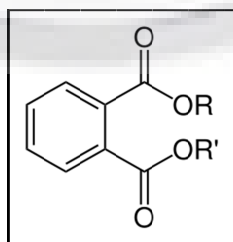


BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Ftalat

Ftalat atau ester ftalat adalah kelompok diesters asam orto-ftalat (dialkil atau alkil aril ester dari asam 1,2-benzendikarboksilat). Struktur kimia ftalat ditunjukkan dalam gambar I.1. Ftalat merupakan bahan yang banyak digunakan dalam industri kimia. Berbagai ftalat yang digunakan secara komersil memiliki rantai samping alkil yang mengandung 1-13 atom karbon. Ftalat dengan berat molekul tinggi bertindak sebagai aditif yang memberikan fleksibilitas dalam resin vinyl, hal tersebut merupakan fungsi ftalat yang paling banyak dimanfaatkan. Sedangkan ftalat dengan berat molekul yang lebih rendah digunakan sebagai pemlastis dalam beberapa resin non-vinyl, termasuk akrilik, uretan dan selulosa. Ftalat dengan jumlah atom karbon pada rantai samping alkilnya 1 sampai 4, digunakan secara luas mencakup produk-produk konsumen dan farmasi seperti DEP dan DBP. Ftalat dengan jumlah atom karbon pada rantai samping alkil kurang dari 6 jarang digunakan sebagai pemlastis utama karena masalah volatilitas (Stanley *et al.*, 2003).



Gambar I.1. Struktur kimia ester ftalat (Cao, 2010)

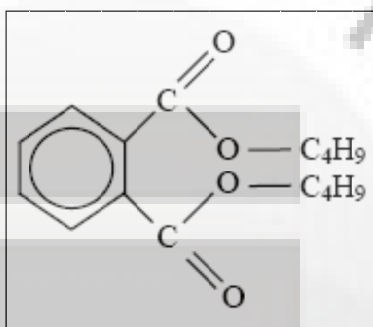
Struktur dan sifat ftalat biasa dipantau dalam makanan dan bahan kemasan makanan (Cao, 2010). Karena tidak ada ikatan kovalen antara senyawa ftalat dengan polimer, hal tersebut menyebabkan ftalat dapat bermigrasi ke makanan yang dikemas. Pengaturan penggunaan senyawa ftalat sebagai pemlastis dalam kemasan pangan telah diatur mulai dari dibatasi hingga dilarang. Beberapa negara telah mengatur ketentuan tentang pemlastis kemasan pangan, misalnya Uni Eropa (*Commission Directive EC*), Amerika Serikat (*Code of Federal Regulation, CFR, Title 21*), dan Jepang (*Food Sanitation Law*) (Rosyanie *et al.*, 2008).

Di Indonesia sendiri, penggunaan ftalat sebagai zat kontak pangan yang digunakan sebagai kemasan pangan telah diatur dalam Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 03.1.23.07. 11.6664 tahun 2011 tentang Pengawasan Kemasan Pangan, yang menyatakan bahwa penggunaan ftalat diizinkan dengan persyaratan batas migrasi yg berbeda-beda untuk setiap jenis ftalat. Jenis-jenis ftalat yang diizinkan berdasarkan peraturan tersebut diantaranya yaitu Butilbenzilftalat (BBP), Di(2-etilheksil)ftalat (DEHP), Dibutilftalat (DBP), Diisonilftalat (DINP), dan Diisodesilftalat (DIDP) dengan batas migrasi masing-masing secara berurutan yaitu 30; 1,5; 0,3; 9; dan 9 ppm (BPOM, 2011).

1.1.1. Di-n-butilftalat (DBP)

DBP adalah salah satu senyawa kelompok ester ftalat berupa cairan berminyak tidak berbau dan tidak berwarna yang dihasilkan saat n-butanol bereaksi dengan anhidrida ftalat (*U.S Consumer Product Safety Commission*, 2010). DBP memiliki rumus kimia $C_{16}H_{22}O_4$ dengan struktur kimia yang

ditunjukkan dalam gambar I.2. DBP memiliki beberapa sinonim dan nama dagang diantaranya di-n-Butil Ftalat; n-Butilftalat; asam 1,2-Benzendikarboksilat, dibutil ester; dibutil ester asam ftalat; asam o-benzendikarboksilat, dibutil ester; asam benzen-o-dikarboksilat; di-n-butyl ester; dibutil 1,2-benzendikarboksilat; celluflex dpb; elaol; hexaplas m/b; palatinol c; polycizer dbp; PX 104; staflex dbp; wicizer 300; araldite 502; asam benzendikarboksilat, dibutil ester; dibutil o-ftalat; dan lainnya (EPA, 2007).



Gambar I.2. Struktur kimia di-n-butylftalat (CPSC, 2010)

a. Sifat Fisikokimia

Berat Molekul	: 278,34
Warna	: Tidak berwarna sampai sedikit kuning
Rasa	: Kuat dan pahit
Keadaan fisik	: Cairan berminyak
Titik lebur	: - 69°C
Titik didih	: 340°C pada 1.013 hPa
Kepadatan relatif	: 1,045 g/cm ³ pada 20°C
Kelarutan	: 11,2 mg/L dalam air, sangat larut dalam alkohol eter, aseton dan benzen.

Inkompatibilitas : Bereaksi menimbulkan ledakan dengan cairan klorin.

(ATSDR, 2001; *European Union*, 2003)

b. Pemanfaatan

Ftalat digunakan terutama sebagai pemlastis untuk menambah fleksibilitas plastik. Tidak seperti ftalat lain, DBP saat ini tidak digunakan sebagai pemlastis dalam plastik polyvinyl chloride (PVC) (National Toxicology Program, 2000). Penggunaan DBP sebagai pemlastis biasanya dikombinasi dengan ftalat lain yang memiliki bobot molekul tinggi (European Chemicals Agency, 2009). Biasanya, DBP digunakan sebagai komponen perekat lateks. DBP juga digunakan dalam kosmetik dan produk perawatan pribadi lainnya, sebagai pemlastis dalam plastik selulosa, dan sebagai pelarut untuk pewarna. Selain itu, sebagai pelarut untuk insektisida, peroksida, dan bahan organik lainnya, sebagai agen antifoam, sebagai pelumas serat dalam industri tekstil, sebagai pelarut/pemlastis untuk nitroselulosa dan resin epoksi (ATSDR, 2001). DBP pun secara luas dipergunakan dalam produk pernis, kaca pengaman, cat kuku, pelapis kertas, farmasi dan plastik kemasan pangan (National Toxicology Program, 1995).

c. Sumber Paparan

Karena DBP memiliki begitu banyak kegunaan, membuatnya tersebar luas di lingkungan. Kebanyakan orang mungkin terpapar pada tingkat rendah dari udara. Beberapa orang mungkin juga terpapar DBP dari air, makanan, atau keduanya (ATSDR, 2001). Kebanyakan orang yang terpapar DBP terutama melalui makanan. DBP bermigrasi ke makanan, terutama makanan berlemak, dari

bahan mengandung DBP yang digunakan untuk memproses dan mengemas makanan. Kemungkinan lain, sumber DBP ditemukan dalam makanan adalah dari perekat lateks yang digunakan dalam peralatan pengolahan makanan dan kemasan makanan yang terbuat dari plastik berbasis selulosa (NTP, 2000).

d. Dampak Pada Tubuh

Berdasarkan data yang tersedia, DBP sedikit beracun jika tertelan (LD_{50} tikus adalah $\geq 6,300$ mg / kg bb), sedikit hingga cukup beracun jika terhirup (LC_{50} tikus ≥ 15.68 mg / L) dan sedikit beracun pada kontak dengan kulit (LD_{50} kulit kelinci > 20.000 mg / kg bb) (EU, 2003).

Dalam penelitian terhadap hewan, efek utama yang terlihat dari paparan DBP adalah perubahan dalam proses perkembangan dan alat reproduksi. Penelitian pada hewan telah menunjukkan bahwa perkembangan sistem reproduksi laki-laki, terutama epitel seminiferus testis, dapat terganggu oleh paparan dosis tinggi DBP dalam rahim selama periode kritis dalam perkembangan sistem reproduksi janin. Efek perkembangan lain juga dapat terjadi setelah terpapar dalam rahim atau perinatal, termasuk peningkatan kerugian pasca implantasi penurunan jumlah janin hidup per induk, penurunan berat badan bayi, dan peningkatan kejadian malformasi eksternal tulang dan internal (ATSDR, 2001).

Efek pada sistem reproduksi juga terlihat pada hewan dewasa yang terpapar DBP. Kesuburan berkurang pada hewan jantan dan betina, hal tersebut berhubungan dengan kerusakan atrofi testis dan tubulus seminiferus pada laki-laki sedangkan mekanisme pada wanita tidak diketahui. Perubahan sistem reproduksi

juga dapat meluas sampai ke keturunan hewan yang terpapar, dan mungkin termasuk mengurangi kesuburan dan penurunan produksi sperma (ATSDR, 2001).

Selain menjadi racun testis dan ovarium, dalam beberapa tahun terakhir studi ftalat sebagai pengganggu endokrin telah muncul. Dalam suatu studi paparan DBP dan DEHP terhadap tikus dalam keadaan hamil dan menyusui menunjukkan dampak yang mendalam pada sistem reproduksi laki-laki keturunannya, termasuk kelainan penis, testis, prostat, epididimis, dan vas deferens. Perubahan ini mirip dengan yang terlihat setelah terpapar anti-androgen, flutamid. Studi lanjut DBP, menunjukkan bahwa pola spesifik kelainan agak berbeda dari flutamid. Temuan ini menunjukkan bahwa DBP dan DEHP bertindak sebagai anti-androgen yang mengganggu pembentukan saluran reproduksi laki-laki yang diperantarai androgen, tetapi DBP bertindak agak berbeda dari antagonis reseptor androgen, flutamide (Schettler, 2001).

Beberapa ftalat termasuk BBP dan DBP, bertindak sebagai estrogen lemah dalam sistem kultur sel. Mereka dapat berikatan dengan reseptor estrogen, menginduksi respon seluler estrogen yang sesuai dan bertindak bersamaan dengan estradiol estrogen alami dalam mengubah sistem ini (Jobling, 1995; Kang, 2005). Ftalat juga mengikat lemah pada reseptor androgen, mengganggu tindakan seluler yang biasanya diprakarsai oleh androgen (Borch, 2006). Selain efek langsung, ftalat juga dapat menginduksi proliferasi, invasi ganas, dan pembentukan tumor di jaringan sel kanker payudara yang rendah atau kekurangan reseptor hormon ini menunjukkan bahwa setidaknya beberapa efek senyawa ini independen dari efek langsung estrogenik atau androgeniknya. (Hsieh, 2012).

Dalam sistem sel *in vitro*, BBP, DBP dan DEHP secara signifikan meningkatkan proliferasi sel pada sel tumor payudara manusia (MCF-7 sel). Selain itu, tiga ftalat tersebut mampu menghambat aksi anti-tumor dari Tamoxifen dalam sel MCF-7 kanker payudara (Kim, 2004). Dalam studi sel lain, paparan sel epitel payudara manusia normal terhadap DBP dapat mengakibatkan perubahan ekspresi gen pada jalur yang berhubungan dengan beberapa sistem, seperti respon imun, regulasi siklus sel dan status antioksidan sel (Gwinn, 2007).

1.2. KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi)

Kromatografi merupakan suatu teknik analisis yang didasarkan pada pemisahan molekul akibat perbedaan pada struktur dan atau komposisinya. Kromatografi pada umumnya melibatkan pergerakan sampel melewati fase diam dimana perbedaan afinitas dan interaksi sampel dengan fase diam menyebabkan terjadinya pemisahan molekul. Adanya interaksi yang kuat antara komponen sampel dengan fase diam akan menyebabkan pergerakannya melewati kolom lebih pelan dibanding dengan komponen yang interaksinya lemah (Kupiec, 2004).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu jenis kromatografi cair yang disertai dengan tekanan tinggi. KCKT digunakan untuk memisahkan dan mengukur senyawa yang telah terlarut dalam suatu larutan. Instrumen KCKT terdiri dari sebuah pompa, injektor, kolom, detektor dan integrator dimana kolom merupakan bagian inti dari instrumen ini karena pemisahan senyawa terjadi di dalam kolom (Kupiec, 2004).

Hal yang perlu diperhatikan dalam penggunaan KCKT adalah sampel yang digunakan harus larut dalam suatu pelarut terutama fase gerak karena fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang membawa sampel melewati kolom. Jenis dan komposisi dari fase gerak berpengaruh pada pemisahan komponen sampel. Jenis KCKT yang berbeda menggunakan pelarut yang berbeda pula. Untuk KCKT fase normal biasanya menggunakan pelarut non polar dan untuk KCKT fase balik umumnya pelarut merupakan campuran air dan pelarut organik polar (Kupiec, 2004).

1.2.1 Analisis Ftalat Menggunakan KCKT

Teknik utama untuk pengukuran ftalat adalah kromatografi gas dengan deteksi spektrometri massa (Wenzl, 2009). Namun selama beberapa tahun terakhir, metode analisis menggunakan KCKT dengan diawali berbagai metode prekonsentrasi seperti ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat dan mikroekstraksi fase padat pada berbagai matriks mulai banyak dikembangkan (Shen *et al*, 2007).

Sistem KCKT yang telah digunakan dalam menganalisis ftalat seperti kolom, fase gerak dan detektor oleh Adewuyi dkk., Kurie Mitani dkk., dan Zhiyong Guo dkk., yaitu menggunakan kolom C₁₈ dengan fase gerak Asetonitril : Air, sementara Shen dkk. menggunakan kolom C₈ dengan fase gerak Air : Metanol, sedangkan detektor yang digunakan semuanya menggunakan detektor UV. Untuk sistem elusi sendiri kebanyakan teknik yang digunakan adalah tipe elusi gradien dengan laju alir di set pada 1 mL/menit dan analit dideteksi berkisar pada panjang gelombang 225 – 245 nm.

1.3. Validasi Metode

Suatu metode analisis adalah serangkaian prosedur dari penerimaan sampel untuk produksi hasil akhir. Validasi adalah proses verifikasi bahwa metode sesuai dengan tujuan (Fajgelj dan Ambrus, 2000).

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Beberapa parameter analisis yang perlu dipertimbangkan dalam validasi metode diantaranya:

1.3.1 Linearitas

Linearitas suatu prosedur analitis adalah kemampuan (dalam kisaran tertentu) untuk dapatkan hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) dari analit dalam sampel (Ermer, 2005).

Pada penetapan linearitas, dianjurkan menggunakan minimal 5 konsentrasi untuk terbentuknya linearitas. Linearitas harus dievaluasi dengan inspeksi visual dari plot sinyal sebagai fungsi dari konsentrasi analit. Jika terdapat hubungan yang linier, hasil tes harus dievaluasi lebih lanjut dengan metode statistik yang sesuai, misalnya, dengan perhitungan garis regresi (*International Conference on Harmonization*, 2005).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a

menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y) (Harmita, 2004).

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - \bar{y}_1)^2}{n-2}} \dots\dots\dots (1)$$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

S_{x_0} = Standar deviasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

V_{x_0} = koefisien variasi dari fungsi

1.3.2. *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantitation (LOQ)*

Batas deteksi (DL) atau batas deteksi (LOD) dari suatu prosedur adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak harus secara kuantitatif sebagai nilai yang pasti. Dalam prosedur analitis yang menunjukkan noise dasar, LOD dapat didasarkan pada rasio signal-to-noise (3 : 1), yang biasanya dinyatakan sebagai konsentrasi (misalnya; persentase, bagian per miliar) dari analit dalam sampel. Ada beberapa cara yang dapat ditentukan, tapi biasanya melibatkan penyuntikkan sampel yang menghasilkan S / N rasio 3 : 1 dan memperkirakan DL (Bliesner, 2006).

Batas kuantitasi (QL) atau batas kuantitasi (LOQ) dari suatu prosedur analitis adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang sesuai. Batas kuantitasi merupakan parameter dari tes kuantitatif untuk konsentrasi rendah senyawa dalam matriks sampel dan digunakan terutama untuk penentuan kotoran dan / atau produk

degradasi. Hal ini biasanya dinyatakan sebagai konsentrasi (misalnya; persentase, bagian per juta) dari analit dalam sampel. Untuk prosedur analitis yang menunjukkan noise dasar, LOQ umumnya diperkirakan dari penentuan rasio signal-to-noise (10: 1) dan biasanya dikonfirmasi dengan menyuntikkan standar yang memberikan rasio S / N tersebut dan juga memiliki % RSD yang dapat diterima (Bliesner, 2006).

Menurut Harmita, penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis tersebut menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis instrument batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko tersebut. Persamaan berikut dapat digunakan untuk perhitungan.

$$Q = \frac{k \times S_b}{S_l} \dots\dots\dots (2)$$

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

k = 3 untuk LOD atau 10 untuk LOQ

S_b = Simpangan baku respon analitik dari blanko

S_l = Arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope

Batas deteksi dan kuantitasi juga dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (S_y/x). Maka persamaannya menjadi

$$Q = \frac{k \times S_y/x}{S_l} \dots\dots\dots (3)$$

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

k = 3 untuk LOD atau 10 untuk LOQ

Sy/x = Simpangan baku residual

Sl = Arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope

1.3.3. 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). Spesifitas dari metode uji ditentukan dengan membandingkan hasil uji dari analisis sampel yang mengandung pengotor dengan hasil dari analisis sampel yang tidak mengandung pengotor (Chan, 2004). Jika diduga tidak terdapat komponen pengganggu dalam sampel, maka spesifitas dapat ditunjukkan dengan membandingkan hasil uji sampel dengan standar (ICH, 2005).

1.3.4. Kecermatan (*Accuracy*)

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

Kecermatan harus diuji dengan menggunakan minimal 9 kali pengujian terhadap setidaknya 3 konsentrasi (80, 100, dan 120%) (ICH, 2005; APVMA, 2004). Kriteria kecermatan sangat tergantung pada konsentrasi analit dalam matriks sampel, pada tabel 1. ditunjukkan rentang penerimaan persen perolehan kembali berdasarkan kandungan analit dalam sampel.

Tabel I.1. Rentang penerimaan % *recovery* (APVMA, 2004)

Kandungan Analit dalam Sampel (%)	Rentang Penerimaan <i>Recovery</i> (%)
≥ 10	98 – 102
≥ 1	90 – 110
0,1 sampai 1	80 – 120
$< 0,1$	75 - 125

Kecermatan dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standart addition*).

a. Metode Simulasi

Dalam metode simulasi, sejumlah analit murni ditambahkan ke dalam campuran pembawa (plasebo), lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya).

b. Metode Penambahan Baku

Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan) (Harmita, 2004).

1.3.5. Keseksamaan (*Precision*)

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 homogen. Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*) (Harmita, 2004). Keterulangan merupakan keseksamaan metode yang dilakukan berulang kali oleh analis yang

sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek, sedangkan ketertiruan merupakan keseksamaan metode yang dikerjakan pada kondisi yang berbeda, biasanya dilakukan oleh analis yang berbeda dalam laboratorium yang berbeda dan menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut yang berbeda pula.

Terdapat dua pilihan cara yang diperbolehkan oleh ICH (2005) dalam melakukan keseksamaan keterulangan.

- 1) Dilakukan dengan minimal sembilan penentuan yang meliputi rentang yang diharapkan (misalnya, tiga konsentrasi / tiga pengulangan seperti pada uji kecermatan), atau
- 2) Minimal enam penentuan pada konsentrasi 100%.

Keseksamaan biasanya dinyatakan sebagai varians, standar deviasi atau koefisien variasi dari serangkaian pengukuran. Kriteria keseksamaan dapat diterima jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Namun kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Pada tabel 2. ditunjukkan rentang kriteria penerimaan keseksamaan berdasarkan APVMA.

Tabel I.2. Kriteria Penerimaan Keseksamaan

Analit dalam Sampel (%)	Nilai Keseksamaan
$\geq 10,0$	$\leq 2\%$
1,0 sampai 10,0	$\leq 5\%$
0,1 sampai 1,0	$\leq 10\%$
$< 0,1$	$\leq 20\%$