

**ANALISIS SIKLAMAT PADA AGAR-AGAR YANG BEREDAR DI PASAR WAGE
PURWOKERTO DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

Rizki Widyaningsih*, Pri Iswati Utami*

*Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuwaluh,
PO Box 202, Purwokerto 53182*

ABSTRAK

Telah dilakukan penetapan kadar siklamat dalam makanan kemasan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sampel yang digunakan adalah agar-agar yang beredar di Pasar Wage Purwokerto. KCKT yang digunakan adalah fase terbalik dengan fase diam kolom *shimpack octadesylsilane* (ODS) dan fase gerak metanol:air (30:70) dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah detektor UV dengan panjang gelombang pengukuran 220 nm. Penentuan linierita pada kurva kalibrasi menunjukkan hubungan yang linier antara luas area dengan konsentrasi siklamat. Persamaan kurva kalibrasi adalah $y = 0,959 x + 0,003$ ($r=0,999$). Nilai *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantitation* (LOQ) berturut-turut sebesar $6,5 \times 10^{-3}$ dan 0,022 mg/mL. Hasil uji presisi menunjukkan metode memiliki presisi yang baik dengan nilai *relative standard deviation* (RSD) sebesar 0,31%, namun ketepatan metode kurang memenuhi persyaratan. Berdasarkan hasil penetapan kadar, diperoleh bahwa kadar rata-rata siklamat dalam sampel agar-agar diperoleh sebesar 1,99 mg/mL.

Kata kunci: siklamat, KCKT, pemanis buatan

ABSTRACT

It has been done the determination of cyclamate in food packaging by high performance liquid chromatography (HPLC). The samples used were seaweed jelly circulating in the traditional market in Purwokerto. HPLC is used reversed-phase column with a stationary phase shimpack octadesylsilane (ODS) and a mobile phase of methanol: water (30:70) with a flow rate of 1 mL / min. The detector used is a UV detector at 220 nm wavelength measurements. The calibration curve showed a linear relationship between the concentration of cyclamate and peak area. Calibration curve equation is $y = 0.959 x + 0.003$ ($r = 0.999$). Value limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ), were 6.5×10^{-3} and 0.022 mg / mL respectively. Precision test results show the method has a good precision with a value relative standard deviation (RSD) of 0.31%, but the accuracy of the method does not meet the requirements. Based on the assay results, obtained that average levels of cyclamate in seaweed jelly samples obtained at 1.99 mg/mL.

Keywords: HPLC, cyclamate, sweeteners.

Pendahuluan

Dewasa ini penggunaan bahan tambahan makanan (BTM) sangat beragam, dari pengawet sampai ke pemberi aroma dan pemanis. Penggunaan BTM dalam proses produksi pangan perlu diwaspadai bersama, baik oleh produsen maupun konsumen, mengingat penggunaannya mempunyai efek menguntungkan maupun merugikan bagi kesehatan masyarakat (Donatus, 1990).

Salah satu BTM adalah pemanis buatan. Pemakaian pemanis buatan oleh produsen makanan olahan baik industri besar maupun yang berskala rumahan (industri kecil) banyak digunakan karena dapat menghemat biaya produksi. Hal tersebut karena harga pemanis buatan jauh lebih murah dibandingkan dengan pemanis gula asli. Jumlah pemanis buatan yang perlu ditambahkan juga jauh lebih sedikit jika dibandingkan dengan pemanis gula.

Di Indonesia, penggunaan pemanis buatan diatur berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. III/MenKes/Per/IX/88 tentang bahan tambahan makanan. Peraturan tersebut menyatakan tentang BTM yang diizinkan, yaitu batas penggunaan "secukupnya" yaitu batas

penggunaan yang sesuai dengan cara produksi yang baik (DepKes, 1988).

Pada penelitian ini, pemanis buatan yang diteliti adalah siklamat di dalam sampel agar-agar dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sampel agar-agar dipilih mengingat jenis makanan ini merupakan makanan yang banyak digemari oleh anak-anak. Mengingat siklamat jika dikonsumsi terlalu sering dan dalam jumlah yang banyak dapat menyebabkan efek merugikan maka menjadi sangat penting untuk menentukan kadar siklamat dalam sampel makanan tersebut.

Metode Penelitian

Bahan: baku siklamat, sampel agar-agar, metanol pro KCKT (Merck), aquabidestilata (Otsuka).

Alat: seperangkat alat KCKT (Shimadzu LC- 10) yang dilengkapi dengan detektor UV SPD-10; *ultrasonic batch* (Bronson 1510); pompa vakum; vakum filter 0,45 μm ; *microsiringe* 100 μl ; kolom shim-pack C-18; alat-alat gelas yang dipakai dalam laboratorium Kimia Analisis, neraca analitik (Shimadzu AY 220).

Cara Kerja

1. Pembuatan Berbagai Larutan

- a. Fase gerak dibuat dengan mencampurkan metanol dan air dengan perbandingan 30 : 70 (v/v).
- b. Larutan stok siklamat baku: Ditimbang 100 mg baku siklamat kemudian dilarutkan dalam aquabidestilata sampai volume 100 mL.
- c. Pembuatan larutan untuk baku siklamat: dari larutan stok dipipet 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; dan 10,0 mL masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu ditepatkan volumenya dengan aquabidestilata sehingga diperoleh konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/mL.

2. Penentuan Kondisi Analisis Optimum

Kondisi analisis optimum dibuat berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, yaitu:

Fase gerak : metanol:air (30:70) v/v

Laju alir : 1 mL/menit

Volume injeksi : 20 μ L

Detektor : UV 220 nm

3. Validasi Metode Analisis

- a. Pembuatan kurva baku: larutan siklamat baku dengan konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/mL disuntikkan ke KCKT sesuai dengan kondisi yang telah ditetapkan. Dibuat kurva hubungan antara konsentrasi siklamat dan luas area Luas puncak siklamat.
- b. Penentuan batas deteksi (*limit of detection* / LOD) dan batas kuantitasi (*limit of quantitation* / LOQ): LOD dan LOQ dihitung secara statistik dari persamaan kurva baku.
- c. Uji ketelitian: disiapkan lima larutan baku siklamat 0,5 mg/mL dan disuntikkan ke KCKT, dicatat luas area dan waktu retensi masing-masing puncak untuk kemudian dihitung koefisien variasinya.
- d. Uji ketepatan: Uji ketepatan dilakukan dengan metode addisi yaitu dengan menghitung persentase *recovery*.

Uji *recovery* dilakukan dengan memasukkan 1,0 mL larutan baku siklamat 0,5 mg/mL ke dalam 2,0 mL larutan sampel. Kemudian dilakukan diperlakukan seperti pada perlakuan penetapan kadar siklamat pada sampel agar-agar. Luas area masing-masing dicatat kemudian dihitung perolehan kembali dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ recovery} = \frac{\{(Kadar \text{ sampel} + \text{ baku}) - (\text{kadar sampel})\}}{\text{Kadar sebenarnya}} \times 100 \%$$

4. Penetapan Kadar Siklamat

Sampel agar-agar diencerkan 5 kali, kemudian diambil 2,0 mL dan

Validasi Metode Analisis Siklamat

a. Linearitas

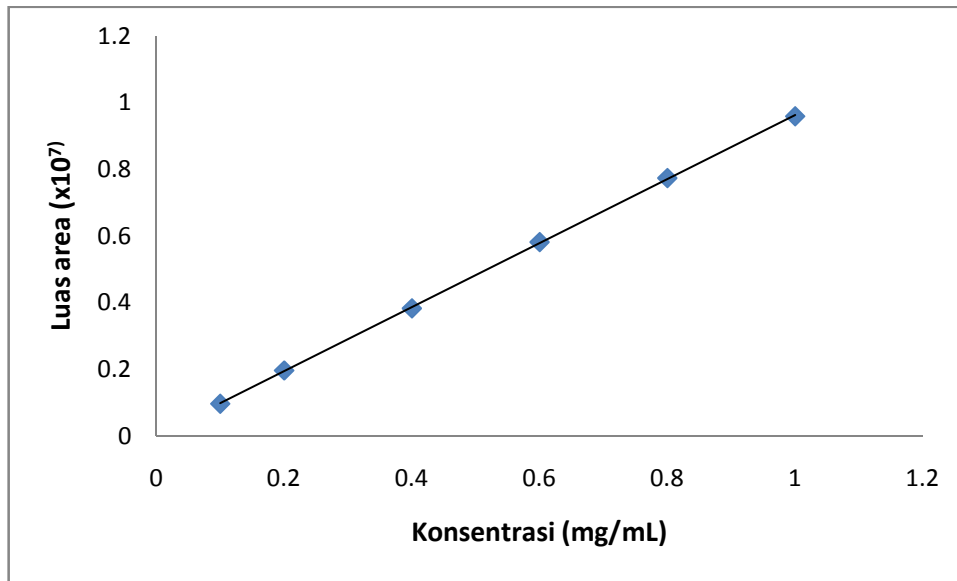
Linieritas yang juga menunjukkan sensitivitas dapat dilihat dari persamaan garis lurus hubungan antara konsentrasi siklamat dan luas area yang diperoleh. Berdasarkan perhitungan statistik diperoleh persamaan garis $y = 0,959$

dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Ditambahkan aquabidestilata sampai tanda dan disaring. Kemudian diinjeksikan ke KCKT. Luas area yang diperoleh dicatat untuk menghitung kadar siklamat dalam sampel agar-agar dengan menggunakan persamaan kurva baku.

Hasil dan Pembahasan

Penetapan kadar natrium siklamat dalam sampel agar-agar dilakukan dengan metode KCKT menggunakan fase diam C18 yang non polar dan fase gerak metanol : aquabidestilata (30:70) yang bersifat polar. Sistem ini merupakan sistem fase terbalik.

$x + 0,003$ dengan koefisien korelasi (r) 0,999. Nilai (r) bisa diterima karena (r) tabel < (r) hitung yaitu $0,917 < 0,9995$ dengan derajat bebas 4 dan taraf kepercayaan 1% sehingga memenuhi uji linearitas serta menunjukkan bahwa metode ini memiliki sensitivitas yang baik.



Gambar 1. Kurva hubungan konsentrasi siklamat (mg/mL) dan luas area

b. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

LOD dan LOQ ditentukan dengan perhitungan statistik dari kurva baku. Diperoleh nilai LOD dan LOQ berturut-turut sebesar $6,5 \times 10^{-3}$ dan 0,022 mg/mL.

c. Ketelitian

Berdasarkan uji ketelitian diperoleh nilai koefisien variasi (KV) = 0,31 %. Menurut Snyder *et al.* (1997), nilai KV yang dapat diterima adalah $\leq 2\%$. Dengan nilai KV yang memenuhi persyaratan menunjukkan bahwa ketelitian metode ini dikatakan baik sehingga

keterulangan hasil pengukuran dapat dipercaya.

d. Ketepatan

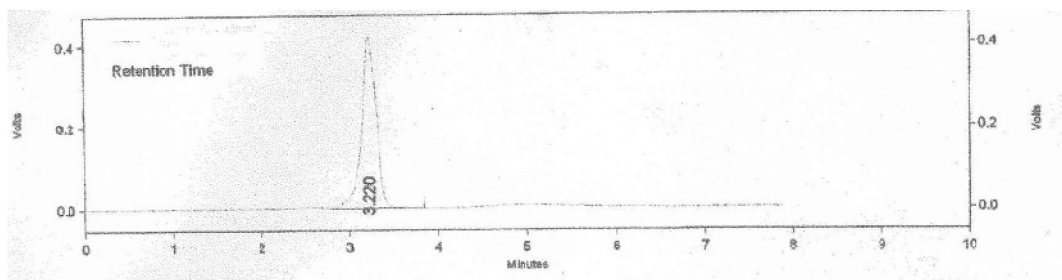
Hasil uji ketepatan dengan penentuan perolehan kembali (*recovery*) diperoleh nilai perolehan kembali yang tidak berada pada rentang yang diharapkan sehingga menunjukkan bahwa metode analisis penetapan kadar siklamat secara KCKT ini belum mampu memberikan hasil yang akurat karena tidak memberikan % *recovery* yang dapat diterima (80% - 120%). Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena adanya kesalahan sistematis yang

berkontribusi terhadap ketepatan hasil analisis. Suatu metode mempunyai ketepatan yang baik apabila nilai perolehan kembali berkisar antara 80-120% (Gunawan,1994).

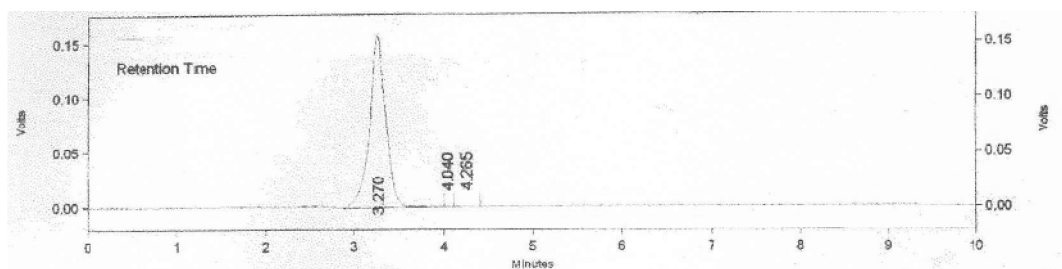
Penetapan Kadar Siklamat dalam Sampel agar-agar

Analisis kualitatif terhadap siklamat dengan metode KCKT dilakukan untuk mengidentifikasi

kebaradaan siklamat dalam sampel agar-agar sebelum dilakukan penetapan kadarnya. Identifikasi adanya siklamat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi puncak baku siklamat dan puncak dari sampel. Waktu retensi adalah selang waktu yang diperlukan oleh linarut (solut) mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor (Mulya & Suharman, 1995).



Gambar 2. Kromatogram baku siklamat



Gambar 3. Kromatogram sampel agar-agar

Penetapan kadar siklamat bertujuan untuk mengetahui kadar siklamat yang terdapat di dalam agar-agar. Dengan menggunakan kurva baku siklamat yang

telah dibuat, luas area puncak siklamat dalam sampel digunakan untuk menghitung kadar siklamat dalam sampel. Berdasarkan hasil perhitungan,

diperoleh kadar siklamat dalam sampel sebedar $1,99 \pm 7,7 \cdot 10^{-4}$ mg/mL (KV=0,35%).

Siklamat aman dikonsumsi asalkan sesuai dengan batas maksimum menurut ADI (*acceptable daily intake*) yaitu suatu batasan berapa banyak konsumsi bahan tambahan makanan setiap hari yang dapat diterima dan dicerna setiap hari sepanjang hayat tanpa mengalami resiko kesehatan (Winarno & Titi, 1994).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dengan menggunakan metode KCKT pada sampel agar-agar yang beredar di Pasar Wage Purwokerto maka disimpulkan bahwa di dalam sampel yang diteliti mengandung siklamat dengan kadar rata-rata 1,99 mg/mL.

Daftar Pustaka

- Depkes RI, 1988, *Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 722/Men Kes/Per/IX/88*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Donatus, I.A., 1990, *Toksikologi Pangan*, Ed ke-1, Lab. Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi UGM, PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Gunawan, I., 1994, *Metode Validasi Pada Analisis Kimia*,

Pendidikan Kelanjutan
Apoteker, Surabaya :
Fakultas Farmasi
Universitas Airlangga

- Mulya, M. & Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, Surabaya, Airlangga University Press.
- Snyder, L.R, Joseph, K., & Josephl, G. 1997. *Practical HPLC Method Development Second Edition*. New York USA: John and Wiley & Sons.
- Winarnro, F.G., dan Titi, S.R., 1994, *Bahan Tambahan Makanan dan Kontaminan*, Pustaka Harapan, Jakarta.