

BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Wafer

Wafer adalah biskuit yang dibuat dari adonan cair, berpori-pori kasar, renyah dan bila dipatahkan penampang potongannya berongga-rongga (SNI, 1992).

1.2 Bahan Tambah Makanan

Bahan tambahan makanan adalah bahan yang biasanya tidak digunakan sebagai makanan dan biasanya bukan merupakan *ingredien* khas makanan, mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi, yang dengan sengaja ditambahkan ke dalam makanan untuk maksud teknologi (termasuk organoleptik) pada pembuatan, pengolahan, penyediaan, perlakuan, pewadahan, pembungkusan, penyimpanan atau pengangkutan makanan untuk menghasilkan atau diharapkan menghasilkan (langsung atau tidak langsung) suatu komponen yang mempengaruhi sifat khas makanan (Permenkes No. 722/MENKES/PER/IX/88).

1.3 Antioksidan

Antioksidan Menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No.722/Menkes/Per/IX/1988 tentang Bahan Tambah Makanan, Antioksidan Adalah Bahan tambahan makanan yang dapat mencegah atau menghambat oksidasi.

Antioksidan adalah bahan tambahan yang digunakan untuk melindungi senyawa kimia dalam makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Meskipun demikian antioksidan dapat digunakan untuk melindungi senyawa kimia lain seperti vitamin dan pigmen, yang juga banyak mengandung ikatan rangkap di dalam strukturnya (O'Brien, 166:2009).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat digolongkan ke dalam dua jenis. *Pertama*, antioksidan yang bersifat alami, seperti senyawa fenolik atau flavonoid, vitamin E, vitamin C, dan beta-karoten. *Kedua*, antioksidan sintetis seperti BHA (*Butylated Hydroxyanisole*), BHT (*Butylated Hydroxytoluene*), PG (Propil Galat), dan TBHQ (*di-t-Butyl Hydroquinone*) (O'Brien, 167:2009).

Oksidasi sering terjadi dalam proses produksi penyimpanan dan penggunaan makanan yang mengandung lemak dan minyak. Oksidasi lemak dan minyak tak jenuh diawali dengan pembentukan radikal bebas karena adanya panas, cahaya, ion logam atau oksigen. Reaksi ini terjadi pada gugus metil yang berada dekat pada ikatan rangkap antar karbon (Smith, 1991).

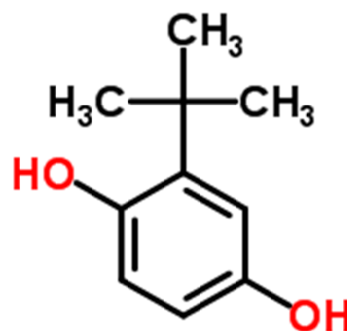
1.3.1 Mekanisme Antioksidan

Adanya ion logam, terutama besi dan tembaga, dapat mendorong terjadinya oksidasi lemak. Ion-ion logam ini seringkali diinaktivasi dengan penambahan senyawa penghelat, dan dapat juga disebut bersifat sinergistik dengan antioksidan karena menaikkan efektivitas antioksidan utamanya (O'Brien, 166:2009).

Untuk dapat digunakan sebagai antioksidan, suatu senyawa harus mempunyai sifat-sifat: tidak toksik, efektif pada konsentrasi rendah (0,01-0,02%), dapat terkonsentrasi pada permukaan atau lapisan lemak (bersifat lipofilik) dan harus dapat pada tahap kondisi pengolahan pangan umumnya (O'Brien, 167:2009).

1.3.2 Tetrabutyl Hydro Quinon (TBHQ)

TBHQ (Tertiary Butylhydroquinone). TBHQ merupakan antioksidan yang paling efektif dalam minyak yang terdapat pada makanan dibandingkan BHA, BHT, PG dan tokoferol. TBHQ memiliki sifat-sifat: (1). bersinergis dengan BHA, (2). cukup larut dalam lemak, (3). tidak membentuk kompleks dengan ion logam (O'Brien, 168:2009).



Gambar I.1 tert-Butylhydroquinone (Batchelor *et al.* 2013)

Sinonim TBHQ antara lain 2-tert-Butyl-1,4-dihydroxybenzene dengan rumus kimia $C_{10}H_{14}O_2$. Massa molar 166,21 g/mol, titik leleh 127-129 °C, dan titik didih 295 °C. TBHQ praktis tidak larut dalam air, larut dalam minyak, etanol, etil asetat, dan propilenglikol (Smith, 100:2003).

1.4 Kromatografi Cair Kromatografi Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan salah satu teknik pemisahan campuran secara modern. Teknik KCKT ini merupakan salah satu teknik kromatografi cair-cair, yang dapat digunakan baik untuk keperluan pemisahan maupun analisis kuantitatif. Analisis kuantitatif dengan teknik KCKT didasarkan pada pengukuran luas per area puncak analit dalam kromatogram, dibandingkan dengan luas per area standar. Pada prakteknya, perbandingan kurang menghasilkan data yang akurat bila hanya melibatkan satu standar. Karena itu, maka perbandingan dilakukan dengan menggunakan teknik kurva kalibrasi (Sumar, 2006: 83-85).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis. analisis ketidakh murnian (*impurities*) yaitu analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (*non-volatile*); penentuan molekul-molekul netral, *ionic*, maupun *zwitter ion*; isolasi dan pemurnian senyawa; pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekecil (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gandjar, 378-379:2007).

1.4.1 Prinsip Kromatografi Cair Kinerja tinggi

Prinsip kerja KCKT merupakan proses pemisahan berdasarkan kepolaran dengan suatu fasa gerak cair dipompa di bawah tekanan melalui kolom baja yang mengandung partikel-partikel fasa diam dengan diameter 3-10 μm .

Analit tersebut dimasukkan ke dalam bagian atas kolom melalui katup lengkung dan pemisahan suatu campuran berlangsung sesuai dengan lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponennya di dalam fasa diam (Watson, 2009: 314).

1.4.2 Fasa gerak

Di dalam kromatografi cair, komposisi dari solven atau fasa gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada solven yang digunakan untuk KCKT, tetapi ada beberapa sifat umum yang sangat disukai fasa gerak yaitu:

1. Murni, tidak terdapat kontaminan.
2. Tidak bereaksi dengan wadah (*packing*).
3. Sesuai dengan detektor.
4. Melarutkan sampel.
5. Memiliki viskositas rendah.
6. Meningkatkan nilai perolehan kembali sampel.
7. Diperdagangan dapat diperoleh dengan harga murah (*reasonable price*) (Effendy, 2004).

1.4.3 Fasa diam

Kebanyakan fasa diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Permukaan silika bersifat polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH) (Gandjar, 385:2007).

Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen seperti klorosilan. Reagen-reagen ini akan bereaksi dengan

gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional yang lain. Hasil reaksi yang diperoleh disebut dengan silika fasa yang terikat stabil terhadap hidrolisis karena terbentuk ikatan-ikatan siloksan (Si-O-O-Si), silika yang dimodifikasi ini mempunyai karakteristik kromatografi dan selektifitas yang berbeda jika dibandingkan dengan silika yang tidak dimodifikasi (Gandjar, 385-386:2007).

Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan fasa diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar. Silika-silika aminopropil dan sianopropil (nitril) lebih cocok sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan karena adanya kandungan air yang digunakan (Gandjar, 386:2007).

Solut-solut yang polar, terutama yang bersifat basa, akan memberikan puncak yang mengekor (*tailing peak*) pada penggunaan fasa diam, silika fasa terikat. Hal ini disebabkan oleh adanya interaksi adsorpsi antara solut-solut ini dengan residu silanol dan pengotor logam yang terdapat pada silika. Masalah ini dapat diatasi dengan *end-capping* yakni suatu proses menutup residu silanol ini dengan gugus-gugus trimetilsilil dan menggunakan silika dengan kemurnian yang tinggi (kandungan logam < 1 ppm) (Gandjar, 386:2007).

Tabel I.1 Fasa diam pada KCKT
(Sumber: Kealey and Haines, 2002)

| Fase Diam | Mekanisme adsorpsi | Karakteristik fase diam |
|---|---|---|
| Silika yang tidak dimodifikasi | Adsorpsi, fase normal | Polar, waktu retensi bervariasi karena adanya air yang diserap |
| <i>Fase terikat</i> Oktadesil silika -C18H35 (ODS) atau C18) Oktil silika -C8H17 Propil silika -C3H7 | Partisi, fase terbalik | Non polar, akan tetapi gugus silanol yang tidak direaksikan akan menyebabkan solu-solut yang polar, terutama solute basa, akan mengekor. Kisaran pH terbatas pada kisaran antara 2,5-7,5. Semua fase diam ini akan mampu memisahkan sejumlah besar solut. |
| <i>Fase terikat</i> Aminopropil -C3H6NH2 | Partisi yang dimodifikasi, fase normal atau fase terbalik | Polar, untuk memisahkan senyawa-senyawa karbohidrat. Kisaran pH terbatas pada kisaran antara 2,5-7,5. |
| <i>Fase terikat</i> Asam sulfonat -(CH ₂) _n SO ₃ H | Penukar kation | Transfer massa lambat karenanya akan melebarkan puncak, kapasitas sampel terbatas, kisaran pH terbatas pada kisaran antara 2,5-7,5 untuk bahan-bahan yang berasal dari silika. |
| <i>Fase terikat</i> Amin kuartener -(CH ₂) _n NR ₃ OH | Penukar kation | - |
| <i>Fase terikat</i> Silika dengan porositas terkendali | Ekskusi ukuran | Sesuai baik untuk fase gerak berair atau pelarut organik. Kisaran pH terbatas pada kisaran 2,5-10 |
| <i>Fase terikat</i> Silika α -, β -, γ -siklodekstrin | Slektifitas kiral berdasarkan pada interaksi adsorpsi | Mahal, waktu hidup kolom terbatas, resolusi kolom peka terhadap komposisi fase gerak |
| <i>Polimer</i> Polimer stiren atau divinil benzene baik yang dimodifikasi atau tidak dengan gugus penukar ion. | Partisi, ekskusi, atau penukar ion | Non polar jika polimer tidak dimodifikasi, stabil pada kisaran pH 1-13 |

Fasa diam ekskusi dan penukar ion dapat menggunakan silika atau polimer.

Asam sulfonat merupakan fasa diam dengan mekanisme penukar kation, sementara ammonium kuartener mempunyai mekanisme penukar anion.

Fasa diam kiral telah dikembangkan untuk memisahkan campuran enansiomer, akan tetapi jenis fasa diam ini mahal dan mempunyai waktu hidup yang pendek.

Tersedianya berbagai macam fasa diam jenis fasa terikat dan polimer telah memunculkan berbagai macam KCKT (Gandjar, 386:2007).

1.4.4 Pompa KCKT

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana wadah pelarut yakni: pompa harus *inert* terhadap

fasa gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan, batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fasa gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparative, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fasa gerak dengan kecepatan 20 mL/menit (Gandjar, 382:2007).

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fasa gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fasa gerak berlangsung secara tepat, reproduisible, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fasa gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fasa gerak yang konstan lebih umum sejauh ini dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Gandjar, 381-382:2007).

1.4.5 Kolom KCKT

Ada 2 jenis kolom pada KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Perbandingan kedua kolom dapat dilihat pada tabel I.2 (Gandjar, 384:2007).

1.5 Verifikasi Metoda

Dalam penganalisaan suatu senyawa dengan menggunakan instrumen yang sudah diketahui metode bakunya, perlu dilakukan suatu verifikasi metode untuk memastikan apakah metode yang akan diadopsi ini memberikan mutu analisis yang masih dapat memenuhi standar yang dipersyaratkan atau tidak.

Persyaratan paling mendasar dalam suatu analisis adalah bahwa analisis tersebut harus akurat dan tepat (Watson, 2009:6).

Tabel I.2 Perbandingan antara kolom KCKT konvensional dan mikrobor
(Sumber: Kealey dan Haines, 2002)

| Parameter | Kolom konvensional | Kolom mikrobor |
|--------------------|---|---|
| Tabung kolom | <i>Stainless steel</i> panjang 3,10,15,20 dan 25 cm. | <i>Stainless steel</i> |
| | Diameter luar 0,25 inci | Panjang 25 dan 50 cm |
| | Diameter dalam 4,6 mm | Diameter luar 0,25 inci Diameter dalam 1 atau 2 mm |
| Fase diam | Porous, silika ukuran kecil, silika yang dimodifikasi secara kimiawi (<i>boded phase</i>), atau polimer-polimer stiren/divinil benzene. | Porous, silika ukuran kecil, silika yang dimodifikasi secara kimiawi (<i>boded phase</i>), atau polimer-polimer stiren/divinil benzene. |
| | Rata-rata diameter partikel 3,5 atau 10 μm dengan kisaran sempit. | Rata-rata diameter partikel 3,5 atau 10 μm dengan kisaran ukuran partikel yang sempit. |
| Tekanan oprasional | 500-3000 psi (35-215 bar) | 1000-5000 psi (70-350 bar) |
| Fase gerak | Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alcohol untuk fase normal. Untuk fase terbalik (<i>reversed phase</i>) digunakan methanol atau asetonitril + air atau <i>buffer</i> . | Hidrokarbon + pelarut-pelarut terklorinasi atau alcohol untuk fase normal. Untuk fase terbalik digunakan methanol atau asetonitril + air atau <i>buffer</i> . |
| | Kecepatan alir: 1-3 ml/menit. | Kecepatan alir: 10-100 μL /menit. |
| | | <i>Modifikasi instrument</i> System penghantaran pelarut yang mampu memberikan control aliran di bawah 10 μL /menit. Katup injeksi sampel bervolume kecil; Sel detector bervolume kecil. |
| Kinerja | Efisiensi meningkat dengan berkurangnya ukuran partikel fase diam, akan tetapi umur kolom | Sangat efisien dan sensitive, akan tetapi lambat. |
| | | Konsumsi fase gerak hanya $\frac{1}{4}$ dari kolom konvensional. |

1.5.1 Kalibrasi dan linieritas

Kalibrasi suatu metode meliputi perbandingan nilai yang diukur oleh sistem di bawah kondisi-kondisi yang ditetapkan secara ketat dengan nilai-nilai standar yang telah ditentukan sebelumnya (Watson, 2009:15). Kepekaan metode menunjukkan seberapa responsif metode tersebut terhadap sedikit perubahan terhadap sedikit perubahan dalam konsentrasi suatu analit. Kepekaan dapat dilihat sebagai kemiringan suatu respon kurva dan mungkin merupakan fungsi suatu cara kalibrasi instrumen (Watson, 2009:19).

Linieritas adalah kemampuan metode untuk menunjukkan respon yang berbanding lurus dengan konsentrasi pada rentang tertentu. Kebanyakan metode analisis didasarkan pada proses-proses yang metodenya menghasilkan suatu respon yang linier dan meningkat atau menurun secara linier sebanding dengan konsentrasi analit. Kelinieran diuji melalui penentuan koefisien korelasi (r) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}). Koefisien korelasi diperoleh dari persamaan garis linier grafik respon instrumen terhadap konsentrasi:

$$y = a + bx \quad (1)$$

(a) adalah perpotongan garis lurus dengan sumbu (y) yang merupakan tetapan empirik dan juga sebagai respon blanko (nilai y saat $x = 0$), (b) adalah tetapan proporsionalitas atau kemiringan garis tersebut dan (y) adalah nilai respon instrumen. Kurva kalibrasi terbentuk melewati pembacaan absorbans terhadap konsentrasi (x) (Harmita, 2004:128).

Sedangkan untuk mendapat untuk mendapatkan koefisien variansi fungsi regresi dapat diperoleh dari:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (2)$$

$S_{y/x}$ adalah simpangan baku, \hat{y}_i adalah semua titik pada garis regresi yang berpadanan dengan x_i ($i = 1, 2, 3, \dots$) yang dihitung dari persamaan regresinya, y_i adalah sinyal yang terukur (Harmita, 2004:129).

1.5.2 Keseksamaan (Presisi)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogenya (Harmita, 2004:121).

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau keterulangan (*reproducibility*) (Harmita, 2004:122). Keterulangan menyatakan presisi yang diperoleh dibawah kondisi-kondisi pelaksanaan yang sama selama interval waktu yang singkat. Keterulangan juga dapat disebut sebagai presisi intra-penetapan kadar. Kemungkinan besar penetapan kadar dapat diulangi oleh orang yang sama dengan menggunakan instrumen tunggal (Watson, 2009:10). Sedangkan ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda (Harmita, 2004:122).

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (*plasebo*) untuk melihat

pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini (Harmita, 2004:123).

1.5.3 Kecermatan (Akurasi)

Dalam suatu penganalisisan, metode dapat tepat tetapi tidak akurat. Maka, penentuan akurasi dalam penetapan kadar suatu sampel harus dilakukan guna melihat apakah metode yang digunakan masih dapat memberikan hasil yang akurat. Metode yang paling sederhana adalah membandingkan zat yang sedang dianalisis dengan baku pembanding yang sedang dianalisis menggunakan prosedur yang sama (Watson, 2009:10).

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistemik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistemik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, sesuai prosedur (Harmita, 2004:117).

Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) atau metode baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bajan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (*plasebo*) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya

dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya) (Harmita, 2004:117-118).

Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Persen peroleh kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel *plasebo* atau metode adisi. Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan (Harmita, 2004:118).

1.5.4 Batas deteksi (*Limit of Detection / LOD*) dan Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification, LOQ*)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Cara Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat (Harmita, 130:2004).