

Analisis 3-Monokloro-1,2-Propanadiol (3-MCPD) Ester dalam Minyak Sawit dengan Instrumen Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

(Analysis of 3-Monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) Esters in Palm Oil Using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Instrument (GC-MS))

Hanifah Nuryani Lioe*, Nancy Dewi Yuliana, Dias Indrasti, Yane Regiyana, Cony Arisya Putri

(Diterima Agustus 2014/Disetujui Juli 2015)

ABSTRAK

Senyawa kontaminan 3-monokloropropana-1,2-diol (3-MCPD) ester telah ditemukan dalam minyak goreng khususnya minyak sawit. Analisis senyawa ini memerlukan instrumen kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) untuk dapat mendeteksi hingga level bagian per miliar (ppb). Analisis senyawa 3-MCPD ester dalam minyak sawit dengan GC-MS memakai penderivasasi asam fenil boronat (PBA) dan standar internal 3-MCPD-D₅ yang dilaporkan oleh Weißhaar (2008). Penelitian ini diawali dari validasi metode dan dilanjutkan dengan analisis pada sampel minyak goreng sawit komersial. Hasil penelitian menunjukkan unjuk kerja instrumen GC-MS yang digunakan: linieritas instrumen pada rentang konsentrasi 3-MCPD 0,25–7,50 µg/mL larutan uji mempunyai nilai R² yang memenuhi kriteria (R² lebih dari 0,990 menurut AOAC 2012), uji dilakukan pada konsentrasi standar internal 3-MCPD-D₅ sama 2,0 µg/mL larutan. Presisi waktu retensi senyawa 3-MCPD dan 3-MCPD-D₅ juga memenuhi keterterimaan RSD (kurang dari 2,0%). LOD dan LOQ instrumen yang terbaca pada GC-MS, yaitu 0,17 dan 0,59 µg/mL. Pengujian linieritas metode dengan menggunakan matriks minyak sawit juga dihasilkan linearitas yang baik dengan R² lebih dari 0,990. Hasil uji rekoveri pada konsentrasi sedang (40 µg/g sampel minyak sawit) menunjukkan akurasi sebesar 83,29 ± 7,12% yang nilainya masuk dalam batas persyaratan AOAC (80–110%). Presisi metode pun menunjukkan nilai yang diterima, yaitu 5,38% (kurang dari RSD_{HORWITZ}). Pengukuran 14 sampel minyak goreng sawit yang terdapat di pasaran menunjukkan 100% sampel minyak sawit positif mengandung 3-MCPD ester pada kisaran 8,15–58,14 µg/g sampel.

Kata kunci: 3-MCPD ester, asam fenil boronat, derivatisasi 3-MCPD, GC-MS, minyak sawit

ABSTRACT

A group of components called as 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters has been found in some vegetable oils, particularly palm oil. Analysis of these components needs GC-MS instrument to reach a low level detection, parts per billion or ppb level. An effort to validate the 3-MCPD esters analysis by GC-MS method (Weißhaar method) using phenyl boronic acid (PBA) as a derivatizing agent and isotopic internal standard (IS) 3-MCPD-D₅ followed by the determination of 3-MCPD in commercial palm oils has been conducted. The analytical results showed the instrumental performance as follows: instrument linearity for the analysis of 3-MCPD standard solutions containing IS 2.0 µg/mL was obtained at a concentration range of 0.25–7.50 µg/mL test solution with R² higher than 0.990, precision of 3-MCPD as well as IS retention time was less than 2.0% which was acceptable according to JECFA guidance. Instrument detection limit (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were read from GC-MS based on the linearity experiment, i.e. 0.17 and 0.59 µg/mL solution, respectively. Method linearity by using palm oil as a matrix also showed R² higher than 0.990. Recovery test result at 40 µg/g gave an accuracy at 83.29 ± 7.12% which is in the range of AOAC standard (80–110%) and precision at 5.38% (less than RSD_{HORWITZ}). Analysis of 14 palm oils from local market showed 100% of the samples were positive to contain 3-MCPD esters. 3-MCPD esters in palm oil were found at a concentration range of 8.15–58.14 µg 3-MCPD/g sample.

Keywords: 3-MCPD derivatization, 3-MCPD esters, GC-MS, palm oil, phenylboronic acid

PENDAHULUAN

Minyak goreng telah diteliti mengandung senyawa 3-monokloro-1,2-propanadiol (3-MCPD) dalam bentuk ester yang merupakan senyawa kontaminan (Seefelder *et al.* 2008). Analisis 3-MCPD ester pada

minyak sawit yang dominan dikonsumsi masyarakat Indonesia sangat penting untuk dilakukan mengingat senyawa ini merupakan prekursor pembentukan 3-MCPD yang telah terbukti sebagai senyawa karsinogen pada hewan percobaan (Cho *et al.* 2008). Konsumsi minyak goreng yang mengandung 3-MCPD ester secara tidak langsung meningkatkan potensi paparan 3-MCPD dalam tubuh (Schilter *et al.* 2011). Studi terbaru menunjukkan bahwa pada minyak, senyawa ini terutama terbentuk selama pemrosesan pada suhu tinggi, yaitu proses deodorisasi (Hamlet *et*

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

* Penulis Korespondensi: E-mail: hanilioe@hotmail.com

al. 2011). Hingga kini belum ada nilai *tolerable daily intake* (TDI) maksimum untuk 3-MCPD ester dalam minyak, namun 3-MCPD ester tetap menjadi perhatian untuk industri minyak dan lemak. Saat ini diketahui nilai *tolerable daily intake* (TDI) maksimum terbaru untuk 3-MCPD, yaitu 7 µg/kg berat badan (Rietjens *et al.* 2012). Peraturan mengenai jumlah maksimum 3-MCPD dalam makanan belum ada di Indonesia maupun di dunia, akan tetapi negara Eropa telah mengatur jumlahnya dalam *ingredient* protein hidrolisat (HVP) dan kecap kedelai, yaitu sebesar 20 µg/kg atau 20 ppb (apabila produk cair berdasarkan 40% basis kering) (EC No 1881/2006).

Validasi metode analisis diperlukan apabila metode yang digunakan bukan termasuk metode standar. Telah banyak metode analisis 3-MCPD ester yang telah dikembangkan. Salah satu metode yang banyak digunakan adalah metode pengukuran tidak langsung 3-MCPD ester dengan menggunakan kromatografi gas spektroskopi massa (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*). Analisis dilakukan dengan menggunakan transesterifikasi basa (NaOCH₃ atau sodium metoksida) dan penderivat berupa larutan *phenylboronic acid* atau asam fenil boronat (PBA) sebagaimana dilaporkan oleh Weiβhaar (2008), BfR (2011), dan Hamlet *et al.* (2011).

Tujuan umum dari penelitian ini adalah melakukan evaluasi kandungan 3-MCPD ester dalam sampel minyak goreng sawit yang terdapat di pasaran dengan metode analisis 3-MCPD ester menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS), modifikasi dari metode Weiβhaar (2008) oleh Lanovia *et al.* (2014), yang divalidasi lebih lanjut dalam penelitian ini. Validasi metode analisis terdiri dari uji unjuk kerja alat, uji linearitas instrumen, limit deteksi atau *limit of detection* (LOD), limit kuantitasi atau *limit of quantitation* (LOQ), uji rekoveri (akurasi), rpitabilitas (presisi), dan linieritas metode. Minyak sawit terpilih sebagai sampel yang dianalisis karena dalam beberapa penelitian kandungan 3-MCPD ester tertinggi pada minyak goreng ditemukan dalam minyak sawit (Hamlet & Sadd 2004; Svejkovska *et al.* 2004; Zelinkova *et al.* 2006).

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel minyak sawit komersial. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisis meliputi standar internal 3-MCPD-D₅ 1 mg/mL dari Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Amerika Serikat) dan 3-MCPD dari Sigma Aldrich Chemie GmbH (Jerman) dengan kemurnian > 98%, serta *methyl tertiary-butyl ether* (MTBE), etil asetat, sodium metoksida (NaOCH₃), asam asetat glasial, *phenylboronic acid* atau asam fenil boronat (PBA), aseton, n-heksana, NaCl semuanya dengan kualitas *pro analysis* dari Merck (Jerman), dan Milli-Q akuades (air bebas ion).

Alat-alat untuk analisis meliputi tabung reaksi tutup ulir, gelas piala, pipet volumetrik, pipet Mohr, pipet tetes, mikropipet, vortex, vial, botol waste, botol semprot, timbangan, pengaduk kaca, sudip, dan penangas air. Instrumen analisis yang digunakan adalah *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS) dengan *Single Quadrupole model* QP 2010 merek Shimadzu (Jepang) milik Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor.

Uji Unjuk Kerja Instrumen GC-MS

• Persiapan Larutan Standar

Larutan standar yang digunakan pada uji unjuk kerja instrumen dibuat dengan mencampurkan larutan 3-MCPD dan standar internal 3-MCPD-D₅. Konsentrasi larutan 3-MCPD dan standar internal 3-MCPD-D₅ yang digunakan merupakan konsentrasi yang dapat diamati peak-peaknya dengan GC-MS. Larutan stok standar 3-MCPD dibuat dari 3-MCPD cair kemurnian 98% dengan konsentrasi 1 mg/mL atau 1000 µg/mL dalam etil asetat, selanjutnya larutan diencerkan 100 kali (2 tahap, masing-masing tahap 10 kali pengenceran) menjadi larutan kerja konsentrasi 10 µg/mL dengan etil asetat. Larutan stok 3-MCPD-D₅ konsentrasi 1 mg/mL diencerkan 100 kali (2 tahap) menjadi larutan kerja 10 µg/mL dengan etil asetat.

• Uji Unjuk Kerja Instrumen

Uji unjuk kerja instrumen meliputi uji linieritas alat dan limit deteksi alat serta uji presisi waktu retensi. Uji linieritas alat dilakukan dengan menginjeksikan lima vial larutan standar 3-MCPD yang konsentrasinya berbeda-beda. Konsentrasi 3-MCPD yang digunakan, yaitu 0,25, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, dan 7,50 µg/mL larutan uji. Pembuatan larutan standar dilakukan dengan mencampurkan larutan 3-MCPD sebanyak 100 µL dan 2 µg standar internal 3-MCPD-D₅ (dimodifikasi dari 5 µg menurut Lanovia *et al.* 2014). Campuran kemudian diderivatisasi dengan 250 µL reagen PBA. Larutan selanjutnya dimasukkan pada penangas air yang bersuhu 80 °C selama 20 menit. Setelah didinginkan larutan diekstrak dengan 2 x 0,5 mL heksana (dimodifikasi dari 1 x 3 mL menurut Lanovia *et al.* 2014). Larutan uji yang diperoleh kemudian diinjeksikan ke instrumen GC-MS.

Hasil pengukuran GC-MS berupa kromatogram, yang di dalamnya mencakup hasil luas area dan waktu retensi. Hasil pembacaan GC-MS selanjutnya digunakan untuk pembuatan kurva standar hubungan antara rasio luas area 3-MCPD dengan 3-MCPD-D₅ (sebagai sumbu y) dan konsentrasi larutan standar (µg/mL) (sebagai sumbu x). Melalui kurva yang telah dibuat dapat diketahui persamaan linier dan nilai koefisien determinasinya (R²). Linieritas dianggap baik apabila memiliki R² lebih dari 0,990. Waktu retensi dari berbagai kromatogram (konsentrasi berbeda) dirata-ratakan serta dihitung standar deviasi (SD) dan *relative standard deviation* (RSD). Keberterimaan RSD waktu retensi adalah < 2,0% (JECFA 2006).

Limit deteksi instrumen (LOD) diketahui setelah dilakukan uji linieritas instrumen, nilai LOD langsung dibaca dari nilai yang ditunjukkan oleh instrumen GC-MS. Selanjutnya limit kuantifikasi instrumen (LOQ) diketahui setelah nilai LOD dikali dengan rasio 10/3 (EURACHEM 2014).

Akurasi dan Presisi dengan Uji Rekoveri

Pengujian dilakukan dengan menggunakan sampel yang di-*spike* dengan 3-MCPD pada tiga konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi *spiking* yang digunakan adalah konsentrasi 40 ppm atau 40 µg/g sampel yang mendekati konsentrasi yang ditemukan pada sampel minyak goreng umumnya. Persiapan larutan sampel uji dapat dilihat pada prosedur baku bagian C. Pengujian dilakukan sebanyak tujuh ulangan. Persen rekoveri menentukan akurasi dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Rekoveri (\%)} = \frac{\text{Konsentrasi sampel yang di-}spike\text{-konsentrasi sampel tanpa }spike}{\text{Konsentrasi 3-MCPD yang di-}spike} \times 100\%$$

Keberterimaan persen rekoveri mengacu pada AOAC (2012). Nilai RSD analisisnya menunjukkan presisi. Keberterimaan RSD ditentukan dengan membandingkan nilai RSD analisis dengan RSD_{Horwitz}. Presisi yang baik memiliki nilai RSD_H yang lebih rendah dari RSD hasil analisis. Nilai RSD_{Horwitz} (RSD_H) dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{RSD}_H = [2 \exp(1 - 0,5 \log C)]$$

Keterangan: C = Nilai rata-rata konsentrasi analat (dalam bentuk fraksi)

Selain presisi di atas, yang merupakan repeatabilitas metode, presisi juga dapat diketahui dari percobaan reproduksibilitas intralab atau reproduksibilitas intermediet. Reproduksibilitas intralab diuji dengan cara melakukan analisis pada sampel yang sama, tetapi dilakukan pada waktu (bulan) yang berbeda. Dalam penelitian ini reproduksibilitas intralab diuji dalam 3 bulan, selanjutnya hasil 3-MCPD ester yang terbaca dari pengukuran pada bulan yang berbeda tersebut diolah datanya untuk mendapatkan nilai RSD analisis. RSD ini menunjukkan nilai reproduksibilitas intralab.

Linieritas Metode

Pengujian linieritas metode analisis 3-MCPD total dilakukan dengan menginjeksikan sampel yang di-*spike* dengan larutan standar 3-MCPD. Larutan standar 3-MCPD yang ditambahkan, yaitu berkisar pada rentang 0–60 µg/g sampel. Pengujian dilakukan dengan dua kali ulangan analisis. Pembuatan larutan dilakukan dengan mengikuti prosedur yang terdapat pada bagian C.

Hasil pembacaan GC-MS selanjutnya diplotkan pada kurva hubungan antara rasio luas area 3-MCPD dengan 3-MCPD-D₅ (sebagai sumbu y) dan konsentrasi larutan standar (µg/g sampel) (sebagai

sumbu x). Melalui kurva yang telah dibuat dapat diketahui persamaan linier dan nilai korelasinya (R²). Linieritas metode dianggap baik apabila memiliki R² lebih dari 0,990.

Analisis 3-MCPD Ester dalam Minyak Sawit Komersial

Analisis 3-MCPD ester terhadap minyak goreng sawit komersial yang dipasarkan di pasar/warung, minimarket, dan supermarket dengan berbagai merek dagang dilakukan dengan menggunakan metode hasil validasi di atas. Analisis dilakukan sebanyak satu ulangan pada setiap sampel.

Jumlah sampel yang dianalisis sebanyak 14 sampel, yaitu 4 sampel diperoleh dari pasar/warung, 5 sampel dari minimarket, dan 5 sampel dari supermarket. Hasil analisis kemudian diolah dengan statistik sederhana, berupa nilai rata-rata dan standar deviasi menggunakan Microsoft Excel 2011.

Prosedur Analisis 3-MCPD Ester pada Minyak Sawit (Modifikasi dari Metode Weißhaar 2008, yang Dimodifikasi Lanovia *et al.* 2014)

Sampel minyak goreng sebanyak 100 ± 5 mg dimasukkan ke dalam tabung kaca 10 mL bertutup. Ke dalam vial tersebut kemudian ditambahkan 0,5 mL MTBE – etil asetat (8:2 v/v) dan 2 µg larutan standar internal 3-MCPD-D₅ (atau 2 µg/mL dalam larutan akhir setelah derivatisasi atau larutan uji), yaitu diambil dari 200 µL larutan dari larutan kerja 10 µg/mL 3-MCPD-D₅, jumlah standar internal ini dimodifikasi dari 5 µg menurut Lanovia *et al.* 2014 atau 1,3 µg/mL dalam larutan uji. Larutan yang telah dicampurkan tersebut dibiarkan pada suhu ruang selama 2 jam. Ke dalam tabung kemudian ditambahkan 1 mL NaOCH₃ (0,5 mol/L dalam metanol HPLC grade) yang selanjutnya didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 3 mL heksana, 0,1 mL asam asetat glasial, dan 3 mL NaCl (200 g/L). Setelah dilakukan homogenisasi campuran dipisahkan dengan lapisan organik. Pada lapisan air ditambahkan 3 mL n-heksana, yang kemudian dibuang lapisan organiknya kembali setelah dilakukan homogenisasi. Pengukuran 3-MCPD bebas juga dilakukan, caranya sama hanya tidak melalui penambahan NaOCH₃ (sodium metoksida) saat proses preparasi sampel.

Hasil ekstrak (3 mL) yang diperoleh kemudian diderivatisasi dengan PBA (5 g PBA dalam 20 mL pelarut (aseton:air 19:1)) sebanyak 250 µL dan dipanaskan dalam penangas air bersuhu 80 °C selama 20 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, derivat 3-MCPD diekstraksi dengan 2 x 0,5 mL heksana (dimodifikasi dari 1 x 3 mL menurut Lanovia *et al.* 2014). Setelah dilakukan ekstraksi pisahkan bagian heksana. Larutan uji ini siap diinjeksikan pada instrumen GC-MS. Sebelum dilakukan analisis dilakukan persiapan instrumen GC-MS yang dapat dilihat pada Tabel 1. Nilai kadar 3-MCPD ester pada minyak dihitung sebagai selisih total 3-MCPD dan 3-MCPD bebas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prinsip dasar analisis 3-MCPD ester, yaitu mengkuantifikasi 3-MCPD bebas hasil transesterifikasi 3-MCPD ester oleh sodium metoksida (NaOCH_3). Senyawa 3-MCPD bebas selanjutnya diderivatisasi menggunakan asam fenil boronat (PBA). Pemilihan senyawa PBA karena senyawa ini dapat bereaksi secara spesifik dengan senyawa diol, membentuk senyawa turunan nonpolar siklik. Hasil derivatisasi ini mudah diekstrak dengan pelarut nonpolar seperti heksana sehingga dapat langsung diinjeksikan ke instrumen GC-MS. Analisis 3-MCPD ester dalam minyak goreng telah divalidasi oleh Weiβhaar (2008) dan selanjutnya modifikasi metodenya divalidasi oleh Lanovia *et al.* (2014). Akan tetapi metode yang telah divalidasi Lanovia *et al.* (2014) dimodifikasi lebih lanjut dalam penelitian ini, baik pada penggunaan jumlah isotop 3-MCPD- D_5 sebagai standar internal dan volume pelarut pengekstrak setelah derivatisasi pada persiapan sampel, maupun kondisi GC-MS yang diterapkan. Hasil validasi dari metode ini disampaikan

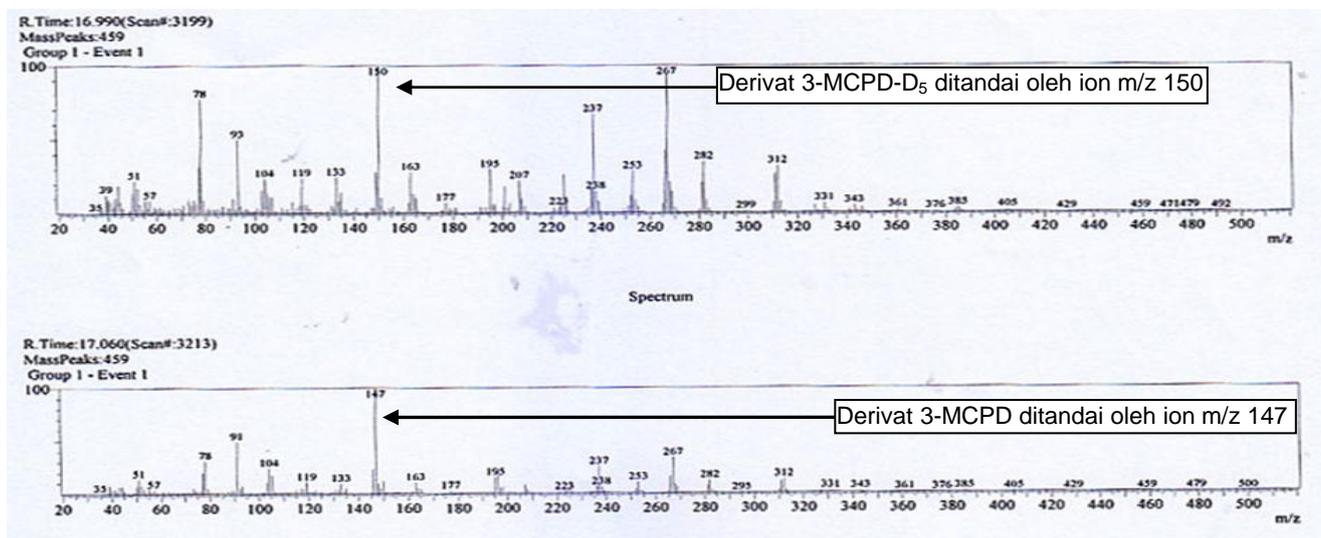
di bawah ini. Selanjutnya metode yang telah divalidasi digunakan untuk mengevaluasi kandungan 3-MCPD ester dalam minyak sawit komersial.

Unjuk Kerja Instrumen GC-MS

Unjuk Kerja instrumen GC-MS dilakukan dengan menentukan linieritas kurva, LOD/LOQ instrumen serta presisi instrumen. Sebelum dilakukan uji unjuk kerja instrumen, dilakukan uji coba untuk melihat waktu retensi serta profil kromatogram dari 3-MCPD dan standar internalnya 3-MCPD- D_5 . Hasil uji pendahuluan tersebut menunjukkan waktu retensi dari 3-MCPD berkisar pada menit ke-17,0 dan senyawa 3-MCPD- D_5 muncul pada menit ke-16,9. Meskipun memiliki waktu retensi yang berdekatan, profil kromatogram menunjukkan senyawa 3-MCPD dan 3-MCPD- D_5 dapat membentuk *peak* yang terpisah. Analisis kuantitatif 3-MCPD dilakukan dengan menggunakan ion m/z 147, sedangkan ion m/z 150 pada pengukuran 3-MCPD- D_5 . Hasil spektrum menunjukkan keduanya merupakan *base peak*. Spektra massa keduanya dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1 Kondisi Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) untuk analisis 3-MCPD ester yang diderivatisasi dengan PBA. Kondisi ini dimodifikasi, berbeda dari metode Weiβhaar yang dimodifikasi lebih lanjut oleh Lanovia *et al.* (2014)

Parameter penggunaan GC-MS	Pengaturan
Kolom	Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm ID, tebal film 0,25 μm
Temperatur injektor	180 °C
Temperatur oven	60 °C (1 menit), 190 °C laju 6 °C/menit (1 menit), 260 °C laju 30 °C/menit (5 menit).
Mode injeksi	<i>splitless</i>
Gas pembawa	Helium dari kualitas UHP (<i>ultra high purity</i>)
Aliran kolom	1,61 mL/menit
Volume penyuntikan	1 μL
Mode ionisasi	<i>Electron Impact (EI)</i>
Temperatur <i>interface</i>	260 °C
Temperatur <i>Ion source</i>	230 °C
Mode <i>acquisition</i>	<i>Selected Ion Monitoring (SIM)</i>
m/z (kualitatif)	91,196 (derivat 3-MCPD) 93,201 (derivat 3-MCPD- D_5)
m/z (kuantitatif)	147 (derivat 3-MCPD) 150 (derivat 3-MCPD- D_5)



Gambar 1 Spektra massa senyawa derivat asam fenil boronat (PBA) dari senyawa 3-MCPD dan standar internal 3-MCPD- D_5 yang diperoleh dari analisis menggunakan GC-MS.

Profil kromatogram linieritas unjuk kerja instrumen disajikan pada Gambar 2. Hasil kromatogram berupa luas area 3-MCPD dan 3-MCPD-D₅ dirasioakan dan diplotkan pada sumbu y dengan konsentrasi 3-MCPD yang diukur. Konsentrasi 3-MCPD yang dicoba berada pada range 0,25–7,50 µg/mL larutan uji, sedangkan konsentrasi 3-MCPD-D₅ tetap 2,0 µg/mL. Kurva linieritas instrumen hasil penelitian ini memiliki persamaan $y = 0,5306x - 0,0614$ dengan nilai $R^2 = 0,9997$. Kurva telah memenuhi syarat kriteria linieritas instrumen, yaitu nilai R^2 lebih dari 0,990 (AOAC 2012). Nilai koefisien korelasi (R) merupakan suatu parameter linieritas yang menunjukkan proporsionalitas respons terhadap konsentrasi yang diujikan (Novelina *et al.* 2009). Kurva linieritas instrumen GC-MS pada analisis 3-MCPD menunjukkan semakin besar konsentrasi 3-MCPD yang diuji, maka semakin besar rasio area 3-MCPD/3-MCPD-D₅ (Gambar 3).

Presisi instrumen diukur dengan menghitung RSD waktu retensi dari senyawa 3-MCPD dan 3-MCPD-D₅. Hasil menunjukkan RSD waktu retensi senyawa 3-MCPD dan 3-MCPD-D₅, yaitu 0,03%. Persyaratan presisi yang baik, yaitu bila nilai RSD <2,0% (JECFA 2006). Berdasarkan syarat tersebut RSD waktu retensi senyawa 3-MCPD maupun 3-MCPD-D₅ dapat diterima.

Limit deteksi instrumen (LDI) atau *Limit of Detection* (LOD) adalah jumlah analit terkecil yang masih dapat terdeteksi namun masih memberikan respons yang berbeda dibandingkan blanko (Harmita 2004). Nilai LOD instrumen yang terukur oleh alat GC-MS, yaitu 0,17 µg/mL. Limit kuantitasi (LOQ) merupakan batas terendah konsentrasi total 3-MCPD yang dapat dilaporkan, nilainya adalah 0,59 µg/mL, nilai di bawah konsentrasi ini dapat dikatakan 'tidak terdeteksi' (Harmita 2004). Hasil analisis unjuk kerja instrumen secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 2.

Linieritas Metode

Hasil pengujian menghasilkan kurva linieritas dengan persamaan $y = 0,0475x + 1.1546$ dan nilai $R^2 = 0,9950$. Persamaan kurva tersebut diperoleh dengan memplotkan rataan rasio derivat 3-MCPD/3-MCPD-D₅ dari dua kali ulangan analisis dengan konsentrasi 3-MCPD. Hasil uji linearitas metode secara rinci pada masing-masing ulangan disajikan pada Tabel 3.

Kurva linieritas metode yang diperoleh memiliki nilai korelasi R^2 yang sudah memenuhi kriteria persyaratan, yaitu nilai $R^2 > 0,990$ (AOAC 2012). Dengan demikian, metode yang digunakan memiliki linearitas yang baik, yaitu instrumen mampu menghasilkan kurva linieritas yang proporsional, semakin tinggi konsentrasi larutan standar 3-MCPD yang ditambahkan, maka akan semakin besar rasio area derivat 3-MCPD/3-MCPD-D₅ yang diperoleh.

Melalui percobaan yang telah dilakukan limit deteksi metode atau *method detection limit* (MDL) yang terbaca oleh GC-MS, yaitu 4,59 µg/g. Nilai MDL yang diperoleh ini lebih tinggi dibandingkan dengan

nilai LOQ instrumen, yaitu 0,59 µg/mL. Hal ini menunjukkan metode analisis memiliki tingkat sensitivitas yang lebih rendah saat mendeteksi senyawa derivat 3-MCPD dalam matriks sampel hingga pada konsentrasi 4,59 µg/g sampel.

Akurasi dan Presisi dari Uji Rekoveri

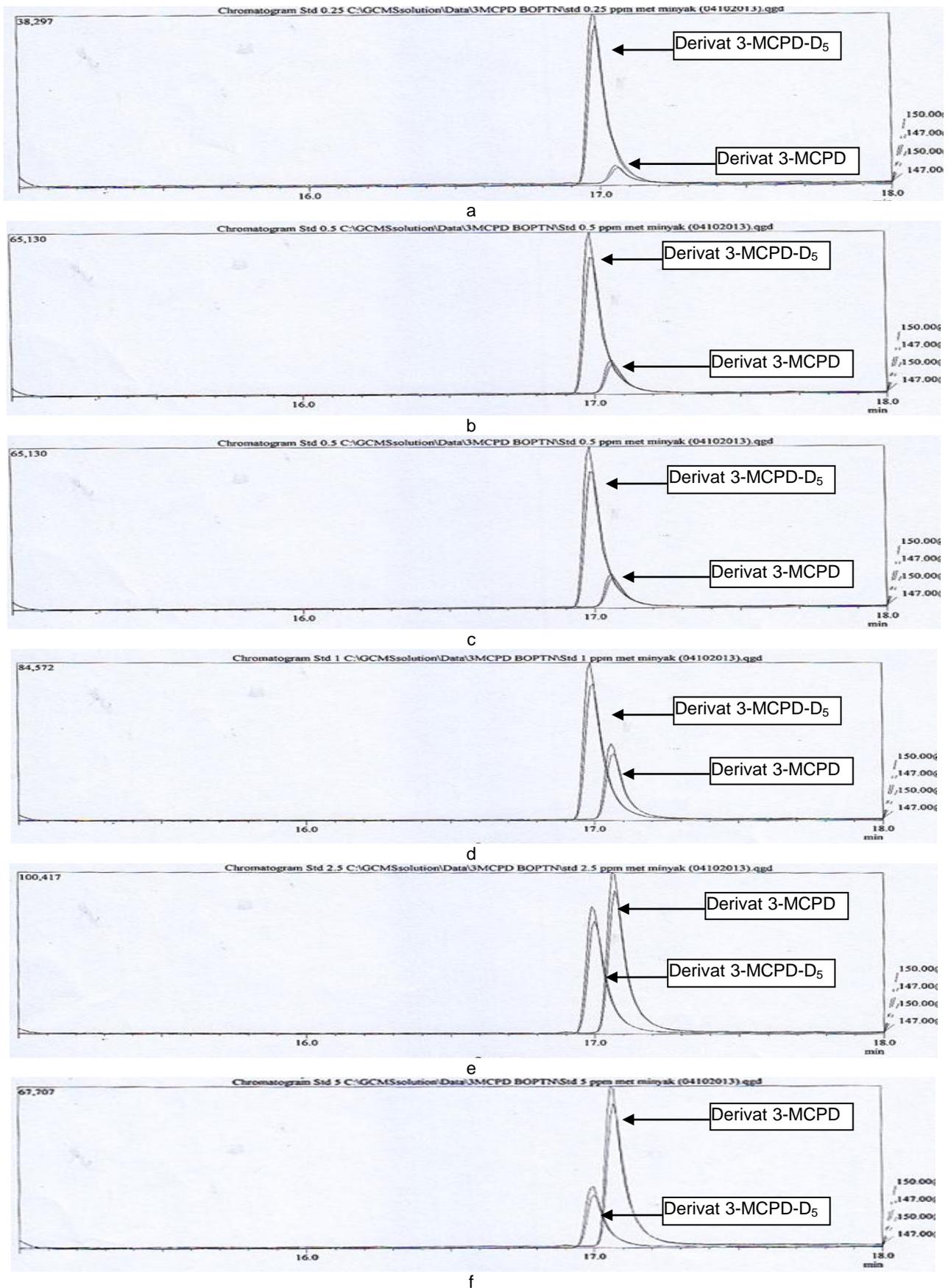
Akurasi menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya yang biasanya dinyatakan sebagai persen perolehan kembali atau rekoveri (Harmita 2004). Nilai rekoveri didapat dengan merasioakan konsentrasi 3-MCPD yang diperoleh kembali dengan konsentrasi yang sengaja ditambahkan. Konsentrasi 3-MCPD terukur yang diperoleh kembali didapat dari selisih antara konsentrasi 3-MCPD sampel dengan *spiking* dan konsentrasi 3-MCPD sampel tanpa *spiking*. Konsentrasi 3-MCPD yang di-*spike* dalam sampel minyak goreng, yaitu 40,00 µg/g. Konsentrasi 3-MCPD bebas dalam sampel minyak sawit yang menjadi matriks uji rekoveri, yaitu $0,80 \pm 0,06$ µg/g sampel, sedangkan konsentrasi 3-MCPD ester dalam sampel tersebut adalah $19,58 \pm 0,21$ µg/g sampel (2 ulangan analisis).

Nilai perolehan kembali (rekoveri) yang diperoleh memiliki rata-rata sebesar $83,29 \pm 7,12\%$ dengan rentang 77,89–96,49%. Uji Rekoveri yang telah dilakukan sebanyak tujuh kali pengulangan ini mendekati persyaratan AOAC (2012), yaitu 80–110%. Hal ini menunjukkan metode analisis memiliki akurasi yang baik. Hasil pengukuran rekoveri dapat dilihat pada Tabel 4. Bagaimanapun hasil validasi analisis 3-MCPD ester dari penelitian ini berbeda dengan hasil validasi yang dilaporkan oleh Lanovia *et al.* (2014) dengan instrumen yang sama, hasilnya berkisar pada 95,83–113,27%.

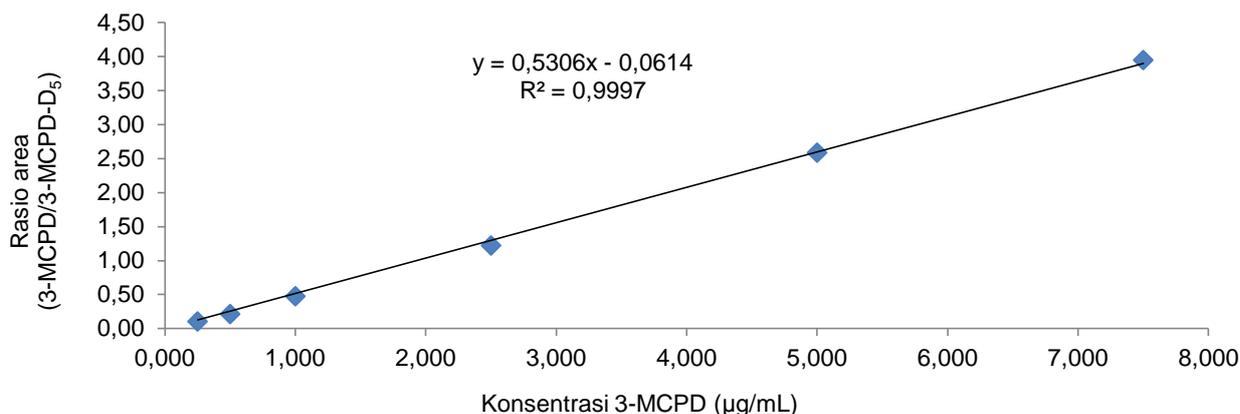
Presisi merupakan nilai yang menunjukkan derajat kedekatan di antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari pengujian beberapa sampel homogen dengan metode analisis yang sama. Ukuran ketelitian atau presisi dapat dilihat melalui parameter RSD hasil pengulangan. Bila nilai RSD analisis kurang dari $RSD_{HORWITZ}$ maka dapat dikatakan analisis yang dilakukan memiliki presisi yang baik atau telah memenuhi persyaratan. Hasil uji presisi analisis 3-MCPD ester pada minyak sawit dengan senyawa penderivasasi PBA yang diinjeksikan pada instrumen GC-MS dapat dilihat pada Tabel 4 yang ditunjukkan oleh nilai RSD analisis.

Hasil menunjukkan nilai RSD analisis sebesar 5,38%, di mana nilainya kurang dari $RSD_{HORWITZ}$ (8,80%). Hal ini menunjukkan analisis yang dilakukan memiliki presisi yang baik, yaitu variabilitas pengukuran yang dilakukan masih dapat diterima.

Hasil pengujian presisi dengan menggunakan minyak sawit yang sama tetapi diuji pada bulan yang berbeda (selama 3 bulan) memberikan nilai reproduktibilitas intralab atau reproduktibilitas intermedial sebesar 7,70%. Nilai RSD ini masih lebih kecil daripada nilai $RSD_{HORWITZ}$ (10,57%). Dengan demikian nilai reproduktibilitasnya pun dapat diterima.



Gambar 2 Kromatogram senyawa 3-MCPD dan 3-MCPD-D₅ pada konsentrasi 3-MCPD (A) 0,25 µg/mL; (B) 0,50 µg/mL; (C) 1,00 µg/mL; (D) 2,50 µg/mL; (E) 5,00 µg/mL; dan (F) 7,50 µg/mL larutan uji, sedangkan konsentrasi 3-MCPD-D₅ tetap 2,0 µg/mL larutan uji.



Gambar 3 Kurva linieritas instrumen analisis 3-MCPD dengan GC-MS.

Tabel 2 Unjuk kerja instrumen GC-MS untuk analisis 3-MCPD dengan menggunakan asam fenil boronat (PBA) sebagai penderivat dan 3-MCPD-D₅ sebagai standar internal

Parameter uji	Hasil	Ketentuan
Unjuk kerja instrumen		
Linieritas (y= ax + b)	y = 0,5306x – 0,0614 R ² = 0,9997	R ² > 0,990 (AOAC 2012)
Presisi instrumen	RSD waktu retensi 3-MCPD = 0,03% RSD waktu retensi 3-MCPD-D ₅ = 0,03%	RSD (%) < 2,0% (JECFA 2006)
LOD dan LOQ instrumen	LOD = 0,17 µg/mL LOQ = 0,59 µg/mL	

Tabel 3 Hasil uji linearitas metode analisis 3-MCPD ester pada matriks sampel minyak goreng sawit menggunakan instrumen GC-MS

Linearitas metode	Hasil		Persyaratan
	Ulangan 1	Ulangan 2	
Linearitas (y=ax+b)			
Rentang (µg/g)	0–60	0–60	
slope (a)	0,0536	0,0416	
intercept (b)	1,1314	1,1391	
coefficient of determination (R ²)	0,9953	0,9933	R ² >0,990

*AOAC (2012)

Tabel 4 Nilai persen perolehan kembali pada uji akurasi metode analisis 3-MCPD ester pada minyak sawit yang di-spike 3-MCPD sejumlah 40 µg/g sampel, analisis menggunakan instrumen GC-MS

Berat sampel (g)	Rasio area 3-MCPD/3-MCPD-D ₅	Konsentrasi (µg/mL)	Vol. akhir (mL)	Konsentrasi terukur (µg/g)	Rekoveri (%)
0,1071	3.031	5.8285	1	55,51	89,81
0,1012	2.625	5.0631	1	50,91	78,31
0,0997	2.630	5.0722	1	51,78	80,50
0,1021	2.640	5.0913	1	50,74	77,89
0,1024	2.662	5.1332	1	51,01	78,58
0,1037	2.757	5.3117	1	52,16	81,44
0,1024	3.036	5.8368	1	58,18	96,49
			Rata-Rata	52,90	83,29
			SD	2,85	7,12
			RSD analisis (%)	5,38	
			RSD _{HORWITZ} (%)	8,80	

Penetapan 3-MCPD Ester pada Minyak Sawit

Pengujian 3-MCPD ester dilakukan terhadap 15 (lima belas) sampel minyak goreng komersial terdiri dari 14 minyak sawit dan 1 minyak kelapa yang terdapat di pasaran, dibeli dari tiga tempat yang berbeda, yaitu pasar tradisional/warung, minimarket, dan supermarket. Sampel S2 merupakan minyak

goreng kelapa, dijadikan sebagai sampel minyak goreng pembanding. Hasil penetapan kadar 3-MCPD ester tercantum pada Tabel 5. Dalam tabel tersebut terlihat bahwa 100% sampel minyak goreng positif mengandung 3-MCPD dalam bentuk 3-MCPD ester.

Rentang konsentrasi 3-MCPD ester dalam minyak goreng sawit yang terukur pada penelitian ini, yaitu

Tabel 5 Kadar 3-MCPD ester dalam minyak goreng sawit yang diperoleh dari pasaran

Sampel minyak	3-MCPD Ester ($\mu\text{g/g}$)
S1 (minimarket)	17,01
S2 (minimarket)*	3,15
S3 (minimarket)	15,68
S4 (minimarket)	21,89
S5 (minimarket)	11,00
S6 (pasar/warung)	21,55
S7 (pasar/warung)	19,77
S8 (pasar/warung)	13,81
S9 (pasar/warung)	8,15
S10 (pasar/warung)	15,50
S11 (supermarket)	58,14
S12 (supermarket)	11,84
S13 (supermarket)	15,08
S14 (supermarket)	17,44
S15 (Supermarket)	30,33

*Sampel S2 merupakan minyak kelapa, sebagai pembanding untuk minyak sawit (14 sampel lainnya)

8,15–58,14 $\mu\text{g/g}$ minyak. Sampel yang diuji 100% positif mengandung 3-MCPD ester. 3-MCPD ester pada berbagai sampel minyak memiliki kadar yang bervariasi. Perbedaan sumber bahan baku buah sawit serta proses pengolahan minyak pada masing-masing perusahaan bisa saja menjadi faktor penyebabnya. Minyak goreng kelapa (sampel S2) dalam penelitian ini menunjukkan kandungan 3-MCPD ester yang relatif kecil dibandingkan semua sampel minyak goreng sawit.

Apabila dibandingkan dengan hasil analisis 3-MCPD ester dalam minyak goreng sawit komersial yang dilaporkan Lanovia *et al.* (2014), yaitu 13,94–33,92 $\mu\text{g/g}$ minyak, maka rentang hasil penelitian di atas masih mencakup hasil yang dilaporkan Lanovia *et al.* (2014). Meskipun beberapa minyak sawit komersial yang dianalisis Lanovia *et al.* (2014) kemungkinan berasal dari produsen yang sama dengan produsen minyak yang dianalisis dalam penelitian ini, karena sama-sama beredar di pasaran Indonesia. Sampel-sampel minyak sawit yang dianalisis Lanovia *et al.* (2014) tersebut berbeda batch produksinya dari sampel yang dianalisis dalam penelitian ini. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini serta hasil yang dilaporkan oleh Lanovia *et al.* (2014) menunjukkan nilai yang relatif besar apabila dibandingkan dengan kadar 3-MCPD ester dalam minyak goreng sawit yang beredar di negara tetangga (Malaysia), yang dilaporkan kurang dari 2,5 mg/kg atau 2,5 $\mu\text{g/g}$ (Razak *et al.* 2012).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka metode analisis 3-MCPD ester pada minyak sawit dengan penderivatisasi *phenyl boronic acid* atau asam fenil boronat (PBA) menggunakan instrumen GC-MS telah tervalidasi. Pengukuran 14 sampel minyak sawit yang terdapat di pasaran baik dari pasar tradisional-

/warung, minimarket, serta supermarket dengan metode tersebut menunjukkan 100% sampel positif mengandung 3-MCPD ester, pada kisaran 8,15–58,14 $\mu\text{g/g}$ minyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Nasional Republik Indonesia atas pemberian dana penelitian di bawah program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi: BOPTN Penelitian Dasar untuk Bagian dengan DIPA IPB SPK Nomor: 298/IT3.41.2/L2/SPK/2013. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Nuri Andarwulan yang mendorong penelitian ini menjadi penelitian dasar dalam Bagian Kimia, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Analytical Communities. 2012. AOAC Official Methods Of Analysis, Appendix K: Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Tersedia pada (Mei 2015): http://www.eoma.aoc.org/app_k.pdf
- [BfR] Federal Institute for Risk Assessment. 2011. Collaborative study for the determination of 3-MCPD-fatty acid esters in edible fats and oils. Berlin: Germany. Tersedia pada: <http://www.bfr.bund.de/cm/350/collaborative-study-for-the-determination-of-3-mcpd-fatty-acid-esters-in-edible-fats-and-oils.pdf>
- Cho W-S, Han BS, Nam KT, Park K, Choi M, Kim SH, Jeong J, Jang DD. 2008. Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 46(9): 3172–3177. <http://doi.org/dptx5q>
- EURACHEM. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. United Kingdom. Tersedia pada: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- Hamlet CG, Sadd PA. 2004. Chloropropanols and their esters in cereal products. *Czech Journal of Food Sciences*. 22: 259–262.
- Hamlet CG, Asuncion L, Velišek J, Doležal M, Zelinková Z, Crews C. 2011. Formation and occurrence of esters of 3-chloropropane-1,2-diol (3-CPD) in foods: What we know and what we assume. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113(3): 279–303. <http://doi.org/ckmzq8>

- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117–135.
- JECFA. 2006. Combined Compendium of Food Additives Specifications. Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications. Rome (IT): FAO. Tersedia pada: <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/a0691e00.HTM>.
- Lanovia T, Andarwulan N, Hariyadi P. 2014. Validasi modifikasi metode Weiβhaar untuk analisis 3-MCPD ester dalam minyak goreng sawit. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 25(2): 200–208.
- Novelina YM, Sutanto, Fatimah A. 2009. *Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Senyawa Siklamat Dalam Minuman Ringan*. Jakarta (ID): Prodising PPI Standardisasi 2009. Tersedia pada: http://lib.bsn.go.id/index.php?/mjlh_artikel/majalah/detail_simple/584
- Razak RAA, Kuntom A, Siew WL, Ibrahim NA, Ramli MR, Hussein R, Nesaretnam K. 2012. Detection and Monitoring of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) esters in cooking oils. *Food Control*. 25(1): 355–360. <http://doi.org/btctnk>
- Rietjens IMCM, Scholz G, Berg I, Schilter B, Slob W. 2012. Refined hazard characterization of 3-MCPD using benchmark dose modeling. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 114(10): 1140–1147.
- Schilter B, Scholz G, Seefelder W. 2011. Fatty acid esters of chloropropanols and related compounds in food: Toxicological aspects. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113(3): 309–313. <http://doi.org/c5s42q>
- Seefelder W, Varga N, Struder A, Williamson G, Scanlan FP, Stadler RH. 2008. Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: Significance in the formation of 3-MCPD. *Food Additives and Contaminants*. 25(4): 391–400. <http://doi.org/cngmv8>
- Svejkovska B, Novotny O, Divinová V, Reblova Z, Dolezal M, Velíšek J. 2004. Esters of 3-Chloropropane-1,2-Diol in Foodstuffs. *Czech Journal of Food Sciences*. 22(5): 190–196.
- Zelinková Z, Svejková B, Velíšek J, Doležal M. 2006. Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*. 23(12): 1290–1298. <http://doi.org/fng54c>
- Weiβhaar R. 2008. Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible oils by cleavage of MCPD esters with sodium methoxide. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110(2): 183–186. <http://doi.org/c5s4nr>