

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk margarin dan mentega yang diperdagangkan dengan jenis kemasan plastik yang berbeda. Sampel ditimbang sebanyak 50 g dan selanjutnya dilelehkan agar mencair. Margarin cair yang diperoleh kemudian diambil bagian minyaknya saja dan kemudian diisolasi dengan cara kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan dalam kromatografi kolom ini adalah magnesium silika atau yang lebih dikenal dengan nama dagang florisil. Pemilihan florisil sebagai fase diam dalam kromatografi kolom ini karena florisil memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dari silika biasa, sehingga cocok untuk menahan DBP yang memiliki tingkat kepolaran yang tidak terlalu tinggi.

Dalam proses isolasi, pertama kolom dipre-elusi menggunakan heksan. Setelah pre-elusi selesai, sebanyak 2 mL atau 1,7 g sampel dimasukkan kemudian dicuci menggunakan heksan untuk menarik senyawa-senyawa non-polar, DBP sebagai analit yang akan diperiksa tidak ikut terelusi disini karena sifatnya yang sedikit polar sehingga akan tertahan pada fase diamnya. Kemudian kolom dielusi kembali dengan campuran eluen dietileter:heksan (20:80) untuk menarik DBP yang tertahan pada fase diam. Eluat yang didapat kemudian diuapkan hingga diperoleh residu kering, lalu dilarutkan kembali dalam asetonitril sebanyak 30 mL.

## 5.2. Optimasi Sistem KCKT

Untuk memperoleh metode analisis menggunakan KCKT yang baik maka perlu dilakukan optimasi kondisi sistem KCKT-nya terlebih dahulu. Kondisi sistem yang dioptimasi adalah tipe elusi dan komposisi eluennya, sementara kondisi sistem yang lainnya merujuk pada jurnal-jurnal penelitian Zhiyong Gua, dkk., kondisi sistem tersebut yaitu kolom C-18, eluen air : asetronitril, deteksi absorbansi UV pada 230 nm dan laju alir 1 mL/menit.

Tipe elusi yang dicoba pertama yaitu tipe elusi isokratik dimana komposisi eluen yang digunakan adalah air : asetronitril (30:70), (25:75), (20:80), (15:85). Kemudian dicoba juga tipe elusi gradien dengan setting linier 75-80% asetronitril selama 2 menit, 80-85% asetronitril selama 3 menit, 85-90% asetronitril selama 2 menit, 90-100% asetronitril selama 3 menit, kembali ke komposisi awal selama 2 menit lalu tahan selama 3 menit. Dari hasil yang didapatkan, pengujian standar dengan menggunakan tipe elusi isokratik memberikan hasil kromatogram yang lebih jelas dari tipe elusi gradien namun pada pengujian sampel tipe elusi gradien mampu melakukan pemisahan yang lebih baik dari tipe elusi isokratik. Sehingga diputuskan tipe elusi gradien dengan *setting* yang telah disebutkan sebagai kondisi sistem yang digunakan untuk metode analisis ini. Kondisi akhir sistem KCKT yang digunakan dapat dilihat pada tabel V.1. Puncak DBP dengan menggunakan tipe elusi gradien muncul pada waktu retensi 8,1 menit pada standar sementara untuk sampel muncul

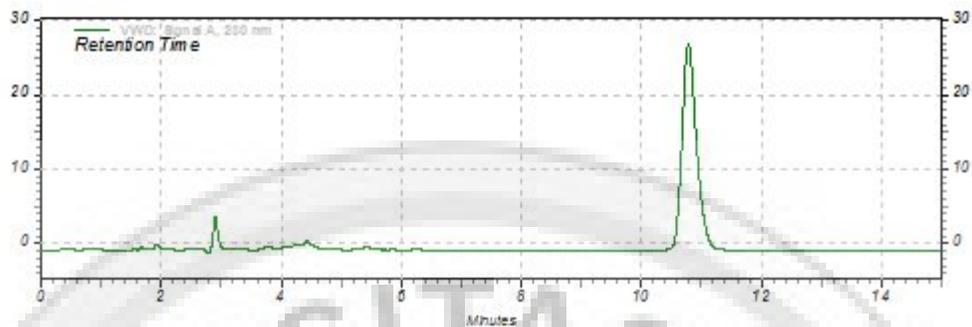
pada waktu retensi antara 8,1-8,2 menit. Perbandingan kromatogram dengan tipe elusi isokratik dan gradien pada standar dan sampel dapat dilihat pada gambar V.1. hingga V.7.

**Tabel V.1. Kondisi sistem KCKT yang digunakan.**

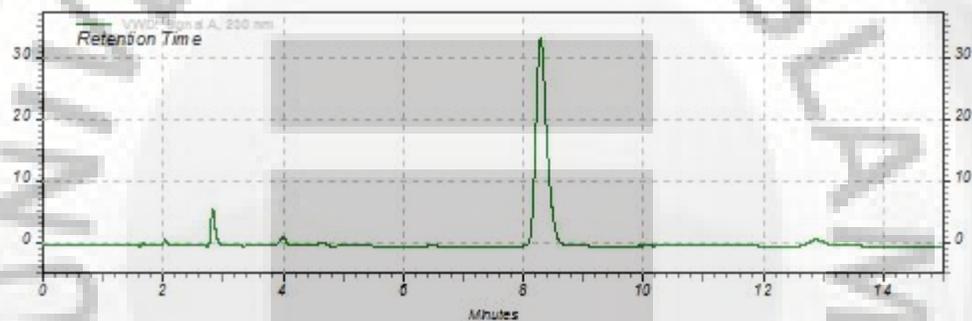
Kondisi	
Kolom	Zorbax SB-C18 4.6 x 250 mm 5 –Micront
Fase Gerak	A. Aquabides B. Asetonitril
Gradien	0-2 min, B: 75-80%; 2-5 min, B: 80-85%; 5-7 min, B: 85-90%; 7-10 min, B: 90-100%; 10-12 min, B: 100-75%; 12-15 min, B:75%
Laju Alir	1 mL/min
Deteksi	UV pada absorbansi 230 nm



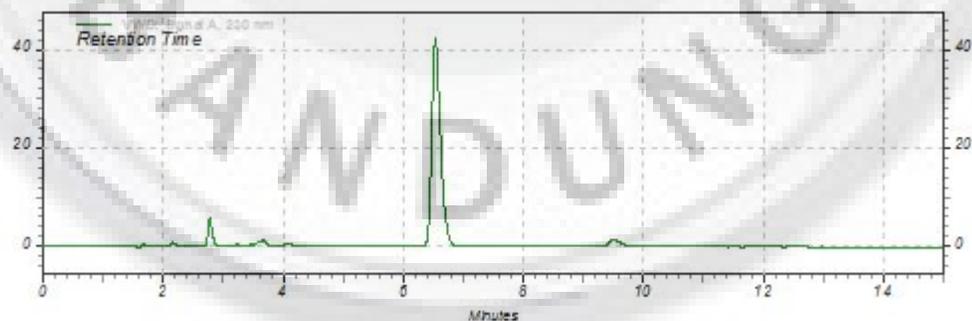
**Gambar V.1. Kromatogram standar dengan tipe elusi isokratik air:asetonitril (30:70)**



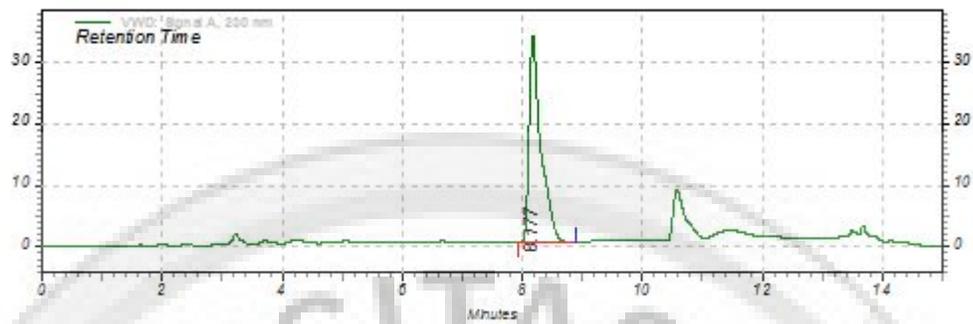
Gambar V.2. Kromatogram standar dengan tipe elusi isokratik air:asetonitril (25:75)



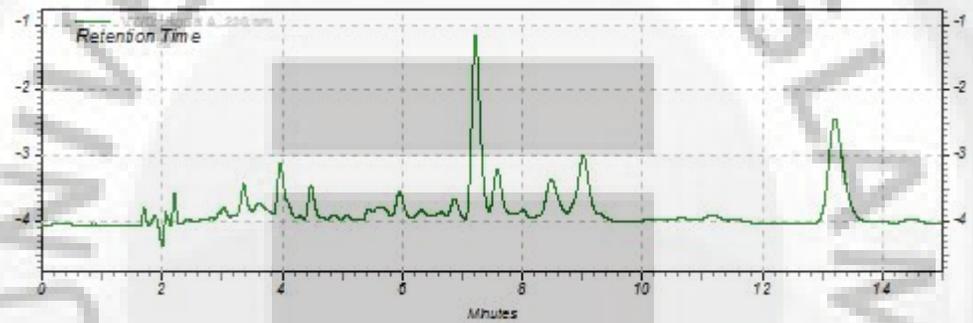
Gambar V.3. Kromatogram standar dengan tipe elusi isokratik air:asetonitril (20:80)



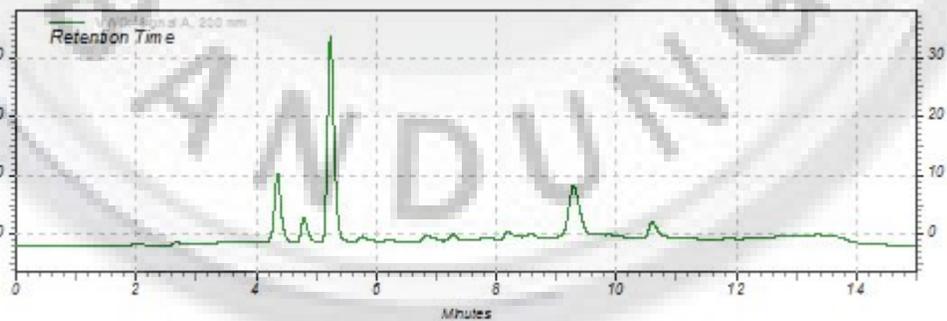
Gambar V.4. Kromatogram standar dengan tipe elusi isokratik air:asetonitril (15:85)



Gambar V.5. Kromatogram standar dengan tipe elusi gradien



Gambar V.6. Kromatogram sampel dengan tipe elusi isokratik air:asetonitril (20:80)



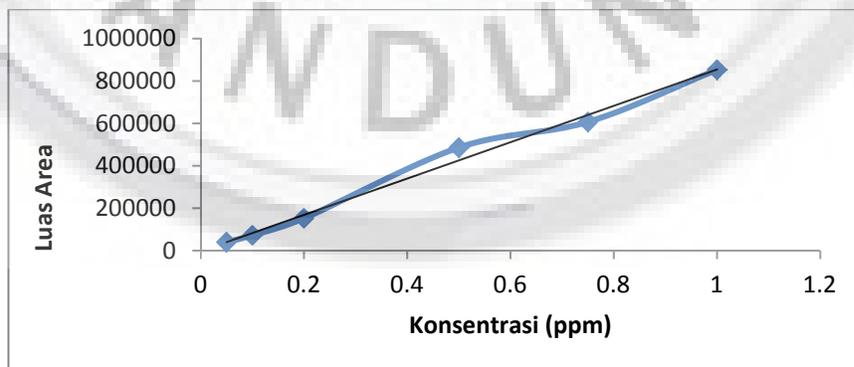
Gambar V.7. Kromatogram sampel dengan tipe elusi gradien

### 5.3. Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Dalam upaya mengembangkan suatu metode, validasi merupakan hal yang wajib dilakukan untuk membuktikan bahwa metode yang telah dikembangkan tersebut sesuai dengan tujuan penggunaannya dan dapat dipergunakan.

#### 5.3.1. Linearitas

Persyaratan dapat diterimanya data linearitas untuk validasi metode pengujian cemaran yaitu jika memenuhi nilai koefisien korelasi ( $r$ ) lebih besar atau sama dengan 0,98. Kurva linearitas diperoleh dari hubungan antara konsentrasi dengan luas area analit yang diperoleh dari kromatogram. Persamaan yang diperoleh dari kurva linearitas adalah  $y = 857527x - 2845,64$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,995. Rentang konsentrasi DBP yang diujikan antara 0,05 hingga 1 ppm. Kurva linearitas ditunjukkan pada gambar V.8.



Gambar V.8. Kurva linearitas antara konsentrasi (ppm) dengan luas area

Dari data tersebut menunjukkan linearitas yang baik dimana koefisien korelasi yang diperoleh telah memenuhi persyaratan. Pengolahan data uji linearitas dapat dilihat pada Lampiran 3.

Dalam Harmita (2004) disebutkan juga parameter lain yang dapat digunakan untuk menggambarkan kelinieran suatu kurva yaitu koefisien variansi fungsi ( $V_{x0}$ ). Syarat penerimaan linearitas yang baik adalah jika  $V_{x0}$  tidak lebih dari 5,0%. Koefisien variansi fungsi diperoleh dari menghitung nilai simpangan baku residual ( $Sy/x$ ) dari persamaan regresi yang didapatkan. Nilai ini digunakan untuk memperkuat kelinieran suatu metode bila nilai koefisien korelasinya lebih rendah dari yang seharusnya. Nilai koefisien variansi fungsi untuk analisis DBP ini adalah 9,6%. Walaupun nilai koefisien variansi yang diperoleh lebih tinggi dari yang seharusnya, namun nilai koefisien korelasi dari uji linearitas ini telah memenuhi syarat.

### **5.3.2. *Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantitation (LOQ)***

Batas deteksi (LOD) dari suatu prosedur adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak harus secara kuantitatif sebagai nilai yang pasti, sedangkan batas kuantitasi (LOQ) dari suatu prosedur analitis adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang sesuai (Bliesner, 2006).

Menurut Harmita (2004), batas deteksi dan kuantitasi juga dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan terlebih dahulu

menghitung nilai simpangan baku residualnya. Nilai LOD dan LOQ dari analisis DBP ini yaitu 0,125 ppm untuk LOD dan 0,416 ppm untuk LOQ. Data perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada Lampiran 4. Berdasarkan survey yang dilakukan Cao (2010), untuk analisis ftalat pada sampel bahan makanan berlemak batas deteksinya berada pada tingkat ppm dan subppm.

### 5.3.3. Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis yang diperoleh dengan kadar analit yang sebenarnya (Harmita, 2004). Dalam Chan (2004) kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) dari jumlah analit yang ditambahkan.

Pengujian dilakukan dengan membuat larutan adisi dengan konsentrasi 0,1 ppm sebagai kadar rendah, 0,2 ppm sebagai kadar sedang dan 0,5 ppm sebagai kadar tinggi. Pemilihan konsentrasi didasarkan pada konsentrasi standar yang digunakan pada pengujian parameter linearitas.

Kriteria kecermatan sangat tergantung pada konsentrasi analit dalam matriks sampel. Nilai rata-rata persentase perolehan kembali harus berada dalam rentang berdasarkan Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (2004).

Nilai rata-rata perolehan kembali pada analisis DBP untuk konsentrasi 0,1; 0,2; 0,5 berturut-turut adalah sebesar 87,31%, 95,86%, dan 115,14%. Pengolahan data uji akurasi dapat dilihat pada lampiran 5. Maka berdasarkan rentang penerimaan

menurut APVMA (2004), hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kecermatan memenuhi syarat dalam rentang 75-125%.

#### **5.3.4. Kesseksamaan (*Precision*)**

Kesseksamaan menunjukan derajat kedekatan antara hasil pengujian individu yang diterapkan secara berulang-ulang. Derajat kedekatan tersebut ditunjukkan oleh nilai *Relative Standard Deviation* (RSD). Menurut Harmita (2004) Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium.

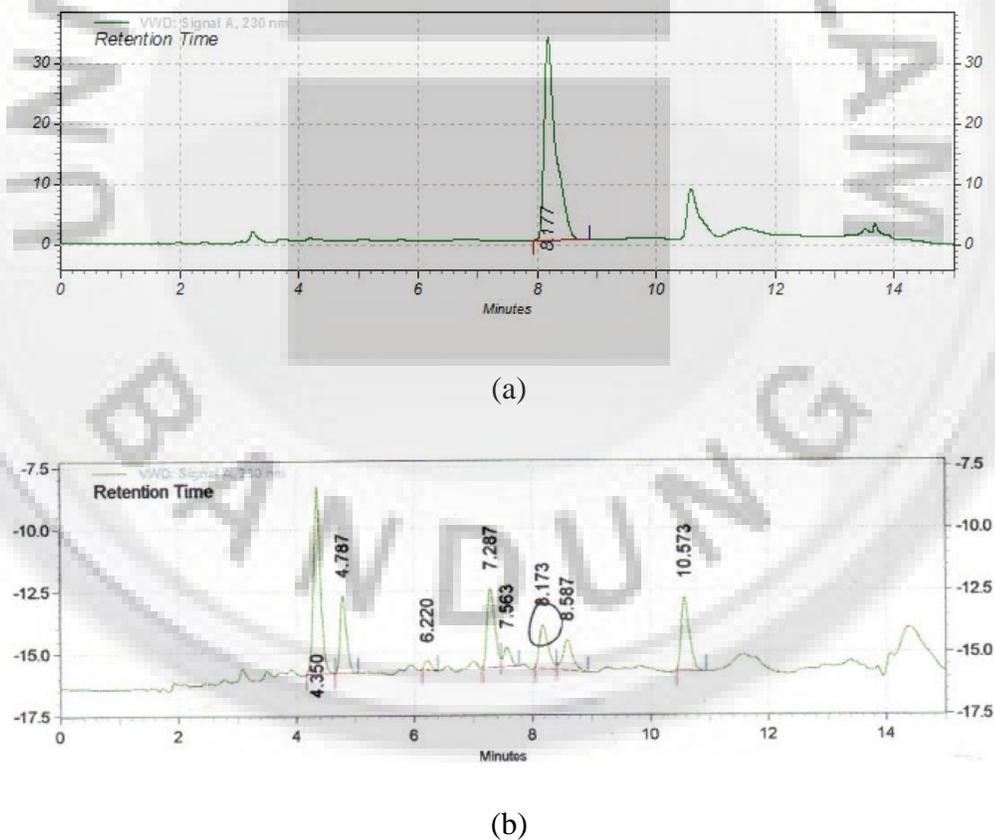
Pengujian ini dilakukan untuk melihat kesseksamaan instrumen terhadap sampel. Pengujian dilakukan dengan menyuntikan larutan sampel adisi dengan konsentrasi 0,2 ppm sebanyak 6 kali kedalam alat KCKT.

Pengujian kesseksamaan metode pada analisis DBP menghasilkan nilai persentase RSD sebesar 1,31%. Pengolahan data uji presisi dapat dilihat pada lampiran 6. Maka berdasarkan rentang penerimaan menurut APVMA (2004) uji kesseksamaan ini memenuhi syarat untuk menyatakan bahwa metode yang digunakan dalam analisis ini dapat menghasilkan keterulangan yang stabil.

#### **5.3.5. Spesifisitas**

Spesifitas adalah kemampuan untuk mengukur secara akurat suatu analit dengan adanya gangguan dari komponen yang dapat diharapkan untuk ada seperti pengotor, hasil degradasi, dan bahan tambahan (Bliesner, 2006). Pada Harmita (2004)

dijelaskan bahwa pada uji spesifisitas, hasil kromatogram standar dan sampel harus menunjukkan waktu retensi yang sama dan pada daerah sekitar waktu retensi tidak boleh ada gangguan yang dapat dilihat dari kromatogram larutan blanko. Gambar V.9. menunjukkan tampilan DBP pada kromatogram. Untuk mengetahui apakah waktu retensi menunjukkan waktu yang sama, dapat dilihat dari nilai RSD waktu retensi pada data presisi dimana syaratnya yaitu  $RSD < 2\%$ . Dari hasil pengolahan data waktu retensi, diperoleh nilai RSD yaitu 0,155 yang berarti hasil tersebut memenuhi persyaratan. Pengolahan data uji spesifitas dapat dilihat pada lampiran 7.



Gambar V.9. Kromatogram (a) standar DBP 10 ppm, (b) sampel

#### 5.4. Pengujian Sampel

Setelah dilakukan validasi terhadap metode dan terbukti kevalidannya, kemudian dilakukan pengujian kuantitatif terhadap sampel margarin dan mentega menggunakan metode tersebut. Daftar sampel yang digunakan dapat dilihat pada tabel V.2.

**Tabel V.2. Daftar sampel yang digunakan**

Sampel	Jenis	Kemasan
A	Margarin	Plastik kode 05 (PP)
B	Margarin	Plastik kode 07 (Other)
C	Mentega	Plastik Wrap

Sampel A merupakan produk margarin kemasan cup plastik dengan kode 05 yang berarti kemasan tersebut berbahan Polypropylene (PP), sedangkan sampel B merupakan produk margarin kemasan sachet plastik dengan kode 7 (Other). Kemasan plastik dengan kode 07 dapat terbuat dari bahan Polycarbonat, *bio-based plastic*, *co-polyester*, *acrylic*, *polyamide*, atau campuran plastik. Dan sampel C merupakan produk mentega kiloan yang dikemas dengan film plastik bening.

Dari hasil pengujian didapatkan bahwa semua sampel mengandung DBP dengan konsentrasi sebesar 4,13 ppm untuk sampel A; 6,25 ppm untuk sampel B; dan 1,15 ppm untuk sampel C. Pengolahan data uji spesifitas dapat dilihat pada lampiran 8. Dalam Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 03.1.23.07.11.6664 tahun 2011 tentang Pengawasan Kemasan Pangan, dinyatakan bahwa DBP merupakan zat kontak pangan yang diizinkan digunakan

sebagai kemasan pangan dengan persyaratan batas migrasi sebesar 0,3 ppm. Berdasarkan peraturan tersebut maka ketiga produk yang diuji mengandung DBP yang telah melewati batas migrasinya. Sumber DBP yang bermigrasi dari kemasan ke makanan tidak hanya berasal dari bahan plastik pengemasnya saja, namun menurut Cao (2010) juga dapat berasal dari tinta yang digunakan untuk mencetak tulisan atau gambar di permukaan luar kemasan. Sehingga, kandungan DBP yang lebih tinggi pada sampel A dan B bisa juga karena berasal dari tinta yang digunakan untuk mencetak tulisan dan gambar pada kemasannya karena pada sampel C kemasan yg digunakan tidak terdapat cetakan tulisan maupun gambar.