

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Akrilamida**

Akrilamida, atau dikenal juga sebagai amida akrilat (2-propenamida), adalah senyawa organik sederhana dengan rumus kimia  $C_3H_5NO$ . Senyawa ini memiliki potensi bahaya bagi kesehatan karena dianggap mungkin bersifat karsinogenik atau dapat menyebabkan kanker. Dalam bentuk murninya, akrilamida berwujud padatan kristal putih dan tidak memiliki aroma. Pada suhu ruang, akrilamida dapat larut dalam air, etanol, eter, dan kloroform. Senyawa ini tidak kompatibel dengan asam, basa, agen pengoksidasi, serta besi dan garamnya. Dalam kondisi normal tanpa pemanasan, akrilamida akan terdekomposisi menjadi amonia, sedangkan dengan pemanasan akan menghasilkan karbon dioksida, karbon monoksida, dan nitrogen oksida (Jahan, 2021). Akrilamida merupakan senyawa toksik dalam bentuk monomer, namun poliakrilamida, yang merupakan polimernya, tidak lagi bersifat toksik (Pratama, 2019). Keberadaan akrilamida dalam makanan bukan disebabkan oleh cemaran dari luar, melainkan karena pemanasan asam amino dan gula dalam makanan pada suhu tinggi. Asparagin, yang merupakan asam amino utama dalam kentang dan memiliki struktur mirip dengan akrilamida, diduga sebagai senyawa yang paling berperan dalam pembentukan akrilamida (Rahmawati, 2020).

Akrilamida, dikenal juga dengan nama-nama lain seperti 2-propenamida, etilen karboksiamida, akrilik amida, asam propeonik amida, dan vinil amida, adalah senyawa kimia yang memiliki peran penting dalam berbagai aplikasi sehari-hari. Senyawa ini umumnya digunakan dalam produksi plastik dan memiliki kegunaan signifikan dalam proses pengolahan dan penjernihan air. Keberadaannya dalam berbagai industri menunjukkan pentingnya akrilamida dalam pengembangan produk-produk berbasis kimia modern (Kementerian Kesehatan, 2020; LIPI, 2019).

Secara umum, akrilamida yang terdapat di alam berasal dari aktivitas manusia, terutama dari residu monomer yang dilepaskan dari poliakrilamida selama perawatan air minum. Hal ini terjadi karena tidak seluruh akrilamida terkoagulasi dan tetap berada di air sebagai pencemar. Akrilamida dapat terdistribusi secara merata dalam air karena kelarutannya yang tinggi. Zat ini memiliki kemampuan untuk bertahan

dalam air selama sehari-hari, berminggu-minggu, bahkan berbulan-bulan di daerah sungai atau pesisir pantai dengan aktivitas mikroba yang rendah. Risiko akumulasi pada ikan dianggap rendah.

### 1. Sifat Fisika dan Kimia

Akrilamida, senyawa organik yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan lingkungan, mudah larut dan memiliki mobilitas tinggi di tanah dan air tanah (Sattar et al., 2020). Senyawa ini terbentuk dari hidrasi akrilonitril dan ditemukan dalam berbagai produk, seperti asap rokok, kopi, dan makanan yang digoreng (Smith et al., 1996). Paparan akrilamida dalam jangka panjang dapat menyebabkan kerusakan saraf, kanker, dan gangguan reproduksi (Sattar et al., 2020). Oleh karena itu, penting untuk membatasi paparan akrilamida dalam kehidupan sehari-hari dengan menghindari produk yang mengandungnya dan menerapkan pola hidup sehat.

Akrilamida adalah senyawa kristal yang bening hingga putih, dengan bobot molekul sebesar 71,09 g/mol, tidak berbau, larut dalam air, metanol, etanol, dimetil eter, dan aseton, namun tidak larut dalam benzena dan heptana. Akrilamida memiliki titik leleh pada suhu 87,5°C dan titik didih pada suhu 125°C. Senyawa ini mudah mengalami polimerisasi pada suhu di atas titik lelehnya atau di bawah sinar UV. Meskipun stabil dan tidak mengalami polimerisasi secara spontan pada suhu kamar, akrilamida memiliki sifat tersebut pada kondisi tertentu. Dengan rumus molekul C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO (Putri & Rahayu, 2019).

**Tabel 1. Kelarutan akrilamida dalam g/100 ml pelarut pada suhu 30°C**

Air	Aseton	Benzena	Etanol	Kloroform	Metanol	Heptana
215,5	63,1	0,346	66,2	2,66	15,5	0,0068

(Harahap, 2006)

Akrilamida merupakan amida kristalin yang dapat mengalami polimerisasi dengan cepat, terutama terbentuk selama proses pemanasan makanan yang mengandung pati pada suhu tinggi. Selain itu, akrilamida sering ditemukan pada asap rokok dan asap industri, seperti industri plastik. Keberadaan akrilamida juga dapat terdeteksi dalam kondisi udara yang lembab (Harimadi, dkk., 2018).

Sejak tahun 1950-an, akrilamida telah dikenal sebagai senyawa antara yang digunakan dalam pembuatan poliakrilamida. Poliakrilamida merupakan suatu polimer yang berasal dari akrilamida dan digunakan sebagai flokulan dan koagulan dalam proses pengolahan air minum dan limbah. Selain itu, poliakrilamida juga dapat berperan sebagai pengatur viskositas dalam pemrosesan minyak mentah, bahan pengikat dalam

pabrik kertas, dalam produksi perekat, dan sebagai gel pada produk kosmetik (Jiang et al., 2020).

## **2. Farmakokinetika**

Akrilamida dapat diserap melalui saluran pernafasan, saluran pencernaan, dan kulit. Setelah diserap, akrilamida didistribusikan ke berbagai kompartemen dalam sistem tubuh dan memiliki kemampuan untuk menembus membran plasenta. Dalam urin tikus, telah ditemukan metabolit akrilamida, seperti asam merkapturat dan sistein-s-propionamida. Glisidamida, yang merupakan metabolit utama dari akrilamida, adalah epoksida yang lebih dicurigai dapat menyebabkan penyakit kanker dan bersifat genotoksik pada hewan percobaan dibandingkan akrilamida itu sendiri. Baik akrilamida maupun metabolitnya dapat terakumulasi dalam sistem saraf dan darah. Akrilamida dicurigai memiliki sifat neurotoksik yang lebih tinggi daripada glisidamida. Terdapat akumulasi akrilamida pada organ-organ seperti ginjal, hati, dan sistem reproduksi pria. (Pelucchi, C., & La Vecchia, C., 2022)

Berdasarkan percobaan pada hewan, akrilamida diekskresikan dalam jumlah besar melalui urin dan empedu sebagai metabolitnya. Terdapat bukti bahwa akrilamida juga dapat ditemukan dalam air susu tikus yang sedang menyusui. Meskipun data farmakokinetika akrilamida pada manusia masih terbatas, hingga saat ini belum terdapat data yang pasti menunjukkan perbedaan dalam distribusi dan ekskresi akrilamida antara manusia dan hewan mamalia. (Lee, J., & Kim, H., 2021)

**Tabel 2. Kadar Akrilamida Dalam Berbagai Jenis Makanan**

Jenis Makanan	Kadar Akrilamida $\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$
Kacang almon panggang ( <i>roasted</i> )	260
Asparagus panggang ( <i>roasted</i> )	143
Produk panggang ; roti, kue, kukis, bagels, pretzels	70 – 430
Bir, susu fermentasi ( <i>malt</i> ), air dadih ( <i>whey</i> )	30 – 70
Biscuit, <i>crackers</i>	30 – 3200
Sereal	30 – 1346
Bubuk Coklat	15 – 90
Bubuk Kopi	170 – 351
Kripik Jagung Kering	34 – 416
Kue Kering	800 – 1200
Produk Ikan	30 – 39
Roti Jahe	90 – 1660
Produk daging dan unggas	30 – 64
Sup Bawang	1184
Biji – bijian dan mentega biji – bijian ( <i>nut butter</i> )	64 – 457
Kacang Tanah Berlapis Kulit ( <i>coasted</i> )	140
Kentang Rebus	48
Kripik Kentang Kering	170 – 3700
Kentang Goreng	200 – 12000
Kentang, <i>puff</i> , <i>deep fried</i>	1270
Cemilan, selain kentang	30 – 1915
Kedelai, panggang ( <i>roasted</i> )	25
Biji Bunga Matahari, panggang ( <i>roasted</i> )	66
<i>Taco Shells</i> , masak	559

(Friedman, 2003)

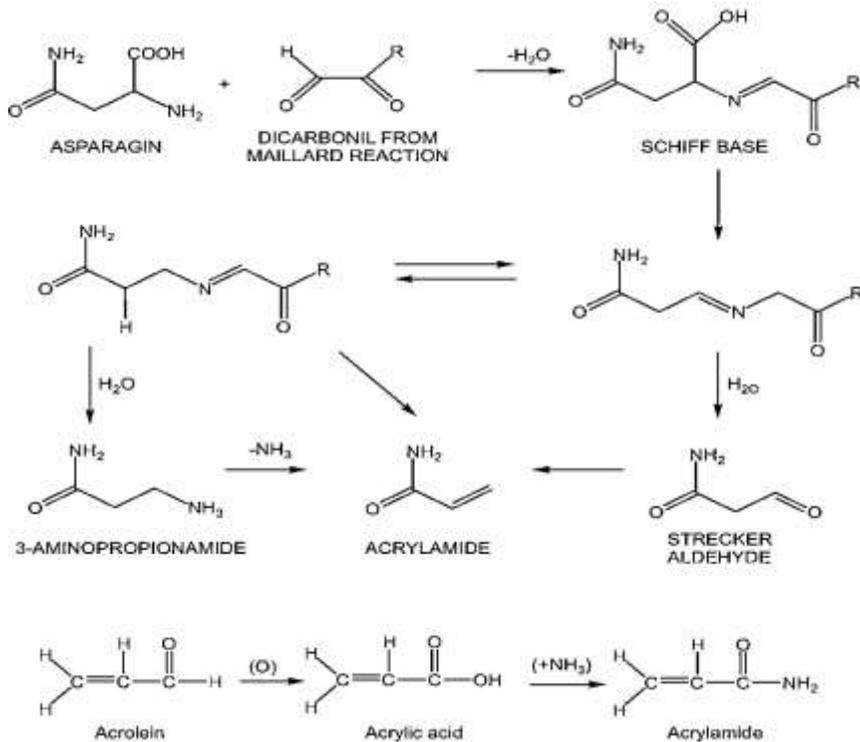
### 3. Mekanisme Terbentuknya Akrilamida

Asparagin, yang merupakan asam amino utama, memiliki struktur yang mirip dengan akrilamida dan diduga sebagai senyawa yang paling berperan dalam pembentukan akrilamida. Penelitian terbaru juga mendukung temuan ini, menunjukkan bahwa asparagin dapat berhubungan dengan peningkatan risiko kanker melalui pembentukan akrilamida dalam proses pemanasan makanan (Smith et al., 2021).

Badan Pengawasan Makanan Nasional Swedia (Swedish National Food Administration) dan Stockholm University melaporkan pada April 2022 bahwa akrilamida ditemukan dalam berbagai jenis makanan yang mengalami proses pemanggangan dalam tanur atau penggorengan. Temuan penelitian tersebut menyatakan bahwa pembentukan akrilamida terjadi akibat pemanasan makanan pada suhu tinggi yang melebihi 120 °C. Akrlamida tidak terbentuk pada suhu di bawah 120 °C, dan pembentukannya terjadi terutama pada makanan dengan kandungan karbohidrat tinggi. Meskipun makanan yang mengandung protein juga dapat menghasilkan akrilamida, namun dalam konsentrasi yang lebih rendah (Andersson et al., 2022).

Akrilamida dapat ditemukan pada beberapa jenis makanan yang melibatkan proses dan pengolahan pada suhu tinggi. Kadar akrilamida dalam makanan cenderung meningkat seiring dengan peningkatan suhu dan durasi pemanasan. Proses pembentukan akrilamida tidak terjadi pada suhu di bawah 120 °C. Meskipun mekanisme pembentukannya belum sepenuhnya diketahui, diperkirakan melibatkan reaksi dari berbagai komponen dalam makanan, seperti karbohidrat, lemak, protein, asam amino, dan berbagai komponen lainnya dalam jumlah yang kecil

Studi sistematis mengenai pembentukan akrilamida masih belum dapat dipastikan, dan kemungkinan terbesar terjadi melalui reaksi campuran. Kondisi sulit untuk melakukan studi yang lebih mendalam disebabkan oleh sifat akrilamida yang mudah menguap dan dapat hilang setelah terbentuk. Akrilamida dianggap sebagai produk samping dari reaksi Maillard, yakni reaksi yang terjadi antara asam amino dengan gula pereduksi seperti glukosa, fruktosa, ribosa, dan lainnya, atau dengan sumber karbonil lainnya. Asparagin, yang merupakan asam amino dalam makanan, berpartisipasi dalam reaksi ini pada suhu tinggi. Skema pembentukan akrilamida melalui reaksi Maillard dapat dilihat pada gambar 1 di bawah ini.



**Gambar 1. Skema Pembentukan Akrilamida melalui Reaksi Maillard**

#### **4. Faktor yang Mempengaruhi Pembentukan Akrilamida**

Beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan akrilamida dalam makanan antara lain:

**4.1. Prekursor.** Prekursor yang kuat diduga berperan dalam pembentukan akrilamida pada makanan melibatkan lipid, asam amino atau protein, dan karbohidrat. Terbentuknya akrilamida dianggap terjadi dari berbagai senyawa prekursor pada makanan selama proses pemanasan. Kehadiran asam lemak tak jenuh yang lebih banyak dapat meningkatkan kadar akrilamida melalui oksidasi asam lemak. Demikian pula, peningkatan jumlah gula pereduksi dan asam amino diyakini dapat meningkatkan kadar akrilamida dalam makanan selama proses pemanasan (Jezussek, J., 2020; Lin, H., & Jin, C., 2019).

**4.2. Suhu.** Pada tahun 2002, para ilmuwan Swedia mengumumkan penemuan akrilamida pada berbagai jenis makanan yang mengalami proses pemanasan pada suhu tinggi. Mekanisme utama pembentukan senyawa akrilamida melibatkan reaksi Maillard antara gula pereduksi dan asparagin. Oleh karena itu, makanan yang kaya karbohidrat seperti kentang, keripik, dan roti berpotensi mengandung akrilamida ketika diolah pada suhu di atas 120°C. Maka berdasarkan penelitian oleh peneliti sebelumnya dapat disimpulkan semakin tinggi suhu pemanasan pada makanan kaya karbohidrat maka kadar senyawa akrilamida yang dihasilkan akan semakin tinggi juga (Capuano, E., & Fogliano, V., 2011; Stadler, R. H., 2022).

**4.3. Lama Pemanasan.** Suhu yang semakin tinggi dan durasi pemanasan yang semakin lama pada makanan akan meningkatkan kadar akrilamida yang terbentuk (FAO dan WHO, 2002). Persamaan Arrhenius menjelaskan bahwa reaksi kimia yang dipengaruhi oleh suhu dapat diungkapkan melalui energi aktivasi ( $E_a$ ). Semakin tinggi nilai  $E_a$ , semakin besar pengaruh suhu terhadap laju reaksi. Nilai  $E_a$  untuk reaksi Maillard, yang berkaitan dengan pembentukan akrilamida, berkisar antara 10-160 kJ/mol, menunjukkan bahwa suhu memiliki dampak signifikan pada pembentukan akrilamida. Reaksi ini sejalan dengan pembentukan akrilamida yang dimulai dengan pemanasan pada suhu tinggi. Durasi waktu merupakan faktor terpenting yang dapat mempengaruhi peningkatan konsentrasi akrilamida pada suhu tinggi berdasarkan laporan sebelumnya (Perera, 2021).

**4.4. Kadar air.** Kadar air dalam bahan makanan berkorelasi dengan suhu yang digunakan dalam proses pengolahan. Jika kadar air

dalam bahan makanan rendah, suhu yang dibutuhkan untuk pengolahan makanan tidak perlu tinggi, sehingga dapat mengurangi potensi terbentuknya akrilamida pada makanan (Sun, J., Liang, H., & Zhang, Y., 2019).

**4.5. pH.** Pencoklatan larutan glukosa pada saat pemanasan diperoleh ketika pH melebihi 5 dan meningkat dengan meningkatnya pH. Tingkat kecoklatan bervariasi dengan posisi gugus amino. Awalnya, hanya bentuk asam amino non-protonisasi yang dapat membentuk basa Schiff. Ini menjelaskan perubahan nyata dalam reaktivitas (dipantau sebagai kecoklatan) yang terjadi ketika pH melewati titik isoelektrik gugus amino dalam asam amino yang bereaksi. Dengan demikian, pH optimal untuk reaksi Maillard bervariasi dengan sistem yang digunakan dan bagaimana reaksi dipantau misalnya kehilangan lisin atau kecoklatan (Liu, L., 2021).

## **B. Upaya Reduksi Akrilamida**

Hingga saat ini, berbagai upaya untuk mengurangi kadar senyawa akrilamida pada bahan pangan terus dikembangkan. Secara umum, upaya untuk mengurangi terbentuknya senyawa akrilamida pada bahan pangan dapat dilakukan pada beberapa tahap, yaitu sebelum tahap pengolahan, selama pengolahan, dan setelah proses pengolahan bahan pangan.

Upaya untuk mengurangi akrilamida sebelum tahap pengolahan umumnya melibatkan modifikasi atau perlakuan tambahan terhadap bahan pangan. Sementara itu, upaya untuk mengurangi akrilamida selama tahap pengolahan biasanya melibatkan modifikasi kondisi proses, seperti suhu pengolahan, waktu pengolahan, jenis minyak, dan parameter lainnya (Zhang, L., & Zhang, H., 2020). Salah satu metode yang belum banyak diteliti untuk mengurangi akrilamida adalah pada tahap setelah pengolahan, yaitu dapat mengurangi akrilamida yang sudah terbentuk dalam bahan pangan.

Blansir, suatu proses perendaman singkat dalam air panas, merupakan salah satu metode yang dapat digunakan pada tahap setelah pengolahan. Proses ini dapat menginaktivasi enzim polifenol oksidase yang dapat merusak penampilan produk. Blansir juga dapat melarutkan komponen polar pada sampel, seperti mineral, vitamin larut air, komponen pati, dan gula pereduksi. Proses ini dapat mereduksi prekursor akrilamida seperti gula pereduksi (Zhang, L., & Zhang, H., 2020).

Selain manfaat tersebut, blansir juga dapat meningkatkan kecerahan bahan pangan dengan menghilangkan udara dan debu pada permukaan, menghasilkan perubahan panjang gelombang cahaya yang dipantulkan. Meskipun demikian, perlu diperhatikan bahwa blansir yang dilakukan pada suhu dan waktu yang tidak tepat dapat menyebabkan off-flavor pada bahan pangan selama penyimpanan, baik untuk produk kering maupun produk beku (Smith, P., & Fellows, P., 2023).

### C. Singkong

Singkong telah lama dikenal dan ditanam oleh penduduk dunia. Penelusuran para pakar botani dan pertanian menunjukkan bahwa singkong berasal dari kawasan Amerika yang memiliki iklim tropis. Tanaman singkong diperkenalkan ke Indonesia sekitar abad ke-18, tepatnya pada tahun 1852. Di Indonesia, singkong merupakan salah satu produksi pertanian terbesar kedua setelah padi, menjadikannya sebagai bahan baku potensial untuk berbagai produk pangan dan industri (BPS, 2020; Nugroho, 2019). Singkong merupakan salah satu komoditas pertanian yang telah diolah menjadi berbagai produk jadi atau produk setengah jadi dengan nilai tambah yang tinggi (Putra, 2020). Indonesia merupakan salah satu negara produsen singkong, dengan luas panen mencapai 867.495 hektar dan produksi sebanyak 20.744.674 ton pada tahun 2016 (BPS, 2020).

Berdasarkan hasil identifikasi tumbuhan oleh Herbarium Medanense (2019) dan Nugroho (2019), taksonomi singkong dapat diuraikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Ordo	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Kelas	: Dicotyledoneae
Genus	: <i>Manihot</i>
Spesies	: <i>Manihot utilissima</i> Pohl.



Gambar 2. Singkong

Singkong adalah sumber makanan yang kaya akan beragam zat penting seperti karbohidrat, lemak, protein, serat makanan, vitamin B1, vitamin C, serta mineral seperti besi, fosfor, dan kalsium (Achmad et al., 2020). Selain itu, senyawa non-gizi seperti zat tanin juga ditemukan dalam singkong (Putri & Setiawan, 2021). Umbi singkong diakui sebagai sumber energi yang tinggi karbohidrat tetapi rendah protein (Santoso et al., 2019). Kandungan protein yang penting dapat ditemukan pada daun singkong, khususnya asam amino metionin (Dewi et al., 2022). Walaupun umbi singkong mengandung glukosa dan bisa dimakan mentah dengan rasa manis atau pahit, namun kadar racun seperti glukosida yang dapat membentuk asam sianida perlu diperhatikan (Wijaya et al., 2023). Penting untuk dicatat bahwa proses pemasakan diperlukan untuk menurunkan kadar racun dalam singkong yang rasanya pahit (Setiawan et al., 2024).

Singkong banyak dimanfaatkan dalam berbagai panganan, seperti keripik, kudapan, sayuran, hingga tape. Tepung singkong, yang dikenal sebagai tepung tapioka, juga banyak digunakan sebagai pengganti tepung gandum. Komposisi unsur gizi dalam tiap 100 gram singkong segar, menurut Direktorat Gizi, Depkes RI, dapat dilihat dalam Tabel 3.

**Tabel 3. Komposisi Singkong**

Unsur Gizi	Banyaknya dalam .... (per 100g)	
	Singkong Putih	Singkong Kuning
Kalori (kal)	146,00	157,00
Protein (g)	1,20	0,80
Lemak (g)	0,30	0,30
Karbohidrat (g)	34,70	37,90
Kalsium (mg)	33,00	33,00
Fosfor (mg)	40,00	40,00
Zat Besi (mg)	0,70	0,70
Vitamin A (Si)	0	385,00
Vitamin B (mg)	0,06	0,06
Vitamin C (mg)	30,00	30,00
Air (g)	62,50	60,00
Bagian Dapat Dimakan (%)	75,00	75,00

Singkong telah terbukti menjadi sumber daya pangan yang memiliki potensi besar untuk pengembangan berbagai produk olahan yang dapat menjadi bisnis yang menguntungkan (Misri, 2020). Dari hasil olahannya, seperti singkong goreng, singkong rebus, keripik singkong, tape, dan gethuk, dapat diperoleh produk-produk dengan nilai tambah yang tinggi, yang menarik minat konsumen (Misri, 2020; Santoso et al., 2023). Tidak hanya itu, variasi olahan singkong juga mencakup produk khas daerah yang memiliki potensi pasar yang besar. Contohnya adalah sagu kasbi, hidangan khas Maluku Utara, dan kasoami, makanan khas masyarakat Kabupaten Wakatobi, Sulawesi Tenggara (Kurniawati & Haryono, 2022; Anugraha, 2023). Kedua produk tersebut menunjukkan diversifikasi tinggi dalam penggunaan singkong sebagai bahan baku, menciptakan peluang bisnis lokal yang berkelanjutan dan berpotensi ekspansi pasar.

#### **D. Cara Pengolahan Singkong**

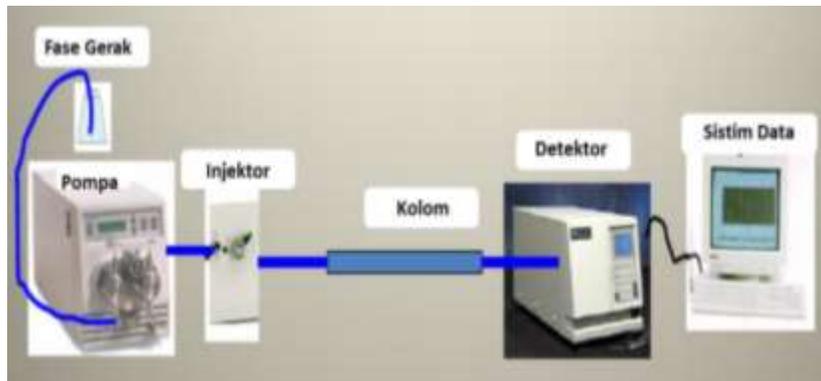
Penggorengan merupakan salah satu metode pengolahan pangan yang populer dan banyak digunakan. Penggunaan minyak atau lemak dalam penggorengan memungkinkan peningkatan cita rasa dan tekstur khusus dari bahan pangan, memberikan hasil akhir yang renyah dan mengembang. Proses penggorengan melibatkan transfer panas, transfer massa air, dan penyerapan minyak oleh bahan pangan secara simultan. Selama penggorengan, terjadi perubahan pada komposisi kimia dan sifat fisik bahan pangan yang dapat mempengaruhi kualitas akhirnya (Bansal et al., 2021).

Menggoreng merupakan suatu proses memasak bahan pangan dengan menggunakan lemak atau minyak panas pada suhu tinggi. Proses deep frying, yang melibatkan penggunaan jumlah minyak yang cukup banyak, dapat memiliki dampak signifikan pada stabilitas nutrisi, pembentukan senyawa berbahaya, serta karakteristik sensori dan tekstur produk (Guillén & Uriarte, 2022).

#### **E. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Kromatografi adalah metode analisis yang mendasarkan pada pemisahan molekul berdasarkan perbedaan sifat-sifatnya. Terdapat dua jenis utama kromatografi, yaitu kromatografi cair dan kromatografi gas, yang masing-masing bergantung pada fase geraknya. Salah satu teknik yang paling umum digunakan dalam kromatografi cair adalah

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), yang dikenal juga sebagai High Performance Liquid Chromatography (HPLC). KCKT telah menjadi pilihan utama dalam analisis farmasi karena keunggulannya (Charde et al., 2019). Penggunaan teknik ini meluas dalam uji identifikasi, evaluasi kemurnian, serta penetapan kadar dalam penelitian farmasi modern (Meri Susanti & Dachriyanus, 2023).



**Gambar 3. Sistem Kerja Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**  
Harmita., et al. (2019)

Teknik pemisahan yang diterapkan dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) melibatkan penggunaan dua fase, yaitu fase gerak (cairan) dan fase diam (padatan), yang digunakan secara luas dalam prosedur analisis kualitatif dan kuantitatif (Kemenkes, 2020). Menurut Charde et al. (2019), KCKT digunakan untuk pemisahan senyawa baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Kemampuan KCKT dalam mengatur fase gerak untuk meningkatkan selektivitas fase diam memungkinkan pemisahan berbagai campuran dengan efisiensi yang tinggi.

Polaritas relatif antara fase gerak dan fase diam memainkan peran penting dalam proses pemisahan, dan hal ini membagi KCKT menjadi dua jenis, yaitu fase normal dan fase terbalik (Gandjar & Rohman, 2022). Fase gerak, yang berupa campuran pelarut, memegang peranan krusial dalam resolusi dan elusi. Pengaruh polaritas pelarut secara keseluruhan dan fase diam, bersama dengan sifat komponen sampel, sangat mempengaruhi daya resolusi dan elusi pada fase gerak.

Pada fase normal, fase diam lebih polar daripada fase gerak, sehingga ketika pelarut meningkat, kemampuan elusi juga meningkat. Sebaliknya, pada fase terbalik, kemampuan elusi menurun seiring dengan peningkatan pelarut. Terdapat dua jenis elusi yang umumnya terjadi pada KCKT, yaitu elusi gradient (perubahan komposisi fase

gerak) dan isokratik (komposisi fase gerak tetap). Eluen dicampur sebelum dimasukkan ke dalam botol eluen pada elusi isokratik.

Dalam pemilihan fase gerak, panduan deret elutropik yang disusun berdasarkan polaritas pelarut dapat digunakan. Panduan ini mencakup nilai pemenggalan UV (UV cut-off), yang menunjukkan panjang gelombang pelarut yang menghasilkan nilai absorbansi lebih dari 1,0 satuan pada kuvet 1 cm (Gandjar & Rohman, 2022). Fase gerak umumnya menggunakan metanol dan asetonitril atau campuran keduanya pada KCKT fase terbalik. Penting untuk memastikan bahwa fase gerak dapat bercampur dengan baik untuk mencegah presipitasi dalam kolom, yang dapat menyebabkan kekosongan pada kolom akibat partikel kecil yang terkumpul di dalamnya (Kazakevich & LoBrutto, 2019; Gandjar & Rohman, 2022).

**Tabel 4. Deret elutropik pelarut – pelarut untuk KCKT**

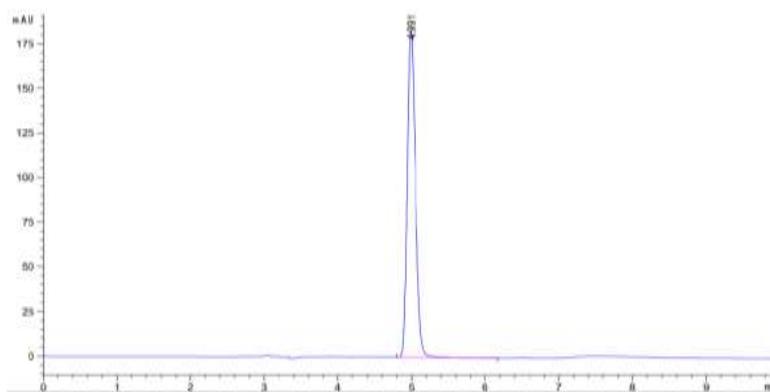
<b>Pelarut</b>	<b>UV cut-off (nm)</b>
diklorometan	230
tetrahidrofuran	212
propanon	330
asetonitril	190
iso-propanol	205
etanol	205
methanol	205
asam etanoat	255
air	170

Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan contoh yang sering digunakan dari golongan silika termodifikasi sebagai fase diam dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Fase ini mampu efektif memisahkan senyawa dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Selain ODS, polimer stiren dan divinil benzena (silika non-modifikasi) juga dapat berperan sebagai fase diam dalam HPLC. Permukaan silika pada umumnya bersifat agak asam dan polar karena adanya residu silanol (Si-OH)

### **1. Prinsip Kerja Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Prinsip dasar Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah memisahkan komponen analitik berdasarkan kepolarannya, seperti yang dikaji oleh Fertiasari pada tahun 2023. Proses ini dimulai dengan menyuntikkan sampel dalam bentuk larutan ke dalam kolom yang terdiri dari fase diam dan fase gerak. Penelitian terbaru oleh Charde et al. (2024) menegaskan bahwa tegangan tinggi diterapkan untuk mengeluarkan

sampel dari kolom, dengan hasilnya diidentifikasi oleh detektor dalam bentuk kromatogram. Distribusi fase gerak dan fase diam mengontrol kecepatan elusi melalui kolom, sebuah konsep yang dipelajari oleh Gandjar dan Rohman (2019). Mereka menyoroti pentingnya penggabungan yang tepat dari parameter-operasional kolom, seperti suhu, panjang, dan diameter, serta fase gerak, seperti kecepatan alir, dan ukuran sampel. Dengan mengoptimalkan parameter-parameter ini, KCKT dapat memberikan pemisahan yang efektif dan akurat dari komponen-komponen dalam suatu sampel.



**Gambar 4. kromatogram dari akrilamida (Wardani, et al., 2021)**

Dalam analisis kualitatif menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), kromatogram memberikan informasi tentang senyawa tertentu dalam sampel, yang dapat diidentifikasi melalui waktu retensi (tR). Waktu retensi mengindikasikan posisi pada fase diam setelah periode waktu elusi yang ditentukan. Jika kromatogram sampel sesuai atau identik dengan standar baku yang dijalankan dalam kondisi identik, dapat disimpulkan bahwa sampel mengandung senyawa yang sama. Sebaliknya, jika tidak sesuai, diasumsikan bahwa sampel tidak mengandung senyawa atau memiliki kadar di bawah batas deteksi (Harmita et al., 2019).

Pada pemeriksaan kuantitatif, tinggi atau luas puncak dibandingkan dengan standar acuan pada konsentrasi yang diketahui dapat digunakan untuk menentukan kandungan senyawa dalam sampel. Luas puncak direpresentasikan sebagai integrasi konsentrasi (ketinggian puncak kurva) terhadap waktu (volume fase gerak) (Harmita et al., 2019).

Analisis KCKT dibagi menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik. Pada KCKT fase normal, fase diam lebih polar daripada fase

gerak, sehingga senyawa kurang polar terelusi lebih awal. Fase terbalik, di sisi lain, memiliki fase diam kurang polar dibandingkan fase gerak. Sebagai contoh, pada KCKT fase terbalik, fase gerak yang lebih polar menyebabkan zat polar terelusi lebih awal, sementara tingkat kepolaran fase gerak akan meningkatkan waktu elusi (Syallah, F. Y., 2021).

## **2. Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) terdiri dari beberapa komponen utama, yaitu pompa, injektor, kolom, detector, dan sistem data.

**2.1 Pompa dalam sistem KCKT** Pentingnya peran pompa dalam memastikan pengangkutan fase gerak yang stabil, tepat, dan bebas dari gangguan telah diakui dalam literatur terkini (Misra et al., 2022). Dalam konteks analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), spesifikasi teknis pompa menjadi krusial untuk memastikan operasionalitas yang efisien dan akurat (Smith & Jones, 2020). Menurut penelitian terbaru, pompa harus mampu memberikan tekanan hingga 5000 psi dan mengalirkan fase gerak dengan kecepatan tertentu, biasanya sekitar 3 mL per menit, agar tetap bekerja secara optimal dalam fase gerak, sambil menjaga sifat inertnya (Brown et al., 2023). Dalam praktiknya, ada dua jenis pompa yang sering digunakan dalam KCKT, yaitu pompa dengan tekanan tetap (constant pressure) dan pompa dengan pendesakan tetap (constant displacement). Dengan memastikan penggunaan pompa yang sesuai dengan kebutuhan, pengangkutan fase gerak melalui kolom dapat dijaga agar berjalan dengan lancar dan konsisten, sehingga memungkinkan analisis yang akurat dan dapat diandalkan (Misra et al., 2022).

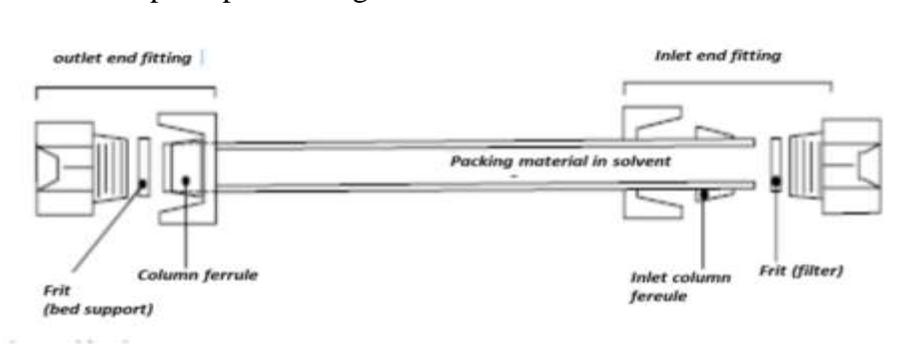
**2.2 Pompa Tekanan Tetap (Constant Pressure):** Tekanan Langsung: Gas dengan tegangan tinggi dialirkan ke bagian atas pompa, dan eluen terbawa ke silinder atas. Tekanan Tetap Menengah: Jenis pompa ini mengatur tekanan secara konstan dan dapat menciptakan tekanan tinggi yang stabil.

**2.3 Pompa Pendesakan Tetap (Constant Displacement):** Pompa Bolak-Balik (Reciprocating): Menghasilkan aliran pelarut yang seragam melalui kolom dan cocok untuk sistem gradien. Memiliki tingkat kebisingan yang rendah.

Pompa Syringe (Pompa Pendesakan Tunggal): Mudah digunakan pada sistem gradien.

**2.4 Injektor** terbuat dari bahan tembaga anti karat dan katup dengan bahan Teflon lengkap dengan sampel loop (keluk sampel) internal maupun eksternal. Alat penyuntik ini digunakan langsung ke dalam fase gerak yang mengalir menuju kolom di bawah tekanan untuk melakukan penyuntikan. Pada saat penyuntikan, sampel didorong melewati sampel loop dan kelebihan sampel akan dikeluarkan. Selama prosedur ini, katup kolom diputar agar fase gerak dapat melewati keluk sampel dan masuk ke dalam kolom. Presisi yang tinggi dapat dicapai pada proses ini, ditunjukkan dengan nilai RSD 0,1%. Pada HPLC, penyuntikan sering dilakukan oleh autosampler

**2.5 Kolom** merupakan komponen kunci dalam sistem KCKT yang digunakan untuk memisahkan bagian-bagian sampel yang dianalisis. Kolom ini memiliki peran vital dalam pemisahan senyawa berdasarkan prinsip kromatografi.



**Gambar 5. Kolom Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Harmita et al., 2019)**

Bahan seperti gelas dan stainless steel, yang merupakan campuran logam yang mampu menahan tekanan tinggi, digunakan untuk membuat kolom dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pemilihan bahan kolom yang tepat memiliki peran krusial dalam menentukan kinerja kolom, karena kolom harus memiliki kemampuan untuk membedakan senyawa yang dianalisis (Harmita, 2019). Kolom stainless steel umumnya memiliki bentuk lurus dan dioperasikan pada suhu kamar. Pada umumnya, fase diam dan fase gerak dalam KCKT menguap pada suhu di atas 60°C. Oleh karena itu, pemanasan kolom dengan tujuan efisiensi pemisahan jarang dilakukan dalam analisis menggunakan KCKT (Syallah, F. Y., 2021).

**2.6 Detektor** dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) memiliki peran penting dalam proses analisis. Fungsinya mencakup identifikasi keberadaan senyawa dalam aliran yang berasal

dari kolom (analisis kualitatif) dan penghitungan konsentrasinya (analisis kuantitatif) (Syallah, F. Y., 2021). Detektor dikategorikan baik jika memiliki kisaran respons linier yang luas, sensitivitas tinggi dengan gangguan (noise) yang rendah, dan mampu memberikan respon untuk semua jenis senyawa. Sebagai komponen utama dalam KCKT, detektor sangat mempengaruhi keberhasilan analisis.

Detektor UV adalah salah satu jenis detektor KCKT yang paling serbaguna. Prinsip dasarnya adalah bahwa sinar ultraviolet (UV) dapat diserap oleh sebagian besar senyawa organik pada panjang gelombang tertentu, yang dapat diatur sesuai dengan kemampuan serapan senyawa tertentu. Panjang gelombang rendah digunakan untuk mengidentifikasi sebagian besar senyawa, atau dalam modus deteksi fotodiode untuk pemindaian berbagai panjang gelombang UV. Pengaturan panjang gelombang rendah ini memungkinkan pemindaian beberapa panjang gelombang sinar ultraviolet atau berfungsi sebagai mode deteksi fotodiode. Sinyal sinar ultraviolet mendeteksi identitas dan keberadaan senyawa target serta pengotornya. Hal ini ditunjukkan dengan adanya gugus kromofor berdasarkan konsentrasi dan koefisien absorpsi terhadap sampel (Harmita et al., 2019). Detektor UV memberikan informasi yang berguna dalam menganalisis sampel secara kualitatif maupun kuantitatif dalam KCKT.

**2.7 Komputer** terhubung dengan detektor untuk menangkap sinyal elektronik sebagai kromatogram. Komputer berfungsi sebagai sistem perekam/integrator untuk mengolah data, menghasilkan data puncak dan luas area puncak. Komputer juga digunakan untuk mengidentifikasi kemurnian suatu senyawa dengan membandingkan database dan pola fragmentasi puncak (Harmita et al., 2019).

### **3. Hal-hal yang Perlu Diperhatikan dalam Analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Sebelum memanfaatkan fase gerak dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), langkah penting yang perlu dilakukan adalah proses degassing dan penyaringan. Degassing, juga dikenal sebagai penghilangan gas, bertujuan untuk menghapus gas yang terperangkap dalam komponen KCKT seperti pompa dan detektor. Hal ini penting karena gas yang terperangkap dapat mengganggu akurasi dan kestabilan proses analisis (Adams et al., 2020). Proses degassing juga membantu mencegah terbentuknya gelembung udara, yang dapat mengganggu perpindahan fase gerak saat pelarut yang berbeda dicampurkan. Berbagai

metode degassing telah dikembangkan, termasuk pemanasan dengan pengadukan, pemvakuman di atas fase gerak, penggunaan ultrasonik, atau teknik lain yang sesuai dengan kebutuhan spesifik aplikasi (Lee & Novotny, 2021).

Pemilihan fase gerak yang optimal merupakan aspek penting dalam KCKT, karena dapat memengaruhi daya resolusi dan elusi dalam proses analisis. Faktor-faktor yang perlu dipertimbangkan meliputi sifat-sifat komponen sampel, polaritas fase diam, dan karakteristik campuran pelarut yang digunakan (Chen et al., 2023). Oleh karena itu, penting untuk memilih fase gerak yang tidak hanya non-toksik, tetapi juga tidak berpotensi berinteraksi dengan sampel yang sedang dianalisis. Selain itu, tahap penyaringan fase gerak juga krusial untuk menghilangkan partikel-partikel kecil yang dapat menyebabkan gangguan selama proses analisis (Yan & Haddad, 2019). Dengan memperhatikan semua aspek ini, proses KCKT dapat dilakukan dengan lebih akurat dan efisien, memastikan hasil analisis yang lebih dapat diandalkan dan konsisten.

#### **4. Kelebihan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT):**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) terus menunjukkan keunggulan dalam analisis senyawa, menampilkan kepekaan yang luar biasa terhadap senyawa non-volatile yang sering tidak stabil saat dipanaskan. Penelitian terbaru menegaskan bahwa KCKT mampu mengidentifikasi dan menetapkan konsentrasi senyawa dalam jumlah sangat kecil, bahkan dalam satuan nanogram (Putra, 2023) dan part per trillion atau ppt (Harmita, 2022). Efisiensi analisis yang tinggi dicapai dengan KCKT melalui penggunaan volume sampel yang minimal (Anggraena, 2021), sementara peningkatan efektivitas analisis ditemukan melalui pengoptimalan fase gerak (Sarmiento et al., 2020). Validitas dan sensitivitas KCKT juga terus ditingkatkan, sesuai dengan temuan terbaru (Prabowo, M. H. et al., 2024). Fleksibilitas KCKT dalam menawarkan variasi kolom dan detector memungkinkan otomatisasi yang lebih mudah dan akurasi yang lebih tinggi dalam pengukuran sampel (Watson, 2019). Dengan demikian, KCKT tetap menjadi pilihan utama dalam analisis senyawa modern, memberikan keandalan dan efisiensi yang diperlukan untuk mengeksplorasi sampel-sampel yang kompleks.

## F. Validasi Metode

Validasi merupakan rangkaian kegiatan yang bertujuan memastikan bahwa prosedur analisis yang dilakukan memenuhi syarat dan tujuan pemakaiannya. Proses validasi metode mencakup beberapa aspek, termasuk akurasi (ketepatan), presisi (seksama), spesifisitas (kekhususan), batas deteksi dan kuantifikasi, serta linearitas (Kemenkes RI, 2020).

Validasi metode diperlukan untuk memastikan mutu secara kualitatif, yang menunjukkan bahwa metode yang digunakan telah sesuai dengan syarat yang telah ditetapkan. Validasi metode menjadi suatu langkah penting dalam memastikan keandalan dan keakuratan hasil analisis, sehingga dapat diandalkan untuk pengambilan keputusan yang tepat.

### 1. Linearitas dan Rentang:

Dengan memanfaatkan linearitas, hasil analisis dapat disajikan secara langsung atau melalui perubahan numerik sebanding dengan kadar senyawa yang dianalisis, memenuhi batas yang telah ditetapkan. Rentang, pada konteks ini, merujuk pada jarak konsentrasi antara batas atas dan batas bawah analit yang dianalisis. Rentang ini dapat ditentukan melalui suatu analisis tertentu, dengan menghitung nilai akurasi, presisi, dan linearitas dalam satuan yang sama, seperti persentase, bpm, atau bpj, berdasarkan hasil pengujian.

Menurut dokumen International Conference on Harmonization (ICH), linearitas ditetapkan dengan menggunakan minimal 5 konsentrasi, dengan rentang minimum antara 80% hingga 120% dari konsentrasi pengujian senyawa obat yang telah ditetapkan kadarnya (Kemenkes RI, 2020). Rentang prosedur dianggap valid jika menunjukkan nilai linearitas, presisi, dan akurasi pada rentang yang ditetapkan untuk menganalisis sampel dengan kandungan analit pada konsentrasi ekstrim.

Koefisien relasi ( $r$ ) merupakan parameter yang digunakan dalam uji linieritas, menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi analit yang diukur dan respon analitik (luas area) pada kurva kalibrasi. Untuk menentukan linearitas, kurva standar dapat dibuat dengan absorbansi sebagai sumbu  $y$  dan konsentrasi larutan standar sebagai sumbu  $x$ . Berdasarkan kurva tersebut, persamaan regresi dapat diperoleh sebagai berikut:

$$y = bx + a$$

Keterangan:

b = Slope

a = Intercept

y = Nilai absorban pada sumbu y

x = Kadar larutan standar pada sumbu x

Berdasarkan kurva tersebut akan diperoleh nilai koefisien korelasi (r). Uji linearitas menjadi esensial dalam memastikan keandalan metode analisis untuk memberikan respons yang akurat di berbagai rentang konsentrasi (Noviany, A., & Setiawan, B., 2022)

## 2. Akurasi

Akurasi mencerminkan seberapa dekat hasil uji suatu teknik dengan nilai sebenarnya atau nilai yang seharusnya. Evaluasi akurasi umumnya melibatkan penggunaan tiga konsentrasi dan tiga pengulangan untuk setiap konsentrasi, dengan mengukur hubungan linear antara konsentrasi sampel yang dihitung dan konsentrasi standar yang telah ditetapkan. Tingkat akurasi dianggap baik jika nilainya mendekati atau sama dengan 1,0 (Kemenkes RI, 2020), dan hasilnya biasanya dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali atau % recovery (Harmita et al., 2019).

Menurut Harmita et al. (2019), persentase recovery dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{Kadar yang diperoleh}}{\text{kadar sesungguhnya}} \times 100\%$$

Persyaratan untuk persentase perolehan kembali analitik berkisar antara 80% hingga 110% untuk konsentrasi 1 ppm hingga 100 ppm (Harmita, 2004). Kemenkes (2020) dan International Conference on Harmonization (ICH) merekomendasikan bahwa prosedur validasi harus memberikan nilai presisi yang dapat diterima, berada dalam rentang antara 80% hingga 120% dari konsentrasi uji.

## 3. Presisi/ Keseksamaan

Presisi mencerminkan tingkat keseragaman hasil uji yang dilakukan oleh individu sesuai dengan metode yang digunakan, baik pada sampel ganda maupun sampel homogen. Keseragaman ini dapat diukur menggunakan simpangan baku atau simpangan baku relatif, yang dikenal sebagai koefisien variasi. Proses pengukuran kadar analisis melibatkan langkah-langkah mulai dari persiapan hingga perolehan hasil

akhir dari suatu sampel. Penetapan ini umumnya memerlukan tiga replikasi untuk setiap dari tiga konsentrasi, atau minimal enam penetapan pada konsentrasi uji sebesar 100% (Kemenkes RI, 2020).

Harmita et al. (2019) menjelaskan bahwa pengukuran presisi mencakup:

**4. Keterulangan (Repeatability) atau Intra-assay Precision:**

Analisis dilakukan menggunakan kondisi yang sama dalam rentang waktu singkat. Analisis dilakukan pada hari yang sama, dengan menggunakan peralatan yang sama, oleh petugas yang sama, dan dengan kondisi lain yang serupa pada satu larutan, dengan melakukan penyuntikan beberapa kali.

**5. Presisi Antara (Intermediate Precision) atau Within-Laboratory Variations:**

Pengukuran dilakukan di laboratorium yang sama tempat analisis dilaksanakan pada hari yang berbeda, oleh petugas yang berbeda, atau dengan menggunakan peralatan yang berbeda.

Merupakan bagian dari Ruggedness menurut United States Pharmacopeia (USP).

**6. Reprodusibilitas (Reproducibility):** Dilakukan dengan menggunakan peralatan atau analis dari laboratorium analisis yang berbeda.

**7. Batas Deteksi (*Limit of Detection / LOD*) dan Batas Kuantifikasi (*Limit of Quantification / LOQ*):**

LOD merujuk pada konsentrasi terendah dari analit yang dapat terdeteksi dalam sampel tanpa memerlukan pengujian kuantitatif untuk menunjukkan tingkat konsentrasinya. LOD umumnya dinyatakan sebagai konsentrasi analit (seperti persen, bpj, bpm) yang tidak memiliki batas yang pasti, tetapi dapat menunjukkan keberadaan analit dalam batas deteksi yang telah ditetapkan sesuai persyaratan.

Proses validasi LOD melibatkan analisis sampel dengan konsentrasi yang sudah diketahui, mendekati, atau pada tingkat konsentrasi sesuai dengan batas deteksi yang telah ditentukan (Kemenkes RI, 2020).

LOQ merujuk pada batas kuantitas minimum dalam suatu sampel yang ditentukan dengan mengevaluasi presisi dan akurasi, dinyatakan dalam persentase, bpj, atau bpm dalam sampel. LOQ umumnya ditetapkan dengan menganalisis sampel yang memiliki konsentrasi di atas dan di bawah batas kuantitasnya.

## 8. Spesifisitas:

Spesifisitas adalah kemampuan untuk menguji suatu analit dengan akurat, terutama ketika ada pengotor (cemaran), hasil peruraian, dan matriks dalam sampel.

Pada uji identifikasi (analisis kualitatif), spesifisitas harus menunjukkan kemampuan untuk mengidentifikasi analit dibandingkan dengan standar. Pada uji penetapan kadar (analisis kuantitatif), spesifisitas harus mampu menetapkan kadar analit dalam sampel secara akurat (Kemenkes RI, 2020).

## 9. Ketegaran:

Ketegaran adalah ukuran kemampuan suatu prosedur yang diukur selama pengembangan metode analisis. Ketegaran tidak boleh terpengaruh dan harus tetap konstan, bahkan saat diberikan perlakuan yang disengaja pada parameter metode yang tercantum dalam dokumen.

**Tabel 5. Unsur data yang dibutuhkan untuk validasi prosedur analisis**

Karakteristik kinerja analitik	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas Deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas Kuantitasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linearitas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

Catatan : \* Mungkin dipersyaratkan tergantung pada sifat khusus dari uji (Kemenkes, 2020)

Pada tahap validasi, diperlukan sejumlah persyaratan pengujian dengan skema yang berbeda untuk setiap prosedur, mulai dari penetapan analisis dengan tingkat kepatuhan yang tinggi hingga evaluasi keseluruhan proses. Berikut adalah kategori pengujian umum yang memerlukan data validasi:

### 1. Kategori I:

Prosedur yang digunakan untuk menentukan konsentrasi kandungan utama dalam bahan aktif dalam sediaan jadi, termasuk bahan pengawet.

### 2. Kategori II:

Prosedur untuk analisis, termasuk penetapan Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ), untuk mengidentifikasi kontaminan atau cemaran pada bahan baku atau senyawa hasil degradasi dalam sediaan jadi.

**3. Kategori III:**

Prosedur analisis yang dilakukan untuk menetapkan karakteristik kinerja sediaan, seperti pelepasan obat dan disolusi.

**4. Kategori IV:**

Prosedur analisis khusus untuk identifikasi substansi tertentu.

Untuk setiap kategori, terdapat unsur data yang diperlukan yang dapat diidentifikasi dan didokumentasikan sesuai dengan tabel yang terkait. Proses validasi melibatkan langkah-langkah dan parameter yang sesuai dengan tujuan pengujian yang ditetapkan untuk masing-masing kategori tersebut.

## **G. Landasan Teori**

Akrilamida terbentuk pada proses pengolahan makanan dengan suhu tinggi seperti menggoreng dan memanggang (Sutopo, 2021). Kadar akrilamida cenderung meningkat seiring dengan peningkatan suhu dan waktu pemanasan (Butue et al., 2019). Pembentukan akrilamida terjadi pada makanan yang mengandung protein (asam amino), glukosa, dan fruktosa (karbohidrat), serta lipida, yang berfungsi sebagai prekursor akrilamida, terutama pada suhu mulai 120 °C (BPOM RI, 2018). Akrilamida, yang memiliki gugus kromofor dan auksokrom (Harahap, 2006) serta mudah larut dalam air, dapat diisolasi menggunakan pelarut polar seperti diklorometan dan etanol, di mana etanol meningkatkan kelarutan akrilamida. Metode analisis akrilamida umumnya menggunakan HPLC fase terbalik dengan kolom C18.

Food and Drug Administration pada tahun 2004 menetapkan batas maksimal konsentrasi akrilamida dalam makanan sebesar 2 g/kg karena potensi bahaya terkait dengan proses karsinogenesis melalui pembentukan glisinamida epoksida dalam tubuh.

Proses produksi keripik dan singkong goreng melibatkan pemanasan pada suhu tinggi, yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi Maillard. Akibatnya, akrilamida dapat terbentuk ketika bahan pangan yang mengandung banyak pati, seperti singkong dan kentang, mengalami proses pengolahan dengan pemanasan pada suhu tinggi, termasuk dalam metode seperti penggorengan, pemanggangan, dan bahkan pembakaran (Zhang, dkk., 2019). Suhu penggorengan yang disarankan untuk deep frying adalah antara 170° - 201°C, dan titik didih minyak adalah sekitar ±210°C.

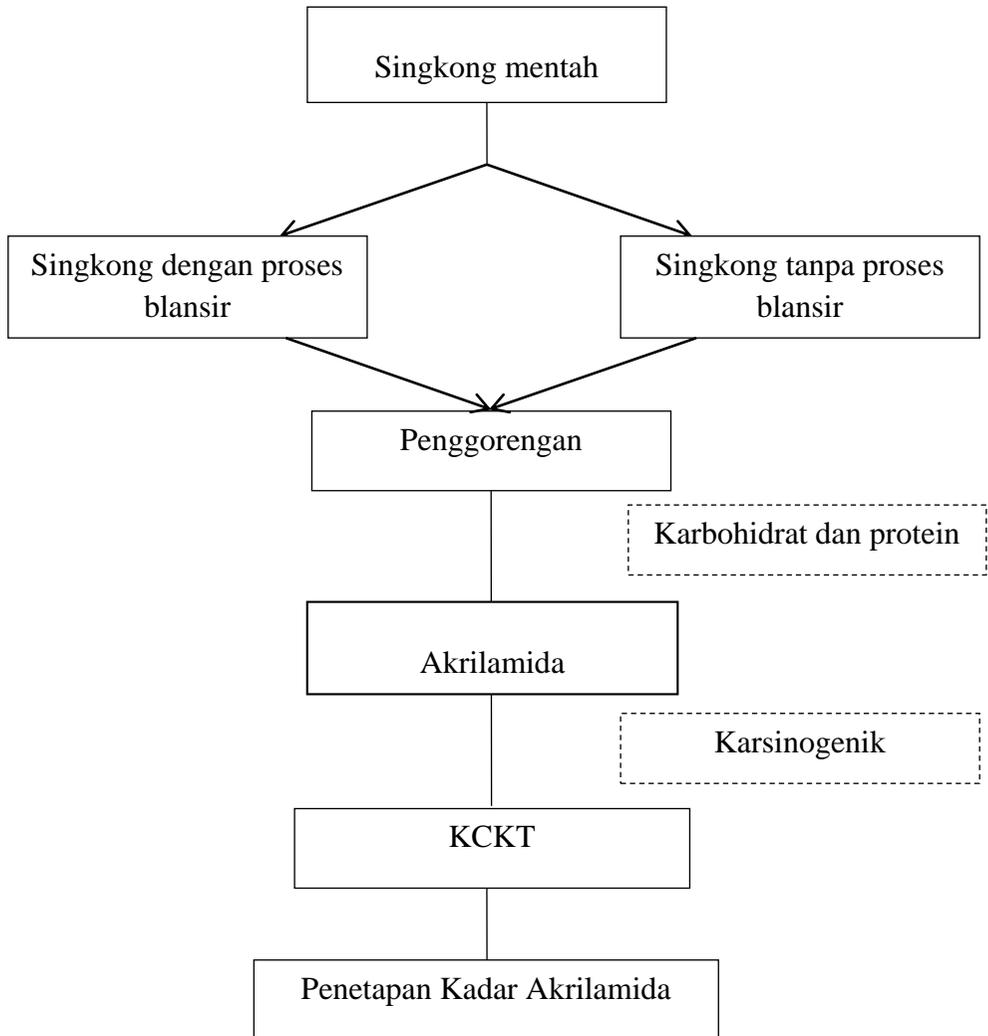
Penerapan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) tetap menjadi metode unggulan dalam pemisahan dan pemurnian akrilamida dari berbagai sampel, dengan terus mengalami perkembangan signifikan (Arum, 2023). Melalui teknik ini, identifikasi yang akurat dan pengukuran kuantitatif konsentrasi akrilamida dapat dilakukan dengan membandingkan luas puncak analit dengan luas area standar (Kusuma & Rosalina, 2021). Namun, sebelum diterapkan secara luas, validasi metode analisis menjadi langkah esensial untuk memastikan kepatuhan terhadap standar mutu yang diinginkan dalam analisis kuantitatif. Validasi tersebut mencakup uji akurasi, presisi, linieritas, rentang, Limit of Detection (LOD), dan Limit of Quantification (LOQ) (Gandjar & Rohman, 2020). Penelitian terkini, seperti yang dilakukan oleh Gunarti, Tuslinah, dan Amin (2024), terus memberikan wawasan yang berharga mengenai kandungan akrilamida dalam berbagai sampel, termasuk dalam konteks perbandingan kadar akrilamida pada minyak goreng bekas sebelum dan sesudah proses penjernihan menggunakan karbon aktif.

### **H. Hipotesis**

Berdasarkan permasalahan yang ada, dapat diajukan hipotesis dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Proses pengolahan singkong menggunakan metode penggorengan dapat menghasilkan pembentukan senyawa akrilamida.
2. Proses pengolahan singkong dengan metode penggorengan dengan dilakukan blansir dan tanpa terdapat perbedaan kadar senyawa akrilamida yang terbentuk.
3. Terdapat perbedaan kadar akrilamida yang signifikan pada proses penggorengan singkong dengan dilakukan blansir dan tanpa.

## I. Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka Konsep