

Perbandingan Akrilamidakopi Bubuk Tradisional Dan Luwak Dengan Metode HPLC

¹ Ridho Asra, ¹ Rusdi, ¹ Sofia Nofianti, ² Nessa Nessa

¹ Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang, Jalan Raya Siteba, 25147, Padang, Indonesia

² Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang, Indonesia

Detail Artikel

Diterima : 22 September 2019

Direvisi : 08 Oktober 2019

Diterbitkan : 30 Oktober 2019

Kata Kunci

Akrilamida

Kopi bubuk tradisional

Kopi bubuk luwak

KCKT

Penulis Korespondensi

Name : Ridho Asra

Affiliation : Sekolah Tinggi Ilmu
Farmasi Padang

Email : ridhoasra@gmail.com

ABSTRAK

Akrilamida merupakan senyawa kimia terdapat pada kopi yang disangrai pada suhu diatas 120 °C, berpotensi menyebabkan kanker pada manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan kandungan akrilamida dalam kopi bubuk tradisional dan kopi luwak dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Fase gerak yang digunakan asetonitril: aquabidest (15: 85, v/v), dengan detektor Photodiode-Array (PDA) pada λ 200 nm. Akrilamida dalam sampel kopi bubuk teridentifikasi pada waktu retensi (tR) $\pm$ 6,8 menit. Metode ini terbukti valid dengan linearitas $y = 356468 + 293761 x$, koefisien korelasi (r) = 0,9993, batas deteksi 1,9901 $\mu\text{g/mL}$ dan batas kuantitasi 6,6337 $\mu\text{g/mL}$, presisi dengan % SBR = 0,207 %, akurasi dengan % perolehan kembali kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak 99 % dan 104 %. Kadar akrilamida dalam

sampel kopi bubuk 1 sampai 6 berturut-turut adalah $1115 \pm 12,17 \mu\text{g/g}$ sampel (1), $687 \pm 7,58 \mu\text{g/g}$ sampel (2), $1461 \pm 63,89 \mu\text{g/g}$ sampel (3), $221 \pm 3,54 \mu\text{g/g}$ sampel (4), $128 \pm 3,24 \mu\text{g/g}$ sampel (5), $195 \pm 1 \mu\text{g/g}$ sampel (6). Dari keenam sampel kopi bubuk menunjukkan bahwa kadar akrilamida masing-masing sampel berkisar antara 128 sampai 1461 $\mu\text{g/g}$. Kadar yang diperoleh melebihi batas aman konsumsi akrilamida yang dikeluarkan oleh WHO.

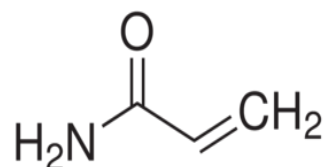
ABSTRACT

Acrylamide is a chemical compound found in roasted coffee at temperatures above 120 °C which can potentially cause cancer in humans. The purpose of this research was to analyze acrylamide contents in traditional ground coffee and civet ground coffee by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. This analysis was carried out by isocratic elution system, the mobile phase of acetonitrile : aquabidest (15 : 85, v/v), using the stationary phase of the Shimadzu Shimpack ODS C18 column (250 $\times$ 4.6 mm), flow rate of 0.5 mL/minute, injection volume 20 μL , with a Photodiode-Array (PDA) detector at a wavelength of 200 nm. Acrylamide in ground coffee samples was identified at retention time (tR) $\pm$ 6.8 minutes. This method is proved valid with the linearity $y = 356468 + 293761 x$, correlation coefficient (r) = 0.9993, limit of detection 1.9901 $\mu\text{g / mL}$ and limit of quantitation 6.6337 $\mu\text{g / mL}$, precision with % RSD = 0.207 %, accuracy with % recovery of traditional ground coffee and luwak ground coffee 99 % and 104 %. Acrylamide levels in 1 to 6 ground coffee samples in a row is $1115 \pm 12.17 \mu\text{g / g}$ samples (1), $687 \pm 7.58 \mu\text{g / g}$ samples (2), $1461 \pm 63.89 \mu\text{g / g}$ samples (3), $221 \pm 3.54 \mu\text{g / g}$ sample (4), $128 \pm 3.24 \mu\text{g / g}$ sample (5), $195 \pm 1 \mu\text{g / g}$ sample (6). Of the six ground coffee samples showed that the acrylamide levels of each sample ranged from 128 to 1461 $\mu\text{g / g}$. The levels obtained exceed the safe limits of acrylamide consumption released by WHO.

PENDAHULUAN

Kopi bubuk merupakan salah satu jenis kopi yang banyak digemari masyarakat (Towaha and Tjahjana, 2015). Kopi bubuk berasal dari biji kopi yang disangrai kemudian digiling, dengan atau tanpa penambahan bahan lain dalam kadar tertentu tanpa mengurangi rasa dan aroma serta tidak membahayakan kesehatan (SNI, 2004). Kopi bubuk tradisional adalah biji kopi yang diolah langsung dengan cara tradisional menggunakan alat-alat sederhana melalui proses penyangraian, penggilingan sehingga menghasilkan kopi bubuk dan apabila dilarutkan dalam air maka akan meninggalkan ampas (Najiyati & Danarti, 2004). Salah satu kopi yang terkenal di Indonesia adalah kopi luwak yang berasal dari feses hewan luwak dan diolah melalui proses penyangraian, penggilingan sehingga berbentuk bubuk yang siap diminum (Rahardjo, 2017).

Proses penyangraian biji kopi dilakukan menggunakan suhu tinggi (120 – 250 °C) yang dapat menyebabkan perubahan komposisi kimia dari biji kopi. Biji kopi merupakan salah satu produk pangan yang mengandung karbohidrat dan asam amino yang tinggi. Karbohidrat dan asam amino berperan penting dalam reaksi maillard serta pembentukan citarasa dan aroma dari biji kopi (Belitz & Grosch, 1987). Reaksi Maillard menghasilkan akrilamida yang bersifat karsinogenik yang dapat menyebabkan perubahan struktur kimia DNA serta menyebabkan kerusakan sel-sel saraf (WHO, 2002). Rumus struktur akrilamida terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rumus Struktur Akrilamida (Lingnert *et al.*, 2002)

Akrilamida memiliki serapan maksimum yang dapat dideteksi menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 196-198 nm dengan konsentrasi baku 10 µg/mL, namun karena sampel yang akan dianalisis merupakan sampel kopi bubuk dengan kandungan yang kompleks, maka dikhawatirkan penggunaan panjang gelombang 196-198 nm pada pelarut dapat memberikan serapan yang cukup besar dan pengotor akan menyerap lebih kuat sehingga akan mengganggu analisis serta pemilihan fase gerak yang akan digunakan juga menjadi terbatas (Brown, *et al.*, 1982). Analisis yang dilakukan pada panjang gelombang 190 nm menghasilkan *noise* yang tinggi dan garis alas yang tidak stabil (Leung, *et al.*, 1987). Berdasarkan hal tersebut maka analisis akrilamida dalam penelitian ini dilakukan pada panjang gelombang 200 nm, karena pada panjang gelombang 200 nm merupakan panjang gelombang yang mendekati panjang gelombang maksimum dan memberikan kondisi analisis yang baik (bebas dari gangguan pelarut) (Friedman, 2003). Panjang gelombang ini juga digunakan dalam penelitian sebelumnya (Can & Arli, 2014).

Penelitian sebelumnya mengenai analisis akrilamida dalam kopi serbuk (tubruk) dan kopi instan secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) ditemukan adanya kandungan akrilamida sebanyak $7,03 \pm 0,001$ µg/g dalam kopi serbuk (tubruk) dan sebanyak $5,71 \pm 0,03$ µg/g dalam kopi instan (Prabowo, *et al.*, 2012). Berdasarkan FDA kopi serbuk dan kopi instan

yang diuji masih relatif aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat tidak melebihi 16 g/hari. Pada penelitian ini, analisis akrilamida juga dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Metode kromatografi cair kinerja tinggi dipilih karena waktu analisis cepat, daya pisah yang baik dan selektif, fasa gerak dapat digunakan berulang kali demikian juga dengan kolomnya, dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah, serta tingkat ketelitian dan sensitifitas yang relatif tinggi (Gandjar and Rohman, 2007). Mengingat efek buruk adanya bahaya akrilamida pada proses penyangraian biji kopi, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menganalisis kandungan akrilamida dalam kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang digabung dengan detektor Photodiode-Array (PDA). Detektor yang digunakan pada pengukuran ini adalah detektor *Photodiode-Array* (PDA). Detektor ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (*single run*). Selama pengukuran, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400 nm) dapat ditampilkan, dengan demikian detektor *Photodiode-Array* (PDA) dapat memberikan lebih banyak informasi komposisi sampel dibanding dengan detektor UV-Vis (Gandjar & Rohman, 2007).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

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. Bahan yang digunakan untuk analisis adalah enam sampel kopi bubuk jenis robusta (tiga kopi bubuk tradisional dan tiga kopi bubuk luwak), Akrilamida (C₃H₅NO) *for synthesis* (Merck), heksana (C₆H₁₄) (p.a Merck), aseton (C₃H₆O) (p.a Merck), asetonitril (C₂H₃N) *grade HPLC* (Merck), Aquabides Pro Injeksi (PT. Ikapharmindo Putramas).

PROSEDUR

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.

Pembuatan Larutan Uji Sampel

Sejumlah 2,2 g kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak masing-masing ditimbang dan kemudian dilakukan penghilangan kandungan lemak dengan menambahkan 10 mL heksana pada sampel lalu dihomogenkan menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan 350 rpm selama 5 menit. Setelah itu, campuran endapan didekantasi, kemudian residu dibiarkan kering untuk menghilangkan sisa heksana. Tahap penghilangan kandungan lemak dilakukan dua kali pengulangan. Untuk mengekstraksi akrilamida, residu kopi yang telah dihilangkan kandungan lemaknya ditambahkan aseton sebanyak 20 mL dan dihomogenkan menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan 350 rpm selama 20 menit. Lapisan aseton disaring dengan menggunakan kertas saring dan kemudian diuapkan dengan *waterbath*. Kemudian residunya

ditambahkan dengan 4 mL fase gerak asetonitril dan aquabidest (15:85 v/v) dikocok untuk melarutkan kemudian disaring dengan kertas saring. Selanjutnya masing-masing larutan disaring menggunakan membran filter 0,45 μm dan dimasukkan ke dalam vial KCKT. Sebanyak 20 μL diinjeksikan ke sistem KCKT dan diukur luas areanya dengan KCKT sesuai kondisi analisis optimum, dicatat luas areanya dan pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Kadar akrilamida dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva kalibrasi (Prabowo *et al*, 2012).

Optimasi Fase Gerak dan Kondisi Analisis

Siapkan larutan fase gerak dengan berbagai perbandingan 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) asetonitril : aquabidest (15:85, v/v). Kemudian alirkan fase gerak dengan konsentrasi standar akrilamida 10 $\mu\text{g/mL}$ 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 C_{18}) dengan volume penyuntikan 20 μL . Selanjutnya dipilih kombinasi fase gerak dan laju alir yang memberikan pemisahan terbaik, berdasarkan puncak yang simetris, tinggi puncak, luas area dan waktu retensi yang sangat singkat dari larutan standar akrilamida.

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 standar akrilamida dan larutan uji hasil preparasi masing-masing disaring dengan membran filter 0,45 μm dan dimasukkan ke dalam vial KCKT. Sebanyak 20 μL diinjeksikan ke sistem KCKT dan ditentukan waktu retensi larutan standar dan larutan uji. Larutan uji dikatakan mengandung akrilamida jika waktu retensi larutan uji sama atau mendekati dengan waktu retensi larutan standar.

Validasi Metode Analisis

Pembuatan Standar dan Kurva Kalibrasi Akrilamida

Pembuatan seri larutan akrilamida konsentrasi bertingkat, sebanyak 0,01 g standar akrilamida ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Larutan induk akrilamida dilarutkan dengan campuran fase gerak asetonitril: aquabidest (15:85, v/v) sampai tanda batas (konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$). Larutan standar akrilamida dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40 dan 50 ppm dibuat dengan mengencerkan larutan induk 200 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan fase gerak. Pipet larutan induk 200 $\mu\text{g/mL}$ sebanyak 0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL; 1 mL; dan 1,25 mL. Masing-masing larutan dimasukan ke dalam labu ukur 5 mL. Cukupan dengan campuran fase gerak asetonitril: aquabidest (15:85, v/v) sampai tanda batas. Saring dengan membran filter 0,45 μm . Larutan standar 10; 20; 30; 40 dan 50 ppm, masing-masing diinjeksikan sebanyak 20 μL ke dalam sistem KCKT. Luas area di bawah kurva yang diperoleh dihitung dan buat kurva kalibrasi untuk menentukan persamaan garis regresi linier $y = a + bx$.

Uji Linearitas

Dari data pengukuran kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan persamaan garis regresi linear sehingga diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linearitasnya. Nilai linearitas (r) yang baik adalah $< 0,999$.

Pengujian Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi ditentukan dari garis regresi linier dari kurva baku kalibrasi yang diperoleh. Nilai LOD = $3 \times (SD/b)$ dan LOQ = $10 \times (SD/b)$, standar deviasi (SD) respon ditentukan berdasarkan standar deviasi residual (simpangan baku residual) dari garis regresi yang dinyatakan sebagai Sy/x dan b merupakan nilai kemiringan (slope) pada persamaan garis atau regresi linier $y = a + bx$.

Uji Presisi Keterulangan (Repeatability)

Uji presisi dilakukan pada tingkat keterulangan (*repeatability*) dengan cara mengukur sebanyak 6 kali pada konsentrasi larutan baku akrilamida 30 µg/mL. Uji presisi (keseksamaan) ditentukan dengan parameter RSD (*Relative Standar Deviasi*). Nilai RSD yang diperbolehkan adalah $\leq 1\%$.

Uji Akurasi (% Perolehan Kembali)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode simulasi (*spiked*) yaitu dengan cara menambahkan sejumlah larutan baku akrilamida ke dalam larutan uji sampel yang tidak mengandung akrilamida. Konsentrasi larutan baku akrilamida yang ditambahkan adalah 10 mg ke dalam 2,2 g kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak lalu diekstraksi dengan cara yang sama seperti pembuatan larutan sampel dilakukan masing-masing 3 kali pengulangan. Kemudian dihitung nilai perolehan kembali baku pembanding yang ditambahkan pada larutan uji dinyatakan dengan % perolehan kembali. Nilai % perolehan kembali antara 85 % - 110 %.

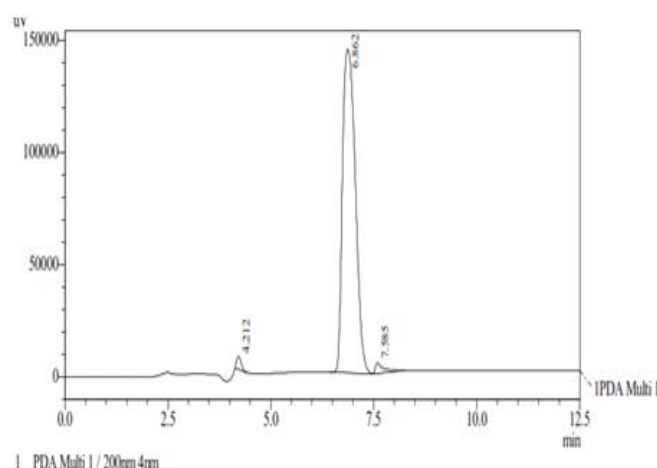
Penetapan Kadar Akrilamida dengan KCKT

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 µm dan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT sebanyak 20 µL pada kondisi analisis yang sesuai dan ditentukan luas area puncaknya. Konsentrasi akrilamida dalam sampel dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi dengan panjang gelombang 200 nm dalam 12,5 menit, laju alir lebih kurang 0,5 mL/menit, fase diam *shimadzu shimpack* oktadesilsilika (ODS atau C₁₈) (250 mm × 4,6 mm), fase gerak asetronitril: akuabides (15:85v/v). Selanjutnya diukur luas area puncak/ *area under curve* (AUC) sesuai kondisi analisis optimum, pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Kadar akrilamida dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Fase Gerak dan Kondisi Analisis

Penelitian ini dimulai dengan menentukan kondisi analisis optimum kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) agar menghasilkan pemisahan yang baik, dengan variasi komposisi fase gerak, laju alir, bentuk kromatogram dari larutan standar akrilamida yang simetris. Fase gerak yang dipilih pada penelitian ini perbandingan asetronitril: aquabidest (15: 85, v/v) dengan laju alir 0,5 mL/menit pada panjang gelombang 200 nm. Dalam komposisi fase gerak dan laju alir ini, didapat puncak akrilamida berada 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. Kromatogram optimasi fase gerak terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram optimasi fase gerak akrilamida pembanding 10 µg/mL dengan fase gerak campuran asetonitril: aquabidest (15:85, v/v) laju alir 0,5 mL/menit pada panjang gelombang 200 nm.

Identifikasi Akrilamida

Hasil identifikasi akrilamida pada sampel kopi bubuk menunjukkan bahwa keenam sampel kopi bubuk positif mengandung akrilamida. Semua sampel memberikan waktu retensi yang sama dengan baku akrilamida yaitu $\pm 6,8$ menit. Hal ini menunjukkan bahwa akrilamida dalam sampel terdapat satu puncak yang sama dengan akrilamida baku pembanding. Data identifikasi akrilamida baku pembanding dan kromatogram sampel dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Data identifikasi akrilamida pembanding dan akrilamida sampel

Kopi	Sampel	Waktu retensi (t_R)
Kopi Tradisional	Standar akrilamida 10 µg/mL	6,866
	Sampel A	6,855
	Sampel B	6,876
	Sampel C	6,865
Kopi Luwak	Sampel D	6,873
	Sampel E	6,837
	Sampel F	6,827

Validasi Metode Analisis

Hasil uji validasi yang telah dilakukan, maka dapat dikatakan bahwa akrilamida dapat dianalisis dengan metode KCKT menggunakan fase gerak asetonitril dan aquabidest (15:85, v/v), dimana metode analisis yang dilakukan telah akurat, memiliki keterulangan yang baik, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis serta tidak munculnya masalah yang sulit diidentifikasi. Parameter validasi yang telah diujikan adalah uji linearitas, batas deteksi batas kuantitasi, presisi (keseksamaan), dan akurasi (kecermatan).

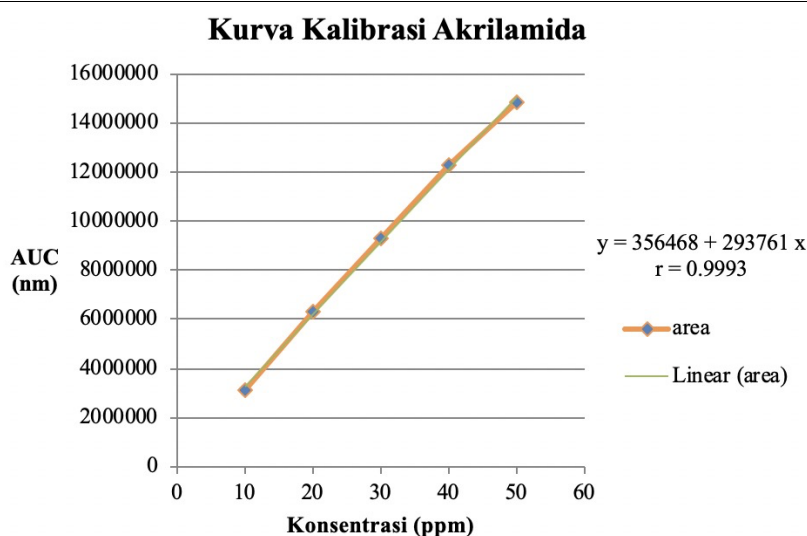
Uji Linearitas

Uji linearitas bertujuan untuk mengetahui linearitas hubungan antara konsentrasi larutan standar akrilamida (x) dengan luas area (y), sehingga diketahui apakah langkah kerja yang

dilakukan telah sesuai agar memperoleh hasil yang akurat serta mengurangi kesalahan galat alat (*noise*). Kurva kalibrasi dibuat menggunakan senyawa murni akrilamida pada beberapa konsentrasi berbeda kemudian dihitung koefisien korelasi (*r*). Pengukuran seri larutan standar akrilamida pada panjang gelombang 200 nm dengan konsentrasi 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, dan 50 µg/mL, diperoleh persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi akrilamida $y = 356468 + 293761 x$ dengan koefisien korelasinya (*r*) sebesar 0.9993. Dari data hasil pengukuran luas area terhadap konsentrasi akrilamida terdapat hubungan yang linear antara respon detektor (luas area) terhadap konsentrasi analit dan terlihat dari koefisien korelasinya ≤ 1 . Data selengkapnya mengenai pengukuran luas area larutan baku akrilamida dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada (Tabel II dan Gambar 3).

Tabel II. Kurva kalibrasi akrilamida pembanding dari berbagai konsentrasi

No.	Konsentrasi (ppm)	Waktu retensi (t_R)	Luas area (nm)
1.	10	6,866	3144434
2.	20	6,837	6284064
3.	30	6,857	9307450
4.	40	6,802	12272010
5.	50	6,861	14838501



Gambar 3. Grafik hubungan luas area dengan konsentrasi dari akrilamida.

Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi akrilamida merupakan salah satu syarat untuk validasi metode analisis. Batas deteksi (BD) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantitasi. Batas kuantitasi (BK) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dalam presisi dan akurasi yang dapat diterima kondisi operasional metode yang digunakan. Pada analisis kuantitatif konsentrasi pengukuran harus berada diatas batas deteksi dan batas kuantitasi. Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dapat ditentukan dari persamaan regresi dan standar deviasi

(simpangan baku). Pada penelitian ini, akrilamida didalam sampel kopi bubuk memiliki nilai batas deteksi 1,9901 µg/mL dan batas kuantifikasi 6,6337 µg/mL sehingga dapat ditentukan dalam akurasi dan presisi.

Uji Presisi

Uji presisi (keseksamaan) merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama. Konsep presisi diukur dengan simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (% RSD). Keterulangan (*repeatability*) merupakan penilaian terhadap ketepatan pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orang, peralatan, tempat maupun waktunya. Pengujian ini untuk menilai keterulangan yang dilakukan dengan mengukur sebanyak 6 kali pengulangan pada konsentrasi 30 µg/mL. Dari hasil uji presisi yang didapatkan pada konsentrasi 30 µg/mL ini memberikan nilai koefisien variasi atau simpangan baku relatif kurang dari 1 % yaitu sebesar 0,213 %. Data selengkapnya pada (Tabel III). Hasil uji presisi yang didapatkan sudah menunjukkan nilai RSD yang sangat teliti, hal tersebut terlihat dari nilai RSD yang diperoleh ≤ 1 %.

Tabel III. Data hasil uji presisi (*repeatability*) akrilamida konsentrasi 30 µg/mL enam kali pengulangan.

No.	Konsentrasi (µg/mL)	x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	30	9302120	-21786	474629796
2	30	9311014	-12892	166203664
3	30	9346601	22695	515063025
4	30	9348794	24888	619412544
5	30	9315682	-8224	67634176
6	30	9319223	-4683	21930489
Σ		55943434	-2	1864873694
$\bar{x}$		9323906	-0,33	310812282
SD			19312,55	
% RSD			0,207	

Uji Akurasi (% Perolehan Kembali)

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali akrilamida yang ditambahkan. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan. Uji akurasi dilakukan dengan metode simulasi (*spiked placebo recovery*) yaitu dengan cara menambahkan sejumlah larutan baku akrilamida ke dalam sampel kopi bubuk yang tidak mengandung akrilamida, kemudian sampel kopi bubuk tersebut dianalisis dan dibandingkan dengan kadar akrilamida yang ditambahkan. Konsentrasi baku akrilamida yang ditambahkan adalah 10 mg ke dalam 2,2 g kopi bubuk tradisional dan kopi bubuk luwak lalu diekstraksi dengan cara yang sama seperti pembuatan larutan sampel. Masing-masing diinjeksikan sebanyak 20 µL pada sistem KCKT dan dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian dihitung nilai perolehan kembali baku pembanding yang ditambahkan pada larutan uji dinyatakan dengan % perolehan kembali. Didapatkan rata-rata % perolehan kembali pada kopi bubuk tradisional dan kopi

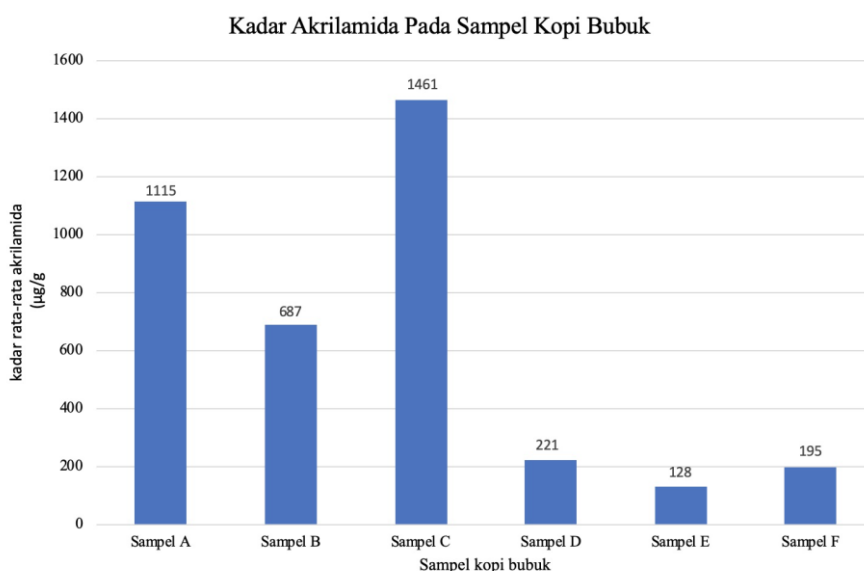
bubuk luwak masing-masing sebesar 99 % dan 104 % pada (Tabel IV dan Tabel V). Hasil yang didapat telah memenuhi kriteria validasi metode analisis yaitu berada pada rentang 85 % - 110 %.

Tabel IV. Data uji akurasi (% perolehan kembali) akrilamida dalam sampel kopi bubuk A(tradisional) dan D (Luwak)

Sampel	Kadar yang ditambahkan (mg)	Luas Area (nm)	Kadar akrilamida setelah penambahan standar (mg)	% perolehan kembali akrilamida	Rata-rata % perolehan kembali akrilamida
kopi bubuk A(tradisional)	10 mg	73045611	9.8976	98 %	99 %
		73081422	9.9028	99 %	
		74014123	10,0296	100 %	
kopi bubuk D (Luwak)	10 mg	70131226	9,5008	95 %	104 %
		79943221	10,8368	108 %	
		81343411	11,0276	110 %	

Penetapan Kadar Akrilamida Pada Kopi Bubuk Tradisional dan Kopi Bubuk Luwak

Kadar akrilamida dalam enam sampel kopi bubuk (tiga kopi bubuk tradisional dan tiga kopi bubuk luwak) terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kadar akrilamida pada enam sampel kopi bubuk

World Health Organization (WHO) menyatakan rata-rata asupan akrilamida melalui makanan yang dapat ditoleransi berada pada rentang 0,3-0,8 µg/kg BB/hari. Jika diasumsikan

berat rata-rata perempuan dan laki-laki dewasa sekitar 60 kg, maka asupan akrilamida yang diperbolehkan adalah 18–48 µg setiap harinya.

Umumnya seseorang minum kopi sebanyak 1-3 cangkir per hari, jika berat kopi bubuk dalam 1 sendok makan adalah 5 g, maka kadar akrilamida dalam satu cangkir kopi berkisar antara 640–7305 µg (Fuferti, *et al*, 2013). Berdasarkan data tersebut, maka kadar akrilamida yang diperoleh dari masing-masing kopi dapat dikatakan sangat tidak aman untuk dikonsumsi hingga 15 g dalam sehari (1920 - 21915 µg) pada orang dewasa (World Health Organization, 2002).

Pada Gambar 4 menunjukkan kadar akrilamida tertinggi terdapat pada sampel kopi bubuk tradisional C sebesar $1461 \pm 63,89$ µg/g, sedangkan kadar akrilamida terendah terdapat pada sampel kopi bubuk luwak E sebesar $128 \pm 3,24$ µg/g. Rendahnya kadar akrilamida pada kopi bubuk luwak mungkin terjadi karena proses fermentasi alami didalam pencernaan hewan luwak. Sekresi endogen pencernaan hewan luwak itu meresap ke dalam biji kopi. Sekresi dari bakteri proteolitik dengan bantuan enzim pepsin dan tripsin yang memecah kandungan protein pada biji kopi. Hasilnya peptida dan asam amino bebas menjadi berkurang. Perubahan jumlah protein dan asam amino bebas tersebut menghasilkan rasa yang unik pada kopi bubuk luwak. Sementara itu, proses pengolahan biji kopi berupa penyangraian pada suhu tinggi dalam waktu yang lama juga menghasilkan kadar akrilamida yang rendah melalui reaksi-reaksi pencoklatan atau reaksi Maillard (Marcone, 2004).

Ada beberapa faktor yang memungkinkan terjadinya peningkatan kadar akrilamida dalam sampel kopi bubuk antara lain adalah tergantung banyaknya senyawa prekursor akrilamida yang terdapat pada masing-masing kopi bubuk dimana jumlah asam amino dan gula pereduksi bervariasi tergantung dari jenis kopi sehingga konsentrasi akrilamida setelah pemanggangan dapat berbeda. Waktu dan suhu penyangraian berpengaruh terhadap pembentukan akrilamida dimana semakin cepat proses penyangraian dan semakin rendah suhu maka kadar akrilamida yang ditemukan semakin tinggi (Gandjar and Rohman, 2007).

SIMPULAN

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

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Padang yang telah memfasilitasi dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Belitz, H. D. and Grosch, W. 1987. Food Chemistry: Coffee, Tea, Cocoa. *Food Chemistry*. 3 (1): 23–28.

Brown, L., Rhead, M. M. and Bancroft, K. C. C. 1982. Rapid Screening Technique Utilising High Performance Liquid Chromatography for Assessing Acrylamide Contamination in

Effluents. *Analyst*. 10 (7): 749–754.

Can, N. O. and Arli, G. 2014. Analysis of acrylamide in traditional and nontraditional foods in turkey using HPLC-DAD with SPE cleanup. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 37 (6): 850–863.

Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide a review. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 51 (1): 4504–4526.

Fuferti, M. A. Z., Syakbaniah and Ratnawulan. 2013. Perbandingan karakteristik fisis kopi luwak (Civet coffee) dan kopi biasa jenis Arabica. *Pillar of Physics*. 2 (1): 68–75.

Gandjar, I. G. and Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Leung, R. W. M., Pandey, R. N. and Das, B. S. 1987. Determination of Polyacrylamides in Coal Washery Effluents by Ultrafiltration/Size-Exclusion Chromatography-Ultraviolet Detection Techniques. *Environmental Science Technology*. 21 (5): 476–481.

Lingnert, H. et al. 2002. Acrylamide in food: Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. *Scandinavian Journal of Nutrition*. 46 (4): 159–172.

Marcone, M. 2004. Composition and properties of Indonesian palm Civet coffee (kopi luwak) and ethiopian Civet coffee. *Food Research International*. 37 (1): 901–912.

Najiyati, S. and Danarti .2004. *Kopi: Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Prabowo, M. H., Wibowo, A. and Yuliani, F. 2012. Identifikasi dan analisis akrilamida dalam kopi serbuk (tubruk) dan kopi instan dengan metode Kromatografi cair kinerja tinggi. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 9 (1): 13–24.

Rahardjo, P. 2017. *Berkebun Kopi*. Jakarta: Penebar Swadaya.

SNI .2004. *Kopi Bubuk*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.

Towaha, J. and Tjahjana, B. E. 2015. Kopi luwak budidaya sebagai diversifikasi produk yang mempunyai citarasa khas. *Jurnal SIRINOV*. 3 (1): 19–30.

WHO . 2002. *Health Implication of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation*. Geneve: World Health Organization.