



Artikel Penelitian

Pengembangan dan Validasi Metode Destruksi Gelombang Mikro untuk Penentuan Logam Berat Kadmium dan Timbal dalam Cokelat dengan Spektroskopi Serapan Atom (SSA)

Moh. Taufiq*, Akhmad Sabarudin, Ani Mulyasuryani

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

INFO ARTIKEL

Sejarah artikel:
Revisi 13 Agustus 2016
Diterima 29 September 2016
Tersedia online 31 Oktober 2016

*Penulis korespondensi:
Email: mohtaufiq84@gmail.com

ABSTRAK

Development and validation of analytical methods has been performed for determination of heavy metals cadmium (Cd) and lead (Pb) in two types of chocolate, prior to use of domestic microwave-assisted acid digestion method without modification. Heavy metals were analyzed by flame atomic absorption spectrometry. The analysis showed that the microwave digestion has complied to the terms of validation, linearity >0.99 , mean recoveries from 92.6 to 103.2%, repeatability of the method (inter-day) and intra-day gave relative standard deviation (RSD) from 1.6 to 4.8%. Limit of detection (LOD) of Cd and Pb of 0.006 and 0.02 mg/kg respectively and quantification (LOQ) 0.025 mg/kg for Cd and 0.042 mg/kg for Pb. Robustness of the method gave relative standard deviation from 2.6 to 4.8%. The procedure of microwave digestion of developed is very practical, easy, fast, accurate, precise, reliable and useful for routine laboratory analyses of a large number of samples.

Keywords: AAS, microwave digestion, heavy metal, validation method

Pengembangan dan validasi metode analisis telah dilakukan untuk penentuan logam berat cadmium (Cd) dan timbal (Pb) dalam dua jenis cokelat. Sampel ditambahkan asam dan didestruksi dengan gelombang mikro rumah tangga tanpa modifikasi. Pengukuran logam berat menggunakan spektroskopi serapan atom (SSA). Hasil analisis menunjukkan bahwa destruksi gelombang mikro telah memenuhi persyaratan validasi seperti linieritas $>0,99$ dan rata-rata perolehan kembali 92,6-103,2%. Parameter ketelitian yang dilakukan pada hari yang sama maupun berbeda memperoleh standar deviasi relatif (RSD) $<5\%$, batas deteksi metode (LOD) Cd dan Pb masing-masing 0,006 dan 0,02 mg/kg, sedangkan batas kuantitasi (LOQ) 0,025 mg/kg untuk Cd dan 0,042 mg/kg untuk Pb. Kekuatan metode menghasilkan standar deviasi relatif 2,6-4,7%. Prosedur destruksi gelombang mikro yang dikembangkan sangat praktis, dan dikategorikan sebagai metode preparasi yang mudah, cepat, akurat, teliti, dapat diandalkan dan dapat dijadikan sebagai metode analisis rutin di dalam laboratorium dengan beberapa jenis sampel dalam jumlah yang banyak.

Kata Kunci: destruksi gelombang mikro, SSA, logam berat, validasi metode

1. Pendahuluan

Validasi metode analisis merupakan langkah penting dalam mengontrol kualitas analisis kuantitatif (Abarca, Canfranc, Sierra, & Marina, 2001). Validasi ini dilakukan untuk memastikan bahwa suatu metode analitik secara ilmiah baik diaplikasikan untuk keperluan analisis di laboratorium sehingga memperoleh suatu data yang valid (Purwanto, Supriyanto, & Samin, 2007; Hanjani, 2013). Upaya untuk memperoleh suatu metode yang valid memerlukan beberapa parameter yang harus dilakukan meliputi ketepatan, ketelitian, linieritas, batas deteksi instrumen (IDL) batas deteksi dan batas kuantitasi metode (LOD dan LOQ), dan uji kekuatan metode (*robustness*). Apabila parameter-parameter tersebut memenuhi persyaratan validasi, maka mudah memperoleh kepercayaan dari metode analisis yang sedang dilakukan, khususnya untuk analisis logam berat kadmium (Cd) dan timbal (Pb) dalam cokelat.

Logam Cd dan Pb merupakan dua jenis logam berat yang dapat menimbulkan bahaya kesehatan apabila masuk ke dalam tubuh. Beberapa penyakit yang disebabkan logam Cd yaitu gangguan saluran pernafasan dan pencernaan, radang paru-paru, hati dan menjadi racun pada tulang (Zhong, Ren, & Zhao, 2016). Penyakit yang sebabkan oleh keracunan logam Pb antara lain mengurangi tingkat IQ, menghambat pertumbuhan dan merusak ginjal, keguguran, kehilangan keseimbangan, gangguan pendengaran, anemia, dan merusak alat pendengaran (Suherni, 2010)

Sumber utama kontaminasi logam berat Cd dalam cokelat berasal dari bahan baku pembuatan cokelat, proses produksi dan pengolahan cokelat yang dilakukan di dalam alat berbahan baja, pencucian logam dari *vessel* yang digunakan (Dahiya, Karpe, Hegde, & Sharma, 2005). Sementara itu, logam berat Pb dalam cokelat dapat berasal dari bahan pangan yang ditambahkan, peralatan produksi yang digunakan serta bahan pembungkus cokelat yang beraneka warna. Kebanyakan perusahaan menggunakan wadah cokelat yang tidak diperuntukkan pada makanan seperti pewarna yang digunakan mengandung $PbCrO_4$ dan tidak cocok untuk makanan (Dias & Wickramasinghe, 2016).

Studi penelitian tentang cokelat telah dilakukan terhadap 69 merk cokelat di Mumbai India. Hasilnya menunjukkan bahwa cokelat mengandung logam berat Pb, Cd, dan Ni dengan konsentrasi

berturut-turut sebesar 0,93; 0,105 dan 1,63 $\mu\text{g/g}$ (Dahiya et al., 2005). Penelitian lain juga pernah dilaporkan bahwa cokelat mengandung logam berat Cd, Cu, Ni dan Zn dengan konsentrasi masing-masing sebesar 1,95; 14,15; 2,90 dan 20,02 $\mu\text{g/g}$ (Ramtahal et al., 2014).

Preparasi sampel cokelat dalam penelitian ini menggunakan metode destruksi basah sistem gelombang mikro, sedangkan pengukuran logam berat Cd dan Pb menggunakan spektroskopi serapan atom (SSA). Metode ini memiliki beberapa keunggulan antara lain waktu destruksi lebih cepat, mengurangi polusi saat destruksi, mengurangi penguapan analit, penggunaan asam lebih sedikit, dan mudah dilakukan (Zhong et al., 2016).

Metode analisis logam dalam penelitian ini merupakan pengembangan dari metode standar SNI 7934:2014 tentang produk cokelat, untuk itu perlu dilakukan proses validasi. Hal ini sesuai dengan peraturan ISO/IEC 17025 (2005) yang menyebutkan bahwa salah satu metode yang harus divalidasi adalah metode standar yang sedang dikembangkan.

2. Bahan dan metode

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu asam nitrat (HNO_3) 65% for analysis EMSURE (Merck), akuabides (*pro injection*), larutan standar Cu (Merck-SRM) 1000 mg/L, standar Pb (Merck-SRM) 1000 mg/L, standar Cd (Merck-SRM) 1000 mg/L, Na_2EDTA 0,1 mol/L, HNO_3 0,5 mol/L dan 1,0 mol/L.

2.2. Preparasi sampel

Sampel cokelat jenis bars ditimbang sebanyak 0,2 g dan masukkan ke dalam tabung *vessel* polipropilena, tambahkan HNO_3 65% sebanyak 5 mL dan ditutup rapat.

2.3. Destruksi Basah Sistem Gelombang Mikro yang diusulkan

Sampel cokelat 0,2 g yang sudah disiapkan dalam tabung *vessel* polipropilena, didestruksi menggunakan gelombang mikro tanpa modifikasi (MODENA 2502) dengan tingkat pemanasan 100% dan daya 900 Watt, lama destruksi 2 menit, didinginkan di dalam gelombang mikro 5 menit pada suhu kamar 5 menit, kemudian saring menggunakan kertas Whatman 40. Filtrat diukur menggunakan SSA-AA240 (Varian Australia) pada panjang gelombang 228,8 nm untuk Cd dan 283

nm untuk Pb. Data yang dilaporkan adalah rata-rata dari 5 replikasi sampel hasil destruksi. Selanjutnya, dilakukan validasi yang meliputi linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ) dan kekuatan metode (*robustness*).

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Optimasi Spektroskopi Serapan Atom (Manual Book AA240, 1989)

Proses optimasi telah berhasil dilakukan pada SSA yang meliputi lampu katoda berongga, *burner*, *nebulizer*, sensitivitas dan verifikasi larutan standar Cd dan Pb untuk kalibrasi (Tabel 1). Hasil presisi ditunjukkan dengan nilai standar deviasi relatif (RSD) yaitu 1,5% untuk Cd dan 1,8% untuk Pb. Sementara itu, perolehan kembali yang diperoleh sebesar 104,3% untuk Cd dan 98,4% untuk Pb. Hasil ini menunjukkan bahwa performa instrumen SSA-AA240 cukup baik digunakan sebagai alat ukur logam Cd dan Pb karena memiliki ketelitian dan ketepatan yang cukup baik dan telah memenuhi ekspektasi akurasi dari instrumen yaitu 95-105%.

3.2. Destruksi dengan gelombang mikro

Proses destruksi merupakan salah satu hal penting yang perlu diperhatikan dalam proses preparasi sampel untuk penentuan konsentrasi suatu logam. Destruksi merupakan pemutusan ikatan organologam menjadi logam-logam anorganik dalam bentuk larutannya (ion) yang siap dianalisis dengan spektroskopi serapan atom. Penelitian ini menggunakan metode destruksi sistem gelombang mikro dengan daya 900 Watt, waktu destruksi 2 menit, dan sampel yang dihasilkan berupa larutan jernih berwarna kuning kecokelatan. Metode ini adalah pengembangan dari metode standar yaitu destruksi kering sehingga perlu dilakukan validasi.

Tabel 1.

Kondisi instrument SSA-AA240 untuk pengukuran Cd dan Pb

Parameter	Cd	Pb
Sumber lampu	Katoda Cd	Katoda Pb
Panjang gelombang (nm)	228,8	283
Arus lampu (mA)	4	10
Lebar celah (nm)	0,5	0,5
Gas pembakar	Udara/asetilena	Udara/asetilena
Waktu tunggu pembacaan (detik)	3	3
Lama pengukuran (detik)	3	3
Bahan kimia yang ditambahkan	-	0,1 mol/L Na ₂ EDTA

Tabel 2.

Hasil pengukuran Cd dan Pb dalam cokelat dengan metode destruksi gelombang mikro yang dikembangkan (n = 5)

Parameter	Logam	
	Cd	Pb
Konsentrasi (mg/kg)	1,1	1,5
Standar deviasi	0,020	0,053
Baku mutu cokelat (mg/kg) SNI 7934:2014	0,5	1,0

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa cokelat bars mengandung logam Cd dan Pb sangat tinggi masing-masing 1,1 dan 1,6 mg/kg. Konsentrasi tersebut lebih besar jika dibandingkan dengan nilai ambang batas maksimum yang dipersyaratkan oleh standar nasional Indonesia dengan nomor SNI 7934:2014 (BSN, 2014), sedangkan menurut *food and drug administration* (FDA) konsentrasi Pb maksimum 0,1 mg/kg. Tingginya konsentrasi logam Cd dan Pb dapat disebabkan beberapa faktor antara lain asal tanaman cokelat (Suherni & Group, 2010), komposisi bahan pangan yang ditambahkan, peralatan yang digunakan saat proses produksi, dan jumlah zat warna yang dicampurkan baik pada cokelat itu sendiri (Dahiya et al., 2005) maupun pada wadah atau pembungkus yang digunakan (Dias & Wickramasinghe, 2016).

3.3. Validasi metode

Berdasarkan peraturan ISO/EIC 17025 (2005) disebutkan bahwa proses validasi merupakan satu hal penting yang perlu dilakukan untuk mengkonfirmasi melalui pengujian dan dibuktikan dengan data-data yang objektif. Hal ini untuk mengetahui bahwa persyaratan tertentu untuk maksud tertentu telah terpenuhi. Salah satu metode yang perlu dilakukan validasi adalah metode standar yang sedang dikembangkan atau dimodifikasi seperti metode yang dilakukan pada penelitian ini.

Linieritas dikonfirmasi melalui larutan standar Cd dan Pb dengan hasil cukup baik (Tabel 3) karena absorbansi Cd dan Pb meningkat secara eksponensial sesuai dengan konsentrasinya dan menghasilkan koefisien korelasi (R^2) mendekati 1. Menurut Harmita (2004), linieritas yang ideal dapat diperoleh apabila nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 tergantung pada arah garis.

Tabel 3
Hasil linieritas Cd dan Pb

Konsentrasi (mg/kg)	Persamaan	R^2
Cd 0,02 - 0,40	$Y=0,7433X+0,0024$	0,9999
Pb 0,10 - 0,20	$Y=0,0307X+0,0018$	0,9960

Uji batas deteksi metode (LOD) bertujuan untuk mengetahui batas konsentrasi Cd dan Pb terkecil yang dapat terukur oleh instrumen dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko, sedangkan batas kuantitasi metode (LOQ) adalah batas terkecil analit yang dapat terdeteksi secara kuantitatif (Harmita, 2004). Penentuan batas deteksi metode dilakukan dengan mengukur HNO_3 65% yang sudah didestruksi dengan gelombang mikro (9 kali ulangan).

Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa batas deteksi metode (LOD) penentuan logam Cd dan Pb masing-masing sebesar 0,006 dan 0,020 mg/kg, sedangkan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 0,025 mg/kg untuk Cd dan 0,042 mg/kg untuk Pb. Hasil tersebut memberikan informasi bahwa logam Cd dan Pb dapat terdeteksi apabila sampel yang diukur memiliki konsentrasi lebih besar dari nilai LOQ, sehingga hasilnya dapat dipercaya. Namun, apabila sampel yang terdeteksi lebih kecil dari nilai LOQ dapat dipastikan bahwa hasil tersebut bukanlah murni dari sampel melainkan *noise* atau gangguan saat analisis, dengan demikian data yang dihasilkan kurang akurat atau tidak dapat dipercaya.

Parameter akurasi metode menggunakan *spiking method* yang didasarkan pada persen (%) perolehan kembali (Ravichandran, Shalini, Sundram, & Rajak, 2010). Proses ini dilakukan dengan cara menambahkan larutan standar (Cd dan Pb) yang sudah diketahui konsentrasinya, dan berdasarkan AOAC (2002), konsentrasi standar yang ditambahkan harus identik atau relatif sama dengan konsentrasi sampel. Perbandingan destruksi basah sistem gelombang mikro yang diusulkan dengan destruksi kering (standar) ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4.
Perbandingan destruksi basah sistem gelombang mikro yang diusulkan dengan destruksi kering (standar)

Parameter	Destruksi basah Sistem gelombang mikro	Destruksi kering (metode standar SNI 7934:2014)
Massa sampel	0,2 g	10-20 g
Pra destruksi	-	Dipanaskan dengan pemanas listrik
Jenis asam yang digunakan	HNO_3 pekat 65% (14,3 mol/L)	HCl 6 mol/L dan HNO_3 0,1 mol/L dan akuades
Volume asam	5 mL	15 mL
Kondisi destruksi	Tertutup	Terbuka
Waktu destruksi	2 menit	4-5 jam
Energi panas	Gelombang mikro	Konvensional
Efek panas	Tidak dapat diserap oleh wadah yang digunakan sehingga dapat diserap sampel secara merata	Dapat diserap oleh wadah yang digunakan akibat suhu tinggi dan waktu yang lama, tidak merata
Sampel hilang karena penguapan	Tidak ada	Ada
Kontaminasi sampel	Tidak ada	Ada
Daya (Watt)	900	3000
Sistem operasi	Otomatis	Manual
Setelah destruksi	Langsung diukur dengan SSA	Diencerkan dengan 6 mol/L HCl:0,1 mol/L HNO_3 :akuades

Hasil pengujian akurasi ditunjukkan dengan persen perolehan kembali logam Cd dan Pb dalam cokelat masing-masing sebesar 94,3 dan 92,6% untuk cokelat a, sedangkan pada cokelat b sebesar 103,2 dan 94,1%, berturut-turut (Tabel 5). Nilai tersebut menunjukkan bahwa metode destruksi basah sistem gelombang mikro yang diusulkan memiliki ketepatan yang cukup baik dan memenuhi kriteria yang dipersyaratkan dalam validasi metode yaitu 80-110% (AOAC, 2002).

Tabel 6 menunjukkan bahwa destruksi basah sistem gelombang mikro memiliki ketepatan (akurasi) yang cukup baik untuk preparasi beberapa jenis logam dalam beberapa jenis sampel dengan waktu destruksi yang singkat. Namun, pada penelitian ini proses destruksi dilakukan dalam waktu 2 menit dan perolehan kembali mencapai 92,3-103,6% sehingga metode destruksi gelombang mikro yang diusulkan dapat dikategorikan lebih efisien.

Tabel 5.
Hasil perolehan kembali logam Cd dan Pb dalam cokelat (n=5)

Logam	Cokelat	Konsentrasi standar yang ditambahkan (mg/kg)	Konsentrasi terukur (mg/kg)	Perolehan kembali (%)	Standar deviasi relatif (%)
Cd	a	0	1,05	-	-
		1,19	2,18	94,3	2,3
	b	0	1,10	-	-
		1,19	2,30	103,2	1,9
Pb	a	0	1,43	-	-
		1,43	2,75	92,6	3,4
	b	0	1,60	-	-
		1,43	2,94	94,1	3,3

Perolehan kembali yang tinggi menunjukkan bahwa destruksi basah sistem gelombang mikro yang diusulkan memiliki ketepatan yang baik, karena sampel hasil didestruksi dimasukkan dalam *vesse* polipropilena dan kondisi tertutup sehingga penguapan analit dapat dihindari. Energi panas dari gelombang mikro diserap secara merata oleh sampel sehingga logam Cd dan Pb terlarut secara sempurna dan tetap terlindungi dengan baik karena tidak terjadi penguapan selama proses destruksi (Zhong et al., 2016).

Hasil akurasi metode yang baik sangat diperlukan dalam penelitian ini sebagai bukti bahwa metode yang sedang dikembangkan memenuhi persyaratan validasi. Hal ini sangat tergantung pada seluruh tahapan dalam metode analisis antara lain kondisi laboratorium yang baik, ketelitian dalam preparasi sampel, pereaksi dan pelarut yang baik, taat asas sesuai dengan prosedur, dan alat ukur yang terkalibrasi.

Tabel 6.
Perbandingan destruksi gelombang mikro yang diusulkan dengan destruksi gelombang mikro yang lain

Sampel	Jenis logam	Perolehan kembali (%)	Referensi
Beberapa jenis cokelat dan wadah cokelat ¹	Cr, Ni, Cd, As, Sb, dan Pb	91,15-93,8%	(Dias & Wickramasinghe, 2016)
Beberapa jenis makanan ¹	Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb, dan Ni	84,3-97,8%	(Akinyele & Shokunbi, 2015)
Bunga matahari ¹	Cd, Pb, dan Zn	96,7-96,9%	(Ansari et al., 2009)
Cokelat a dan b²	Cd dan Pb	92,3-103,6%	Penelitian ini (2016)

¹ sampel 0,2-0,25 g, waktu destruksi 5-15 menit, menggunakan *multiwave* dan *domestic microwave*

² sampel 0,2 g, waktu destruksi 2 menit, menggunakan *domestic microwave*

Parameter ketelitian (presisi) metode dilakukan dengan mengukur Cd dan Pb dalam kondisi yang sama baik sampel, metode, analisis, instrumen, kondisi laboratorium dan dianalisis pada hari yang sama dengan interval waktu relatif singkat, proses ini disebut dengan *repeatability (intra-day)*.

Presisi metode juga dilakukan dengan *intermediate precision (inter-day)*. Proses ini dilakukan pada sampel sama, menggunakan metode sama, analisis sama dan instrumen yang sama, namun dilakukan pada hari yang berbeda, kemudian dihitung nilai standar deviasi relatif (RSD) yang dihasilkan.

Robustness (kekuatan metode) dilakukan untuk mengetahui kemiripan hasil pengukuran yang dilakukan dalam beberapa kondisi instrumen yang berbeda (parameter kondisi instrumen yang dirubah). Apabila perubahan kondisi instrumen menghasilkan suatu data yang memiliki kemiripan dengan kondisi standar (normal), maka sesungguhnya metode tersebut dapat dikategorikan *robust* (metode yang kuat). Tabel 9 menunjukkan bahwa hasil standar deviasi relatif (RSD) Cd pada kondisi a (normal) dan kondisi b (berbeda) masing-masing sebesar 2,6 dan 2,8%, sedangkan RSD Pb sebesar 4,0 dan 4,7%.

Tabel 7

Hasil uji presisi metode untuk Cd dan Pb pada hari yang sama (*intra-day*) (n = 5)

Cokelat	Logam	Konsentrasi (mg/kg)	Standar deviasi relatif (%)	Konsentrasi* (mg/kg)	Standar deviasi relatif* (%)
a	Cd	1,07	1,9	1,07	2,7
	Pb	1,48	3,6	1,43	4,7
b	Cd	1,10	1,6	1,11	1,9
	Pb	1,54	2,0	1,66	4,3

*Sampel dianalisis setelah 3 jam

Berdasarkan hasil uji presisi pada Tabel 7 dan Tabel 8 diketahui bahwa standar deviasi relatif (RSD) yang dihasilkan kisaran 1,6-4,8%. Hasil ini menunjukkan bahwa metode destruksi sistem gelombang mikro memiliki keterulangan yang cukup baik. Menurut AOAC (2002), semakin kecil konsentrasi analit yang diteliti, semakin besar pula kriteria RSD yang dapat diterima. Analit dengan konsentrasi 10 µg/g kriteria RSD yang diterima 6% sedangkan 1 µg/g kriteria RSD sebesar 8%. Apabila hasil yang diperoleh kurang dari kisaran tersebut, maka metode analisis dianggap memiliki keterulangan yang kurang baik.

Tabel 8

Hasil uji presisi metode untuk Cd dan Pb pada hari berbeda (*inter-day*) (n = 5)

Cokelat	Logam	Hari	Konsentrasi (mg/kg)	Standar deviasi relatif (%)
a	Cd	1	1,07	2,7
		2	1,08	1,6
	Pb	1	1,43	4,7
		2	1,48	4,8
b	Cd	1	1,11	1,9
		2	1,13	2,4
	Pb	1	1,66	4,3
		2	1,68	4,5

Adanya kemiripan hasil pengukuran dengan beberapa kondisi pengukuran berbeda menunjukkan bahwa metode destruksi gelombang mikro yang diusulkan untuk penentuan logam Cd dan Pb memiliki ketelitian cukup baik dengan nilai RSD <5%, dan memenuhi kriteria validasi dalam hal *robustness* karena telah berhasil digunakan pada berbagai kondisi pengukuran berbeda dengan hasil yang relatif sama atau tidak berbeda secara signifikan.

4. Kesimpulan

Konsentrasi Cd dan Pb dalam coklat yang diteliti melebihi baku mutu maksimum yang dipersyaratkan oleh SNI 7934:2014 yaitu 0,5 mg/kg untuk Cd dan 1,0 mg/kg untuk Pb. Metode destruksi basah sistem gelombang mikro yang dikembangkan telah memenuhi persyaratan validasi seperti linieritas lebih besar dari 0,99, perolehan kembali mencapai 92,6-103,2%, standar deviasi relatif (RSD) <5%, konsentrasi Cd dan Pb lebih besar dari batas deteksi metode (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ), memiliki kekuatan metode (*robustness*) cukup baik untuk penentuan logam Cd dan Pb dalam coklat. Prosedur destruksi gelombang mikro yang dikembangkan sangat praktis, mudah, cepat, akurat, teliti, dan dapat diandalkan.

Tabel 9

Robustness penentuan logam Cd dan Pb dalam coklat (n = 5)

Cokelat	Konsentrasi Cd dengan kondisi pengukuran berbeda		Konsentrasi Pb dengan kondisi pengukuran berbeda	
	1	2	1*	2*
a	1,00	1,02	1,56	1,51
b	1,04	1,06	1,61	1,60
Standar deviasi relatif (%)*	2,62	2,74	3,99	4,73

¹ lebar celah = 0,5 nm, waktu pengukuran = 3 detik, waktu tunggu pembacaan = 3 detik, arus lampu = 4 mA² lebar celah = 0,2 nm, waktu pengukuran = 4 detik, waktu tunggu pembacaan = 4 detik, arus lampu = 6 mA^{1*} lebar celah = 0,5 nm, waktu pengukuran = 3 detik, waktu tunggu pembacaan = 3 detik, arus lampu = 10 mA

* standar deviasi relatif merupakan hasil rata-rata dari dua jenis sampel coklat

5. Daftar pustaka

- Abarca, A., Canfranc, E., Sierra, I., & Marina, M. L. (2001). A validated flame AAS method for determining magnesium in a multivitamin pharmaceutical preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(5–6), 941–945.
- Akinyele, I. O., & Shokunbi, O. S. (2015). Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chemistry*, 173, 682–684.
- Ansari, R., Kazi, T. G., Jamali, M. K., Arain, M. B., Wagan, M. D., Jalbani, N., ... Shah, A. Q. (2009). Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chemistry*, 115(1), 318–323.
- AOAC. (2002). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. *AOAC International*, 1–38.
- Badan standarisasi nasional (BSN) 2014 Standar Nasional Indonesia (SNI) 7934:2014 Cokelat dan produk-produk coklat. (2014), 7934.
- Dahiya, S., Karpe, R., Hegde, A. G., & Sharma, R. M. (2005). Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 517–522.
- Dias, A. R. M., & Wickramasinghe, I. (2016). Determination of toxic metals in chocolate confectionery wrappers used by the chocolate manufacturers in Sri Lanka, and its migration to chocolates under different storage conditions. *International Journal of Science and Research*, 5(1), 352–357.
- Hanjani, F.N., (2013). Validasi metode analisis unsur logam Pb, Cu, dan Zn produk saus tomat y dari pasar tradisional x daerah surabaya timur dengan ICPS, 2(2), 1–11.
- Harmita. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. 117–135.
- Manual Book AA240, (1989). Analytical methods, varian of flame atomic absorption spectrometry.
- Purwanto, A., Supriyanto, C., & Samin, P. (2007). Validasi pengujian Cr, Cu dan Pb dengan metode spektrometri serapan atom, Prosiding PPI-PDIPTN. 151–158.
- Ramtahal, G., Chang Yen, I., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., Sukha, B., & Maharaj, K. (2014). Cost-effective method of analysis for the determination of cadmium, copper, nickel and zinc in cocoa beans and chocolates. *Journal of Food Research*, 4(1), 193-199.
- Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K. M., & Rajak, H. (2010). Validation of analytical methods - Strategies & importance. *International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 2(3), 18-22.
- Standar Internasional ISO/IEC 17025 (Versi Bahasa Indonesia) Persyaratan umum kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium.
- Suherni, O., (2010). Keracunan Timbal di Indonesia, global lead advice & support service, 1-19.
- Zhong, W. S., Ren, T., & Zhao, L. J. (2016). Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1), 46–55.