

VALIDASI MODIFIKASI METODE WEIßHAAR UNTUK ANALISIS 3-MCPD ESTER DALAM MINYAK GORENG SAWIT

[Validation of Modified Weißhaar's Method for 3-MCPD Esters Analysis in Palm Oil]

Tanti Lanovia^{1,2)*}, Nuri Andarwulan^{1,3)} dan Purwiyatno Hariyadi^{1,3)}

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Pusat Riset Obat dan Makanan Badan POM-RI, Jakarta

³⁾ Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 20 September 2014 / Disetujui 30 Desember 2014

ABSTRACT

The 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 3-MCPD esters were found in any type of refined vegetable oil -mostly produced during the refining process- and recognized as emerging food contaminants. Several analytical methods have been developed and one of which was a Weißhaar's method. The study aims to validate the modified Weißhaar's method for analysis of 3-MCPD and 3-MCPD esters in refined palm oil. Ion fragments were used for identification and quantification of 3-MCPD and 3-MCPD-ds. 3-MCPD was determined by GC-MS after released from its ester by transesterification with sodium methoxide and derivatized with phenylboronic acid. The validation showed that linearity response ($r=0.994$) was observed from a linear regression by using external standard and internal standard at a concentration range of 0.008 and 0.377 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The LOD of the validated method was 0.06 $\mu\text{g g}^{-1}$ while its LOQ was 0.20 $\mu\text{g g}^{-1}$, precision (relative standard deviation, RSD) was 6.16%, and accuracy (as percentage of recovery) was in the range of 95.83-113.27%. This results indicated that the modified method was valuable and sensitive for detection of 3-MCPD and 3-MCPD esters. Using the validated method, 3-MCPD esters content of a commercial palm oil sample was determined and calculated as the difference between total 3-MCPD and free 3-MCPD, which was 13.24 $\mu\text{g g}^{-1}$. Total 3-MCPD content of several palm oils were at a concentration range of 13.94-34.52 $\mu\text{g g}^{-1}$. These results also showed that there was a correlation between 3-MCPD with diacylglyceride (DAG). Samples with DAG content gave a high test results of 3-MCPD with a coefficient of correlation of $r=0.752$.

Keywords: analytical method, Weißhaar's method, palm oil, 3-MCPD, 3-MCPD esters

ABSTRAK

Senyawa 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) dan esternya merupakan kontaminan yang umumnya terbentuk pada proses pengolahan pangan. Kontaminan ini termasuk *food emerging* yang berpotensi mempengaruhi kesehatan manusia. Beberapa metode analisis telah dikembangkan untuk penetapan kadar 3-MCPD dan esternya dan salah satunya adalah metode Weißhaar yang digunakan untuk menguji minyak safflower. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode analisis Weißhaar yang dimodifikasi dan metode ini digunakan untuk minyak goreng sawit. 3-MCPD ester dibebaskan dari esternya oleh natrium metoksida secara transesterifikasi kemudian 3-MCPD bebas diderivatisasi dengan *phenylboronic acid* dan diidentifikasi secara GC-MS dengan menggunakan fragmen ion. Validasi metode analisis yang dilakukan memberikan hasil sebagai berikut: dari persamaan regresi $y=0.076x+0.005$, y adalah rasio area baku pembandingan eksternal dan internal, x adalah konsentrasi baku pembandingan eksternal, didapatkan linearitas yang ditunjukkan oleh koefesien korelasi (r) 0.994 pada rentang kerja 0.008-0.377 $\mu\text{g mL}^{-1}$; batas deteksi pada 0.06 $\mu\text{g g}^{-1}$, batas kuantitasi pada 0.20 $\mu\text{g g}^{-1}$; presisi dinyatakan sebagai koefisien variasi sebesar 5.89%; akurasi dihitung sebagai persen rekoverti dengan nilai 95.83-113.27%. Hasil validasi metode analisis ini memenuhi kriteria yang telah dipersyaratkan. Kadar 3-MCPD ester dihitung sebagai selisih 3-MCPD total dan 3-MCPD, pada minyak goreng sawit komersial didapatkan hasil 13.24 $\mu\text{g g}^{-1}$. Penetapan kadar 3-MCPD total dalam minyak goreng sawit komersial telah dilakukan dan didapatkan hasil dengan kisaran konsentrasi 13.94-34.52 $\mu\text{g g}^{-1}$. Sampel dengan kandungan diasilgliserida yang tinggi akan memberikan hasil pengujian yang tinggi pula pada kadar 3-MCPD dengan koefesien korelasi sebesar (r) 0.752.

Kata kunci: metode analisis, metode Weißhaar, minyak goreng sawit, 3-MCPD, 3-MCPD ester

PENDAHULUAN

Senyawa 3-MCPD dan esternya merupakan kontaminan yang terdapat dalam pangan, zat ini terbentuk pada saat pembuatan dan pengolahan beberapa bahan pangan (Stadler dan Lineback, 2009). Ditemukannya 3-MCPD dan esternya dalam pangan menjadi perhatian para akademisi, pembuat kebijakan

dan pihak industri, terutama setelah Hrnccirik (2010) menemukan 3-MCPD ester dalam pangan olahan, selain semakin banyaknya bahan dan produk pangan yang diketahui mengandung kontaminan tersebut juga karena kekhawatiran akan dampaknya terhadap kesehatan.

Laporan uji toksikologi klinik pada hewan uji menyatakan bahwa 3-MCPD memberikan efek pada ginjal dan organ reproduksi hewan jantan, namun belum ada laporan tentang uji klinik dan epidemiologi pada manusia. Berdasarkan uji klinik tersebut batasan 3-MCPD dalam pangan telah ditetapkan

*Penulis Korespondensi:
E-mail: lanovia.tanti@gmail.com

dengan *tolerable daily intake* (TDI) $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ bb (berat badan) oleh *Commission Regulation* (EC) No 1881/2006 dan *European Union* menyatakan batasan maksimal 0.02 mg kg^{-1} dalam HVP dan kecap (cairan dengan 40% bahan kering). Walaupun belum ada pernyataan tentang batasan untuk 3-MCPD ester serta bukti yang menunjukkan bahwa 3-MCPD ester menyebabkan gangguan kesehatan seperti 3-MCPD, namun 3-MCPD ester tetap menimbulkan kekhawatiran, karena dianggap sebagai sumber pembentukan 3-MCPD. Selain itu ditemukan juga 3-MCPD ester dalam pangan yang kadarnya mencapai 5 sampai 396 kali lebih tinggi dari 3-MCPD (Svejkovska *et al.* 2004). *German Federal Institute for Risk Assessment* (*Bundesinstitut für Risikobewertung*, BfR) memperkirakan semua 3-MCPD ester akan dibebaskan menjadi 3-MCPD selama proses pencernaan dalam usus dan telah mengeluarkan himbauan kepada pihak industri untuk menurunkan kadar 3-MCPD ester dalam pangan (Karasek *et al.* 2010).

Mekanisme pembentukan 3-MCPD dan esternya dalam pangan belum sepenuhnya dapat dipahami. Dugaan sintesisnya adalah reaksi antara klorin dan lipid yang terjadi selama proses pengolahan, pemasakan dan penyimpanannya yang dipicu oleh pemanasan atau reaksi enzim-katalis (Watkins, 2009). Pembentukan 3-MCPD secara enzimatik diteliti dengan menggunakan model sistem yang terdiri dari lipase, minyak nabati, natrium klorida dan air, pembebasannya dari 3-MCPD ester dilakukan melalui reaksi hidrolisis yang dikatalisis oleh enzim lipase dalam pangan atau tubuh (Robert *et al.* 2004; Zelinkova *et al.* 2006). Kadarnya dalam minyak berbanding lurus dengan konsentrasi minyak dan natrium klorida. Selama proses pemanasan beberapa bahan pangan terjadi peningkatan kadar kontaminan 3-MCPD yang disebabkan oleh adanya lemak dan garam (Abu-El-Haj *et al.* 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Svejkovska *et al.* (2006) juga membuktikan bahwa 3-MCPD ester adalah komponen yang tidak stabil dan relatif mudah terurai pada pemanasan.

Pada tahun 1978 3-MCPD ditemukan pada *hydrolyzed vegetable proteins* (HVP) dan kecap, sedangkan 3-MCPD ester ditemukan dalam minyak *rapeseed* di awal tahun 1980-an. Selanjutnya kedua komponen ini ditemukan dalam beberapa pangan olahan dan minyak nabati (Watkins, 2009; Stadler dan Lineback, 2009). 3-MCPD ester ditemukan pada semua jenis minyak nabati dengan konsentrasi 0.6-14 ppm dan kandungan tertinggi terdapat pada minyak goreng sawit (Greyt, 2012). Hal ini menimbulkan kekhawatiran karena saat ini penggunaan minyak goreng sawit telah menggantikan posisi minyak kedelai yang sebelumnya menempati posisi teratas untuk penggunaannya pada proses pengolahan pangan. Berbagai pihak dengan berbagai cara telah melakukan mitigasi untuk menekan keberadaan 3-MCPD ester dalam pangan dan salah satunya adalah di bidang pengembangan metode analisis identifikasi 3-MCPD ester baik secara langsung ataupun tidak langsung.

Kandungan 3-MCPD ester yang beragam dalam minyak sawit kemungkinan dipengaruhi oleh wilayah budidaya dengan kondisi iklim, tanah dan cara tanam yang berbeda, selain itu jenis tanaman sawit, teknik panen dan pengolahan tentunya juga memberikan pengaruh. Mekanisme pembentukan 3-MCPD dan esternya dalam pangan belum sepenuhnya dapat dipahami. Dugaan sintesisnya adalah reaksi antara klorin dan

lipid yang terjadi selama proses pengolahan, pemasakan dan penyimpanan yang dipicu oleh pemanasan atau reaksi enzim-katalis (Watkins, 2009). Klorin dalam minyak goreng untuk pembentukan 3-MCPD ester ini belum dapat dipastikan sumbernya, namun ada kemungkinan klorin berasal dari bahan baku berupa bahan organik yang tidak larut dalam air (Matthaus *et al.* 2012). Dugaan lain pembentuk 3-MCPD dan esternya adalah gliserol, garam, air serta asilgliserol dan gliserol sebagai prekursor (Zelinkova *et al.* 2006). Tentunya kondisi yang berbeda akan mempengaruhi jumlah klorin dan diasilgliserol dalam minyak yang diduga sebagai prekursor pembentuk 3-MCPD dan esternya.

Berbagai pihak dengan berbagai cara telah melakukan mitigasi untuk menekan keberadaan 3-MCPD ester dalam pangan dan salah satunya adalah di bidang pengembangan metode analisis identifikasi 3-MCPD ester baik secara langsung ataupun tidak langsung. *The European Commission's Joint Research Centre* pada tahun 2009 menyelenggarakan uji profisiensi untuk menilai kemampuan laboratorium dalam melakukan pengujian 3-MCPD ester yang diikuti oleh 34 laboratorium pada 11 negara Uni Eropa, Swiss dan Makedonia. Kinerja laboratorium pada pengujian 3-MCPD ester dalam minyak zaitun menunjukkan 85% laboratorium memberikan hasil yang memuaskan sedangkan untuk minyak goreng sawit hanya 56% (Karasek *et al.* 2010). Dari hasil uji profisiensi tersebut disarankan perlu dilakukan validasi metode analisis sebelum melakukan pengujian rutin dengan menggunakan metode terpilih.

Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode analisis Weißhaar yang dimodifikasi untuk penetapan kadar 3-MCPD dan esternya dalam minyak goreng sawit dan menentukan kadar 3-MCPD dan esternya dalam minyak goreng sawit komersial yang beredar dipasaran.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah minyak goreng sawit bermerek dan curah yang diperoleh dari super market dan pasar tradisional.

Penentuan metode analisis

Metode analisis yang digunakan adalah metode Weißhaar (2008) terdiri dari 3 tahapan yaitu ekstraksi, derivatisasi dan analisis dengan kromatografi gas-spektrometri massa. 3-MCPD dibebaskan dari 3-MCPD ester secara transesterifikasi dengan natrium metoksida dalam metanol, kemudian diderivatisasi dengan PBA, selanjutnya 3-MCPD bebas ditentukan dengan GC-MS. 3-MCPD- d_5 (Fluka, Sigma-Aldrich), digunakan sebagai baku pembandingan internal. Modifikasi dilakukan pada penggunaan pelarut, isoheksan diganti dengan heksan (Merck), dan kondisi penggunaan GC-MS (Tabel 1 dan 2). Metode analisis ini dipilih berdasarkan kemudahan penerapannya di laboratorium.

Tabel 1. Parameter penggunaan GC

Kondisi Penggunaan	Metode Weiβhaar	Metode Modifikasi
GC/MS	GC-MS (Thermo Scientific)	GC-MS 320-MS (Varians)
Kolom	Rtx-5MS 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm (Restek, Varian)	yang dilengkapi <i>autosampler</i> Rtx-5MS 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm (Restek, Varian)
Suhu injector	250°C	180°C
Suhu oven	80°C (1 menit), 300°C dengan laju 10°C/menit (37 menit)	60°C (1 menit), 90°C dengan laju 6°C/menit (1 menit), 280°C dengan laju 20°C/menit (5 menit)
Gas pembawa	Helium	Helium
Aliran kolom	0.8 mL/menit	1.2 mL/menit
Penyuntikan	Splitless	Rasio split 10
Volume penyuntikan	1 μL	1 μL

Tabel 2. Parameter penggunaan MS

Kondisi Penggunaan	Metode Weiβhaar	Metode Modifikasi
Mode <i>aquisition</i>	<i>Selected Ion Monitoring</i> (SIM)	<i>Selected Ion Monitoring</i> (SIM)
Mode ionisasi	<i>Electron impact</i> (EI)	<i>Electron impact</i> (EI)
Suhu interface	-	280°C
Suhu ion source	-	200°C
<i>m/z</i>	196, 201 (analisis kuantitatif); 147, 150 (kualifikasi)	147, 150 (analisis kuantitatif); 91, 93, 196, 201 (kualifikasi)

Preparasi sampel dilakukan dengan menggunakan 100 mg sampel minyak yang dimasukkan ke dalam tabung kaca 10 mL bertutup ulir, ditambahkan 0.5 mL campuran *methyl tert-butyl ether* (MTBE) (Sigma-Aldrich) dan etil asetat (Merck) (8:2), baku internal dengan kadar 0.13 μg mL⁻¹, dicampur dan dibiarkan pada suhu kamar sekurangnya 2 jam, kemudian ditambahkan 1 mL natrium metoksida (Merck) (0.5 mol L⁻¹ dalam metanol (Merck) HPLC grade), divorteks selama 30 detik, kemudian dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran tersebut ditambahkan 3 mL heksan (Merck), 0.1 mL asam asetat glasial (Merck), dan 3 mL natrium klorida (Merck) (200 g L⁻¹), divorteks selama 30 detik. Setelah fase organik campuran tersebut dibuang, pada fase air ditambahkan 3 mL heksan dan kembali fase organik dibuang. Pada fase air ditambahkan 250 μL reagen penderivat (5 g *Phenylboronic acid* (PBA) (Sigma-Aldrich) yang dilarutkan dalam 19 mL aseton (Merck) dan 1 mL air), tabung ditutup dan panaskan pada suhu 80°C dalam penangas air selama 20 menit. Setelah didinginkan pada suhu kamar, derivat siklik fenilboronat dari 3-MCPD diekstrak dengan 3 mL heksan (Weiβhaar, 2008). Fase organik dipisahkan dan dianalisis sesuai prosedur.

Larutan baku kerja dibuat dalam satu seri pada konsentrasi tertentu, dengan cara menambahkan larutan baku pembanding eksternal pada volume tertentu yang ditambahkan kedalam 100 mg minyak goreng sawit. Perlakuan yang sama seperti sampel juga dilakukan pada larutan baku kerja dan penetapan 3-MCPD bebas, tanpa penambahan natrium metoksida saat proses preparasi. Instrumen utama yang digunakan untuk analisis adalah GC-MS 320 (Varians) yang dilengkapi dengan *autosampler*, instrumen penunjang yang digunakan antara lain penangas air dan vorteks.

Parameter penggunaan GC

GC/MS	: GC-MS 320-MS (Varians) yang dilengkapi <i>autosampler</i>
Kolom	: Kolom Rtx-5MS 30 m x 0,25 mmID x 0,25μm (Restek)
Temperatur injektor	: 180°C
Temperatur oven	: 60°C (1 menit), 90°C dengan laju 6°C/menit (1 menit), 280°C dengan laju 20°C/menit (5 menit)
Gas pembawa	: Helium
Aliran kolom	: 1.2 mL/menit
Penyuntikan	: Rasio split 10
Volume penyuntikan	: 1 μL

Parameter penggunaan MS

Mode <i>aquisition</i>	: <i>Selected Ion Monitoring</i> (SIM)
Mode ionisasi	: <i>Electron impact</i> (EI)
Temperatur interface	: 280°C
Temperatur ion source	: 200°C
<i>m/z</i> 3-MCPD	: 147 (analisis kuantitatif); 91, 196 (kualifikasi)
<i>m/z</i> 3-MCPD-d ₅	: 150 (analisis kuantitatif), 93, 201 (kualifikasi)

Validasi metode analisis

Parameter validasi yang diuji meliputi linearitas dan rentang kerjanya, spesifisitas, presisi, akurasi, batas deteksi dan kuantifikasi. Identifikasi puncak ditentukan dengan melihat waktu retensi, spektrum dan kromatogram sampel yang ditambahkan baku pembanding eksternal (Codex Stan, 2012; ICH, 2005; Magnusson dan Ornemak, 2014). Kuantifikasi dilakukan menggunakan kurva baku pembanding eksternal dengan delapan konsentrasi dan baku pembanding internal dengan konsentrasi tetap yang ditambahkan kedalam sampel (sampel *spike*). Konsentrasi baku pembanding eksternal yang digunakan 0.008-0.377 μg mL⁻¹ dan baku pembanding internal sebesar 0.13 μg mL⁻¹, konsentrasi dalam larutan akhir setelah derivatisasi (Tabel 3). Linearitas yang ditunjukkan dengan persamaan regresi $y=bx+a$ dievaluasi dengan memetakan area daerah puncak yang merupakan rasio dari area baku pembanding eksternal dan baku pembanding internal (y) terhadap konsentrasi baku pembanding eksternal (x) yang umumnya membentuk hubungan linear, sedangkan hubungan antara kedua peubah dinyatakan sebagai koefisien korelasi (r). Spesifisitas adalah kemampuan metode untuk merespon secara khusus analit yang ditentukan tetapi tidak untuk komponen lain dari matriks, namun hanya sedikit metode yang benar-benar spesifik, jadi istilah ini lebih sering digunakan untuk menyatakan bahwa parameter spesifisitas menunjukkan bahwa metode dapat digunakan untuk menentukan analit secara kuantitatif tanpa adanya gangguan, hal ini dapat dilihat pada kromatogram puncak analit yang terpisah. Presisi adalah fungsi dari konsentrasi yang menyatakan kedekatan diantara serangkaian pengukuran beberapa sampel homogen, uji dilakukan pada dua konsentrasi yang berbeda dengan enam ulangan. Akurasi merupakan kedekatan antara nilai terukur dan nilai diterima, nilai benar atau nilai referensi, ditentukan secara rekoverti

dengan penambahan baku pembanding eksternal pada atau disekitar konsentrasi target, uji dilakukan pada satu konsentrasi dengan tujuh ulangan. Batas deteksi adalah kuantitas terkecil dari analit yang memberikan tinggi puncak tiga kali *noise*, secara signifikan lebih besar dari pada kesalahan pengukuran blanko secara acak dinyatakan sebagai penjumlahan konsentrasi rerata dengan tiga kali standar deviasi dari sepuluh ulangan. Batas kuantitasi adalah kuantitas terkecil dari analit yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang memenuhi syarat, dinyatakan sebagai penjumlahan konsentrasi rerata dengan sepuluh kali standar deviasi dari sepuluh ulangan.

Penetapan kadar 3-MCPD dan esternya dalam minyak goreng sawit komersial

Penetapan kadar 3-MCPD bebas dan 3-MCPD total atau kadar setelah dilakukan hidrolisis dilakukan dengan menggunakan metode analisis yang telah divalidasi, 3-MCPD ester dihitung sebagai selisih antara kadar 3-MCPD total dengan 3-MCPD bebas. Analisis dilakukan sebanyak enam ulangan.

Penetapan kadar asam lemak bebas dan monodiasilgliserol dalam minyak goreng sawit komersial

Kadar asam lemak bebas dalam minyak goreng ditetapkan mengikuti AOAC (2005) dan penetapan kadar monodiasilgliserol mengikuti AOCS (2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode analisis

Uji pendahuluan dilakukan sebelum metode analisis divalidasi, uji ini bertujuan untuk mencari kondisi pengujian terbaik yang sesuai dengan kondisi laboratorium pengujian yang digunakan, tahapannya meliputi: penentuan pereaksi, kondisi GC-MS, waktu retensi 3-MCPD dan 3-MCPD-d₅ dan ion *m/z* yang digunakan untuk analisis kuantitatif.

Prinsip dari penetapan 3-MCPD ester adalah mengubah 3-MCPD ester menjadi 3-MCPD bebas. Tahapan yang dilakukan adalah menambahkan baku pembanding internal ke dalam sampel, kemudian dilanjutkan dengan transesterifikasi menggunakan natrium metoksida dalam metanol (metanolisis), netralisasi dan *salting out*, derivatisasi dengan PBA yang

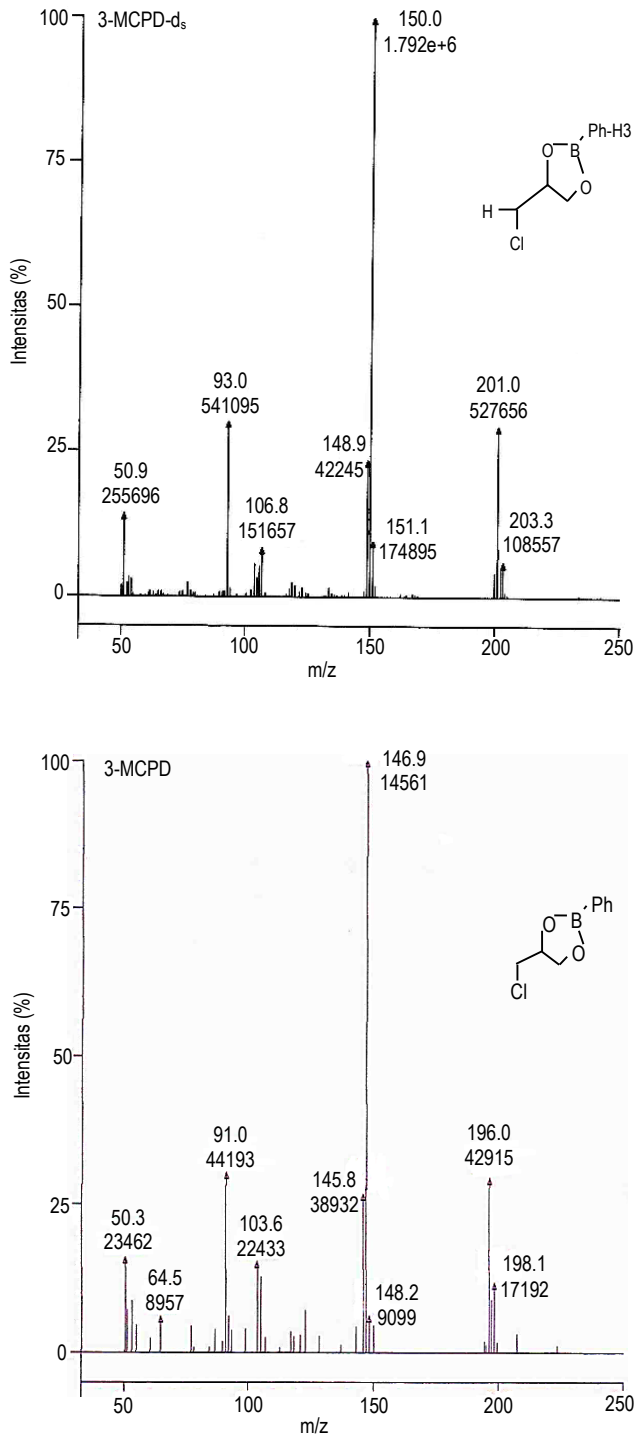
selanjutnya dianalisis secara GC-MS. Larutan baku pembanding eksternal 3-MCPD dan larutan baku pembanding internal 3-MCPD-d₅ ditambahkan minimal dua jam sebelum preparasi. Setelah sampel di preparasi kemudian analit dalam sampel ditentukan dengan detektor spektrum massa menggunakan ion *m/z* 91.147, 196 untuk 3-MCPD dan ion *m/z* 93, 150, 201 untuk 3-MCPD-d₅ (Svejkovska *et al.* 2006; Zelinkova *et al.* 2006; Weßhaar, 2008). Kromatogram yang dihasilkan diidentifikasi dengan memperhatikan respon spektrum, luas area dan gangguan pada puncak.

Intensitas spektrum terbesar pada 3-MCPD dihasilkan oleh ion *m/z* 147 3-MCPD dan ion *m/z* 150 untuk 3-MCPD-d₅. Hal ini menjadi salah satu alasan pemilihan ion tersebut untuk analisis kuantitatif, walaupun spektrum yang umumnya digunakan untuk penentuan kuantitatif adalah spektrum ion dengan berat molekul terbesar (Gambar 1). Kromatogram *total ion chromatogram* (TIC) pada mode deteksi *scan* menghasilkan luas puncak gabungan seluruh spektrum massa yang sebanding dengan konsentrasi analit, namun puncak baku pembanding internal dan eksternal tidak terpisah sempurna, maka untuk mengatasinya digunakan mode ion selektif (SIM) yang dapat memisahkan puncak analit (Gambar 2). SIM waktu siklusnya lebih pendek dari pada mode deteksi *scan*, akurasi dan presisinya lebih baik sehingga analisis kuantitatif menjadi lebih optimal (Collin *et al.* 2009).

Penentuan ion kuantitasi selain dari spektrum dapat pula menggunakan kromatogramnya, ion yang dipilih harus memiliki puncak tanpa interferensi atau sedikit mungkin gangguan serta memiliki sensitifitas tinggi yang ditunjukkan oleh luas area puncak. Kromatogram 3-MCPD pada ion *m/z* 91 terlihat puncak matriks lebih dominan dari puncak analit, pada ion *m/z* 196 tidak terlihat puncak matriks namun ada interferensi pada puncak analit, kedua sisi bagian bawah puncak analit terlihat lebih lebar sedangkan luas area puncaknya lebih kecil dibandingkan kedua ion yang lain sehingga ion kuantitatif yang dipilih adalah ion *m/z* 147 yang interferensinya paling kecil dan luas area puncaknya lebih besar. Pemilihan ion kuantitatif 3-MCPD-d₅ hanya melihat besaran luas area puncak, karena pada ketiga kromatogram tidak terlihat adanya gangguan. Ion hasil derivatisasi yang terbentuk untuk masing-masing nilai *m/z* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Konsentrasi baku pembanding eksternal dan internal

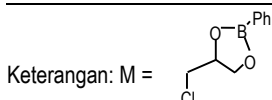
3-MCPD			3-MCPD-d ₅		
Volume (mL)		Konsentrasi	Volume (mL)		Konsentrasi
Pengambilan	Pengenceran	(ug/mL)	Pengambilan	Pengenceran	(ug/mL)
0	0	12.561	0	0	12.500
0.002	3	0.008	0.032	3	0.133
0.004	3	0.017	0.032	3	0.133
0.008	3	0.033	0.032	3	0.133
0.016	3	0.067	0.032	3	0.133
0.032	3	0.134	0.032	3	0.133
0.048	3	0.201	0.032	3	0.133
0.064	3	0.268	0.032	3	0.133
0.090	3	0.377	0.032	3	0.133



Gambar 1. Spektrum mass hasil derivatisasi PBA untuk 3-MCPD-d₅ (atas) dan 3-MCPD (bawah)

Tabel 4. Karakteristik ion (*m/z*) pada spektrum massa 3-MCPD dan 3-MCPD-d₅ terderivatisasi

	MW	M-(CH ₂ CL)-	(C ₇ H ₇)-
3-MCPD	196	147	91
3-MCPD-d ₅	201	150	93



Metode analisis tervalidasi

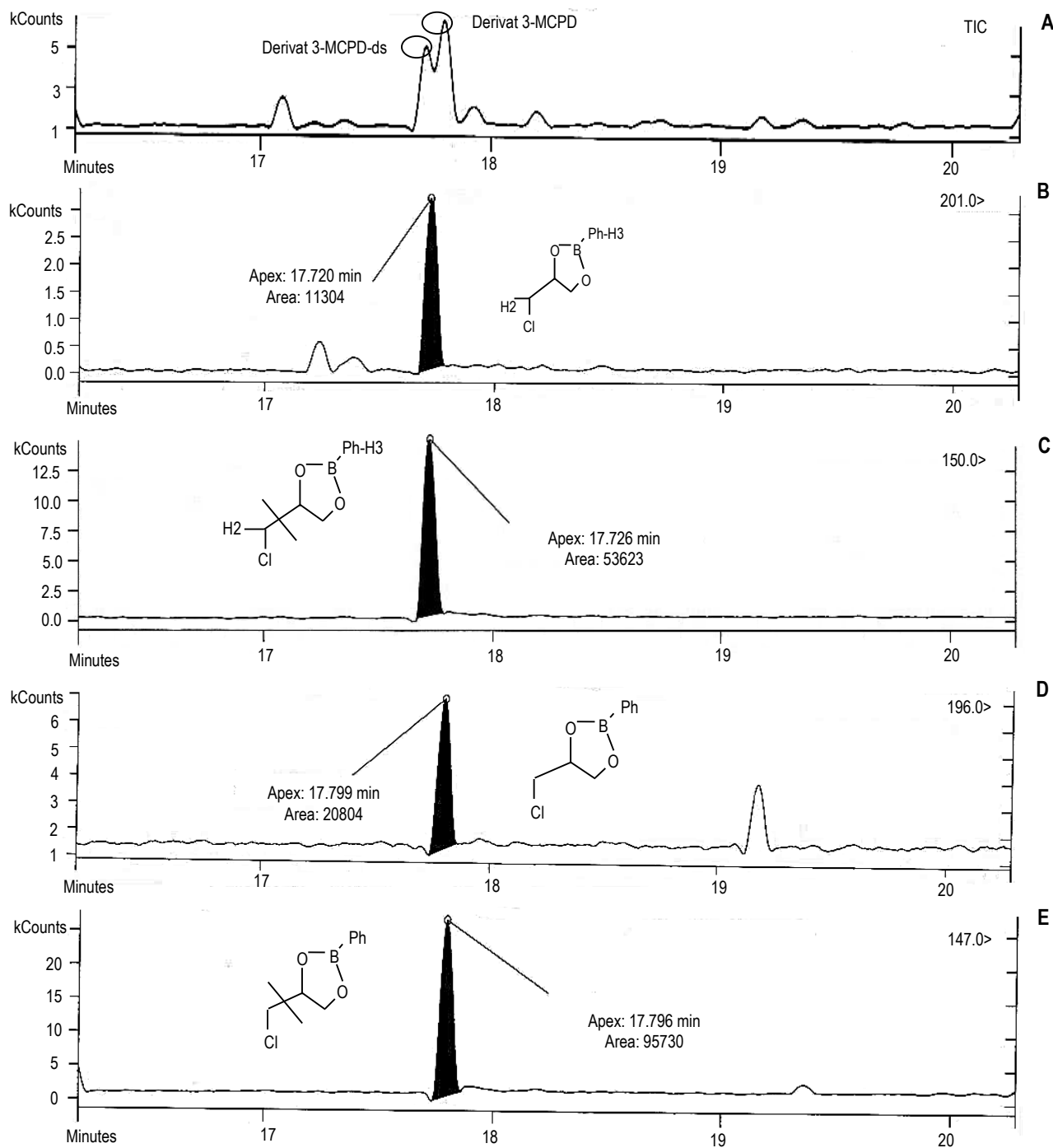
Pada metode kuantitatif perlu ditentukan rentang konsentrasi analit dimana metode dapat digunakan untuk pengujian. Hal ini merujuk pada berbagai konsentrasi analit dalam larutan yang diukur bukan dalam sampel sebenarnya. Pada penelitian ini rentang konsentrasi analit ditambahkan pada sampel sebelum dipreparasi untuk mendapatkan larutan uji dengan rentang konsentrasi tersebut, hal ini dilakukan untuk meminimalkan pengaruh matriks sampel pada penetapan kadar analit dalam sampel sebenarnya. Dalam rentang kerja yang digunakan kemungkinan ada respon yang memiliki hubungan linear dengan konsentrasi analit (Magnusson dan Ornemark, 2014). Hubungan tersebut tergambar pada kurva linearitas yang dibuat dengan menggunakan 8 tingkatan konsentrasi baku pembanding eksternal (0.008–0.377 µg mL⁻¹) dan konsentrasi tetap baku pembanding internal (0.13 µg mL⁻¹). Persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = 0.076x - 0.005$ dengan koefisien korelasi (*r*) sebesar 0.994 (Gambar 3).

Tahapan preparasi sangat mempengaruhi hasil pengujian, isolasi yang efektif akan menghasilkan analit yang terpisah dari matriksnya. Kromatogram yang dihasilkan dapat memperlihatkan puncak analit yang terpisah dari puncak-puncak lain sehingga memudahkan identifikasi dan pengukuran, bahkan pada sampel yang mengandung analit dengan konsentrasi rendah. Kromatogram yang memperlihatkan puncak tanpa interferensi bisa menyatakan bahwa metode analisis yang digunakan spesifik (Gambar 4).

Pengujian keterulangan (presisi) hanya tergantung dari sebarannya dan sama sekali tidak berhubungan dengan nilai benarnya sedangkan akurasi merupakan nilai pengukuran yang mendekati nilai benar. Akurasi dilakukan dengan uji rekovery yaitu menambahkan baku pembanding eksternal ke dalam blanko sampel dengan konsentrasi tertentu (*spike*). Limit deteksi dan limit kuantitasi dilakukan dengan menambahkan baku pembanding eksternal dengan kadar sangat rendah pada sampel blanko, namun analit masih dapat membentuk puncak yang tingginya lebih kurang 3 kali tinggi *noise*. Hasil pengujian seperti terlihat pada Tabel 5.

Kadar 3-MCPD dan esternya dalam minyak goreng sawit

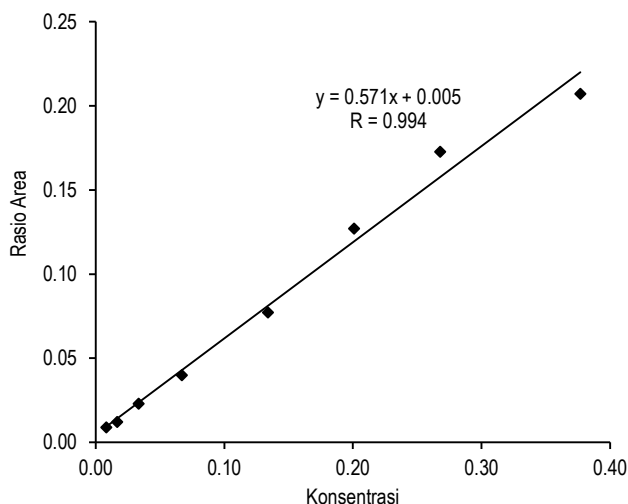
Metode analisis tervalidasi digunakan untuk menetapkan kadar 3-MCPD total dan 3-MCPD bebas dalam minyak goreng sawit komersial bermerek yang diperoleh dari pasar tradisional, hasilnya tercantum pada Tabel 6. Perhitungan 3-MCPD ester pada minyak goreng sawit ditentukan berdasarkan selisih 3-MCPD total dan 3-MCPD bebas, yaitu sebesar 13.24 µg g⁻¹. Hasil yang didapatkan mendekati kadar 3-MCPD ester sampel minyak goreng sawit pada uji profisiensi EU-JRC yang dinyatakan oleh Karasek *et al.* (2010) yaitudengan kisaran hasil 0.6–18.8 µg g⁻¹ dan laboratorium yang memenuhi nilai *z score* sebanyak 56%. Hasil ILSI (2009) juga melaporkan bahwa minyak goreng sawit mengandung 3-MCPD ester dengan kadar 4.5–13 µg g⁻¹.



Gambar 2. Kromatogram TIC derivatisasi 3-MCPD-d₅ dan 3-MCPD (A), 3-MCPD-d₅ m/z 201 (B), 3-MCPD-d₅ m/z 150 (C), 3-MCPD m/z 196 (D), 3-MCPD m/z 147 (E)

Tabel 5. Hasil uji presisi, rekovery, batas deteksi dan batas kuantitasi

	SD	KV	2/3 KV	HorRat	Persyaratan
		(%)	Horwitz (%)		
Presisi (µg g ⁻¹)	4.06	0.25	6.16	0.680	KV<2/3KV Horwitz
Rekovery (%)	95.83-113.27	6.26	6.16		HorRat 0.5-2.0 (Horwitz 2006)
Batas deteksi	0.06 (µg g ⁻¹)				10 µg g ⁻¹ , 80-115% (AOAC. 2002)
Batas kuantitasi	0.20 (µg g ⁻¹)				1 µg g ⁻¹ , 75-120% (AOAC. 2002)



Gambar 3. Kurva linearitas 3-MCPD

Analisis 3-MCPD total juga dilakukan terhadap sebelas sampel minyak goreng sawit komersial bermerek dan curah yang menunjukkan kadar 3-MCPD total bervariasi antara 13.94-34.52 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabel 6). Hal ini diduga terjadi akibat pengaruh proses pengolahan, lama waktu dan atau cara penyimpanan minyak goreng sawit. Kadar air yang tinggi dan enzim lipase yang ada dalam minyak goreng sawit selama penyimpanan minyak goreng sawit dapat membentuk asilgliserol, terutama diasilgliserol, yang akan menjadi prekursor pembentukan 3-MCPD ester (Karsulinova *et al.* 2007).

Tabel 6. Kadar 3-MCPD dan 3-MCPD ester dalam minyak goreng

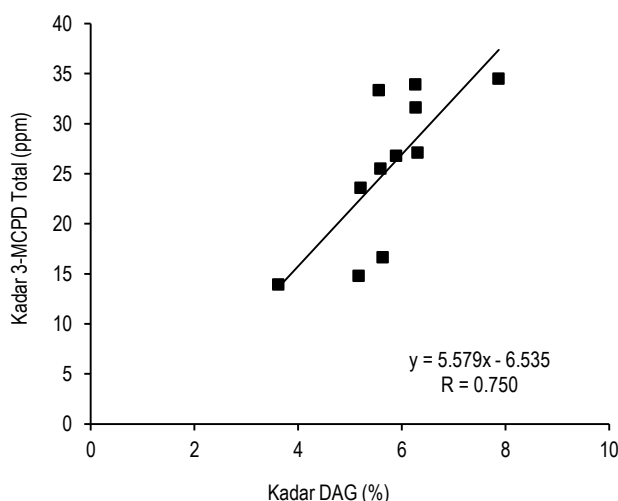
Kode Sampel	3-MCPD Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3-MCPD Bebas ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3-MCPD Ester ($\mu\text{g g}^{-1}$)
S1	15.77	3.54	12.23
S2	15.99	3.59	12.39
S3	16.86	3.79	13.08
S4	18.17	3.69	14.48
S5	17.99	3.81	14.19
S6	16.95	3.92	13.03
Rerata	16.96	3.72	13.23
SD	0.99	0.14	0.92
KV (%)	5.83	3.81	6.96
2/3 KV Horwitz (%)	6.97	8.75	7.23

Sebelas sampel minyak goreng sawit yang telah diketahui konsentrasi 3-MCPD totalnya juga ditentukan kadar diasilgliserida (DAG), triasilgliserida (TAG) dan kandungan asam lemak bebasnya (ALB). Penentuan ini dilakukan untuk melihat korelasinya dengan kandungan 3-MCPD dan esternya dalam minyak goreng sawit. seperti terlihat pada Gambar 5. Dugaan adanya korelasi antara diasilgliserol dan pembentukan 3-MCPD dan esternya tidak terlihat secara nyata, namun disini lain dengan membandingkan antara konsentrasi diasilgliserol dan konsentrasi 3-MCPD total pada 11 sampel minyak goreng sawit ini, secara umum konsentrasi 3-MCPD total meningkat dengan bertambahnya konsentrasi diasilgliserida. Diasilgliserida memperlihatkan korelasinya dengan kandungan 3-MCPD total, sampel dengan diasilgliserida tertinggi 7.87% mengandung 3-

MCPD total sebanyak 34.517 $\mu\text{g g}^{-1}$ sementara sampel dengan diasilgliserida terendah 3.62% mengandung 3-MCPD total sebanyak 13.94 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabel 7 dan Gambar 5).

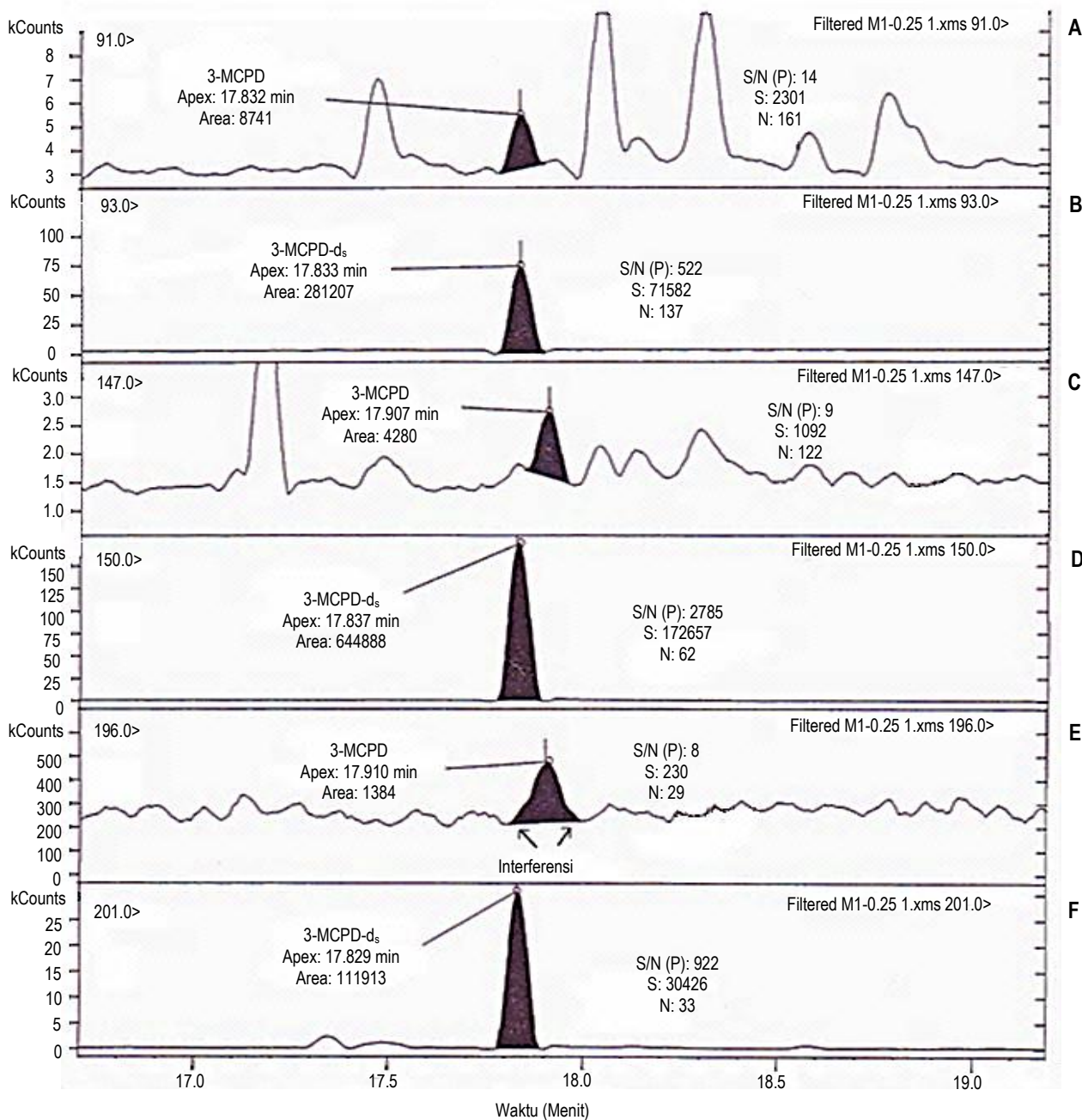
Tabel 7. Kadar 3-MCPD total, DAG, TAG dan ALB dalam minyak goreng sawit komersial

No Sampel	3-MCPD total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	DAG (%)	TAG (%)	ALB (%)
1	23.60	5.21	94.80	0.19
2	14.79	5.17	94.83	0.17
3	25.50	5.59	94.34	0.15
4	34.52	7.87	92.13	0.11
5	26.79	5.90	94.10	0.13
6	33.36	5.56	94.44	0.13
7	27.10	6.31	93.69	0.13
8	31.62	6.27	93.72	0.23
9	16.66	5.63	94.37	0.18
10	33.92	6.26	93.74	0.11
11	13.94	3.62	96.38	0.11
Rerata	25.62	5.76	94.23	0.15
SD	7.65	1.03	1.029	0.04



Gambar 5. Hubungan antara diasilgliserida dengan 3-MCPD yang terkandung dalam minyak goreng sawit

Greyt (2010) pada penelitiannya menyatakan bahwa diasilgliserida memiliki korelasi dengan 3-MCPD ester, jika kadar diasilgliserida lebih besar dari 4%, maka kadar 3-MCPD ester umumnya lebih besar dari 5 ppm. Penentuan 3-MCPD bebas atau prosedur preparasi sampel tanpa metanolisis tidak dilakukan pada 11 sampel minyak goreng sawit sehingga tidak bisa ditentukan konsentrasi 3-MCPD bebas. Pada 10 dari 11 sampel minyak goreng sawit kandungan diasilgliseridanya lebih dari 4%, kemungkinan besar kandungan 3-MCPD esternya lebih dari 5 ppm karena konsentrasi 3-MCPD total 13.94-34.62%, dimana konsentrasi 3-MCPD ester dalam pangan lebih tinggi dari 3-MCPD bebas.



Gambar 6. Kromatogram 3-MCPD ion m/z 91 (A), 3-MCPD-dsion m/z 93 (B), 3-MCPD ion m/z 147 (C), 3-MCPD-dsion m/z 150 (D), 3-MCPD ion m/z 196 (E), dan 3-MCPD-dsion m/z 201 (F)

KESIMPULAN

Modifikasi metode Weiβhaar yang dilakukan pada penelitian ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi kadar 3-MCPD dan esternya dalam minyak goreng sawit. Hasil validasi metode analisis 3-MCPD dalam minyak goreng sawit telah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linieritas, dan spesifisitas yang ditunjukkan oleh persamaan linear (r) 0.994, rentang kerja dengan konsentrasi 0.008 sampai 0.377 $\mu\text{g mL}^{-1}$, batas deteksi 0.06 $\mu\text{g g}^{-1}$, batas kuantitasi 0.20 $\mu\text{g g}^{-1}$, presisi (koesisien variasi (KV)) 6.16%, dan akurasi (persen rekovery) 95.83-113.27%.

Metode analisis tervalidasi dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar 3-MCPD dan esternya pada minyak goreng sawit komersial. Sampel minyak goreng sawit yang dianalisis pada penelitian ini diperoleh kadar 3-MCPD total sebesar 16.96 $\mu\text{g g}^{-1}$, 3-MCPD sebesar 3.72 $\mu\text{g g}^{-1}$, sedangkan 3-MCPD ester bisa dihitung berdasarkan selisih antara kadar 3-MCPD total dan 3-MCPD sebesar 13.24 $\mu\text{g g}^{-1}$. Sebelas sampel yang diuji berdasarkan metode analisis tervalidasi didapatkan jumlah 3-MCPD total yang diperoleh berkisar antara 13.94-34.52 $\mu\text{g g}^{-1}$. Hasil analisis memperlihatkan adanya korelasi antara konsentrasi 3-MCPD dalam sampel dengan kandungan diasilgliserida. Sampel dengan kandungan diasilgliserida tinggi

akan memberikan hasil pengujian yang tinggi pula terhadap 3-MCPD, hubungan ini dinyatakan dengan koefisien korelasi sebesar (r) 0.752.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Assosiation of Official Agricultural Chemists, Official Method. 2005. AOAC official method 940.28: Fatty Acid (Free) in Crude and Refined Oils. Official methods of analysis of AOAC International. 18th edition. Chapter 41, p. 12-13.
- [AOCS] American Oil Chemist's Society, Official Method. 2003. AOCS official method Cd 11b-91: Determination of Mono- and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography. Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, p. 1-5.
- Abu-El-Haj S, Bogusz MJ, Ibrahim Z, Hassan H, Al Tufail M. 2007. Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1,3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS. *Food Control* 18: 81-90. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.08.014.
- Codex Stan. 2010. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed. Codex standard 193-1995. http://www.codexalimentarius.net/input/download/standards/17/CXS_193e.pdf. [09 Maret 2013].
- Collin OL, Zimmermann CM, Jackson GP. 2009. Fast gas chromatography negative chemical ionization tandem mass spectrometry of explosive compounds using dynamic collision-induced dissociation. *Int J of Mass Spectrometry* 279: 93-99. DOI: 10.1016/j.ijms.2008.10.009.
- Magnusson B, Ormestad U. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. Eurachem Guide.
- Greyt. 2010. Development in edible oil refining for the production of high quality food oils. http://www.aocs.org/files/ResourcesPDF/refining_desmet_ballestra.pdf. [02 Desember 2012].
- Greyt. 2012. Review on 3-MCPD and glycidyl esters in vegetable oils and fats. [http://aocs.files.cms-plus.com/ResourcesPDF/MCPD-GE-mitigation-AOCS-2012\(DGW\)-final.pdf](http://aocs.files.cms-plus.com/ResourcesPDF/MCPD-GE-mitigation-AOCS-2012(DGW)-final.pdf). [02 Desember 2012].
- Horwitz W, Albert R. 2006. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J AOAC Int* 89: 1095-109.
- Hrcirik K. 2010. 3-MCPD ester formation in vegetable oil refining current state of knowledge. http://www.ovid-verband.de/fileadmin/user_upload/ovid-verband.de/downloads/Unilever_Hrcirik.pdf [26 November 2012].
- [ICH] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005. Validation of analytical procedures. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Product/Guidelines/Quality/Q2R1/Step4/Q2R1Guideline.pdf [23 Maret 2011].
- [ILSI] International Life Sciences Institute. 2009. 3-MCPD esters in Food Products. Summary Report of a Workshop held in February 2009 in Brussels, Belgium.
- Karasek L, Wenzl T, Ulberth F. 2010. Profisensy Test on The Determination of 3-MCPD Esters in Edible Oil. Luxembourg: Publication Office of the European Union. DOI: 10.2787/2587.
- Karsulinova L, Folprechtova B, Dolezal M, Dostalova J, Velisek J. 2007. Analysis of the lipid fractions of coffee creamers, cream aerosol, and bouillon cubes for the their health risk associated constituents. *Czech J Food Sci* 25: 257-264.
- Matthaus B, Freudenstein A, Vosmann K, Pudel F, Rudolph T, Franke K, Strijowski U. 2012. Mitigation of 3-MCPD esters in refined vegetable oils. <http://www.bakingbiscuit.com/id-2012-01-sweet-baking/articles/mitigation-of-3-mcpd-esters-in-refined-vegetable-oils.html>. [20 Desember 2012].
- Robert MC, Oberson, JM, Stadler RH. 2004. Model studies on th formation of monochloropropanediols in the presence of lipase. *J Agr Food Chem* 52: 5102-5108. DOI: 10.1021/jf049837u.
- Stadler RH, Lineback DR. 2009. Process-Induced Food Toxicants. Occurrence, Formation, Mitigation and Health Risks. A John Wiley & Sons, Incc., Publication. Hoboken, New Jersey.
- Svejkovska B, Dolezal M, Velisek J. 2006. Formation and decomposition of 3-chloropropane-1,2-diol esters in models simulating processed foods. *Czech J Food Sci* 24: 172-179.
- Svejkovska B, Novotny O, Divinova V, Reblova Z, Dolezal M, Velisek J. 2004. Ester of 3-chloropropane-1,2-diol in foodstuffs. *Czech J Food Sci Czech* 5: 190-196.
- Watkins C. 2009. Chloroesters in Foods: An Emerging Issue. *Inform Magazine*. April edition. AOCS. Urbana.
- Weißhaar R. 2008. Determination of total 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in edible Oils by cleavage of MCPD esters with Sodium Methoxide. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 183-186. DOI: 10.1002/ejlt.200700197.
- Zelinkova Z, Svejlkovska B, Velisek J, Dolezal M. 2006. Fatty acids esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Addit Contam* 23: 1290-1298. DOI: 10.1080/02652030600887628.