

**PENETAPAN KADAR NATRIUM SAKARIN DAN NATRIUM SIKLAMAT  
PADA KERTAS ROKOK SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS  
DENSITOMETRI**

**DWIJAYANTI KRISMAYA NURHANDINI**

**0706197295**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN FARMASI  
DEPOK  
2010**

**PENETAPAN KADAR NATRIUM SAKARIN DAN NATRIUM SIKLAMAT  
PADA KERTAS ROKOK SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS  
DENSITOMETRI**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**Oleh :**

**DWIJAYANTI KRISMAYA NURHANDINI**

**0706197295**



**DEPOK**

**2010**

SKRIPSI : PENETAPAN KADAR NATRIUM SAKARIN DAN NATRIUM  
SIKLAMAT PADA KERTAS ROKOK SECARA KLT  
DENSITOMETRI

NAMA : DWIJAYANTI KRISMAYA NURHANDINI

NPM : 0706197295

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010



DR. HARMITA, APT

PEMBIMBING I



DRS. UMAR MANSUR, MSC.

PEMBIMBING II

Tanggal lulus ujian Sidang Sarjana : ..... Januari 2010

Penguji I : Drs. Hayun, Msi.....

Penguji II : Prof. Dr. Endang Hanani.....

Penguji III : Dr. Joshita Djajadisastra, MS.....

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT, karena atas segala rahmat, anugerah serta karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini. Shalawat dan salam tak lupa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Skripsi yang berjudul penetapan kadar natrium sakarin dan natrium siklamat pada kertas rokok secara KLT Densitometri ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi, Departemen Farmasi Universitas Indonesia. Penelitian dalam rangka penyusunan skripsi ini dilakukan sepenuhnya di Laboratorium Kimia Kuantitatif, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Harmita, Apt. selaku pembimbing I dan Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc selaku pembimbing II yang telah bersedia memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.

3. Bapak Dr. Abdul Mun'im selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
4. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
5. Bapak Drs. Hayun, Msi, selaku kepala Laboratorium Kimia Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Seluruh staff pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI
7. Para karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu terlaksananya penelitian ini
8. Kedua orang tua, kakak, adik, dan keponakan penulis atas doa, cinta, kasih sayang, dukungan serta bantuannya kepada penulis selama ini.
9. Seluruh rekan-rekan Farmasi Ekstensi 2007, terutama rekan-rekan Laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif : Anyu, Pika, Fabel, Galih, Koba, Fitri, Angel, Kak Inggga, Kak Deffi, Kak Rima, Kak Dede, dan Tika yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.
10. Untuk sahabat-sahabatku : Nila, Anyu, Ayu, Heny, Deiz, Lia, Kiki, dan Yuli yang telah memberikan semangat kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya, baik dari segi ilmiah maupun penyajiannya. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi rekan-rekan Farmasi khususnya dan para pengembang ilmu pengetahuan pada umumnya.

Penulis

2010

## ABSTRAK

Pemanis telah lama digunakan dalam kertas rokok bagian ujung yang langsung berkontak dengan mulut perokok. Pemanis buatan yang biasa digunakan pada kertas rokok yakni natrium sakarin dan natrium siklamat. Adanya batasan penggunaan pemanis buatan, maka perlu diteliti kandungan natrium sakarin dan natrium siklamat, salah satunya yang terdapat pada kertas rokok. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar natrium sakarin dan natrium siklamat pada kertas rokok secara kromatografi lapis tipis densitometri, menggunakan lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan campuran butanol–asam asetat–air (4:1:1) sebagai fase gerak. Natrium sakarin dianalisis pada panjang gelombang 276 nm, menghasilkan nilai Rf 0,61 dan natrium siklamat dianalisis pada panjang gelombang 523 nm menggunakan penampak bercak larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1), menghasilkan nilai Rf 0,56; Hasil penelitian ini menunjukkan koefisien variasi kurang dari 2% dan akurasi antara 98-102%. Kurva kalibrasi natrium sakarin dilakukan pada rentang 50–300 µg/mL menghasilkan linieritas 0,9996. Kurva kalibrasi natrium siklamat dilakukan pada rentang 600-1600 µg/mL menghasilkan linieritas 0,9990. Dari ketiga sampel kertas rokok, pemanis yang ditemukan adalah natrium sakarin.

Kadar natrium sakarin dari ketiga sampel kertas rokok yakni AM 0,4735%; LL 0,3424%; dan GG 0,4557%.

Kata kunci : natrium sakarin, natrium siklamat, kertas rokok, KLT  
Densitometri

Xiii + 84 hal; lamp; gbr; tab

Bibliografi: 32 (1979-2007)



## ABSTRACT

Sweeteners have long been used in cigarette paper to direct the tip into contact with the smoker's mouth. Artificial sweetener commonly used in cigarette paper is sodium saccharin and sodium cyclamate. The existence of limitations on use of artificial sweeteners, it is necessary to study the content of sodium saccharin and sodium cyclamate, contained in cigarette paper. In this research, determination of sweeteners in cigarette paper by Thin Layer Chromatography Scanner, using silica gel plates  $F_{254}$  as the stationary phase, and the mixture of buthanol-acetic acid-aquadest (4:1:1) as the mobile phase. Sodium saccharin were analyzed at a wavelength of 276 nm, Rf value 0,61 and sodium cyclamate were analyzed at a wavelength of 523 nm, using brom 5% in dichlormethane and fluorescein 0,25% in mixture of dimethylformamide-ethanol (1:1) as spray reagents, Rf value 0,56. This experiment showed lower than 2% precission and accuracy between 98-102%. Sodium saccharin calibration curve performed in the range 50-300  $\mu\text{g/mL}$  produce 0,9996 linearity. Sodium cyclamate calibration curve performed in the range 600-1600  $\mu\text{g/mL}$  produce 0,9990 linearity. Of the three samples of cigarette paper, a sweetener was found is sodium saccharin. Sodium saccharin levels of the three samples of cigarette paper is AM 0,4735%; LL 0,3424%; dan GG 0,4557%.



Keywords : sodium saccharin, sodium cyclamate, cigarette paper, TLC

Scanner

Xiii + 84 pages; pictures; tables; appendixes.

Bibliography: 32 (1979-2007)



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar belakang.....	1
B. Tujuan penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Pemanis buatan.....	4
B. Rokok.....	15
C. Kromatografi lapis tipis.....	17
D. Validasi metode analisis.....	24
<b>BAB III. ALAT BAHAN DAN CARA KERJA</b>	
A. Lokasi.....	30
B. Alat.....	30
C. Bahan.....	30
D. Cara kerja.....	31

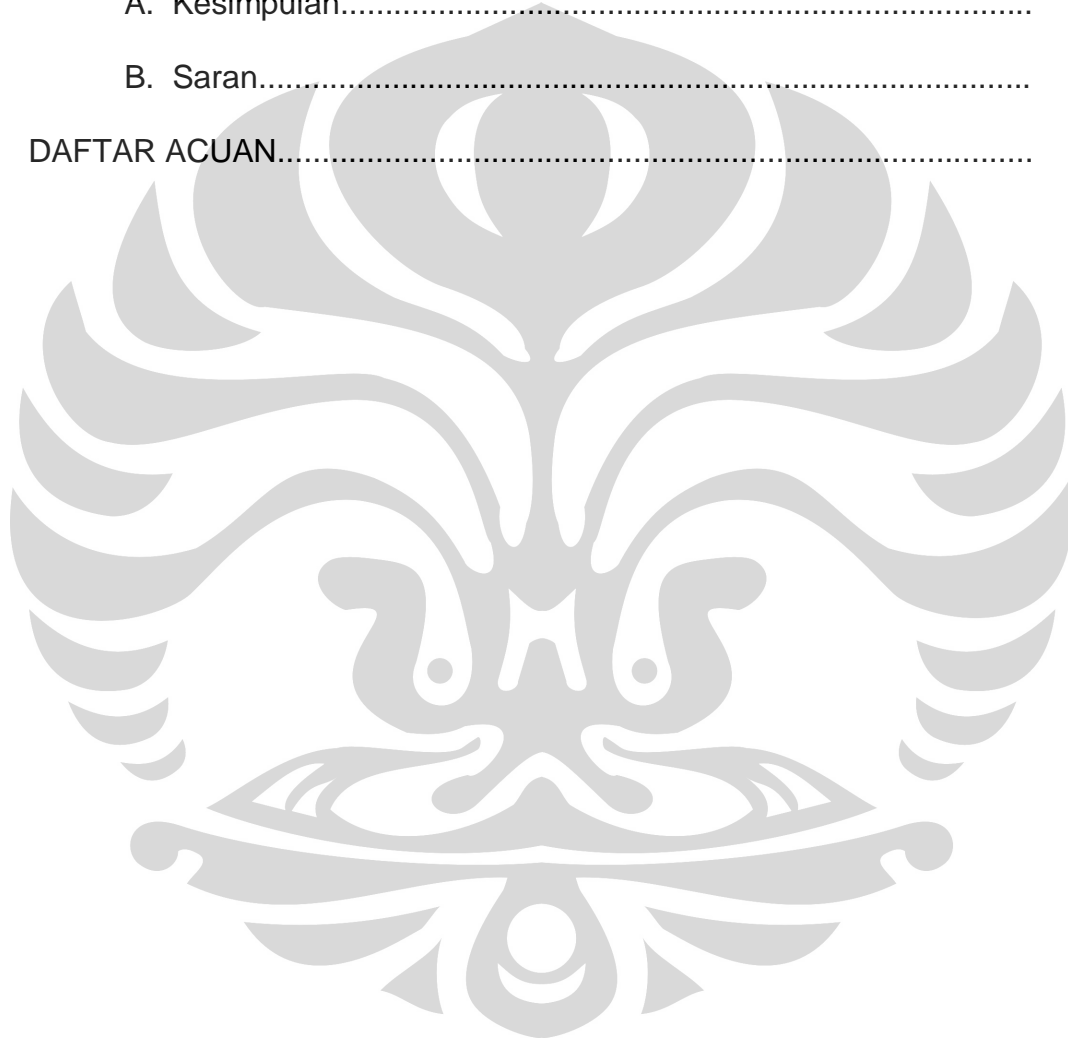
**BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

A. Hasil.....	36
B. Pembahasan.....	40

**BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN**

A. Kesimpulan.....	45
B. Saran.....	45

DAFTAR ACUAN.....	46
-------------------	----



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumus struktur natrium sakarin.....	6
2. Rumus struktur natrium siklamat.....	9
3. Alat TLC <i>scanner</i> 3 (Camag) beserta komputer yang dilengkapi program winCATS.....	52
4a. Kurva serapan natrium sakarin 100 µg/mL dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 200-400 nm, $\lambda$ max 270 nm.....	52
4b. Kurva serapan natrium siklamat 1000 µg/mL dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 200-400 nm, $\lambda$ max 211 nm.....	53
5a. Kurva densitas natrium sakarin 1000 µg/mL dengan fase gerak butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9) pada $\lambda$ 254 nm.....	53
5b. Kurva densitas natrium siklamat 1000 µg/mL dengan fase gerak butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9) pada $\lambda$ 254 nm.....	54
6a. Kurva densitas natrium sakarin 1000 µg/mL dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 254 nm.....	54
6b. Kurva densitas natrium siklamat 1000 µg/mL dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 254 nm.....	55
7. Bercak natrium siklamat dengan fase gerak butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9) dan bercak natrium siklamat dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1).....	55

8a. Kurva serapan bercak natrium sakarin pada panjang gelombang 200-400 nm dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1), $\lambda$ max 276 nm.....	56
8b. Kurva serapan bercak natrium siklambat pada panjang gelombang 200-700 nm dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1), $\lambda$ max 523 nm.....	56
9a. Kurva kalibrasi natrium sakarin.....	57
9b. Kurva kalibrasi natrium siklambat.....	57
10. Kurva densitas perolehan kembali natrium sakarin 80% dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 276 nm.....	58
11. Kurva densitas perolehan kembali natrium sakarin 100% dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 276 nm.....	58
12. Kurva densitas perolehan kembali natrium sakarin 120% dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 276 nm.....	59
13a. Kurva densitas sampel AM dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 276 nm.....	59
13b. Kurva serapan bercak sampel AM dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin, $\lambda$ max 276 nm.....	60
13c. Kurva serapan bercak sampel AM dibandingkan dengan bercak standar natrium siklambat, fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 523 nm.....	60

14a. Kurva densitas sampel LL dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 276 nm.....	61
14b. Kurva serapan bercak sampel LL dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin, $\lambda$ max 276 nm.....	61
14c. Kurva serapan bercak sampel LL dibandingkan dengan bercak standar natrium siklamat, fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 523 nm.....	62
15a. Kurva densitas sampel GG dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 276 nm.....	62
15b. Kurva serapan bercak sampel GG dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin, $\lambda$ max 276 nm.....	63
15c. Kurva serapan bercak sampel AM dibandingkan dengan bercak standar natrium siklamat, fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada $\lambda$ 523 nm.....	63
16. Bercak sampel AM, bercak sampel LL, bercak sampel GG dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin dan bercak natrium siklamat.....	64

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nilai Rf pada variasi fase gerak.....	66
2. Kurva kalibrasi dan linearitas natrium sakarin.....	67
3. Batas deteksi dan batas kuantitasi natrium sakarin.....	68
4. Uji keterulangan natrium sakarin.....	69
5. Kurva kalibrasi dan linearitas natrium siklambat.....	70
6. Batas deteksi dan batas kuantitasi natrium siklambat.....	71
7. Uji keterulangan natrium siklambat.....	72
8. a. Penetapan kadar sampel AM.....	73
b. Penetapan kadar sampel LL.....	74
c. Penetapan kadar sampel GG.....	75
9. Uji perolehan kembali natrium sakarin.....	76

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan kurva kalibrasi.....	78
2. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi.....	79
3. Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi.....	80
4. Perhitungan uji perolehan kembali.....	81
5. Perhitungan penetapan kadar.....	82
6. Sertifikat analisa standar natrium sakarin.....	83
7. Sertifikat analisa standar natrium siklambat.....	84



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Rasa manis merupakan satu dari empat rasa utama (manis, asin, pahit, dan asam) yang sangat digemari manusia. Penggunaan pemanis buatan pada saat ini telah bertambah jenisnya. Pemakaiannya dalam sediaan dapat secara tunggal ataupun dalam bentuk campuran dua atau lebih. Pencampuran ini dimaksudkan untuk menutupi kelemahan dari salah satu pemanis tersebut antara lain "*after taste*" atau rasa pahit yang tertinggal setelah mengkonsumsi zat tersebut (1).

Penggunaan pemanis saat ini telah berkembang dengan luas, selain digunakan untuk sediaan makanan dan farmasi, pemanis telah lama digunakan dalam kertas rokok bagian ujung yang langsung berkontak dengan mulut perokok. Hal ini dimaksudkan untuk menutupi rasa yang tidak enak atau tajam dari rokok dan memberikan suatu cita rasa sehingga akan timbul suatu kenikmatan saat menghisap rokok yang dapat menyebabkan peningkatan konsumsi dan adiktif terhadap rokok (2).

Pemanis yang biasa digunakan pada kertas rokok tersebut yakni sakarin, natrium sakarin, siklambat, dan natrium siklambat (3). Kedua pemanis tersebut merupakan pemanis buatan yang dalam pemakaiannya harus

mendapatkan pengawasan. Penggunaan pemanis buatan harus sesuai dengan ketentuan yang telah diatur berdasarkan peraturan Menteri Kesehatan RI No 208/Menkes/Per/IV/85 tentang pemanis buatan dan peraturan Menteri Kesehatan RI No 722/Menkes/Per/1X/88 tentang bahan tambahan pangan. Dalam peraturan tersebut tercantum bahwa jumlah pemanis yang digunakan disesuaikan dengan *Acceptance Daily Intake* (ADI) untuk masing-masing pemanis buatan dan penggunaannya harus dicantumkan dalam sediaannya dengan keterangan jumlah yang digunakan (4,5). Namun, seperti telah diketahui bahwa penggunaan pemanis pada kertas rokok tidak dicantumkan jumlah ataupun jenis pemanis yang digunakan pada sediaannya yakni pada bungkus rokok. Oleh karena itu, diadakanlah penelitian untuk mengetahui jenis pemanis dan penetapan kadar pemanis yang digunakan dalam kertas rokok.

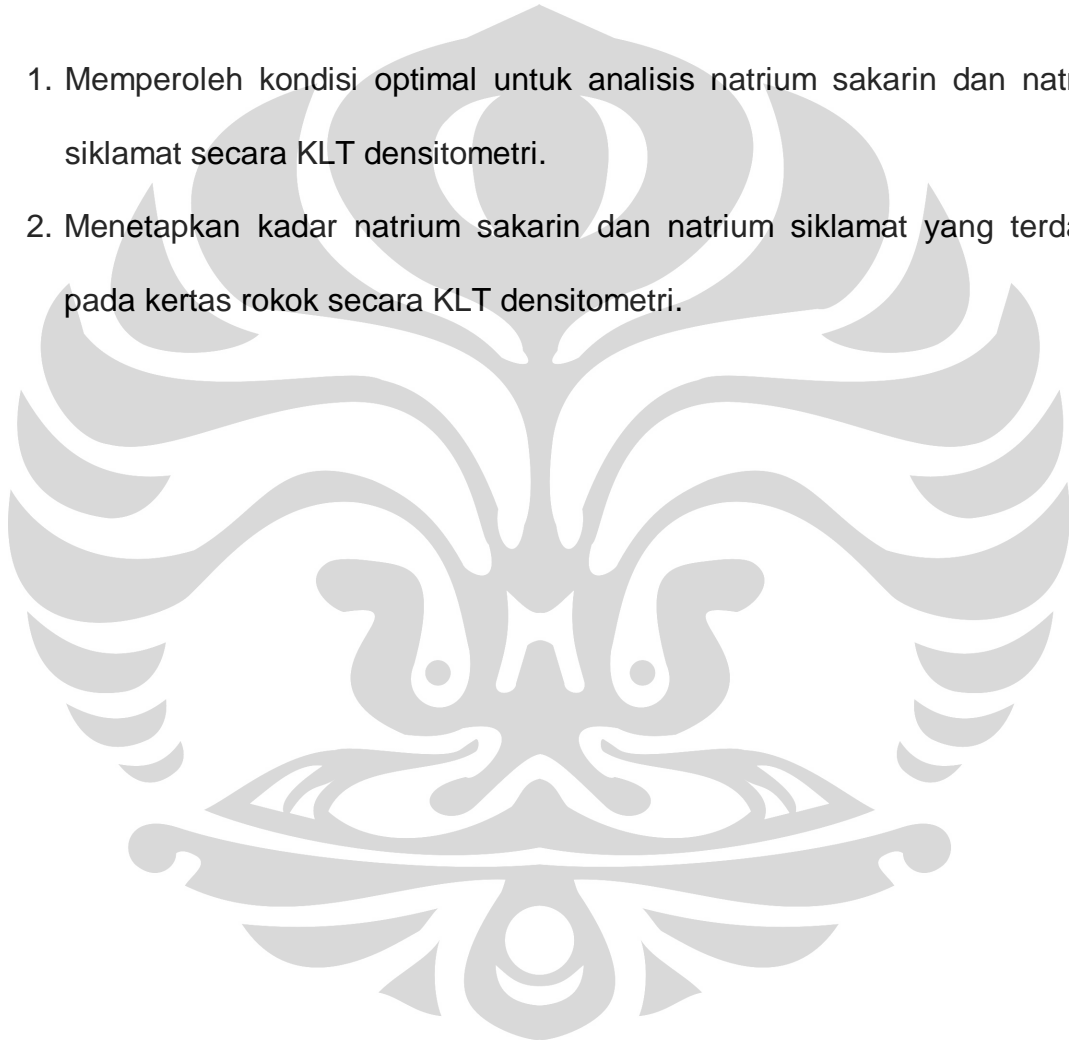
Metode analisis kuantitatif yang dipilih untuk analisis pemanis pada kertas rokok adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dikarenakan penyiapan sampel, peralatan dan metode yang digunakan relatif lebih sederhana, waktu analisis relatif cepat yaitu dalam satu kali elusi dapat menganalisis lebih dari satu sampel. Selain itu biaya operasional yang dibutuhkan juga lebih murah (6).

Sebelum melakukan analisis kuantitatif pemanis secara KLT densitometri, terlebih dahulu dilakukan optimasi dan validasi agar didapatkan metode analisis dengan tingkat sensitivitas yang cukup tinggi, sesedikit mungkin kesalahan, dan dapat dipercaya. Dengan dilakukan optimasi dan

validasi ini, diyakini bahwa metode KLT densitometri dapat digunakan untuk analisis pemanis pada kertas rokok.

## **B. TUJUAN PENELITIAN**

1. Memperoleh kondisi optimal untuk analisis natrium sakarin dan natrium siklamat secara KLT densitometri.
2. Menetapkan kadar natrium sakarin dan natrium siklamat yang terdapat pada kertas rokok secara KLT densitometri.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. PEMANIS BUATAN

##### 1. Definisi dan teori

Pemanis buatan adalah bahan tambahan pangan yang dapat menyebabkan rasa manis pada produk pangan yang tidak atau sedikit mempunyai nilai gizi atau kalori, hanya boleh ditambahkan ke dalam produk pangan dalam jumlah tertentu. Jika dibandingkan dengan jenis zat aditif lainnya, kelompok bahan pemanis lebih beragam. Keragaman tersebut mencakup sumber, rumus struktur, dan intensitas rasa manis (5).

Bahan pemanis yang kita kenal strukturnya sangat beragam, ada yang sederhana dan ada yang cukup rumit. Penjelasan teoritik mengenai tedapatnya rasa manis pada suatu senyawa dijelaskan melalui beberapa pandangan, antara lain (1, 8) :

- a. Menurut Cohn (1914), rasa manis disebabkan oleh adanya gugus  $-OH$  dalam molekul suatu senyawa. Pandangan ini dilandaskan bahwa molekul-molekul gula didominasi oleh gugus  $-OH$ . Cohn berpendapat makin banyak gugus  $-OH$  dalam molekul senyawa, makin manis rasanya.
- b. Tahun 1919, Oertly dan Myers mengemukakan bahwa suatu senyawa akan memiliki rasa manis jika dalam molekulnya terdapat glukofor dan

aüksogluk. Glukofor adalah gugus yang bertanggung jawab atas rasa manis senyawa, sedangkan aüksogluk adalah bagian molekul yang fungsinya meningkatkan rasa manis. Contoh : glukofor pada etilen glikol adalah HO-CH<sub>2</sub>OH-CH-

- c. Pada tahun 1948, Tsuzuki menyatakan bahwa adanya hubungan yang erat antara energi resonansi senyawa dengan rasa manis atau rasa pahit. Disimpulkan bahwa senyawa dengan energi resonansi tinggi memiliki rasa manis.
- d. Pada tahun 1967, Shallenberger dan Acree menyatakan bahwa suatu senyawa memiliki rasa manis maka dalam molekulnya harus memiliki 2 atom elektronegatif. Pada atom elektronegatif yang pertama (A) harus terikat sebuah proton, sedangkan jarak atom elektronegatif kedua (B) terhadap (A) sekitar 3 Å.

## 2. Jenis Pemanis (9, 10)

Pemanis ada 2 jenis, yaitu: pemanis yang menghasilkan kalori (pemanis nutritif) dan pemanis yang sedikit atau tidak menghasilkan kalori (pemanis non nutritif).

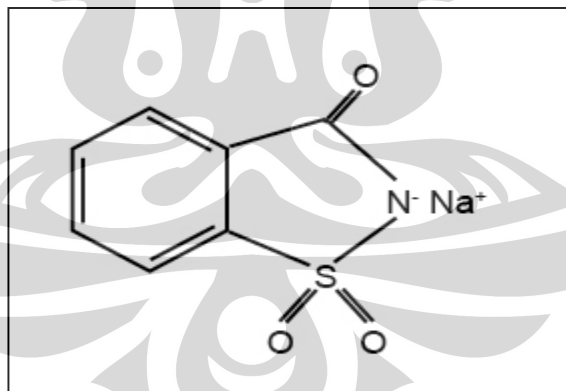
Pemanis yang menghasilkan kalori (pemanis nutritif), antara lain:

- a. Berasal dari tanaman atau hewan, seperti gula tebu (sukrosa) yang diekstrak dari tebu (*Saccharum officinarum* L), madu yang dihasilkan oleh lebah madu.

- b. Berasal dari penguraian (hidrolisa) karbohidrat antara lain glukosa, dekstrosa, maltosa, laktosa, fruktosa.

Pemanis yang tidak menghasilkan kalori (pemanis non nutritif), antara lain:

- a. Berasal dari tanaman seperti steviosida yang berasal dari tanaman herba *Stevia rebaudiana*, yang dijumpai di Paraguay.
- b. Berasal dari reaksi kimia, antara lain:
- 1) Sakarin (1,2-Benzisotiazolin-3-on-1,1-dioksida)
  - 2) Siklamat (asam sikloheksilsulfamat)
  - 3) Aspartam (L-aspartil-L-fenilalanin metil ester)
3. Natrium sakarin (12, 13)



Gambar 1. Rumus struktur natrium sakarin (12)

a. Sakarin

Definisi : sakarin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0%  $C_7H_5NO_3S$ , dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

Nama kimia : 1,2-Benzisotiazolin-3-on-1,1-dioksida.

Rumus molekul :  $C_7H_5NO_3S$

Bobot molekul : 183,18

Pemerian : serbuk atau hablur, putih; tidak berbau atau berbau aromatik lemah.

Kelarutan : larut dalam 290 bagian air, dalam 25 bagian air mendidih, dalam 31 bagian etanol, dalam 12 bagian aseton dan dalam 50 bagian gliserol.

Titik lebur :  $228,8^{\circ}$ - $229,7^{\circ}C$

Kegunaan : pemanis buatan

b. Natrium sakarin

Definisi : natrium sakarin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0%  $C_7H_4NNaO_3S$ , dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

Nama kimia : natrium 1,2-benzisotiazolin-3-on 1,1-dioksida.

Rumus molekul :  $C_7H_4NNaO_3S$

Bobot molekul : 205,20

Pemerian : hablur atau serbuk hablur, putih; tidak berbau atau agak aroantik; rasa sangat manis walau dalam larutan encer.

Kelarutan : larut dalam 1,5 bagian air dan dalam 50 bagian etanol(95%) P

Titik lebur : 226°-230°C

Kegunaan : pemanis buatan

Identifikasi (11) :

1. Dicampur 20 mg zat dengan 40 mg resorsinol, ditambahkan 10 tetes asam sulfat, dipanaskan perlahan-lahan hingga campuran menjadi hijau tua. Didinginkan dan ditambahkan 10 mL air dan 10 mL natrium hidroksida; cairan berfluorosensi hijau.
2. Dilarutkan 0,1 g zat dalam 5 mL natrium hidroksida, dipanaskan perlahan-lahan, diuapkan hingga kering, dileburkan sisa dengan hati-hati di atas nyala api kecil, dibiarkan hingga dingin, dilarutkan dalam lebih kurang 20 mL air, dinetralkan dengan asam klorida encer, disaring. Pada filtrat ditambahkan 1 tetes besi (III) klorida; terjadi warna ungu hingga ungu kemerahan.

Sakarin pertama kali ditemukan oleh ilmuwan dari Universitas John Hopkins pada tahun 1879. Pada mulanya sakarin digunakan sebagai antiseptik dan pengawet makanan. Penggunaannya pada makanan berkembang secara bertahap setelah abad ke 20 terutama pada perang dunia II saat dunia kekurangan produksi gula (14).

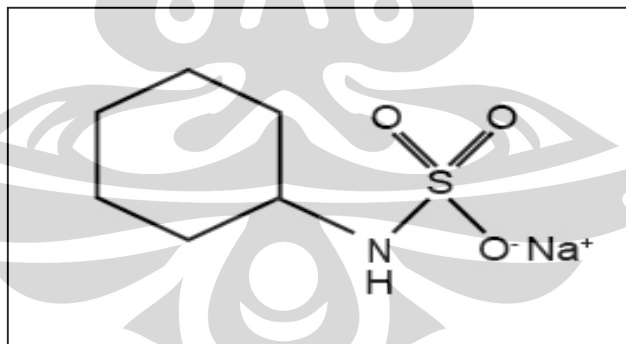
Garam natrium lebih mudah larut dalam air, maka yang digunakan sebagai bahan pemanis adalah natrium sakarin. Bahan pemanis sintetis ini mempunyai tingkat kemanisan tinggi yakni 300-500 kali sukrosa, bahkan



masih dapat dirasakan manisnya dalam pengenceran 1:100.000. *Acceptance Daily Intake* (ADI) menurut WHO yakni 2,5 mg/ kgBB untuk sakarin dan garam kalsium, fosfat, dan natrium sakarin (7, 8, 15).

Natrium sakarin yang terserap ke dalam tubuh tidak mengalami metabolisme sehingga akan diekskresikan melalui urin tanpa perubahan kimia 24-28 jam setelah dimakan. Sakarin memiliki *after taste* berupa rasa pahit, stabil pada suhu tinggi. Digunakan untuk mengurangi insiden kerusakan gigi, penderita diabetes, dan kegemukan. Hasil penelitian menyebutkan sakarin dapat menginduksi kanker kandung kemih pada tikus jantan. Oleh karena itu, penggunaan pada manusia harus diawasi. (7, 8, 9, 16).

#### 4. Natrium siklamat (12, 17)



Gambar 5. Rumus struktur natrium siklamat (12)

##### a. Siklamat

Nama Kimia : asam sikloheksilsulfamat

Rumus molekul :  $C_6H_{13}NO_3S$

Bobot molekul : 179,24

Pemerian : kristal manis – asam  
Kelarutan : sangat sukar larut dalam air  
Titik lebur : 169°-170°C

b. Natrium siklamat

Definisi : natrium siklamat mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0%  $C_6H_{12}NNaO_3S$ , dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

Nama kimia : natrium sikloheksilsulfamat

Rumus molekul :  $C_6H_{12}NNaO_3S$

Bobot molekul : 201,22

Pemerian : hablur atau serbuk hablur, putih; tidak berbau atau hampir tidak berbau.

Kelarutan : praktis tidak larut dalam benzen dan kloroform; 1:250 dalam etanol (95%); 1:25 dalam propilen glikol; 1:5 dalam air; dan 1:1 dalam air pada 45°C.

Kegunaan : pemanis buatan.

Identifikasi (11) : dilarutkan 0,1 g zat dalam 10 mL air, ditambahkan 1 mL asam klorida dan 1 mL barium klorida, larutan tetap jernih. Ditambahkan 1 mL natrium nitrit, terbentuk endapan putih.

Metode deteksi natrium siklamat untuk KLT densitometri yaitu menyemprotkan bercak natrium siklamat dengan larutan brom 5% dalam diklormetan, kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25%

dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1), menghasilkan bercak berwarna pink (27).

Siklamat pertama kali ditemukan oleh seorang ilmuwan dari *University of Illinois* pada tahun 1937, yang merupakan ketidaksengajaan karena ilmuwan tersebut salah meletakkan rokok pada tumpukan kristal, saat rokok tersebut dihisap terasa manis yang ternyata disebabkan oleh derivat *cyclohexyl sulfamic acid* (14).

Intensitas kemanisan siklamat 30 kali sukrosa. Menurut ketentuan FAO atau WHO, ADI untuk siklamat yakni 11 mg/ kgBB. Siklamat sebagai pemanis buatan hanya diperbolehkan untuk diet kalori rendah dan penderita diabetes melitus. Biasanya siklamat yang digunakan adalah natrium siklamat. Rasa manisnya akan berkurang bila konsentrasinya makin rendah dan bila sampai 0,5% timbul rasa pahit (8, 16).

Dalam pembuatan siklamat digunakan sikloheksilamin sebagai bahan awal. Sikloheksilamin ini dapat berpengaruh terhadap kesehatan bila penggunaannya lama, antara lain bahaya kanker, dimana terjadi mutasi atau perubahan genetik, bahaya reproduksi yang dapat menghambat perkembangan fetus, dapat merusak testis dan mengurangi fertilitas pada wanita, dan dapat meningkatkan tekanan darah (7, 8, 9).

Hasil evaluasi *national research council committee* tahun 1985 menyimpulkan bahwa siklamat tidak karsinogenik, tetapi dari hasil penelitian *in vitro* dan *in vivo* disimpulkan sebagai pendorong terjadinya kanker (*cancer promoting*) atau *co-carcinogenic activity* (9).

5. Metode uji untuk campuran pemanis buatan

a. Penetapan kadar sakarin, asesulfam, dan aspartam dalam minuman ringan (18).

Alat : HPLC dengan pompa 2 Perkin-Elmer 410 LC.

Kolom : LiChrosorb RP18, 10  $\mu\text{m}$  (250 x 4,6 mm I.D.).

Fase gerak : metanol dan buffer fosfat 0,1M (pH 4,0).

Laju alir : 1,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume injeksi 100  $\mu\text{L}$ .

b. Penetapan kadar sakarin, aspartam dalam minuman bersoda secara KCKT (19).

Alat : KCKT model LC-6A.

Detektor : uv-vis model SPD-6AV.

Kolom : C-18 Latek (15 cm x 4,0 mm).

Fase gerak : campuran asetonitril dan dapar asetat.

Laju alir : 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume injeksi 20  $\mu\text{L}$ .

c. Analisis pemanis buatan campuran alitam, asesulfam K, dan aspartam dalam sediaan makanan (20).

Alat : KCKT Hitachi D-7000 series.

Kolom : kolom partisi ODS C-18.

Detektor : ultraviolet.

Fase gerak : campuran metanol dengan dapar fosfat 0,025M  
pH 5,3.

Laju alir : 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume injeksi 20  $\mu\text{L}$ .

d. Pemisahan aspartam, asesulfam K, dan sakarin (21).

Fase diam : lempeng silika G, w/UV, *glass backed* 250  
µm, 20x20cm, 25/pk.

Fase gerak : aseton–toluen–asam asetat glasial (2:2:1).

Deteksi : *TLC Scanner, dual wavelength uv*, 215/370nm.

Jarak migrasi : 9,5 cm dalam 30 menit.

e. Analisa sakarin dalam gula kelapa secara KLT densitometri (22).

Fase diam : lempeng silika gel GF 254.

Fase gerak : n butanol– etanol P–ammonia P–air (40:4:1:9).

Deteksi : pada 275 nm.

f. Penetapan kadar diazepam, fenobarbiton, dan sakarin dalam minuman alkohol (23).

Fase diam : lempeng silika gel G.

Fase gerak : kloroform-asam asetat (9:1).

Penampak bercak : klorinasi dengan o-tolidin.

g. Penetapan kadar sakarin, kofein, dan asam benzoat dalam minuman (24).

Fase diam : lempeng silika Adsorbsil RP.

Fase gerak : asetoniril-metil etil keton-larutan campuran  
ammonium asetat 0,6% dan asam asetat glasial  
2,4% (22:28:50).

Deteksi : pada 254 nm.

h. Penetapan kadar sakarin dan siklomat pada tablet *effervescent* (32).

Fase diam : lempeng selulosa mn 300G.

Fase gerak : aseton-etil asetat-amoniak 25% (8:1:1).

Penampang bercak : 0,1% metil merah dalam buffer fosfat pH 7.

i. Penetapan kadar sakarin, siklomat pada minuman berkarbonasi (32).

Fase diam : lempeng silika gel G.

Fase gerak : etil asetat – isopropanol – aseton – metanol – air  
(50:15:15:4:16).

Penampang bercak : uap brom dan 0,05% fluorescein.

j. Penetapan kadar pemanis natrium sakarin, kalsium siklomat, dulsin (27).

Fase diam : lempeng silika gel H (0,25 mm)

Fase gerak : butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9)

Penampang bercak : 5% brom dalam  $CCl_4$ , 0,25% fluorescein dalam dimetilformamida-etanol (1:1), 2% N-1-naftiletildiamin . 2HCl dalam alkohol.

## B. ROKOK

### 1. Sejarah rokok

Rokok adalah hasil olahan tembakau terbungkus termasuk cerutu atau bentuk lainnya yang dihasilkan dari tanaman *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* dan spesies lainnya atau sintetisnya yang mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan (25).

Rokok menjadi populer di Inggris sekitar tahun 1820, dan di Spanyol pada 1828. Produksi rokok dimulai sejak perang dunia I. Pada tahun 1930,

mulai diketahui bahwa rokok berefek buruk bagi kesehatan. Hal tersebut dibuktikan oleh Raymond Pearl, ahli biologi dari Amerika (26).

## 2. Komposisi Rokok (2)

Di Indonesia dikenal beberapa macam rokok, antara lain rokok putih dan rokok kretek. Rokok putih adalah rokok yang bahan utamanya adalah tembakau, saos, kertas, dan filter. Sedangkan untuk rokok kretek, komposisi utamanya yakni tembakau, cengkeh, saos, kertas, dan filter.

Lebih dari 3040 jenis bahan kimia dijumpai di dalam daun tembakau kering. Bahan-bahan kimia ini dapat berasal dari pertumbuhan daun tembakau itu sendiri, misalnya bersumber dari tanah, udara, dan bahan-bahan kimia yang digunakan baik di dalam proses pembuatan maupun penanaman tembakau.

## 3. Kertas rokok

Dalam pembuatan rokok, selain bahan utama berupa tembakau dan cengkeh juga dibutuhkan kertas rokok yang akan digunakan untuk membungkus atau melinting rokok. Kertas ini terbuat dari selulosa yang merupakan serat-serat yang terdapat pada dinding sel tumbuhan terutama bagian batang, dan dapat menggunakan zat tambahan yang dimaksudkan untuk menjaga warna tetap putih, membentuk abu yang baik dan menjaga pembakaran yang baik. Pada rokok filter juga terdapat filter yang terdiri dari empat bagian yaitu tow (rangkain selulosa asetat sebagai badan filter),

*plasticizer* (zat pelunak untuk mengikat filter), *plug wrap* (kertas pembungkus fiber filter) dan pelekat (sebagai pelekat *plug wrap*). Kertas tipping (*tipping paper*) yang merupakan kertas pembungkus filter yang menjangkau sampai ke batang rokok merupakan pengikat antara batang rokok dan batang filter, terbuat dari fiber selulosa (26).

Pada kertas tipping dilapisi dengan *flavoring agents* yang akan memberikan rasa saat awal merokok. Ide untuk menambahkan *flavoring agents* kedalam rokok dimulai sejak tahun 1861 di Hyams, Inggris. *Flavoring agents* yang digunakan bisa tunggal maupun kombinasi, diantaranya *coffee flavor, fruit flavors, aromatics vanilla, maple menthol, dan peppermint licorice*. Selain *flavoring agents* juga ditambahkan pemanis seperti sakarin, natrium sakarin, siklamat, dan natrium siklamat (3).

### **C. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

#### **1. Kromatografi**

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu sistemnya bergerak berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat tersebut menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, ukuran molekul atau kerapatan molekul ion (27).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak berfungsi



membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya. Umumnya zat terlarut dibawa melalui media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai penjerap, seperti halnya alumina dan silika gel yang telah diaktifkan, atau dapat bertindak untuk melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (27).

Salah satu metode kromatografi yang sering dilakukan dengan fase diam berupa zat padat adalah kromatografi lapis tipis yang telah dikembangkan sejak tahun 1938. Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah, lebih murah, dan peralatan yang digunakan lebih sederhana (6).

## 2. Penggunaan KLT

Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk analisis kualitatif dan dapat juga digunakan untuk analisis kuantitatif. Saat ini metode KLT banyak diaplikasikan untuk :

- a. Menganalisis kemurnian dari suatu senyawa secara sederhana.
- b. Memisahkan dan mengidentifikasi komponen-komponen zat dalam suatu campuran.
- c. Menganalisis komponen-komponen yang terkandung dalam suatu campuran senyawa secara kuantitatif.

Penggunaan metode KLT semakin luas dikarenakan metode ini memiliki banyak kelebihan, diantaranya adalah (6) :

- a. Penggunaannya mudah, waktu pemisahan cepat dan relatif lebih murah
- b. Polaritas pelarut atau jenis campuran pelarut dapat diubah berdasarkan percobaan, memudahkan untuk mengubah fase gerak.
- c. Memungkinkan untuk mengelusi beberapa cuplikan sekaligus sehingga waktu yang dibutuhkan untuk jumlah sampel yang banyak dapat lebih singkat.
- d. Jumlah cuplikan dan pelarut yang digunakan sedikit.
- e. Memungkinkan dilakukan penotolan cuplikan berganda.

Sedangkan kekurangan metode KLT yaitu keterulangan yang buruk bila analisis dilakukan pada lempeng yang berbeda. Hal ini disebabkan adanya kesulitan untuk membuat lempeng yang terulangan, bahkan dalam satu pabrik sekalipun. Perbedaan keterulangan ini dapat disebabkan variasi dari ukuran partikel ataupun ketebalan lempeng (6).

Kriteria zat yang dapat dianalisis dengan KLT antara lain :

- a. Dapat terdeteksi pada kromatogram, dapat dilarutkan, dapat dielusi dengan fase geraknya.
- b. Tidak bersifat volatil sehingga tidak menguap selama proses elusi dan pengeringan kromatogram.
- c. Harus stabil selama proses kromatografi, baik terhadap cahaya, udara dan pelarut yang digunakan.

Hal-hal yang harus diperhatikan untuk pelarut yang digunakan yaitu (29) :

- a. Campuran pelarut hanya boleh digunakan maksimum dua atau tiga kali.

- b. Komposisi campuran dapat berubah karena penyerapan atau penguapan.
- c. Komponen-komponen campuran pelarut mungkin bereaksi satu sama lain.

### 3. Sistem KLT

Pemisahan pada KLT terjadi karena adanya interaksi dari komponen-komponen yang akan dipisahkan dengan fase diam dan fase gerak yang digunakan.

#### a. Fase diam (fase stasioner)

Adsorben/ penjerap yang umumnya digunakan adalah silika gel, alumina, kieselghur dan selulosa karena strukturnya yang berpori dan luas permukaannya besar. Ukuran partikel rata-rata dari adsorben tersebut adalah antara 10 dan 50  $\mu\text{m}$ . Adsorben ini melapisi plat KLT yang dapat terbuat dari kaca atau aluminium dengan ketebalan 250  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya (30).

Sebelum digunakan, sebaiknya pelat kromatografi yang dilapisi adsorben dimurnikan dulu dengan cara mengelusinya menggunakan *prewashing agent* yaitu metanol. Hal ini dimaksudkan untuk membersihkan pelat dari pengotor-pengotor selain air. Selain dimurnikan dengan metanol, pelat juga harus diaktifkan dulu dengan pemanasan. Tujuannya adalah untuk mengangkat air yang mungkin terdapat pada permukaan fase diam. Temperatur yang digunakan maupun waktu pemanasan jangan terlalu tinggi

karena dapat menyebabkan perubahan pada komposisi fase diam. Temperatur juga jangan terlalu rendah karena dikhawatirkan masih ada sisa-sisa dari metanol sebagai *prewashing agent* (31).

#### b. Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dipilih berdasarkan sifat zat yang ingin dipisahkan dan juga tipe adsorben yang digunakan. Komposisi fase gerak bisa tunggal atau campuran yang terdiri dari tiga sampai empat campuran pelarut dengan proporsi tertentu. Sistem yang paling sederhana adalah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat terjadi secara optimal (30).

Pemilihan fase gerak sebaiknya memenuhi syarat (30, 31) :

- 1) Fase gerak harus dapat melarutkan zat aktif
- 2) Memberikan nilai  $R_f$  antara 0,2 – 0,8
- 3) Memberikan selektifitas yang cukup baik kepada komponen zat aktif yang akan dipisahkan
- 4) Fase gerak yang digunakan harus memiliki stabilitas yang baik
- 5) Memiliki viskositas yang rendah
- 6) Tidak toksik

#### 4. Metode Pengembangan KLT

Tahap selanjutnya pada KLT setelah penotolan sampel pada lempeng adalah mengembangkan sampel tersebut dalam bejana kromatografi yang

sebelumnya telah dijenuhkan dengan uap fase gerak (30). Ada beberapa metode untuk melakukan pengembangan dalam KLT (27, 28) :

a. Metode pengembangan menaik (*linear ascending development*)

Metode ini paling sering digunakan pada percobaan KLT. Pada metode ini, fase gerak bergerak naik pada lempeng. Metode ini merupakan metode yang paling sederhana. Fase gerak ditambahkan ke dalam bejana dan bagian paling bawah dari lempeng dicelupkan ke fase gerak. Fase gerak akan bergerak naik berdasarkan aksi kapiler.

b. Metode pengembangan mendatar (*linear horizontal development*)

Metode ini membutuhkan waktu yang lebih singkat daripada metode pengembangan menaik karena efek gravitasi tidak mempengaruhi gerakan dari fase gerak.

c. Metode pengembangan sirkuler (*circular development*)

Metode ini memindahkan fase gerak ke pusat dari lempeng KLT yang berbentuk lingkaran dan pengembangan berlangsung keluar dari pusat lempeng. Sampel yang terlarut dalam eluen bergerak menuju tepi lempeng secara konsentris.

d. Metode pengembangan antisirkuler (*anticircular development*)

Pada metode ini sampel ditotolkan di bagian luar bidang lempeng, dan fase gerak bergerak dari sekeliling lingkaran menuju ke pusat lempeng.

## 5. Perhitungan faktor retardasi (Rf)

Faktor retardasi (Rf) didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak rambat zat dengan jarak rambat eluen. Rf merupakan sifat khas dari suatu cuplikan untuk identifikasi suatu zat (31). Cara menghitung Rf dengan menggunakan rumus :

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_f - Z_o}$$

dimana :  
Rf = faktor retardasi  
Zs = jarak rambat zat dari posisi awal penotolan  
Zf = jarak elusi  
Zo = jarak awal elusi

## 6. Densitometri

Deteksi kromatogram merupakan tahap akhir yang penting dalam kromatografi. Densitometri merupakan metode yang sering digunakan pada KLT (30). Densitometer dapat bekerja secara serapan atau fluoresensi. Jenis sumber cahaya yang digunakan juga bermacam-macam, tergantung pada panjang gelombang yang digunakan, yaitu (31) :

- Lampu deuterium (untuk panjang gelombang 190-400 nm)
- Lampu raksa atau xenon (untuk panjang gelombang 254-578 nm)
- Lampu wolfram atau tungsten (untuk panjang gelombang 400-800 nm)

Pada sistem serapan dapat dilakukan dengan model pantulan atau transmisi. Pada cara pantulan, yang diukur adalah sinar yang dipantulkan

yang dapat menggunakan sinar tampak maupun ultraviolet. Sementara itu, cara transmisi dilakukan dengan menyinari bercak dari satu sisi dan mengukur sinar yang diteruskan pada sisi lain (30).

Sistem fluoresensi biasanya lebih disenangi jika senyawa itu dapat dibuat berfluoresensi. Batas deteksi sistem ini lebih rendah dan kelinieran respon dan selektivitasnya lebih tinggi (6).

#### **D. VALIDASI METODE ANALISIS (29)**

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metoda analisis antara lain :

##### **1. Kecermatan (*accuracy*)**

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 ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi / absolut (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku / adisi (*standard addition method*).

Pada metode simulasi, persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekspien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 20 - 80% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui, maka dapat dipakai metode adisi. Metode adisi 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.

## 2. 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 diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Sedangkan ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda.



Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Percobaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

### 3. Selektivitas (spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

Untuk tujuan uji kemurnian dan pengukuran kadar, selektivitas atau spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah dua senyawa yang berdekatan. Penentuannya dapat diperoleh dengan dua cara, yaitu melakukan optimasi sehingga senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa  $\geq 2$ ) dan menggunakan detektor selektif terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama.

#### 4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. 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. Nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

#### 5. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan

seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

a. Batas deteksi (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{k \times S_b}{S_I} \quad k = 3$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{k \times S_b}{S_I} \quad k = 10$$

Keterangan :

$S_b$  = simpangan baku respon analitik dari blanko

$S_I$  = arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope ( $b$  pada persamaan garis  $y = a + bx$ )

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrument, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analisis.

## 7. Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus-menerus dan mengevaluasi respon analitik serta efek pada presisi dan akurasi.



## **BAB III**

### **ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA**

#### **A. LOKASI**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Instrumen, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

#### **B. ALAT**

Bejana kromatografi lapis tipis (Camag), mikropipiler 5  $\mu$ L, detektor (CAMAG TLC Scanner), lempeng silika gel F<sub>254</sub> (Merck), data processor dilengkapi dengan program Wincats, printer, neraca analitik (Acculab ALC-210.4), spektrofotometer Uv-Vis (Jasco V-630), oven, dan alat-alat gelas.

#### **C. BAHAN**

Standar natrium sakarin, standar natrium siklamat, butanol, etanol p.a, diklormetan, dimetilformamida (Merck), amonia 28% (Univar), asam asetat (Brataco), fluorescein (Wako pure chemical ind.), brom, aquadest, tiga sampel rokok kretek filter yang berada di pasaran Jabodetabek.

## D. CARA KERJA

### 1. Penyiapan sampel

Proses *sampling* rokok yang dijadikan sampel dalam penelitian ini adalah rokok kretek filter yang banyak pemakainya di daerah Jabodetabek.

### 2. Penetapan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometri Uv-Vis

Larutan standar natrium sakarin dengan konsentrasi 100 µg/mL dalam pelarut etanol dan larutan standar natrium siklamat 1000 µg/mL dalam pelarut etanol. Lalu dibuat kurva serapan dengan mengukur serapan larutan standar pada panjang gelombang 200-400 nm. Dari kurva serapan dapat ditentukan panjang gelombang maksimum yang memberikan serapan maksimum.

### 3. Pemilihan fase gerak

Larutan standar natrium sakarin dan natrium siklamat dengan konsentrasi 1000 µg/mL dalam pelarut etanol ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 100°C selama 15 menit. Volume penotolan sebanyak 5 µL dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah. Kemudian dielusi dengan jarak elusi 8 cm dan dianalisis menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang analisis yang didapat dan dibuat spektrum serapannya. Fase gerak yang digunakan adalah:

a. Butanol-etanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (40:4:1:9).

b. Butanol-asam asetat-air (4:1:1).

Setelah pengembangan selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC scanner*, dipilih fase gerak yang menghasilkan nilai R<sub>f</sub> dan pemisahan yang paling baik.

#### 4. Pemilihan panjang gelombang maksimum menggunakan *TLC Scanner*

Larutan standar natrium sakarin dan natrium siklamat masing-masing dengan konsentrasi 1000 µg/mL dalam pelarut etanol ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 100°C selama 15 menit. Volume penotolan sebanyak 5 µL dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah dan dikembangkan sepanjang 8 cm dengan fase gerak terpilih. Setelah pengembangan selesai, bercak natrium sakarin pada lempeng dikeringkan dan dianalisis dengan menggunakan *TLC Scanner* pada panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan bercak natrium siklamat disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklorometan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1), kemudian dianalisis dengan menggunakan *TLC Scanner* pada panjang gelombang 400-700 nm. Dari kurva serapan akan diperoleh panjang gelombang maksimum yang dicatat dan digunakan dalam percobaan.

## 5. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan standar natrium sakarin dibuat dengan konsentrasi 50, 100, 160, 200, 240, dan 300 µg/mL dalam pelarut etanol dan larutan standar natrium siklamat dibuat dengan konsentrasi 600, 800, 1000, 1200, 1400, dan 1600 µg/mL. Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan 100°C selama 15 menit. Volume penotolan 5 µL dengan titik totolan 1 cm dari tepi bawah. Kemudian lempeng dielusi dengan fase gerak terpilih sepanjang 8 cm, lalu dianalisis dengan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum masing-masing untuk natrium sakarin dan natrium siklamat.

Setelah itu dibuat kurva kalibrasi larutan standar natrium sakarin dan natrium siklamat, lakukan analisis hubungan antara berat yang ditotolkan dan luas puncak (area) sehingga didapat persamaan garis linier  $y = a + bx$ .

## 6. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dari larutan standar natrium sakarin dan natrium siklamat dapat dihitung dengan perhitungan statistik melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

## 7. Uji keterulangan

Larutan standar natrium sakarin dibuat dengan konsentrasi 50, 200, 300 µg/mL dan larutan standar natrium siklamat dibuat dengan konsentrasi



600, 1200, 1600  $\mu\text{g/mL}$ . Masing-masing konsentrasi ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan dengan pemanasan  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dengan volume penotolan 5  $\mu\text{L}$ , sejumlah masing-masing enam titik. Kemudian lempeng dielusi dengan fase gerak terpilih sepanjang 8 cm, lalu dianalisis dengan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum masing-masing untuk natrium sakarin dan natrium siklamat.

Parameter keterulangan ditentukan dengan menghitung simpangan baku dan koefisien variasinya.

#### 8. Uji perolehan kembali (UPK)

Standar natrium sakarin ditimbang seksama masing-masing sebanyak 28,3 mg; 35,4 mg; dan 41,8 mg. Masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan pelarut etanol, lalu dicukupkan volumenya sampai batas. Kemudian masing-masing larutan dipipet sebanyak 2,0 mL dan ditambahkan pada kertas rokok yang telah *diblender* dengan berat 0,4146 g. Kemudian ditambahkan etanol ad 10 mL, kemudian *divortex* selama 10 menit, dan *disentrifuge* dengan kecepatan 1800 rpm. Terdapat endapan dan larutan, ambil bagian larutan, kemudian larutan tersebut ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan menggunakan pemanasan  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dengan volume penotolan 5  $\mu\text{L}$  dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih sepanjang 8 cm. Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis

menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum masing-masing untuk natrium sakarin dan natrium siklamat.

9. Identifikasi dan penetapan kadar natrium sakarin dan natrium siklamat dalam sampel

Sampel yang berupa kertas rokok dihaluskan terlebih dahulu dengan cara di *blender*. Kemudian ditimbang sejumlah  $\pm 400$  mg dan ditambahkan pelarut etanol ad 10 mL. Setelah itu divortex selama 10 menit dan disentrifuge dengan kecepatan 1800 rpm. Akan didapat endapan dan larutan, ambil bagian larutan. Masing-masing larutan ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diaktifkan menggunakan pemanasan  $100^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit dengan volume penotolan  $5\ \mu\text{L}$  dan jarak penotolan 1 cm. Lempeng KLT kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih sepanjang 8 cm. Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan dianalisis menggunakan *TLC scanner* pada panjang gelombang maksimum masing-masing untuk natrium sakarin dan natrium siklamat. Kadar natrium sakarin dan natrium siklamat dalam sampel dihitung berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. HASIL

1. Pemilihan panjang gelombang maksimum menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis

Larutan standar natrium sakarin dengan konsentrasi 100 µg/mL dalam pelarut etanol memberikan panjang gelombang maksimum pada 270 nm dan larutan standar natrium siklamat dengan konsentrasi 1000 µg/mL dalam pelarut etanol memberikan panjang gelombang maksimum 211 nm. Gambar spektrum serapan dari natrium sakarin dan natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 4a dan Gambar 4b.

2. Pemilihan fase gerak yang sesuai

Fase gerak terbaik untuk pemisahan natrium sakarin dan natrium siklamat yaitu butanol–asam asetat–air (4:1:1) daripada butanol–etanol–amonia–air (40:4:1:9). Data mengenai fase gerak dan Rf dapat dilihat pada Tabel 1 dan gambar kromatogram dari masing-masing fase gerak dapat dilihat pada Gambar 5a-5b dan 6a-6b.

### 3. Pemilihan panjang gelombang maksimum menggunakan *TLC Scanner*

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh untuk natrium sakarin adalah 276 nm dan panjang gelombang maksimum untuk natrium siklamat adalah 523 nm. Gambar spektrum serapan dari natrium sakarin dan natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 8a-8b.

### 4. Pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi larutan standar natrium sakarin yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi adalah 50, 100, 160, 200, 240, dan 300 µg/mL. Berdasarkan perhitungan statistik regresi linear, persamaan garis regresi kurva kalibrasi adalah  $y = 1740x + 22,62$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) adalah 0,9996. Data kurva kalibrasi natrium sakarin dapat dilihat pada Tabel 2 dan persamaan regresi linier natrium sakarin pada Gambar 9a.

Konsentrasi larutan standar natrium siklamat yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi adalah 600, 800, 1000, 1200, 1400, dan 1600 µg/mL. Berdasarkan perhitungan statistik regresi linear, persamaan garis regresi kurva kalibrasi adalah  $y = 2209x + 4805$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) adalah 0,9990. Data kurva kalibrasi natrium siklamat dapat dilihat pada Tabel 5 dan persamaan regresi linier natrium siklamat pada Gambar 9b.

#### 5. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

Hasil perhitungan secara statistik menggunakan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh dari Tabel 2 dengan rentang konsentrasi larutan natrium sakarin 50 - 300  $\mu\text{g/mL}$ , nilai LOD yang didapat adalah 0,0446  $\mu\text{g}$  dan nilai LOQ adalah 0,1485  $\mu\text{g}$ . Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel

3. Sedangkan untuk natrium siklamat berdasarkan persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh dari Tabel 5 dengan rentang konsentrasi larutan natrium sakarin 600-1600  $\mu\text{g/mL}$ , nilai LOD yang didapat adalah 0,2815  $\mu\text{g}$  dan nilai LOQ adalah 0,9382  $\mu\text{g}$ . Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

#### 6. Uji keterulangan

Uji keterulangan dilakukan dengan menotolkan masing-masing enam kali dari tiga konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Koefisien variasi (KV) untuk natrium sakarin pada konsentrasi rendah (50  $\mu\text{g/mL}$ ) adalah 1,56 %; pada konsentrasi sedang (200  $\mu\text{g/mL}$ ) adalah 1,41 %; dan pada konsentrasi tinggi (300  $\mu\text{g/mL}$ ) adalah 1,65 %. Koefisien variasi (KV) untuk natrium siklamat pada konsentrasi rendah (600  $\mu\text{g/mL}$ ) adalah 1,43 %; pada konsentrasi sedang (1200  $\mu\text{g/mL}$ ) adalah 0,77 %; dan pada konsentrasi tinggi (1600  $\mu\text{g/mL}$ ) adalah 1,67 %. Dari percobaan uji keterulangan yang telah dilakukan untuk analisis natrium sakarin dan natrium siklamat, hasil yang diperoleh sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 7.

## 7. Uji Perolehan Kembali (UPK)

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (UPK). Uji perolehan kembali dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda. Pada penelitian ini, uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode adisi. Nilai UPK rata-rata dari tiga konsentrasi adalah 99,14%. Data uji perolehan kembali natrium sakarin dapat dilihat pada tabel 9 dan Gambar 10-12.

## 8. Identifikasi sampel

Identifikasi sampel dengan membandingkan nilai  $R_f$  sampel dengan standar natrium sakarin dan natrium siklamat. Setelah itu, dilakukan perbandingan spektrum serapan sampel dengan standar natrium sakarin dan natrium siklamat. Perbandingan spektrum serapan sampel dengan standar natrium sakarin dan standar natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 13-15. Perbandingan bercak sampel dengan bercak standar natrium sakarin dan natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 16.

## 9. Penetapan kadar natrium sakarin dan natrium siklamat dalam sampel

Penetapan kadar sampel diperoleh dengan membandingkan nilai  $R_f$  dan luas puncak pada bercak dari sampel dengan standar natrium sakarin dan natrium siklamat. Dari ketiga sampel kertas rokok kretek filter, pemanis yang ditemukan adalah natrium sakarin. Kadar rata-rata natrium sakarin dari ketiga sampel kertas rokok yakni AM 0,4735%; LL 0,3424%; dan GG 0,4557%.

## B. PEMBAHASAN

Optimasi kondisi analisis dimulai dengan menentukan panjang gelombang analisis untuk deteksi menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Panjang gelombang maksimum dari natrium sakarin dan natrium siklamat tersebut dapat diketahui dari spektrum serapan yang diperoleh. Pengukuran natrium sakarin dan natrium siklamat menggunakan *TLC Scanner* dilakukan pada masing-masing panjang gelombang maksimumnya.

Selanjutnya yang dilakukan adalah mencari fase gerak yang sesuai untuk analisis. Fase gerak yang diuji terdiri dari kombinasi butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9), butanol-asam asetat-air (4:1:1). Lempeng yang digunakan adalah lempeng KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>. Sebelum digunakan, lempeng KLT terlebih dahulu dielusi menggunakan metanol untuk membersihkan lempeng dari pengotor-pengotor yang ada di atas lempeng karena penyimpanan yang lama. Setelah dielusi, lempeng dikeringkan di dalam oven untuk menguapkan metanol pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 15 menit.

Larutan standar natrium sakarin dan natrium siklamat dibuat dengan konsentrasi masing-masing 1000 µg/mL dan ditotolkan pada lempeng KLT dengan volume penotolan 5 µL. Lempeng dielusi dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan selama ± 4 jam. Tujuan dari penjenuhan ini adalah agar naiknya eluen pada lempeng selama elusi rata. Lempeng yang telah selesai dielusi dan dikeringkan, kemudian dianalisis menggunakan *TLC scanner*. Fase gerak yang dipilih untuk analisis adalah kombinasi butanol-asam asetat-

air (4:1:1) karena nilai  $R_f$  antara 0,2 – 0,8 dan menghasilkan puncak yang tajam, tidak berekor, dan menghasilkan pemisahan yang baik antara natrium sakarin dan natrium siklamat. Data nilai  $R_f$  pada variasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 1.

Bercak natrium sakarin yang telah dielusi dengan fase gerak terpilih dianalisis dengan *TLC scanner* pada panjang gelombang optimum yang diperoleh menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Kemudian dibuat spektrum serapannya pada rentang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum natrium sakarin yang dihasilkan adalah 276 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh menggunakan spektrofotometer Uv-Vis berbeda dengan yang diperoleh menggunakan *TLC scanner*. Hal ini dapat terjadi karena pada spektrofotometer Uv-Vis, pengukuran dilakukan terhadap larutan natrium sakarin, sedangkan pada *TLC scanner*, pengukuran dilakukan terhadap bercak natrium sakarin yang terdapat pada lempeng KLT. Untuk analisis selanjutnya, panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah panjang gelombang yang diperoleh menggunakan *TLC scanner*.

Pengukuran terhadap bercak natrium sakarin dapat dilakukan secara langsung karena memiliki gugus kromofor, sedangkan bercak natrium siklamat, karena tidak memiliki gugus kromofor maka menggunakan penampak bercak yang terdiri dari larutan brom 5% dalam diklormetan yang kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1), dan akan menghasilkan bercak berwarna pink (27). Kemudian dilakukan pengukuran panjang gelombang



menggunakan *TLC Scanner* menghasilkan panjang gelombang maksimum 523 nm.

Selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Validasi perlu dilakukan untuk menjamin metode KLT densitometri dapat digunakan untuk penetapan kadar natrium sakarin dan natrium siklamat pada kertas rokok. Kurva kalibrasi terdiri dari enam konsentrasi dengan rentang 50-300 µg/mL untuk natrium sakarin dan rentang 600-1600 µg/mL untuk natrium siklamat. Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh untuk natrium sakarin adalah  $y = 1740x + 22,62$  dan untuk natrium siklamat adalah  $y = 2209x + 4805$ . Linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi dapat ditentukan dari hasil kurva kalibrasi.

Uji linearitas dilakukan untuk mendapatkan batas deteksi dan batas kuantitasi. Nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yang didapatkan dari kurva kalibrasi natrium sakarin dan natrium siklamat adalah 0,9996 dan 0,9990. Batas deteksi untuk natrium sakarin dan natrium siklamat adalah 0,0446 dan 0,2815 µg, sedangkan batas kuantitasinya adalah 0,1485 dan 0,9382 µg.

Uji presisi dilakukan dengan menguji keterulangan metode analisis. Uji keterulangan dilakukan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dengan jumlah penotolan enam kali dari masing-masing konsentrasi. Hasil dari uji keterulangan telah memenuhi persyaratan yaitu nilai koefisien variasi di bawah 2%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4 dan Tabel 7.

Uji akurasi dilakukan melalui uji perolehan kembali (UPK). Pada percobaan uji perolehan kembali, digunakan tiga konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Uji perolehan kembali dilakukan

untuk mengetahui keakuratan dan kepresisian metode yang dilakukan. Hasil dianggap baik bila berada dalam rentang 98 – 102% dengan koefisien variasi  $\leq 2\%$ . Dalam penelitian ini, uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode adisi. Nilai UPK rata-rata dari tiga konsentrasi adalah 99,14%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah tiga merk rokok yaitu LL, AM, dan GG dengan jenis rokok kretek filter. Sampel diambil kertas rokoknya yang kemudian *diblender* dan ditimbang seberat  $\pm 400$  mg, menghasilkan kadar AM 0,4735%; LL 0,3424%; dan GG 0,4557%.

Sebelum ditetapkan kadar sampel, dilakukan terlebih dahulu identifikasi pemanis yang terdapat dalam sampel kertas rokok dengan cara membandingkan nilai Rf dan spektrum serapan dari sampel kertas rokok kretek filter dengan standar natrium sakarin dan standar natrium siklamat. Hasilnya adalah bercak sampel memiliki nilai Rf 0,61 dan panjang gelombang maksimum 276 nm, hal ini sama dengan standar natrium sakarin yang memiliki nilai Rf 0,61 dan panjang gelombang maksimum 276 nm. Saat bercak sampel, bercak standar natrium sakarin, dan bercak natrium siklamat disemprot dengan penampak bercak larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1), bercak sampel dan bercak standar natrium sakarin tidak menghasilkan bercak berwarna pink, sedangkan pada bercak standar natrium siklamat menghasilkan bercak berwarna pink.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Kondisi optimum untuk analisis natrium sakarin dan natrium siklamat secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri dengan menggunakan fase diam yaitu lempeng silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak butanol–asam asetat–air (4:1:1) pada panjang gelombang maksimum 276 nm untuk natrium sakarin dan 523 nm untuk natrium siklamat dengan menggunakan penampak bercak larutan brom 5% dalam diklormetan yang kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1).
2. Kadar natrium sakarin yang terdapat pada kertas rokok ketiga merk yakni AM 0,4735%; LL 0,3424%; dan GG 0,4557%. Seluruh sampel kertas rokok tidak mengandung natrium siklamat.

#### B. SARAN

1. Dilakukan penetapan kadar pemanis pada kertas rokok menggunakan merk rokok yang berbeda.

2. Dilakukan analisis jenis pemanis buatan lain dan dengan sampel yang berbeda.



## DAFTAR ACUAN

1. Wahjudi. *Keanekaragaman Bahan Pemanis. Media Komunikasi Kimia Jurnal Ilmu Kimia dan Pembelajarannya* no.1 Tahun 3, Februari, 1999: 1-13.
2. Sitepoe M. *Kekhususan Rokok Indonesia* . Jakarta : Gramedia Widiasarana Indonesia, 2000: 25-58.
3. Rein MD. *Cigar Holder*. United States Patent 3589371. 1979 (<http://www.freepatentsonline>), diakses 24 agustus 2009.
4. Anonim. *Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan, Persyaratan Penggunaan*. SNI 01-6993-2004.
5. Anonim. *Kajian Keamanan Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan*. (<http://www.pom.go.id:8796/nonpublic/makanan/standard/News1.html>), diakses 6 agustus 2009.
6. Gandjar IG & Rohman A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar, 2007.
7. Winarno FG & Sulistiowati T. *Bahan Tambahan untuk Makanan dan Kontaminan*. Jakarta : Pustaka Sinar Harapan, 1994: 80-87.
8. Branen AL, Salminen S & Davidson PM. *Food Additives 2<sup>nd</sup> edition*. USA : Marcel Dekker.,Inc, 2001: 447-455.
9. Sally TS. *Pemanis Buatan dalam Makanan dan Minuman*. *Majalah Ilmu Fakultas Kedokteran USAKTI* volume 15 no.2 Mei, 1996: 1567-1573.

10. Veronika, Meliawati & Yashinta. *Pemanis Buatan*. *Zigma, Majalah Gizi dan Teknologi Pangan* volume 11 no.2 Oktober, 1999: 12-15.
11. Anonim. *Kodeks Makanan Indonesia Tentang Bahan Tambahan Makanan*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979: 354-359.
12. Anonim. *The Merck Index 14th edition*. USA : Merck & Co.,Inc, 2006: 452,1435.
13. Anonim. *Farmakope Indonesia IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995: 748-750.
14. Lestiani L. *Aneka Ragam Pemanis Buatan. Seminar Perkembangan Terakhir Pemanis Buatan di Indonesia*. 2000: 9-15.
15. Ambarsari I, Qanitah & Surjana. *Penerapan Standar Penggunaan Pemanis Buatan pada Produk Pangan*. (<http://www.bsn.go.id/files/348256349/Litbang%202009/Bab%206.pdf>) diakses 6 agustus 2009.
16. Omaye ST. *Food and Nutritional Toxicology*. USA : CRC Press LLC, 2004: 259-261.
17. Anonim. *Handbook of Pharmaceutical Excipients 3<sup>rd</sup> edition*. USA : Pharmaceutical Press, 2000.
18. Bontempelli G, Dossi N, Toniolo R. *Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks*. *Chromatographia*, 63, 2006 : 557-562.
19. Hayun, Harahap Y & Aziza CN. *Penetapan Kadar Sakarin, Asam Benzoat, Asam Sorbat, Kofeina, dan Aspartam di Dalam Beberapa Minuman Ringan Bersoda Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, volume 1, no.3, Desember, 2004 : 148-159.

20. Kartadarma E, Firman K & Mulyani R. *Analisis Pemanis Buatan Campuran Alitam, Kalium Asesulfam dan Aspartam Dalam Sediaan Makanan. Acta Pharmaceutica Indonesia*, volume 28, no.2 Juni, 2003 : 36-41.
21. Anonim. *Separation of Aspartam, Acesulfam, and Saccharin* (<http://www.sorbtech.com>) diakses 20 agustus 2009.
22. Supriyati N. *Penggunaan Teknik KLT-Densitometri Untuk Analisis Sakarin Dalam Gula Kelapa. Widyariset*, volume 8, no.1, 2005 : 106-113.
23. Garad MV, Mali BD & Rathod DS. *Thin Layer Chromatographic Determination of Diazepam, Phenobarbiton, and Saccharin in Toddy Samples. Journal of Planar Chromatography*, vol 18, Juli, 2005: 330-332.
24. Ma, Y. *Indirect Fluorometric Detection Techniques on Thin Layer Chromatography and Effect of Ultrasound and Gel Electrophoresis*. USA : National technical Information Service US Department of Commerce. 1990: 82-90.
25. Anonim. *Pengamanan Rokok Bagi Kesehatan*. Peraturan Pemerintah RI No. 19, 2003.
26. Jerry RW, Donald R & Donna W. *Smoking Product*. United States Patent 4643205, 1987.
27. Fried B & Sherma J. *Practical Thin Layer Chromatography, A Multidisciplinary Approach*. USA : CRC Press, 1996 : 1 – 15.
28. Touchstone JC & Dobbins MF. *Practice of Thin Layer Chromatography 2<sup>nd</sup> edition*. USA : Joh Wiley & Sons, Inc, 1983.

29. Harmita. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, 2006.
30. Deinstrop EH. *Applied Thin Layer Chromatography 2<sup>nd</sup> edition*. Jerman : Wiley – VCH, 2007.
31. Fried B & Sherma J. *Handbook of Thin Layer Chromatography 2<sup>nd</sup> Edition, Revised and Expanded, vol 71, Chapter 29*. New York : Marcel Dekker, Inc, 1996.
32. Nollet LML. *Handbook of Food Analysis Residues and Other Food Component Analysis*. USA : Marcel Dekker, Inc, 2004.

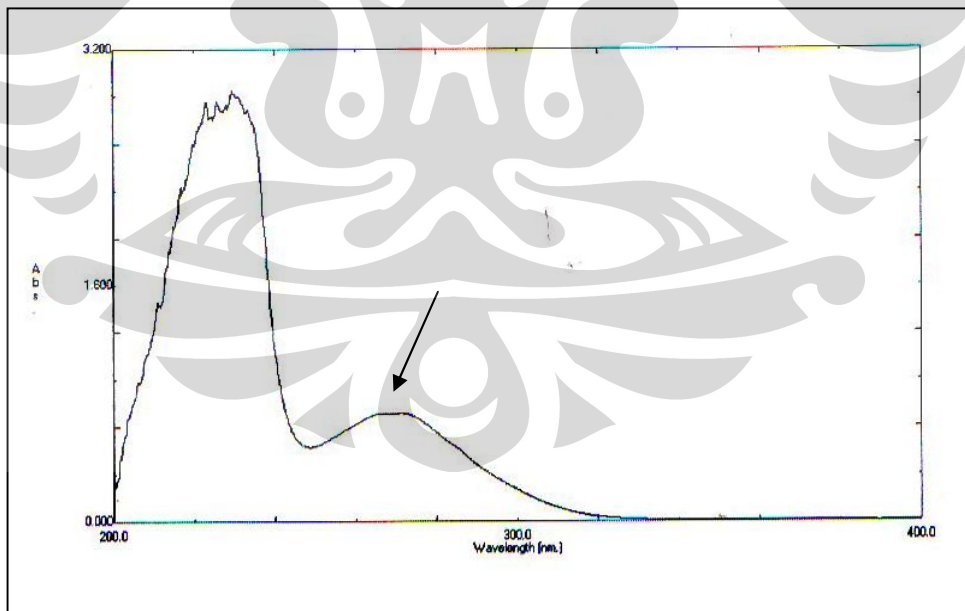




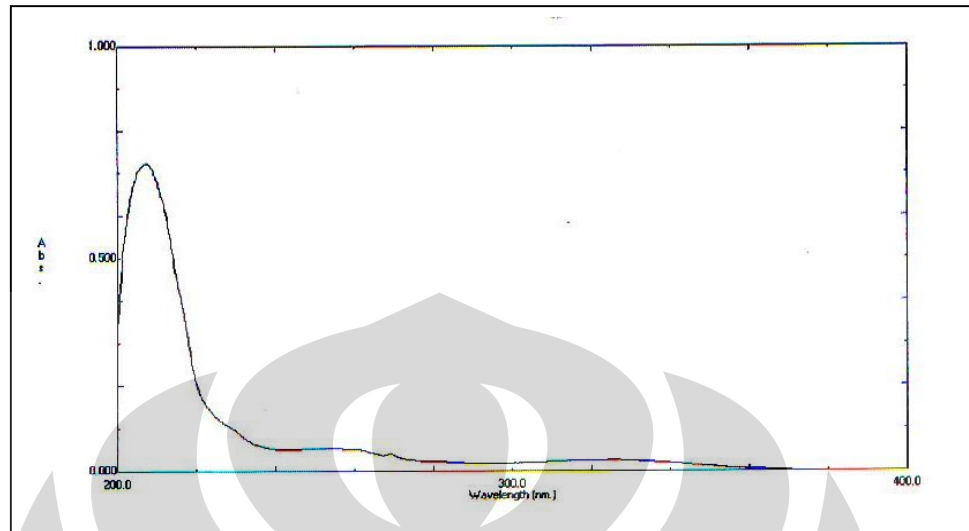




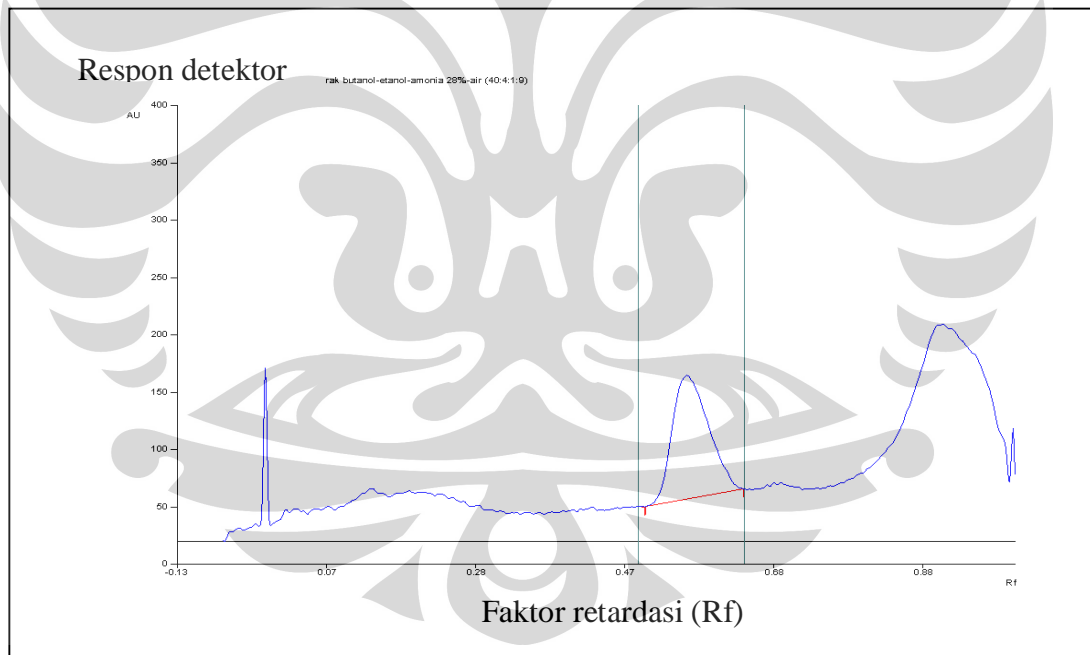
Gambar 3. Alat TLC scanner 3 (Camag) beserta komputer yang dilengkapi program winCATS



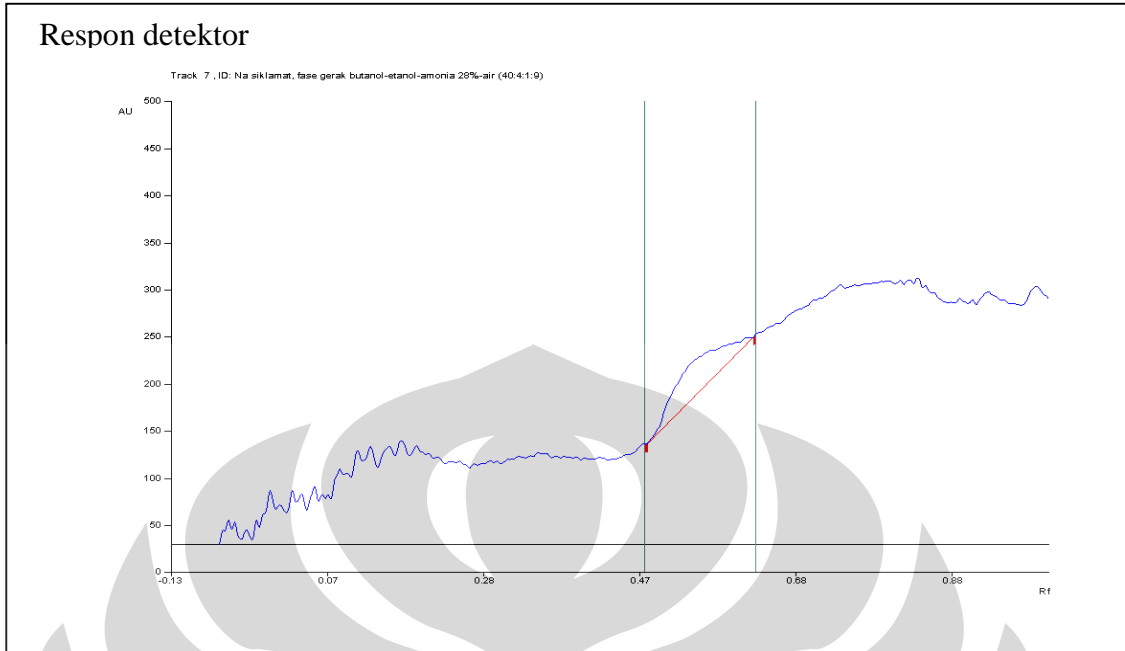
Gambar 4a. Kurva serapan natrium sakarin 100  $\mu\text{g/mL}$  dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 200-400 nm,  $\lambda$  max 270 nm



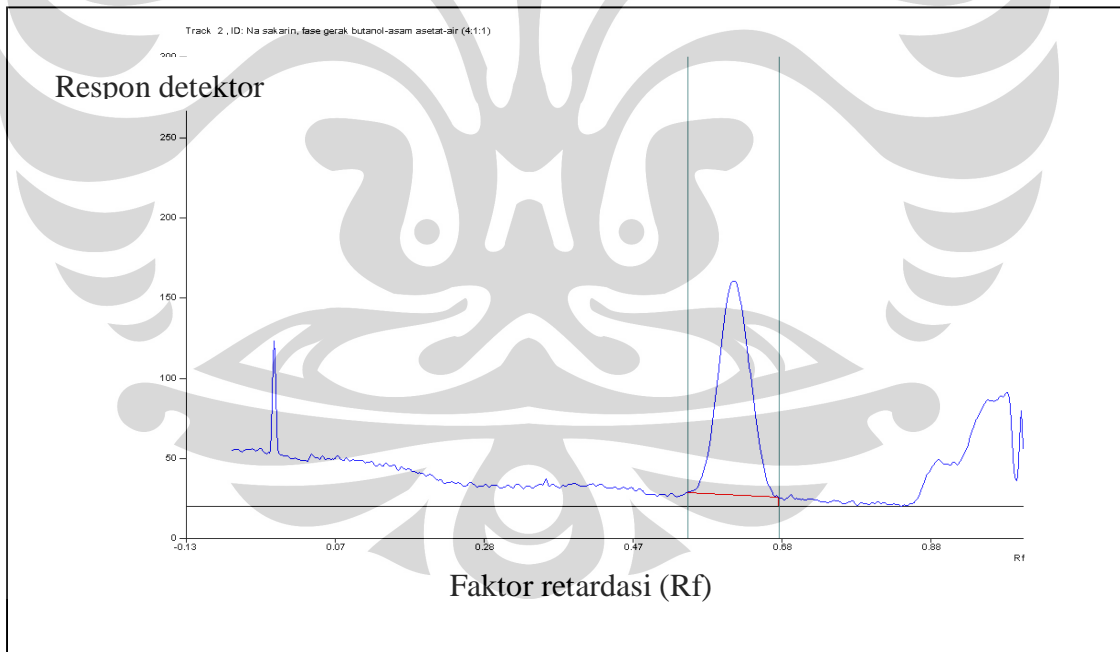
Gambar 4b. Kurva serapan natrium siklomat 1000  $\mu\text{g/mL}$  dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 200-400 nm,  $\lambda$  max 211 nm



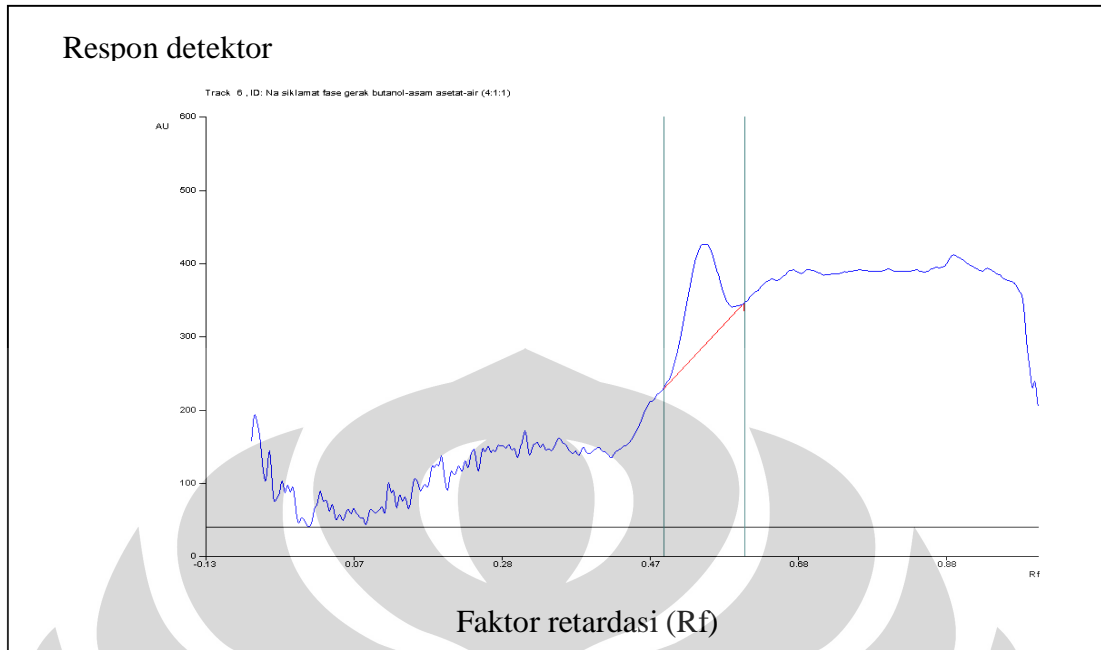
Gamba 5a. Kurva densitas natrium sakarin 1000  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9) pada  $\lambda$  254 nm



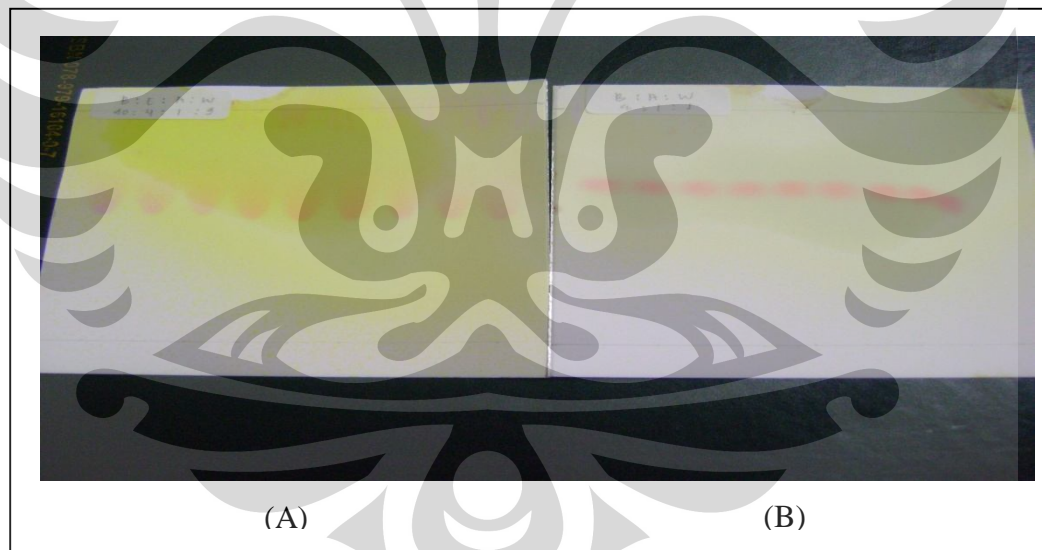
Gambar 5b. Kurva densitas natrium siklamat 1000  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9) pada  $\lambda$  254 nm



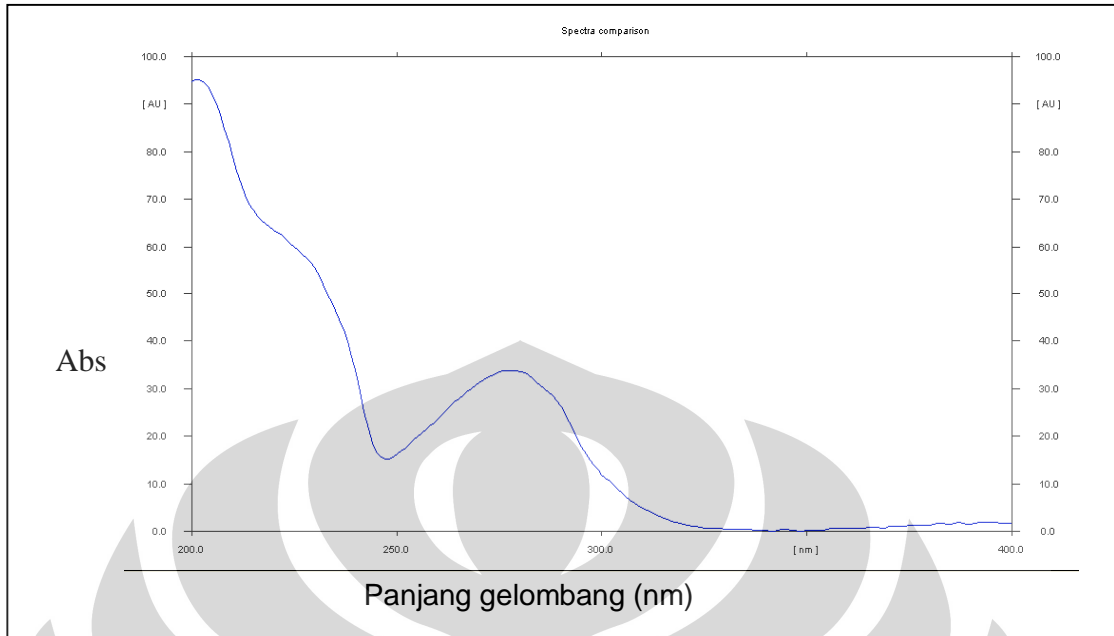
Gambar 6a. Kurva densitas natrium sakarin 1000  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  254 nm



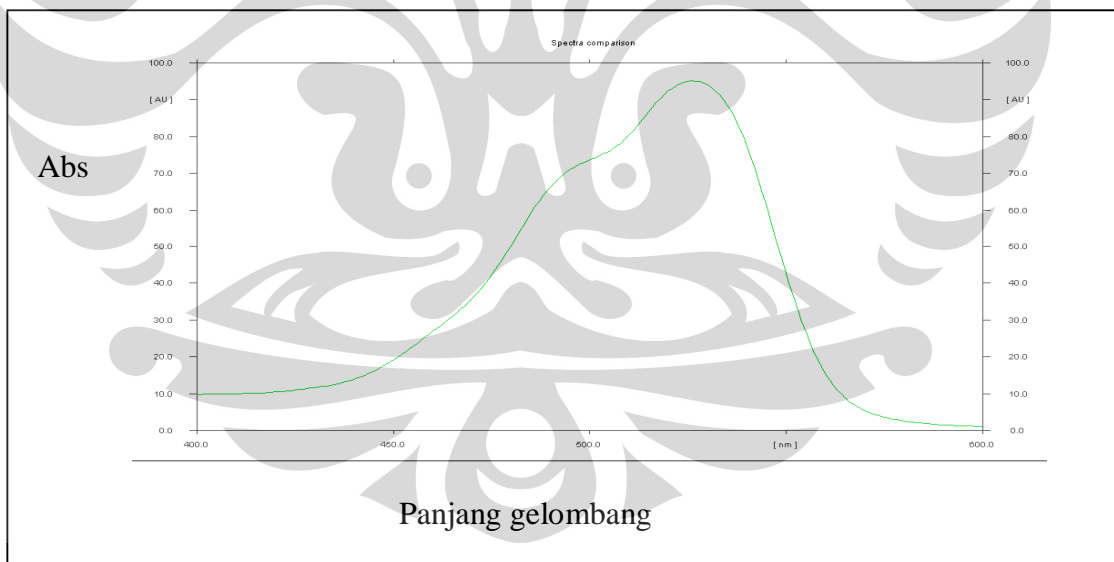
Gambar 6b. Kurva densitas natrium siklamat 1000  $\mu\text{g/mL}$  dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  254 nm



Gambar 7. (A) Bercak natrium siklamat dengan fase gerak butanol-etanol-amonia-air (40:4:1:9) dan (B) bercak natrium siklamat dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) Kondisi: setelah disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1)

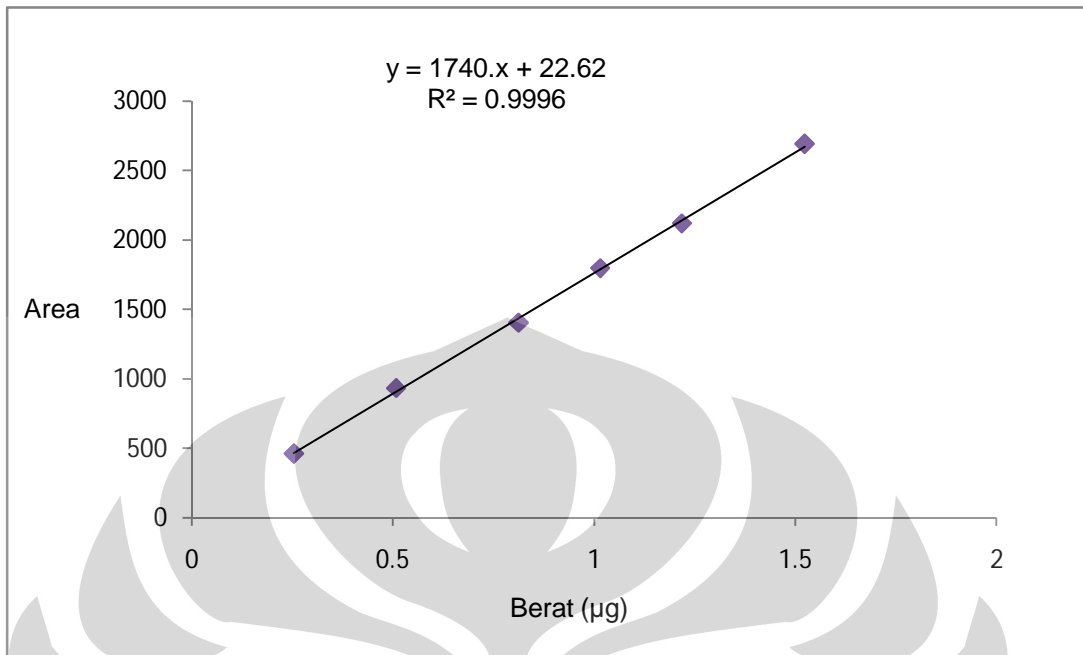


Gambar 8a. Kurva serapan bercak natrium sakarin pada panjang gelombang 200-400 nm dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1),  $\lambda$  max 276 nm

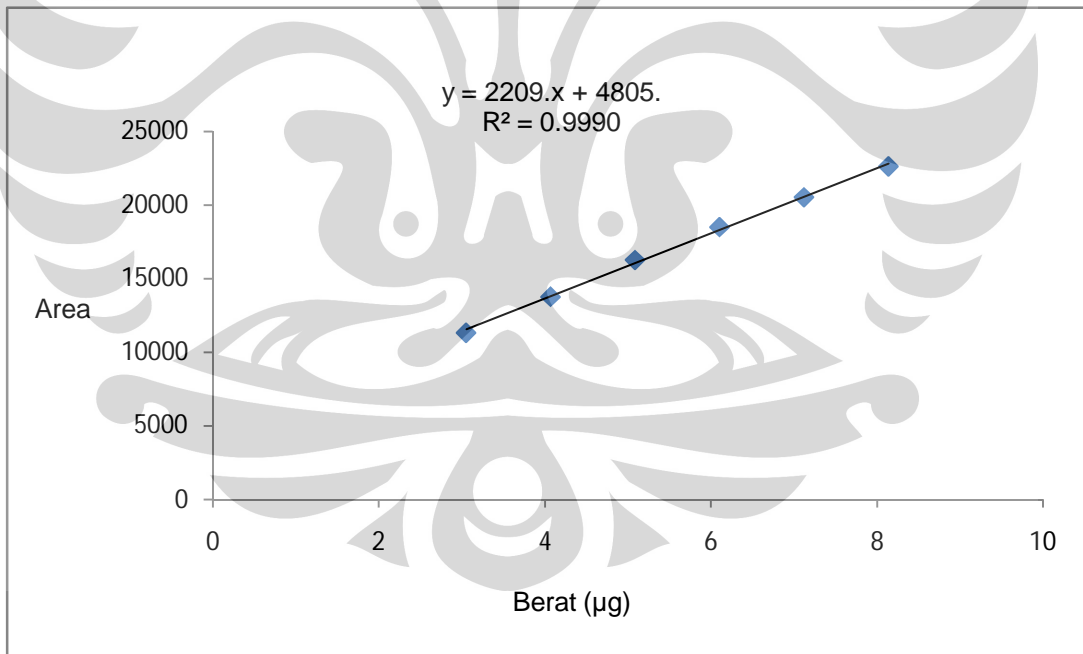


Gambar 8b. Kurva serapan bercak natrium siklomat pada panjang gelombang 400-700 nm dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1),  $\lambda$  max 523 nm

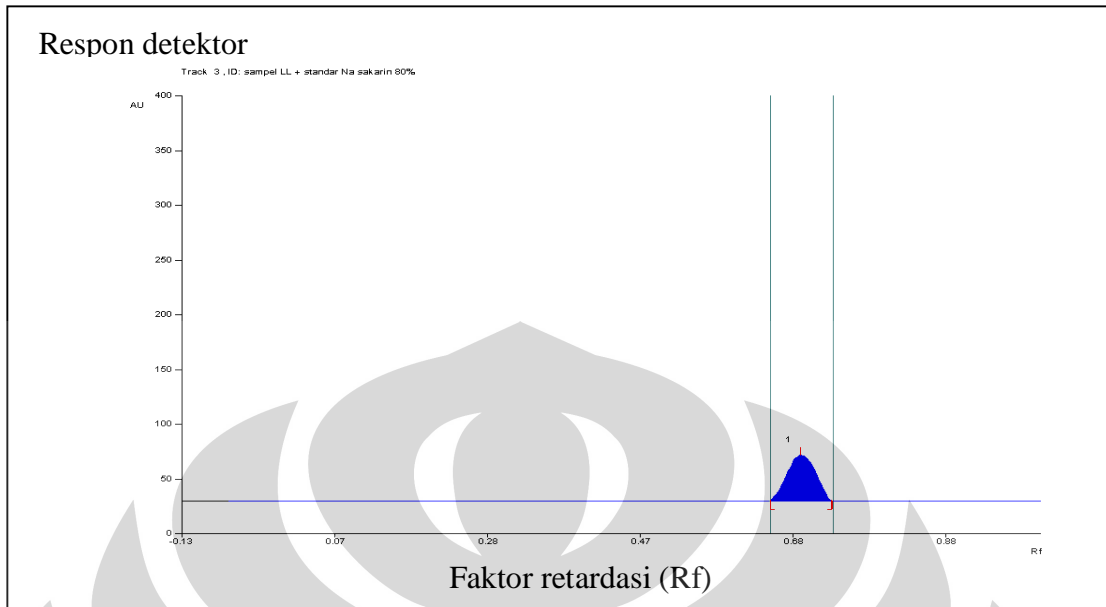
Kondisi: setelah disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1).



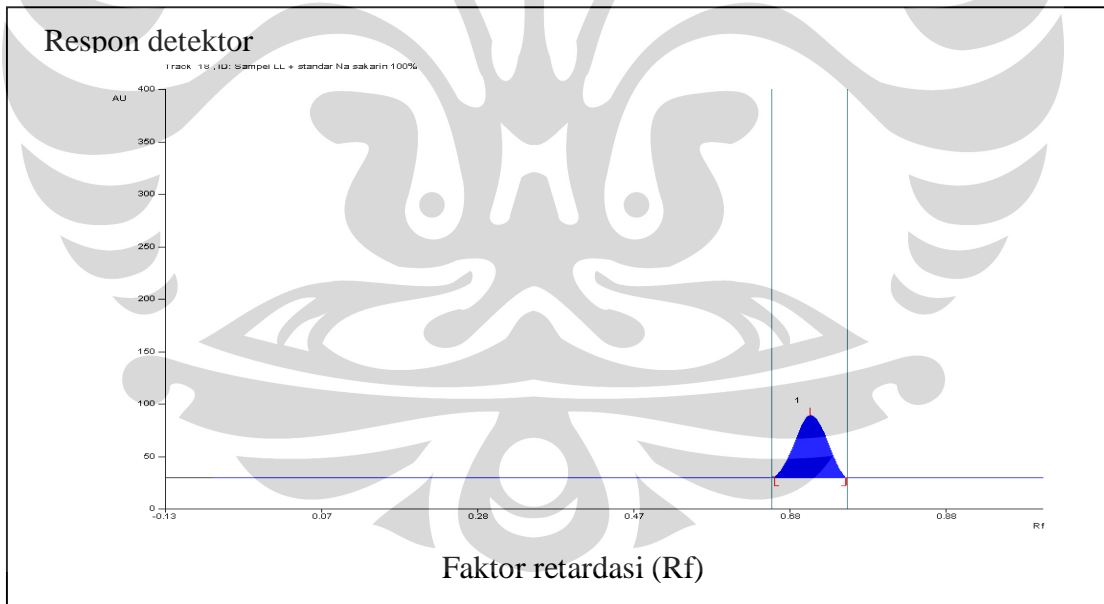
Gambar 9a. Kurva kalibrasi natrium sakarin



Gambar 9b. Kurva kalibrasi natrium siklamat

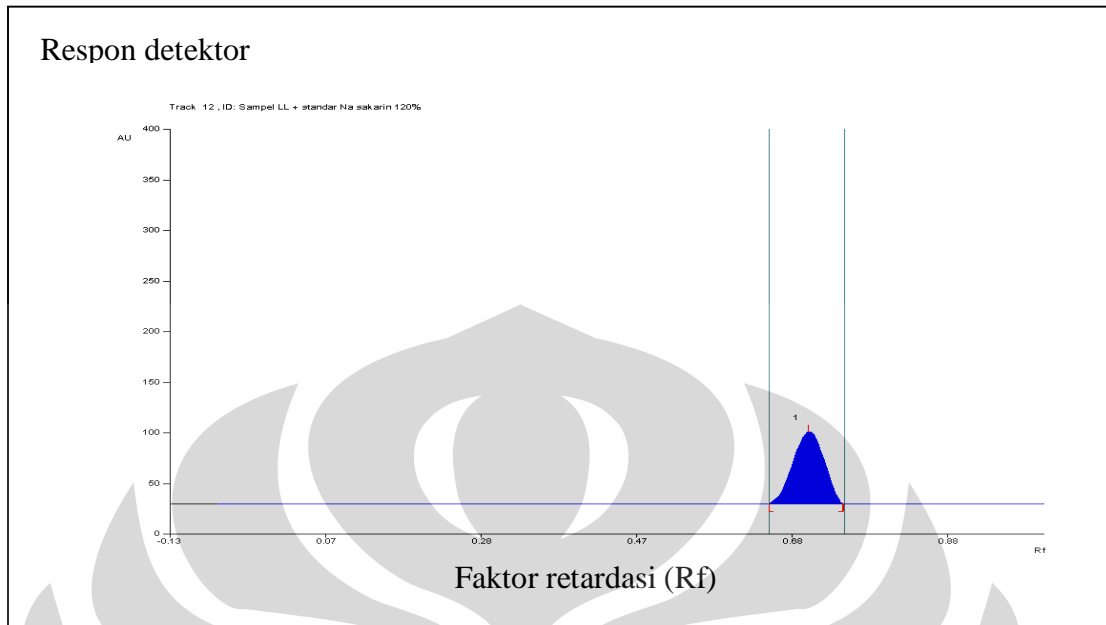


Gambar 10. Kurva densitas perolehan kembali natrium sakarin 80% dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  276 nm

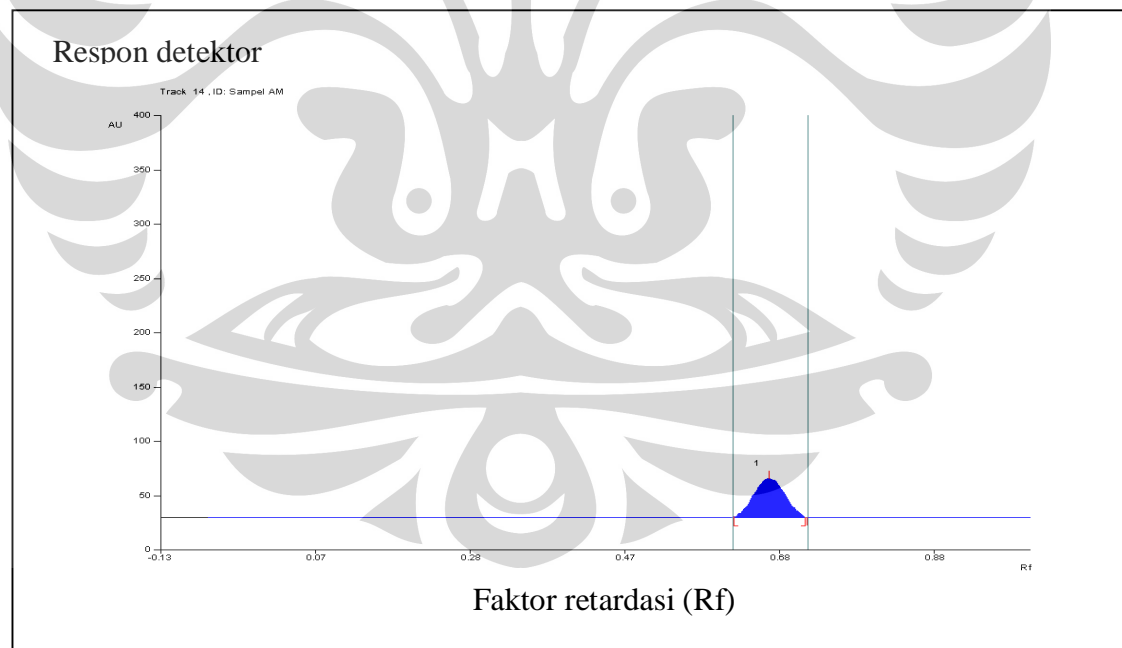


Gambar 11. Kurva densitas perolehan kembali natrium sakarin 100% dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  276 nm

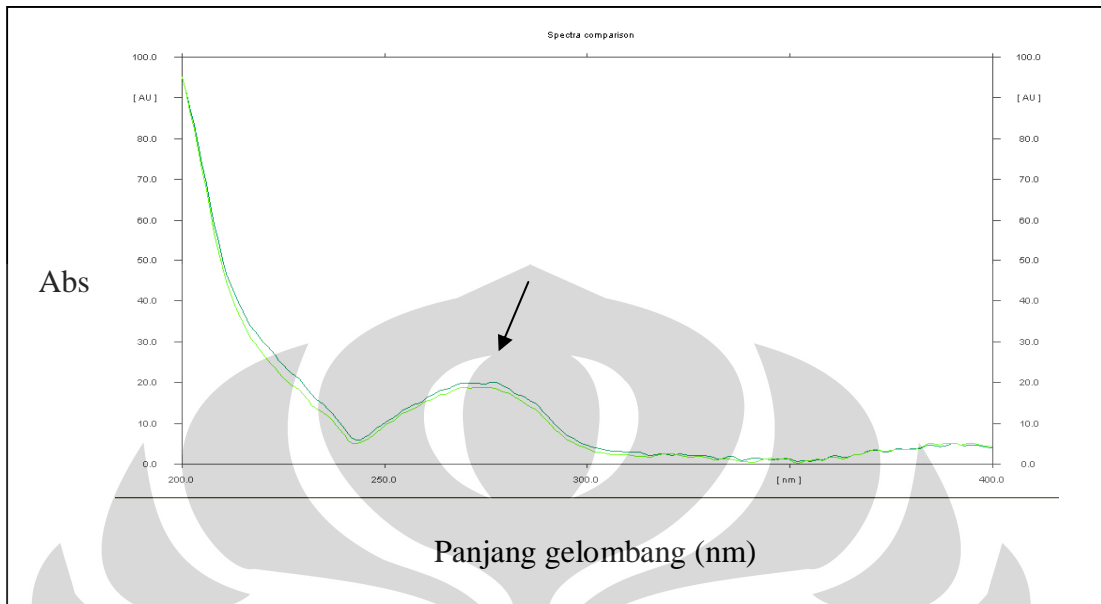




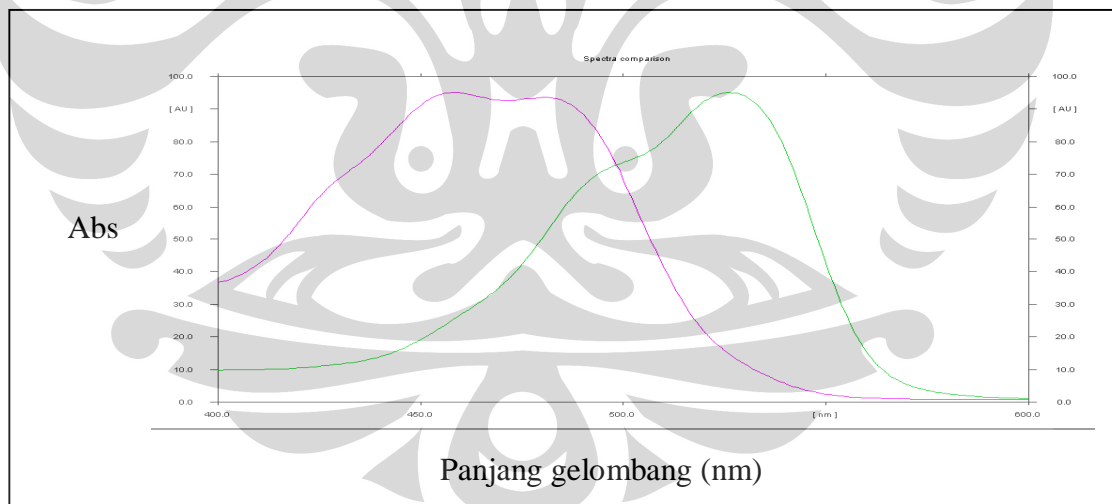
Gambar 12. Kurva densitas perolehan kembali natrium sakarin 120% dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  276 nm



Gambar 13a. Kurva densitas sampel AM dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  276 nm

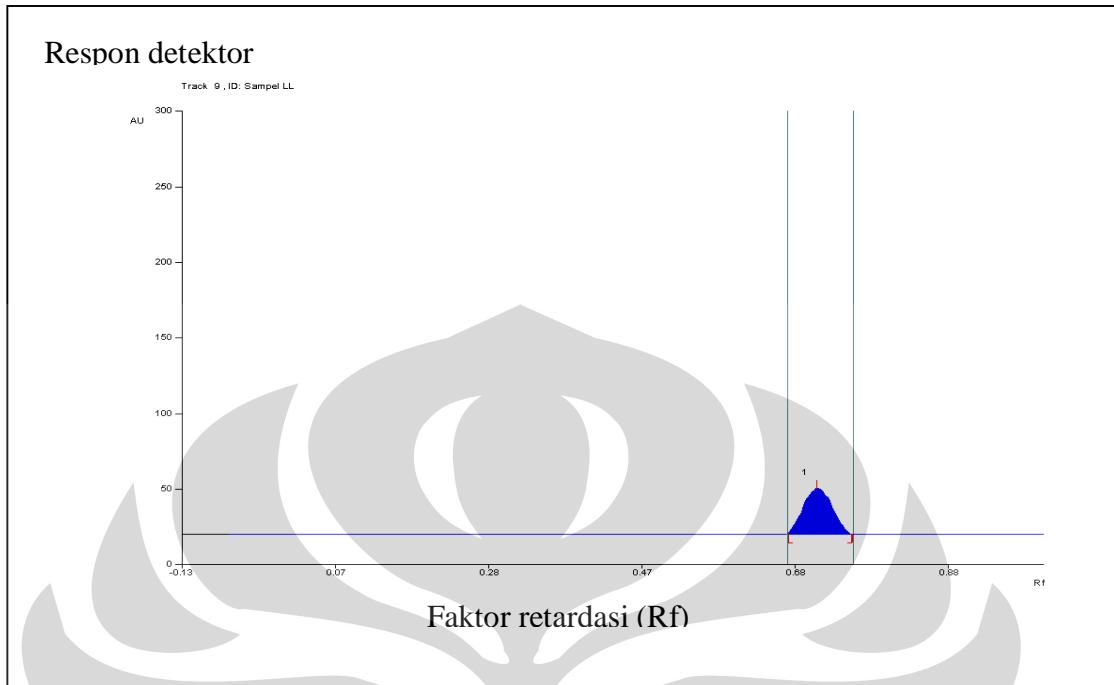


Gambar 13b. Kurva serapan bercak sampel AM dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin,  $\lambda_{\text{max}}$  276 nm

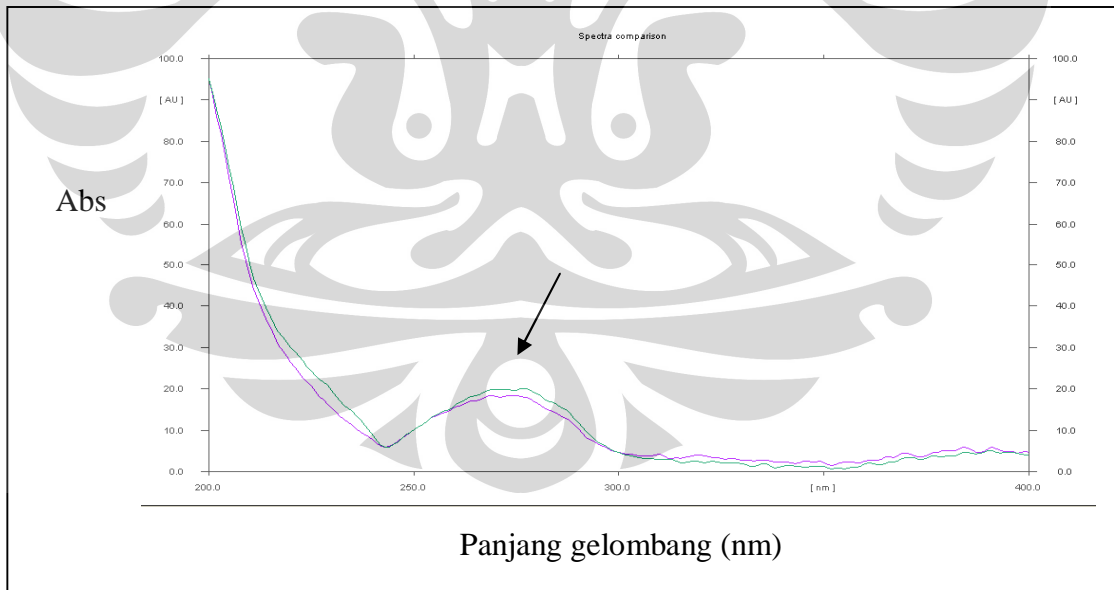


Gambar 13c. Kurva serapan bercak sampel AM ( — ) dibandingkan dengan bercak standar natrium siklamat ( — ), fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  523 nm

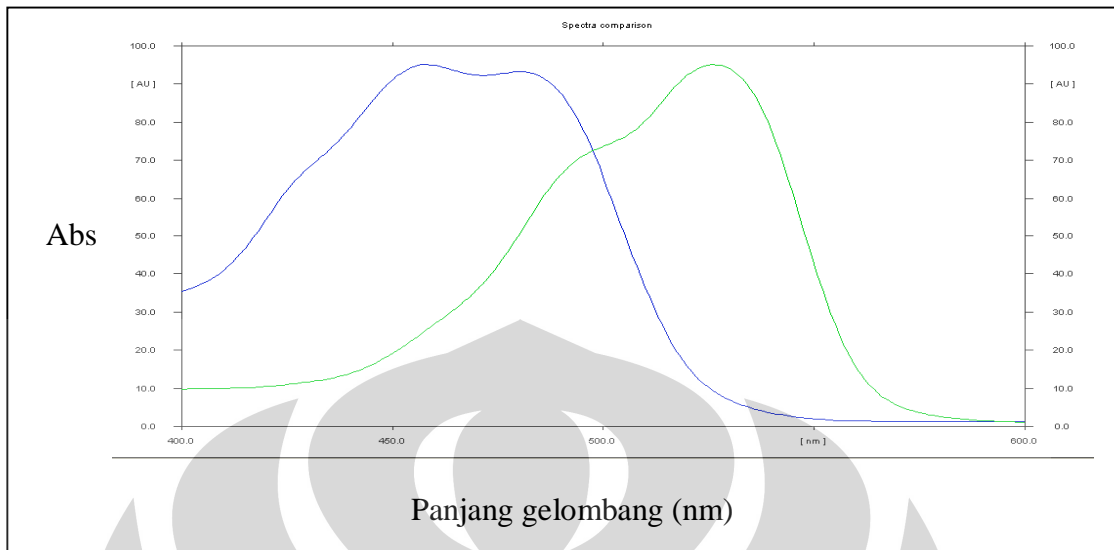
Kondisi: setelah disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1).



Gambar 14a. Kurva densitas sampel LL dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  276 nm

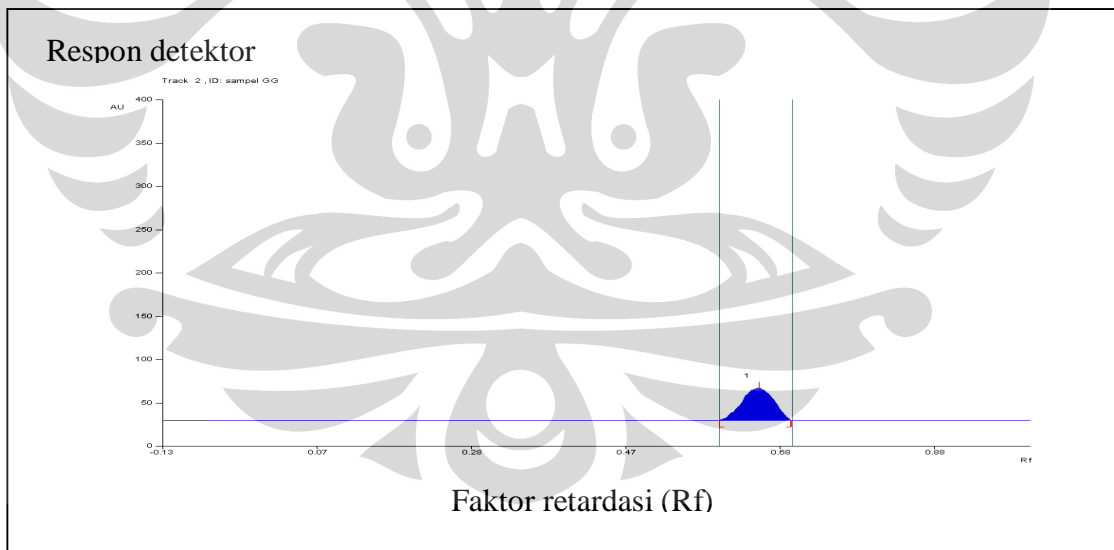


Gambar 14b. Kurva serapan bercak sampel LL dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin,  $\lambda$  max 276 nm

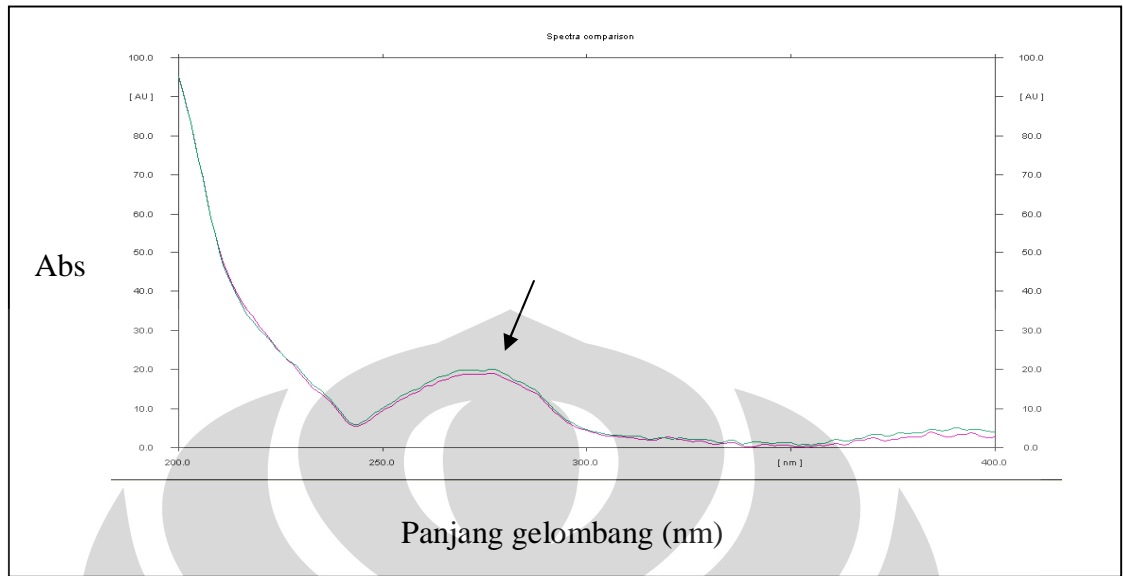


Gambar 14c. Kurva serapan bercak sampel LL (—) dibandingkan dengan bercak standar natrium siklamat (—), fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  523 nm

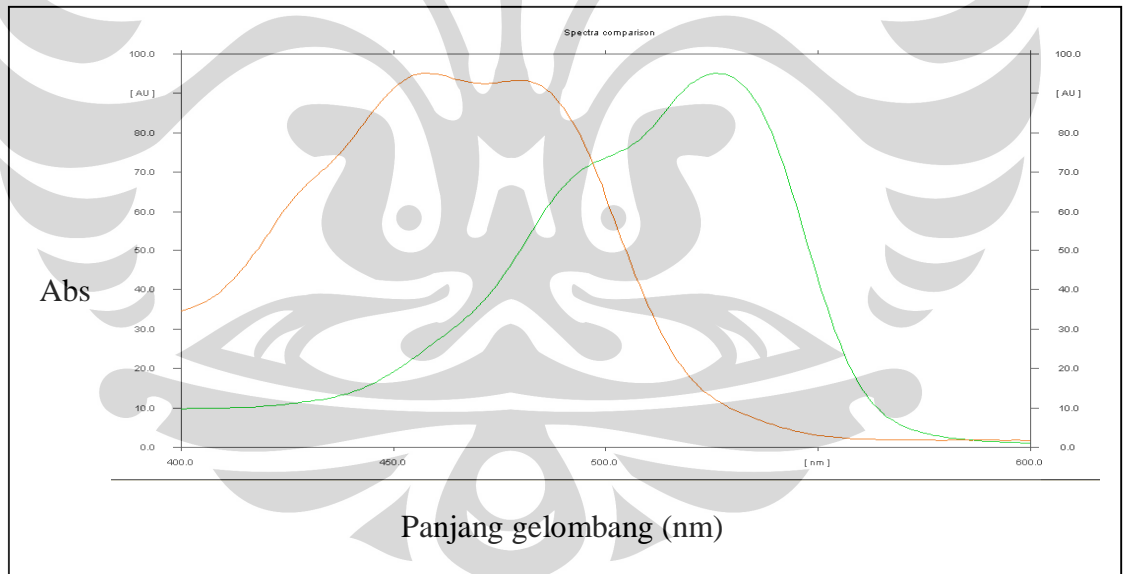
Kondisi: setelah disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1).



Gambar 15a. Kurva densitas sampel GG dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  276 nm

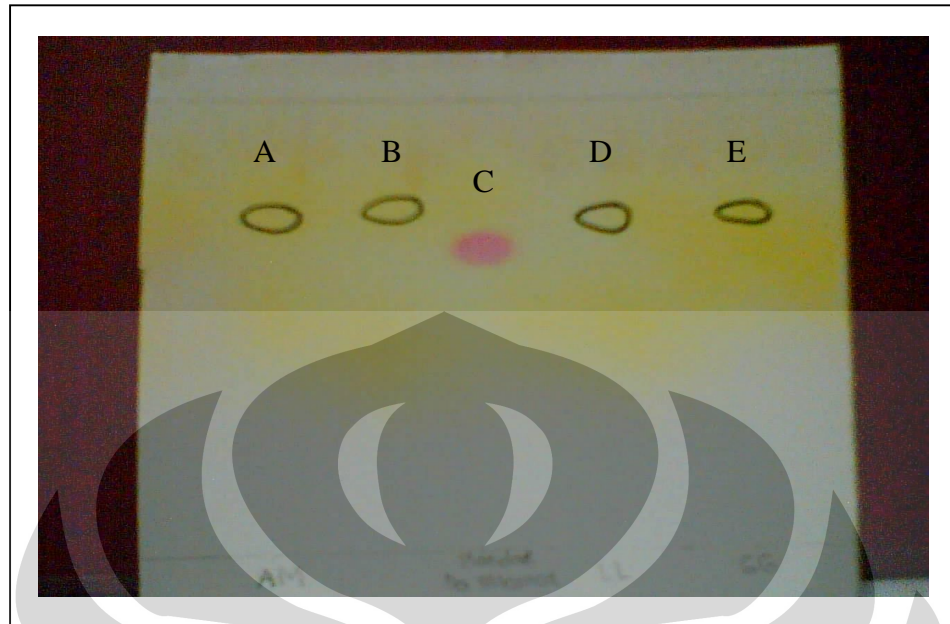


Gambar 15b. Kurva serapan bercak sampel GG dengan fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin,  $\lambda$  max 276 nm



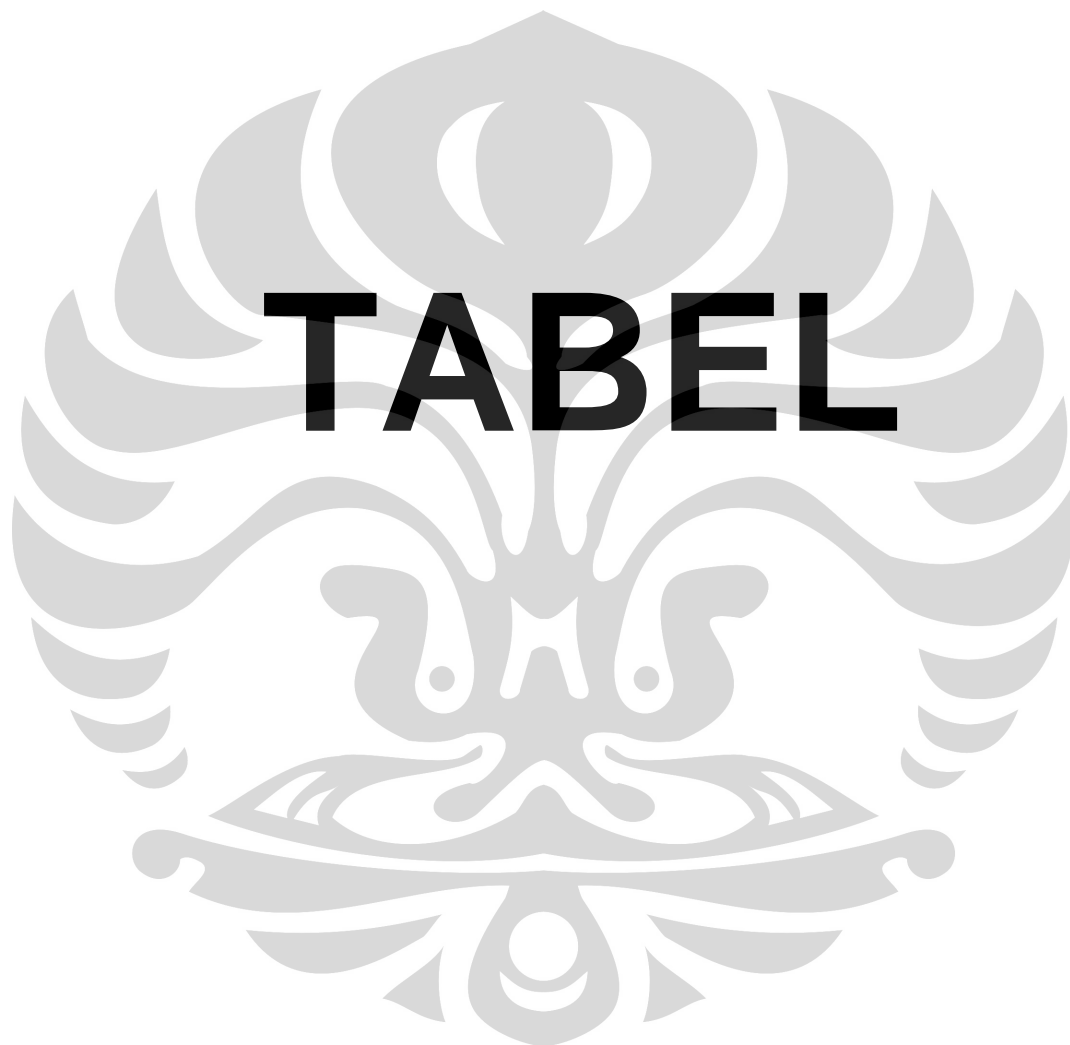
Gambar 15c. Kurva serapan bercak sampel AM (—) dibandingkan dengan bercak standar natrium siklamat (—), fase gerak butanol-asam asetat-air (4:1:1) pada  $\lambda$  523 nm

Kondisi: setelah disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1).



Gambar 16. Bercak sampel AM (A), bercak sampel LL (D), bercak sampel GG (E) dibandingkan dengan bercak standar natrium sakarin (B) dan bercak natrium siklamat (C)

Kondisi: setelah disemprot dengan larutan brom 5% dalam diklormetan kemudian disemprot kembali dengan larutan fluorescein 0,25% dalam campuran dimetilformamida-etanol (1:1).



Tabel 1  
 Nilai Rf pada variasi fase gerak

Fase gerak	Rf	
	Natrium sakarin	Natrium siklamat
Butanol – etanol – amonia – air 40 : 4 : 1 : 9	0,58	0,54
Butanol – asam asetat – air 4 : 1 : 1	0,61	0,56



Tabel 2  
Kurva kalibrasi dan linearitas natrium sakarin

Konsentrasi (ppm)	Berat ( $\mu\text{g}$ ) [x]	Luas puncak [y]
50,8	0,254	462,7
101,6	0,508	933,8
162,6	0,813	1406,2
203,2	1,016	1800,0
243,8	1,219	2123,0
304,8	1,524	2695,6

Keterangan:

Persamaan garis :  $y = 1740x + 22,62$

Koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9996

Tabel 3  
Batas deteksi dan batas kuantitasi natrium sakarin

Konsentrasi (ppm)	(μg) [x]	Luas			LOD (μg)	LOQ (μg)
		puncak [y]	y'	(y - y') <sup>2</sup>		
50,8	0,254	462,70	464,58	3,53		
101,6	0,508	933,80	906,54	743,11	0,0446	0,1485
162,6	0,813	1406,20	1436,89	942,00		
203,2	1,016	1800,00	1790,46	91,01		
243,8	1,219	2123,00	2144,03	442,18		
304,8	1,524	2695,60	2674,38	450,29		
				Σ = 2672,12		

Keterangan :

x = berat standar natrium sakarin (μg)

y = luas puncak / area yang diperoleh

y' = luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

S(y/x) = 25,8463

Tabel 4  
Uji keterulangan natrium sakarin

Konsentrasi (ppm)	Berat ( $\mu$ g)	Luas puncak [y]	x' x'	x' rata-rata	SD	KV (%)
50,8	0,254	463,0	0,2531	0,2567	0,004	1,56
		473,7	0,2592			
		473,1	0,2589			
		468,3	0,2561			
		476,8	0,2610			
		460,9	0,2519			
203,2	1,016	1659,7	0,9409	0,9208	0,013	1,41
		1610,6	0,9126			
		1601,2	0,9072			
		1617,4	0,9165			
		1644,9	0,9323			
		1615,3	0,9153			
304,8	1,524	2794,9	1,5933	1,5787	0,026	1,65
		2733,0	1,5577			
		2739,4	1,5614			
		2845,2	1,6222			
		2732,5	1,5574			
		2772,0	1,5801			

Tabel 5  
Kurva kalibrasi dan linearitas natrium siklamat

Konsentrasi (ppm)	Berat ( $\mu\text{g}$ ) [x]	Luas puncak [y]
610,8	3,054	11350,5
814,4	4,072	13791,6
1018	5,090	16278,7
1221,6	6,108	18508,1
1425,2	7,126	20524,9
1628,8	8,144	22611,3

Keterangan :

Persamaan garis :  $y = 2209x + 4805$

Koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9990

Tabel 6  
 Batas deteksi dan batas kuantitasi natrium siklamat

Konsentrasi (ppm)	Luas ( $\mu\text{g}$ ) [x]	Luas			LOD ( $\mu\text{g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}$ )
		puncak [y]	$y'$	$(y - y')^2$		
610,8	3,054	11350,50	11551,29	40315,02		
814,4	4,072	13791,60	13800,05	71,37	0,2815	0,9382
1018	5,090	16278,70	16048,81	52849,41		
1221,6	6,108	18508,10	18297,57	44322,04		
1425,2	7,126	20524,90	20546,33	459,42		
1628,8	8,144	22611,30	22795,1	33780,97		
				$\Sigma =$		
				171798,23		

Keterangan :

- x = berat standar natrium siklamat ( $\mu\text{g}$ )
- y = luas puncak / area yang diperoleh
- $y'$  = luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi
- $S(y/x) = 207,2427$

Tabel 7  
Uji keterulangan natrium siklamat

Konsentrasi (ppm)	Berat ( $\mu\text{g}$ )	Luas puncak [y]	x'	x' rata-rata	SD	KV (%)
610,8	3,054	13603,4	3,9830	4,0517	0,058	1,43
		13842,6	4,0913			
		13965,2	4,1468			
		13717,9	4,0348			
		13725,9	4,0384			
		13676,3	4,0160			
1221,6	6,108	21296,8	7,4657	7,4325	0,057	0,77
		21130,0	7,3902			
		21147,4	7,3981			
		21308,0	7,4708			
		21389,8	7,5078			
		21068,1	7,3622			
1628,8	8,144	24281,0	8,8167	8,8713	0,148	1,67
		24894,4	9,0943			
		24300,0	8,8253			
		23917,5	8,6521			
		24456,2	8,8960			
		24561,7	8,9437			

Tabel 8a  
 Penetapan kadar sampel AM

Berat sampel (µg)	Luas puncak [y]	x'	Kadar (%)	Kadar rata-rata (%)	KV (%)	Kadar rata-rata (%)
193,05	1532,6	0,8678	0,4495	0,4585 ± 0,015	1,71	0,4735 ± 0,013
	1581,4	0,8959	0,4641			
	1574,1	0,8917	0,4619			
203,4	1770,9	1,0048	0,4940	0,4910 ± 0,016	1,61	
	1728,5	0,9804	0,4820			
	1781,5	1,0109	0,4970			
199,50	1641,5	0,9304	0,4664	0,4711 ± 0,009	0,98	
	1673,6	0,9488	0,4756			
	1658,4	0,9401	0,4712			

Keterangan :

x' = berat sampel natrium sakarin berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 8b  
Penetapan kadar sampel LL

Berat sampel (µg)	Luas puncak [y]	x'	Kadar (%)	Kadar rata-rata (%)	KV (%)	Kadar rata-rata (%)
212,7	1332,3	0,7527	0,3539	0,3557 ± 0,012	1,59	0,3424 ± 0,008
	1322,0	0,7468	0,3511			
	1362,4	0,7700	0,3620			
205,3	1241,8	0,7007	0,3414	0,3422 ± 0,007	0,97	
	1257,5	0,7097	0,3458			
	1234,4	0,6964	0,3393			
204,1	1200,9	0,6771	0,3319	0,3294 ± 0,005	0,68	
	1190,5	0,6712	0,3290			
	1185,2	0,6681	0,3274			

Keterangan :

x' = berat sampel natrium sakarin berdasarkan persamaan kurva kalibrasi



Tabel 8c  
Penetapan kadar sampel GG

Berat sampel (µg)	Luas puncak [y]	x'	Kadar (%)	Kadar rata-rata (%)	KV (%)	Kadar rata-rata (%)
198,1	1595,6	0,9040	0,4565	0,4489 ± 0,013	1,49	0,4557 ± 0,011
	1561,5	0,8844	0,4466			
	1551,5	0,8787	0,4437			
200,7	1629,3	0,9234	0,4602	0,4547 ± 0,010	1,06	
	1598,0	0,9054	0,4512			
	1603,1	0,9083	0,4527			
201,3	1630,5	0,9241	0,4592	0,4636 ± 0,009	0,94	
	1660,9	0,9415	0,4678			
	1646,6	0,9333	0,4638			

Keterangan :

x' = berat sampel natrium sakarin berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Tabel 9  
Uji perolehan kembali natrium sakarin

Berat standar (µg)	Luas puncak [y]	X	Luas puncak [y']	x'	UPK (%)	UPK rata-rata (%)	KV (%)	UPK rata-rata
0,562	1242,8	0,7013	2205,2	1,2544	98,42	99,37 ± 0,010	0,83	99,14 ± 0,008
	1244,1	0,7020	2234,2	1,2710	101,25			
	1238,3	0,6987	2200,9	1,2519	98,44			
0,708	1262,8	0,7127	2488,2	1,4170	99,47	98,65 ± 0,006	0,45	
	1259,6	0,7109	2467,8	1,4053	98,07			
	1258,7	0,7104	2471,0	1,4071	98,41			
0,836	1303,3	0,7360	2743,1	1,5635	98,98	99,39 ± 0,009	0,59	
	1312,9	0,7415	2756,1	1,5710	99,21			
	1269,7	0,7167	2724,2	1,5526	99,99			

Keterangan :

x' = berat total sampel yang telah ditambahkan standar berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

y' = luas puncak sampel yang ditambahkan standar



# LAMPIRAN

## Lampiran 1 Perhitungan kurva kalibrasi

Dari kurva kalibrasi didapatkan persamaan :

$y = a + bx$ , dimana:

$y$  = luas puncak / area  
 $x$  = berat ( $\mu\text{g}$ )  
 $a$  = intersep  
 $b$  = slope  
 $r$  = koefisien korelasi

$a$  dan  $b$  dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{n \times \sum x_i \cdot y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{(\sum x_i^2) (\sum y_i) - (\sum x_i) (\sum x_i \cdot y_i)}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

Koefisien korelasi ( $r$ ) dihitung dengan rumus :

$$r = \frac{n \times \sum x_i \cdot y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{\sqrt{\{(n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2) \times (n \times \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2)\}}}$$

Lampiran 2  
Perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Rumus :

$$S_{y/x} = \left[ \frac{\sum (y-y')^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

a. Batas Deteksi (LOD) =  $\frac{3 (S_{y/x})}{b}$

b. Batas Kuantitasi (LOQ) =  $\frac{10 (S_{y/x})}{b}$

Keterangan :

b = slope dari kurva kalibrasi ;  $y = a+bx$

$S_{y/x}$  = simpangan baku residual

y = luas puncak yang diperoleh

y' = luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Contoh perhitungan :

$$y = 1740x + 22,62$$

$$\sum (y-y')^2 = 2672,12$$

$$n = 6$$

$$S_{y/x} = \left[ \frac{2672,12}{6 - 2} \right]^{1/2}$$

$$S_{y/x} = 25,8563$$

a. Batas Deteksi (LOD) =  $\frac{3 \times 25,8563}{1740} = 0,0446$

b. Batas Kuantitasi (LOQ) =  $\frac{10 \times 25,8563}{1740} = 0,1485$

Lampiran 3  
Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

Simpangan baku atau standar deviasi :

$$SD = \left[ \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2}$$

Koefisien variasi ( RSD atau KV (%) ) :

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan :

$x$  = berat ( $\mu\text{g}$ )

$\bar{x}$  = berat rata-rata ( $\mu\text{g}$ )

$n$  = jumlah data

Contoh perhitungan :

$$\sum (x - \bar{x})^2 = 6,594 \cdot 10^{-5}$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 0,2567$$

$$SD = \left[ \frac{6,594 \cdot 10^{-5}}{6 - 1} \right]^{1/2} = 0,004$$

$$KV = \frac{0,004}{0,2567} \times 100\% = 1,56\%$$

Lampiran 4  
Perhitungan uji perolehan kembali

Uji Perolehan Kembali (UPK) dihitung dengan rumus :

$$UPK = \frac{x' - x_o}{x^*o} \times 100\%$$

Keterangan :

- $x'$  = berat ( $\mu\text{g}$ ) total sampel yang telah ditambahkan standar berdasarkan hasil perhitungan menggunakan persamaan kurva kalibrasi  
 $x_o$  = berat ( $\mu\text{g}$ ) sampel berdasarkan hasil perhitungan menggunakan persamaan kurva kalibrasi  
 $x^*o$  = berat ( $\mu\text{g}$ ) standar yang ditambahkan

Contoh perhitungan :

$$x' = 1,2544$$

$$x_o = 0,7013$$

$$x^*o = 0,5620$$

$$UPK = \frac{1,2544 - 0,7013}{0,5620} \times 100\% = 98,42\%$$

Lampiran 5  
Perhitungan penetapan kadar

$$\% \text{ Kadar} = \frac{x'}{x} \times 100\%$$

Keterangan :

$x'$  = berat ( $\mu\text{g}$ ) sampel berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

$x$  = berat ( $\mu\text{g}$ ) sampel yang ditimbang

Contoh perhitungan :

$$x = 212,7$$

$$\text{Luas puncak (y)} = 1332,3$$

$$y = 1740x + 22,62$$

$$x' = \frac{1332,3 - 22,62}{1740} = 0,7527$$

$$\% \text{ Kadar} = \frac{0,7527}{212,7} \times 100\% = 0,3539\%$$