17	ND	40	ND	63	14.91
18	ND	41	ND	64	0.11
19	0.13	42	0.49	65	0.22
20	ND	43	ND	66	ND
21	ND	44	0.22	67	0.46
22	ND	45	ND	68	ND
23	ND	46	0.65	69	0.11

.ND: non detected

Tabel 3.9 Terjadinya melamin untuk kelompok dalam sampel yang dianalisis (Maleki *et al.*, 2018)

Origin	Samples	Mean (mg/kg)	Range (mg/kg)	No. Of positive samples (%)	No. Of sample
Domestic	Infant formula	0.78	0.11-3.63	30 (71.4)	42
	Follow up formula	0.72	0.12-2.48	10 (58.8)	17
Imported	Infant formula	0.46	0.25-0.65	3 (50)	6
	Follow up formula	0.38	0.38	2 (50)	4
Total	Infant formula	0.75	0.11-3.63	33 (68.8)	48
	Follow up formula	0.68	0.12-2.48	12 (57.2)	21

Hasil kami menunjukkan bahwa melamin ditemukan pada 65,2% sampel susu formula bayi dan hanya 14,5% sampel yang diamati lebih tinggi dari tingkat maksimum yang ditetapkan oleh *Codex Alimentarius* untuk makanan bayi (1 mg/kg). Rendahnya tingkat melamin mungkin berasal dari sumber yang berbeda. Karena melamin adalah bahan baku dalam produksi beberapa produk plastik yang digunakan untuk menyajikan makanan, makanan mungkin mengandung kandungan melamin yang rendah karena migrasinya ke dalam makanan atau degradasi beberapa bahan kimia untuk melamin.

d. Kesimpulan dan Saran:

Hasil penelitian menunjukkan bahwa anak-anak Iran yang diberi makanan bayi dan formula lanjutan terpapar berbagai tingkat melamin. Meskipun tingginya insiden kontaminasi melamin ditemukan dalam sampel yang dianalisis, asupan melamin setiap

hari oleh berbagai kelompok usia anak-anak yang berbeda lebih rendah daripada TDI yang ditetapkan oleh WHO menunjukkan bahwa adanya tingkat melamin pada susu bayi dan formula lanjutan yang dikumpulkan di Iran tidak menimbulkan risiko kesehatan.