

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

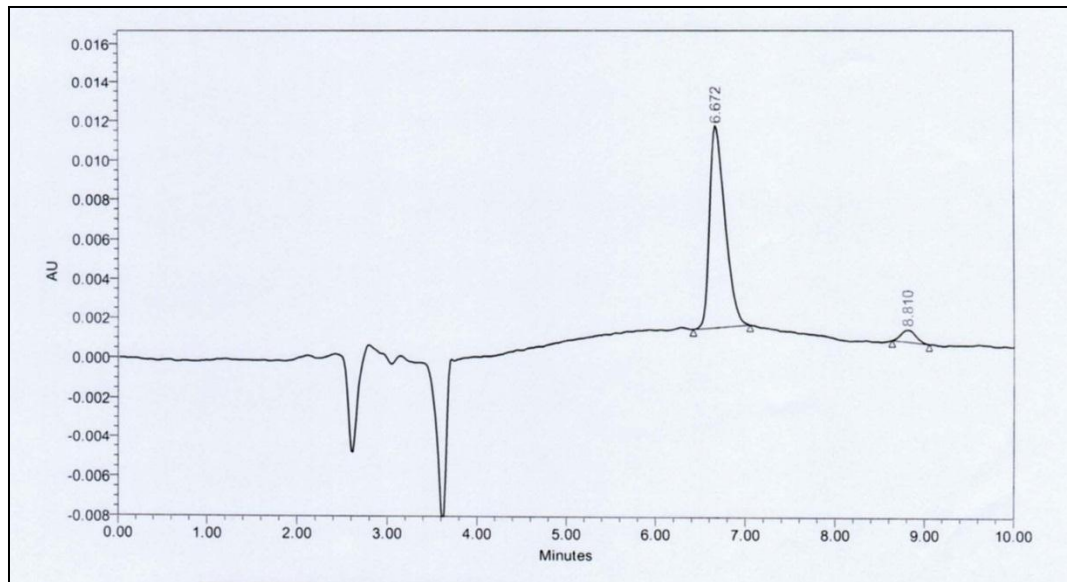
#### **A. Hasil Penelitian**

##### **1. Optimasi Sistem KCKT**

Sistem KCKT yang digunakan untuk analisis senyawa siklambat adalah sebagai berikut:

Fase diam	: C <sub>18</sub>
Fase gerak	: dapar fosfat pH 3,5 : asetonitril (80:20)
Elusi	: isokratik
Volume injeksi	: 20 µl
Kecepatan alir	: 1 ml/menit
Detektor UV	: panjang gelombang 195 nm

Hasil dari optimasi sistem untuk menganalisis senyawa siklambat dengan konsentrasi 0,08 g/kg diperoleh waktu retensi 6,672 menit. Konsentrasi 0,08 g/kg dipilih karena dianggap sebagai konsentrasi yang dapat mewakili dari konsentrasi terkecil (0,01 g/kg) hingga konsentrasi terbesar (0,2 g/kg) dengan data kromatogram dapat dilihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Kromatogram Standar Siklamat

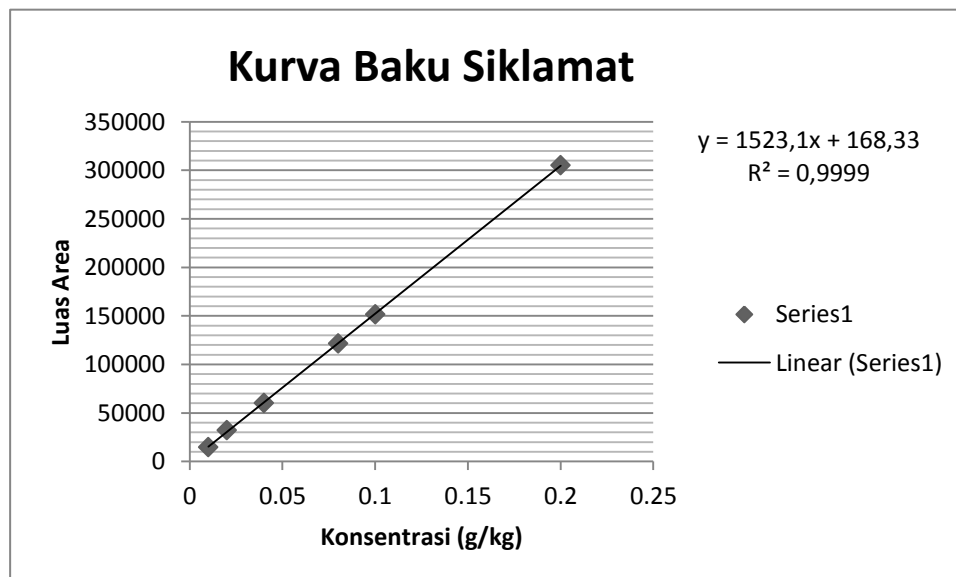
## 2. Validasi Metode Analisis

### a. Linieritas Kurva Baku Siklamat

Uji linieritas dilakukan pada seri larutan baku standar siklamat dengan konsentrasi 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; dan 0,2 g/kg. Hasil uji diperoleh persamaan garis  $y = 1523,1x + 168,33$  dan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,9999. Tabel linieritas kurva baku siklamat dapat dilihat pada tabel 4. dan gambar 5.

**Tabel 4.** Linearitas

<b>Kadar (g/kg)</b>	<b>Luas Area</b>
<b>0,01</b>	14954
<b>0,02</b>	32449
<b>0,04</b>	60302
<b>0,08</b>	121669
<b>0,1</b>	151721
<b>0,2</b>	305294
<b>Slope (b)</b>	1523,1
<b>Aksis Intercept (a)</b>	168,33
<b>Koefisien korelasi (r)</b>	0,9999

**Gambar 5.** Kurva Baku Siklamat

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

Dari hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi, diperoleh batas dekesi (LOD) adalah  $2,22 \times 10^{-3}$  g/kg dan nilai batas kuantitasi (LOQ) adalah  $7,399 \times 10^{-3}$  g/kg. (perhitungan pada lampiran).

**Tabel 5.** LOD dan LOQ

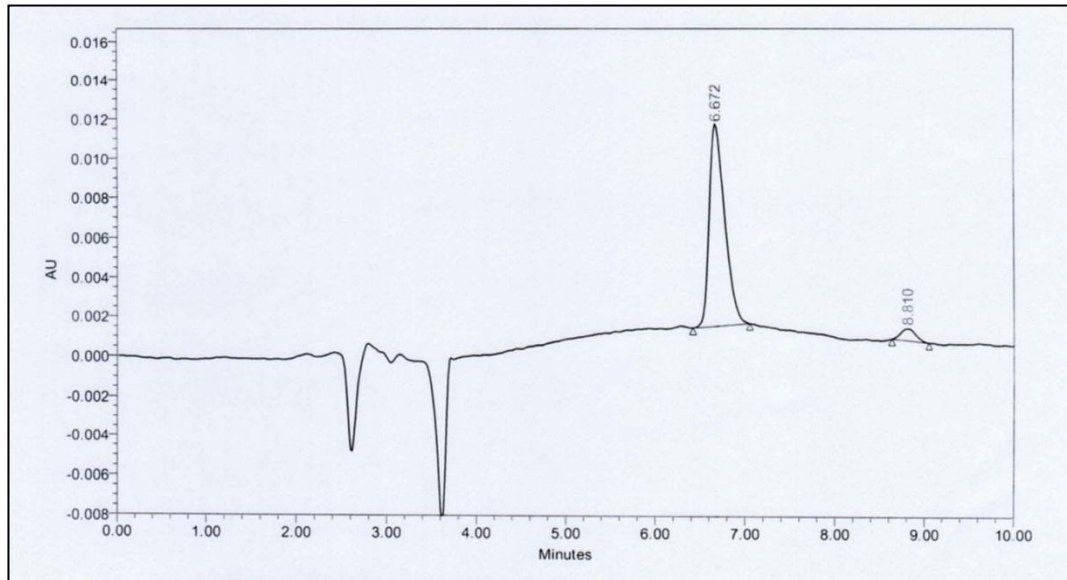
Zat Pemanis	LOD (g/kg)	LOQ (g/kg)
Siklamat	$2,22 \times 10^{-3}$	$7,399 \times 10^{-3}$

### c. Spesifisitas

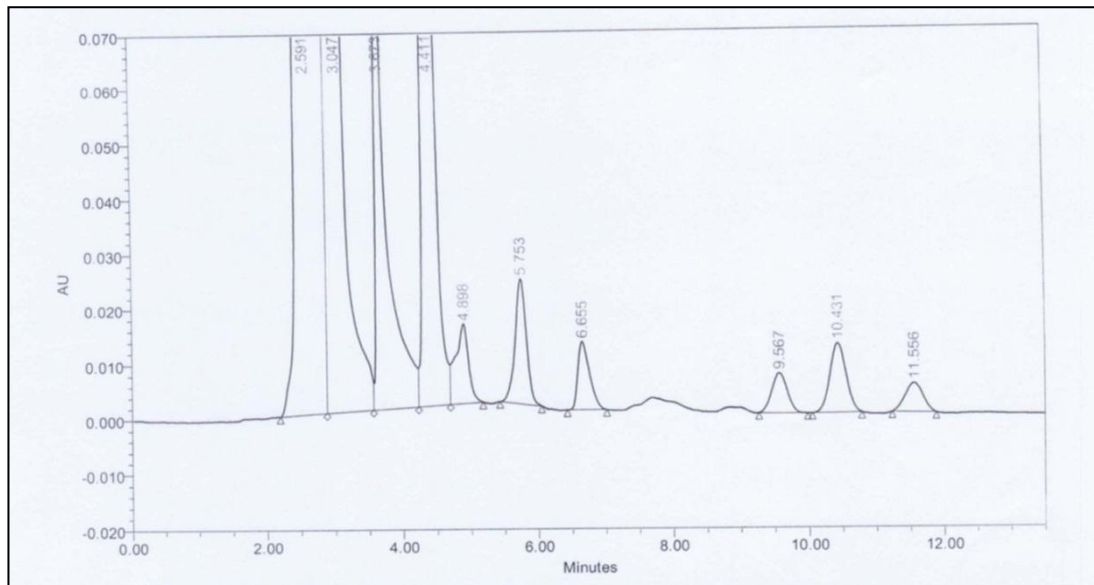
Uji spesifisitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu metode untuk mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang ada dalam matriks sampel. Dilakukan dengan membandingkan rata-rata waktu retensi dan kromatogram larutan baku siklamat dengan rata-rata waktu retensi dan kromatogram sampel. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel 6, gambar 6 dan gambar 7.

**Tabel 6.** Perbandingan Pengamatan Waktu Retensi

<b>Konsentrasi larutan baku siklambat (g/kg)</b>	<b>Waktu retensi larutan baku siklambat (menit)</b>	<b>Sampel</b>	<b>Waktu retensi sampel (menit)</b>
<b>0,01</b>	6,673		
<b>0,02</b>	6,748		
<b>0,04</b>	6,711	Replikasi 1	6,655
<b>0,08</b>	6,672	Replikasi 2	6,685
<b>0,1</b>	6,663	Replikasi 3	6,663
<b>0,2</b>	6,567		
<b>Rata-rata waktu retensi larutan baku siklambat</b>			6,672
<b>Rata-rata waktu retensi sampel</b>			6.667



**Gambar 6.** Waktu Retensi Larutan Baku Siklomat 0,08 g/kg = 6,672 menit



**Gambar 7.** Waktu Retensi Sampel Replikasi 1 = 6,655 menit

### 3. Penetapan Kadar Siklamat dalam Sampel

Hasil penetapan kadar siklamat dalam sampel menggunakan sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan tiga kali replikasi dan dihitung berdasarkan persamaan regresi linier diperoleh rata-rata sebesar  $0,47 \pm 0,058$  g/kg bahan. Penetapan kadar siklamat dari masing-masing replikasi dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Hasil Penetapan Kadar Siklamat

<b>Sampel</b>	<b>Replikasi</b>	<b>Berat Sampel (g)</b>	<b>Luas Area</b>	<b>Kadar Siklamat (g/kg)</b>	<b>Rata- rata (g/kg)</b>	<b>SD (g/kg)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Minuman berenergi</b>	R1	1,00004	148237	0,48	0,47	0,058	12,37
	R2	0,99998	124177	0,40			
	R3	1,00008	158683	0,51			

## **B. Pembahasan**

### **1. Optimasi Sistem KCKT**

Sebelum uji penetapan kadar siklamat terlebih dahulu dilakukan optimasi sistem KCKT. Optimasi dilakukan untuk mencari sistem KCKT yang optimum dengan kondisi yang seefektif dan seefisien mungkin. Optimasi sistem KCKT dilakukan untuk melihat daya elusi dan waktu retensi yang diperoleh. Fase gerak yang digunakan dalam elusi menggunakan fase terbalik, yaitu campuran antara dapor fosfat pH 3,5 dan asetronitril dengan perbandingan (80 : 20) dan fase diam yang digunakan adalah C<sub>18</sub>. Proses elusi dilakukan dengan cara isokratik dimana elusi dengan menggunakan komposisi fase gerak yang sama tanpa ada perubahan perbandingan fase gerak yang digunakan. Pemilihan sistem KCKT tersebut didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Hatta (2013).

Sistem kromatografi fase terbalik, memiliki daya elusi (*eluent strenght*) yang berbanding terbalik dengan kepolaran fase gerak. Semakin lemah kepolaran fase gerak maka akan semakin besar daya elusinya (Harris, 1999). Pada sistem KCKT fase terbalik, fase diam C<sub>18</sub> bersifat non polar sehingga pada kondisi ini apabila suatu campuran yang terdiri dari beberapa senyawa dielusi pada kolom C<sub>18</sub> dengan fase gerak yang



polar, senyawa yang relatif non polar cenderung tertahan di kolom sehingga waktu retensinya lebih panjang dibandingkan senyawa lain yang relatif lebih polar (Snyder *et al.*, 1997).

Perbedaan polaritas analit menyebabkan perbedaan kecepatan migrasi dan menimbulkan pemisahan senyawa-senyawa kimia dalam suatu larutan. Pada kondisi tersebut maka senyawa siklamat yang bersifat polar akan lebih cepat keluar dari kolom dan memiliki waktu retensi yang relatif cepat.

Penggunaan kolom C<sub>18</sub> karena siklamat merupakan senyawa polar sehingga siklamat mampu dipisahkan oleh kolom fase terbalik karena kolom ini memiliki gugus oktadesil silika (ODS atau C<sub>18</sub>) yang mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Gandjar & Rohman, 2007). Selain itu, kolom C<sub>18</sub> memiliki jumlah C yang banyak sehingga sifat fase diam ini cenderung bersifat non polar, akibatnya pemisahan terhadap siklamat akan semakin baik.

Pada penggunaan kolom fase terbalik ini, fase gerak yang digunakan bersifat polar. Fase gerak yang digunakan adalah dapar fosfat dengan pH 3,5 dan asetonitril dengan perbandingan 80:20. Pemilihan dapar fosfat sebagai fase gerak dimungkinkan untuk mengondisikan

suasana pH analit yang akan diidentifikasi pada kondisi panjang gelombang 195 nm, sehingga diharapkan mampu menghasilkan puncak kromatogram yang ideal.

Detektor yang digunakan dalam analisis ini adalah detektor UV. Detektor UV merupakan detektor yang banyak digunakan pada pemakaian instrumen KCKT, karena sebagian besar solut mampu menyerap sinar ultraviolet (Harris, 1999). Suatu senyawa dapat dideteksi oleh sinar UV apabila memiliki gugus kromofor dan aoksokrom. Kedua gugus tersebut yang bertanggung jawab dalam penyerapan radiasi ultraviolet senyawa siklamat pada sampel. Siklamat dalam strukturnya memiliki gugus kromofor dan aoksokrom, dengan demikian siklamat dapat dideteksi oleh sinar UV.

Berdasarkan pemilihan sistem KCKT tersebut menunjukkan bahwa sistem KCKT yang digunakan memberikan hasil puncak kromatogram yang baik (tidak mengekor/ *tailing peak*) dan memberikan waktu retensi yang cukup cepat, yaitu pada menit ke 6,672.

## **2. Penyiapan Fase Gerak dan Larutan Baku Siklamat**

Fase gerak sebelum digunakan harus disaring dengan menggunakan membran filter ukuran 0,45  $\mu\text{m}$  untuk menghilangkan partikel asing dan endapan dalam campuran yang dapat menyebabkan penyumbatan kolom

dan kerusakan pompa. Setelah disaring, fase gerak di *degassing* selama 15 menit untuk menghilangkan gas-gas dalam fase gerak yang dapat mempengaruhi kerja dari detektor karena akan menghasilkan sinyal palsu/bias.

Pembuatan larutan baku standar siklamat bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang digunakan dalam menetapkan kadar senyawa siklamat dalam minuman berenergi dengan nomor registrasi POMSD152246XXX.

Larutan standar siklamat dibuat dengan melarutkan standar siklamat dengan aquabides dan di *degassing* selama 15 menit, lalu disaring dengan membran filter 0,45  $\mu\text{m}$ . Proses *degassing* selain difungsikan untuk menghilangkan gas-gas yang terlarut dalam larutan juga untuk menyebarkan nanopartikel yang masih dapat melewati membran filter 0,45  $\mu\text{m}$  dalam larutan sampel (Khopkar, 2008). Hasil pembuatan larutan baku mendapatkan hasil yang larut dan sudah memenuhi syarat untuk digunakan analisis dengan KCKT.

### **3. Validasi Metode Analisis**

#### **a. Hasil Kurva Baku dan Linieritas**

Kurva baku merupakan suatu kurva yang dibuat dengan membandingkan antar konsentrasi kadar dengan luas areanya. Melalui

kurva baku dapat diketahui linieritas metode yang digunakan. Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Koefisien korelasi ( $r$ ) merupakan parameter linieritas yang menggambarkan proporsionalitas respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur, linieritas dikatakan baik jika nilai  $r > 0,99$ .

Berdasarkan data kurva baku siklamat yang terdiri dari 6 konsentrasi yaitu 0,01 g/kg; 0,02 g/kg; 0,04 g/kg; 0,08 g/kg; 0,1 g/kg; dan 0,2 g/kg diperoleh antara kadar dan area adalah  $y = 1523,1x + 168,33$  dengan nilai koefisien regresi  $r = 0,9999$ . Sehingga terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik dengan konsentrasi yang diukur karena meningkatnya konsentrasi diikuti pula oleh meningkatnya luas area yang dihasilkan.

Menurut ICH (2005), Nilai  $r$  yang dihasilkan telah memenuhi persyaratan, yaitu harus lebih besar dari 0,990. Nilai  $r$  yang diperoleh mendekati satu sehingga dapat dikatakan bahwa kurva memiliki kelinieran yang tinggi, artinya dengan meningkatnya konsentrasi siklamat maka luas area juga akan mengalami kenaikan yang linier, sehingga

metode yang digunakan telah memenuhi syarat linieritas untuk digunakan pada penetapan kadar siklamat dalam minuman berenergi.

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

Batas deteksi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi sedangkan batas kuantitasi adalah konsentrasi analit terendah yang masih dapat diukur secara kuantitatif. Secara statistik perhitungan LOD dan LOQ diperoleh melalui garis regresi linier kurva baku siklamat. Nilai LOD dan LOQ menggambarkan sensitivitas dari suatu metode, semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif metode tersebut. Hasil perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada tabel 5.

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa konsentrasi terkecil siklamat yang masih dapat dideteksi oleh metode KCKT sebesar  $2,22 \times 10^{-3}$  g/kg dan konsentrasi terkecil yang masih dapat dikuantitasi secara presisi dan akurasi sebesar  $7,399 \times 10^{-3}$  g/kg. Hasil perhitungan yang dilakukan menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki sensitivitas yang bagus.

#### **c. Spesifisitas**

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks

sampel. Dari data yang didapat menunjukkan bahwa rata-rata waktu retensi dari 6 konsentrasi larutan baku siklambat adalah 6,672 menit, sedangkan rata-rata waktu retensi dari sampel adalah 6,667 menit. Waktu retensi dapat digunakan sebagai parameter penentuan spesifisitas karena waktu retensi adalah parameter analisis kualitatif suatu senyawa dalam campuran sampel pada metode KCKT. Selain menggunakan perbandingan rata-rata waktu retensi larutan baku siklambat dan sampel, penentuan spesifisitas dapat dilakukan melalui perbandingan kromatogram larutan baku siklambat dan kromatogram sampel. Dari dua perbandingan tersebut, diketahui waktu retensi larutan baku siklambat konsentrasi 0,08 g/kg adalah 6,672 menit dan sampel replikasi 1 adalah 6,655 menit. Dengan demikian, baik perbandingan rata-rata waktu retensi maupun perbandingan kromatogram memberikan hasil waktu retensi yang relatif sama, sehingga memenuhi salah satu parameter validasi yaitu spesifisitas.

#### **4. Hasil Pengujian Kadar**

Berdasarkan pada *European Standard* EN 12857:1999, preparasi sampel dapat dilakukan dengan penambahan larutan pengestraksi 1 dan 2 yang berfungsi untuk mengendapkan lemak dan protein. Larutan pengestraksi 1 yaitu kalium heksasianoferat (II) trihidrat

( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) bersifat basa sehingga akan menghidrolisis lemak dalam sampel, sedangkan larutan pengekstraksi 2 yaitu zink sulfat heptahidrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) bersifat asam sehingga protein dalam sampel akan terkoagulasi. Penambahan larutan pengekstraksi tersebut dimaksudkan untuk mengurangi jumlah zat-zat dalam sampel yang akan dideteksi oleh detektor sehingga jumlah puncak kromatogram dapat berkurang dan tidak terjadi *peak overlap* atau puncak kromatogram yang saling tindih. Hal itu dapat mempermudah identifikasi puncak siklamat dalam sampel.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah minuman berenergi dengan nomor registrasi POMSD152246XXX yang mengandung pemanis buatan siklamat yang beredar dipasaran. Pada sampel terdapat zat-zat selain siklamat yang terdeteksi oleh detektor. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi puncak yang dihasilkan oleh sampel untuk memastikan bahwa puncak itu adalah puncak dari siklamat. Identifikasi puncak dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi yang dihasilkan oleh sampel dengan waktu retensi standar siklamat. Waktu retensi untuk standar siklamat 6,672 menit. Dari hasil kromatogram sampel terdapat puncak yang memiliki waktu retensi yang

sama atau mendekati dengan waktu retensi standar siklamat yang menunjukkan bahwa pada sampel terdapat siklamat.

Sampel minuman berenergi dengan nomor registrasi POMSD152246XXX termasuk dalam kategori suplemen makanan sehingga berdasarkan Keputusan Kepala BPOM Nomor HK.00.05.5.1.4547 Tahun 2004 tentang persyaratan penggunaan bahan tambahan pangan pemanis buatan dalam produk pangan, kategori suplemen makanan, yaitu tidak lebih dari 1,25 g/kg bahan.

Hasil penetapan kadar siklamat dalam minuman berenergi yang diteliti dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dari tiga kali replikasi, diperoleh rata-rata sebesar  $0,47 \pm 0,058$  g/kg bahan, cukup aman dikonsumsi karena tidak melebihi persyaratan yang ditetapkan menurut Keputusan Kepala BPOM Nomor HK.00.05.5.1.4547 Tahun 2004 tentang persyaratan penggunaan bahan tambahan pangan pemanis buatan dalam produk pangan.