

## **BAB I**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **1.1 Bahan Tambahan Pangan (BTP)**

##### **1.1.1. Definisi Bahan Tambahan Pangan (BTP)**

Pengertian bahan tambahan pangan secara umum adalah bahan yang biasanya tidak digunakan sebagai makanan dan biasanya bukan merupakan komponen khas makanan, mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi, yang dengan sengaja ditambahkan kedalam makanan untuk maksud teknologi pada pembuatan, pengolahan, penyiapan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, dan penyimpanan (Cahyadi, 2006).

Peraturan pemerintah nomor 28 tahun 2004 tentang keamanan, mutu, dan gizi pangan pada bab 1 pasal 1 menyebutkan, yang dimaksud dengan bahan tambahan pangan adalah bahan yang ditambahkan kedalam makanan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan atau produk pangan.

##### **1.1.2. Penggolongan Bahan Tambahan Pangan**

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 722/MENKES/PER/IX/88 terhadap bahan tambahan makanan terdiri dari dua golongan yaitu, bahan tambahan makanan yang diizinkan dan bahan tambahan makanan yang tidak diizinkan (SNI 01-0222, 1995).

Filename: Bab Ia  
Directory: F:\sidang  
Template: C:\Users\user\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: DELL  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 1/26/2014 4:12:00 PM  
Change Number: 3  
Last Saved On: 6/22/2015 2:27:00 PM  
Last Saved By: DELL  
Total Editing Time: 1 Minute  
Last Printed On: 7/7/2015 3:42:00 PM  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 1  
Number of Words: 153 (approx.)  
Number of Characters: 875 (approx.)



**Tabel I.1.** Penggolongan Bahan Tambah Pangan (SNI 01-0222, 1995)

Bahan tambahan yang diizinkan	Bahan tambahan yang tidak diizinkan
Antioksidan	Boraks
Antikempal	Formalin
Pengatur keasaman	Minyak nabati yang dibrominasi
Pemanis buatan	Kloramfenikol
Pemutih dan pematang tepung	Kalium klorat
Pengemulsi, pemantap, pengental	Dietil pirokarbonat
Pengeras	Nitrofurazon
Pengawet	P-Phenetilkarbamida
Pewarna	Asam salisilat dan garamnya

## 1.2. Zat Pemanis

### 1.2.1. Pemanis Sintetis

Zat pemanis sintesis merupakan zat yang dapat menimbulkan rasa manis atau dapat membantu mempertajam penerimaan terhadap rasa manis tersebut, sedangkan kalori yang dihasilkannya jauh lebih rendah daripada gula (Winarno, 1997).

Rasa manis dihasilkan oleh berbagai senyawa organik, termasuk alkohol, glikol, gula, dan turunan gula. Sukrosa adalah bahan pemanis pertama yang digunakan secara komersial karena pengusahaannya paling ekonomis. Sekarang telah banyak diketahui bahwa bahan alami maupun sintetis mempunyai rasa manis. Bahan pemanis tersebut termasuk karbohidrat, protein, maupun senyawa sintetis yang bermolekul sederhana dan tidak mengandung kalori seperti bahan pemanis alami.

Bahan pemanis sintetis adalah hasil rekaan manusia, karena itu bahan pemanis tersebut tidak terdapat di alam (Cahyadi, 2006).

Perkembangan industri pangan dan minuman kebutuhan pemanis dari tahun ke tahun semakin meningkat. Industri pangan dan minuman lebih menyukai menggunakan pemanis sintetis karena selain harganya relatif lebih murah, tingkat kemanisan pemanis sintetis jauh lebih tinggi dari pemanis alami. Hal tersebut mengakibatkan terus meningkatnya penggunaan pemanis sintetis terutama sakarin dan siklambat. Peningkatan penggunaan bahan pemanis di Indonesia untuk industri pangan dan minuman diperhitungkan dengan melihat perkembangan produksi pangan dan minuman jadi dan perkembangan pemakaian gula pasir sebagai bahan baku utama oleh industri tersebut (Cahyadi,2006).

### **1.2.2. Jenis Pemanis**

Berdasarkan keputusan BPOM RI No. HK.00 05 233644 mengenai ketentuan pokok pengawasan suplemen makanan, pemanis buatan yang diizinkan penggunaannya di antara alitam, asesulfame-K, aspartam, laktitol, malitol, manitol, neotam, sakarin, siklambat, silitol, sorbitol, dan sukralosa. Penetapan batas maksimum penggunaan pemanis buatan ditempatkan dalam kategori pangan *Codex Alimentarius Commission* (CAC), didasarkan atas pertimbangan bahwa kategori pangan sistem CAC ini telah dikenal dan digunakan sebagai acuan internasional oleh banyak negara dalam komunikasi pedagangannya (BSN,2004).

### 1.2.3. Hubungan Struktur dan Rasa Manis

Konsep adanya empat rasa pokok (manis, asin, pahit, dan asam) sebenarnya hanya penyederhanaan supaya praktis. Rangsangan yang diterima oleh otak karena rangsangan elektrik yang diteruskan dari sel perasa sebetulnya sangat kompleks. Rasa asin terutama disebabkan oleh rangsangan ion-ion positif (kation) bahan kimia, sedangkan rasa asam oleh ion-ion negatif (anion) bahan kimia pada reseptor rasa. Tetapi, tidak ada kelompok bahan kimia tertentu yang menyebabkan rasa manis, meskipun telah diketahui bahwa struktur molekul sederhana kelompok senyawa-senyawa gula yang terbentuk tertutup sangat merangsang rasa manis (Cahyadi,2006).

### 1.2.4. Tujuan Penggunaan Pemanis Buatan

Pemanis ditambahkan ke dalam bahan pangan mempunyai beberapa tujuan di antaranya sebagai berikut (Cahyadi, 2006) :

- a. Sebagai pangan bagi penderita diabetes mellitus karena tidak menimbulkan kelebihan gula darah. Pada penderita diabetes mellitus disarankan menggunakan pemanis sintetis untuk menghindari bahaya gula. Dari tahun 1955 sampai 1966 digunakan campuran siklamat dan sakarin pada pangan dan minuman bagi penderita diabetes.
- b. Memenuhi kebutuhan kalori rendah untuk penderita kegemukan. Kegemukan merupakan salah satu faktor penyakit jantung yang merupakan penyebab utama kematian. Untuk orang yang kurang aktif secara fisik disarankan untuk mengurangi masukan kalori per harinya. Pemanis sintetis merupakan salah satu bahan pangan untuk mengurangi masukan kalori.

- c. Sebagai penyalut obat. Beberapa obat mempunyai rasa yang tidak menyenangkan, karena itu untuk menutupi rasa yang tidak enak dari obat tersebut biasanya dibuat tablet yang bersalut. Pemanis lebih sering digunakan untuk menyalut obat karena umumnya bersifat higroskopis dan tidak menggumpal.
- d. Menghindari kerusakan gigi. Pada pangan seperti permen lebih sering ditambahkan pemanis sintetis karena bahan permen ini mempunyai rasa manis yang lebih tinggi dari gula, pemakaian dalam jumlah sedikit saja sudah menimbulkan rasa manis yang diperlukan sehingga tidak merusak gigi.
- e. Pada industri pangan, minuman, termasuk industri rokok, pemanis sintetis dipergunakan dengan tujuan untuk menekan biaya produksi, karena pemanis sintetis ini selain mempunyai tingkat rasa manis yang lebih tinggi juga harganya relatif murah dibandingkan dengan gula yang diproduksi di alam.

#### **1.2.5. Persyaratan dan Efek terhadap Kesehatan**

Di Indonesia penggunaan bahan tambahan pangan pemanis, baik jenis maupun jumlahnya diatur dengan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 722/Menkes/Per/IX/88. Menurut Permenkes tersebut, pemanis pada pangan yang tidak atau hampir tidak mempunyai gizi. Bahan pemanis sintetis yang diperbolehkan menurut Permenkes Nomor 722 adalah sakarin, aspartam, siklamat, dan sorbitol (Cahyadi, 2006).

**Tabel I.2** Bahan Pemanis Sintetis yang Diizinkan Sesuai Peraturan (Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 208/Menkes/Per/IV/1985)

Nama Pemanis Sintetis	ADI	Jenis Bahan Makanan	Batas Maksimal Penggunaan
Aspartam *)	0-40 mg	-	-
Sakarin (serta garam Natrium)	0-2,5 mg	Makanan berkalori rendah : a. Permen karet b. Permen c. Saus d. Es Lilin e. Jem dan Jeli f. Minuman ringan g. Minuman yoghurt h. Es krim dan sejenisnya i. Minuman ringan terfermentasi	50 mg/kg (Sakarin) 100 mg/kg (Na-Sakarin) 300 mg/kg (Na-Sakarin) 300 mg/kg (Na-Sakarin) 200 mg/kg (Na-Sakarin) 300 mg/kg (Na-Sakarin) 300 mg/kg (Na-Sakarin) 200 mg/kg (Na-Sakarin) 50 mg/kg (Sakarin)
Siklamat (serta garam Natrium dan garam Kalsium)		Makanan berkalori rendah : a. Permen karet b. Permen c. Saus d. Es krim dan sejenisnya e. Es lilin E. Jem dan Jeli F. Minuman ringan G. Minuman yoghurt H. Minuman ringan terfermentasi	500 mg/kg dihitung sebagai asam siklamat 1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 3 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 2 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat 1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat

Keterangan : \*) Hanya dalam bentuk sediaan

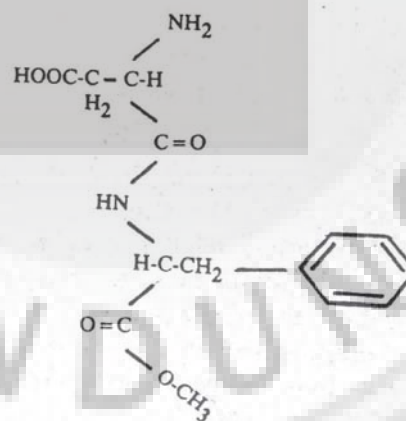
### 1.2.6. Ketentuan Label Pemanis Buatan pada Pangan

Label pemanis buatan baik dalam sediaan maupun dalam produk olahan harus memenuhi ketentuan Peraturan Pemerintah Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan. Produk pangan yang menggunakan pemanis buatan harus mencantumkan jenis dan jumlah pemanis buatan dalam komposisi bahan atau daftar bahan pada label. Pemanis buatan dalam bentuk sediaan, pada label harus mencantumkan :

- a. Nama pemanis buatan;
- b. Jumlah pemanis buatan dalam bentuk tablet dinyatakan dengan miligram dan dalam bentuk granul atau serbuk dinyatakan dengan miligram dalam kemasan sekali pakai;
- c. ADI (*Acceptable Daily Intake*);
- d. Kata peringatan : tidak digunakan untuk bahan yang akan dimasak atau dipanggang.

#### 1.4. Aspartam

Aspartam adalah senyawa metil ester dipeptida, yaitu L-aspartil-L-alanin-metilester dengan rumus  $C_{14}H_{16}N_2O_5$  memiliki daya kemanisan 100-200 kali sukrosa (Cahyadi, 2006).



Gambar 1.1 Struktur Kimiawi Aspartam (Cahyadi, 2006)



Aspartam yang dikenal dengan nama dagang *equal*, merupakan salah satu bahan tambahan pangan yang telah melalui berbagai uji yang mendalam dan menyeluruh aman bagi penderita diabetes mellitus. Pada penggunaan minuman ringan, aspartam kurang menguntungkan karena penyimpanan dalam waktu lama akan mengakibatkan turunnya rasa manis. Selain itu, aspartam tidak tahan panas sehingga tidak baik digunakan dalam bahan pangan yang diolah melalui pemanasan (Cahyadi, 2006).

Aspartam tersusun oleh asam amino, sehingga di dalam tubuh akan mengalami metabolisme seperti halnya asam amino pada umumnya. Bagi penyakit keturunan yang berhubungan dengan kelemahan mental (phenil keton urea/PKU) dilarang untuk mengonsumsi aspartam karena adanya fenilalanin yang tidak dapat dimetabolisme oleh penyakit tersebut. Kelebihan fenilalanin dalam tubuh penderita PKU diduga dapat menyebabkan kerusakan otak dan pada akhirnya akan mengakibatkan cacat mental (Cahyadi, 2006).

Mengacu pada asam amino pembentuk aspartam maka aspartam bukanlah termasuk suatu bahan pemanis nonkalori seperti protein, aspartam dimetabolisme menjadi asam amino-asam amino penyusunnya dan memiliki nilai energi 4 kkal/g. tetapi, karena dalam penggunaannya 100 g sukrosa dapat diganti dengan 1 g aspartam maka dapat dikatakan bahwa aspartam merupakan bahan pemanis nonkalori (Marie and Piggott, 1991).

Aspartam terurai menjadi 2 asam amino dan metanol. Asam amino L-asam aspartat dan L-fenilalanin yang merupakan hasil urai aspartam merupakan asam

amino penyusun protein dalam makanan sehari-hari sehingga tidak akan menimbulkan efek yang berbahaya (Cahyadi, 2006).

#### **1.4. Minuman Ringan**

Minuman ringan adalah minuman yang tidak mengandung alkohol, merupakan minuman olahan dalam bentuk bubuk atau cair yang mengandung bahan makanan atau bahan tambahan lainnya baik alami maupun sintetis yang dikemas dalam kemasan siap dikonsumsi (Cahyadi, 2005).

Minuman ringan terdiri dari dua jenis, yaitu :

- a. Minuman ringan dengan karbonasi, misalnya Sprite.
- b. Minuman ringan tanpa karbonasi, misalnya Nutrisari.

Minuman ringan dengan karbonasi adalah minuman yang dibuat dengan menambahkan CO<sub>2</sub> dalam air minum, sedangkan minuman ringan tanpa karbonasi adalah minuman selain minuman ringan dengan karbonasi.

Fungsi minuman ringan itu tidak berbeda jauh dengan minuman ringan lainnya yaitu sebagai minuman untuk melepaskan dahaga sedangkan dari segi harga, ternyata minuman ringan karbonasi relatif lebih mahal dibandingkan minuman ringan tanpa karbonasi.

#### **1.5. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu teknik pemisahan komponen dalam campuran melalui proses kesetimbangan (ekuilibrium) yang dihasilkan dari partisi

atau penyerapan (absorpsi) diantara dua fase yang berlainan, yaitu fase diam (*stationary phase*) yang mempunyai luas permukaan dan fase bergerak (*mobile phase*) yang selalu kontak dengan fase pertama (Johnson & Stevenson, 1991). Campuran komponen dipisahkan dengan cara melewatkan sampel yang dibawa oleh fase gerak pada fase diam. Derajat pemisahan ditunjukkan oleh laju pergerakan tiap komponen dengan kecepatan yang berbeda. Pada saat tercapai kesetimbangan, komponen akan terdistribusi diantara fase diam dan fase gerak.

Prinsip dasar untuk mengoptimalkan kromatografi dalam proses pemisahan ialah mencari kondisi yang menyebabkan perbedaan laju perpindahan paling besar. Pemisahan paling baik diperoleh pada keadaan fase diam mempunyai luas kontak maksimal dan fase gerak berpindah dengan cepat untuk meminimalkan efek difusi (Gritter et al, 1991). Untuk memperoleh permukaan fase diam yang luas digunakan adsorben (penjerap) berupa serbuk halus, sedangkan untuk memacu pergerakan fase gerak digunakan tekanan tinggi. Kondisi ini menghasilkan teknik kromatografi cair yang disebut kromatografi cair tekanan tinggi (KCKT = HPLC/High Performance Liquid Chromatography) yang kemudian diubah menjadi kromatografi cair kinerja tinggi yang disingkat KCKT.

Beberapa kelebihan KCKT dibandingkan metode kromatografi cair lain, yaitu (Johnson & Stevenson, 1991) :

- a. Cepat, waktu analisis lazim kurang dari 1 jam. Banyak analisis dapat dilakukan dalam 15-30 menit,
- b. Daya pisah baik,
- c. Peka, detektor unik. Detektor serapan UV dapat mendeteksi berbagai senyawa dalam jumlah nanogram ( $10^{-9}$ g),
- d. Kolom dapat dipakai kembali,
- e. Ideal untuk molekul besar dan ion,
- f. Mudah memperoleh kembali cuplikan,
- g. Pelarut mudah dihilangkan (mudah penguapan).

Dalam KCKT, sebagai fase diam umumnya digunakan suatu partikel silika berpori mikro yaitu  $C_{18}$  (ODS= *octadecylsilane*) (Harris, 1999). Adapun untuk fase gerak dilihat dari kemampuan relatifnya melulusi solut. Kemampuan elusi relatif fase gerak dinyatakan dengan kekuatan eluen (Tabel 1.4), yang merupakan ukuran penyerapan energi. Semakin besar kekuatan eluen, semakin cepat solusi terelusi dari kolom (Harris, 1999).

**Tabel 1.3** Eluotropik dan UV $_{cutoff}$  beberapa eluen pada KCKT (Harris, 1991)

Eluen	<i>Eluen strength</i> (Kekuatan Eluen)	UV( <i>cutoff</i> )
Heksan	0.01	195
Toluen	0.22	284
Kloroform	0.26	245
Dietil eter	0.43	215
Asetonitril	0.52	190
Tetrahidrofuran	0.53	212
Metanol	0.70	205

Di antara dua fase yang berperan, salah satu selalu harus lebih polar daripada yang lain. Jika yang lebih polar fase diam disebut kromatografi normal (*normal-phase chromatography*), sedangkan jika fase diam kepolarannya lebih rendah dikenal sebagai kromatografi fase balik (Gritter, 1991). Pada tipe *normal-phase chromatography*, semakin polar fase gerak semakin tinggi *eluen strength*, sedangkan untuk tipe kromatografi fase balik, semakin lemah kepolaran eluen semakin besar kekuatan eluen (Harris, 1991). Urutan elusi pada kromatografi fase balik juga bisa dikaitkan dengan sifat kehidrofobikan solut yang meningkat. Semakin mudah solut larut dalam air, makin cepat komponen tersebut terelusi (Johnson & Stevenson, 1991).

Kromatografi fase balik mempunyai keuntungan dapat mengeliminasi adanya *peak tailing* karena fase diam mempunyai sedikit sisi aktif memiliki daya absorpsi terhadap solut penyebab tailing. Kromatografi fase balik juga kurang sensitif terhadap adanya *impurities* polar seperti air dalam eluen (Harris, 1999).

Dalam sistem kromatografi fase balik, eluen polar atau campurannya lebih umum digunakan. Pasangan yang paling lazim dipakai adalah air dengan metanol dan air dengan asetonitril (Johnson & Stevenson, 1991). Metanol merupakan senyawa sangat murni, mudah didapat, dan menghasilkan pemisahan yang baik, sedangkan asetonitril mempunyai viskositas rendah sehingga meningkatkan koefisien kolom, serta mudah bercampur dengan solut non polar. Kelebihan lain penggunaan asetonitril dan metanol adalah daya elusi tinggi, namun tidak mempunyai daya absorpsi

terhadap pancaran sinar detektor, khususnya di atas panjang gelombang 200 nm (Krstulovic & Brown , 1982 ; Swadesh, 2001).

Kebanyakan pemisahan dalam kromatografi fase balik disusun oleh larutan buffer atau air sebagai eluen awal. Penggunaan buffer diperlukan dalam pemisahan senyawa polar karena pada pH tertentu dapat merubah retensi senyawa melalui kesetimbangan kedua (Krstulovic & Brown , 1982). Larutan buffer juga dapat menekan pengionan dari kompoen yang mengandung senyawa ion. Konsentrasi garam dalam buffer dibuat relatif tinggi untuk menghindari puncak asimetrik dan *bandsplitting* yang diakibatkan oleh lambatnya laju komponen proton dan ekuilibrium kedua lain (Johnson & Stevenson, 1991).

Penggunaan buffer (Tabel.1.5) hendaknya memperhatikan faktor : kapasitas pH (kisaran 2-8), secara optik transparan, kompatibel dengan eluen organik, dapat meningkatkan derajat kesetimbangan, serta potensi untuk *masking* terhadap grup silanol pada permukaan adsorben. Buffer asetat tidak banyak digunakan karena rendahnya efisiensi kolom akibat pembentukan kompleks nonpolar antara ion asetat dan solut bermuatan tertentu. Halida juga dihindari karena efeknya terhadap komponen *stainless steel* pada kolom (Krstulovic & Brown , 1982).

Analisis kualitatif KCKT dilakukan dengan membandingkan waktu tambat (*retention time*) atau volume tambat senyawa murni dengan waktu/volume tambat komponen yang dikehendaki. Waktu/volume tambat yang diperoleh dari senyawa murni menunjukkan senyawa murni, sehingga cuplikan yang mempunyai

waktu/volume tambat di sekitar waktu/volume tambat senyawa murni diduga kuat mengandung komponen senyawa tersebut (Gritter *et al*, 1991).

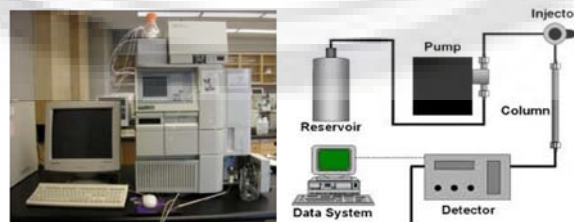
**Tabel 1.4** Kisaran Nilai pH Beberapa Larutan buffer sebagai Eluen pada KCKT

Sistem Buffer	pH
$H_3PO_4/KH_2PO_4/K_2HPO_4/KOH$	2-12
Asam asetat/Na-asetat	3-6
Asam asetat/ $NH_4$ -asetat/ $NH_4OH$	3-9
$NH_4$ -bikarbonat/ $NH_4$ -karbonat/ $NH_4OH$	3-10
$NH_4$ -bikarbonat/ $NH_4$ -karbonat/ NaOH	9-11
$H_3BO_3/ Na_3BO_3/ NaOH$	7-11

Sumber : Krstulovic & Brown (1982)

Kromatografi kuantitatif menunjukkan kadar relatif masing-masing komponen terhadap komponen lain, atau kadar mutlak jika menggunakan baku pembanding. Metode kuantitatif dipakai untuk penetapan kadar cuplikan secara rutin, sebagai bagian dari pengendalian mutu (Gritter *et al*, 1991). Perhitungan kuantitatif didasarkan pada perbandingan luas atau tinggi puncak komponen dengan baku pembanding (Johnson & Stevenson, 1991). Dalam prakteknya, biasanya dibuat kurva kalibrasi dari larutan baku dengan rentang konsentrasi tertentu, kemudian luas puncak senyawa yang tak diketahui ditentukan dengan interpolasi (Johnson & Stevenson, 1991).

### 1.5.1. Instrumen kromatografi cair kinerja tinggi



**Gambar I.2** Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

a. Fasa gerak

Fasa gerak dalam KCKT adalah berupa zat cair dan disebut juga eluen atau pelarut. Berbeda dengan kromatografi gas, KCKT mempunyai lebih banyak pilihan fasa gerak dibandingkan dengan fasa gerak untuk kromatografi gas. Dalam kromatografi gas, fasa gerak hanya sebagai pembawa solut melewati kolom menuju detektor. Sebaliknya dalam KCKT, fasa gerak selain berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor. Fasa gerak dapat berinteraksi dengan solut. Oleh karena itu, fasa gerak dalam KCKT merupakan salahsatu faktor penentu keberhasilan proses pemisahan. Persyaratan fasa gerak KCKT dimana zat cair yang akan digunakan sebagai fasa gerak KCKT harus memenuhi beberapa persyaratan berikut (Hendayana, Sumar, 2006) :

- 1) zat cair harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk cuplikan yang akan di analisis
- 2) zat cair harus murni sekali untuk menghindarkan masuknya kotoran yang dapat mengganggu interpretasi kromatogram.
- 3) zat cair harus jernih sekali untuk menghindarkan penyumbatan pada kolom
- 4) zat cair harus mudah diperoleh, murah, tidak mudah terbakar, dan tidak beracun.
- 5) zat cair tidak kental.
- 6) sesuai dengan detektor.

Fasa gerak untuk kromatografi partisi, adsorpsi, dan penukar ion bersifat interaktif dalam arti fasa gerak berinteraksi dengan komponen-komponen cuplikan.



Akibatnya, waktu retensi sangat dipengaruhi oleh jenis pelarut. Sebaliknya fasa gerak untuk kromatografi eksklusi bersifat non interaktif. Oleh karena itu, waktu retensi dengan kromatografi ini tidak bergantung pada komposisi fasa gerak ((Hendayana, Sumar, 2006).

b. Pompa

Pompa dalam KCKT dapat dianalogikan dengan jantung pada manusia yang berfungsi untuk mengalirkan fasa gerak cair melalui kolom yang berisi serbuk halus. Pompa yang dapat digunakan dalam KCKT harus memenuhi persyaratan sebagai berikut (Gritter *et al*, 1991):

- 1) Menghasilkan tekanan samapai 600 psi
- 2) Kecepatan alir berkisar antara 0,1-1,0 mL/menit
- 3) Bahan tahan korosi

c. Unit sistem penyuntikan sampel

Kadang kala, faktor ketidaktepatan pengukuran KCKT terletak pada keterulangan pemasukan cuplikan ke dalam pengepakan kolom. Masalahnya, kebanyakan memasukan cuplikan ke dalam kolom dapat menyebabkan pelebaran pita. Oleh karena itu, cuplikan yang dimasukkan harus sekecil mungkin kurang lebih beberapa puluh mikroliter. Selain itu, perlu diusahakan tekanan tidak menurun ketika memasukkan cuplikan ke dalam aliran fasa gerak. Berikut beberapa teknik pemasukan cuplikan ke dalam sistem KCKT (Sudjadi, 2007) :

### 1) Injeksi

Jarum disuntikkan melalui septum (*seal* karet) dan untuk ini dirancang jarum yang tahan tekanan sampai 1500 psi. Akan tetapi keterulangan injeksi jarum ini sedikit lebih baik dari 2-3% dan bahkan sering lebih jelek.

### 2) Injeksi *stop-flow*

Injeksi *stop-flow* adalah jenis injeksi syringe kedua tapi di sini aliran pelarut dihentikan, sementara sambungan pada ujung kolom dibuka dan cuplikan disuntikkan langsung ke dalam ujung kolom. Setelah menyambungkan kembali kolom maka pelarut dialirkan kembali (Sudjadi, 2007).

### d. Kran cuplikan

Jenis pemasangan cuplikan ini disebut juga putaran dan paling banyak digunakan. Untuk memasukkan cuplikan ke dalam aliran fasa gerak perlu dua langkah (Sudjadi, 2007):

- 1) Sejumlah volume cuplikan disuntikkan ke dalam loop dalam posisi '*load*', cuplikan masih berada dalam putaran.
- 2) Kran diputar untuk mengubah posisi '*load*' menjadi posisi 'injeksi' dan fasa gerak membawa cuplikan ke dalam kolom. putaran dapat diganti-ganti dan tersedia berbagai ukuran volume dari 5 - 500 $\mu$ L. Dengan sistem pemasangan cuplikan ini memungkinkan memasukkan cuplikan pada tekanan 7000 psi dengan ketelitian tinggi. putaran mikro tersedia dengan volume 0,5 hingga 5  $\mu$ L.

### e. Kolom KCKT

Biasanya terbuat dari stainless steel walaupun ada juga yang terbuat dari gelas berdinding tebal. Kolom utama berisi fase diam, tempat terjadinya pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya (Sudjadi, 2007).

f. Detektor

Berbagai detektor untuk KCKT telah tersedia, walaupun demikian detektor harus memenuhi persyaratan seperti cukup sensitif, stabilitas dan keterulangan tinggi, respon linear terhadap solut, waktu respon pendek sehingga tidak bergantung kecepatan alir, realibilitas tinggi dan mudah digunakan, tidak merusak cuplikan. Detektor KCKT dikelompokkan ke dalam tiga jenis, yaitu: detektor umum memberi respon terhadap fasa gerak yang dimodulasi dengan adanya solut. Detektor spesifik memberi respon terhadap beberapa sifat solut yang tidak dimiliki oleh fasa gerak. Detektor yang bersifat umum terhadap solut setelah fasa gerak dihilangkan dengan penguapan. Detektor berdasarkan absorpsi UV merupakan detektor KCKT yang paling banyak dipakai. Detektor elektro kimia paling banyak dipakai terutama dalam KCKT penukar ion (Sudjadi, 2007).

g. Mekanisme kerja KCKT

Mula-mula solven diambil melalui pompa. Solven ini kemudian masuk ke dalam katup injeksi berputar yang dipasang tepat pada sampel putaran. Dengan pertolongan mikro siring, sampel dimasukkan ke dalam sampel putaran yang kemudian bersama-sama dengan solven masuk ke dalam kolom. Hasil pemisahan dideteksi oleh detektor dimana penampakannya ditunjukkan oleh perekam. Tekanan solven di atur dengan pengatur dan pengukur tekanan. Pompa pemasuk solven pada

tekanan konstan hingga tekanan kurang lebih 4500 psi dengan laju alir rendah yaitu beberapa milliliter per menit. Rekorder menghasilkan kromatogram zat-zat yang dipisahkan dari suatu sampel. Tahap pemekatan dengan ekstraksi solven dan penguapan untuk memperkecil volume sering kali diperlukan sebelum pengerjaan sampel dengan KCKT. Hal ini terutama sering dilakukan untuk analisis senyawa-senyawa hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH) atau residu pestisida dalam makanan. Sebagai alternatif lain, sampel air dapat di absorpsi oleh suatu adsorben padat (C8 atau C18 yang terikat pada silika gel), diikuti dengan desorpsi dalam suatu solven yang kemudian langsung dimasukkan kedalam kolom. Suatu solven dengan polaritas rendah, misalnya  $\text{CH}_3$  berair yang secara bertingkat mengalami perubahan menjadi  $\text{CH}_3\text{OH}$  murni, menjamin pemisahan yang baik pada C18 yang terikat pada silika gel (Sudjadi, 2007).

## **1.6. Uji Kesesuaian Sistem**

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi ketika metode baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis, tertentu atau metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar dua metode seperti antara metode baru dan metode baku ( Rohman, 2009)

### **1.6.1. Presisi**

Presisi atau keseksamaan merupakan ukuran kedekatan antar serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama. Konsep presisi diukur dengan simpangan baku. Dokumentasi presisi seharusnya mencakup simpangan baku, simpangan baku relative (RSD) atau koefisien variasi (KV) (Rohman, 2009).

Nilai RSD dirumuskan dengan :

$$\text{RSD} = \frac{SD}{X} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

$$X = \frac{\sum X_n}{n} \dots\dots\dots (2)$$

Dimana :

X<sub>n</sub> = sampel ke-n

X = rata-rata (mean) dari pengukuran sampel

n = jumlah sampel

Data untuk menguji presisi seringkali dikumpulkan sebagai bagian kajian-kajian lain yang berkaitan dengan presisi seperti linieritas atau akurasi. Biasanya pengukuran dilakukan 6-15 pada sampel tunggal untuk tiap-tiap konsentrasi. Pada pengujian KCKT, nilai RSD antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa aktif dengan kadar dalam jumlah sedikit RSD berkisar antara 5-15% (Rohman, 2009).

Presisi merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel yang homogen. Presisi dapat di

bagi lagi menjadi 2 atau 3 kategori. Komisi eropa membagi presisi kedalam keterulangan dari ketertiruan (Rohman,2009).

a. Keterulangan

Merupakan ketepatan pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya.

b. Presisi antara

Merupakan ketepatan paa kondisi percobaan yang salah satunya berbeda, baik prangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya.

c. Reprodusibilitas

Merupakan ketepatan pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya.

### 1.6.2. Akurasi

Akurasi atau kecermatan merupakan kedekatan antara nilai terukur (nilai rata-rata hasil analisis) dengan nilai yang diterima sebagai nilai sebenarnya, baik nilai konvensi, nilai sebenarnya ataupun nilai rujukan. Nilai akurasi juga dapat dijadikan sebagai petunjuk kesalahan sistematik (Rohman, 2009).

Penentuan ketepatan dan kadar teoritis dari jumlah tertentu senyawa standar yang sengaja ditambahkan kedalam sampel. Harga perbandingan ini disebut persen perolehan kembali. Nilai keterimaan adalah  $RSD < 2\%$  dan nilai perolehan kembali antara 98-102% (Rohman, 2009).

### 1.6.3. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan, intersep dan koefisien relasinya (Rohman, 2009).

### 1.5.4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi diartikan sebagai kuantitasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi criteria cermat dan seksama (Harmita, 2004)

$$Q = \frac{K \cdot S_b}{b} \dots \dots \dots (3)$$

Dimana :

Q = LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)

K = untuk LOD adalah 3 dan untuk LOQ adalah 10

S<sub>b</sub> = simpangan baku residual

B = arah garis linear (slope) dari kurva antara respon terhadap  $y = bx + a$

c. Batas deteksi (LOD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu kuantifikasi. *LOD* merupakan batas yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko ( $y_b$ ) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ( $3S_b$ ) (Gandjar dan Rohman, 2007),

$$Q = \frac{3.S_b}{b} \dots\dots\dots (4)$$

d. **Batas Kuantitasi (LOQ)**

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana *LOD*, *LOQ* juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). (Gandjar dan Rohman, 2007).

$$Q = \frac{10.S_b}{b} \dots\dots\dots (5)$$

Simpangan baku ( $S_b$ ) =  $S_{y/x}$  atau disebut juga simpangan baku residual

**1.5.5. Uji Tailing**

Uji kesesuaian sistem dilakukan terhadap sampel dengan standar internal dalam fasa gerak, kemudian disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ l ke dalam alat KCKT pada kondisi optimum. Percobaan diulang sebanyak enam kali ( $n = 6$ ). Dari kromatogram



yang diperoleh ditentukan keterulangan penyuntikan larutan baku yang dinyatakan dengan KV dari waktu retensi, dan rasio tinggi puncak, *tailing* faktor (Hendayana, 2006).

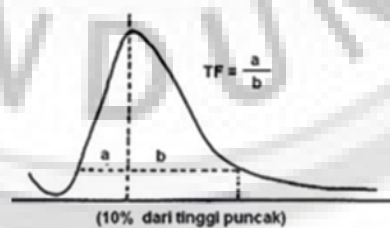
a. Waktu retensi ( $t_R$ )

Waktu retensi ( $t_R$ ) adalah ukuran waktu mulai injeksi cuplikan hingga suatu komponen campuran keluar kolom, dengan kata lain waktu yang diperlukan oleh suatu komponen campuran (solut) untuk keluar dari kolom. Waktu retensi diukur melalui kromatogram dari menit ke-0 hingga muncul peak (Hendayana, 2006).

b. Resolusi

Tujuan utama dari kromatografi adalah memisahkan komponen-komponen campuran secara sempurna. Derajat pemisahan dua komponen campuran dalam proses kromatografi dinyatakan dengan istilah resolusi ( $R_s$ ) (Hendayana, Sumar, 2006).

c. Tailing factor (faktor asimetris)



**Gambar 1.3** Menghitung besarnya TF pada kromatogram

Jika puncak yang akan dikuantifikasi adalah asimetri (tidak setangkup), maka suatu perhitungan asimetrisitas merupakan cara yang berguna untuk mengontrol atau

mengkarakterisasi sistem kromatografi. Puncak asimetri muncul karena berbagai factor. Peningkatan puncak yang asimetri akan menyebabkan penurunan resolusi, batas deteksi, dan presisi (Hendayana, 2006).



Filename: Bab Ia Lanjutan  
Directory: F:\sidang  
Template: C:\Users\user\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: DELL  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 1/26/2014 4:51:00 PM  
Change Number: 11  
Last Saved On: 6/22/2015 4:25:00 PM  
Last Saved By: DELL  
Total Editing Time: 149 Minutes  
Last Printed On: 7/7/2015 3:42:00 PM  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 24  
Number of Words: 4,384 (approx.)  
Number of Characters: 24,990 (approx.)

