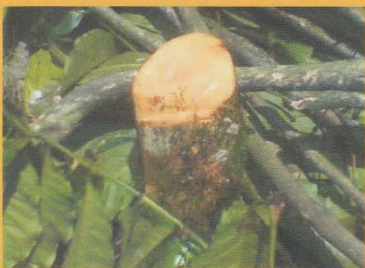




PROSIDING SEMINAR HASIL-HASIL PENELITIAN INSTITUT PERTANIAN BOGOR 2011



**OPTIMASI REDUKSI POLISIKLIK AROMATIK HIDROKARBON
DALAM MAKANAN BAKAR KHAS INDONESIA DENGAN
MEMANFAATKAN BUMBU LOKAL SERTA PENGATURAN JARAK
DAN LAMA PEMANASAN MENGGUNAKAN *RESPONSE SURFACE
METHODOLOGY***

(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Reduction in Traditional Indonesian Grilled Food with Optimization of Local Seasoning and its Heating Process Using Response Surface Methodology)

Hanifah Nuryani Lioe, Yane Regiana, Rangga Bayuharda Pratama
Dep. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

ABSTRAK

Polisiklik aromatik hidrokarbon telah diketahui luas sebagai komponen yang bersifat karsinogenik, diantaranya benzo(a)piren (BAP) dan dibenzo(a,h)antrasen (DBA) dikenal sebagai komponen yang paling toksik. Komponen ini dapat terbentuk melalui pembakaran yang tidak sempurna dari kayu, arang dan senyawa organik selama pembakaran daging dan ikan. Tujuan penelitian adalah menentukan proses pembakaran (jarak dan lama pemanasan) dan jumlah bumbu yang optimum untuk mereduksi kandungan PAH dalam daging ikan dan ayam bakar. Komponen PAH diekstrak dengan menggunakan teknik *tandem solid phase extraction (tandem SPE)* dan HPLC-UV (dengan kolom C18, fase gerak 80% asetonitril dan detektor MWD). Metoda optimasi yang digunakan adalah *response surface methodology (RSM)* berdasarkan desain Box-Behnken menggunakan software Design Expert® 7. Linearitas dengan adisi standar dalam sampel, limit deteksi, limit kuantitasi, kesesuaian sistem, akurasi dengan uji rekoveri, dan presisi dari metoda analisis PAH, masing-masing adalah 0,96–0,97, 0,03–0,04 µg/mL, 0,09–0,11 µg/mL larutan uji, 0,57–1,59% (< 2%), 123–126%, and 12–15% . Metoda yang telah divalidasi digunakan dalam penentuan komponen PAH (BAP dan DBA) dalam makanan bakar yang telah mengalami perlakuan sesuai dengan desain RSM. Total PAH dalam daging ikan bakar tanpa bumbu dapat mencapai 193 ng/g, sedangkan dalam ayam bakar tanpa bumbu mencapai 226 ng/g. Dengan menggunakan RSM, diketahui perlakuan optimum untuk mendapatkan tingkat PAH total yang tidak terdeteksi dalam ikan bakar adalah pada jarak pembakaran 7,3 cm, lama pemanasan 31,5 min dan jumlah bumbu 7,40 % dari berat ikan, sedangkan hal yang sama pada ayam bakar dicapai pada jarak pembakaran 6,8 cm, lama pemanasan 28,0 min dan jumlah bumbu 8.69 %. Bumbu yang dipakai adalah bumbu kuning yang terdiri dari bawang putih, bawang merah, lengkuas, jahe, kunyit, kemiri, merica dan garam dengan komposisi yang biasa dipakai oleh pedagang lokal. Warna ikan bakar yang dihasilkan pada kondisi optimum tersebut mempunyai nilai L, a, b dan Hue masing-masing 48,03; 4,2; 19,88; dan 77,96. Warna ayam bakar pada kondisi perlakuan optimum memiliki nilai L, a, b dan Hue berturut-turut 31,65; 9,29; 18,15; dan 62,21. Dengan demikian penggunaan bumbu pada kisaran konsentrasi 7 sampai 9% dari berat ikan/ayam, jarak pembakaran 7 cm, dan lama pemanasan 28,0 sampai 31,5 min dapat mereduksi secara signifikan kandungan PAH dalam ikan dan ayam bakar.

Kata kunci: Polisiklik aromatik hidrokarbon, optimasi pembakaran daging, SPE, HPLC-UV, *response surface methodology*.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been widely known as carcinogenic compounds with benzo(a)pyrene (BAP) and dibenzo(a,h)antracen (DBA) as the most toxic ones. This compound formed through incomplete combustion of wood, charcoal, and organic compounds during grilling of meat, chicken, or fish. The objective of this study is to discover the optimum grilling process, distance and heating time of grilling process and the amount of seasoning used, to reduce the amount of PAH formed during grilling of fish and chicken. PAHs were extracted using a tandem solid phase extraction technique and HPLC-UV (using C18 column, 80% acetonitrile, and multiwavelength detector or MWD). The method used in optimization was response surface Box-Behnken design using Design Expert® 7 software. Linearity with standard addition in sample, limit of detection, limit of quantitation, system suitability, accuracy by recovery test and precision of the analytical method were performed at 0.96–0.97, 0.03–0.04 µg/mL, 0.09–0.11 µg/mL test solution, 0.57–1.59% (< 2%), 123–126%, and 12–15%. The validated method was then used for the determination of PAHs (BAP and DBA) in grilled fish and chicken from some treatments following the response surface methodology (RSM) design. The total PAHs content in grilled fish without seasoning treatment can reach 193 ng/g, while that in grilled chicken 226 ng/g. Using the RSM in this study, it is known that the optimum treatment for grilled fish to have an undetected level of PAHs was reached at the grilling distance of 7.3 cm, heating time of 31.5 min and seasoning amount of 7.40 %, while that for grilled chicken was 6.8 cm, 28.0 min and 8.69 %, respectively. The seasoning consists of garlic, shallot, galangal, ginger, turmeric, candle nut, pepper and salt with a composition normally found at the local food seller. Color properties of grilled fish at the optimum condition were L value 48.03, a value 4.2, b value 19.88, and score of Hue 77.96, while the color properties of grilled chicken were 31.65, 9.29, 18.15, and 62.21, respectively. The use of seasoning at a range of 7 to 9% of fish/chicken weight, grilling distance at c.a. 7 cm and length of grilling time 28.0 to 31.5 min can significantly reduce PAHs contents in the grilled foods.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbon, meat grilling optimization, SPE, HPLC-UV, response surface methodology.

PENDAHULUAN

Data kesehatan masyarakat di Indonesia menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan penderita kanker yang terus meningkat. Selain bahan tambahan pangan yang dicurigai berpengaruh terhadap angka kenaikan tersebut, meningkatnya trend gaya hidup masyarakat perkotaan mengkonsumsi menu makanan yang dibakar/dipanggang baik di rumah maupun di restoran atau rumah makan diduga menjadi salah satu penyebabnya. Telah dibuktikan oleh para ahli bahwa dalam makanan yang mengalami pemanasan pada suhu tinggi melalui pemanggangan atau pembakaran dapat terbentuk komponen karsinogenik seperti polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) dan heterosiklik aromatik amin (HAA). Kedua komponen tersebut lebih mudah ditemukan pada makanan berprotein

tinggi seperti daging dan ikan yang dibakar/dipanggang. Dalam usulan ini komponen PAH menjadi fokus penelitian reduksi komponen karsinogenik dalam makanan tersebut.

Komponen PAH adalah kelompok dari hampir 10.000 senyawa, tetapi hanya beberapa diantaranya yang terdapat dalam jumlah yang nyata dalam makanan dan yang paling bersifat karsinogenik serta paling banyak diteliti, yaitu benzo(a)piren (BAP). Setelah itu terdapat 14 komponen PAH lain yang bersifat karsinogenik, diantaranya dibenzo(a,h)antrasen (DBA) yang juga memiliki faktor toksisitas tinggi. Keberadaannya dalam makanan dapat ditolerir hingga batas 10 µg/kg atau 10 ppb, menurut legislasi pangan di Uni Eropa. Analisis pada batas yang sangat rendah tersebut membutuhkan instrumen yang cukup sensitif dan persiapan sampel yang hati-hati, ditambah fakta bahwa komponen PAH mempunyai struktur atau sifat kimia yang mirip dengan matriks sampel yang kaya protein sehingga memerlukan proses *clean up* yang efektif. Penelitian mengenai pengembangan dan validasi metode deteksi dan kuantifikasi komponen PAH menggunakan HPLC-UV (dengan instrumen HPLC-MWD) dan persiapan sampel dengan tandem SPE (*solid phase extraction*) perlu dilakukan. Hasilnya digunakan untuk penelitian lanjutan untuk mempelajari optimasi reduksi komponen karsinogenik PAH dalam makanan bakar/panggang. Instrumen HPLC-UV dipilih dalam studi ini karena instrumen ini banyak tersedia di laboratorium analisis dan penelitian di Indonesia, sehingga apabila metode analisis dan penelitian telah dapat dikembangkan, maka metode ini mudah diadopsi oleh laboratorium analisis atau lembaga/badan penelitian lainnya.

Reduksi komponen toksik atau karsinogenik juga menjadi concern masyarakat dunia dewasa ini, baik reduksi pada proses pembentukannya maupun reduksi jumlah awalnya. Reduksi komponen PAH dapat dilakukan pada saat pengolahan makanan, sehingga memungkinkan laju pembentukan komponen tersebut terhambat. Makanan khas Indonesia yang sering menggunakan bumbu dan rempah diduga menguntungkan dalam proses reduksi komponen PAH karena bumbu dan rempah dapat mempunyai sifat antioksidatif yang berpengaruh terhadap terbentuknya PAH karena proses pirolisis. Penghambatan proses pirolisis ini juga diduga dapat dilakukan dengan mengatur lamanya pemanasan sehingga

intensitas proses pirolisis dapat dikurangi dan dengan demikian jumlah terbentuknya komponen PAH dapat direduksi. Dengan demikian optimasi penerapan ketiga perlakuan, yaitu penambahan bumbu/rempah dan pengaturan jarak serta lama proses pembakaran daging, perlu diteliti.

Untuk dapat mengetahui optimasi dari dua atau lebih respons, metode statistik *response surface methodology* (RSM) dapat digunakan. Oleh karena itu melalui penelitian ini dikembangkan teknik analisis PAH dengan HPLC-UV dalam makanan bakar khas Indonesia, dalam hal ini dipilih sampel ikan dan ayam bakar, serta standar PAH yang digunakan adalah BAP dan DBA. Selanjutnya dengan menggunakan RSM diteliti mengenai jarak pembakaran, lama pemanasan dan jumlah bumbu yang optimal sehingga memberikan resiko paling rendah dengan kandungan PAH yang tidak terdeteksi dalam makanan bakar tersebut. Pengembangan teknik analisis ini berguna untuk harmonisasi metode analisis PAH dengan HPLC-UV di Indonesia dan dapat membantu sebuah laboratorium jasa analisis melakukan analisis PAH atas permintaan kliennya. Informasi hasil penelitian ini juga dapat berkontribusi dalam upaya pemerintah Indonesia membentuk Jejaring Keamanan Pangan.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Sampel makanan berupa daging ayam bagian dada dan ikan mujair dengan berat per unit sampel 250-300 gram, bumbu kuning (terdiri dari kunyit, lengkuas, bawang putih, bawang merah, kemiri, merica, garam, dan jahe) yang digunakan untuk penyiapan ayam bakar dan ikan bakar, standar komponen PAH, yaitu benzo(a)piren (BAP) dan dibenzo(a,h)antrasen (DBA), asetonitril HPLC-grade, diklorometan p.a., toluena p.a., n-heksana p.a., akuades Milli-Q grade, NaOH p.a., kolom *Solid Phase Extraction*, yaitu kolom ekstrelut (*diatomaceous earth*), kolom PRS (*propylsulphonic acid silica*), dan kolom *silica gel*. Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas, pipet mikro, alat pembakaran dengan menggunakan arang untuk penyiapan ikan bakar dan ayam bakar dan *food processor*. Sedangkan peralatan yang digunakan untuk analisis PAH adalah instrumen HPLC Agilent

1200 Series (Agilent Technologies, USA) dengan detektor MWD (UV/Vis) dan kolom Zorbax ODS (C18) dengan panjang 15cm, diameter 4.6 mm dan ukuran partikel 5 μm .

Metode

Penelitian dilakukan dalam dua tahapan. Tahapan pertama adalah validasi metode ekstraksi PAH (secara simultan untuk BAP dan DBA) dengan *Solid Phase Extraction*. Tahapan kedua adalah penentuan PAH pada ikan dan ayam bakar dengan melakukan pengujian pada kombinasi tiga taraf pembumbuan, jarak dan lama pemanasan. Penentuan kombinasi pembumbuan, lama dan jarak pemanasan didapatkan dengan *Response Surface Methodology* (RSM).

1) Tahap Pertama: Validasi metode ekstraksi PAH

Validasi metode analisis *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) dilakukan dengan cara melakukan uji linearitas dengan standar adisi dalam sampel, uji limit deteksi dan limit kuantitasi, uji kesesuaian sistem, akurasi uji *recovery*, dan uji presisi atau repeatabilitas. Validasi dilakukan pada metode dari mulai tahap ekstraksi dengan *Solid Phase Extraction* sampai analisis PAH dengan menggunakan HPLC-UV.

2) Tahap Kedua: Efek kombinasi variasi pembumbuan, lama pemanasan, dan jarak api terhadap kadar PAH ikan dan ayam bakar

Formulasi bumbu ikan dan ayam bakar dilakukan dengan menggunakan bumbu kuning yang sudah umum digunakan oleh pedagang ikan dan ayam bakar umumnya. Penentuan kombinasi formula bumbu, jarak pemanasan dan lama pemanggangan dilakukan dengan menggunakan desain *Response Surface Methodology* (RSM) dengan variabel independen seperti terlihat pada Tabel 1. Jumlah ulangan dan pengacakan didapat melalui program Design Expert[®] 7. Presentase formula bumbu merupakan perbandingan jumlah bumbu dengan berat basah daging ikan maupun ayam.

Ikan yang digunakan adalah ikan bawal berukuran 250-300 gram. Ayam yang digunakan adalah ayam negeri berukuran 250-300 gram. Respon yang digunakan untuk optimasi proses pembakaran adalah konsentrasi BAP, DBA dan

total PAH, kadar air, dan intensitas warna. Tahap akhir adalah verifikasi dari kombinasi perlakuan yang dihasilkan dari percobaan.

Tabel 1. Variabel independen yang dipakai dalam desain RSM.

Simbol	Variabel Independen	Kode Level	
		-1	+1
X1	Kombinasi bumbu/rempah	0%	15%
X2	Jarak Pemanasan	2 cm	8 cm
X3	Lama Pemanasan	28 menit	40 menit

- **Ekstraksi dan Clean-up Komponen PAH dengan teknik Gabungan SPE (Solid Phase Extraction)**

Masing masing sampel daging, baik ayam bakar maupun ikan bakar, dihomogenkan dengan menggunakan food processor. Kemudian ditimbang sebanyak 1 gram daging lalu dilarutkan dalam 1 mL larutan NaOH 1 M dingin untuk proses saponifikasi. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam 1.5 gram ekstrelut, diaduk rata lalu diisikan ke dalam kolom *Solid Phase Extraction-Propylsulphonic acid silica* (SPE-PRS) dan sampel dielusi dengan fase gerak 12 mL diklorometan yang mengandung 5% toluen. Untuk membantu proses ekstraksi digunakan vacuum chamber.

Ekstrak diklorometan yang didapat kemudian diuapkan dengan gas nitrogen pada suhu ruang dan residu yang tertinggal dilarutkan dalam 2x1 mL n-heksana. Setelah itu dipersiapkan kolom berisi silika gel yang telah teraktivasi untuk ekstraksi berikutnya. Aktivasi silika gel dilakukan dengan memanaskan silika gel dalam oven pada suhu 200 °C selama 12 jam lalu kolom dielusi dengan 5 mL n-heksana sebelum digunakan untuk ekstraksi. Fraksi PAH dalam n-heksana kemudian diekstraksi ke dalam kolom tersebut dengan menggunakan eluen campuran n-heksana dan diklorometan 60:40 (v/v) sebanyak 12 mL. Ekstrak PAH yang didapat kemudian diuapkan dengan gas nitrogen pada suhu ruang. Ekstrak PAH kemudian dilarutkan dalam 2x0.5 mL acetonitril dan dipindahkan ke dalam vial untuk kemudian diuapkan pelarutnya dengan gas nitrogen pada suhu ruang. Residu yang tertinggal dalam vial kemudian dilarutkan dengan 200 µL larutan standar PAH 2.5 ppm. Sampel kemudian dianalisis kandungan PAH-nya dengan

HPLC-MWD yang diset pada panjang gelombang UV (selanjutnya disebut HPLC-UV).

- **Analisis Komponen PAH dengan Menggunakan HPLC-UV**

Analisis menggunakan HPLC Agilent 1200 series dengan detektor MWD pada panjang gelombang UV dilakukan secara isokratik mengikuti kondisi pada Tabel 2.

Tabel 2. Kondisi operasi analisis komponen PAH dengan HPLC-UV.

Kriteria	Kondisi
Kolom	C18 (ODS), ukuran partikel pendukung 5 μ m, panjang 15 cm, diameter dalam 4.6 mm
Suhu running	Suhu ruang
Fase gerak	Asetonitril-aquades MilliQ (80:20, v/v), isokratik
Laju aliran fase gerak	1.0 mL/menit
Deteksi	UV 280 nm
Sampel loop	20 L

HASIL DAN PEMBAHASAN

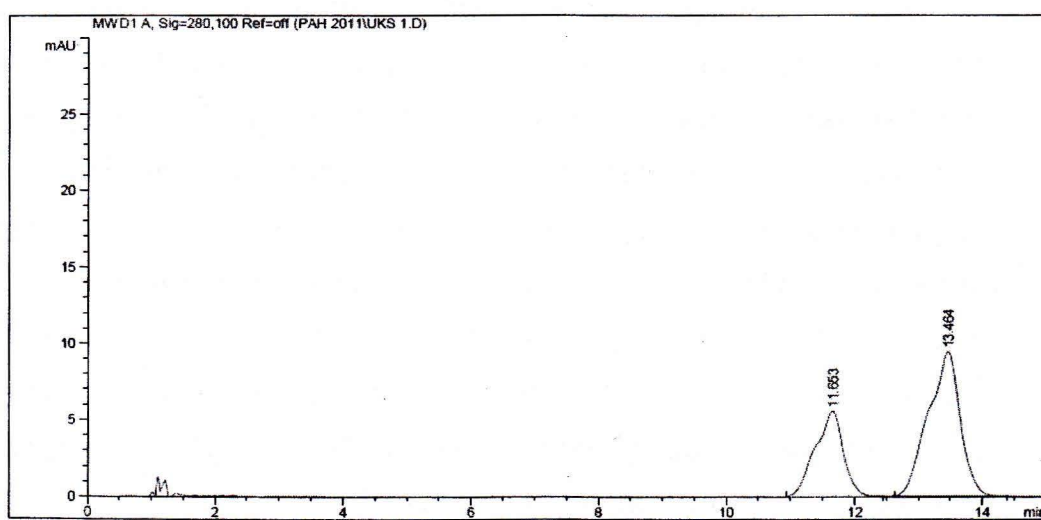
- **Validasi Metode Analisis PAH**

Validasi metode analisa PAH dengan menggunakan teknik ekstraksi dan clean-up dengan tandem SPE (SPE extrelut), SPE kolom PRS (*Propylsulphonic acid silica*) serta SPE kolom silica gel telah dilakukan. Validasi diperlukan karena PAH dalam sampel makanan umumnya berada dalam jumlah sedikit (trace). Nilai limit deteksi (LOD) dan LOQ, linearitas metode, uji kesesuaian sistem, akurasi dan presisi dengan uji recovery tersaji dalam Tabel 3.

Kromatogram campuran standar BAP dan DBA terlihat pada Gambar 1 sebagai dua puncak yang terpisah pada menit ke 11.66 untuk BAP dan 13.45 untuk standar DBA. Hal ini menandakan analisa senyawa BAP dan DBA dapat dilakukan secara simultan pada sistem HPLC yang digunakan dalam penelitian ini.

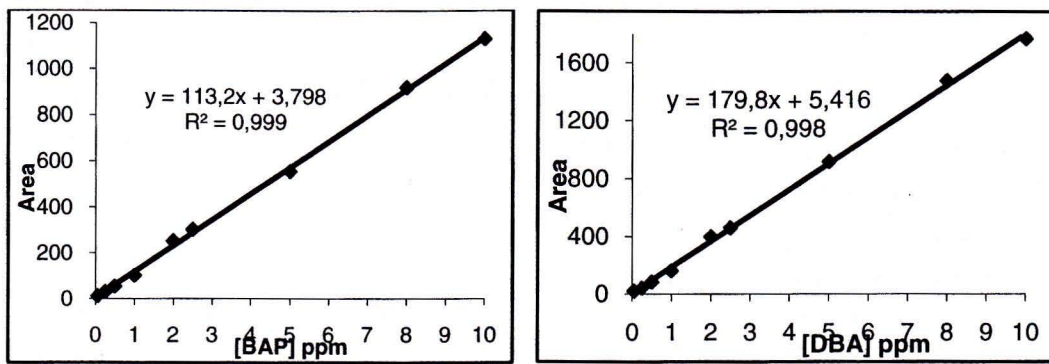
Tabel 3. Hasil uji validasi metode analisis PAH dengan menggunakan standar BAP dan DBA.

Kriteria	Nilai untuk BAP	Nilai untuk DBA
Linieritas metode dengan standar adisi dalam sampel (R^2), range spiking 0.1–10 $\mu\text{g/mL}$	0.9675	0.9593
Kesesuaian sistem ($\text{RSD} < 2\%$):		
- RSD luas area	0.8%	0.6%
- RSD waktu retensi	1.4%	1.6%
Limit deteksi (LOD)	0.04 $\mu\text{g/mL}$	0.03 $\mu\text{g/mL}$
Limit kuantitasi (LOQ)	0.11 $\mu\text{g/mL}$	0.09 $\mu\text{g/mL}$
Rekoveri dengan spiking 5 $\mu\text{g/g}$	122.6%	126.0%
Presisi atau repeatabilitas	12.4%	15.0%



Gambar 1. Kromatogram campuran standar BAP dan DBA pada konsentrasi 2 ppm. Standar BAP terdeteksi pada waktu retensi 11.663 menit dan DBA pada 13.454 menit.

Kurva standar BAP dan DBA yang dibuat pada range konsentrasi 0.05 – 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$) mempunyai nilai R^2 di atas 0.990. Kurva standar ini diperlihatkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva standar larutan BAP (kiri) dan DBA (kanan) dengan injeksi langsung larutan standar (tanpa sampel) ke dalam instrumen HPLC-UV.

- **Hasil optimasi proses pembakaran untuk menurunkan PAH pada ikan bakar**

Optimasi proses pembakaran dilakukan pada 3 variabel dependen yaitu jarak pemanasan, lama pemanasan, dan jumlah bumbu. Level dari masing-masing variabel pemanasan yang diujikan didapat dari *trial and error* pada penelitian pendahuluan. Untuk variabel jarak, level minimum dan maksimum yang dipergunakan pada perancangan percobaan adalah 2 cm dan 8 cm. Sedangkan untuk jumlah bumbu dan lama pemanasan, level minimum dan maksimum yang dipergunakan masing-masing adalah 28 menit dan 40 menit untuk lama pemanasan, serta 0% dan 15% untuk jumlah bumbu. Perancangan percobaan menggunakan software Design Expert® 7 dengan desain percobaan menggunakan desain *response surface* (RSM) Box-Behnken design.

Molekul benzo(a)piren (BAP) yang ditemukan pada ikan bakar berkisar antara tidak terdeteksi hingga 130.1 ng/g sampel (130.1 ppb). Nilai terendah didapat pada pembakaran dengan jarak 5 cm selama 34 menit dengan bumbu 7.5%. Sedangkan nilai tertinggi didapat pada pembakaran dengan jarak 2 cm selama 40 menit dengan tidak menggunakan bumbu. Nilai maksimum yang dicapai pada penelitian ini jauh lebih tinggi dibandingkan batas yang diperbolehkan oleh Uni Eropa yaitu 10 ng/g (10 ppb). Contoh grafik tiga dimensi hubungan antara lama dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi BAP yang dihasilkan oleh software *Design Expert*® 7 ditunjukkan pada Gambar 3.

Molekul Dibenzo(a,h)antrasen (DBA) yang ditemukan dalam ikan bakar berkisar antara tidak terdeteksi hingga 82.7 ng/g sampel (82.7 ppb). Nilai terendah didapat pada pembakaran dengan jarak 5 cm selama 34 menit dengan bumbu 7.5%. Sedangkan nilai tertinggi didapat pada pembakaran dengan jarak 2 cm selama 34 menit dengan tidak menggunakan bumbu. Seperti halnya BAP, nilai maksimum yang dicapai pada penelitian ini jauh lebih tinggi dibandingkan batas yang diperbolehkan oleh Uni Eropa. Grafik RSM tiga dimensi hubungan antara lama dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi DBA dalam ikan bakar ditunjukkan pada Gambar 4.

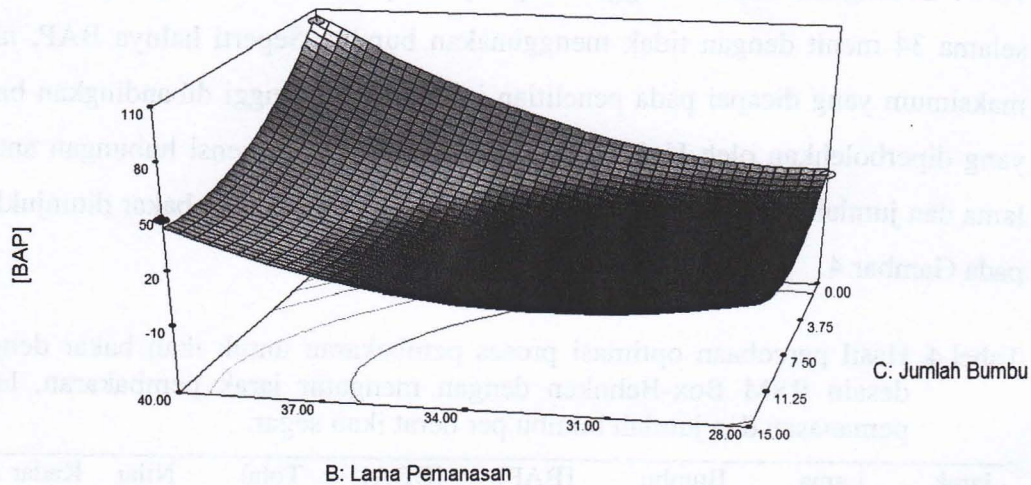
Tabel 4. Hasil percobaan optimasi proses pembakaran untuk ikan bakar dengan desain RSM Box-Behnken dengan mengatur jarak pembakaran, lama pemanasan dan jumlah bumbu per berat ikan segar.

Jarak (cm)	Lama (menit)	Bumbu (%)	[BAP] (ng/g)	[DBA] (ng/g)	Total PAH	Nilai Hue	Kadar Air (%)
5	34	7.5	ttd*	ttd	ttd	64.35	64.95
2	34	0	110.3	82.7	192.9	70.15	61.93
8	34	15	22.2	28.5	50.7	75.43	63.99
8	28	7.5	17.6	23.4	41.0	64.95	57.90
5	34	7.5	7.5	20.3	27.8	74.22	62.72
5	34	7.5	12.2	14.6	26.9	62.15	65.91
2	40	7.5	130.1	76.0	206.1	70.74	65.19
5	28	0	20.2	24.2	44.4	59.57	64.95
5	34	7.5	0.4	31.2	31.7	67.65	65.70
5	40	0	102.7	82.4	185.1	74.15	66.03
2	28	7.5	36.3	50.5	86.8	69.98	66.76
5	40	15	49.9	88.9	138.7	59.72	62.49
2	34	15	41.5	56.0	97.4	75.86	61.91
8	40	7.5	31.8	41.9	73.8	69.53	66.37
5	28	15	24.7	32.8	57.5	65.15	66.54
5	34	7.5	16.4	9.4	25.8	73.42	64.95
8	34	0	33.1	20.4	53.5	66.18	64.98

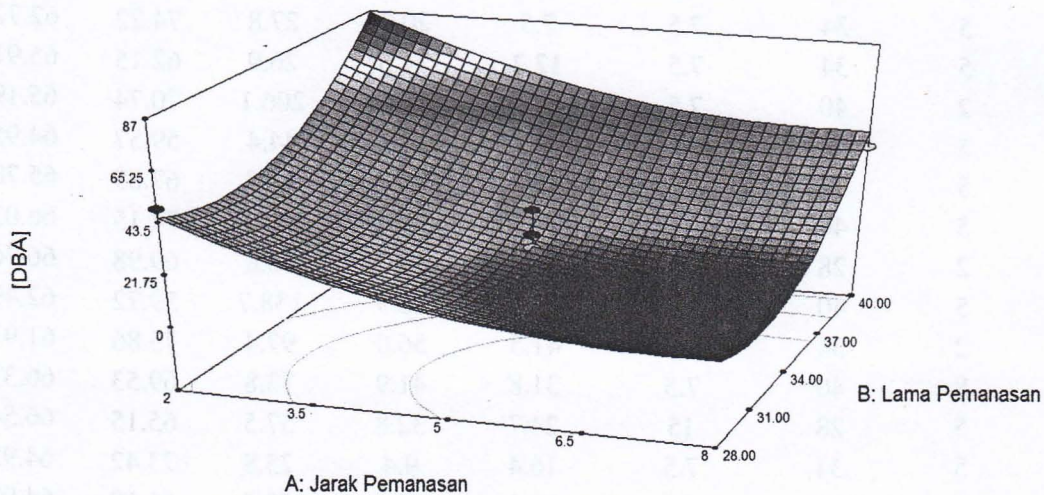
Keterangan : *ttd adalah tidak terdeteksi

Total PAH yang ditemukan pada penelitian berkisar antara tidak terdeteksi hingga 192.9 ng/g sampel (192.9 ppb). Nilai terendah didapat pada pembakaran dengan jarak 5 cm selama 34 menit dengan bumbu 7.5%. Sedangkan nilai tertinggi didapat pada pembakaran dengan jarak 2 cm selama 34 menit dengan

tidak menggunakan bumbu. Grafik RSM 3 dimensi untuk hasil analisis total PAH dalam ikan bakar ditunjukkan pada Gambar 5.



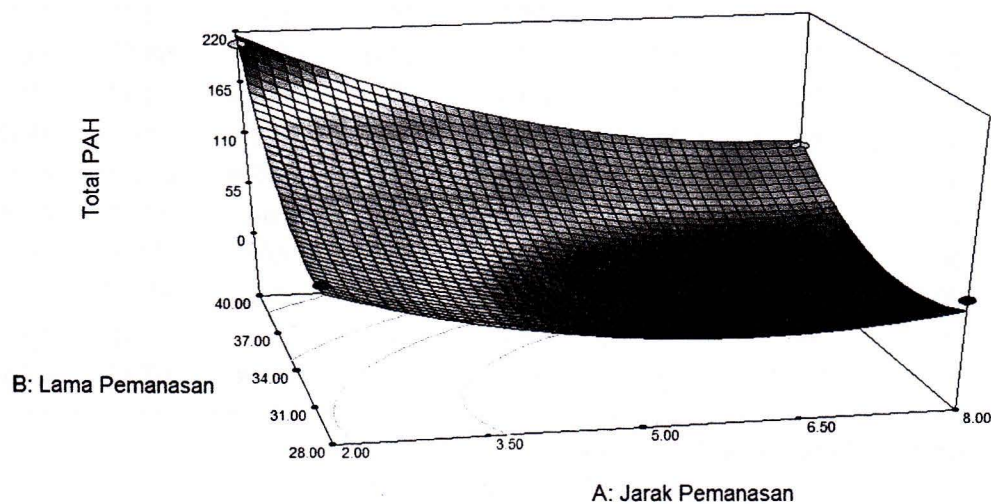
Gambar 3. Grafik 3 dimensi hubungan lama pemanasan dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi BAP ikan bakar. Warna biru menunjukkan nilai minimum BAP dan maksimum pada warna kuning dan merah.



Gambar 4. Grafik 3 dimensi hubungan lama pemanasan dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi DBA ikan bakar. Warna biru menunjukkan nilai minimum DBA dan maksimum pada warna kuning dan merah.

Hasil optimasi dengan menggunakan RSM untuk komponen dan respon di atas untuk memberikan nilai komponen berbahaya minimum dalam ikan bakar adalah pada proses jarak pemanggangan 7.26 cm, lama pemanasan 31.48 menit, dan jumlah bumbu 7.48%. Perkiraan respons yang dihasilkan dari proses tersebut

menurut Gambar 3, 4 dan 5 adalah BAP $2.4 \cdot 10^{-6}$ ng/g sampel, DBA 2.8 ng/g sampel, total PAH 3.3 ng/g sampel, nilai hue 68.42, dan kadar air 64.32 %. Hasil verifikasi menunjukkan bahwa dengan proses pemanggangan ikan dengan jarak 7.26 cm, lama pemanasan 31.48 menit, dan jumlah bumbu 7.48% menghasilkan kadar BAP, DBA, dan total PAH yang tidak terdeteksi. Dengan kombinasi dan jarak tersebut, reaksi pirolisis dan pirosintesis dari PAH dapat dihambat karena interaksi langsung antara bahan pangan dan sumber api dapat dicegah dengan jarak yang tinggi dan waktu pembakaran yang singkat. Penggunaan bumbu sebesar 7.48% merupakan bumbu yang optimal untuk menurunkan nilai PAH.



Gambar 5. Grafik 3 dimensi hubungan lama pemanasan dan jumlah bumbu terhadap total PAH ikan bakar. Warna biru menunjukkan nilai minimum total PAH dan maksimum pada warna kuning dan merah.

- **Hasil optimasi proses pembakaran untuk menurunkan PAH pada ayam bakar**

Optimasi proses pembakaran pada ayam bakar dilakukan pada 3 variabel dependen sama seperti ikan bakar yaitu jarak pemanasan, lama pemanasan, dan jumlah bumbu. Level dari masing-masing variabel pemanasan yang diujikan pun sama dengan percobaan pada ikan bakar. Perbedaan terletak pada ayam sampel terlebih dahulu dikukus selama 30 menit sebelum dibakar. Hasil percobaan ditunjukkan pada Tabel 5.

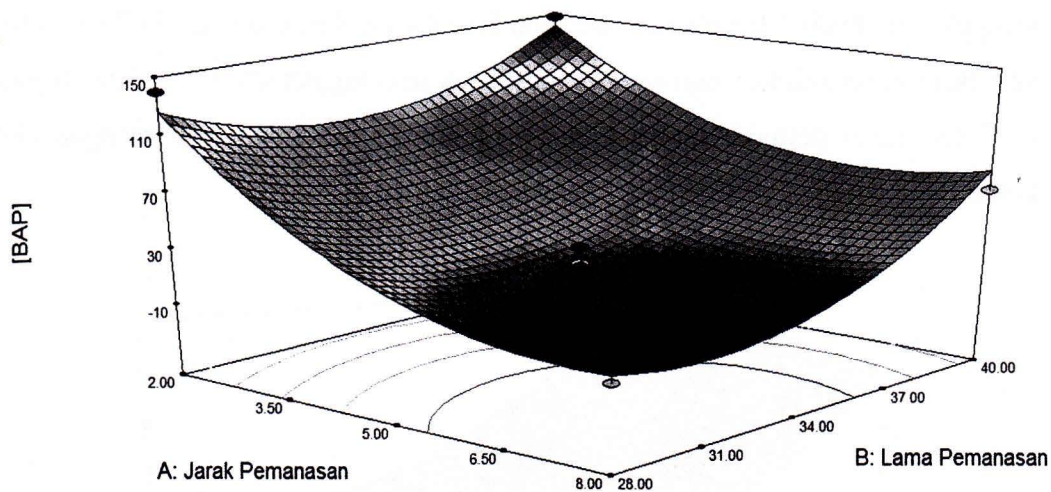
Tabel 5. Hasil percobaan optimasi proses pembakaran untuk ayam bakar dengan desain RSM Box-Behnken dengan mengatur jarak pembakaran, lama pemanasan dan jumlah bumbu per berat daging ayam segar.

Jarak (cm)	Lama (menit)	Bumbu (%)	[BAP] (ng/g)	[DBA] (ng/g)	Total PAH	Nilai Hue	Kadar Air (%)
5	34	7.5	19.7	7.6	27.2	62.05	46.98
5	28	15	20.4	44.5	64.9	66.26	44.76
2	34	0	104.6	121.3	225.9	65.12	44.04
8	40	7.5	64.6	44.8	109.5	57	42.00
5	34	7.5	9.4	16.4	25.8	64.77	60.27
2	40	7.5	148.1	83.2	231.2	64.56	51.69
5	34	7.5	15.2	28.1	43.3	64.8	46.82
5	40	0	65.7	45.0	110.7	63.05	40.60
5	34	7.5	12.2	21.0	33.1	68.52	41.35
2	28	7.5	139.6	49.3	188.9	72.12	41.1
2	34	15	74.0	149.2	223.2	66.2	49.88
5	40	15	91.9	53.7	145.6	62.05	42.62
8	28	7.5	ttd*	ttd	ttd	73.12	41.91
5	34	7.5	27.3	33.6	60.9	61.6	39.22
8	34	15	31.8	54.0	85.8	65.27	42.82
8	34	0	ttd	ttd	ttd	57.25	45.76
5	28	0	31.5	37.9	69.4	67.32	47.14

Keterangan : *ttd adalah tidak terdeteksi.

Molekul benzo(a)piren yang ditemukan pada penelitian ayam bakar berkisar antara tidak terdeteksi hingga 148.1 ng/g sampel (148.1 ppb). Nilai terendah didapat pada pembakaran dengan jarak 8 cm selama 28 menit dengan bumbu 7.5% serta jarak 8 cm selama 34 menit tanpa menggunakan bumbu. Sedangkan nilai tertinggi didapat pada pembakaran dengan jarak 2 cm selama 34 menit dengan tidak menggunakan bumbu. Nilai maksimum yang dicapai pada penelitian ini jauh lebih tinggi dibandingkan batas yang diperbolehkan oleh Uni Eropa .

Grafik tiga dimensi hubungan antara lama dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi BAP dalam ayam bakar ditunjukkan pada Gambar 6.



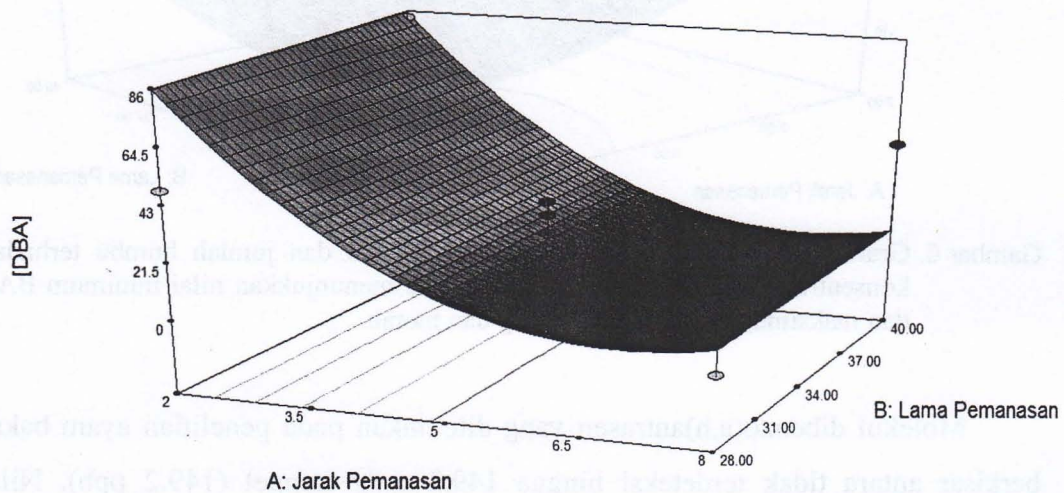
Gambar 6. Grafik 3 dimensi hubungan lama pemanasan dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi BAP ayam bakar. Warna biru menunjukkan nilai minimum BAP dan maksimum pada warna kuning dan merah.

Molekul dibenzo(a,h)antrasen yang ditemukan pada penelitian ayam bakar berkisar antara tidak terdeteksi hingga 149.2 ng/g sampel (149.2 ppb). Nilai terendah didapat pada pembakaran dengan jarak 8 cm selama 28 menit dengan bumbu 7.5% serta jarak 8 cm selama 34 menit tanpa menggunakan bumbu. Sedangkan nilai tertinggi didapat pada pembakaran dengan jarak 2 cm selama 34 menit dengan 15% bumbu. Grafik tiga dimensi hubungan antara lama dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi DBA dalam ayam bakar ditunjukkan pada Gambar 7.

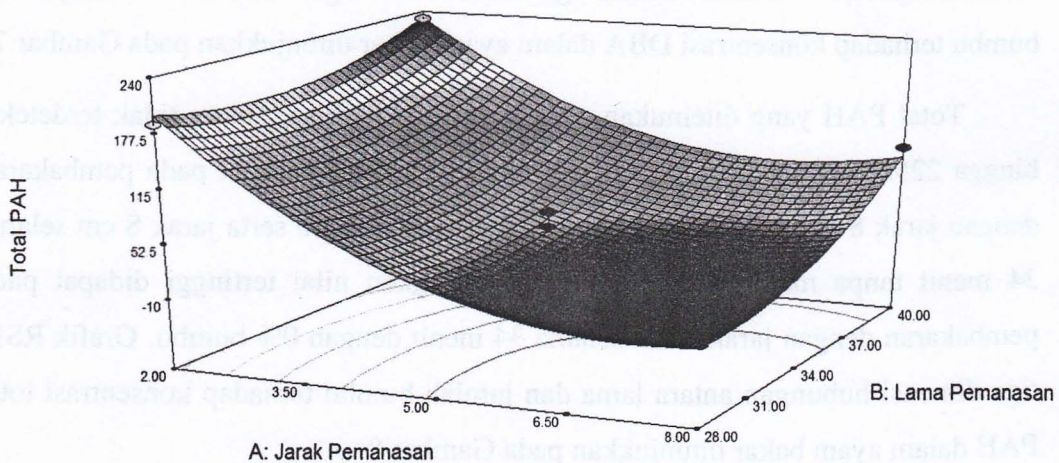
Total PAH yang ditemukan pada penelitian berkisar antara tidak terdeteksi hingga 225.9 ng/g sampel (225.9 ppb). Nilai terendah didapat pada pembakaran dengan jarak 8 cm selama 28 menit dengan bumbu 7.5% serta jarak 8 cm selama 34 menit tanpa menggunakan bumbu. Sedangkan nilai tertinggi didapat pada pembakaran dengan jarak 2 cm selama 34 menit dengan 0% bumbu. Grafik RSM tiga dimensi hubungan antara lama dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi total PAH dalam ayam bakar ditunjukkan pada Gambar 8.

Hasil optimasi dengan menggunakan RSM untuk komponen dan respon di atas memberikan nilai optimasi untuk mendapatkan kandungan senyawa berbahaya minimum dalam ayam bakar berupa jarak pemanggangan 6.79 cm, lama pemanasan 28 menit, dan jumlah bumbu 8.69%. Perkiraan respons yang dihasilkan dari proses tersebut adalah BAP 8.6 ng/g sampel, DBA 9.0 ng/g

sampel, total PAH 1.0 ng/g sampel, nilai Hue 68.79, dan kadar air 54.76 %. Hasil verifikasi menunjukkan bahwa dengan proses pemanggangan ayam dengan jarak 6.79 cm, lama pemanasan 28 menit, dan jumlah bumbu 8.69% menghasilkan kadar BAP, DBA, dan total PAH yang tidak terdeteksi.



Gambar 7. Grafik 3 dimensi hubungan lama pemanasan dan jumlah bumbu terhadap konsentrasi DBA ayam bakar. Warna biru menunjukkan nilai minimum DBA dan maksimum pada warna kuning dan merah.



Gambar 8. Grafik 3 dimensi hubungan lama pemanasan dan jumlah bumbu terhadap total PAH dalam ayam bakar. Warna biru menunjukkan nilai minimum total PAH dan maksimum pada warna kuning dan merah.

KESIMPULAN

Validasi metode analisis PAH dilakukan dengan standar benzo(a)piren (BAP) dan dibenzo(a,h)antrasen (DBA) dengan menggunakan *tandem solid phase extraction* (*tandem* SPE) dan HPLC-UV. Linearitas metode (dengan adisi standar dalam sampel) yang ditunjukkan dengan nilai R^2 pada konsentrasi 0.1 – 10 ug/ml (ppm) untuk standar BAP dan DBA berada di atas 0.95. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan nilai RSD di bawah 2% sesuai dengan yang disarankan JECFA untuk analisis trace. Limit deteksi instrumen untuk larutan BAP dan DBA adalah 0.04 dan 0.03 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan limit kuantitasnya adalah 0.11 dan 0.09 $\mu\text{g/mL}$ larutan. Hasil uji recovery pada sampel dengan *spiking* standar BAP dan DBA sebesar 5 ppm adalah 122.55% (BAP) dan 126.02% (DBA). Sementara nilai *repeatability* dari metode untuk BAP dan DBA masing-masing adalah 12% dan 15%, hasil ini sesuai dengan AOAC.

Penentuan kombinasi pembumbuan, lama dan jarak pembakaran yang didapatkan dengan *response surface methodology* (RSM) menghasilkan formula pemrosesan optimum untuk ikan dan ayam bakar yang memberikan kandungan senyawa berbahaya yang minimum. Formula optimum untuk ikan bakar adalah pembakaran dengan jarak pembakaran 7.26 cm, lama pemanasan 31.48 menit dan jumlah bumbu 7.48%. Sebelum pengaturan ini ikan bakar tanpa pembumbuan mempunyai kandungan PAH hingga 193 ng/g sampel. Sementara optimasi untuk ayam bakar menghasilkan jarak pembakaran 6.79 cm, lama pemanasan 28 menit, dan jumlah bumbu 8.69%. Apabila proses ayam bakar dilakukan tanpa pembumbuan akan ditemukan PAH total hingga 226 ng/g.

Hasil verifikasi formula ikan bakar dengan menggunakan kondisi optimum di atas menunjukkan kadar BAP, DBA, dan total PAH dalam ikan bakar maupun ayam bakar adalah tidak terdeteksi dengan nilai Hue 77.96 dan kadar air 59.6% pada ikan bakar, sedangkan pada ayam bakar, nilai Hue 62.21 dan kadar air 50.62%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Kementerian Pendidikan Nasional RI atas pemberian dana penelitian di bawah program Hibah Fundamental DIPA IPB dengan kontrak No. 26/I3.24.4/SPP/PF/2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Baran S, Oleszczuk P, Baranowska E. 2003. Degradation of soil environment in the post-flooding area: Content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and S-triazine herbicides. *Journal of Environmental Science and Health Part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 38: 799–812.
- Camel V. 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in analytical chemistry* 19(4): 229-248.
- Castro MDL, Carmona MM. 2000. Where is supercritical fluid extraction going?. *Trends in analytical chemistry* 19(4): 223-228.
- Chen BH, Wang CY, Chiu CP. 1996. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2244-2251.
- Chen J, Chen S. 2005. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by low density polyethylene from liquid model and roasted meat. *Food Chemistry* 90: 461-469.
- Dong MW. 2006. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey: Wiley
- Farhadian A, Jinap S, Hanifah HN, Zaidul IS. Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chemistry* 124: 141-146.
- Guillen MD, Sopelana P, Palencia G. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and olive pomace oil. *J Agric. Food Chem* 57: 2123-2132.
- Haritash AK, Kaushik CP. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. of Hazardous Material* 169: 1-15.
- Harvey RG. 2011. *Historical Overview of Chemical Carcinogenesis dalam Chemical Carcinogenesis*. Penning TM editor. Philadelphia: Springer.
- Jagerstad M, Skog K. 2005. Review: Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation research* 574: 156-172.

- Janoszka B, Warzecha L, Blaszczyk, Bodzek D. 2004. Organic compounds formed in thermally treated high-protein food part I: polycyclic aromatic hydrocarbons. *Acta chromatographica* 14: 115-128.
- Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N. 2001. Analysis of 200 food items for benzo(a)pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology* 39: 423-436.
- Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. 2004. The multitechnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature Reviews Cancer* 4: 519-527.
- Luch A¹. 2005. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 5: 113-125.
- Luch A². 2005. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Induced Carcinogenesis- An Integrated View dalam *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Luch A editor. London: CRC Press.
- Luch A, Baird WM. 2005. Metabolic Activation and Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons dalam *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Luch A editor. London: CRC Press.
- Michalski R, Germuska R. 2002. Extraction of benzo(a)pyrene from mussel tissue by accelerated solvent extraction (ASE) and determination by GPC and HPLC. *Acta Chromatographica*. 12.
- Montgomery DC. 2001. *Design and Analysis of Experiments* 5th ed. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Morret S, Conte L, Dean D. 1999. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons content of smoked fish by means of a fast HPLC/HPLC method. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1367-1371.
- Mottier P, Parisod V, Turesky RJ. 2000. Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1160-1166.
- Oros DR, Ross JRM. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves from the San Francisco estuary: Spatial distributions, temporal trends, and sources. *Marine Environmental Research* (60): 466-488.
- Peto J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390-395.
- Rey-Salgueiro. 2008. Effect of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry* 108: 607-615.
- Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan KW. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* 3th ed. Nes Jersey: Wiley.

- Wang G, Lee AS, Lewis M, kamath B, Archer RK. 1999. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1062-1066.
- Wenzl T, Simon R, Anklam E, Kleiner J. 2006. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry* 25(7): 716-725.
- Wretling S, Eriksson A, Eskhult GA, Larsson B. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 264-272.
- Wootton EC, Dyrinda EA, Pipe RK, Ratcliffe NA. 2003. Comparison of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquatic Toxicol.* 65: 13-25.