**PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR CAMPURAN
PEMANIS, PENGAWET DAN PEWARNA SECARA SIMULTAN
DALAM SIRUP ESSENS DENGAN MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Magister Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Sumatera Utara

**Oleh:
SUPRIANTO
NIM 097014008**

**PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
MEDAN
2014**

LEMBAR PERSETUJUAN TESIS

Nama : Suprianto
NIM : 097014008
Program Studi : Magister Farmasi
Judul Tesis : Pengembangan Metode Penetapan Kadar Campuran Pemanis, Pengawet dan Pewarna Secara Simultan dalam Sirup Esens dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Tempat dan Tanggal Ujian Lisan Tesis: Medan, 9 Januari 2014

Medan, Maret 2014

Menyetujui:

Komisi Pembimbing,

Ketua,

Prof. Dr. rer. nat. Effendy De Lux Putra, S.U., Apt.
NIP 195306191983031001

Anggota,

Prof. Dr. Siti Morjin Sinaga, M.Sc., Apt.
NIP 195008281976032002

Mengetahui:

Ketua Program Studi,

Prof. Dr. Karsono, Apt.
NIP 195409091982011001

Prof. Dr. Sumadio Hadisahputra, Apt.
NIP 195311281983031002

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Nama Mahasiswa : Suprianto
No.Induk Mahasiswa : 097014008
Program Studi : Magister Farmasi
Judul Tesis : Pengembangan Metode Penetapan Kadar Campuran Pemanis, Pengawet dan Pewarna Secara Simultan dalam Sirup Esens dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah diuji dan dinyatakan LULUS di depan Tim Penguji pada Hari Kamis
Tanggal Sembilan Bulan Januari Tahun Dua Ribu Empat Belas

Mengesahkan:

Tim Penguji,

Ketua Tim Penguji : Prof. Dr. rer. nat. Effendy De Lux Putra, S.U., Apt.

Anggota Tim Penguji : Prof. Dr. Siti Morin Sinaga, M.Sc., Apt.

Prof. Dr. Jansen Silalahi, M.App.Sc., Apt.

Dr. Ginda Haro, M.Sc., Apt.

SURAT PERNYATAAN

Nama Mahasiswa : Suprianto
Nomor Induk Mahasiswa : 097014008
Program Studi : Magister Farmasi
Judul Tesis : Pengembangan Metode Penetapan Kadar Campuran Pemanis, Pengawet dan Pewarna Secara Simultan dalam Sirup Esens dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Dengan ini menyatakan bahwa tesis yang saya buat adalah hasil karya saya sendiri, bukan plagiat, dan apabila dikemudian hari diketahui tesis saya tersebut plagiat karena kesalahan saya sendiri, maka saya bersedia diberi sanksi apapun oleh Program Studi Magister Farmasi Fakultas Farmasi USU. Saya tidak akan menuntut pihak manapun atas perbuatan saya tersebut.

Demikian surat pernyataan ini saya perbuat dengan sebenarnya dalam keadaan sehat.

Medan, 9 Januari 2014

Yang membuat pernyataan,

Suprianto

NIM 097014008

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas segala nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis dengan judul Pengembangan Metode Penetapan Kadar Campuran Pemanis, Pengawet dan Pewarna Secara Simultan dalam Sirup Esens dengan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Shalawat dan beriring salam saya haturkan untuk junjungan Rasulullah Muhammad SAW.

Penulis telah banyak mendapat bantuan dan motivasi dari berbagai pihak selama penulisan tesis ini sehingga penulis ingin menghaturkan penghargaan dan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Sumatera Utara, Bapak Prof. Dr. dr. Syahril Pasaribu, DTM&H., M.Sc., (CTM)., Sp.A.(K)., atas fasilitas yang diberikan kepada penulis selama mengikuti dan menyelesaikan Program Magister Farmasi.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Bapak Prof. Dr. Sumadio Hadisahputra, Apt., atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menjadi mahasiswa Program Studi Magister Farmasi.
3. Ketua Program Studi Magister Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Bapak Prof. Dr. Karsono, Apt., yang telah memberi motivasi kepada penulis dalam penyelesaian pendidikan Program Magister Farmasi.
4. Bapak Prof. Dr. rer. nat. Effendy De Lux Putra, S.U., Apt., selaku Pembimbing I dan Kepala Laboratorium Penelitian yang telah memberi saran, bimbingan, motivasi dan bantuan fasilitas laboratorium kepada penulis selama menjalani penelitian dan penulisan tesis ini.

5. Ibu Prof. Dr. Siti Morin Sinaga, M.Sc., Apt., selaku Pembimbing II yang telah memberi saran, bimbingan dan motivasi kepada penulis selama menjalani penelitian dan penulisan tesis ini.
6. Bapak Prof. Dr. Jansen Silalahi, M.App.Sc., Apt., dan Dr. Ginda Haro, M.Sc., Apt., selaku dosen penguji yang telah memberi arahan perbaikan penulisan tesis ini.
7. Bapak Sumardi, M.Sc., S.Si., Apt., selaku *Supervisor* yang telah memberi saran dan motivasi kepada penulis selama penelitian dan penulisan tesis ini.
8. Almarhumah Ibunda Martinah dan Ayahanda H. Sarijan yang dengan sabar mendidik, membimbing, memotivasi dan mendo'akan dengan tulus selama penulis menjalani pendidikan.
9. Istri tercinta Latipa Komalasari, S.S., dan Ananda tersayang Fathia Rahma Dewi, Yusrizha Maharani, Eka Hasbi Habibi dan Assyfa Zahra Salsabila yang telah memberi motivasi selama penulisan tesis ini.
10. Seluruh staf laboratorium penelitian Fakultas Farmasi yang telah membantu dalam penelitian.

Serta seluruh pihak yang tidak dituliskan yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini. Semoga Allah SWT menjadikan sebagai amal ibadah yang tak ternilai harganya dan memberikan balasan atas kebaikan tersebut.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Penulis juga berharap semoga tesis ini dapat menjadi sumbangan yang berarti bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Medan, 9 Januari 2014

Penulis,

Suprianto

PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR CAMPURAN PEMANIS, PENGAWET DAN PEWARNA SECARA SIMULTAN DALAM SIRUP ESSENS DENGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Abstrak

Sirup merupakan larutan gula pekat dengan atau tanpa penambahan bahan tambahan pangan. Bahan pemanis, pengawet dan pewarna dapat mengganggu kesehatan bila dikonsumsi berlebihan. Tujuan penelitian adalah untuk mengembangkan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dalam sirup esens. Penelitian menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik, tiga panjang gelombang dengan instrumen UFLC 1290 DAD (Agilent), kolom C18 100 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m (Agilent), spektrofotometer UV Probe 1800 (Shimadzu), bahan baku natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow*. Parameter optimasi meliputi volume void, panjang gelombang, pH fase gerak, komposisi fase gerak, laju alir dan suhu kolom. Parameter validasi meliputi linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi dan selektivitas. Metode yang diperoleh digunakan untuk penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dalam sampel sirup esens. Sebanyak enam sampel sirup esens diperoleh dari grosir dan supermarket di Kota Medan dan diberi kode H, I, J, K, L dan M.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum pengujian adalah volume void 30% dengan tiga panjang gelombang analisis, yaitu: 200 nm untuk natrium siklamat; 220 nm untuk natrium sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat; 450 nm untuk tartrazin dan *sunset yellow*. Fase gerak buffer fosfat pH 4,5 dan metanol 75 : 25 (v/v), laju alir 1,0 ml/menit, suhu kolom 30°C. Rentang waktu retensi adalah 0,941 menit - 8,583 menit. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa rentang linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, persen RSD keterulangan dan ketertiruan metode masing-masing 0,99945 – 0,99999; 0,03634 ppm - 2,66306 ppm; 0,12113 ppm - 8,87687 ppm; 92,92% - 105,72%; 0,11% - 1,53% dan 0,04% – 1,94%. Uji selektivitas metode menunjukkan hasil yang baik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalium sorbat tidak terkandung dalam sampel sirup esens. Rentang kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, tartrazin dan *sunset yellow* dalam sampel sirup esens masing-masing 37,952 mg/kg – 533,990 mg/kg; 2753,140 mg/kg – 5329,890 mg/kg; 464,456 mg/kg – 1615,360 mg/kg; 41,957 mg/kg - 108,048 mg/kg dan 31,084 mg/kg – 145,399 mg/kg. Sampel sirup esens mengandung kadar natrium sakarin untuk kode I dan natrium benzoat untuk kode H, J dan K melebihi batas penggunaan maksimum. Semua sampel sirup esens mengandung natrium siklamat melebihi batas penggunaan maksimum.

Kata kunci : Pemanis, Pengawet, Pewarna, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Optimasi, Validasi, Sirup Esens.

METHOD DEVELOPMENT OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SWEETENERS, PRESERVATIVES AND DYES IN ESSENCES SYRUP USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Abstract

Syrup is concentrated sugar solution with or without the addition of food additives. Sweeteners, preservatives and dyes can be hazardous to health if they are over consumed. The purpose of this research was to develop a method for the simultaneous determination of sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, potassium sorbate, tartrazine and sunset yellow in essence syrup. This research used high performance liquid chromatography reverse phase, three wavelengths with UFLC 1290 DAD (Agilent), column C18 100 mm x 4.6 mm x 3.5 μm (Agilent), spectrophotometer UV Probe 1800 (Shimadzu), standard material sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, potassium sorbate, tartrazine and sunset yellow. Optimization parameters were include void volume, wavelengths, pH of mobile phase, composition of mobile phase, flow rate and column temperature. Validation parameters were include linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, precision and selectivity. The method obtained was used for the simultaneous determination of sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, potassium sorbate, tartrazine and sunset yellow in essence syrup samples. A total of six essence syrup samples were obtained from wholesale and supermarket in Medan City and given code H, I, J, K, L and M.

The results of reseach showed that the optimum conditions were void volume 30% with three-wavelength analysis, i.e: 200 nm for sodium cyclamate; 220 nm for sodium saccharin, sodium benzoate and potassium sorbate; 450 nm for tartrazine and sunset yellow. Mobile phase was phosphate buffer pH 4.5 and methanol 75: 25 (v/v), flow rate was 1.0 ml/min, column temperature was 30°C. The range of retention time was 0.941 minute - 8.583 minute. The results of validation method showed that the ranges of linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, percent RSD of the repeatability and reproducibility methods were 0.99945 - 0.99999; 0.03634 ppm - 2.66306 ppm; 0.12113 ppm - 8.87687 ppm; 92.92% - 105.72%; 0.11% - 1.53% and 0.04% - 1.94%, respectively. The selectivity test of methods showed good results. The result showed that potassium sorbate is not contained in essence syrup samples. The ranges of levels of sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, tartrazine and sunset yellow in the samples of essences syrup were 37.952 mg/kg - 533.990 mg/kg; 2753.140 mg/kg - 5329.890 mg/kg; 464.456 mg/kg - 1615.360 mg/kg; 41.957 mg/kg - 108.048 mg/kg and 31.084 mg/kg - 145.399 mg/kg, respectively. Samples of essences syrup contain of sodium saccharin for the I code and sodium benzoate for the H, J and K codes exceed the maximum usage limit. All samples syrup contain of sodium cyclamate essences exceed the maximum usage limit.

Key words : Sweeteners, Preservatives, Dyes, High Performance Liquid Chromatography, Optimization, Validation, Essence Syrup.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN TESIS	iii
LEMBAR PENGESAHAN TESIS	iv
SURAT PERNYATAAN	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Kerangka Konsep Penelitian	4
1.3 Perumusan Masalah	5
1.4 Hipotesis	5
1.5 Tujuan Penelitian	6
1.6 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Sirup	7
2.2 Bahan Tambahan Pangan	8

2.2.1 Bahan Pemanis Pangan	8
2.2.1.1 Sakarin	9
2.2.1.2 Siklamat	10
2.2.2 Bahan Pengawet Pangan	10
2.2.2.1 Natrium Benzoat	11
2.2.2.2 Kalium Sorbat	12
2.2.3 Bahan Pewarna Pangan	13
2.2.3.1 Tartrazin	13
2.2.3.2 <i>Sunset yellow</i>	14
2.3 Kromatografi	15
2.3.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	15
2.3.2 Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	16
2.3.3 Klasifikasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	21
2.3.4 Seleksi Tipe Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	22
2.3.5 Fase Gerak Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	23
2.3.6 Fase Diam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	25
2.4 Parameter Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	25
2.4.1 Waktu Retensi	25
2.4.2 Faktor Kapasitas	26
2.4.3 Jumlah Plat Teoritis	27
2.4.4 Resolusi	28
2.4.5 Selektivitas	28
2.4.6 Faktor <i>Tailing</i>	29

2.5. Validasi Metode Analisis	31
2.5.1 Linearitas	31
2.5.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	32
2.5.3 Akurasi	33
2.5.4 Presisi	34
2.5.5 Selektivitas	35
2.6 Metode Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna	36
2.7 Perhitungan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna	40
BAB III METODE PENELITIAN	41
3.1 Metode Penelitian	41
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	41
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	42
3.3.1 Alat Penelitian	42
3.3.2 Bahan Penelitian	42
3.4 <i>ChamStation Software</i>	42
3.5 Sampel Sirup Esens	43
3.6 Sirup Uji Akurasi dan Presisi	43
3.7 Rancangan Penelitian	44
3.8 Parameter Penelitian	44
3.9 Prosedur Penelitian	45
3.9.1 Pembuatan Larutan	45
3.9.1.1 Pembuatan Larutan Asam Fosfat 10 mM	45
3.9.1.2 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,7 ...	45
3.9.1.3 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,5 ...	45

3.9.1.4	Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,3 ...	46
3.9.1.5	Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,0 ...	46
3.9.1.6	Pembuatan Larutan Baku Induk Satu	46
3.9.1.7	Pembuatan Larutan Baku Induk Dua	47
3.9.1.8	Pembuatan Larutan Baku Tunggal	47
3.9.1.9	Pembuatan Larutan Baku Tunggal Seri	47
3.9.1.10	Pembuatan Larutan Baku Campuran	48
3.9.1.11	Pembuatan Larutan Baku Campuran Seri ...	48
3.9.2	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	49
3.9.3	Optimasi Metode KCKT	49
3.9.3.1	Optimasi Volume <i>Void</i>	49
3.9.3.2	Optimasi Panjang Gelombang	50
3.9.3.3	Optimasi pH Fase Gerak	50
3.9.3.4	Optimasi Komposisi Fase Gerak	51
3.9.3.5	Optimasi Laju Alir	51
3.9.3.6	Optimasi Suhu Kolom	52
3.9.4	Penentuan Waktu Retensi Senyawa	52
3.9.5	Validasi Metode KCKT	53
3.9.5.1	Linearitas	53
3.9.5.2	Akurasi	53
3.9.5.3	Presisi	55
3.9.5.4	Selektivitas	56
3.9.6	Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dalam Sampel	57

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	58
4.1 Panjang Gelombang Maksimum	58
4.2 Tahap Optimasi	61
4.2.1 Optimasi Volume <i>Void</i>	61
4.2.2 Optimasi Panjang Gelombang	63
4.2.3 Optimasi pH Fase Gerak	69
4.2.4 Optimasi Komposisi Fase Gerak	73
4.2.5 Optimasi Laju Alir	75
4.2.6 Optimasi Suhu Kolom	77
4.3 Hasil Optimasi	78
4.4 Waktu Retensi	79
4.5 Validasi Metode	80
4.5.1 Linearitas Baku	80
4.5.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	81
4.5.3 Akurasi	82
4.5.4 Presisi	83
4.5.5 Selektivitas	84
4.6 Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dalam Sampel	86
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	92
5.1 Kesimpulan	92
5.2 Saran	93
DAFTAR PUSTAKA	94
LAMPIRAN	101

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Detektor yang Paling Sering Digunakan pada KCKT	20
Tabel 2.2 Penyebab dan Solusi Masalah Bentuk Kromatogram	30
Tabel 2.3 Rentang Persentase <i>Recovery</i>	33
Tabel 2.4 Persentase <i>Relative Standard Deviation</i> Uji Ripitabilitas	35
Tabel 2.5 Persentase <i>Relative Standard Deviation</i> Uji Reproduksiabilitas	35
Tabel 2.6 Daftar Beberapa Penelitian Optimasi dan Validasi metode atau Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	38
Tabel 4.1 Pengaruh Volume <i>Void</i> terhadap Parameter Optimasi	61
Tabel 4.2. Faktor <i>Tailing</i> Senyawa pada Masing-Masing Panjang Gelombang	63
Tabel 4.3 Pengaruh pH Buffer terhadap Parameter Optimasi	69
Tabel 4.4 Pengaruh Komposisi Fase Gerak terhadap Parameter Optimasi	73
Tabel 4.5 Pengaruh Laju Alir terhadap Parameter Optimasi	75
Tabel 4.6 Pengaruh Suhu Kolom terhadap Parameter Optimasi	77
Tabel 4.7 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Masing-Masing Senyawa	81
Tabel 4.8 Persen Perolehan Kembali Masing-Masing Senyawa	82
Tabel 4.9 Presisi Ripitabilitas dan Reproduksiabilitas Metode	83
Tabel 4.10 Kadar Masing-Masing Senyawa dalam Sampel	87

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Kerangka Konsep Penelitian	4
Gambar 2.1 Struktur Natrium Sakarin	9
Gambar 2.2 Struktur Natrium Siklamat	10
Gambar 2.3 Struktur Natrium Benzoat	11
Gambar 2.4 Struktur Kalium Sorbat	12
Gambar 2.5 Struktur Tartrazin	13
Gambar 2.6 Struktur <i>Sunset Yellow</i>	14
Gambar 2.7 Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	16
Gambar 2.8 Skema Penyuntikan Sampel Metode <i>Valve</i>	18
Gambar 2.9 Seleksi Tipe Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	22
Gambar 2.10 Waktu Retensi Senyawa	26
Gambar 2.11 Resolusi Dua Senyawa	28
Gambar 2.12 Pengukuran Faktor <i>Tailing</i>	29
Gambar 4.1 Spektrum <i>Overlay</i> Enam Senyawa Baku	58
Gambar 4.2 Hubungan Volume <i>Void</i> dengan Faktor Kapasitas dan Selektifitas Natrium Sakarin, Natrium Siklamat, Natrium Benzoat, Tartrazin dan <i>Sunset Yellow</i>	61
Gambar 4.3 Hubungan Volume <i>Void</i> dengan Faktor Kapasitas dan <i>Tailing</i> Natrium Siklamat	62
Gambar 4.4 Kromatogram Serapan Pelarut pada Panjang Gelombang 200 nm - 220 nm	64
Gambar 4.5 Faktor <i>Tailing</i> dan Tinggi Serapan Natrium Sakarin, Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat pada Panjang Gelombang 220 nm - 240 nm	65
Gambar 4.6 Kromatogram Larutan Baku Ditambah Sirup X pada Panjang Gelombang 220 nm – 240 nm	66

Gambar 4.7	Kromatogram Larutan Baku Ditambah Sirup X pada Panjang Gelombang 440 nm - 470 nm	67
Gambar 4.8	Faktor <i>Tailing</i> dan Tinggi Serapan Tartrazin dan <i>Sunset Yellow</i> pada Panjang Gelombang 440 nm - 470 nm	68
Gambar 4.9	Hubungan pH dengan Faktor <i>Tailing</i> , Resolusi dan Faktor Kapasitas Natrium Sakarin, Natrium Siklamat, Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, Tartrazin dan <i>Sunset Yellow</i>	70
Gambar 4.10	Pengaruh Komposisi Fase Gerak terhadap Faktor <i>Tailing</i> Natrium Sakarin, Natrium Siklamat, Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, Tartrazin dan <i>Sunset Yellow</i>	74
Gambar 4.11	Pengaruh Laju Alir terhadap Tekanan Pompa Sistem KCKT dan Faktor <i>Tailing</i> Natrium Sakarin, Natrium Siklamat, Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, Tartrazin dan <i>Sunset Yellow</i>	76
Gambar 4.12	Kromatogram Senyawa Hasil Optimasi Metode pada Panjang Gelombang 200 nm	78
Gambar 4.13	Kromatogram Senyawa Hasil Optimasi Metode pada Panjang Gelombang 220 nm	78
Gambar 4.14	Kromatogram Senyawa Hasil Optimasi Metode pada Panjang Gelombang 450 nm	78
Gambar 4.15	Kurva Linearitas Natrium Sakarin, Natrium Siklamat, Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, Tartrazin dan <i>Sunset Yellow</i>	80
Gambar 4.16	Kromatogram <i>Overlay</i> Selektivitas Larutan Baku, Sirup X dan Sirup X Ditambah Baku pada Panjang Gelombang 200 nm Menggunakan Metode Hasil Optimasi	84
Gambar 4.17	Kromatogram <i>Overlay</i> Selektivitas Larutan Baku, Sirup X dan Sirup X Ditambah Baku pada Panjang Gelombang 220 nm Menggunakan Metode Hasil Optimasi	85
Gambar 4.18	Kromatogram <i>Overlay</i> Selektivitas Larutan Baku, Sirup X dan Sirup X Ditambah Baku pada Panjang Gelombang 450 nm Menggunakan Metode Hasil Optimasi	85
Gambar 4.19	Spektrum <i>Overlay</i> Natrium Sakarin Baku (Sigma Aldrich)	90
Gambar 4.20	Spektrum <i>Overlay</i> Natrium Siklamat dari Salah Satu Produk yang Beredar di Pasar Kota Medan	90
Gambar 4.21	Spektrum <i>Overlay</i> Natrium Siklamat Baku (Sigma Aldrich)	91

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Sertifikat Analisis Bahan Baku	101
Lampiran 2. Spesifikasi Sampel dan Sirup X	107
Lampiran 3. Spektrum Masing-Masing Senyawa Baku	108
Lampiran 4. Absorbansi Masing-Masing Senyawa Baku	111
Lampiran 5. Kromatogram Optimasi Volume <i>Void</i>	112
Lampiran 6. Kromatogram Optimasi Panjang Gelombang	113
Lampiran 7. Contoh Hasil Perhitungan Faktor <i>Tailing</i>	116
Lampiran 8. Kromatogram Optimasi pH Larutan Buffer Fosfat	117
Lampiran 9. Kromatogram Optimasi Komposisi Fase Gerak	121
Lampiran 10. Kromatogram Optimasi Laju Alir	124
Lampiran 11. Kromatogram Optimasi Suhu Kolom	127
Lampiran 12. Kromatogram Waktu Retensi Masing-Masing Senyawa Baku	130
Lampiran 13. Data Waktu Retensi Masing-Masing Senyawa Baku	132
Lampiran 14. Kromatogram <i>Overlay</i> Larutan Baku Seri	133
Lampiran 15. Massa, Konsentrasi Larutan Baku dan Data Hubungan Konsentrasi dengan Luas Area Larutan Baku Seri	136
Lampiran 16. Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	137
Lampiran 17. Kromatogram Akurasi	141
Lampiran 18. Luas Area Masing-Masing Senyawa dalam Larutan Sirup X dan Sirup X Ditambah Baku	153
Lampiran 19. Contoh Perhitungan Konsentrasi Senyawa dalam Sirup X Ditambah Baku	154

Lampiran 20.	Contoh Perhitungan Konsentrasi Senyawa dalam Sirup X	155
Lampiran 21.	Contoh Perhitungan Konsentrasi Sebenarnya yang Ditambahkan ke dalam Sirup X dan Persentase Perolehan Kembali	156
Lampiran 22.	Konsentrasi Sebenarnya yang Ditambahkan dalam Sirup X, Konsentrasi Senyawa dalam Sirup X Ditambah Baku dan Sirup X serta Persentase Perolehan Kembali	157
Lampiran 23.	Kromatogram Presisi	158
Lampiran 24.	Contoh Perhitungan Standar Deviasi dan Persentase <i>Relative Standard Deviation</i>	170
Lampiran 25.	Luas Area dan Hasil Perhitungan Presisi	171
Lampiran 26.	Kromatogram Senyawa dalam Sampel	172
Lampiran 27.	Luas Area Masing-Masing Senyawa dalam Sampel	190
Lampiran 28.	Contoh Perhitungan Kadar Senyawa dalam Sampel	191

PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR CAMPURAN PEMANIS, PENGAWET DAN PEWARNA SECARA SIMULTAN DALAM SIRUP ESSENS DENGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Abstrak

Sirup merupakan larutan gula pekat dengan atau tanpa penambahan bahan tambahan pangan. Bahan pemanis, pengawet dan pewarna dapat mengganggu kesehatan bila dikonsumsi berlebihan. Tujuan penelitian adalah untuk mengembangkan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dalam sirup esens. Penelitian menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik, tiga panjang gelombang dengan instrumen UFLC 1290 DAD (Agilent), kolom C18 100 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m (Agilent), spektrofotometer UV Probe 1800 (Shimadzu), bahan baku natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow*. Parameter optimasi meliputi volume void, panjang gelombang, pH fase gerak, komposisi fase gerak, laju alir dan suhu kolom. Parameter validasi meliputi linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi dan selektivitas. Metode yang diperoleh digunakan untuk penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dalam sampel sirup esens. Sebanyak enam sampel sirup esens diperoleh dari grosir dan supermarket di Kota Medan dan diberi kode H, I, J, K, L dan M.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum pengujian adalah volume void 30% dengan tiga panjang gelombang analisis, yaitu: 200 nm untuk natrium siklamat; 220 nm untuk natrium sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat; 450 nm untuk tartrazin dan *sunset yellow*. Fase gerak buffer fosfat pH 4,5 dan metanol 75 : 25 (v/v), laju alir 1,0 ml/menit, suhu kolom 30°C. Rentang waktu retensi adalah 0,941 menit - 8,583 menit. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa rentang linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, persen RSD keterulangan dan ketertiruan metode masing-masing 0,99945 – 0,99999; 0,03634 ppm - 2,66306 ppm; 0,12113 ppm - 8,87687 ppm; 92,92% - 105,72%; 0,11% - 1,53% dan 0,04% – 1,94%. Uji selektivitas metode menunjukkan hasil yang baik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalium sorbat tidak terkandung dalam sampel sirup esens. Rentang kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, tartrazin dan *sunset yellow* dalam sampel sirup esens masing-masing 37,952 mg/kg – 533,990 mg/kg; 2753,140 mg/kg – 5329,890 mg/kg; 464,456 mg/kg – 1615,360 mg/kg; 41,957 mg/kg - 108,048 mg/kg dan 31,084 mg/kg – 145,399 mg/kg. Sampel sirup esens mengandung kadar natrium sakarin untuk kode I dan natrium benzoat untuk kode H, J dan K melebihi batas penggunaan maksimum. Semua sampel sirup esens mengandung natrium siklamat melebihi batas penggunaan maksimum.

Kata kunci : Pemanis, Pengawet, Pewarna, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Optimasi, Validasi, Sirup Esens.

METHOD DEVELOPMENT OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SWEETENERS, PRESERVATIVES AND DYES IN ESSENCES SYRUP USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Abstract

Syrup is concentrated sugar solution with or without the addition of food additives. Sweeteners, preservatives and dyes can be hazardous to health if they are over consumed. The purpose of this research was to develop a method for the simultaneous determination of sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, potassium sorbate, tartrazine and sunset yellow in essence syrup. This research used high performance liquid chromatography reverse phase, three wavelengths with UFLC 1290 DAD (Agilent), column C18 100 mm x 4.6 mm x 3.5 μ m (Agilent), spectrophotometer UV Probe 1800 (Shimadzu), standard material sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, potassium sorbate, tartrazine and sunset yellow. Optimization parameters were include void volume, wavelengths, pH of mobile phase, composition of mobile phase, flow rate and column temperature. Validation parameters were include linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, precision and selectivity. The method obtained was used for the simultaneous determination of sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, potassium sorbate, tartrazine and sunset yellow in essence syrup samples. A total of six essence syrup samples were obtained from wholesale and supermarket in Medan City and given code H, I, J, K, L and M.

The results of reseach showed that the optimum conditions were void volume 30% with three-wavelength analysis, i.e: 200 nm for sodium cyclamate; 220 nm for sodium saccharin, sodium benzoate and potassium sorbate; 450 nm for tartrazine and sunset yellow. Mobile phase was phosphate buffer pH 4.5 and methanol 75: 25 (v/v), flow rate was 1.0 ml/min, column temperature was 30°C. The range of retention time was 0.941 minute - 8.583 minute. The results of validation method showed that the ranges of linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, percent RSD of the repeatability and reproducibility methods were 0.99945 - 0.99999; 0.03634 ppm - 2.66306 ppm; 0.12113 ppm - 8.87687 ppm; 92.92% - 105.72%; 0.11% - 1.53% and 0.04% - 1.94%, respectively. The selectivity test of methods showed good results. The result showed that potassium sorbate is not contained in essence syrup samples. The ranges of levels of sodium saccharin, sodium cyclamate, sodium benzoate, tartrazine and sunset yellow in the samples of essences syrup were 37.952 mg/kg - 533.990 mg/kg; 2753.140 mg/kg - 5329.890 mg/kg; 464.456 mg/kg - 1615.360 mg/kg; 41.957 mg/kg - 108.048 mg/kg and 31.084 mg/kg - 145.399 mg/kg, respectively. Samples of essences syrup contain of sodium saccharin for the I code and sodium benzoate for the H, J and K codes exceed the maximum usage limit. All samples syrup contain of sodium cyclamate essences exceed the maximum usage limit.

Key words : Sweeteners, Preservatives, Dyes, High Performance Liquid Chromatography, Optimization, Validation, Essence Syrup.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Standar Nasional Indonesia No. 01-3544-1994 (SNI 01-3544-1994) yang diterbitkan oleh Badan Standarisasi Nasional (BSN), dinyatakan bahwa sirup merupakan larutan gula pekat dengan atau tanpa penambahan bahan tambahan pangan (BSN, 1994). Berdasarkan bahan baku yang digunakan untuk pembuatan sirup, maka sirup dibedakan menjadi lima, yaitu: sirup maltosa, sirup glukosa, sirup fruktosa, sirup buah dan sirup esens (BSN, 1992a; BSN, 1992b; BSN, 1992c; Satuhu, 1994). Sirup fruktosa, sirup glukosa dan sirup maltosa berdasarkan kategori pangan sebagai pemanis. Sedangkan sirup buah, sirup berperisa, squash dan squash berperisa sebagai minuman (Badan POM RI, 2006). Sirup esens adalah sirup yang cita rasanya ditentukan oleh esens yang ditambahkan, misalnya esens jeruk, esens markisa, esens nenas dan lain-lain (Satuhu, 1994).

Pemanis sintetis digunakan untuk mengontrol program pemeliharaan dan penurunan berat badan, mengurangi kerusakan gigi dan sebagai bahan substituen pemanis alami dalam diet diabetes (Roberts dan Wright, 2012; Ambarsari, dkk., 2009; Rismana dan Paryanto, 2007; Kroger, et al., 2006; BSN, 1995b; BSN, 2004). Akan tetapi, pemanis sintetis seperti sakarin dapat meningkatkan frekuensi resiko kanker kandung kemih, menimbulkan reaksi alergi dan berpotensi memicu pertumbuhan tumor (Roberts dan Wright, 2012; Ambarsari, dkk., 2009). Siklamat menyebabkan tumor kandung kemih, paru, hati dan limpa serta menyebabkan kerusakan genetik dan atropi testicular (BSN, 2004).

Pengawet merupakan bahan tambahan pangan untuk mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman atau peruraian terhadap makanan yang disebabkan oleh mikroorganisme (BSN, 1995a). Namun, pengawet dapat menyebabkan kerusakan organ tubuh manusia, karena pemakaian terus-menerus (Oyewole, et al., 2012; Harmita, 2005).

Demikian juga pewarna, sebagai bahan tambahan pangan yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada pangan, seperti tartrazin dan *sunset yellow* yang biasa terdapat pada sirup esens. Ternyata, tartrazin menyebabkan reaksi alergi, hiperaktif, hepatotoksik dan nefrotoksik (Rus, et al., 2010). *Sunset yellow* menimbulkan reaksi alergi, hiperaktivitas, sakit perut, mual dan muntah (Vachirapatama, et al., 2008). Beberapa negara membuat aturan harus menuliskan peringatan pada label tentang reaksi alergi yang mungkin terjadi (Allam dan Kumari, 2011), bahkan melarang penggunaan pewarna tartrazin dan *sunset yellow* (Vachirapatama, et al., 2008). Tahun 2009, *European Food Safety Authority* (EFSA) telah memutuskan untuk menurunkan sementara *Acceptable Daily Intake* (ADI) *sunset yellow* sebesar 2,5 mg/kg berat badan menjadi 1 mg/kg berat badan karena alasan terjadi efek yang signifikan pada testis (EFSA, 2009a).

Kandungan pemanis, pengawet dan pewarna dalam produk sirup esens menjadi perhatian karena dapat menimbulkan efek yang membahayakan bagi kesehatan bila dikonsumsi dalam jumlah berlebih dan jangka waktu yang lama. Oleh karena itu, dibutuhkan pengawasan untuk menjamin bahwa bahan tambahan tersebut digunakan tidak melebihi batas maksimal yang diizinkan (Badan POM RI, 2013a; Badan POM RI, 2013b; BSN, 2004).

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan teknik analisis yang ideal karena cepat, sederhana, kepekaan tinggi dan diperoleh hasil yang teliti (Hartono, 2007; De Lux, 2004). Penetapan kadar sakarin dalam campuran atau siklamat sebagai zat tunggal telah dilakukan dengan menggunakan KCKT (Ree dan Stoa, 2011; Novelina, dkk., 2009). Penetapan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat juga telah dilakukan dengan menggunakan KCKT (Pylypiw dan Grether, 2000). Demikian juga penetapan kadar tartrazin dan *sunset yellow*, telah dilakukan dengan menggunakan KCKT (Diacu dan Ene, 2009).

Penetapan kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dapat dilakukan menggunakan KCKT. Bahan-bahan tersebut memiliki sifat fisika kimia yang beragam seperti polaritas, pKa dan panjang gelombang maksimum yang berbeda sehingga membutuhkan tahap optimasi untuk dapat dianalisis secara simultan. Metode analisis yang ada biasanya hanya menetapkan kadar satu senyawa atau beberapa senyawa dan tidak untuk menetapkan kadar keenam senyawa tersebut secara simultan.

Metode penetapan kadar yang tidak simultan menyebabkan proses pengujian menjadi tidak efisien, lebih mahal dan pereaksi kimia yang lebih banyak serta membutuhkan waktu analisis yang lebih lama. Upaya untuk memperoleh suatu metode yang baik memerlukan tahap optimasi agar diperoleh metode analisis yang memiliki resolusi yang baik, sensitifitas uji yang tinggi, waktu analisis yang cepat dan biaya yang lebih murah (Hayun, dkk., 2004).

Oleh karena itu, penulis ingin melakukan pengembangan metode KCKT untuk menetapkan kadar campuran pemanis, pengawet dan pewarna dalam sirup esens yang terdiri dari natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow*.

1.2 Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep penelitian terdiri dari tahap optimasi, validasi dan penetapan kadar sampel. Pada tahap optimasi terdapat dua variabel, yaitu: variabel bebas dan variabel terikat. Sebagai variabel bebas adalah volume *void*, panjang gelombang, pH fase gerak, komposisi fase gerak, laju alir dan suhu kolom. Sedangkan variabel terikat adalah faktor kapasitas, faktor *tailing*, waktu retensi, resolusi, selektivitas dan jumlah plat teoritis. Metode yang diperoleh dari hasil optimasi kemudian diuji penggunaannya sesuai parameter validasi. Metode hasil validasi kemudian digunakan untuk penetapan kadar bahan pemanis, pengawet dan pewarna dalam sampel sirup esens. Kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.1.

Gambar 1.1 Kerangka Konsep Penelitian

1.3 Perumusan Masalah

Berdasarkan kerangka konsep penelitian, dapat disusun rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pengembangan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi memberikan hasil kondisi KCKT yang optimum?
2. Apakah hasil optimasi pengembangan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi memenuhi syarat validasi?
3. Apakah hasil validasi pengembangan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dalam sirup esens?

1.4 Hipotesis

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Pengembangan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi memberikan hasil kondisi KCKT yang optimum berdasarkan parameter optimasi.

2. Hasil optimasi pengembangan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi memenuhi persyaratan validasi.
3. Hasil validasi pengembangan metode penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat diaplikasikan untuk menetapkan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin, *sunset yellow* secara simultan dalam sirup esens.

1.5 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan metode KCKT *dioda array* untuk digunakan dalam penetapan kadar campuran natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dalam sirup esens.

1.6 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan menjadi metode pilihan utama yang dapat digunakan oleh Badan POM RI dan Laboratorium Standarisasi serta menjadi rujukan metode penetapan kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan dalam sirup esens yang beredar di pasaran.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sirup

Sirup adalah larutan gula pekat dengan atau tanpa penambahan bahan tambahan pangan yang diizinkan (BSN, 1994). Berdasarkan bahan baku yang digunakan untuk pembuatan sirup, maka sirup dibedakan menjadi lima, yaitu: sirup maltosa, sirup glukosa, sirup fruktosa, sirup buah dan sirup esens (BSN, 1992a; BSN, 1992b; BSN, 1992c; Satuhu, 1994). Berdasarkan kategori pangan sirup fruktosa, glukosa dan maltosa sebagai pemanis. Sedangkan sirup buah, berperisa, squash dan squash berperisa sebagai minuman (Badan POM RI, 2006).

Sirup glukosa, fruktosa atau maltosa merupakan cairan kental dan jernih dengan komponen utama glukosa, fruktosa atau maltosa yang diperoleh dari hidrolisis pati dengan cara kimia atau enzimatis (BSN, 1992a; BSN, 1992b; BSN, 1992c). Sirup buah atau minuman squash adalah sirup yang aroma dan rasanya ditentukan oleh buah segar (BSN, 1998; Satuhu, 1994). Sirup buah atau squash adalah produk minuman yang cita rasanya ditentukan oleh sari buah yang ditambahkan (Badan POM RI, 2006; BSN, 1998; Satuhu, 1994). Sirup esens atau sirup berperisa adalah produk minuman yang cita rasanya ditentukan oleh esens yang ditambahkan misalnya: esens jeruk, mangga, markisa atau nenas dan lain-lain (Badan POM RI, 2006; Satuhu, 1994). Squash berperisa adalah produk minuman yang cita rasanya ditentukan oleh esens dengan atau tanpa cita rasa buah (Badan POM RI, 2006).

2.2 Bahan Tambahan Pangan

Bahan tambahan pangan (BTP) adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan, baik yang mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi (BSN, 2004). BTP merupakan bahan yang ditambahkan dengan sengaja ke dalam produk pangan dalam jumlah kecil dengan tujuan untuk memperbaiki penampilan, cita rasa, memperpanjang daya simpan dan lain-lain (BSN, 1995a).

Bahan tambahan pangan bukan bagian dari bahan pangan, tetapi terdapat dalam produk pangan tersebut karena perlakuan saat pengolahan, penyimpanan atau pengemasan. BTP meliputi bahan pengawet, pemanis, pewarna, penguat rasa, pemutih, anti kempal dan anti oksidan (BSN, 1995a). Batas penggunaan maksimum atau konsentrasi maksimum yang diizinkan untuk ditambahkan ke dalam produk pangan dinyatakan dalam milligram per kilogram bahan sesuai dengan nomor kategori pangan (Badan POM RI, 2006; BSN, 2004).

2.2.1 Bahan Pemanis Pangan

Pemanis sintetis adalah bahan tambahan pangan yang dapat menyebabkan terutama rasa manis pada produk pangan dengan tidak atau sedikit mempunyai nilai gizi atau kalori. Pemanis sintetis yang diizinkan mencakup alitام, asesulfام, aspartام, isomalt, laktitol, maltitol, manitol, neotام, sakarin, siklامat, silitol, sorbitol dan sukralosa (BSN, 2004). Pemanis sintetis dapat ditemukan hampir pada semua produk, seperti: yoghurt, es krim, makanan pencuci mulut, permen, permen karet, saus dan produk lainnya (Zygler, et al., 2011).

2.2.1.1 Sakarin

Sakarin atau 1,2-benzisotiazolin-3-on-1,1-dioksida dengan rumus kimia $C_7H_5NO_3S$, mempunyai pKa 1,8 dan panjang gelombang maksimum 202 nm, secara komersil dalam bentuk garam kalsium, kalium dan natrium (Ambarsari, dkk., 2009; Windholz, et al., 1983). Garam sakarin berbentuk kristal putih, tidak berbau, mudah larut dalam air dan berasa manis dengan tingkat kemanisan relatif sebesar 300 sampai 500 kali kemanisan sukrosa, tetapi tanpa nilai kalori (Serdar dan Knezevic, 2011). Struktur natrium sakarin dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Windholz, et al., 1983; Kroger, 2006).

Gambar 2.1 Struktur Natrium Sakarin

Sakarin tidak dimetabolisme, lambat diserap oleh usus, cepat dikeluarkan melalui urin tanpa perubahan, tidak bereaksi dengan DNA, tidak bersifat karsinogenik, tidak menyebabkan karies gigi dan cocok bagi penderita diabetes (Ambarsari, dkk., 2009). Meskipun dinyatakan aman untuk dikonsumsi, namun penggunaan dalam produk pangan di USA masih dibatasi (Kroger, et al., 2006). Mungkin, karena tikus yang diberi sakarin 0,5% setiap hari selama dua tahun terbukti menderita kanker kandung kemih (Reuber, 1978). *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) menetapkan ADI untuk sakarin sebesar 5 mg/kg bb/hari (BSN, 2004). Penggunaan pada sirup esens tidak lebih dari 500 mg/kg (BSN, 2004).

2.2.1.2 Siklamat

Siklamat, asam siklamat atau asam sikloheksilsulfamat ($C_6H_{13}NO_3S$) (Ambarsari, dkk., 2009), mempunyai pKa 1,90 dan panjang gelombang maksimum 194 nm (Xiao, et al., 2011). Siklamat digunakan dalam bentuk garam kalsium, kalium dan natrium. Garam siklamat berbentuk kristal putih, tidak berbau, tidak berwarna, mudah larut dalam air dan etanol, berasa manis (Ambarsari, dkk., 2009). Struktur natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 2.2 (Windholz, et al., 1983).

Gambar 2.2 Struktur Natrium Siklamat

Siklamat memiliki kemanisan relatif sebesar 30 kali kemanisan sukrosa dan tanpa nilai kalori. Kombinasi dengan sakarin bersifat sinergis. JECFA menetapkan *acceptable daily intake* (ADI) untuk siklamat sebesar 11 mg/kg bb/hari (BSN, 2004). Penggunaan pada sirup esens tidak lebih dari 1000 mg/kg (BSN, 2004).

2.2.2 Bahan Pengawet Pangan

Pengawet adalah bahan tambahan pangan untuk mencegah atau menghambat fermentasi terhadap pangan yang disebabkan oleh mikroorganisme. Pengawet yang diizinkan antara lain: asam atau garam benzoat, propoat dan sorbat (Badan POM RI, 2013a).

2.2.2.1 Natrium Benzoat

Asam benzoat atau *acidum benzoicum* berfungsi sebagai antimikroba, mempunyai pKa 4,2 dan panjang gelombang maksimum 225 nm. Natrium benzoat atau natrium benzenakarboksilat (C_6H_5COONa) yang sering digunakan sebagai pengawet karena sangat mudah larut dalam air, berupa serbuk yang stabil, tidak berbau, berwarna putih dengan rasa menyengat, bersifat higroskopik dan larut dalam metanol (Windholz, et al., 1983; Pylypiw dan Grether, 2000). Struktur natrium benzoat dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Windholz, et al., 1983).

Gambar 2.3 Struktur Natrium Benzoat

Natrium benzoat digunakan pada makanan yang mempunyai pH 2,5 - 4,0 untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme, misalnya: minuman berkarbonasi, selai, jus buah dan sirup (Oyewole, et al., 2012; Sibarani, 2010; Hartono, 2007; Pylypiw dan Grether, 2000). Penggunaan pada sirup tidak lebih dari 0,09% atau 900 ppm (Badan POM RI, 2013a) dengan ADI sebesar 5 mg/kg berat badan (JECFA, 1974). Natrium benzoat telah dilaporkan menyebabkan efek samping langsung, seperti reaksi alergi (Hussain, et al., 2011) atau efek samping tidak langsung yang serius dalam tubuh akibat dikonsumsi secara terus-menerus sehingga menyebabkan kerusakan sel hati dan ginjal yang ditandai dengan peningkatan *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine aminotransferase* (ALT) dalam serum dan kreatinin, glutamin, urea dan asam urat dalam urin (Oyewole, et al., 2012).

2.2.2.2 Kalium Sorbat

Asam sorbat atau asam-trans-2,4-hexadienat memiliki rumus molekul $C_6H_8O_2$. Asam sorbat merupakan padatan putih berbentuk kristal dan berbau agak asam. Asam sorbat efektif untuk mencegah pertumbuhan khamir, kapang dan bakteri pada pH rendah, namun tetap efisien pada pH 6,5 (Hussain, et al., 2010; Pylypiw dan Grether, 2000; Windholz, et al., 1983).

Secara komersil, asam sorbat tersedia dalam bentuk garam kalsium, natrium, dan kalium sorbat. Kalium sorbat lebih umum digunakan daripada asam sorbat karena kelarutan dalam air lebih tinggi daripada asam sorbat, mempunyai pKa 4,80 dan panjang gelombang maksimum 255 nm (Hussain, et al., 2010; Pylypiw dan Grether, 2000; Windholz, et al., 1983). Struktur kalium sorbat dapat dilihat pada Gambar 2.4 (Windholz, et al., 1983).

Gambar 2.4 Struktur Kalium Sorbat

Kalium sorbat telah digunakan sebagai pengawet sejak tahun 1945. Kalium sorbat banyak digunakan dalam berbagai macam makanan termasuk keju, roti, margarin, sayuran, produk buah, salad, sirup dan ikan asin. Konsentrasi kalium sorbat dalam sirup tidak lebih dari 0,1% atau 1000 ppm (Hussain, et al., 2010; Sibarani, 2010; Badan POM RI, 2013a) dengan ADI sebesar 25 mg/kg bobot badan (JECFA, 1974).

2.2.3 Bahan Pewarna Pangan

Pewarna adalah bahan tambahan pangan yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada makanan. Pewarna alami dan sintetis telah banyak digunakan dalam pangan, namun 95% yang digunakan saat ini adalah sintetis, karena diproduksi dengan mudah, murah dan memberikan warna yang lebih stabil (Gautam, et al., 2010). Tartrazin dan *sunset yellow* merupakan pewarna sintetis yang banyak digunakan dalam minuman ringan, sirup, biskuit, saus dan lain-lain (Gautam, et al., 2010; Vachirapatama, et al., 2008).

2.2.3.1 Tartrazin

Tartrazin atau trinitratium-5-hidroksi-1-(4-fenilsulfonat)-4-(4-fenilazo-sulfonat) pirazol-3-karboksilat (EFSA, 2009b), rumus molekul $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ dan $pK_a = 10,9$ (Gomez, et al., 2012; Himri, et al., 2011) dengan nomor indeks warna 19140 (Zatar, 2007). Tartrazin merupakan serbuk berwarna kuning, stabil terhadap suhu, cahaya, asam dan basa serta mempunyai panjang gelombang maksimum 427 nm (Zatar, 2007). Struktur tartrazin dapat dilihat pada Gambar 2.5 (Windholz, et al., 1983).

Gambar 2.5 Struktur Tartrazin

Tartrazin dikenal sebagai zat warna azo yang digunakan dalam pangan, produk obat-obatan dan kosmetik. Batasan ADI sebesar 7,5 mg/kg berat badan (EFSA, 2009b) dan batas maksimum penggunaan dalam sirup sebesar 300 mg/kg atau 0,03% (Badan POM RI, 2013b).

Efek kronis warna ortoaminoazo-toluen dapat menyebabkan kanker hati, jika dikonsumsi dalam jangka waktu lama. Senyawa azo lainnya dapat mengakibatkan kanker dengan waktu lebih lama (Himri, et al., 2011). Pewarna tartrazin menyebabkan hepatotoksik dan nefrotoksik (Rus, et al., 2010) sehingga Austria maupun Norwegia melarang penggunaan tartrazin (Vachirapatama, et al., 2008).

2.2.3.2 *Sunset Yellow*

Sunset yellow, dinatrium-6-hidroksi-5-(4-sulfonatofenilazo) naftalen sulfonat (EFSA, 2009a), nomor indeks warna 15985 (Zatar, 2007), serbuk berwarna kuning, stabil terhadap suhu, cahaya, asam dan basa, mempunyai pKa = 9,20 dan panjang gelombang maksimum 481 nm (Gomez, et al., 2012; Zatar, 2007). Struktur *sunset yellow* dapat dilihat pada Gambar 2.6 (Vachirapatama, et al., 2008).

Gambar 2.6 Struktur *Sunset Yellow*

Sunset yellow dapat ditemukan dalam sirup orange, jus jeruk, es krim dan lain-lain (Vachirapatama, et al., 2008). Batasan ADI sebesar 2,5 mg/kg diubah sementara menjadi 1 mg/kg berat badan karena alasan terjadi efek yang signifikan pada testis (EFSA, 2009a). Batas maksimum *sunset yellow* dalam sirup sebesar 300 mg/kg atau 0,03 % (Badan POM RI, 2013b). *Sunset yellow* dapat menimbulkan alergi, hiperaktivitas, mual dan muntah. Norwegia melarang penggunaan *sunset yellow* (Vachirapatama, et al., 2008; EFSA, 2009a).

2.3 Kromatografi

Kromatografi pertama sekali diperkenalkan oleh Mikhail Tswett, seorang ahli botani Rusia pada tahun 1903. Beliau memisahkan pigmen yang terdapat dalam daun dengan kolom gelas vertikal yang diisi serbuk kalsium karbonat. Pada waktu yang hampir bersamaan, D.T. Day juga menggunakan kromatografi untuk memisahkan fraksi-fraksi petroleum, namun Mikhail Tswett yang diakui sebagai penemu dan yang menjelaskan tentang proses kromatografi (Dong, 2006; De Lux, 2004; Grob dan Barry, 2004).

Kromatografi merupakan teknik pemisahan campuran menggunakan fase diam dan fase gerak. Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen campuran dengan laju yang berbeda, sehingga terjadi pemisahan karena perbedaan daya adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau muatan ion. Berdasarkan fase gerak, kromatografi dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu: Kromatografi Gas dan Kromatografi Cair. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merupakan salah satu jenis Kromatografi Cair (Dong, 2006; De Lux, 2004; Grob dan Barry, 2004).

2.3.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah metode kromatografi yang menggunakan fase gerak cair dan fase diam cair atau padat untuk melakukan pemisahan suatu jenis molekul. KCKT yang menggunakan fase gerak polar dengan fase diam non-polar disebut KCKT fase terbalik (*reversed phase*). KCKT yang menggunakan fase gerak non-polar dan fase diam polar disebut KCKT fase normal (*normal phase*) (De Lux, 2004; Gritter, et al., 1991).

2.3.4 Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat dilihat pada Gambar 2.7 yang terdiri dari:

1. Wadah fase gerak

Wadah fase gerak terbuat dari bahan yang inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan adalah gelas dan baja anti karat. Daya tampung tandon harus lebih besar dari 500 ml sehingga dapat digunakan selama 4 jam dengan kecepatan alir yang umumnya 1-2 ml/menit (Dong, 2006; De Lux, 2004).

Sumber: De Lux, 2004

Gambar 2.7 Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2. Pompa

Untuk mengalirkan fase gerak melalui kolom diperlukan pompa yang terbuat dari bahan inert terhadap semua pelarut, umumnya digunakan gelas, baja antikorosi dan teflon. Aliran pelarut harus tanpa denyut untuk menghindari hasil yang menyimpang pada detektor. Pompa harus menghasilkan tekanan sampai 600 psi dengan kecepatan alir berkisar 0,1 – 10 ml/menit. Ada tiga jenis pompa yang masing-masing memiliki keuntungan dan kerugian, yaitu (De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979):

a. Pompa *Reciprocating*

Jenis pompa *reciprocating* paling banyak digunakan, namun menghasilkan pulsa yang dapat mengganggu *base-line* kromatogram sehingga dipasang peredam. Keuntungan menggunakan pompa *reciprocating* adalah pompa memiliki volume internal yang kecil sehingga mengurangi *band broadening*. Selain itu, pompa menghasilkan tekanan tinggi, kecepatan alir konstan yang tidak bergantung pada tekanan balik kolom dan viskositas pelarut.

b. Pompa *displacement*

Pompa ini menyerupai *syringe* yang terdiri dari tabung dengan dilengkapi pendorong dan digerakkan oleh motor. Pompa tidak menghasilkan pulsa dengan aliran yang cenderung tidak bergantung pada tekanan balik kolom dan viskositas pelarut. Akan tetapi, pompa mempunyai keterbatasan kapasitas pelarut dan tidak mudah untuk melakukan pergantian pelarut.

c. Pompa *pneumatic*

Pelarut dalam pompa didorong oleh gas bertekanan tinggi. Pompa jenis *pneumatic* harganya murah dan bebas pulsa. Akan tetapi, pompa mempunyai keterbatasan kapasitas dan tekanan yang dihasilkan serta kecepatan alir bergantung pada viskositas pelarut dan tekanan balik kolom.

3. Injektor

Injektor sebagai tempat memasukkan sampel dan kemudian sampel dapat didistribusikan masuk ke dalam kolom. Sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan kantong sampel (*sample loop*) internal atau

eksternal. Ada dua model umum injeksi sampel, yaitu *Stopped Flow* (fase gerak dihentikan sesaat) dan *Solvent Flowing* (fase gerak tetap mengalir) dengan tiga dasar cara menginjeksikan sampel, yaitu (Varelis, 2008; Dong, 2006; De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979):

- a. *Stop Flow*: menghentikan aliran fase gerak saat injeksi sampel dilakukan, sistem tertutup, kemudian aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam aliran kecil dan resolusi tidak dipengaruhi.
- b. *Septum*: menginjeksikan sampel langsung ke aliran fase gerak, umumnya sama dengan yang digunakan pada kromatografi gas. Injektor dapat digunakan pada tekanan sampai 60 - 70 atmosfer, tetapi septum ini tidak tahan terhadap pelarut kromatografi cair. Di samping itu, partikel kecil dari septum yang terkoyak dapat menyebabkan penyumbatan.
- c. *Valve*: menginjeksikan sampel ke dalam aliran fase gerak dilakukan dengan dua langkah, yaitu:
 1. Sejumlah volume sampel diinjeksikan ke dalam loop dalam posisi *load*.
 2. Kran diputar untuk mengubah posisi *load* menjadi posisi injeksi dan fase gerak membawa cuplikan ke dalam kolom.

Dengan sistem ini memungkinkan sampel dimasukkan pada tekanan 7000 psi dengan ketelitian tinggi. Skema penyuntikan sampel dengan metode *valve* dapat dilihat pada Gambar 2.8.

Gambar 2.8 Skema Penyuntikan Sampel Metode *Valve*

4. Kolom

Kolom merupakan tempat fase diam untuk berlangsungnya proses pemisahan dan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu (Varelis, 2008; Dong, 2006; De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979):

- a. Kolom analitik: memiliki diameter 2 - 6 mm dan panjang kolom tergantung pada jenis kemasan. Panjang kolom untuk kemasan poros makropartikel (37 - 44 μ) adalah 50 - 100 cm dan untuk kemasan poros mikropartikel ($< 20 \mu$) pada umumnya 10 - 30 cm.
- b. Kolom preparatif: memiliki diameter ≥ 6 mm dan panjang 25 -100 cm.

5. Detektor

Detektor dibutuhkan untuk mendeteksi komponen sampel dalam aliran yang keluar dari kolom. Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan, yaitu (Varelis, 2008; Dong, 2006; De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979):

- a. Detektor universal, detektor yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik dan tidak bersifat selektif, seperti: detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa.
- b. Detektor spesifik, detektor yang hanya mendeteksi senyawa secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia.

Detektor yang ideal harus mempunyai karakteristik sebagai berikut (De Lux, 2004; Gritter, et al., 1991; Snyder dan Kirkland, 1979):

- a. Sangat sensitif dan memberi respon yang cepat untuk semua zat terlarut.
- b. Stabil, tidak dipengaruhi oleh perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

- c. Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan *broadening*.
- d. Memberikan respon yang linear terhadap konsentrasi zat terlarut dan inert terhadap zat terlarut.

Detektor yang digunakan dalam KCKT dapat diterapkan untuk analisis senyawa dalam makanan. Detektor yang paling sering digunakan pada KCKT dapat dilihat pada Tabel 2.1. Kemampuan detektor UV untuk mengkonfirmasi adanya senyawa tertentu, metabolit dan turunannya dalam sampel sangat baik sehingga detektor UV paling populer. Namun, untuk analisis yang membutuhkan sensitivitas dan selektivitas yang tinggi digunakan detektor fluoresensi sebagai metode pilihan. Meskipun detektor elektrokimia juga sangat sensitif dan selektif, tetapi jarang digunakan dalam analisis makanan. Sedangkan detektor konduktivitas merupakan detektor yang sensitif dan selektif untuk analisis kation dan anion. Detektor indeks bias digunakan jika detektor yang lain tidak sesuai atau konsentrasi senyawa dalam sampel tinggi (Dong, 2006; Angelika, et al., 2001; Snyder dan Kirkland, 1979).

Tabel 2.1 Detektor yang Paling Sering Digunakan pada KCKT

Detektor	Sensitivitas (g/ml)	Karakteristik
UV	2×10^{-10}	Sensitif, paling sering digunakan. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak. Selektif terhadap gugus dan struktur tidak jenuh.
Fluoresensi	1×10^{-12}	Sensitif. Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak. Selektif bagi senyawa berfluoresensi.
Refraksi Indeks	1×10^{-7}	Universal. Sensitif terhadap suhu dan tidak dapat digunakan pada elusi gradien. Dapat digunakan untuk mendeteksi polimer, gula, trigliserida, asam organik.
Elektrokimia	1×10^{-12}	Sensitif terhadap suhu dan kecepatan alir fase gerak, tidak dapat digunakan pada elusi gradien. Selektif terhadap oksidator-reduktor.
Konduktimetri	1×10^{-8}	Sensitif terhadap suhu dan kecepatan alir fase gerak, tidak dapat digunakan pada elusi gradien. Selektif terhadap ionik, asam organik dan surfaktan.

Sumber: Dong, 2006; Angelika, et al., 2001; Snyder dan Kirkland, 1979.

6. Integrator

Integrator adalah alat yang mengubah tanda-tanda listrik dari detektor menjadi kromatogram sekaligus menghitung luas kromatogram yang dibentuk secara elektronik (Dong, 2006; De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979).

7. Rekorder

Hasil pemisahan kromatografi biasanya ditampilkan dalam bentuk kromatogram pada rekorder. Waktu retensi selalu konstan dari setiap kondisi kromatografi yang sama dan dapat digunakan untuk identifikasi atau analisis kualitatif. Luas puncak proporsional dengan konsentrasi senyawa dalam sampel yang diinjeksikan sehingga dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi senyawa dalam sampel pada analisis kuantitatif. Senyawa yang berbeda memiliki waktu retensi yang berbeda. Waktu retensi bervariasi dan tergantung pada (Dong, 2006; De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979):

- a. Panjang kolom, jenis dan ukuran partikel material fase diam.
- b. Jenis, komposisi dan pH fase gerak.
- c. Temperatur kolom, tekanan pompa dan laju alir.

2.3.3 Klasifikasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Pemisahan dengan KCKT dapat dilakukan dengan fase normal, jika fase diam lebih polar daripada fase gerak atau fase terbalik, jika fase diam kurang polar dibanding dengan fase gerak. Sehingga KCKT dapat dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik. Selain klasifikasi tersebut, KCKT juga dapat dikelompokkan berdasarkan mekanisme pemisahan, yaitu: kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, kromatografi pasangan ion, kromatografi fase terikat, kromatografi eksklusi dan kromatografi afinitas (De Lux, 2004; Snyder dan Kirkland, 1979).

2.3.4 Seleksi Tipe Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Sebelum mengoperasikan KCKT, analis harus membuat keputusan tipe kromatografi agar memberikan informasi yang diinginkan. Namun, sampel yang tidak dikenal akan menyulitkan pemilihan. Informasi kelarutan, gugus fungsi, massa molekul relatif (M_r) atau data spektroskopi seperti *nucleic magnetic resonance* (NMR), infra red (IR), ultra violet (UV) dan mass spektrofotometer (MS) dapat digunakan sebagai petunjuk bagi analis memilih tipe KCKT yang tepat untuk digunakan (De Lux, 2004; Nollet, 2000).

Seleksi tipe KCKT secara cepat dapat dilakukan dengan mengetahui massa molekul relatif. Jika massa molekul relatif > 2000 dapat menggunakan kromatografi eksklusi. Jika sampel larut dalam air, maka menggunakan fasa gerak air dan fasa diam Sephadex atau Bondagel Seri E. Tetapi, jika sampel larut dalam pelarut organik maka harus menggunakan fase gerak organik dan fase diam Styragel atau MicroPak TSK gel. Seleksi tipe KCKT dapat dilihat pada Gambar 2.9 (De Lux, 2004; Nollet, 2000).

Gambar 2.9 Seleksi Tipe Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Jika massa molekul relatif < 2000 dengan mempertimbangkan kelarutan sampel dapat dilakukan sebagai berikut:

- a. Sampel tidak larut dalam air, maka dianjurkan untuk menggunakan kromatografi partisi atau kromatografi padat cair. Jika analisis dilakukan rutin, disarankan menggunakan kromatografi partisi fase terikat normal karena perawatan kolom tidak rumit. Untuk sampel isomer, lebih baik digunakan kromatografi padat cair. Sampel yang memiliki perbedaan ukuran partikel digunakan kromatografi eksklusi sterik dengan fase gerak organik.
- b. Sampel larut dalam air, maka digunakan kromatografi partisi fase terbalik atau kromatografi penukar ion. Kelarutan sampel dipengaruhi oleh keasaman (pH), maka kromatografi penukar ion sebagai pilihan utama. Untuk kelarutan sampel yang tidak dipengaruhi oleh pH dan bersifat non ionik, maka kromatografi partisi fase terbalik sebagai pilihan terbaik.

2.3.5 Fase Gerak Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Pemilihan fase gerak hanya dapat dilakukan berdasarkan eksperimen *trial and error* hingga diperoleh kromatogram yang diharapkan. Fase gerak biasanya terdiri atas campuran pelarut yang mempunyai daya elusi dan resolusi terhadap senyawa dalam sampel. Daya elusi dan resolusi ditentukan oleh polaritas pelarut, polaritas fase diam dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal, yaitu fase diam lebih polar daripada fase gerak dan mempunyai kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik, fase diam kurang polar daripada fase gerak dan mempunyai kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Dong, 2006; De Lux, 2004).

Senyawa asam lemah atau basa lemah dipisahkan dengan menggunakan fase gerak buffer untuk memperbaiki resolusi dan selektivitas. Pada larutan buffer asam, senyawa basa akan terionisasi sehingga lebih cepat terelusi, sedangkan senyawa asam tidak terionisasi sehingga lebih lambat terelusi atau sebaliknya (Dong, 2006).

Larutan buffer yang dipilih sebaiknya memiliki pH mendekati pKa senyawa sampel, kapasitas buffer yang cukup untuk menahan perubahan pH serta range pH yang sesuai untuk senyawa sampel. Biasanya lebih baik buffer dengan $\text{pH} \pm 1$ unit dari pKa senyawa sampel, namun dapat juga digunakan buffer dengan $\text{pH} \pm 1,50$ unit dari pKa senyawa sampel (Dong, 2006).

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik, yaitu komposisi fase gerak tetap selama elusi atau dengan cara komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi yang biasa disebut dengan cara gradien. Elusi gradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks, terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas (De Lux, 2004).

Fase gerak yang paling sering digunakan pada fase terbalik adalah campuran larutan buffer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal digunakan campuran pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol (De Lux, 2004).

Fase gerak sebelum digunakan harus disaring untuk menghindari partikel-partikel kecil. Selain itu, adanya gas dalam fase gerak juga harus dihilangkan, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di dalam pompa dan detektor sehingga akan mengganggu analisis (De Lux, 2004).

2.3.6 Fase Diam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi atau polimer stiren dan divinil benzena. Permukaan silika merupakan permukaan yang polar dan sedikit asam, karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen seperti klorosilan. Reagen akan bereaksi dengan gugus silanol dan diganti dengan gugus fungsi yang lain (De Lux, 2004).

Oktadesil silika, ODS atau C-18 merupakan fase diam yang paling banyak digunakan, karena mampu memisahkan senyawa dengan kepolaran rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lebih sesuai untuk senyawa polar. Silika aminopropil dan sianopropil lebih baik sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan adanya kandungan air (De Lux, 2004).

2.4 Parameter Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Optimasi kondisi KCKT dilakukan dengan parameter waktu retensi (t_R), faktor kapasitas (k'), jumlah plat teoritis (N), resolusi (R_s), selektivitas (α) dan faktor *tailing* (F_t).

2.4.1 Waktu retensi

Waktu yang dibutuhkan senyawa bergerak melalui kolom menuju detektor disebut waktu retensi. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak maksimum dari

senyawa. Waktu retensi senyawa dapat diilustrasikan seperti Gambar 2.10 (Dong, 2006; Ornaf dan Dong, 2005; Snyder, et al., 1997; Snyder dan Kirkland, 1979).

Gambar 2.10 Waktu Retensi Senyawa

2.4.2 Faktor Kapasitas

Faktor kapasitas adalah ukuran kemampuan kolom mempertahankan komponen sampel. Faktor kapasitas merupakan waktu zat terlarut berada dalam fase diam relatif terhadap waktu dalam fase gerak. Nilai faktor kapasitas dapat dihitung dengan persamaan 2.1 (Snyder, et al., 2010; Dong, 2006).

$$k' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \dots\dots\dots 2.1$$

Di mana: k' = faktor kapasitas

t_R = waktu tambat suatu senyawa

t_0 = waktu tambat hampa

Volume void adalah total volume fase gerak yang terkandung dalam kolom. Volume void merupakan volume kolom kosong dikurangi volume fase diam. Sebagian besar kolom, volume void dapat diperkirakan 65% dari volume kolom kosong (Dong, 2006).

Rasio konsentrasi senyawa dalam fase diam dengan fase gerak dinyatakan dengan koefisien partisi (K). Sedangkan rasio mol senyawa dalam fase diam dengan fase gerak dinyatakan sebagai faktor kapasitas, maka faktor kapasitas

berbanding lurus dengan koefisien partisi dan volume fase diam serta berbanding terbalik dengan volume fase gerak atau volume void (Dong, 2006).

Pemisahan dengan nilai $k \leq 10$ untuk semua puncak berhubungan dengan t_0 yang sempit, meningkatkan deteksi puncak dan jangka waktu yang pendek sehingga lebih banyak sampel dapat dianalisis setiap hari. Nilai $k < 1$ dapat menyebabkan resolusi kurang baik, kemungkinan terjadi tumpang tindih senyawa dengan matriks yang biasanya menumpuk di dekat t_0 . Oleh karena itu, parameter faktor kapasitas sebaiknya berada pada rentang 1 sampai 10 untuk semua puncak. Namun, ada kemungkinan untuk memperluas rentang yang juga disukai, yaitu $0,5 \leq k \leq 20$ (Snyder, et al., 1997; Dong, 2006; Snyder, et al., 2010).

2.4.3 Jumlah Plat Teoritis

Jumlah plat teoritis (N) merefleksikan jumlah waktu senyawa berpartisi antara dua fase selama melalui kolom dan menggambarkan efisiensi kolom. Jumlah plat teoritis suatu kromatografi dapat dihitung dengan persamaan 2.2 (Ornaf dan Dong, 2005; Snyder, et al., 1997; Snyder dan Kirkland, 1979).

$$N = \frac{41,7 \left(\frac{t_R}{W_{0,1}} \right)^2}{\left(\frac{b}{a} \right) + 1,25} \dots\dots\dots 2.2$$

Di mana: N = Jumlah plat teoritis

t_R = Waktu retensi senyawa

$W_{0,1}$ = Lebar dasar puncak pada posisi 10% dari dasar tinggi puncak

$a = b$ = Lebar salah satu sisi kromatogram

2.4.4 Resolusi

Resolusi atau daya pemisahan dua pita yang berdekatan didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak pita dibagi dengan luas rata-rata pita. Nilai resolusi $> 1,5$ menunjukkan bahwa kedua puncak terpisah secara sempurna. Untuk pengembangan metode, sebaiknya dilakukan sampai resolusi ≥ 2 (Snyder, et al., 2010). Resolusi dua senyawa dapat diilustrasikan seperti Gambar 2.11 dan dapat dihitung dengan persamaan 2.3 (Dong, 2006; Ornaf dan Dong, 2005; Snyder, et al., 1997; Snyder dan Kirkland, 1979).

Gambar 2.11 Resolusi Dua Senyawa

$$R_s = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{(W_2 + W_1)} \dots\dots\dots 2.3$$

Di mana: R_s = Resolusi dari dua pita

$t_{R,1}$ = Waktu retensi senyawa pertama

$t_{R,2}$ = Waktu retensi senyawa kedua

W_1 = Luas area pita pertama

W_2 = Luas area pita kedua

2.4.5 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan sistem KCKT untuk memisahkan senyawa yang berbeda. Nilai selektivitas ditentukan sebagai rasio perbandingan faktor kapasitas dari senyawa yang berbeda. Nilai selektivitas harus > 1 agar terjadi pemisahan sempurna. Selektivitas bergantung pada sifat senyawa dan

interaksi antara senyawa dengan permukaan fase diam dan fase gerak. Selektivitas dihitung menggunakan persamaan 2.4 (Dong, 2006)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \dots\dots\dots 2.4$$

Di mana: α = selektivitas

k_1 = faktor kapasitas senyawa pertama

k_2 = faktor kapasitas senyawa kedua

2.4.6 Faktor *Tailing*

Jika puncak yang akan dikuantifikasi adalah asimetri (tidak setangkup), maka perhitungan asimetrisitas merupakan cara yang baik untuk mengontrol sistem kromatografi. Peningkatan puncak asimetri akan menyebabkan penurunan resolusi, batas deteksi, dan presisi. Pengukuran derajat asimetris puncak dapat dihitung dengan faktor *tailing* dan faktor asimetris. Faktor *tailing* dihitung dengan menggunakan lebar puncak pada ketinggian 5% dengan persamaan 2.5. Gambar 2.12 menunjukkan cara menghitung nilai faktor *tailing* (Dong, 2006; Ornaf dan Dong, 2005; Snyder, et al., 1997; Snyder dan Kirland, 1979).

$$Ft = \frac{a+b}{2a} \dots\dots\dots 2.5$$

Gambar 2.12 Pengukuran Faktor *Tailing*; (a) Puncak simetris dan (b) Puncak Asimetris

Bentuk kromatogram normal jika nilai faktor *tailing* berada pada rentang yang diinginkan, yaitu $0,9 \leq Ft \leq 1,2$. Persyaratan umum untuk pemisahan rutin adalah $Ft < 2$ untuk semua puncak. Puncak utama *tailing* ($Ft > 2$) sangat merugikan baik pemisahan dan analisis kuantitatif (Snyder, et al., 2010). Penyebab dan solusi masalah bentuk kromatogram dapat dilihat pada Tabel 2.2 (Snyder, et al., 2010; Phomenex, 2005).

Tabel 2.2 Penyebab dan Solusi Masalah Bentuk Kromatogram

No	Bentuk	Penyebab	Solusi
1	<i>Tailing</i> ($Ft \geq 1,2$)	<i>Block frit</i>	Mengganti frit
		<i>Column void</i>	Mengatur volume void
		<i>Interfering peak</i>	- Menggunakan kolom lebih panjang, - Mengubah fase gerak atau - Menggunakan kolom yang lebih selektif
		pH fase gerak	Mengatur pH fase gerak
		Sampel reaktif	Mengganti kolom
2	<i>Fronting</i> ($Ft < 0,9$)	Pelarut sampel	Menggunakan pelarut sama dengan fase gerak
		Sampel <i>overload</i>	Menurunkan konsentrasi sampel
		<i>Bad column</i>	- Membalikkan kolom, - Mengganti frit atau - Mengganti kolom
3	<i>Broadening</i> ($N > 75\%$)	Perubahan komposisi fase gerak	Membuat fase gerak yang baru
		Penurunan laju alir	Mengatur laju alir
		Ada kebocoran antar kolom dengan detektor	Mengecek dan mengatur sistem
		Penurunan konsentrasi buffer	Mengatur konsentrasi buffer
		Kontaminasi frit	Mengganti frit
		Kontaminasi kolom	Mengganti kolom
		Penurunan volume <i>void</i>	- Mengatur volume void atau - Mengganti kolom
		Penurunan suhu kolom	Mengatur suhu kolom

2.5 Validasi Metode Analisis

Metode analisis yang baru, pengembangan, jika terjadi perubahan kondisi antara kondisi analisis dan kondisi saat validasi metode sebelumnya atau terjadi perubahan dari metode standar maka harus dilakukan validasi metode. Manfaat validasi metode, antara lain: untuk mengevaluasi hasil metode analisis, menjamin prosedur analisis, menjamin keakuratan dan ulangan hasil prosedur analisis serta mengurangi resiko penyimpangan. Validasi metode meliputi linearitas, akurasi (*accuracy*), batas deteksi (*limit of detection*), batas kuantitasi (*limit of quantitation*), ketelitian (*precision*), selektivitas (*specifity*) (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004).

2.5.1 Linearitas

Koefisien korelasi merupakan indikator linearitas yang menggambarkan proporsionalitas respon luas area terhadap konsentrasi yang diukur. Hasil plot antara konsentrasi larutan baku dengan luas puncak dari masing-masing komponen digunakan untuk menentukan persamaan 2.6 yang merupakan persamaan regresi linear, dimana a dan b dihitung dengan persamaan 2.7 dan 2.8. Suatu metode analisis yang valid mempunyai harga koefisien korelasi lebih dari 0,999 (Ravichandran, et al., 2010; Harmita, 2004).

$$Y = a + bX \dots\dots\dots 2.6$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \dots\dots\dots 2.7$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \dots\dots\dots 2.8$$

Untuk menguji linearitas hubungan konsentrasi (X) dengan luas area (Y), digunakan koefisien korelasi (r) yang dihitung dengan persamaan 2.9.

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{\{n(\sum X^2) - (\sum X)^2\}\{n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2\}}} \dots\dots\dots 2.9$$

2.5.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Limit of Detection (LOD) merupakan batas konsentrasi terendah senyawa dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon yang signifikan oleh alat. Sedangkan *Limit of Quantitation (LOQ)* adalah kuantitas terkecil senyawa dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama. Nilai *LOD* dan *LQD* dihitung secara statistik melalui persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Kemudian dihitung standar deviasi, *SD* dengan persamaan 2.10. *LOD* dan *LQD* dihitung dengan persamaan 2.11 dan 2.12 (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Huber, 1999).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (Y - Y_i)}{n - 2}} \dots\dots\dots 2.10$$

$$LOD = \frac{3SD}{b} \dots\dots\dots 2.11$$

$$LOQ = \frac{10SD}{b} \dots\dots\dots 2.12$$

Di mana: SD = Standar deviasi

Y = Luas area terdeteksi setiap konsentrasi

Y_i = Luas area teoritis setiap konsentrasi

n = Jumlah ulangan penyuntikan sampel

b = *Slope* persamaan regresi dari kurva kalibrasi

Y_i dihitung dari persamaan regresi linear, yaitu dengan mensubstitusikan konsentrasi (X) pada persamaan 2.6.

2.5.3 Akurasi

Akurasi adalah kemampuan suatu alat ukur untuk memberikan respon yang dekat dengan nilai sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan bahan baku (*standard addition method*). Dalam metode penambahan bahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu senyawa yang diperiksa (biasanya 80% - 120%) ditambahkan ke dalam sampel dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Akurasi dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali (*recovery*) yang ditambahkan dan dapat ditentukan dengan persamaan 2.13. Rentang persentase *recovery* dapat dilihat pada Tabel 2.3 (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Huber, 1999).

Tabel 2.3 Rentang Persentase *Recovery*

No	Kadar Senyawa dalam Sampel (%)	<i>Recovery</i> (%)
1	> 10	95 - 102
2	> 1	92 - 105
3	> 0,1	90 - 108
4	> 0,01	85 - 110
5	> 0,001	80 - 115

Sumber: Farrar dan Whaite, 2012.

$$\text{Persentase Recovery} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\% \dots\dots\dots 2.13$$

Di mana:

C_1 = Konsentrasi senyawa dalam sampel dan baku

C_2 = Konsentrasi senyawa dalam sampel

C_3 = Konsentrasi senyawa baku yang sebenarnya ditambahkan ke dalam sampel

2.5.4 Presisi

Uji presisi atau uji keseksamaan digunakan untuk mengevaluasi tingkat kedekatan antara hasil analisis sehingga diketahui kesalahan acak analisis. Uji presisi dapat berupa uji keterulangan (ripitabilitas) dan uji ketertiruan (reproduksibilitas).

Uji ripitabilitas merupakan uji keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis pada kondisi yang sama dalam interval waktu yang singkat. Ripitabilitas dilakukan dengan menggunakan sampel yang identik dari *batch* yang sama, sehingga dapat memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Sedangkan reproduksibilitas adalah keseksamaan metode yang dikerjakan pada kondisi, tempat, peralatan, pereaksi, pelarut atau analis yang berbeda dengan sampel diduga identik serta dari *batch* yang sama. Reproduksibilitas dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut atau analis yang berbeda.

Uji presisi dilakukan paling sedikit enam kali ulangan yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan persentase *relative standard deviation* yang diizinkan. Persentase *relative standard deviation* uji ripitabilitas dan uji reproduksibilitas masing-masing dapat dilihat pada Tabel 2.4 dan Tabel 2.5. Standar deviasi dapat dihitung dengan persamaan 2.14 dan *relative standard deviation* dihitung dengan persamaan 2.15 (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Burn, et al., 2002; Huber, 1999).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}} \dots\dots\dots 2.14$$

$$\text{Persentase RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \dots\dots\dots 2.15$$

Di mana: SD = Standar deviasi

RSD = *Relative standard deviation*

$\bar{X}$ = Kadar rata-rata yang diperoleh dari percobaan

Tabel 2.4 Persentase *Relative Standard Deviation* Uji Ripitabilitas

No	Kadar Senyawa dalam Sampel (%)	<i>Relative Standard Deviation</i> (%)
1	> 10	1,5
2	> 1	2
3	> 0,1	3
4	> 0,01	4
5	> 0,001	6

Sumber: Farrar dan Whaite, 2012.

Tabel 2.5 Persentase *Relative Standard Deviation* Uji Reproduksiabilitas

No	Kadar Senyawa dalam Sampel (%)	<i>Relative Standard Deviation</i> (%)
1	> 10	3
2	> 1	4
3	> 0,1	6
4	> 0,01	8
5	> 0,001	11

Sumber: Farrar dan Whaite, 2012.

2.5.5 Selektivitas

Selektivitas dilakukan dengan membandingkan waktu retensi larutan baku, larutan sampel dan campuran larutan sampel dengan baku. Hasil penelitian harus menunjukkan pada larutan baku dan sampel dan campuran larutan sampel dengan baku muncul *peak area* pada waktu retensi (t_R) relatif sama, sehingga metode dapat dinyatakan selektif (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Huber, 1999).

2.6 Metode Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna

Penetapan kadar pemanis, pengawet dan pewarna yang terdapat dalam sirup esens dapat ditentukan dengan KCKT. Analisis menggunakan metode KCKT memiliki beberapa kelebihan, seperti: waktu analisis cepat, resolusi dan sensitivitas tinggi serta dapat dihubungkan dengan bermacam-macam detektor yang sesuai (De Lux, 2004).

Ree dan Stoa (2011), telah melakukan penetapan kadar sakarin, aspartam, asam benzoat dan kafein dalam minuman ringan menggunakan KCKT, kolom Phenomenex Kinetex C-18, detektor UV dengan panjang gelombang 220 nm dan fase gerak campuran metanol dengan buffer fosfat pH 3 (20 : 80), suhu kolom 35°C, dan laju alir 1 ml/menit. Begitu juga Serdar dan Knezevic (2011), telah berhasil melakukan pemisahan aspartam, natrium sakarin, kalium asesulfam dan siklamat dengan KCKT; detektor *diode array* pada panjang gelombang masing-masing 193 nm, 202 nm, 226 nm dan 314 nm; kolom C-18, fase gerak campuran asetronitril dengan buffer fosfat pH 3,5 (15:75); laju alir 1,5 ml/menit dan volume injeksi 10 µl. Sementara Hayun, dkk. (2004), sudah melakukan penetapan kadar campuran sakarin, aspartam, asam benzoat, kafein dan asam sorbat dengan menggunakan KCKT-UV pada panjang gelombang 254 nm, fase gerak campuran asetronitril dengan buffer fosfat pH 5 (5 : 95), dan laju alir 1 ml/menit. Penetapan kadar siklamat sebagai zat tunggal dalam minuman ringan juga telah dilakukan dengan menggunakan KCKT, detektor UV pada panjang gelombang 200 nm, fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat 0,0125 mg/L dengan metanol (7 : 3) dan laju alir 1 ml/menit (Novelina, dkk., 2009).

Penetapan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat dalam jus buah, soda, kecap, saus tomat, selai kacang dan keju telah dilakukan dengan menggunakan KCKT- UV *diode array* 225 nm, kolom C-18, fase terbalik, fase gerak campuran asetonitril dengan buffer asetat pH 4,2 (1 : 5), suhu kolom 20°C dan laju alir 0,8 ml/menit (Pylypiw dan Grether, 2000). Khosrokhavar, et al. (2010), juga telah melakukan penetapan kadar zat, laju alir dan suhu kolom yang sama dalam minuman ringan dan ekstrak herbal dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm, fase gerak campuran asetonitril dan buffer asetat pH 4,4 (40: 60).

Veni, et al. (2011), telah melakukan penetapan kadar campuran tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan menggunakan KCKT pada panjang gelombang 244 nm. Ramakrishnan, et al. (2011), telah melakukan penetapan kadar tartrazin menggunakan KCKT, kolom Phenomenex C-18, fase gerak campuran buffer amonium asetat pH 8 dengan asetonitril dan metanol (2:1:1), detektor diode array 426 nm dan laju alir 1ml/menit. Diacu dan Ene (2009), telah berhasil melakukan penetapan kadar tartrazin dan *sunset yellow* dalam minuman ringan dengan menggunakan KCKT, detektor *dioda array* 470 nm, kolom Hypersil C-8, fase gerak campuran A (buffer fosfat pH 6,5) dengan B (campuran asetonitril-metanol, 1 : 4), elusi gradien, suhu kolom 30°C, laju alir 1,0 ml/menit dan volume injeksi 10 µl. Demikian juga Jurcovan, et al. (2012), telah menetapkan kadar tartrazin dan *sunset yellow* dengan menggunakan KCKT pada panjang gelombang tunggal 470 nm. Daftar beberapa penelitian optimasi metode, validasi metode atau penetapan kadar pemanis, pengawet dan pewarna dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat dilihat pada Tabel 2.6.

Tabel. 2.6 Daftar Beberapa Penelitian Optimasi dan Validasi metode atau Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Sampel	Metode	Kadar Senyawa dalam Sampel (ppm)						Peneliti (Tahun)
		Sakarin	Siklamat	Benzoat	Sorbat	Tartrazin	Sunset Yellow	
• Minuman ringan	<ul style="list-style-type: none"> KCKT UV 200 nm (Validasi Metode) Kolom Nucleosil C18 (12 cm x 4.6 mm) Fase Gera KH_2PO_4 0,0125 mg/L : Metanol (7 : 3) Laju Alir 1 ml/menit 	-	v	-	-	-	-	Novelina, dkk (2009)
• Minuman ringan	<ul style="list-style-type: none"> KCKT DAD 202 nm, 314 nm Kolom C18 (15 cm x 4.6 mm, 5 μm) Fase Gerak Buffer Fosfat pH 3,5 : Asetonitril (85 : 15) Laju Alir 1,5 ml/menit 	35 - 77	80 - 622	-	-	-	-	Serdar dan Knezevic (2011)
<ul style="list-style-type: none"> Jus buah Soda Kecap Saus tomat Selai kacang 	<ul style="list-style-type: none"> KCKT DAD 225 dan 255 nm Kolom Supelcosil LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μm) Suhu 20oC Fase Gerak Buffer Asetat pH 4,2 : Asetonitril (5 : 1) Laju Alir 0.8 ml/menit 	-	-	12 - 60	350 - 450	-	-	Pylypiw dan Grether (2000)
• Sirup	<ul style="list-style-type: none"> KCKT UV 228 nm (Optimasi pH) Kolom C18 RP Fase Gerak Metanol : Air (1 : 3)) Laju Alir 1,2 ml/menit 	-	-	o	-	-	-	Hartono (2007).
<ul style="list-style-type: none"> Minuman ringan Ekstrak herbal 	<ul style="list-style-type: none"> KCKT DAD 254 nm Kolom C-18 (250x4.6mm) Fase Gerak Buffer Asetat pH 4,4 : Asetonitril (60 : 40) Laju Alir 0.8 ml/menit 	-	-	4 - 2313	1 - 316	-	-	Khosrokhavar, et al (2010)
• Sirup	<ul style="list-style-type: none"> KCKT UV 230 nm Kolom Shimpac VP-ODS (4,6 mm x 250 mm) RP Fase Gerak Metanol : Buffer Fosfat (30 : 70) Laju Alir 0.8 ml/menit 	-	-	237 - 626	31 - 545	-	-	Sibarani (2010) ^x

Keterangan:

o = Optimasi metode

x = Kadar sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat dalam mg/kg sampel

v = Validasi metode

- = Tidak dilakukan penelitian

Tabel. 2.6 Daftar Beberapa Penelitian Optimasi dan Validasi metode atau Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Lanjutan)

Sampel	Metode	Kadar Senyawa dalam Sampel (ppm)						Peneliti (Tahun)
		Sakarin	Siklamat	Benzoat	Sorbat	Tartrazin	Sunset Yellow	
• Minuman ringan berkarbonasi	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT PDA 254 nm • Kolom Latek C 18 (15 cm x 4.0 mm) • Fase Gerak Buffer Fosfat pH 5 : Asetonitril (95 : 5) • Laju Alir 1 ml/menit 	1112	-	10 - 206	-	-	-	Hayun, dkk (2004)
• Sirup	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT UV 225 nm • Kolom ODS • Fase Gerak Buffer Fosfat : Metanol (92 : 8) • Laju Alir 1ml/menit 	564	-	1068	-	-	-	Subani (2008) ^x
• Minuman ringan	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT UV-Vis 220 nm • Kolom Phenomenex Kinetex XB-C18 (50 x 4.6 mm, 2.6µm) • Suhu 35°C • Fase Gerak Buffer Asetat pH 3 : Metanol (80 : 20) • Laju Alir 1 ml/menit 	99 - 162	-	123 -150	-	-	-	Ree dan Stoa (2011)
• Minuman ringan	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT DAD 470 nm • Kolom Hypersil C-8 (250 cm x 4.6 mm, 5 µm) • Suhu 30°C • Fase Gerak Buffer Fosfat pH 6,5 dan Campuran Asetonitril-Metanol (1 : 4) • Laju Alir 1 ml/menit • Elusi Gradien 	-	-	-	-	2 – 17	1 – 13	Diacu dan Ene (2009)
• Makanan	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT 244 nm • Kolom Phenomenex C-18 (250 cm x 4.6 mm, 5 µm) • Fase Gerak Buffer Fosfat pH 7,5 : Asetonitril (80 : 20) • Laju Alir 0,7 ml/menit 	-	-	-	-	97	1057	Veni, et al (2011)
• Makanan	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT DAD 426 nm • Kolom Phenomenex C 18 (150x4.6 mm, 5 µm) • Fase Gerak Buffer Amonium Asetat pH 8 : Asetonitril : Metanol (2: 1 : 1) • Laju alir 1 ml/menit 	-	-	-	-	67 - 633	-	Ramakrishnan, et al (2011)
• Minuman ringan	<ul style="list-style-type: none"> • KCKT DAD 470 nm • Kolom Hypersil C-8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) • Suhu 30°C • Fase Gerak Buffer Fosfat pH 8 dan Campuran Asetonitril-Metanol (1 : 4) • Laju Alir 1 ml/menit • Elusi Gradien 	-	-	-	-	13	2	Jurcovan, et al (2012)

Keterangan:

o = Optimasi metode

x = Kadar sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat dalam mg/kg sampel

v = Validasi metode

- = Tidak dilakukan penelitian

2.7 Perhitungan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna

Luas area komponen-komponen yang dianalisis diplot ke dalam persamaan regresi linear untuk uji kuantitatif, sehingga diperoleh kadar masing-masing senyawa (c). Kemudian ditentukan kadar senyawa dalam sampel dengan persamaan 2.16 dan persamaan 2.17 (Wrolstad, et al., 2005).

$$M = \frac{c}{W} \times \frac{Fp}{1000} \times k \dots\dots\dots 2.16$$

$$P = \frac{M}{10^6} \times 100\% \dots\dots\dots 2.17$$

Di mana: M = Kadar rata-rata BTM (mg/kg)

c = Kadar rata-rata BTM dari penyuntikan (µg/ml)

W = Massa rata-rata penimbangan sampel (kg)

Fp = Faktor Pengenceran

k = Angka kemurnian bahan baku (%)

P = Kadar rata-rata BTM (%)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian adalah metode eksperimental dan deskriptif. Metode eksperimental dengan maksud mengetahui pengaruh atau hubungan antara variabel bebas (X) yang disebut faktor perlakuan dengan variabel terikat (Y) yang disebut faktor pengamatan (Arikunto, 2002). Dalam penelitian eksperimental, sebagai variabel bebas adalah volume void, panjang gelombang, pH fase gerak, komposisi fase gerak, laju alir dan suhu kolom sedangkan variabel terikat adalah faktor kapasitas, waktu retensi, faktor *tailing*, resolusi dan jumlah plat teoritis.

Metode penelitian deskriptif I dilakukan dengan menganalisis parameter validasi yang meliputi: linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi dan selektivitas dengan indikator yang meliputi koefisien korelasi, konsentrasi minimum terdeteksi, konsentrasi minimum terkuantitasi, persen *recovery* dan persen *relative standard deviation* dan waktu retensi.

Metode penelitian deskriptif II dilakukan untuk merekam kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin, *sunset yellow* dalam beberapa sirup esens yang beredar di kota Medan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi USU Medan dari bulan Agustus 2012 sampai dengan Juli 2013.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan, antara lain: seperangkat alat KCKT (*Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector*), kolom Zorbax Eclipse Plus C-18 100 x 4,6 x 3,5 μm (Agilent), seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (UV Probe 1800 Shimadzu), pH meter digital tipe pen (ATC), sonikator (Bransonic), timbangan analitik (Boeco), pompa vacum (Boeco), pompa vacum (Bust), penyaring selulosa nitrat 0,45 μm ; penyaring politetrafluoroetilena (PTFE) 0,45 μm , penyaring *syringe* politetrafluoroetilena (PTFE) 0,45 μm , labu tentukur 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ml (Oberoi), pipet volume 1, 2, 3, 5, 10 ml (Oberoi), gelas ukur 10, 50, dan 100 ml (Oberoi), serta alat-alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium Penelitian

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah metanol *Grade HPLC* (E. Merck), kalium dihidrogen fosfat anhidrat (E. Merck), asam orthofosfat (E. Merck), aqua bidestilata steril (Ekapharmindo Putramas), bahan baku natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin, dan *sunset yellow* (Sigma Aldrich), sampel sirup esens, sirup uji akurasi dan presisi.

3.4 ChemStation Software

Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector dilengkapi dengan *ChemStation Software* 04.03.016, sehingga *set up* parameter optimasi dapat dilakukan, antara lain: volume *void*, panjang gelombang, sistem elusi fase gerak, laju alir dan suhu kolom.

ChemStation Software 04.03.016 memberikan beberapa tipe laporan. Tipe *Performance* untuk metode yang belum dikalibrasi berupa deskripsi sinyal, waktu retensi, luas puncak, tinggi puncak, lebar puncak, faktor simetri, faktor kapasitas, jumlah plat teoritis, selektivitas dan resolusi. Untuk metode yang dikalibrasi, selain laporan metode yang belum dikalibrasi juga disertai dengan nama senyawa untuk masing-masing puncak. Sedangkan faktor *tailing* harus menggunakan tipe *Performance plus Extended*.

3.5 Sampel Sirup Esens

Sampel sirup esens diperoleh dengan cara melakukan survei komposisi bahan pemanis, pengawet dan pewarna sirup esens yang terdapat di Kota Medan. Survei dilakukan dengan mendata merek sirup dan komposisi bahan pemanis, pengawet dan pewarna yang digunakan dari supermarket dan grosir terbesar di Kota Medan pada bulan Juli 2012. Dari hasil survei tersebut dilakukan pemilihan sampel berdasarkan kandungan senyawa yang diuji. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak tiga botol dengan nomor bets yang sama untuk setiap merek yang dipilih dan direncanakan enam merek sirup esens yang akan digunakan untuk pengujian metode analisis dengan diberi kode H, I, J, K, L dan M.

3.6 Sirup Uji Akurasi dan Presisi

Sirup yang digunakan untuk uji akurasi dan presisi dari sirup X. Komposisi sirup X dari label kemasan tidak mengandung bahan tambahan pemanis, pengawet dan pewarna. Sirup X diperkirakan mengandung matriks yang lebih kompleks, selain mengandung bahan penstabil yang biasa digunakan dalam pembuatan sirup juga mengandung matriks dari sari buah asli. Spesifikasi sampel dan sirup X dapat dilihat pada Lampiran 2, halaman 107.

3.7 Rancangan Penelitian

Penelitian tahap optimasi metode dilakukan dengan enam perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan terdiri atas:

$$O_1 = \text{Volume Void}$$

$$O_2 = \text{Volume Void} + \text{Panjang gelombang}$$

$$O_3 = \text{Volume Void} + \text{Panjang gelombang} + \text{pH fase gerak}$$

$$O_4 = \text{Volume Void} + \text{Panjang gelombang} + \text{pH fase gerak} + \text{Komposisi fase gerak}$$

$$O_5 = \text{Volume Void} + \text{Panjang gelombang} + \text{pH fase gerak} + \text{Komposisi fase gerak} \\ + \text{Laju alir}$$

$$O_6 = \text{Volume Void} + \text{Panjang gelombang} + \text{pH fase gerak} + \text{Komposisi fase gerak} \\ + \text{Laju alir} + \text{Suhu kolom.}$$

3.8 Parameter Penelitian

Parameter yang digunakan pada penelitian meliputi parameter optimasi kondisi KCKT dan parameter validasi. Optimasi kondisi KCKT dilakukan dengan parameter: faktor kapasitas (k'), waktu retensi (t_R), faktor *tailing* (F_t), resolusi (R_s) dan jumlah plat teoritis (N). Validasi meliputi: linearitas, batas deteksi (*limit of detection*), batas kuantitasi (*limit of quantitation*), akurasi (*accuracy*), ketelitian (*precision*) dan selektivitas (*specifity*).

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Pembuatan Larutan

3.9.1.1 Pembuatan Larutan Asam Fosfat 10 mM

Sejumlah 0,34 ml asam orthofosfat 85% ($\rho = 1,685 \text{ g/ml}$) dimasukkan ke dalam labu 500 ml. Larutan diencerkan dengan penambahan aqua bidestilata steril sampai garis tanda (Larutan B) (Snyder, et al., 2010).

3.9.1.2 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,7

Ditimbang seksama sejumlah 1,3601 gram kalium dihidrogen fosfat anhidrat, dimasukkan ke dalam labu 1000 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda. Larutan dipindahkan ke beaker gelas, diukur dan diperoleh pH $4,7 \pm 0,1$ menggunakan pH meter (Snyder, et al., 2010). Larutan buffer fosfat kemudian disaring menggunakan penyaring selulosa nitrat $0,45 \mu\text{m}$ dan disonikasi menggunakan alat sonikator selama 30 menit.

3.9.1.3 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,5

Ditimbang seksama sejumlah 1,3601 gram kalium dihidrogen fosfat anhidrat, dimasukkan ke dalam labu 1000 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda. Larutan dipindahkan ke beaker gelas dan ditambah larutan B sedikit demi sedikit sampai diperoleh pH $4,5 \pm 0,1$ menggunakan pH meter (Snyder, et al., 2010). Larutan buffer fosfat kemudian disaring menggunakan penyaring selulosa nitrat $0,45 \mu\text{m}$ dan disonikasi menggunakan alat sonikator selama 30 menit.

3.9.1.4 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,3

Ditimbang seksama sejumlah 1,3601 gram kalium dihidrogen fosfat anhidrat, dimasukkan ke dalam labu 1000 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda. Larutan dipindahkan ke beaker gelas dan ditambah larutan B sedikit demi sedikit sampai diperoleh pH $4,3 \pm 0,1$ menggunakan pH meter (Snyder, et al., 2010). Larutan buffer fosfat kemudian disaring menggunakan penyaring selulosa nitrat 0,45 μm dan disonikasi menggunakan alat sonikator selama 30 menit.

3.9.1.5 Pembuatan Larutan Buffer Fosfat pH 4,0

Ditimbang seksama sejumlah 1,3601 gram kalium dihidrogen fosfat anhidrat, dimasukkan ke dalam labu 1000 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda. Larutan dipindahkan ke beaker gelas dan ditambah larutan B sedikit demi sedikit sampai diperoleh pH $4,0 \pm 0,1$ menggunakan pH meter (Snyder, et al., 2010). Larutan buffer fosfat kemudian disaring menggunakan penyaring selulosa nitrat 0,45 μm dan disonikasi menggunakan alat sonikator selama 30 menit.

3.9.1.6 Pembuatan Larutan Baku Induk Satu

Larutan baku induk satu dibuat dengan cara menimbang sejumlah 0,0655 g natrium sakarin; 0,0503 g natrium siklamat; 0,0700 g natrium benzoat; 0,0575 g kalium sorbat; 0,0528 g tartrazin dan 0,0502 g sunset yellow. Masing-masing larutan baku dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, kecuali tartrazin dan natrium siklamat dalam labu ukur 10 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda (LBI1).

3.9.1.7 Pembuatan Larutan Baku Induk Dua

Larutan baku induk dua dibuat dengan cara menimbang sejumlah 0,0503 g natrium sakarin; 0,0501 g natrium siklamat; 0,0504 g natrium benzoat; 0,0501 g kalium sorbat; 0,0501 g tartrazin dan 0,0502 g sunset yellow. Masing-masing larutan baku dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda (LBI2).

3.9.1.8 Pembuatan Larutan Baku Tunggal

Ke dalam enam labu ukur 10 mL dimasukkan 0,1 ml LBI2 masing-masing natrium sakarin, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* serta 1,0 ml LB2 natrium siklamat, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda (LBT).

3.9.1.9 Pembuatan Larutan Baku Tunggal Seri

Ke dalam labu ukur 50 mL dimasukkan 0,5 ml LBI1 natrium sakarin dan diencerkan dengan aqua bidestilata steril sampai garis tanda sehingga diperoleh konsentrasi 13,1 ppm (LBTS1). Kemudian dipipet secara seri dari larutan LBTS1 natrium sakarin sebanyak 8 ml, 6 ml, 4 ml dan 2 ml, diencerkan dengan aqua bidestilata steril sampai 10 ml sehingga diperoleh LBTS2, LBTS3, LBTS4 dan LBTS5 natrium sakarin. Dilakukan hal yang sama untuk natrium benzoat, kalium sorbat dan *sunset yellow*.

Ke dalam labu ukur 50 mL dimasukkan 1 ml LBI1 natrium siklamat dan diencerkan dengan aqua bidestilata steril sampai garis tanda sehingga diperoleh konsentrasi 100,6 ppm (LBTS1). Kemudian dipipet secara seri dari LBTS1

natrium siklamat sebanyak 9 ml, 8 ml, 7 ml dan 6 ml, diencerkan dengan aqua bidestilata steril sampai 10 ml sehingga diperoleh LBTS2, LBTS3, LBTS4 dan LBTS5 natrium siklamat.

Ke dalam labu ukur 50 mL dimasukkan 1 ml LBI1 tartrazin dan diencerkan dengan aqua bidestilata steril sampai garis tanda sehingga diperoleh konsentrasi 105,6 ppm (LBTS1). Kemudian dipipet secara seri dari LBTS1 tartrazin sebanyak 8 ml, 6 ml, 4 ml dan 2 ml, diencerkan dengan aqua bidestilata steril sampai 10 ml sehingga diperoleh LBTS2, LBTS3, LBTS4 dan LBTS5 tartrazin.

3.9.1.10 Pembuatan Larutan Baku Campuran

Ke dalam labu ukur 10 mL dimasukkan larutan LBI2, masing-masing 0,32 ml natrium sakarin; 3,5 ml natrium siklamat; 0,6 ml natrium benzoat; 0,6 ml kalium sorbat; 0,5 ml tartrazin dan 0,2 ml *sunset yellow*. Kemudian diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda (LBC).

3.9.1.11 Pembuatan Larutan Baku Campuran Seri

Ke dalam labu ukur 10 mL dimasukkan 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,4 ml, 2,0 ml dan 2,8 ml LBC, kemudian masing-masing diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda sehingga diperoleh larutan baku seri LBS1, LBS2, LBS3, LBS4, LBS5, LBS6, LBS7, LBS8 dan LBS9.

Ke dalam labu ukur 10 mL dimasukkan larutan LBI2, masing-masing 0,1 ml natrium sakarin; 7,5 ml natrium siklamat; 0,3 ml natrium benzoat; 0,6 ml

kalium sorbat; 1 ml tartrazin dan 0,5 ml *sunset yellow* (LBCO). Kemudian 1 ml LBCO dimasukkan ke dalam labu ukur 10 dan diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda sehingga diperoleh larutan baku seri 10 (LBS10).

3.9.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Tahap ini untuk menentukan panjang gelombang yang akan digunakan pada detektor KCKT. Pengukuran absorbansi dilakukan LBTS1 – LBTS5 dari masing-masing senyawa. Masing-masing larutan diukur pada 190 - 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum yang diperoleh dianalisis untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk analisis selanjutnya dari keenam senyawa tersebut.

3.9.3 Optimasi Metode KCKT

3.9.3.1 Optimasi Volume *Void*

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui volume *void*. Percobaan dilakukan dengan menyaring larutan LBS10 dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Kemudian diinjeksikan 5 μl LBS 10 ke dalam kolom dengan menggunakan panjang gelombang 200 nm, laju alir 0,8 ml/menit, suhu kolom 30°C, komposisi campuran buffer fosfat dan metanol (75 : 25), pH fase gerak 4,5 dan volume *void* yang diuji adalah 20%, 30% dan 40%. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan hasil optimum. Parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan adalah faktor kapasitas (k').

3.9.3.2 Optimasi Panjang Gelombang

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang optimum. Percobaan dilakukan dengan menyaring larutan LBS10 dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Kemudian diinjeksikan 5 μl LBS10 ke dalam kolom dengan menggunakan volume *void* hasil optimasi, laju alir 0,8 ml/menit, suhu kolom 30°C, komposisi campuran buffer fosfat dan metanol (75 : 25), pH fase gerak 4,5 dan panjang gelombang yang diuji adalah 200 nm, 220 nm - 240 nm dan 440 nm - 470 nm dengan range 10 nm. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan hasil optimum. Parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan adalah faktor *tailing* (t_R') dan tinggi serapan.

3.9.3.3 Optimasi pH Fase Gerak

Tahap ini untuk memperoleh pH larutan buffer fosfat yang memberikan pemisahan senyawa dengan baik. Percobaan dilakukan dengan menyaring larutan LBS10 dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Kemudian diinjeksikan 5 μl LBS10 ke dalam kolom dengan menggunakan volume *void*, panjang gelombang hasil optimasi, laju alir 0,8 ml/menit, suhu kolom 30°C, fase gerak campuran buffer fosfat dan metanol (75 : 25) dan pH fase gerak yang diuji adalah 4,0; 4,3; 4,5 dan 4,7. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan hasil optimum. Parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan adalah waktu retensi, faktor kapasitas, faktor *tailing*, resolusi dan jumlah plat teoritis.

3.9.3.4 Optimasi Komposisi Fase Gerak

Tahap ini untuk menentukan komposisi fase gerak optimum yang memberikan pemisahan senyawa dengan baik. Percobaan dilakukan dengan menyaring larutan LBS10 dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Kemudian diinjeksikan 5 μl LBS10 ke dalam kolom dengan menggunakan volume *void*, panjang gelombang dan pH fase gerak hasil optimasi, laju alir 0,8 ml/menit dan suhu kolom 30°C. Komposisi campuran buffer fosfat dan metanol yang diuji adalah 73 : 27; 75 : 25 dan 77 : 23. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan hasil optimum. Parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan adalah waktu retensi, faktor kapasitas, faktor *tailing*, resolusi dan jumlah plat teoritis.

3.9.3.5 Optimasi Laju Alir

Tahap ini bertujuan untuk menentukan laju alir optimum yang memberikan pemisahan senyawa dengan baik. Percobaan dilakukan dengan menyaring larutan LBS10 dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Kemudian diinjeksikan 5 μl LBS10 ke dalam kolom dengan menggunakan volume *void*, panjang gelombang, komposisi dan pH fase gerak hasil optimasi dengan suhu kolom 30°C. Laju alir yang diuji adalah 0,8; 1,0 dan 1,2 ml/menit. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan hasil optimum. Parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan adalah waktu retensi, faktor kapasitas, faktor *tailing*, resolusi dan jumlah plat teoritis.

3.9.3.6 Optimasi Suhu Kolom

Tahap ini bertujuan untuk menentukan suhu kolom optimum yang memberikan pemisahan senyawa dengan baik. Percobaan dilakukan dengan menyaring larutan LBS10 dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Kemudian diinjeksikan 5 μl LBS10 ke dalam kolom menggunakan volume *void*, panjang gelombang, komposisi dan pH fase gerak dan laju alir hasil optimasi. Suhu kolom yang diuji adalah 25°C, 30°C dan 35°C. Selanjutnya dipilih kondisi yang memberikan hasil optimum. Parameter yang dipakai untuk menetapkan kondisi percobaan adalah waktu retensi, faktor kapasitas, faktor *tailing*, resolusi dan jumlah plat teoritis.

3.9.4 Penentuan Waktu Retensi Senyawa

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui waktu retensi setiap senyawa. Larutan LBT disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit. Penentuan waktu retensi dilakukan dengan menginjeksikan 5 μL LBT. Kondisi pengujian adalah volume *void* 30%, suhu oven 30°C, fase gerak buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25), laju alir 1,0 ml/menit dengan tiga panjang gelombang deteksi hasil optimasi. Waktu retensi setiap senyawa yang diperoleh merupakan karakteristik untuk identifikasi senyawa.

3.9.5 Validasi Metode KCKT

Hasil optimasi metode kemudian divalidasi dengan parameter yang meliputi: linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi, presisi dan selektivitas.

3.9.5.1 Linearitas

Masing-masing larutan baku seri (LBS) disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,2 μm dan disonikasi selama 15 menit. Larutan LBS1 diinjeksikan sebanyak 5 μL , kemudian dibiarkan sampai semua komponen keluar dan terpisah dari kolom. Langkah tersebut diulangi dengan menginjeksikan 5 μL LBS1, LBS2, LBS3, LBS4, LBS5, LBS6, LBS7, LBS8 dan LBS9. Kemudian diplot hubungan antara konsentrasi larutan baku (X) dengan luas area (Y) dari masing-masing komponen, ditentukan persamaan linear $Y = a + bX$, dihitung koefisien korelasi (r), batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing dihitung dengan persamaan $\text{LOD} = 3\text{SD}/b$ dan $\text{LOQ} = 10\text{SD}/b$ (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Huber, 1999).

3.9.5.2 Akurasi

Uji kecermatan dilakukan dengan menggunakan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*). Pengujian akurasi dilakukan pada rentang 80%, 100% dan 120%. Larutan sirup X (LS) dibuat dengan cara menimbang sejumlah 5,0128 g sirup X, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan ditambah aqua bidestilata steril sampai garis tanda, sehingga dalam 1 ml larutan LS mengandung 0,1003 gram sirup X.

Untuk pengujian sirup dilakukan dengan memipet 1 ml LS, dimasukkan ke dalam sebuah labu ukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda, disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μ m, disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μ l ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

Akurasi 80% dilakukan dengan penambahan 0,8 ml LBC ke dalam 1 ml LS, dimasukkan ke dalam sebuah labu ukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda. Larutan tersebut disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μ m, disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μ l ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

Akurasi 100% dilakukan dengan penambahan 1 ml LBC ke dalam 1 ml LS, dimasukkan ke dalam sebuah labu ukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda. Larutan tersebut disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μ m, disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μ l ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

Akurasi 120% dilakukan dengan penambahan 1,2 ml LBC ke dalam 1 ml LS, dimasukkan ke dalam sebuah labu ukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda. Larutan tersebut disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μ m, disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μ l ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

Perhitungan konsentrasi senyawa dalam larutan sirup X, akurasi 80%, akurasi 100% dan akurasi 120% menggunakan persamaan regresi masing-masing senyawa. Kemudian dihitung konsentrasi senyawa dalam sirup dengan menggunakan rumus $M = c/W \times F_p/1000 \times k$. Selisih konsentrasi senyawa dalam

akurasi 80%, 100% dan 120% dengan sirup X ($C_1 - C_2$) dibandingkan dengan konsentrasi senyawa baku yang sebenarnya ditambahkan (C_3). Hasil perhitungan akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali, dihitung dengan persamaan persentase *recovery* sebesar $[(C_1 - C_2)/C_3] \times 100\%$ (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Huber, 1999).

3.9.5.3 Presisi

Uji keseksamaan dilakukan sebagai uji ripitabilitas (URI) dan uji reproduisibilitas (URE). Uji uji ripitabilitas dilakukan dengan cara menyuntikkan 8 μ L LBS 10 sebanyak 6 kali ulangan pada kondisi sistem KCKT yang diperoleh sesuai dengan hasil optimasi.

Pengujian reproduisibilitas dilakukan dengan cara menyuntikkan 5 μ L campuran larutan sirup X dengan LBC. Larutan sirup X (LS) dipipet 1 ml dan dicampur dengan 1,2 ml LBC dalam labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda, disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μ m, disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μ l ke dalam alat KCKT dengan ulangan sebanyak 6 kali pada kondisi sistem KCKT yang diperoleh sesuai dengan hasil optimasi.

Data yang diperoleh setiap injeksi digunakan untuk menentukan keterulangan metode dan ketertiruan metode yang dinyatakan sebagai persen RSD dari luas area. Dihitung standar deviasi (SD), kadar rata-rata ($\bar{X}$) dan persentase RSD sebesar $(SD/\bar{X}) \times 100\%$ (Ravichandran, et al., 2010; Chan, et al., 2004; Harmita, 2004; Burn, et al., 2002; Huber, 1999).

3.9.5.4 Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan dengan membandingkan kromatogram larutan baku, larutan sirup X dan larutan sirup X ditambah baku. Kromatogram larutan baku, larutan sirup X dan larutan sirup X ditambah baku harus menunjukkan waktu retensi relatif sama dengan waktu retensi masing-masing senyawa. Kondisi pengujian menggunakan metode KCKT sesuai hasil optimasi.

Larutan sirup X ditambah baku dibuat sesuai prosedur pengujian 100% pada uji akurasi. Larutan sirup X ditambah baku dibuat dengan cara menambahkan 1 ml LBC ke dalam 1 ml LS, dimasukkan ke dalam sebuah labu tentukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda. Larutan tersebut disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μl ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

Larutan sirup X dibuat sesuai prosedur pengujian sirup X pada uji akurasi. Larutan sirup X dibuat dengan memipet 1 ml LS, dimasukkan ke dalam sebuah labu ukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda, disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μl ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

Larutan baku dibuat dilakukan dengan memipet 1 ml LBC, dimasukkan ke dalam sebuah labu tentukur 10 ml, diencerkan dengan campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol (75 : 25) sampai batas tanda, disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 μm , disonikasi selama 15 menit dan diinjeksikan 5 μl ke dalam alat KCKT dengan kondisi sesuai hasil optimasi.

3.9.6 Penetapan Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dalam Sampel

Ditimbang seksama 1,0 gram sampel, diencerkan sampai volumenya tepat 10 mL, disonikasi selama 30 menit. Larutan dipipet sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml. Larutan disaring dengan penyaring *syringe* PTFE 0,45 µm ke dalam vial autosampler dan diinjeksikan sebanyak 5 µl ke alat KCKT dengan metode sesuai hasil optimasi. Perlakuan tersebut dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Kadar senyawa dihitung berdasarkan persamaan regresi masing-masing senyawa yang sudah diperoleh. Kadar dinyatakan dalam milligram per kilogram setiap senyawa dalam sampel dihitung dengan persamaan berikut (Wrolstad, et al., 2005):

$$M = \frac{c}{W} \times \frac{Fp}{1000} \times k$$

Kadar dinyatakan dalam persen massa per massa setiap senyawa dalam sampel dihitung dengan persamaan berikut (Wrolstad, et al., 2005):

$$P = \frac{M}{10^6} \times 100\%$$

Di mana: M = Kadar rata-rata BTM (mg/kg)

c = Kadar rata-rata BTM dari penyuntikan (µg/ml)

W = Massa rata-rata penimbangan sampel (kg)

Fp = Faktor Pengenceran

k = Angka kemurnian bahan baku (%)

P = Kadar rata-rata BTM (%)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum yang telah dilakukan menunjukkan bahwa setiap senyawa memiliki panjang gelombang maksimum yang berbeda-beda. Panjang gelombang maksimum hasil penelitian untuk natrium siklamat, natrium sakarin, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* masing-masing sebesar: 197, 201, 224, 254, 427 dan 482 nm. Spektrum masing-masing senyawa baku dapat dilihat pada Lampiran 3, halaman 108 - 110. Spektrum *overlay* enam senyawa baku dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Gambar 4.1 Spektrum *Overlay* Enam Senyawa Baku

Panjang gelombang maksimum natrium sakarin yang diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya adalah 200 nm, 202 nm dan 204 nm (Serdar dan Knezevic, 2011; Xiao, et al., 2011; Lin, et al., 2000). Hal ini memberikan informasi bahwa panjang gelombang maksimum natrium sakarin

berada pada rentang 200 nm – 204 nm. Dengan demikian, hasil penelitian penentuan panjang gelombang maksimum natrium sakarin 201 nm dinyatakan berada pada rentang hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya.

Panjang gelombang maksimum natrium siklamat yang diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya adalah 194 nm dan 205 nm (Xiao , et al., 2011; Zhihong dan Yanchun, 1999). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka panjang gelombang maksimum natrium siklamat berada pada rentang 194 nm – 205 nm. Dengan demikian, hasil penelitian penentuan panjang gelombang maksimum natrium siklamat 197 nm dinyatakan berada pada rentang hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya.

Panjang gelombang maksimum natrium benzoat yang diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya adalah 224 nm, 225 nm, 227 nm, 228 nm dan 230 nm (Esfandiari, et al., 2013; Ene dan Diacu, 2009; Nour, et al., 2009; Alghamdi, et al., 2005; Pylypiw dan Grether, 2000). Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa panjang gelombang maksimum natrium benzoat berada pada rentang 224 nm – 230 nm. Dengan demikian, hasil penelitian penentuan panjang gelombang maksimum natrium benzoat 224 nm dinyatakan berada pada rentang hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya dan sama dengan yang dilakukan oleh peneliti Alghamdi, et al. (2005).

Panjang gelombang maksimum kalium sorbat yang diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya adalah 254 nm, 255 nm, 260 nm dan 261 nm (Esfandiari, et al., 2013; Nour, et al., 2009; Tfouni dan Toledo, 2002; Pylypiw dan Grether, 2000). Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa panjang gelombang maksimum kalium sorbat berada pada rentang 254 nm

– 261 nm. Dengan demikian, hasil penelitian penentuan panjang gelombang maksimum kalium sorbat 254 nm dinyatakan berada pada rentang hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya dan sama dengan yang dilakukan oleh peneliti Nour, et al. (2009).

Panjang gelombang maksimum tartrazin yang diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya adalah 426 nm, 427 nm, 429 nm dan 431 nm (Ramakrishnan, et al., 2011; Vachirapatama, et al., 2008; Zatar, 2007; Lopez, et al., 1997). Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa panjang gelombang maksimum tartrazin berada pada rentang 426 nm – 431 nm. Dengan demikian, hasil penelitian penentuan panjang gelombang maksimum kalium sorbat 427 nm dinyatakan berada pada rentang hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya dan sama dengan yang dilakukan oleh peneliti Zatar (2007).

Panjang gelombang maksimum *sunset yellow* yang diperoleh dari hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya adalah 480 nm, 481 nm, 484 nm dan 487 nm (Pavanelli, et al., 2011; Vachirapatama, et al., 2008; Zatar, 2007; Lopez, et al., 1997). Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa panjang gelombang maksimum *sunset yellow* berada pada rentang 480 nm – 487 nm. Dengan demikian, hasil penelitian penentuan panjang gelombang maksimum *sunset yellow* 482 nm dinyatakan berada pada rentang hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya.

4.2 Tahap Optimasi

4.2.1 Optimasi Volume Void

Pengaruh volume *void* terhadap parameter optimasi dapat dilihat pada Tabel 4.1. Hubungan volume *void* dengan faktor kapasitas dan selektifitas natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, tartrazin dan *sunset yellow* dapat dilihat pada Gambar 4.2. Kromatogram optimasi volume *void* dapat dilihat pada Lampiran 5, halaman 112.

Tabel 4.1 Pengaruh Volume *Void* terhadap Parameter Optimasi

No	Senyawa	Panjang Gelombang (nm)	Volume Void (%)																	
			20						30						40					
			R _t	k'	N	R _s	α	F _t	R _t	k'	N	R _s	α	F _t	R _t	k'	N	R _s	α	F _t
1	Tartrazin	200	1.236	1.980	1582	-	-	1.193	1.237	0.990	1598	-	-	1.152	1.238	0.490	1707	-	-	1.229
2	Natrium Sakarin	200	1.925	3.630	6220	6.210	1.840	1.209	1.926	2.090	6040	6.180	2.120	1.230	1.925	1.320	6404	6.340	2.690	1.200
3	Natrium Siklamat	200	3.232	6.780	4765	9.150	1.870	2.390	3.233	4.190	4966	9.230	2.000	1.714	3.231	2.890	5220	9.470	2.190	1.596
4	Sunset Yellow	200	4.659	10.210	2699	5.220	1.510	1.767	4.664	6.490	3084	5.500	1.550	1.293	4.662	4.610	2878	5.430	1.600	1.637
5	Natrium Benzoat	200	7.209	16.350	11423	8.100	1.600	1.065	7.216	10.580	11298	8.390	1.630	1.058	7.212	7.680	12261	8.370	1.670	1.077
6	Kalium Sorbat	200	10.834	25.080	12410	10.990	1.530	1.115	10.846	16.400	12441	10.970	1.550	1.122	10.837	12.040	12188	11.080	1.570	1.051

Keterangan: - = Tak terdeteksi

Gambar 4.2 Hubungan Volume *Void* dengan Faktor Kapasitas (a) dan Selektifitas (b) Natrium Sakarin (■), Natrium Siklamat (▲), Natrium Benzoat (*), Tartrazin (◆) dan *Sunset Yellow* (×)

Tabel 4.1 dan Gambar 4.2 memberikan informasi bahwa volume *void* sangat signifikan mempengaruhi faktor kapasitas dan selektifitas. Volume *void* semakin besar menyebabkan faktor kapasitas semakin kecil dan selektivitas semakin meningkat. Faktor kapasitas semakin menurun menunjukkan bahwa kelarutan

natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dengan fase gerak semakin baik. Selektivitas semakin meningkat memberikan informasi bahwa pemisahan natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* semakin sempurna.

Hubungan volume *void* dengan faktor kapasitas dan *tailing* natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 4.3. Gambar 4.3 menunjukkan bahwa peningkatan volume *void* menyebabkan natrium siklamat mengalami penurunan faktor kapasitas dan faktor *tailing*. Hal ini menunjukkan bahwa partisi natrium siklamat dengan fase gerak semakin baik. Nilai faktor *tailing* natrium siklamat sebesar 2,390 (Tabel 4.1) pada volume *void* 20 %, lebih besar dari yang diizinkan ($0,9 \leq F_t \leq 2,0$). Hal ini menunjukkan bahwa partisi natrium siklamat dengan fase gerak kurang baik.

Gambar 4.3 Hubungan Volume *Void* dengan Faktor Kapasitas (■) dan *Tailing* (×) Natrium Siklamat

Dari Tabel 4.1 pada volume *void* 20% memberikan nilai $k = 25,08$ untuk kalium sorbat, melampaui batas maksimal yang diizinkan, namun kromatogram kalium sorbat tidak mengalami *tailing*. Hal ini menunjukkan bahwa kalium sorbat masih mampu berpartisi dengan fase gerak yang digunakan. Volume *void* 40% memberikan nilai $k = 0,490$ untuk tartrazin, di bawah batas minimal yang diizinkan. Data faktor kapasitas tersebut menunjukkan ada kemungkinan terjadi *overlapping* dengan pelarut yang biasa menumpuk dekat t_0 . Sedangkan volume *void*

30% memberikan nilai k antara 0,990 – 16,400; berada pada rentang yang diizinkan, sehingga penelitian dilanjutkan dengan menggunakan volume *void* 30%.

4.2.2 Optimasi Panjang Gelombang

Faktor *tailing* senyawa pada masing-masing panjang gelombang dapat dilihat pada Tabel 4.2. Kromatogram optimasi panjang gelombang dapat dilihat pada Lampiran 6, halaman 113 – 115.

Tabel 4.2 Faktor *Tailing* Senyawa pada Masing-Masing Panjang Gelombang

Senyawa	Faktor <i>Tailing</i>							
	200 nm	220 nm	230 nm	240 nm	440 nm	450 nm	460 nm	470 nm
Tartrazin	1,152	1,344	1,390	1,412	1,416	1,415	1,412	1,418
Natrium Sakarin	1,230	1,224	1,237	1,232	tt	tt	tt	tt
Natrium Siklamat	1,714	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt
<i>Sunset Yellow</i>	1,293	1,586	1,636	1,645	1,604	1,629	1,649	1,610
Natrium Benzoat	1,058	1,069	1,070	1,069	tt	tt	tt	tt
Kalium Sorbat	1,122	1,046	1,042	1,042	tt	tt	tt	tt

tt = tidak terdeteksi

Hasil penelitian optimasi panjang gelombang natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* diperoleh data faktor *tailing* memenuhi persyaratan yang diizinkan ($0,9 < Ft < 2,0$) dari panjang gelombang 200 nm - 470 nm (Tabel 4.2).

Detektor DAD pada sistem KCKT yang digunakan hanya dapat mendeteksi natrium siklamat pada panjang gelombang 200 nm dengan faktor *tailing* 1,714 (Tabel 4.2) dan berada pada rentang yang diizinkan, walaupun bukan pada panjang gelombang maksimum natrium siklamat 197 nm yang diperoleh dari spektrofotometer UV. Hal ini memberikan informasi bahwa natrium siklamat dapat dideteksi pada panjang gelombang 200 nm dengan menggunakan detektor DAD pada sistem KCKT. Pengembangan metode penetapan kadar siklamat dan implementasi paparan natrium siklamat pada manusia (Wibowotomo, 2008),

validasi metode analisis penetapan kadar senyawa siklamat dalam minuman ringan (Novelina, dkk., 2009), juga menggunakan KCKT dengan panjang gelombang 200 nm. Dengan demikian, hasil penelitian sama dengan panjang gelombang yang digunakan oleh peneliti sebelumnya. Oleh karena itu, untuk penetapan kadar natrium siklamat dilakukan pada panjang gelombang 200 nm.

Kromatogram serapan pelarut pada panjang gelombang 200 nm - 220 nm dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Gambar 4.4 Kromatogram Serapan Pelarut pada Panjang Gelombang 200 nm – 220 nm

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa serapan pelarut buffer fosfat pH 4,5 dan metanol pada perbandingan 75 : 25 terjadi pada waktu retensi 0,714 menit – 1,058 menit pada panjang gelombang 200 nm, sehingga tartrazin dan natrium sakarin yang mempunyai waktu retensi masing-masing 0,941 menit dan 1,589 menit (Lampiran 13) tidak dapat dianalisis pada panjang gelombang 200 nm, karena serapan pelarut akan mengganggu analisis tartrazin dan natrium sakarin. Gambar

4.4 menunjukkan bahwa pada panjang gelombang 220 nm tidak terdapat serapan pelarut, maka analisis sakarin dapat dilakukan pada panjang gelombang 220 nm.

Ree dan Stoa (2011), telah melakukan penetapan kadar sakarin, asam benzoat, aspartam dan kafein dalam minuman ringan dengan menggunakan KCKT detektor UV pada panjang gelombang tunggal 220 nm. Sibarani (2010), telah menetapkan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat dalam sirup dengan menggunakan KCKT detektor UV pada panjang gelombang 230 nm. Matsunaga, et al. (1985), telah melakukan penetapan kadar sakarin, asam benzoat, asam sorbat dan lima ester asam-*p*-hidroksibenzoat dalam makanan dengan menggunakan KCKT detektor UV pada panjang gelombang 240 nm. Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa penetapan kadar natrium sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat dapat dilakukan pada panjang gelombang 220 – 240 nm. Faktor *tailing* dan tinggi serapan natrium sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 220 nm - 240 nm dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Gambar 4.5 Faktor *Tailing* (a) dan Tinggi Serapan (b) Natrium Sakarin (■), Natrium Benzoat (▲) dan Kalium Sorbat (◆) pada Panjang Gelombang 220 nm - 240 nm

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa natrium sakarin lebih baik dianalisis pada panjang gelombang 220 nm, karena faktor *tailing* lebih kecil dan serapan natrium sakarin lebih tinggi. Oleh karena itu, penetapan kadar natrium sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat dilakukan pada panjang gelombang 220 nm.

Kromatogram larutan baku ditambah sirup X pada panjang gelombang 220 nm - 240 nm dapat dilihat pada Gambar 4.6. Kromatogram larutan baku ditambah sirup X pada panjang gelombang 440 nm - 470 nm dapat dilihat pada Gambar 4.7.

Gambar 4.6 Kromatogram Larutan Baku Ditambah Sirup X pada Panjang Gelombang 220 nm – 240 nm

Gambar 4.7 Kromatogram Larutan Baku Ditambah Sirup X pada Panjang Gelombang 440 nm – 470 nm

Gambar 4.6 memberikan informasi bahwa serapan tartrazin kurang simetris, sedangkan Gambar 4.7 bentuk kromatogram tartrazin lebih simetris. Hal ini menunjukkan bahwa pada rentang panjang gelombang 220 nm – 240 nm serapan tartrazin dipengaruhi oleh matriks sirup atau ada senyawa lain dalam komponen sirup yang tidak terelusi sempurna, sedangkan pada rentang panjang

gelombang 440 nm – 470 nm serapan tartrazin tidak dipengaruhi oleh matriks sirup atau tidak ada senyawa lain dalam komponen sirup yang tidak terelusi sempurna, sehingga penetapan kadar tartrazin tidak dapat dilakukan pada panjang gelombang 220 nm – 240 nm.

Penetapan kadar tartrazin dan *sunset yellow* telah dilakukan dalam makanan ternak dengan menggunakan KCKT pada panjang gelombang 420 nm (Lee, et al., 2007). Penetapan kadar tartrazin dan *sunset yellow* dalam minuman beralkohol juga telah dilakukan dengan menggunakan KCKT pada panjang gelombang 450 nm (Prado, et al., 2006). Sedangkan Jurcovan, et al. (2012) menetapkan kadar tartrazin dan *sunset yellow* dalam minuman ringan dengan menggunakan KCKT pada panjang gelombang 470 nm. Penelitian ini memberikan informasi bahwa penetapan kadar tartrazin dan *sunset yellow* dapat dilakukan pada panjang gelombang 420 nm – 470 nm. Faktor *tailing* dan tinggi serapan tartrazin maupun *sunset yellow* pada panjang gelombang 440 nm - 470 nm dapat dilihat pada Gambar 4.8.

Gambar 4.8 Faktor *Tailing* (a) dan Tinggi Serapan (b) Tartrazin (♦) dan *Sunset Yellow* (×) pada Panjang Gelombang 440 nm - 470 nm

Gambar 4.8 menunjukkan bahwa penetapan kadar tartrazin dan *sunset yellow* lebih baik dilakukan pada panjang gelombang 450 nm. Walaupun faktor *tailing sunset yellow* sebesar 1,629 (Tabel 4.2) lebih tinggi dari panjang gelombang 440 nm ($F_t = 1,604$) dan 470 nm ($F_t = 1,610$). Hal ini dilakukan karena serapan *sunset yellow* dan tartrazin masing-masing pada panjang gelombang 440 nm dan 470 nm paling rendah.

4.2.3 Optimasi pH Fase Gerak

Hasil optimasi pH fase gerak diperoleh data berupa waktu retensi, faktor kapasitas, jumlah plat teoritis, resolusi, selektifitas dan faktor *tailing*. Kromatogram optimasi pH larutan buffer fosfat dapat dilihat pada Lampiran 8, halaman 117 - 120. Pengaruh pH buffer terhadap parameter optimasi dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Pengaruh pH Buffer terhadap Parameter Optimasi

Senyawa	Panjang Gelombang (nm)	pH Larutan Buffer Fosfat											
		4,0						4,3					
		Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf
Tartrazin	450	1,255	1,010	1701	-	-	1,911	1,238	0,990	1132	-	-	1,127
Natrium Sakarin	220	2,010	2,230	4771	6,220	2,200	1,886	2,000	2,210	5014	5,570	2,240	1,892
Natrium Siklamat	200	3,473	4,570	3107	8,020	2,050	2,357	3,454	4,540	2581	7,540	2,060	1,056
<i>Sunset Yellow</i>	450	4,824	6,740	2606	14,280	6,650	1,784	4,738	6,600	3585	15,060	6,690	2,109
Natrium Benzoat	220	11,367	17,240	4627	12,590	2,560	1,420	8,728	13,000	4585	9,610	1,970	1,067
Kalium Sorbat	220	14,683	22,560	6364	4,710	1,310	1,839	12,653	19,300	5109	6,400	1,480	1,373
		4,5						4,7					
Tartrazin	450	1,217	0,950	941	-	-	1,381	1,184	0,900	1196	-	-	1,595
Natrium Sakarin	220	2,002	2,210	4986	5,750	2,330	1,976	1,980	2,180	5230	6,540	2,420	2,039
Natrium Siklamat	200	3,470	4,570	3003	8,000	2,060	1,740	3,437	4,510	3332	8,370	2,070	0,872
<i>Sunset Yellow</i>	450	4,747	6,620	3852	15,160	6,950	2,212	4,614	6,400	4736	16,900	7,110	2,164
Natrium Benzoat	220	7,366	10,820	3835	6,750	1,640	0,946	5,204	7,350	4160	1,980	1,150	1,010
Kalium Sorbat	220	11,341	17,200	4848	7,040	1,590	1,072	8,612	12,820	4670	8,230	1,740	1,106

Keterangan: - = Tak terdeteksi

Fase gerak buffer asam menyebabkan senyawa basa terionisasi sehingga lebih cepat terelusi dan senyawa asam tidak terionisasi jika pH larutan buffer lebih kecil dari pKa senyawa asam tersebut sehingga lebih lambat terelusi atau sebaliknya. Larutan buffer yang dipilih harus memberikan pemisahan terbaik berdasarkan nilai resolusi dan faktor kapasitas, selain itu juga memberikan waktu analisis yang lebih singkat.

Hubungan pH dengan faktor *tailing*, resolusi dan faktor kapasitas natrium sakarin, natrium silkamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dapat dilihat pada Gambar 4.9.

Gambar 4.9 Hubungan pH dengan Faktor *Tailing* (a), Resolusi (b) dan Faktor Kapasitas (c) Natrium Sakarin (■), Natrium Silkamat (▲), Natrium Benzoat (■), Kalium Sorbat (●), Tartrazin (◆) dan *Sunset Yellow* (■)

Senyawa terpisah kurang baik pada fase gerak buffer fosfat pH 4,7 yang ditandai resolusi natrium benzoat sebesar 1,980 (Tabel 4.3) lebih kecil dari yang diizinkan untuk pengembangan metode, yaitu $R_s \geq 2$ (Snyder, et al., 2010). Hal ini memberikan informasi bahwa ionisasi natrium benzoat ($pK_a = 4,2$) pada fase gerak buffer pH 4,7 menyebabkan waktu retensi menjadi lebih cepat dan resolusi menjadi buruk (Gamabr 4.9 dan Lampiran 10). Natrium sakarin dan *sunset yellow* mengalami *tailing* dan natrium siklamat mengalami *fronting* pada buffer fosfat pH 4,7 (Tabel 4.3, Gambar 4.9 dan Lampiran 10). Hal ini memberikan informasi bahwa ionisasi natrium sakarin ($pK_a = 1,8$), natrium siklamat ($pK_a = 1,9$) dan *sunset yellow* ($pK_a = 9,2$) menyebabkan bentuk kromatogram natrium sakarin dan *sunset yellow* mengalami *tailing*, sedangkan natrium siklamat mengalami *fronting*.

Semua senyawa pada buffer fosfat pH 4,0 terpisah dengan baik, ditandai dengan resolusi > 2 , tetapi nilai faktor kapasitas kalium sorbat 22,560 (Tabel 4.3), berada di atas batas maksimal yang diizinkan (Gambar 4.9). Nilai faktor kapasitas terlalu besar mengindikasikan bahwa waktu analisis menjadi lebih lama. Hal ini terjadi karena kalium sorbat ($pK_a = 4,8$) tidak mengalami ionisasi sehingga partisi dengan fase gerak kurang baik. Faktor *tailing* natrium siklamat ($pK_a = 1,9$) sebesar 2,357 (Tabel 4.3 dan Gambar 4.9). Hal ini memberikan informasi bahwa ionisasi natrium siklamat pada fase gerak buffer fosfat pH 4,0 menyebabkan partisi dengan fase gerak kurang baik sehingga bentuk kromatogram menjadi *tailing*.

Senyawa terpisah dengan baik pada fase gerak buffer fosfat pH 4,3 dan pH 4,5 karena memenuhi persyaratan parameter optimasi yang ditandai dengan resolusi > 2 , faktor kapasitas berada pada rentang persyaratan ($0,5 \leq k \leq 20$) dan selektivitas > 1 . Namun, *sunset yellow* ($pK_a = 9,2$) mengalami *tailing* baik pada fase gerak buffer fosfat pH 4,3 maupun pH 4,5 (Tabel 4.3 dan Gambar 4.9). Hal

ini menunjukkan bahwa ionisasi *sunset yellow* pada fase gerak buffer fosfat pH 4,3 dan pH 4,5 menyebabkan partisi *sunset yellow* pada fase gerak kurang baik sehingga bentuk kromatogram menjadi *tailing*. Tabel 4.3 menunjukkan bahwa faktor kapasitas kalium sorbat pada pH 4,3 ($k = 19,30$) lebih besar dibandingkan pH 4,5 ($k = 17,20$), sehingga analisis pada pH 4,3 lebih lama dibandingkan pada pH 4,5. Oleh karena itu, larutan buffer fosfat yang dipilih untuk penelitian selanjutnya adalah buffer fosfat pH 4,5.

Pylypiw dan Grether (2000), menggunakan fase gerak campuran asetonitril dan buffer amonium asetat pH 4,2 untuk penetapan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat. Khosrokhavar, et al. (2010), menggunakan fase gerak campuran asetonitril dan buffer amonium asetat pH 4,4 untuk menetapkan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat. Xiao, et al. (2011), menggunakan fase gerak campuran asetonitril dan amonium sulfat pH 4,4 untuk menetapkan kadar aspartam, natrium sakarin, natrium siklamat, kalium asesulfam, neotam dan steviosida. Shimadzu (2007), telah berhasil menetapkan kadar tartrazin dan *sunset yellow* dalam minuman dengan menggunakan fase gerak campuran asetonitril dan buffer amonium asetat pH 4,7. Hasil penelitian masing-masing peneliti tersebut diperoleh informasi bahwa pemisahan senyawa dalam campuran memenuhi syarat yang diizinkan.

Penelitian yang dilakukan dengan menggunakan fase gerak campuran metanol dan buffer fosfat pH 4,0 sampai pH 4,7 ternyata memberikan hasil yang terbaik pada fase gerak campuran metanol dan buffer fosfat pH 4,5; berada pada rentang pH yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Perbedaan pH terjadi karena perbedaan fase gerak organik dan jenis buffer yang digunakan serta komponen senyawa yang dipisahkan.

4.2.4 Optimasi Komposisi Fase Gerak

Pengaruh komposisi fase gerak terhadap parameter optimasi dapat dilihat pada Tabel 4.4. Fase gerak yang dioptimasi adalah buffer fosfat pH 4,5 dan metanol dengan perbandingan komposisi seperti pada Tabel 4.4. Kromatogram optimasi dapat dilihat pada Lampiran 9, halaman 121 - 123.

Tabel 4.4 Pengaruh Komposisi Fase Gerak terhadap Parameter Optimasi

Senyawa	Panjang Gelombang (nm)	Komposisi Fase Gerak Buffer - Metanol																	
		77 : 23						75 : 25						73 : 27					
		Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf
Tartrazin	450	1,273	1,040	2826	-	-	2,493	1,239	0,990	1483	-	-	1,430	1,169	0,880	1092	-	-	1,959
Natrium Sakarin	220	2,099	2,370	6725	8,340	2,270	1,192	1,948	2,130	6193	6,040	2,150	1,269	1,829	1,940	5757	5,650	2,210	1,311
Natrium Siklamat	200	3,573	4,730	5486	9,980	2,000	1,740	3,292	4,280	4906	9,310	2,010	1,941	3,054	3,900	4900	9,010	2,020	2,102
Sunset Yellow	450	6,111	8,810	4193	20,400	8,440	1,611	4,724	6,580	3727	15,870	6,660	1,565	3,755	5,030	3547	13,130	5,740	1,649
Natrium Benzoat	220	8,355	12,410	11931	6,510	1,410	1,045	7,431	10,920	11632	9,240	1,660	1,024	6,631	9,640	11072	11,280	1,920	1,020
Kalium Sorbat	220	12,789	19,520	12738	11,660	1,570	1,048	11,188	16,950	12734	11,160	1,550	1,041	9,807	14,740	12474	10,510	1,530	1,040

Keterangan: - = Tak terdeteksi

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa waktu retensi pada komposisi fase gerak buffer fosfat pH 4,5 dan metanol 77 : 23 lebih lambat dibandingkan pada komposisi 75 : 25 dan 73 : 27. Komposisi metanol semakin meningkat menyebabkan faktor kapasitas, jumlah plat teoritis, resolusi dan selektivitas mengalami penurunan, kecuali resolusi dan selektivitas natrium benzoat.

Faktor kapasitas natrium benzoat mengalami penurunan karena natrium benzoat ($pK_a = 4,2$) dalam fase gerak buffer fosfat pH 4,5 belum terionisasi sempurna, sehingga peningkatan fraksi metanol menyebabkan kelarutan natrium benzoat bertambah. Resolusi dan selektivitas natrium benzoat meningkat menunjukkan bahwa pemisahan menjadi lebih sempurna. Sementara natrium sakarin, natrium siklamat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* mengalami penurunan resolusi dan selektivitas seiring peningkatan kelarutan natrium benzoat

pada fase gerak dengan peningkatan fraksi metanol. Dengan demikian, faktor kapasitas mengalami penurunan disebabkan penurunan viskositas fase gerak, tidak disebabkan peningkatan kelarutan senyawa tersebut.

Pengaruh komposisi fase gerak terhadap faktor *tailing* natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dapat dilihat pada Gambar 4.10.

Gambar 4.10 Pengaruh Komposisi Fase Gerak terhadap Faktor *Tailing* Natrium Sakarin (♦), Natrium Siklamat (▲), Natrium Benzoat (■), Kalium Sorbat (●), Tartrazin (×) dan *Sunset Yellow* (■)

Hasil optimasi komposisi fase gerak memenuhi persyaratan parameter optimasi, kecuali natrium siklamat dan tartrazin mengalami *tailing* masing-masing pada fase gerak buffer fosfat pH 4,5 dan metanol dengan perbandingan 73 : 27 dan 77 : 23 (Tabel 4.4 dan Gambar 4.10). Ionisasi dari natrium siklamat ($pK = 1,9$) dan tartrazin ($pK_a = 10,9$) menyebabkan natrium siklamat dan tartrazin tidak mampu berpartisi pada campuran fase gerak buffer fosfat dan metanol dengan perbandingan masing-masing 73 : 27 dan 77 : 23. Oleh karena itu, penelitian dilanjutkan dengan menggunakan komposisi buffer fosfat dan metanol dengan perbandingan 75 : 25.

4.2.5 Optimasi Laju Alir

Laju alir yang dioptimasi adalah 0,8; 1,0 dan 1,2 ml/menit. Pengaruh laju alir terhadap parameter optimasi dapat lihat pada Tabel 4.5 dan kromatogram optimasi laju alir dapat dilihat pada Lampiran 10, halaman 124 – 126.

Tabel 4.5 Pengaruh Laju Alir terhadap Parameter Optimasi

Senyawa	Panjang Gelombang (nm)	Laju Alir (ml/menit)																	
		0,8 (120 bar)						1,0 (133 bar)						1,2 (156 bar)					
		Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf
Tartrazin	450	1,242	0,990	1710	-	-	1,406	0,991	0,990	1309	-	-	1,336	0,822	0,980	1061	-	-	1,337
Natrium Sakarin	220	1,950	2,130	6276	6,340	2,140	1,316	1,559	2,130	4943	5,570	2,150	1,181	1,297	2,120	3688	4,960	2,170	1,067
Natrium Siklamat	200	3,294	4,280	4906	9,340	2,010	2,235	2,632	4,280	4628	8,780	2,010	1,926	2,191	4,270	4164	8,060	2,010	1,450
Sunset Yellow	450	4,723	6,580	3835	16,360	6,630	1,581	3,776	6,570	3429	15,130	6,650	1,600	3,144	6,570	3246	14,420	6,710	1,471
Natrium Benzoat	220	7,430	10,920	11936	9,470	1,660	1,052	5,918	10,870	10921	8,830	1,650	1,011	4,910	10,820	9912	8,380	1,650	1,043
Kalium Sorbat	220	11,182	16,940	13455	11,400	1,550	1,042	8,897	16,850	12299	10,870	1,550	1,016	7,383	16,770	11786	10,530	1,550	1,040

Keterangan: - = Tak terdeteksi

Pengaruh laju alir terhadap parameter optimasi (Tabel 4.5) menunjukkan bahwa peningkatan laju alir menyebabkan waktu retensi, jumlah plat teoritis, resolusi dan faktor *tailing* semakin menurun, kecuali faktor *tailing* natrium benzoat dan kalium sorbat. Hal ini memberikan informasi bahwa peningkatan laju alir mempercepat waktu analisis, memperburuk efektivitas kolom sehingga pemisahan menjadi tidak sempurna, namun memperbaiki faktor *tailing* untuk senyawa basa lemah dan asam lemah yang larut dan terionisasi sempurna. Natrium benzoat ($pK_a = 4,2$) yang mengalami ionisasi tidak sempurna dan kalium sorbat ($pK_a = 4,8$) yang tidak terionisasi pada fase gerak campuran buffer fosfat pH 4,5 dan metanol dengan perbandingan 75 : 25 maka faktor *tailing* tidak dipengaruhi oleh laju alir.

Pengaruh laju alir terhadap tekanan pompa sistem KCKT dan faktor *tailing* natrium sakarin, natrium silkamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dapat dilihat pada Gambar 4.11.

Gambar 4.11 Pengaruh Laju Alir terhadap Tekanan Pompa Sistem KCKT (a) dan Faktor *Tailing* (b) Natrium Sakarin (■), Natrium Silkamat (▲), Natrium Benzoat (■), Kalium Sorbat (×), Tartrazin (◆) dan *Sunset Yellow* (✱)

Nilai faktor *tailing* natrium siklamat sebesar 2,235 pada laju alir 0,8 ml/menit dan mengalami penurunan yang sangat signifikan dengan peningkatan laju alir, sehingga pada laju alir 1,2 ml/menit menjadi 1,450 (Tabel 4.5 dan Gambar 4.11). Hal ini memberikan indikasi bahwa laju alir dapat memperbaiki bentuk kromatogram senyawa yang mengalami *tailing*. Penurunan faktor *tailing* tersebut bukan disebabkan peningkatan kelarutan natrium siklamat pada fase gerak, tetapi disebabkan peningkatan tekanan pompa sistem KCKT (Gambar 4.11). Jumlah plat teoritis tartrazin pada laju alir 1,0 ml/menit sebesar 1309 (Tabel 4.5) lebih besar dari laju alir 1,2 ml/menit (N=1061), sehingga penelitian dilanjutkan dengan menggunakan laju alir 1,0 ml/menit.

4.2.6 Optimasi Suhu Kolom

Suhu kolom yang dioptimasi adalah 25°C, 30°C dan 35°C. Hasil optimasi suhu kolom diperoleh data berupa waktu retensi, faktor kapasitas, jumlah plat teoritis, resolusi, selektifitas dan faktor *tailing*. Pengaruh suhu kolom terhadap parameter optimasi dapat lihat pada Tabel 4.6 dan kromatogram optimasi suhu kolom dapat dilihat pada Lampiran 11, halaman 127 - 129.

Tabel 4.6 Pengaruh Suhu Kolom terhadap Parameter Optimasi

Senyawa	Panjang Gelombang (nm)	Suhu Kolom (°C)																	
		25						30						35					
		Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf	Rt	k'	N	Rs	α	Tf
Tartrazin	450	1,021	1,050	2163	-	-	2,282	0,993	0,990	1330	-	-	1,306	0,928	0,860	1151	-	-	1,723
Natrium Sakarin	220	1,645	2,300	2300	6,990	2,190	1,167	1,561	2,130	5023	5,630	2,150	1,233	1,489	1,990	4745	5,800	2,310	1,277
Natrium Siklamat	200	2,736	4,490	4490	8,750	1,950	1,721	2,635	4,280	4207	8,510	2,010	1,615	2,535	4,080	4082	8,430	2,060	0,881
Sunset Yellow	450	4,644	8,310	3343	17,700	7,940	1,609	3,790	6,600	3713	15,520	6,660	1,555	3,150	5,320	3942	14,320	6,170	1,487
Natrium Benzoat	220	6,660	12,360	11031	7,010	1,490	1,021	5,935	10,900	11250	9,060	1,650	1,029	5,318	9,670	11188	10,770	1,820	1,006
Kalium Sorbat	220	9,912	18,880	12366	10,640	1,530	1,030	8,918	16,890	12957	11,090	1,550	1,017	8,050	15,150	12914	10,770	1,570	1,044

Hasil optimasi suhu kolom memberikan informasi bahwa suhu kolom sangat signifikan mempengaruhi waktu retensi dan faktor kapasitas (Tabel 4.6). Hal ini memberikan gambaran bahwa suhu kolom dinaikkan maka viskositas fase gerak mengalami penurunan, sehingga faktor kapasitas semakin kecil dan waktu retensi semakin cepat. Kenaikan suhu masih memberikan pemisahan senyawa dengan baik karena proses elusi pemisahan senyawa pada sistem KCKT yang dipilih berlangsung dengan baik dan masih memenuhi persyaratan, kecuali nilai faktor *tailing* tartrazin 2,282 pada suhu kolom 25°C dan natrium siklamat 0,881 pada suhu kolom 35°C. Oleh karena itu, penelitian selanjutnya dilakukan pada suhu kolom 30°C.

4.3 Hasil Optimasi

Hasil optimasi kondisi sistem KCKT adalah fase gerak buffer fosfat pH 4,5 : metanol (75 : 25), suhu kolom 30 °C dan laju alir 1,0 ml/menit dengan panjang gelombang deteksi 200 nm untuk siklamat, 220 nm untuk sakarin, benzoat dan sorbat serta 450 nm untuk tartrazin dan *sunset yellow* yang masing-masing dapat dilihat pada Gambar 4.12, Gambar 4.13 dan Gambar 4.14.

Gambar 4.12 Kromatogram Senyawa Hasil Optimasi Metode pada Panjang Gelombang 200 nm

Gambar 4.13 Kromatogram Senyawa Hasil Optimasi Metode pada Panjang Gelombang 220 nm

Gambar 4.14 Kromatogram Senyawa Hasil Optimasi Metode pada Panjang Gelombang 450 nm

4.4 Waktu Retensi

Hasil penentuan waktu retensi menunjukkan bahwa natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* memiliki waktu retensi berbeda-beda yang dapat digunakan sebagai identifikasi masing-masing senyawa untuk analisis selanjutnya. Waktu retensi masing-masing senyawa adalah tartrazin 0,941 menit; natrium sakarin 1,589 menit; natrium siklamat 2,748 menit; *sunset yellow* 3,703 menit; natrium benzoat 5,516 dan kalium sorbat 8,583 menit. Kromatogram waktu retensi masing-masing senyawa baku dapat dilihat pada Lampiran 12, halaman 130 - 131, sedangkan waktu retensi masing-masing senyawa baku dapat dilihat pada Lampiran 13, halaman 132.

Pada sistem KCKT fase terbalik, fase diam bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Waktu retensi memberikan gambaran kepolaran masing-masing senyawa, kepolaran tertinggi dimiliki oleh tartrazin karena terelusi terlebih dahulu, berikutnya adalah natrium sakarin, dilanjutkan oleh natrium siklamat, *sunset yellow*, natrium benzoat dan diakhiri oleh kalium sorbat berdasarkan waktu retensi masing-masing, yaitu: 1,589 menit; 2,748 menit; 3,703 menit; 5,516 dan 8,583 menit.

4.5 Validasi Metode

4.5.1 Linieritas Baku

Kurva linearitas natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, kalium sorbat, tartrazin dan *sunset yellow* dapat dilihat pada Gambar 4.15. Kromatogram *overlay* larutan baku seri dapat dilihat pada Lampiran 14 halaman 133 - 135, sedangkan massa, konsentrasi larutan baku dan hubungan konsentrasi dengan luas area larutan baku seri dapat dilihat pada Lampiran 15, halaman 136.

Gambar 4.15 Kurva Linearitas Natrium Sakarin (▲), Natrium Silkamat (◆), Natrium Benzoat (×), Kalium Sorbat (●), Tartrazin (■) dan *Sunset Yellow* (+)

Linearitas baku dilakukan terhadap sembilan larutan baku seri menunjukkan garis regresi yang baik, karena koefisien korelasi dari keenam senyawa mendekati nilai satu, berada pada kisaran 0,99945 – 0,99999. Hasil menunjukkan adanya korelasi yang baik antara konsentrasi senyawa dengan luas area yang dihasilkan dari sistem KCKT hasil optimasi. Nilai koefisien korelasi (r) merupakan indikator kualitas dari parameter linearitas yang menggambarkan proporsionalitas respon senyawa (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur (Novelina, dkk., 2009).

4.5.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai kepekaan pengukuran akan sama dengan nilai b (*slope*) pada persamaan garis linear, sedangkan simpangan baku residual (Sy/x) menunjukkan simpangan baku blanko (Harmita, 2004). Batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing senyawa dapat dilihat pada Tabel 4.7. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilihat pada Lampiran 16, halaman 137 – 140.

Tabel 4.7 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Masing-Masing Senyawa

No	Senyawa	Batas Deteksi (ppm)	Batas Kuantitasi (ppm)
1	Natrium Sakarin	0,03634	0,12113
2	Kalium Sorbat	0,16542	0,55141
3	Tartrazin	0,14939	0,49795
4	<i>Sunset Yellow</i>	0,19097	0,63655
5	Natrium Benzoat	0,23882	0,79608
6	Natrium Siklamat	2,66306	8,87687

Joseph (2012), menggunakan KCKT 1290 *Infinity* dengan *diode array detector* (Agilent), diperoleh batas deteksi dalam kisaran konsentrasi 0,05 ppm sampai 0,25 ppm pada penetapan dari sepuluh pewarna dalam manisan, termasuk kadar tartrazin dan *sunset yellow*. Alat yang digunakan untuk penelitian sama dan hasil yang diperoleh untuk tartrazin dan *sunset yellow* berada pada rentang yang dilakukan oleh Joseph (2012). Dengan demikian, dapat dinyatakan bahwa metode KCKT yang digunakan memberikan hasil yang cukup sensitif karena mampu mendeteksi senyawa dalam kisaran konsentrasi 0,03634 ppm (natrium sakarin) – 2,66306 ppm (natrium siklamat).

4.5.3 Akurasi

Persentase perolehan kembali masing-masing senyawa dapat dilihat pada Tabel 4.8. Kromatogram akurasi dapat dilihat pada Lampiran 17, halaman 141 – 152. Luas area masing-masing senyawa dalam larutan sirup X dan sirup X ditambah baku dapat dilihat pada Lampiran 18, halaman 153. Contoh perhitungan konsentrasi senyawa dalam sirup X ditambah baku pada Lampiran 19, halaman 154. Contoh perhitungan konsentrasi senyawa dalam sirup X dapat dilihat pada Lampiran 20, halaman 155. Contoh perhitungan konsentrasi sebenarnya yang ditambahkan dalam sirup X dan persen perolehan dapat dilihat pada Lampiran 21, halaman 156. Konsentrasi sebenarnya yang ditambahkan dalam sirup X, konsentrasi senyawa dalam sirup X ditambah baku dan sirup X serta persen perolehan kembali dapat dilihat Lampiran 22, halaman 157.

Tabel 4.8 Persen Perolehan Kembali Masing-Masing Senyawa

No.	Perlakuan Akurasi	Persen Perolehan Kembali					
		Tartrazin	Kalium Sorbat	<i>Sunset Yellow</i>	Natrium Benzoat	Natrium Siklamat	Natrium Sakarin
1	Akurasi 80%	91,20%	94,71%	101,67%	99,98%	108,98%	103,99%
2	Akurasi 100%	92,46%	101,05%	97,69%	99,49%	101,70%	105,78%
3	Akurasi 120%	95,08%	102,53%	105,40%	106,00%	100,09%	107,38%
	Rata-rata	92,92%	99,43%	101,59%	101,82%	103,59%	105,72%

Tabel 4.8 memberikan informasi bahwa kisaran nilai rata-rata persen perolehan kembali adalah 92,92% - 105,72%. Nilai ini masih memenuhi persyaratan untuk kategori kadar senyawa 0,1%; yaitu dengan rentang 90% - 108% (Farrar dan White, 2012). Mayoritas persen perolehan kembali dari penelitian di atas 98%, seperti yang dilakukan oleh peneliti Joseph (2012). Dengan demikian, metode pengujian yang digunakan dapat dinyatakan memiliki tingkat akurasi yang baik, karena berada pada rentang yang diizinkan dan relatif sama dengan peneliti sebelumnya.

4.5.4 Presisi

Uji presisi atau keseksamaan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen (uji ripitabilitas) atau dikerjakan pada kondisi, tempat, peralatan, pereaksi, pelarut atau analis yang berbeda dengan sampel diduga identik (uji reproduksibilitas). Dalam penelitian dilakukan uji presisi meliputi uji ripitabilitas (URI) dan uji reproduksibilitas (URE). Presisi ripitabilitas dan reproduksibilitas metode dapat dilihat pada Tabel 4.9. Kromatogram presisi dapat dilihat pada Lampiran 23, halaman 158 – 169. Contoh perhitungan standar deviasi dan persentase *relative standard deviation* dapat dilihat pada Lampiran 24, halaman 170. Luas area dan hasil perhitungan presisi dapat dilihat pada Lampiran 25, halaman 171.

Tabel 4.9 Presisi Ripitabilitas dan Reproduksibilitas Metode

No	Jenis Presisi	<i>Relative Standard Deviation (%)</i>					
		Natrium Sakarin	Natrium Siklamat	Natrium Benzoat	Kalium Sorbat	Tartrazin	<i>Sunset Yellow</i>
1	URI	0,50	1,53	0,30	0,38	0,11	0,96
2	URE	0,07	1,94	0,04	0,20	0,68	1,30

Uji presisi menunjukkan bahwa sistem KCKT yang digunakan memberikan hasil uji keterulangan metode atau uji ripitabilitas (URI) dan uji ketertiruan metode atau uji reproduksibilitas (URE) memenuhi persyaratan dengan persentase *relative standard deviation* masing-masing lebih kecil dari 3 % dan 6 %, untuk kategori kadar senyawa dalam sampel 0,1% (Farrar dan White, 2012). Kailasam (2010), memperoleh presisi metode dengan persentase *relative standard deviation* dari luas area sakarin, asam benzoat dan asam sorbat masing-masing sebesar 0,16; 0,30 dan 0,40 pada analisis *ultrafast* dan sensitif dari pemanis, pengawet dan flavor dalam minuman non alkohol dengan menggunakan *Agilent 1290 Infinity LC system*. Sistem operasi alat, metode dan analis memiliki

nilai presisi yang baik karena respon relatif konstan sehingga hasil pengukuran memiliki nilai presisi memenuhi syarat dan relatif sama dengan peneliti sebelumnya.

4.5.5 Selektifitas

Uji selektivitas dilakukan dengan membandingkan kromatogram larutan baku, larutan sirup X dan larutan sirup X ditambah baku. Kromatogram *overlay* larutan baku, larutan sirup X dan larutan sirup X ditambah baku pada panjang gelombang 200 nm dapat dilihat pada Gambar 4.16. Kromatogram *overlay* larutan baku, larutan sirup X dan larutan sirup X ditambah baku pada panjang gelombang 220 nm dapat dilihat pada Gambar 4.17. Kromatogram *overlay* larutan baku, larutan sirup X dan larutan sirup X ditambah baku pada panjang gelombang 450 nm dapat dilihat pada Gambar 4.18.

Gambar 4.16 Kromatogram *Overlay* Selektivitas Larutan Baku (—), Sirup X (—) dan Sirup X Ditambah Baku (—) pada Panjang Gelombang 200 nm Menggunakan Metode Hasil Optimasi

Gambar 4.17 Kromatogram *Overlay* Selektivitas Larutan Baku (—), Sirup X (—) dan Sirup X Ditambah Baku (—) pada Panjang Gelombang 200 nm Menggunakan Metode Hasil Optimasi

Gambar 4.18 Kromatogram *Overlay* Selektivitas Larutan Baku (—), Sirup X (—) dan Sirup X Ditambah Baku (—) pada Panjang Gelombang 200 nm Menggunakan Metode Hasil Optimasi

Menurut Harmita (2004), selektivitas dapat dinyatakan dengan kromatogram larutan baku, larutan sampel dan larutan sampel plus baku harus menunjukkan waktu retensi masing-masing senyawa relatif sama.

Uji selektivitas dilakukan dengan cara membandingkan kromatogram larutan baku, sirup X dan sirup X ditambah baku menunjukkan bahwa metode KCKT hasil optimasi yang diperoleh cukup selektif. Hal ini ditandai dengan waktu retensi senyawa yang diperoleh dari larutan baku, sirup X dan sirup X ditambah baku dari setiap senyawa relatif sama.

4.6 Kadar Pemanis, Pengawet dan Pewarna dalam Sampel

Sirup esens yang diuji berjumlah enam sampel yang diberi kode H, I, J, K, L, dan M. Penetapan kadar senyawa dilakukan sesuai dengan metode KCKT hasil optimasi. Setiap sampel dilakukan analisis pengujian sebanyak tiga kali ulangan. Kadar masing-masing senyawa dalam sampel dapat dilihat pada Tabel 4.10. Kromatogram senyawa dalam sampel dapat dilihat pada Lampiran 26, halaman 172 – 189. Luas area masing-masing senyawa dalam sampel dapat dilihat pada Lampiran 27, halaman 190 Contoh perhitungan kadar sampel dapat dilihat pada Lampiran 28, halaman 191.

Kromatogram sampel menunjukkan bahwa puncak serapan senyawa yang diuji (tartrazin, sakarin, siklamat, *sunset yellow*, benzoat, dan sorbat) memberikan pemisahan yang baik (Lampiran 26). Tidak terlihat adanya gangguan (*overlapping*) pada kromatogram masing-masing senyawa dengan zat lain. Walaupun pada setiap sampel yang diuji mengandung matriks dan komponen zat lain. Hal ini menunjukkan bahwa metode pengujian yang digunakan cukup selektif untuk mendeteksi keenam senyawa yang dianalisis.

Tabel 4.10 Kadar Masing-Masing Senyawa dalam Sampel

No	Kode Sampel	Kadar Senyawa dalam Sampel											
		Natrium Sakarin		Natrium Siklamat		Natrium Benzoat		Kalium Sorbat		Tratrazin		Sunset Yellow	
		(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
1	H	494,455	0,049	4144,856	0,415	1615,360	0,162	-	-	41,957	0,004	-	-
2	I	533,990	0,053	5329,890	0,534	702,569	0,070	-	-	60,468	0,006	76,478	0,008
3	J	302,712	0,030	4169,511	0,418	969,975	0,097	-	-	47,218	0,005	84,141	0,009
4	K	217,560	0,022	3786,085	0,379	1379,582	0,138	-	-	62,459	0,006	52,588	0,006
5	L	37,952	0,004	4641,830	0,465	464,456	0,046	-	-	99,894	0,010	31,084	0,003
6	M	56,172	0,006	2753,140	0,276	785,238	0,079	-	-	108,048	0,011	145,399	0,015
Batas Maksimum		500	0,05	1000	0,10	900	0,09	1000	0,10	300	0,03	300	0,03
No. Kategori Pangan		14.1.4.2 ^a		14.1.4.2 ^a		14.1.4.2 ^b		14.1.4 ^b		14.1.4.2 ^c		14.1.4.2 ^c	

Keterangan :

a : BSN, 2004

b : Badan POM RI, 2013a

c : Badan POM RI, 2013b

- : Tidak ditemukan dalam Sampel

14.1.4 : Minuman berbasis air berperisa, termasuk minuman olahraga atau elektrolit dan minuman berpartikel

14.1.4.2 : Minuman berbasis air berperisa tidak berkarbonat, termasuk Punches dan Ades

Kromatogram natrium siklamat, *sunset yellow* dan tartrazin dalam sampel yang dianalisis memiliki puncak serapan yang rendah (Lampiran 22). Hal ini karena absorpsivitas siklamat rendah, tartrazin disebabkan kadarnya dalam sampel sangat kecil. Sedangkan *sunset yellow* disebabkan absorpsitivitas rendah dan kadar dalam sampel sangat kecil. Akan tetapi, kadar ketiga senyawa tersebut masih berada dalam rentang garis regresi.

Kadar natrium sakarin pada Tabel 4.10 menunjukkan bahwa sampel I melanggar aturan batas penggunaan maksimum sebesar 500 mg/kg (BSN, 2004), karena kadar natrium sakarin dari kode sampel I sebesar 533,990 mg/kg. Subani (2008), juga telah menetapkan kadar natrium sakarin dalam campuran dengan natrium benzoat dan kalium sorbat dalam sirup menggunakan KCKT dengan sampel sirup Marquisa Pohon Pisang dan diperoleh kadar sebesar 564 mg/kg, di atas batas penggunaan maksimum sebesar 500 mg/kg (BSN, 2004). Kadar natrium sakarin dari sampel H, J, K, L dan M masing-masing sebesar 494,456 mg/kg; 302,711 mg/kg; 217,560 mg/kg; 37,592 mg/kg dan 56,172 mg/kg masih memenuhi persyaratan karena natrium sakarin yang digunakan tidak lebih dari batas penggunaan maksimum sebesar 500 mg/kg (BSN, 2004).

Wibowotomo (2010), telah mengaplikasikan hasil dari pengembangan metode penetapan kadar siklamat berbasis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi guna diimplementasikan dalam kajian paparan pada sediaan sirup dan diperoleh kadar siklamat sebesar 6.483,17 mg/kg untuk kota Surabaya. Hasil penelitian penetapan kadar natrium siklamat dari semua sampel berada pada rentang 2753,140 mg/kg – 5329,890 mg/kg masih di bawah hasil penelitian dari peneliti Wibowotomo (2010) dan tetap berada di atas batas penggunaan maksimum sebesar 1000 mg/kg (BSN, 2004).

Pengawet yang digunakan pada sirup esens dari semua sampel yang dianalisis adalah natrium benzoat, tanpa kalium sorbat. Kode Sampel H, J dan K diperoleh kadar natrium benzoat masing-masing sebesar 1615,360 mg/kg; 969,975 mg/kg dan 1379,582 mg/kg; berada di atas batas penggunaan maksimum sebesar 900 mg/kg (Badan POM RI, 2013a). Hasil penelitian Subani (2008), menunjukkan hasil relatif sama, diperoleh natrium benzoat tanpa kalium sorbat di atas batas maksimum yang diizinkan, yaitu sebesar 1068 mg/kg. Sementara Sibarani (2010), telah menetapkan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat dalam sirup menggunakan KCKT dengan sampel dari sirup ABC diperoleh kadar natrium benzoat dan kalium sorbat masing-masing 373,1051 mg/kg dan 544,5627 mg/kg. Untuk sampel sirup Marjan diperoleh kadar natrium benzoat dan kalium sorbat masing-masing 377,7965 mg/kg dan 504,8255 mg/kg. Akan tetapi, hasil penelitian penetapan kadar natrium benzoat dari produsen dan produk yang sama dengan kode sampel L dan M masing-masing sebesar 464,456 mg/kg dan 785,240 mg/kg; berada di bawah batas penggunaan maksimum sebesar 900 mg/kg (Badan POM RI, 2013a), tanpa kalium sorbat. Hal ini menunjukkan ada perubahan komposisi dan kadar yang digunakan dalam sirup.

Pewarna yang digunakan pada sirup esens dari semua sampel yang dianalisis adalah tartrazin dan *sunset yellow*, hanya pada sampel H yang tidak mengandung *sunset yellow*. Semua sampel sirup esens memenuhi persyaratan karena tidak melebihi batas penggunaan maksimum sebesar 300 mg/kg (Badan POM RI, 2013b).

Pemanis sintetis natrium sakarin tidak dicantumkan pada label kemasan dari semua sampel, sedangkan natrium siklamat hanya pada sampel H dan I. Pengawet natrium benzoat dan pewarna dicantumkan pada label kemasan untuk semua sampel sirup. Namun tetap melanggar peraturan perundang-undangan Nomor 18

tahun 2012 tentang Pangan dan Peraturan Pemerintah Nomor 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan karena tidak mencantumkan jenis atau massa ataupun kedua-duanya.

Spektrum *overlay* natrium sakarin baku (Sigma Aldrich) dapat dilihat pada Gambar 4.19, spektrum *overlay* natrium siklamat dari salah satu produk yang beredar di pasar kota Medan dapat dilihat pada Gambar 4.20 dan spektrum *overlay* natrium siklamat baku (Sigma Aldrich) dapat dilihat pada Gambar 4.21.

Gambar 4.19 Spektrum *Overlay* Natrium Sakarin Baku (Sigma Aldrich)

Gambar 4.20 Spektrum *Overlay* Natrium Siklamat dari Salah Satu Produk yang Beredar di Pasar Kota Medan.

Gambar 4.21 Spektrum *Overlay* Natrium Siklamat Baku (Sigma Aldrich)

Gambar 4.19 sama dengan Gambar 4.20, tidak sama dengan Gambar 4.21, hal ini menunjukkan bahwa bahan baku natrium siklamat yang beredar di pasar ada yang mengandung natrium sakarin, sehingga jika dalam produksi sirup kurang pengawasan atau tidak dilakukan *quality control* yang baik dapat menyebabkan natrium sakarin lebih dari batas maksimum atau ditemukan keberadaan natrium sakarin di dalam sirup esens walaupun tidak ditambahkan natrium sakarin secara sengaja.

Hasil penelitian dari beberapa peneliti sebelumnya, menunjukkan bahwa aplikasi pengembangan metode penetapan kadar pemanis, pengawet dan pewarna dalam sirup esens secara simultan dengan menggunakan KCKT relatif sama, sehingga metode yang dikembangkan layak digunakan untuk penetapan kadar pemanis, pengawet dan pewarna secara simultan pada sediaan sirup esens.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum hasil optimasi pengembangan metode penetapan kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, tartrazin dan *sunset yellow* secara simultan menggunakan KCKT adalah volume *void* 30%; panjang gelombang 200 nm untuk analisis natrium siklamat, 220 nm untuk analisis natrium sakarin, natrium benzoat dan kalium sorbat serta panjang gelombang 450 nm untuk analisis tartrazin dan *sunset yellow*; komposisi fase gerak buffer fosfat pH 4,5 dan metanol dengan perbandingan 75 : 25 (v/v); suhu kolom 30°C; laju alir 1,0 ml/menit. Hasil optimasi memenuhi persyaratan validasi dan dapat diaplikasikan pada sampel sirup esens.
2. Kadar natrium sakarin dan natrium siklamat dari enam sampel masing-masing berkisar 37,952 mg/kg – 533,990 mg/kg dan 2753,140 mg/kg – 5329,890 mg/kg. Kadar natrium sakarin di dalam sampel I sebesar 533,990 mg/kg, di atas batas penggunaan maksimum sebesar 500 mg/kg (BSN, 2004). Semua sampel mengandung natrium siklamat di atas batas penggunaan maksimum sebesar 1000 mg/kg (BSN, 2004).
3. Keenam sampel sirup esens tidak mengandung kalium sorbat. Rentang kadar natrium benzoat di dalam sampel adalah 464,456 mg/kg – 1615,360 mg/kg, sampel H, J dan K masing-masing sebesar 1379,582 mg/kg; 969,975 mg/kg dan 1615,360 mg/kg; di atas batas penggunaan maksimum sebesar 900 mg/kg (Badan POM RI, 2013a).

4. Keenam sampel sirup esens mengandung tartrazin dan *sunset yellow* masing-masing berkisar 41,957 mg/kg – 108,048 mg/kg dan 31,084 mg/kg – 145,399 mg/kg, di bawah batas penggunaan maksimum sebesar 300 mg/kg (Badan POM RI, 2013b).

5.2 Saran

Metode hasil optimasi dan validasi dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar natrium sakarin, natrium siklamat, natrium benzoat, tartrazin dan *sunset yellow* pada sampel sirup esens, namun masih perlu dilakukan optimasi jenis buffer sebagai fase gerak atau fase gerak organik oleh peneliti yang berbeda untuk matriks sampel yang sama atau berbeda.

Produksi sirup esens perlu dilakukan pengawasan dari pihak terkait dan *quality control* yang lebih baik serta sosialisasi syarat mutu sirup menurut BSN perlu ditingkatkan agar kadar bahan tambahan makanan yang terdapat dalam produk tidak lebih dari batas penggunaan maksimum menurut BSN serta memenuhi syarat mutu sirup menurut BSN.

DAFTAR PUSTAKA

- Alghamdi, A.H., Alghamdi, A.F., dan Alwarthan, A.A. (2005). Determination of Content Levels of Some Food Additives in Beverages Consumed in Riyadh City. *Journal King Saud University*. 18(2): 99 – 109.
- Allam, K.V., dan Kumari, G.P. (2011). Colorants the Cosmetics for the Pharmaceutical Dosege Form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(3): 13-21.
- Ambarsari, I., Qanytah dan Sarjana (2009). Penerapan Standar Penggunaan Pemanis Buatan pada Produk Pangan. *Jurnal Standarisasi*. 11(1): 1-12.
- Angelika, Hüsgen, G., dan Schuster, R. (2001). HPLC for Food Analysis. [diakses 12 Mei 2011]. Dikutip dari: <http://www.metlab.co.uk/img/literature/59883294.pdf>
- Arikunto, S. (2002). *Prosedur Penelitian*. Edisi Revisi V. Jakarta: PT. Rineka Cipta. Hal. 93-101.
- Badan POM RI (2006). *Surat Keputusan Kepala Badan POM RI Nomor: HK.00.05.52.4040 Tentang Kategori Pangan*. Jakarta: Badan POM RI. Hal. 200-203, 267-268.
- Badan POM RI (2013a). *Peraturan Kepala Badan POM RI No. 36 Tahun 2013 Tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pengawet*. Jakarta: Badan POM RI. Hal. 9 - 17.
- Badan POM RI (2013b). *Peraturan Kepala Badan POM RI No. 37 Tahun 2013 Tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pewarna*. Jakarta: Badan POM RI. Hal. 57 – 62.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (2004). *SNI 01-6993-2004 Tentang Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan – Persyaratan Penggunaan dalam Produk Pangan*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-42.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1998). *SNI 01-2984-1998 Tentang Minuman Squash*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-5.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1995a). *SNI 01-0222-1995 Tentang Bahan Tambahan Makanan*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-138.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1995b). *SNI 01-3698-1995 Tentang Sirup Diet Diabetes*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-3.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1994). *SNI 01-3544-1994 Tentang Sirup*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-4.

- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1992a). *SNI 01-2977-1992 Tentang Sirup Maltosa*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-3.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1992b). *SNI 01-2978-1992 Tentang Sirup Glukosa*. [diakses 10 Mei 2011]. Dikutip dari: [http://sisni.bsn.go.id/index.php?sni main/sni/detail sni/3370](http://sisni.bsn.go.id/index.php?sni%2Fmain%2Fsni%2Fdetail%2Fsni%2F3370)
- BSN (Badan Standarisasi Nasional) (1992c). *SNI 01-2985-1992 Tentang Sirup Fruktosa*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal. 1-4.
- Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., dan Zhang, X.M. (2004). *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. Canada: A John Wiley & Sons Inc. Hal. 11-49.
- De Lux, P.E. (2004). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi. Medan: USU digital library. [diakses 20 Oktober 2010]. Dikutip dari: <http://library.usu.ac.id/download/fmipa/farmasi-effendy2.pdf>
- Diacu, E., dan Ene, C.P. (2009). Simultaneous Determination of Tartrazine and Sunset Yellow in Soft Drinks by Liquid Chromatography. *Rev. Chim.* 60(8): 745-749.
- Dong, M.W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Canada: A John Willey & Sons Inc. Hal. 1-13.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009a). Scientific Opinion on the Re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a Food Additive. *EFSA Journal*. 7(11): 1330.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009b). Scientific Opinion on the Re-evaluation Tartrazine (E 102). *EFSA Journal*. 7(11): 1331.
- Ene, C.P., dan Diacu, E. (2009). High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Benzoic Acid in Beverages. *U.P.B. Sci. Bull.* 71(B): 81-88.
- Esfandiari, Z., Badiey, M., Mahmoodian, P., Sarhangpour, R., Yazdani, E., dan Mirlohi, M. (2013). Simultaneous Determination of Sodium Benzoate, Potassium Sorbate and Natamycin Content in Iranian Yoghurt Drink (Doogh) and the Associated Risk of Their Intake Through Doogh Consumption. *Iranian J. Publ. Health*. 42(8): 915 – 920.
- Farrar, J., dan White, D.G. (2012). Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Food Program. [diakses 10 Januari 2012]. Dikutip dari: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM298730.pdf>
- Gautam, D., Sharma, G., dan Goyal, R.P. (2010). Evaluation of Toxic Impact of Tartrazine on Male Swiss Albino Mice. *Pharmacologyonline*. 1(1): 133-140.

- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.E. (1991). *Pengantar Kromatografi*. Edisi 2. Bandung: ITB. Hal. 186-239.
- Gómez, M., Arancibia, V., Rojas, C., dan Nagles, E. (2012). Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Tartrazine and Sunset Yellow in Gelatins and Soft Drink Powder in the Presence of Cetylpyridinium Bromide *Int. J. Electrochem. Sci.* 7: 7493 – 7502.
- Harmita (2005). Amankah Pengawet Makanan Bagi Manusia?. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2(2): 53-54.
- Harmita (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungan. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117–135.
- Hartono, E. (2007). Pengaruh pH pada Penetapan Kadar Natrium Benzoat dalam Sirup Melalui Isolasi dengan Pelarut Eter Secara KCKT. *Pharmacon*. 8(1): 28–33.
- Hayun, Harahap, Y., dan Aziza, C.N. (2004). Penetapan Kadar Sakarin, Asam Benzoat, Asam Sorbat, Kafeina dan Aspartam di dalam Beberapa Minuman Ringan Bersoda Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 148-159.
- Himri, I., Bellahcen, S., Souna, F., Belmekki, F., Aziz, M., Bnouham, M., Zoheir, J., Berkia, Z., Mekhfi, H., dan Saalaoui, E. (2011). A 90 Day Oral Toxicity Study of Tartrazine, A Synthetic Food Dye, in Wistar Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(3): 159-169.
- Huber, L. (1999). Validation of HPLC Methods. *J. BioPharm*. 12(1): 64-66.
- Hussain, I., Zeb, A., dan Ayub, M. (2011). Evaluation of Apple and Apricot Blend Juice Preserved with Sodium Benzoate at Refrigeration Temperature. *World Journal of Agricultural Sciences*. 7(2): 136-142.
- Hussain, I., Zeb, A., dan Ayub, M. (2010). Quality Attributes of Apple and Apricot Blend Juice Preserved with Potassium Sorbate During Storage at Low Temperature. *Journal of Food Safety*. 12(1): 80-86.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (1974). *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principles and of Specifications*. Geneva: FAO and WHO. Hal. 1-40.
- Joseph, S. (2012). Analysis of Color Additives in Sweets. [diakses 12 Maret 2011]. Diambil dari: <http://www.chem-agilent.com/pdf/5990-9525EN.pdf>
- Jurcovan, M.M., Atudosiei, N.L., dan Mihaila, D. (2012). A Simple HPLC Method for Determination of Tartrazine and Sunset Yellow in Soft Drinks Samples. *Bulletin UASVM Agriculture*. 69(2): 267 – 271.

- Kailasam, S. (2010). Ultrafast and Sensitive Analysis of Sweeteners, Preservatives and Flavorants in Nonalcoholic Beverages Using the Agilent 1290 Infinity LC System. [diakses 12 Maret 2011]. Diambil dari: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-5590EN.pdf>
- Khosrokhavar, R., Sadeghzadeh, N., Amini, M., Khansari, M.G., Hajiaghvaei, R., dan Mehr, S.E. (2010). Simultaneous Determination of Preservatives (Sodium Benzoate and Potassium Sorbate) in Soft Drinks and Herbal Extracts Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Medicinal Plants*. 9(35): 80-87.
- Kroger, M., Meister, K., dan Kava, R. (2006). Low-Calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5(1): 35-47.
- Lin, Y.H., Chou, S.S., Sheu, F., dan Shyu, Y.T. (2000). Simultaneous Determination of Sweeteners and Preservatives in Preserved Fruits by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 38(1): 345 - 352.
- Lopez-de-Alba, P.L., Lopez-Martinez, L., Michelini-Rodriguez, L.I., Katarzyna, W., Kazimierz, W., dan Amador, H.J. (1997). Extraction of Sunset Yellow and Tartrazine by Ion Pair Formation With Adogen-464 and Their Simultaneous Determination by Bivariate Calibration and Derivative Spectrophotometry. *Analyst*. 122(1): 1575–1579.
- Matsunaga, A., Yamamoto, A., dan Makino, M. (1985). Simultaneous Determination of Saccharine, Sorbic Acid, Benzoic Acid and Five Ester of p-Hydroxybenzoic Acid in Liquid Foods by Isocratic High Performance Liquid Chromatography. *Esei Kagaku*. 31(4): 269 – 273.
- Nollet, L.M.L. (2000). *Food Analysis by HPLC*. Edisi 2. New York: Marcel Dekker, Inc. Hal. 1-53.
- Novelina, Y.M., Sutanto dan Fatimah, A. (2009). Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Senyawa Siklamat dalam Minuman Ringan. *Prosiding PPI Standarisasi*; 2009; Nov 9; Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Nour, V., Trandafir, I., dan Ionica, M.E. (2009). Simultaneous Determination of Sorbic and Benzoic Acids in Tomato Sauce and Ketchup Using High Performance Liquid Chromatography. *Annals. Food Science and Technology*. 10(1): 157–162.
- Ornaf, R.M., dan Dong, M.W. (2005). Key Concepts of HPLC in Pharmaceutical Analysis. Dalam: *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Edisi 1. Editor: Satinder Ahuja dan Michael W. Dong. New York: Elsevier Inc. Hal. 22-45.

- Oyewole, O.I., Dere, F.A., dan Okoro, O.E. (2012). Sodium Benzoate Mediated Hepatorenal Toxicity in Wistar Rat: Modulatory Effects of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf. *European Journal of Medicinal Plants*. 2(1): 11-18.
- Pavanelli, S.P., Bispo, G.L., Nascentes, C.C., dan Augusti, R. (2011). Degradation of Food Dyes by Zero-Valent Metals Exposed to Ultrasonic Irradiation in Water Medium: Optimization and Electrospray Ionization Mass Spectrometry Monitoring. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22(1): 111 – 119.
- Phomenenx (2005). HPLC Troubleshooting Guid. [diakses: 26 Februari 2013]; <http://www.tecnocroma.pt/novidades/hplc-troubleshooting-guide.pdf>.
- Prado, M.A., Boas, L.F.V., Bronze, M.R., dan Godoy, H.T. (2006). Validation of Methodology for Simultaneous Determination of Synthetic Dyes in Alcoholic Beverages by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1136(1): 231 – 236.
- Pylypiw, H.M., dan Grether, M.T. (2000). Rapid High Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Foods. *Journal of Chromatography A*. 888(1): 299–304.
- Ramakrishnan, S.P., Laskmi J.B., dan Surya P.R. (2011). Estimation of Synthetic Colorant Tartrazine in Foodstuff and Formulations and Effect of Colorant on the Protein Binding of Drugs. *International Journal of Pharmacy & Industrial Research*. 1(2): 141-152.
- Ravichandran, V., Sahlini, S., Sundram, K.M., dan Rajak, H. (2010). Validation of Analytical Methods Strategi & Importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 12(3): 18-22.
- Ree, M., dan Stoa, E. (2011). Simultaneous Determination of Aspartame, Benzoic Acid, Caffeine, and Saccharin in Sugar-Free Beverages Using HPLC. *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*. 2(1): 73-77.
- Reuber, M.D. (1978). Carcinogenicity of Saccharin. *Environmental Health Perspectives*. 25(1): 173-200.
- Rismana, E., dan Paryanto, I. (2007). Beberapa Bahan Pemanis Alternatif yang Aman. [diakses 10 Januari 2012]. Diambil dari: <http://gula-aren.blogspot.com/2007/07/beberapa-bahan-pemanis-alternatif-yang.html>
- Roberts M.W., dan Wright, J.T. (2012). Nonnutritive, Low Caloric Substitutes for Food Sugars: Clinical Implications for Addressing the Incidence of Dental Caries and Overweight. *International Journal of Dentistry*. 1(1): 1-8.

- Rus, V., Gherman, C., Miclaus, V., Mihalca, A., dan Nadas, G.C. (2010). Comparative Toxicity of Food Dyes on Liver and Kidney in Guinea Pigs: A Histopathological Study. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 15(1): 161-165.
- Satuhu, S. (1994). *Penanganan dan Pengolahan Buah*. Jakarta: PT Penebar Swadaya. Hal. 9-52.
- Serdar, M., dan Knezevic, Z. (2011). Determination of Artificial Sweeteners in Beverages and Special Nutritional Products Using High Performance Liquid Chromatography. *Arh. Hig. Rada Toksikol*. 62(1): 169-173.
- Shimadzu (2007). Analysis of Artificial Colorant. [diakses 12 Mei 2012]. Diambil dari: https://solutions.shimadzu.co.jp/an/s/en/lcms/24_artificial_colorant_uflc_appn_datasheetno_24.pdf
- Sibarani, M. (2010). Optimasi Fase Gerak Metanol-Dapar Fosfat dan Laju Alir pada Penetapan Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat dalam Sirup dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Skripsi*. Medan: Fakultas Farmasi USU.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., dan Dolan, J.W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Edisi 3. New York: A John Willey & Sons Inc. Hal. 20-83, 532-542, 887-890.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., dan Glajch, J.L. (1997). *Practical HPLC Method Development*. Edisi 2. New York: A John Willey & Sons Inc. Hal. 21-97.
- Snyder, L.R., dan Kirkland, J.J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Edisi 2. New York: A John Willey & Sons Inc. Hal. 16-165.
- Subani (2008). Penentuan Kadar Natrium Benzoat, Kalium Sorbat dan Natrium Sakarin dalam Sirup dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) di Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan Medan. *Skripsi*. Medan: Fakultas Farmasi USU.
- Tfouni, S.A.V., dan Toledo, M.C.F. (2002). Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Brazilian Food. *Food Control*. 13(1): 117 – 123.
- Vachirapatama, N., Mahajaroensiri, J., dan Visessanguan, W. (2008). Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks on Monolithic C₁₈ Column by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 16(5): 77-82.
- Varelis, P. (2008). Advances in High Performance Liquid Chromatography and Its Application to the Analysis of Foods and Beverages. Dalam: *Handbook of Food Analysis Instruments*. Editor: Semih Otles. London: CRC Press. Hal. 105-115.

- Veni, N.K., Menyyanathan, S.N., Babu, B.N., Sharma, A.K., Srikanth, B.A., Satyam A.B., dan Sureh, B. (2011). Simultaneous Estimation of Colorants Sunset Yellow and Tartrazine in Food Products by RP HPLC, *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2(4): 545-549.
- Wibowotomo, B. (2008). Pengembangan Metode Penetapan Kadar Siklamat Berbasis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Guna Diimplementasikan dalam Kajian Paparan. *Tesis*. Bogor: IPB.
- Windholz, M., Budavari, S., Stroumstos, L.Y., dan Fertig, M.N. (1983). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals*. Edisi 9. New Jersey: Merck and Co. Inc. Hal. 352, 545, 575, 1107, 1149, 1175, 8492, 8830.
- Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D., dan Sporns, P. (2005). *Handbook of Food Analytical Chemistry*. Canada: A John Willey & Sons Inc. Hal. 647-669.
- Xiao, T.J., Guo, S.C., Ling, L.J., dan Yan, L.Z. (2011). Simultaneous HPLC Determination of 6 Sweeteners. *Analysis Detected Food Science*. 32(6): 165-168.
- Zatar, N.A. (2007). Simultan Determination of Seven Synthetic Water Soluble Food Colorants by Ion Pair Reversed Phase HPLC. *Journal Food and Technology*. 5(3): 220-224.
- Zhihong, L., dan Yanchun, Y. (1999). A Rapid Separation and Quantitation of Sodium Cyclamate in Food by Ion Pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*. 17(3): 278 – 279.
- Zygler, A., Wasik, Wasik, A.K., dan Namiesnik, J. (2011). Determination of Nine High Intensity Sweeteners in Various Foods by High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400(1): 2159–2172.