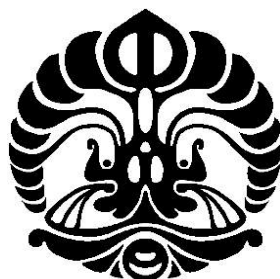


**ANALISIS BENZENA DALAM MINUMAN RINGAN YANG MENGANDUNG
ASAM BENZOAT, ASAM SITRAT DAN VITAMIN C YANG TELAH
DIPAPARKAN SINAR MATAHARI SECARA KROMATOGRIFI GAS**

ANGELINA MAGDALENA

0706197156



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI EKSTENSI

DEPOK

2010

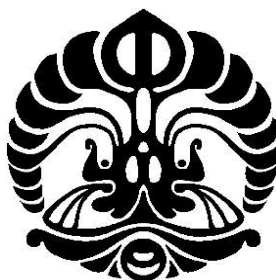
**ANALISIS BENZENA DALAM MINUMAN RINGAN YANG MENGANDUNG
ASAM BENZOAT, ASAM SITRAT DAN VITAMIN C YANG TELAH
DIPAPARKAN SINAR MATAHARI SECARA KROMATOGRIFI GAS**

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

Oleh :

ANGELINA MAGDALENA

0706197156



DEPOK

2010

SKRIPSI : ANALISIS BENZENA DALAM MINUMAN RINGAN YANG
MENGANDUNG ASAM BENZOAT, ASAM SITRAT DAN
VITAMIN C YANG TELAH DIPAPARKAN SINAR MATAHARI
SECARA KROMATOGRAFI GAS

NAMA : ANGELINA MAGDALENA

NPM : 0706197156

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010



DR. YAHDIANA HARAHAHAP, MS

PEMBIMBING I



DR. HARMITA, APT

PEMBIMBING II

Tanggal lulus ujian Sidang Sarjana : 11 Januari 2010

Penguji I : Dr. Arry Yanuar, M.Si.....

Penguji II : Dr. Abdul Mun'im, M.Si.....

Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc.....

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya yang telah membantu dan menuntun penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan baik.

Skripsi dengan judul Analisis Benzena dalam Minuman Ringan yang Mengandung Asam Benzoat, Asam Sitrat dan Vitamin C yang Telah Dipaparkan Sinar Matahari secara Kromatografi Gas ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Farmasi.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, yaitu kepada :

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku pembimbing I atas segala perhatian, bimbingan, saran, bantuan serta dukungan moril dan materil yang telah diberikan sampai terselesaikannya penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt. selaku pembimbing II atas bimbingan dan saran yang telah diberikan sampai terselesaikannya penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.

4. Orang tua dan adik-adik penulis: Iyus dan Lauren yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, doa, semangat, dan dukungan yang tidak terhingga kepada penulis.
5. Seluruh dosen dan laboran, serta seluruh karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Sahabat terkasih penulis: Fitri, Erika, Yulita, Meltari, Melinda, Ranthy, Desy, Ade dan Cica. Terima kasih atas kasih sayang, semangat, doa, dan perhatian yang diberikan kepada penulis. Semoga persahabatan ini akan terus terjalin.
7. Teman-teman Farmasi, terutama yang tergabung dalam KBI Kimia Farmasi: Ka Ingga, Pika, DJ, Fabel, Anyu, Koba, Galih dan Tika.
8. Semua pihak lain yang belum disebutkan, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah banyak membantu penulis.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Besar harapan penulis bahwa skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2010

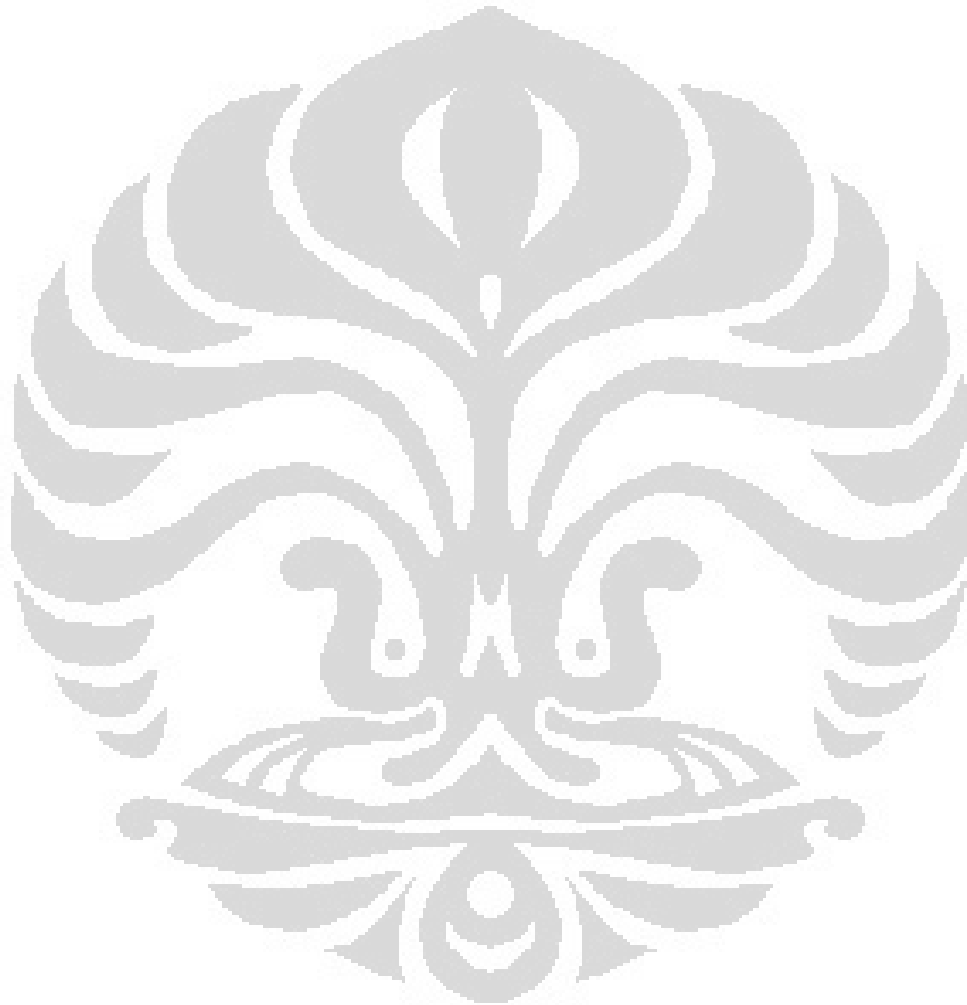
ABSTRAK

Benzena adalah senyawa kimia organik yang bersifat karsinogenik, dapat menyebabkan leukemia pada manusia. *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mengklasifikasikan benzena sebagai Grup 1 yaitu senyawa karsinogen pada manusia. Mekanisme pembentukan benzena dalam minuman ringan adalah sebagai hasil dari dekarboksilasi asam benzoat oleh radikal hidroksi. Pemanasan dapat mempercepat terbentuknya benzena. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kadar benzena yang terbentuk dalam minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C yang telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu. Analisis pembentukan benzena dilakukan dengan kromatografi gas detektor ionisasi nyala, dengan suhu injektor, dan detektor berturut-turut 200°C, 230°C; suhu awal kolom 60°C sampai 120°C dengan kecepatan kenaikan suhu 3°C/menit dan laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit. Kadar benzena dalam sampel A sebesar 7,66 bpm; sampel B sebesar 12,55 bpm dan sampel C sebesar 12,97 bpm. Kadar benzena dalam sampel A masih dibawah jumlah maksimum yang diijinkan WHO sedangkan pada sampel B dan C berada diatas jumlah maksimum yang diijinkan WHO yaitu 10 bpm.

Kata kunci : karsinogenik, kromatografi gas, benzena, minuman ringan.

xi + 100 hlm; gbr; tabel; lamp.

Daftar acuan : 36 (1979-2009)



ABSTRACT

Benzene is a carcinogenic organic chemical compound and it can cause leukemia to human. International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies benzene as Group 1 which is carcinogenic in human. The mechanism of benzene formation in soft drinks is a result from decarboxylation of benzoic acid by hydroxy radicals. Heating can accelerate benzene formation. Therefore, it is necessary to determine the level of benzene that forms in soft drinks which contains benzoic acid, citric acid and vitamin C which has exposed to the sunlight for 2 weeks. Analysis of benzene formation was done by gas chromatography flame ionization detector, a temperature of injector, and detector with 200°C, 230°C respectively; first column temperature was 60°C to 120°C with speed increase from 3°C/minute, and flow rate of 1.5 ml/minute. Levels of benzene formed in sample A was 7.66 ppb; sample B was 12.55 ppb and sample C was 12.97 ppb. Level of benzene in the sample A was below the maximum level allowed by WHO requirement while in sample B and C were above the maximum level allowed by WHO which is 10 ppb.

Keywords : carcinogenic, gas chromatography, benzene, soft drink.

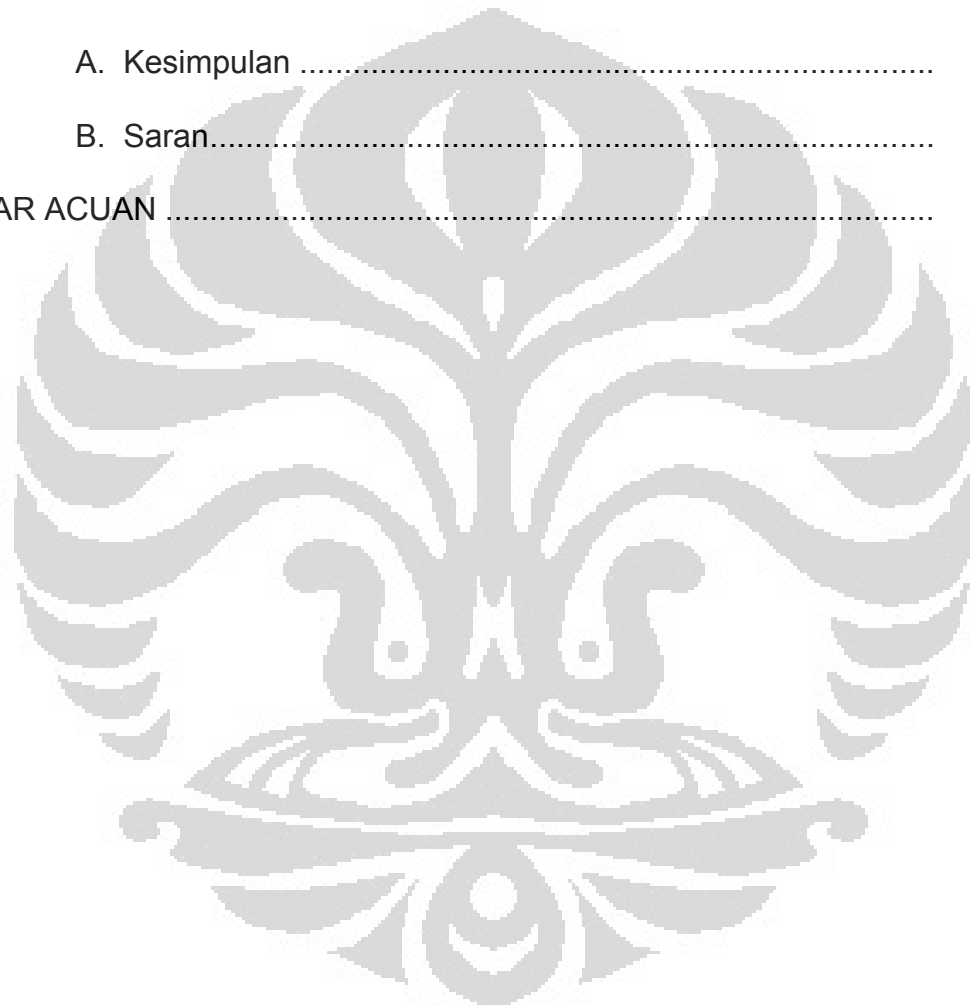
xi + 100 p.g.; fig.; tab.; app.

Bibliography : 36 (1979-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Benzena	5
B. Minuman Ringan	11
C. Kromatografi Gas	19
D. Metode Analisis Senyawa Benzena	32
E. Validasi Metode Analisis	34
BAB III. ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA	43
A. Lokasi	43
B. Bahan	43
C. Alat	43

D. Cara Kerja	44
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	51
A. Hasil	51
B. Pembahasan	53
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	63
A. Kesimpulan	63
B. Saran.....	64
DAFTAR ACUAN	65



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumus struktur benzena	5
2. Reaksi pembentukan benzena dari dekarboksilasi asam benzoat dalam minuman ringan.....	10
3. Rumus struktur asam benzoat.....	13
4. Rumus struktur asam sitrat.....	16
5. Rumus struktur vitamin C	18
6. Alat kromatografi gas Shimadzu GC-17A.....	73
7. Sampel yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C yang telah dipaparkan sinar matahari: sampel A, sampel B, sampel C	74
8. Kromatogram standar benzena murni 1.034 ppm dengan suhu awal kolom 60°C (suhu terprogram) dan laju alir gas 1,5 mL/menit (waktu retensi benzena 5,3 menit).....	74
9. Kurva kalibrasi standar benzena	75
10. Kromatogram sampel minuman ringan A	76
11. Kromatogram sampel minuman ringan B	76
12. Kromatogram sampel minuman ringan C	77

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Batas maksimum penggunaan asam benzoat dalam berbagai jenis makanan	81
2. Batas maksimum penggunaan natrium benzoat dalam berbagai jenis makanan	82
3. Pengaruh pH terhadap molekul tidak terdisosiasi dari asam benzoat...	15
4. Penggunaan asam benzoat dan natrium benzoat sebagai pengawet pada minuman	15
5. Batas maksimum penggunaan asam sitrat dalam berbagai jenis makanan sebagai pengasam.....	83
6. Batas maksimum penggunaan vitamin C dalam berbagai jenis makanan sebagai antioksidan	84
7. Pemilihan kondisi optimum untuk analisis benzena dalam eter dengan variasi kecepatan alir gas pembawa	85
8. Data kurva kalibrasi standar benzena	86
9. Data linearitas, batas deteksi dan kuantitasi benzena	87
10. Data uji presisi benzena	88
11. Data uji perolehan kembali benzena	89
12. Data penetapan kadar benzena dalam sampel minuman ringan	90

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan regresi linear	93
2. Cara perhitungan uji presisi.....	94
3. Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	95
4. Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas.....	96
5. Cara perhitungan kadar benzena dalam sampel.....	97
6. Sertifikat analisis standar benzena.....	98
7. Komposisi sampel minuman ringan.....	100

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Perkembangan industri minuman ringan di Indonesia dalam beberapa tahun terakhir ini berkembang sangat pesat. Banyak merk impor yang diproduksi di dalam negeri yang kini merajai minuman ringan di Indonesia. Belum terhitung minuman ringan tradisional yang kini diolah secara modern dan dikemas dalam botol, kardus, kaleng dan plastik, seperti teh, limun dan jus. Masih ditambah lagi minuman ringan impor yang umumnya dengan kemasan kaleng, berupa *fruit-juice*, limun, air soda dan minuman non alkohol lainnya. Minuman ini banyak disukai karena rasanya yang nikmat, siap saji dan sangat memenuhi selera bagi mereka yang sedang dahaga, terutama setelah berolahraga dan bekerja berat.

Pada awal tahun 1990, *Environmental Protection Agency* (EPA) menyatakan bahwa terbentuknya benzena dalam beberapa minuman ringan yang melebihi batas legal untuk air minum yaitu 5 µg/L (bpm). Menurut WHO, jumlah maksimum yang diijinkan untuk air minum adalah 10 µg/L (bpm) (1). Tetapi *Food and Drug Administration* (FDA) menolak pernyataan tersebut. Pada tahun 2005 FDA mulai menyelidiki keberadaan benzena yang ditemukan dalam minuman ringan yang mengandung asam benzoat atau garamnya dan vitamin C. Hal ini menimbulkan postulat bahwa benzena

dengan konsentrasi rendah dapat terbentuk dalam beberapa minuman ringan sebagai hasil dari dekarboksilasi asam benzoat oleh radikal hidroksi (1, 2). Di Indonesia belum ada peraturan mengenai batas kandungan benzena dalam minuman ringan.

Benzena adalah senyawa kimia organik yang pada umumnya bersumber dari hasil penguapan bensin, hasil akhir atau buangan dari kendaraan, pabrik dan asap rokok. Senyawa ini digunakan di dalam bahan baku pada industri kimia dan di dalam berbagai macam proses industri lain (3, 4). Benzena bersifat karsinogenik yang dapat menyebabkan tumor pada tikus dan leukemia pada manusia (5). Dalam jangka pendek benzena dapat merusak saraf, sistem imun, dan sistem peredaran darah sementara pada konsentrasi di atas konsentrasi kontaminasi maksimum (*maximum contaminant level, MCL*) dapat menyebabkan kanker jika terpapar dalam jangka panjang (6). *International Agency for Research on Cancer (IARC)* mengklasifikasikan benzena sebagai Grup 1 yaitu senyawa karsinogen pada manusia (7).

Keberadaan benzena dalam makanan bersumber dari beberapa sebab, diantaranya adalah perpindahan dari bahan pengemas, terpapar dari lingkungan, degradasi dari pengawet, pemanasan, proses memasak dan teknik radiasi yang digunakan untuk sterilisasi (8). Hasil penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa benzena dalam minuman ringan dapat terbentuk melalui dekarboksilasi ion benzoat dalam kondisi asam. Radikal hidroksi (OH^*) akan terbentuk dari reaksi asam askorbat dan

oksigen terlarut, khususnya dipicu oleh keberadaan sejumlah kecil ion-ion logam transisi, seperti Cu^{2+} dan Fe^{3+} . Selanjutnya OH^* akan menyerang benzoat sehingga mengalami proses dekarboksilasi, sehingga terbentuk benzena (9). Keasaman (pH), panas dan sinar matahari dapat mempercepat terbentuknya benzena. Sedangkan agen pengkhelat dan pemanis dapat menghambat terbentuknya benzena (2, 9).

Asam benzoat biasanya digunakan sebagai pengawet dan vitamin C dapat merupakan komponen jus buah dari minuman itu sendiri atau sebagai tambahan vitamin atau antioksidan (3). Hasil survei Van Poucke dan kawan-kawan, yang dilakukan terhadap minuman ringan yang terdapat di pasar Belgia, ditemukan bahwa keberadaan asam benzoat dan pengatur keasaman, seperti asam sitrat; atau vitamin C dan pengatur keasaman berpengaruh pada pembentukan benzena (2). Oleh karena itu, sampel yang digunakan dalam penelitian untuk analisis benzena ini adalah minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C.

Menurut *The Codex Committee on Contaminants in Foods* metode yang telah dilakukan untuk mendeteksi adanya benzena dalam makanan antara lain *Thermal Desorption GC/MS*, Kromatografi Gas Spektrometri Massa, dan Kromatografi Gas Ionisasi Nyala (1).

Pada penelitian ini metode yang akan digunakan untuk analisis benzena dalam minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C adalah kromatografi gas ionisasi nyala. Metode ini dipilih karena tingkat keberhasilan yang tinggi, waktu analisis yang cepat,

sensitivitas yang tinggi pada sistem detektor, efisiensi pemisahan yang baik, analit yang akan dianalisis mudah menguap dan mampu menganalisis sampel dengan matriks yang kompleks.

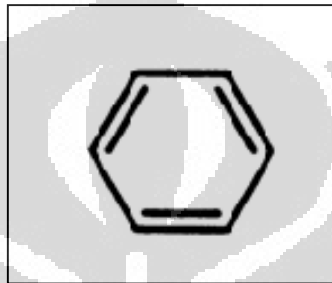
B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh kondisi optimum untuk analisis benzena pada minuman ringan secara kromatografi gas.
2. Melakukan validasi metode analisis benzena dalam minuman ringan secara kromatografi gas.
3. Menetapkan kadar benzena yang terdapat dalam beberapa sampel minuman ringan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. BENZENA



Gambar 1. Rumus struktur benzena

Data Fisika-Kimia (10, 11, 12, 13, 14):

Nama IUPAC : Benzena

Nama lain : Benzol, *cyclohexatriene*, *pyrobenzol*

Pemerian : Cairan tidak berwarna, mudah menguap, berbau khas, sangat mudah terbakar dan meledak

Rumus molekul: C_6H_6

Berat molekul : 78,11

Kelarutan : larut dalam 0,8 bagian per 1000 air (b/b) pada suhu $20^{\circ}C$, dapat bercampur dengan eter, kloroform, karbon disulfida, aseton, etanol, asam asetat glasial.

Titik didih : $80,1^{\circ}C$

Titik leleh : 5,5°C

Massa jenis : 0,88 g/ml

Pemanfaatan utama benzena pada industri kimia adalah untuk memproduksi senyawa-senyawa aromatik seperti *styrene*, fenol, sikloheksana dan nitrobenzena. Kadangkala benzena juga digunakan sebagai pelarut ekstraksi. Benzena juga digunakan sebagai tambahan pada bensin untuk meningkatkan angka oktan (11, 12).

Benzena masuk ke dalam tubuh dapat dengan cara inhalasi, oral (tertelan), maupun melalui penyerapan kulit. Benzena didistribusikan di dalam tubuh melalui darah ke hati, sumsum tulang dan jaringan yang banyak mengandung lemak (19). Metabolit akhir yang utama dari benzena adalah fenol yang diekskresikan melalui urin dalam bentuk terkonjugasi dengan asam sulfat atau glukuronat. Sejumlah kecil dimetabolisme menjadi katekol, hidrokuinon, karbondioksida, dan asam mukonat. Ekskresi benzena 12-50% dapat melalui udara (masih dalam bentuk benzena) dan kurang dari 1% melalui urin. Cara untuk mengetahui pajanan benzena dapat dengan pengukuran kadar fenol di dalam urin atau dengan pengukuran langsung kadar benzena di dalam darah.

Pengaruh Benzena terhadap Kesehatan

1. Keracunan Akut

Gejala utama pada keracunan akut adalah penekanan terhadap sistem saraf pusat yang terpajan dengan kadar 800-1600 mg/m³, dapat berupa pusing, nyeri kepala, mual, muntah, kehilangan keseimbangan, kejang, koma, dan dapat berakhir dengan kematian akibat henti nafas. Paparan dengan konsentrasi tinggi sekitar 64000 mg/m³ akan berakibat fatal dalam waktu 5-10 menit.

2. Keracunan Kronik

Efek terpenting dari paparan benzena adalah gejala kronisnya yang dapat berupa tekanan terhadap sumsum tulang dan perubahan ke arah keganasan berupa leukemia atau kemungkinan ke arah limfoma. Efek kronik benzena dapat dibagi 2, yaitu efek kanker dan efek bukan kanker.

a. Efek Kanker

Menurut *International Agency for Research on Cancer* (IARC) benzena diklasifikasikan sebagai Grup 1 senyawa yang diketahui dapat menyebabkan kanker pada manusia. Telah diidentifikasi leukemia yang berhubungan dengan paparan benzena. IARC menyimpulkan bahwa studi epidemiologis menggambarkan adanya hubungan antara paparan benzena dan berkembangnya *acute myelocytic leukemia* (AML).

IARC menyatakan bahwa leukemia dapat dicegah, yaitu dengan cara menghindari pajanan terhadap benzena. Pengobatan terhadap leukemia dapat berupa kemoterapi (tunggal maupun kombinasi), transplantasi sumsum tulang atau dengan interferon.

Korelasi antara depresi sumsum tulang dan leukemia akut dengan benzena adalah dengan memeriksa hitung kadar benzena di dalam darah dan kadar fenol di dalam urin yang kadarnya tidak lebih dari 50 mg/g kreatinin.

b. Efek Bukan Kanker

1) *Haematopoetic*

Efek toksik pajanan benzena yang paling berarti adalah kerusakan sumsum tulang yang terjadi secara diam-diam dan *irreversible*. Bagaimana cara benzena menyebabkan depresi sumsum tulang belum diketahui secara jelas, namun dikatakan bahwa metabolit yang terbentuk di hati akan ditransportasikan ke sumsum tulang, kemudian terjadi akumulasi di sumsum tulang dan mengakibatkan terhambatnya pembentukan sel. Dengan kata lain benzena tidak menyebabkan kerusakan sumsum tulang secara langsung, namun satu atau lebih dari metabolitnya yang berperan dalam hal tersebut.

Kerentanan individual dan temuan hematologis sangat bervariasi. Perubahan-perubahan yang terjadi adalah trombositopenia, leukopenia,

anemia atau gabungan dari ketiganya yaitu pansitopenia. Pada pajanan berkelanjutan dapat timbul anemia aplastik.

2) Kromosom

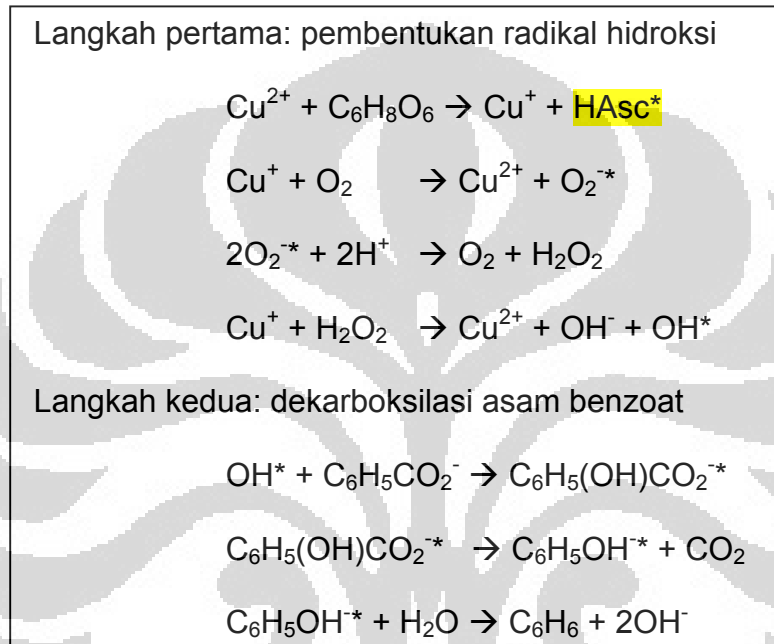
Benzena menyebabkan abrasi kromosom secara penomoran dan structural. Penyelidikan menunjukkan bahwa benzena adalah klastogen yang mengakibatkan abrasi kromosom secara *in vitro*. Data yang tersedia menunjukkan bahwa pajanan jangka panjang dalam konsentrasi > 64 mg/m³ benzena dapat dikaitkan dengan abrasi kromosom. Kerusakan genetis lainnya yang dilaporkan adalah pertukaran *sister chromatid*, *crosslink* DNA dan pembentukan DNA *adduct* (11).

Benzena dalam Minuman Ringan

Pada awal tahun 1990, *Environmental Protection Agency* (EPA) menyatakan bahwa terbentuknya benzena dalam beberapa minuman ringan yang melebihi batas legal untuk air minum yaitu 5 µg/L (bpm). Menurut WHO, jumlah maksimum yang diijinkan untuk air minum adalah 10 µg/L (bpm) (1). Pada tahun 2005 FDA mulai menyelidiki keberadaan benzena yang ditemukan dalam minuman ringan yang mengandung asam benzoat atau garamnya dan vitamin C. Hal ini menimbulkan postulat bahwa benzena dengan konsentrasi rendah dapat terbentuk dalam beberapa minuman ringan sebagai hasil dari dekarboksilasi asam benzoat oleh radikal hidroksi.

Benzena yang masuk ke dalam tubuh secara oral diabsorpsi secara cepat melalui saluran gastrointestinal dan didistribusikan ke seluruh tubuh (1, 2).

Reaksi pembentukan benzena dari dekarboksilasi asam benzoat dalam minuman ringan, yaitu (15, 16):



Gambar 2. Reaksi pembentukan benzena dari dekarboksilasi asam benzoat dalam minuman ringan

Untuk reaksi dekarboksilasi asam benzoat membentuk benzena belum diketahui secara pasti reaksinya. Dan juga belum diketahui bagaimana katalis logam transisi dapat masuk ke dalam minuman ringan tetapi kemungkinannya disebabkan menggunakan air yang sudah terkontaminasi.

Faktor-faktor yang mempengaruhi terbentuknya benzena dalam minuman ringan adalah keberadaan logam Cu dan Fe, keberadaan oksigen, keasaman (pH), suhu dan paparan sinar ultraviolet (15). Kemungkinan sumber lain adanya benzena dalam minuman ringan adalah kontaminasi dari

lingkungan, perpindahan dari bahan pengemas, proses memasak dan teknik radiasi yang digunakan untuk sterilisasi (6).

B. MINUMAN RINGAN

Minuman ringan menurut BPOM ialah produk minuman yang diperoleh tanpa melalui proses fermentasi dengan atau tanpa penambahan karbondioksida, dengan atau tanpa pengenceran sebelum diminum, tetapi tidak termasuk air, sari buah, susu, atau susu untuk persiapan produk, teh, kopi, cokelat, produk telur, produk daging, khamir, atau ekstrak sayur, sup, sari sayur dan minuman beralkohol (17).

Menurut beberapa komponen yang menyusun minuman ringan adalah air, bahan pemanis, perisa material, zat warna dan karbondioksida; sedangkan menurut Potter (1968) komponen utama minuman ringan adalah gula, perasa, zat warna, asam, air dan karbondioksida.

Tiga kategori utama untuk minuman ringan menurut Thorner dan Herzberg (1978) antara lain (18):

1. Minuman berkarbonat yang mencakup minuman asam maupun tidak asam.
2. Minuman tidak berkarbonat dengan perasa, essens atau pun bersama sari buah yang dibuat minuman.

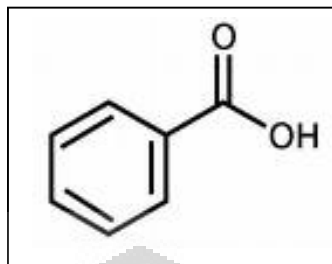
3. Minuman berkarbonat yang hanya menimbulkan efek *sparkle*, misalnya air soda dan air berkarbonat.

Persyaratan minuman ringan menurut Green (1981) antara lain (18):

1. Campuran minuman yang baik tanpa menimbulkan rasa yang tidak disukai setelahnya.
2. Menggunakan air yang memenuhi standar.
3. Disiapkan dalam keadaan cukup dingin.
4. Karbonasi yang cukup untuk memberikan efek yang menyegarkan.
5. Wadah yang jernih dan bersih.

Bahan tambahan yang dapat ditambahkan dalam minuman ringan seperti antioksidan, pengatur keasaman, pengawet, penambah gizi, pemanis buatan, pengemulsi, pemantap, pengental, pewarna dan penguat rasa. Pemakaian bahan tambahan digunakan sesuai dengan batasan yang telah ditentukan. Pemilihan bahan tambahan yang tepat dapat memberikan mutu yang lebih baik.

1. Asam Benzoat



Gambar 3. Rumus struktur asam benzoat

Data Fisika-Kimia (19, 20) :

Nama IUPAC	: Asam benzoat
Nama lain	: Asam benzenkarboksilat, asam fenilformat
Pemerian	: Hablur jarum atau sisik warna putih; tidak berbau atau agak berbau seperti benzaldehida; berasa payau.
Rumus molekul	: $C_7H_6O_2$
Berat molekul	: 122,12
Kelarutan	: Mudah larut dalam etanol P, kloroform P dan eter; sukar larut dalam air.

Asam benzoat merupakan pengawet kimia tertua yang digunakan untuk kosmetik, obat dan industri makanan. Natrium benzoat merupakan pengawet kimia pertama yang diakui oleh *U. S. Food and Drug Administration* (FDA). Maksimum penggunaannya adalah 0,15-0,25% pada makanan. Asam benzoat secara alami terdapat dalam *cranberries*, kayu manis, apel dan stroberi (20, 21). Definisi pengawet adalah bahan tambahan

makanan yang dapat mencegah atau menghambat fermentasi pengasaman atau peruraian lain terhadap makanan yang disebabkan oleh jasad renik (22).

Asam benzoat biasanya digunakan sebagai antimikroba pada buah-buahan asam yang diawetkan, sedangkan garam natrium benzoat digunakan untuk menghambat pertumbuhan jamur dan ragi (22). Asam benzoat biasa dipakai dalam bentuk garam natrium yang lebih mudah larut daripada asamnya, akan tetapi bentuk yang aktif ialah molekul-molekul asam benzoat itu sendiri.

ADI (*Acceptable Daily Intake*) menurut *Codex Alimentarius vol XIV Food Additives*, 1983 untuk asam benzoat adalah 0-5 mg/kg berat badan. Batas maksimum penggunaan asam benzoat dan natrium benzoat menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor: 722/MenKes/Per/IX/88 tentang bahan tambahan makanan dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Molekul-molekul yang tidak terdisosiasi dari asam benzoat yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antimikroba. Gabel (1921) merupakan orang pertama yang menunjukkan bahwa asam benzoat efektif melawan bakteri dalam media asam pada konsentrasi 0,1% dan dalam media netral pada 0,2% tetapi tidak aktif dalam media alkali. Dilaporkan bahwa efek antimikroba dari asam benzoat mendekati 100 kali efisien dalam larutan asam kuat dibandingkan dalam larutan netral (20, 21).

Tabel 3

Pengaruh pH terhadap molekul tidak terdisosiasi dari asam benzoat (20)

pH	Asam Tidak Terdisosiasi (%)
3	93,5
4	59,3
5	12,8
6	1,44
7	0,144

Rentang pH optimum untuk aktivitas antimikroba asam benzoat adalah 2,5-4,0 yang menyebabkan sangat cocok untuk makanan berasam tinggi seperti minuman berkarbonasi, minuman rasa buah, minuman sari buah, dan jus buah (21, 20).

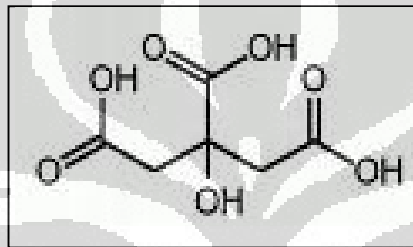
Tabel 4

Penggunaan asam benzoat dan natrium benzoat sebagai pengawet pada minuman (20)

Jenis Minuman	Konsentrasi untuk Penggunaan Umum (%)
Minuman berkarbonasi	0,03-0,05
Minuman tidak berkarbonasi	0,1
Sirup	0,1
Minuman rasa buah	0,05-0,1
Jus buah	0,1
Minuman sari buah	0,05-0,1
Minuman konsentrat	0,1

Keuntungan dari penggunaan pengawet ini adalah harganya murah, mudah bercampur dalam produk, tidak berwarna dan toksisitasnya relatif rendah (20). Dampak negatif dari asam benzoat ialah dapat menyebabkan penyakit syaraf, asma dan reaksi alergi (khususnya yang sensitif terhadap asam asetilsalisilat dan tartrazin) (23).

2. Asam Sitrat



Gambar 4. Rumus struktur asam sitrat

Data Fisika-Kimia (14, 19, 22):

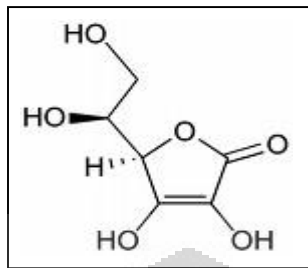
Nama IUPAC	: Asam sitrat
Nama lain	: Asam 2-hidroksipropana-1, 2, 3-trikarboksilat
Pemerian	: Serbuk bening tidak berwarna, butiran atau serbuk hablur warna putih; tidak berbau; rasa sangat asam.
Rumus molekul	: $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
Berat molekul	: 210,15
Kelarutan	: Sangat mudah larut dalam air, mudah larut dalam etanol P; larut dalam eter P.
pKa	: 3,09
pH (1% larutan)	: 2,25

Penggunaan asam organik seperti asam sitrat sebagai bahan tambahan makanan adalah untuk meningkatkan rasa asam (mengatur tingkat keasaman/*buffer*) dan sebagai sekuestran. Tujuan penggunaan *buffer* untuk menyesuaikan dan memantapkan pH makanan dengan pH yang diinginkan (24). Definisi sekuestran adalah bahan tambahan makanan yang dapat mengikat ion logam yang ada dalam makanan, sehingga memantapkan warna, aroma dan tekstur (22).

Asam sitrat juga terdapat dalam makanan seperti buah dan sayur. Asam sitrat biasanya digunakan untuk minuman rasa buah. Penambahan asam sitrat ke dalam minuman dapat meningkatkan dan mempertegas rasa. Asam juga dapat meningkatkan aktivitas natrium benzoat. Penggunaan maksimum dalam minuman adalah sebesar 3 gram/liter sari buah. Penyimpanannya dalam wadah tertutup rapat karena sifatnya yang higroskopis (19, 25, 26).

Batas maksimum penggunaan asam sitrat menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor: 722/MenKes/Per/IX/88 tentang bahan tambahan makanan dapat dilihat pada Tabel 5.

3. Vitamin C



Gambar 5. Rumus struktur vitamin C

Data Fisika-Kimia (14, 19):

Nama IUPAC	: Asam askorbat, vitamin C
Nama lain	: 3- okso-L-gulofuranolakton
Pemerian	: Hablur atau serbuk hablur, warna putih atau agak kekuningan; tidak berbau; rasa asam.
Rumus molekul	: $C_6H_8O_6$
Berat molekul	: 176,13
Kelarutan	: Mudah larut dalam air; agak sukar larut dalam etanol P, praktis tidak larut dalam kloroform P dan dalam eter P.

Vitamin C tersebar luas di alam, kebanyakan dalam produk tumbuhan seperti buah, terutama buah jeruk, sayur hijau, tomat, kentang, dan buah beri. Satu-satunya sumber hewan vitamin ini ialah susu dan hati. Konsentrasi dalam berbagai ragam jaringan buah sangat beragam, misalnya, dalam apel, konsentrasi vitamin C dalam kulit 2 sampai 3 kali konsentrasi dalam daging buah.

Vitamin C sebagai bahan tambahan makanan digunakan sebagai penambah gizi atau antioksidan. Penambah gizi ialah bahan tambahan makanan berupa asam amino, mineral atau vitamin baik tunggal maupun campuran, yang dapat memperbaiki/memperkaya nilai gizi makanan. Sedangkan antioksidan termasuk ke dalam bahan pengawet. ADI untuk vitamin C yang penggunaannya sebagai antioksidan adalah 0-15 mg/kg berat badan (22).

Batas maksimum penggunaan vitamin C menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor: 722/MenKes/Per/IX/88 tentang bahan tambahan makanan dapat dilihat pada Tabel 6.

C. KROMATOGRAFI GAS

1. Teori

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas dan kromatografi cair (27).

Kromatografi gas adalah suatu cara untuk memisahkan campuran yang komponen-komponennya dapat menguap pada suhu percobaan (sampai 400°C) dengan menggunakan gas sebagai fase gerak melalui fase

diam. Bila fase diam berupa zat padat maka disebut kromatografi gas-padat (KGP). Bila fase diam berupa zat cair maka disebut kromatografi gas-cair (KGC) (27). Banyaknya macam fase cair yang dapat digunakan sampai suhu 400°C menyebabkan KGC merupakan bentuk kromatografi gas yang paling serba guna, selektif dan lebih populer dibandingkan dengan KGP (28).

Pada KGC, pemisahan terjadi karena perbedaan kelarutan (partisi) relatif masing-masing komponen antara fase gerak dan fase diam yang berupa cairan dengan titik didih tinggi (tidak mudah menguap) yang terikat pada zat padat penunjangnya (*support*) yang bersifat inert. Sedangkan pada KGP, pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya terjadi karena perbedaan adsorpsi relatif masing-masing komponen pada fase diam yang berupa zat padat penyerap (28).

Kegunaan umum kromatografi gas adalah untuk melakukan pemisahan dinamis dan identifikasi semua jenis-jenis senyawa organik yang mudah menguap dan juga untuk melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu campuran. Kromatografi gas dapat bersifat destruktif dan non destruktif tergantung pada detektor yang digunakan (29). Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi zat yang dianalisis dengan waktu retensi zat pembanding (standar). Analisis kuantitatif dilakukan dengan membandingkan tinggi dan luas puncak kromatogram dari zat yang dianalisis dengan tinggi dan luas puncak kromatogram zat pembanding (standar) (28).

Keunggulan kromatografi gas dibandingkan dengan teknik kromatografi lainnya adalah dalam hal kecepatan, sensitif, spesifik (misalnya penggunaan Spektrometer Massa pada teknik GC-MS sebagai detektor), dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap mikrosampel berupa gas, zat padat, atau zat cair, dan dalam hal tertentu pemisahan yang dihasilkan lebih sempurna (27). Kelemahannya adalah teknik ini terbatas untuk zat yang mudah menguap (28) dan harga instrumennya yang relatif mahal (27).

Resolusi merupakan ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lain. Resolusi didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak dibagi rata-rata lebar dua puncak yang diukur pada alas puncak. Resolusi pada kromatografi gas ditentukan oleh dua faktor, efisiensi kolom dan efisiensi pelarut. Efisiensi kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram (*peak broadening*) dan efisiensi pelarut menentukan posisi puncak kromatogram (*relative retention*) (27).

Effisiensi kolom dapat diukur dari jumlah plat teori (N) atau HETP (*Height Equivalent of Theoretical Plate*). HETP yaitu panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya kesetimbangan komponen cuplikan (linarut) antara fase gerak dan fase diamnya. Effisiensi kolom meningkat dengan bertambahnya jumlah plat teori (N) sedangkan efisiensi pelarut meningkat dengan bertambahnya waktu retensi (27, 28).

2. Instrumentasi

Bagian-bagian utama dari sebuah kromatografi gas yaitu silinder dengan gas pembawa (*carrier gas*), pengukur tekanan dan pengontrol kecepatan alir, tempat injeksi sampel (*injection port*), kolom, detektor dan amplifier, rekorder/perekam, oven dengan termostat untuk tempat injeksi (gerbang suntik), kolom, dan detektor (27).

3. Sistem Kromatografi

a. Gas Pembawa

Tanki gas bertekanan tinggi berlaku sebagai sumber gas pembawa. Suatu pengatur tekanan digunakan untuk menjamin tekanan yang seragam pada pemasok kolom sehingga diperoleh laju aliran gas yang tetap (28). Berbagai jenis gas yang dapat digunakan adalah hidrogen, helium, nitrogen atau argon (30).

Persyaratan untuk gas pembawa, yaitu: inert, untuk mencegah interaksi dengan cuplikan atau pelarut (fase diam), dapat meminimumkan difusi gas, mudah didapat dan murni, murah serta cocok untuk detektor yang digunakan(28).

b. Memasukkan Cuplikan

Cuplikan harus dimasukkan ke dalam kolom sekaligus. Pemeriksaan cara memasukkan cuplikan yang baik adalah dengan menaikkan suhu pemanas tempat suntik dan memperkecil ukuran cuplikan. Bila salah satu

dari kedua faktor ini memperbesar jumlah pelat teori, artinya cara mencuplik tidak baik. Cuplikan gas biasanya dimasukkan dengan semprit kedap gas (28).

Zat cair ditangani dengan semprit. Baru-baru ini alat untuk menyuntikkan zat padat langsung sudah tersedia. Tetapi cara yang paling mudah untuk zat padat adalah dengan melarutkannya dalam suatu pelarut yang tidak mengganggu cuplikan yang dianalisis. Suatu cara baku untuk memasukkan gas dan zat cair adalah dengan memasukkan jarum suntik melalui septum yang dapat menutup kembali sendiri dan menyuntikkan sejumlah volume terukur dari semprit (28). Untuk mendapatkan efisiensi yang besar, sebaiknya digunakan jumlah sampel sekecil mungkin (1 sampai 10 μl) yang konsisten dengan kepekaan detektor (30).

c. Kolom

Pipa kolom dapat terbuat dari tembaga, baja nirkarat, aluminium, dan kaca yang berbentuk lurus, lengkung, atau melingkar. Tembaga kurang cocok karena dapat menyerap atau bereaksi dengan komponen cuplikan tertentu (amin, asetilena, terpen, dan steroid). Pada umumnya digunakan baja nirkarat, yang dikemas dalam bentuk lurus agar kemasan seragam, kemudian dilingkarkan agar dapat dipasang dalam ruang kolom yang terbatas. Kolom lurus lebih efisien, tetapi dapat menjadi tidak praktis, terutama bila alat bekerja pada suhu tinggi (28).

Kolom pada kromatografi gas dikelompokkan menjadi dua kelompok utama, yaitu kolom yang terkemas (*packed column*) dan kolom kapiler (*capillary column*) atau kolom tabung terbuka.

- 1) Kolom yang terkemas (*packed column*) mempunyai panjang antara 1-10 meter dengan diameter dalam antara 3-10 mm atau sampai lebih dari 10 cm bagi kolom preparatif. Kolom diisi dengan suatu material pendukung padat inert yang dilapisi dengan suatu fase diam cair atau padat (27). Ukuran partikel fase diam biasanya berkisar antara 60-80 mesh (250-170 μm) (29).
- 2) Kolom kapiler (*capillary column*) atau kolom tabung terbuka panjangnya dapat mencapai 10-50 meter dengan diameter dalam sangat kecil, yakni 0,2-1,2 mm. Fase diam melekat mengelilingi dinding dalam kolom. Ada tiga macam jenis lapisan pada kolom kapiler ini, yaitu: (27)
 - a) Kolom WCOT (*Wall Coated Open Tubuler*) dimana fase diam cairan dilapiskan secara langsung pada dinding dalam tabung kapiler.
 - b) Kolom PLOT (*Porous Layer Open Tubuler*) atau SCOT (*Support Coated Open Tubuler*) adalah jenis kolom kapiler yang cairan fase diamnya masih ditambah partikel pendukung padat yang telah terikat pada permukaan bagian dalam kolom kapiler.
 - c) Kolom FSOT (*Fused Silica Open Tubuler*) adalah jenis kolom kapiler yang fase diamnya terikat secara kimia (*chemically bonded phase*)

dengan permukaan bagian dalam kolom kapiler, sedangkan bagian luar "*fused silica*" dilapisi resin polyimida. Kelebihan kolom ini adalah tahan terhadap temperatur tinggi, sehingga kemungkinan terjadinya penguapan fase diam (*bleeding*) sangat kecil, garis datar (*baseline*) pada saat analisis relative lebih stabil dan dimungkinkan untuk analisis dengan perubahan temperatur yang cepat, serta bagian dalam kolom dapat dicuci.

d. Penyangga Padat

Penyangga padat dimaksudkan untuk memperoleh permukaan yang luas dan inert bagi lapisan fase diam. Persyaratan bagi *support* yaitu harus inert untuk mencegah adsorpsi, kuat atau tahan gesekan, permukaannya luas (1-20 m²/g), berukuran serba sama dan bentuknya teratur untuk memudahkan pengepakan serta berpori dengan ukuran $\pm 10 \mu\text{m}$ atau kurang. Bahan baku support biasanya kerangka diatomae. Dalam perdagangan dikenal dengan *Chromosorb*[®], terdiri dari dua jenis yaitu *Chromosorb P* (warna pink, sifat adsorpsi kuat, cocok untuk pemisahan hidrokarbon) dan *Chromosorb W* (warna putih, nonadsorptif, cocok untuk pemisahan senyawa polar) (27).

e. Fase Diam (27)

Pemilihan cairan fase diam merupakan salah satu hal yang sangat menentukan keberhasilan pemisahan. Pemilihan fase diam disesuaikan

dengan polaritas sampel. Sampel yang polar maka fase diamnya juga polar, dan sebaliknya. Jadi dengan pemilihan fase diam yang tepat maka komponen-komponen dengan titik didih sama dapat dipisahkan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Secara garis besar fase diam cair dapat dikelompokkan menjadi:

- 1) Fase cair sangat polar (senyawa-senyawa yang sangat polar, dapat membentuk rangkaian ikatan hidrogen) contoh: gliserol, glikol, polifenol.
- 2) Fase cair polar (cairan mengandung baik atom penerima dan atom H aktif) contoh: alkohol-alkohol, fenol-fenol.
- 3) Fase cair polaritas medium (senyawa ini hanya mengandung atom-atom penerima tetapi atom H aktif) contoh: eter, keton, aldehida.
- 4) Fase cair polaritas rendah (senyawa-senyawa ini hanya mengandung atom H aktif, tidak memiliki atom penerima) contoh: hidrokarbon aromatik, kloroform.
- 5) Fase cair non polar (senyawa-senyawa ini tidak dapat membentuk ikatan hidrogen) contoh: hidrokarbon jenuh, sulfida.

f. Suhu (28)

Dalam sistem kromatografi diperlukan sekali untuk memiliki tiga pengendali suhu yang berlainan.

1) Suhu Gerbang

Suntik Gerbang suntik harus cukup panas untuk menguapkan cuplikan sedemikian cepat sehingga tidak menghilangkan keefisienan yang disebabkan oleh cara penyuntikan. Sebaliknya, suhu gerbang suntik harus cukup rendah untuk mencegah peruraian akibat panas.

2) Suhu Kolom

Suhu kolom harus cukup tinggi sehingga analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang layak, dan harus cukup rendah sehingga pemisahan yang dikehendaki tercapai. Menurut pendekatan sederhana yang dilakukan oleh Giddings, waktu retensi naik dua kali lipat tiap penurunan suhu kolom 30°C . Untuk kebanyakan cuplikan, semakin rendah suhu kolom, semakin tinggi koefisien partisi dalam fase diam sehingga hasil pemisahan semakin baik. Pada beberapa kasus tidak dapat digunakan suhu rendah, terutama bila cuplikan terdiri atas senyawa yang rentangan titik didihnya lebar. Untuk itu suhu perlu diprogram.

3) Suhu Detektor

Pengaruh suhu pada detektor sangat bergantung pada jenis detektor yang digunakan. Tetapi, sebagai patokan umum dapat dikatakan bahwa detektor dan sambungan antara kolom dan detektor harus cukup panas sehingga cuplikan dan/atau fase diam tidak mengembun.

Pelebaran puncak dan menghilangnya puncak komponen merupakan ciri khas terjadinya pengembunan.

g. Detektor

Detektor pada kromatografi adalah suatu sensor elektronik yang berfungsi mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen di dalamnya menjadi sinyal elektronik. Sinyal elektronik detektor akan sangat berguna untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap komponen-komponen yang terpisah di antara fase diam dan fase gerak (29). Berikut ini macam-macam detektor yang biasa digunakan pada kromatografi gas (27, 28):

1) Detektor Hantar Panas (*Thermal Conductivity Detector = TCD*)

Prinsip kerjanya adalah suhu filament meningkat dengan adanya analit pada gas pembawa yang melaluinya, hal ini akan menyebabkan kenaikan resistensi. Mempunyai sifat non destruktif, tidak selektif (bersifat umum), batas linearitas 10^4 dan jumlah terkecil yang masih dapat terdeteksi sampai 10^{-5} g/ml.

2) Detektor Ionisasi Nyala (*Flame Ionization Detector = FID*)

Prinsip kerjanya adalah komponen yang dibakar pada suatu nyala akan menghasilkan ion, ion-ion ini dikumpulkan dan diubah menjadi arus listrik. Mempunyai sifat destruktif, dapat mendeteksi semua senyawa

organik, batas linearitas 10^7 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-11} g/ml.

3) Detektor Tangkap Elektron (*Electron Capture Detector = ECD*)

Prinsip kerjanya adalah pada waktu spesies-spesies yang bersifat elektronegatif melewati detektor, spesies-spesies tersebut menangkap elektron-elektron termal. Bersifat dekstruktif, selektif terhadap senyawa dengan sifat elektronegatif seperti halogen organik, batas linearitas 5×10^2 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-13} g/ml.

4) Detektor Nitrogen Fosfor (*Nitrogen Phosphorous Detector = NPD*)

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor akan menyebabkan peningkatan arus pada nyala yang diperkaya dengan uap garam logam alkali. Bersifat dekstruktif, selektif terhadap senyawa nitrogen dan fosfor organik, batas linearitas 10^3 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-10} g/ml.

5) Detektor Fotometri Nyala

Prinsip kerjanya adalah senyawa-senyawa nitrogen dan fosfor yang dibakar dalam suatu nyala akan menghasilkan spesies kemiluminesen yang dapat dimonitor pada panjang gelombang selektif. Bersifat dekstruktif, selektif terhadap senyawa sulfur dan fosfor organik, batas linearitas 10^3 dan batas terkecil pendeteksian 2×10^{-12} g/ml.

6) Detektor Spektrometer Massa (29)

Spektrometer massa jika digunakan sebagai detektor maka akan mampu memberikan informasi data struktur kimia senyawa yang tidak diketahui. Dengan menggunakan spektrometer massa untuk ion tunggal atau ion yang karakteristik dalam analit, maka batas deteksi ion-ion ini akan ditingkatkan.

h. Perekam

Perekam yang dihubungkan dengan bagian luar detektor berfungsi untuk menghasilkan gambaran yang disebut kromatogram. Kromatogram yang dihasilkan dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif (28). Akurasi suatu kromatogram pada suatu daerah pembacaan ditentukan oleh pemilihan pencatat sinyal (rekorder)nya. Kadang mutlak diperlukan penguatan sinyal. Kepekaan perekam adalah 10 mV dengan range 1-10 mV (31).

i. Sistem Pengolah Data

Peran pengolah data dilakukan oleh alat pengolah data (*data processor*) atau komputer. Informasi yang diperoleh dapat dimanfaatkan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif (27).

4. Analisis Kuantitatif (27)

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu:

a. Metode Baku Luar

Dibuat kurva kalibrasi zat baku (standar), dengan cara membuat larutan baku dengan berbagai macam konsentrasi larutan sampel yang akan dianalisis, disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau dengan rumus perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

b. Metode Baku Dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Dibuat kurva antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan metode ini adalah kesalahan pada

volume injeksi dapat dieliminir. Kekurangan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

Persyaratan senyawa baku dalam yang ideal adalah senyawa tersebut harus murni dan mudah diperoleh, mempunyai sifat fisikokimia yang mirip dengan senyawa yang dianalisis, mempunyai puncak yang terpisah baik dari cuplikan, tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan, tidak bereaksi dengan komponen cuplikan dan fase gerak, harus terelusi dekat dengan puncak senyawa yang dianalisis, mempunyai respon detektor dan konsentrasi yang sama dengan senyawa yang dianalisis (28, 32).

D. METODE ANALISIS SENYAWA BENZENA

1. *Thermal Desorption GC/MS*

Kromatografi gas Agilent 6890 dengan detektor spektrometri massa Agilent 5973MSD yang dioperasikan dalam *Electron Impact Mode* (EIM). Kolom kapiler HP5MS dengan panjang 60 m, diameter 0,25 mm dan ketebalan film 250 μm . Suhu awal 40°C dinaikkan hingga 280°C dengan kecepatan 10°C/menit. Suhu *MS transfer line* 280°C. Suhu injektor 280°C dengan mode *split* pada rasio 5:1. Gas pembawa helium dengan kecepatan 8,8 ml/menit (33).

2. Kromatografi Gas Spektrometri Massa

Kromatografi gas detektor spektrometri massa model 6890/5973N dengan peralatan injektor 7673 dengan syringe 100 μ l. Kolom kapiler dengan panjang 30 m, diameter 0,25 mm dan ketebalan film 0,25 μ m DB-624. Gas pembawa menggunakan helium dengan kecepatan konstan 1.6 ml/menit. Suhu awal kolom 35°C dipertahankan selama 1 menit, lalu diatur dengan program kenaikan suhu 10°C/menit hingga mencapai suhu 100°C, lalu diatur kembali dengan program kenaikan suhu 35°C/menit hingga mencapai suhu 250°C dipertahankan selama 5 menit. Suhu injektor 100°C, Volume injeksi 50 μ l. Detektor spektrometri massa dioperasikan dengan mode injeksi: *splitless*, *purge* selama 1 menit. Mode ionisasi: 70 eV EI+, suhu sumber 230°C. Mode *scan: selected ion monitoring (SIM)*: 78, 77, 51 *m/z* untuk benzena, 84, 82, 52 *m/z* untuk d6-benzena, waktu tinggal 50 ms tiap ion. Menggunakan baku dalam d6-benzena (3).

3. *Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry (HSGC-MS)*

Kromatografi gas HP 6890 Series, dilengkapi dengan *Headspace* HP 7694E dan detektor spektrometri massa JMS-GC. Kolom yang digunakan adalah kolom kapiler HP-5 dengan panjang 30 m, diameter 0,32 mm dan ketebalan film 0,25 μ m. Suhu awal kolom 40°C yang dipertahankan selama 5 menit, lalu diatur dengan program kenaikan suhu 10°C/menit hingga mencapai suhu 200°C. Suhu sumber ion (*ion source*) adalah 180°C dan garis

transfer (*transfer line*) 230°C. Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan laju alir sebesar 0,8 ml/menit. Kromatografi gas dioperasikan dalam mode: *splitless*, dengan injektor PTV, suhu 140°C. Mode ionisasi: 70 eV EI+. Mode *scan*: *selected ion monitoring* (SIM): ion 78 *m/z* untuk benzena dan ion 84 *m/z* untuk d6-benzena. Volume sampel 5 ml dimasukkan ke dalam vial *headspace*. Menggunakan baku dalam d6-benzena (4).

4. Kromatografi gas ionisasi nyala.

Kolom yang digunakan adalah kolom gelas dengan panjang 3 m dan diameter 3,2 mm yang dilapisi dengan 20% Carbowax 20M dalam Chromosorb W 60-80 mesh. Suhu awal kolom 60°C yang dinaikkan hingga 120°C dengan kecepatan 3°C/menit. Suhu detektor dan injektor adalah 180°C. Kecepatan alir gas N₂ 10 ml/menit, gas H₂ 40 ml/menit, udara 700 ml/menit. Volume injeksi 1 µl (34).

E. VALIDASI METODE ANALISIS

Validasi metode analisis menurut *United State Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (29).

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis. Hal ini perlu dilakukan apabila metode tersebut baru

dikembangkan untuk suatu permasalahan yang khusus, jika ada perbaikan dari metode yang sudah ada untuk memecahkan suatu permasalahan analisis, jika diterapkan metode rutin pada laboratorium yang berbeda peralatannya dan jika dilakukan oleh analis yang berbeda pula. Seiring dengan berjalannya waktu, proses validasi metode juga perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode tersebut masih dapat diandalkan (29).

Dalam validasi metode analisis, metode dibedakan dalam beberapa kategori berdasarkan syarat keeksakannya, yaitu:

1. Kategori 1, adalah metode analisis untuk penentuan kadar komponen utama dalam bahan obat baku (*bulk*) atau kandungan senyawa aktif dalam sediaan obat jadi (termasuk juga zat pengawet).
2. Kategori 2, adalah prosedur analisis untuk mendeteksi zat pencemar dalam bahan obat baku atau hasil degradasi senyawa aktif dalam sediaan obat jadi. Prosedur analisis ini mencakup juga penentuan kuantitas dan uji batasnya.
3. Kategori 3, prosedur analisis untuk menentukan karakteristik kinerja, seperti uji disolusi, uji pelepasan obat dari matriks, dan lain-lain. (35)

Ada beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis. Untuk menentukan parameter-parameter yang digunakan, perlu diperhatikan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Parameter yang sering digunakan untuk pengembangan metode analisis antara lain kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), selektifitas

(spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan (*ruggedness*), serta kekuatan (*robustness*).

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.

Cara penentuan kecermatan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara absolut atau metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan cara adisi atau metode penambahan bahan baku (*standard addition method*).

Dalam cara absolut atau metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (sampel plasebo, dapat berupa eksipien obat, cairan biologis dll.), lalu campuran tersebut dianalisis dengan metode yang akan diuji validitasnya. Hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya).

Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa senyawa endogen, maka dapat dipakai cara adisi. Cara adisi atau metode penambahan bahan baku dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan

dengan menghitung berapa persen analit yang ditambahkan sebelumnya dapat ditemukan (36).

Syarat akurasi yang baik adalah 98-102% untuk bahan baku farmasi, dan $\pm 10\%$ untuk sampel hayati atau biologis. Rentang kesalahan perolehan kembali yangizinkan berbeda-beda tergantung pada konsentrasi analit pada matriks sampel (27).

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 (*repeatability*) adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal.

Ketertiruan (*reproducibility*) adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan pada sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Ketertiruan juga dapat dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analisis 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 (36).

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini (27).

3. Selektivitas (Spesifitas)

Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuan metode yang hanya untuk 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.

Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa placebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Jika ada penyimpangan hasil merupakan selisih dari hasil uji keduanya.

Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji, lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) (36).

4. Linearitas dan Rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional konsentrasi analit dalam sampel.

Dalam praktek digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien relasi (r) pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{x_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}).

Syarat-syarat dari kelinearan garis yaitu :

- Koefisien korelasi (r) $\geq 0,9990$
- Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), $(r_i)^2$ sekecil mungkin ≈ 0 . r_i diperoleh dari : $r_i = y_i - (bx_i + a)$
- Koefisien fungsi regresi
 $V_{x_0} \leq 2,0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5,0\%$ untuk sediaan biologi.
- Kepekaan analisis ($Q \frac{y}{Q x}$)

$$Q \frac{y}{Q x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_1}{x_3 - x_1} \approx \frac{y_n - y_1}{x_n - x_1}$$

Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima.

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 statistic melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (36).

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Instrumen, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia selama lebih kurang 4 (empat) bulan yaitu dari bulan Agustus sampai November 2009.

B. BAHAN

Bahan-bahan yang digunakan adalah standar benzena (Merck, Jerman), eter pro analisis (Merck, Jerman), Na_2SO_4 anhidrat (Merck, Jerman), gas helium UHP, gas nitrogen HP, gas hidrogen HP, tiga jenis sampel minuman ringan (A, B, C) yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C yang telah dipapar sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00 yang diperoleh dari swalayan daerah Jakarta.

C. ALAT

Alat- alat yang digunakan adalah kromatografi gas (Shimadzu 17A, Jepang) yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (FID), kolom kapiler

dengan panjang 50 meter dan diameter dalam 0,25 mm dengan fase diam CBP-10, *Data Processor Class GC Solution*, *microsyringe* 5 μ l (Hamilton, USA), corong pisah, timbangan analitik, alat-alat gelas yang umum digunakan dalam analisis kuantitatif.

D. CARA KERJA

1. Pembuatan Larutan Induk Benzena 10.000 μ g/ml

Timbang standar benzena secara seksama \pm 50 mg di dalam labu ukur 5,0 ml yang sudah ditara dan kemudian ditambahkan eter sampai tanda batas sehingga didapatkan larutan induk 10.000 μ g/ml (massa jenis benzena adalah 0,88 g/ml). Selanjutnya dapat dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

2. Pencarian Kondisi Analisis Optimum Benzena

Parameter-parameter yang diubah pada pencarian kondisi analisis optimum adalah kecepatan kenaikan suhu kolom dan kecepatan alir gas pembawa. Pertama-tama elusi dilakukan dengan variasi kecepatan alir gas pembawa yaitu 1,0; 1,5; dan 2,0 ml/menit. Suhu awal kolom 60°C yang dinaikan hingga 120°C dengan kecepatan kenaikan suhu kolom 3°C/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor 200°C dan suhu detektor 230°C dengan menggunakan larutan 1.000 μ g/ml dengan volume injeksi sebesar 1,0 μ l.

Masing-masing kondisi dicatat waktu retensinya dan dihitung jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah kondisi yang menunjukkan harga

lempeng teoritis (N) yang tinggi, HETP kecil, waktu retensi yang relatif singkat dan resolusi yang paling baik ($\geq 1,5$).

3. Validasi Metode Analisis Benzena

a. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Larutan standar benzena dengan konsentrasi 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 dan 15,0 $\mu\text{g/ml}$ yang didapat dari pengenceran larutan induk 10000 $\mu\text{g/ml}$, masing-masing sebanyak 1,0 μl disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas pada kondisi analisis terpilih. Luas puncak yang diperoleh dicatat dan diolah secara statistik sehingga diperoleh persamaan regresi dan koefisien korelasinya.

b. Penentuan Batas LOD dan LOQ

Batas deteksi dan batas kuantitasi benzena ditentukan dengan metode perhitungan statistik, melalui persamaan regresi linier kurva kalibrasi standar benzena yang telah dibuat sebelumnya.

Rumus untuk perhitungannya adalah sebagai berikut :

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{y/x}}{b} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{b}$$

dimana b merupakan nilai kemiringan (slope) dari persamaan kurva kalibrasi $y = a + bx$.

c. Uji Keseksamaan (presisi)

Larutan benzena dengan konsentrasi berbeda (rendah, sedang dan tinggi) yaitu 2,0; 8,0; 15,0 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 1,0 μL disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas pada kondisi analisis terpilih. Prosedur pada masing-masing konsentrasi diulang sebanyak enam kali. Dari luas puncak yang diperoleh, dihitung simpangan baku relatif dan koefisien variasinya. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) 2% atau kurang.

d. Uji Perolehan Kembali

1) Untuk sampel A

Sebanyak 400 ml sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00, ditambahkan 1 ml larutan standar benzena konsentrasi 3,10 bpj (untuk UPK konsentrasi sedang), dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian dilakukan ekstraksi dua kali dengan eter sebanyak masing-masing 40 ml. Larutan dikocok kuat selama 10 menit, hasil ekstraksi dipisahkan dari lapisan airnya setelah didiamkan selama 5 menit. Tampung lapisan organik dari ekstraksi pertama dan kedua dalam Erlenmeyer tutup. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian ditambahkan 5 gram natrium sulfat anhidrat untuk menyerap air yang tersisa pada lapisan organik, sentrifugasi larutan selama 10 menit, dengan kecepatan 1600 putaran per menit.

Selanjutnya cairan jernih supernatan diuapkan pada suhu kamar hingga 1 ml. Sebanyak 1,0 μ L supernatan disuntikkan pada alat kromatografi gas dengan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak benzena dicatat, kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali benzena. Hal yang sama dilakukan untuk uji perolehan kembali untuk konsentrasi rendah dan tinggi.

2) Untuk Sampel B

Sebanyak 400 ml sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00, ditambahkan 1 ml larutan standar benzena konsentrasi 4,96 b/j (untuk UPK konsentrasi sedang), dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian dilakukan ekstraksi dua kali dengan eter sebanyak masing-masing 40 ml. Larutan dikocok kuat selama 10 menit, hasil ekstraksi dipisahkan dari lapisan airnya setelah didiamkan selama 5 menit. Tampung lapisan organik dari ekstraksi pertama dan kedua dalam Erlenmeyer tutup. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian ditambahkan 5 gram natrium sulfat anhidrat untuk menyerap air yang tersisa pada lapisan organik, sentrifugasi larutan selama 10 menit, dengan kecepatan 1600 putaran per menit. Selanjutnya cairan jernih supernatan diuapkan pada suhu kamar hingga 1 ml. Sebanyak 1,0 μ L supernatan disuntikkan pada alat kromatografi gas dengan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak benzena dicatat,

kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali benzena. Hal yang sama dilakukan untuk uji perolehan kembali untuk konsentrasi rendah dan tinggi.

3) Untuk Sampel C

Sebanyak 400 ml sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00, ditambahkan 1 ml larutan standar benzena konsentrasi 4,96 bpj (untuk UPK konsentrasi sedang), dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian dilakukan ekstraksi dua kali dengan eter sebanyak masing-masing 40 ml. Larutan dikocok kuat selama 10 menit, hasil ekstraksi dipisahkan dari lapisan airnya setelah didiamkan selama 5 menit. Tampung lapisan organik dari ekstraksi pertama dan kedua dalam Erlenmeyer tutup. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian ditambahkan 5 gram natrium sulfat anhidrat untuk menyerap air yang tersisa pada lapisan organik, sentrifugasi larutan selama 10 menit, dengan kecepatan 1600 putaran per menit. Selanjutnya cairan jernih supernatan diuapkan pada suhu kamar hingga 1 ml. Sebanyak 1,0 μL supernatan disuntikkan pada alat kromatografi gas dengan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak benzena dicatat, kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali benzena. Hal yang sama dilakukan untuk uji perolehan kembali untuk konsentrasi rendah dan tinggi.

4. Analisis Benzena dalam Minuman Ringan

Sebanyak 400 ml sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00, dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian dilakukan ekstraksi dua kali dengan eter sebanyak masing-masing 40 ml. Larutan dikocok kuat selama 10 menit, hasil ekstraksi dipisahkan dari lapisan airnya setelah didiamkan selama 5 menit. Tampung lapisan organik dari ekstraksi pertama dan kedua dalam Erlenmeyer tutup. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian ditambahkan 5 gram natrium sulfat anhidrat untuk menyerap air yang tersisa pada lapisan organik, sentrifugasi larutan selama 10 menit, dengan kecepatan 1600 putaran per menit. Selanjutnya cairan jernih supernatan diuapkan pada suhu kamar hingga 1 ml. Sebanyak 1,0 μL supernatan disuntikkan pada alat kromatografi gas dengan kondisi analisis optimum terpilih. Luas puncak benzena dicatat. Kadar benzena yang terbentuk dalam minuman ringan didapatkan dengan memplot luas puncak benzena berdasarkan persamaan regresi linier standar benzena.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pembuatan Larutan Induk Benzena 10.000 µg/ml

Timbang standar benzena 51,7 mg di dalam labu ukur 5,0 ml yang sudah ditara dan kemudian ditambahkan eter sampai tanda batas sehingga didapatkan larutan induk 10.340 µg/ml (massa jenis benzena adalah 0,88 g/ml). Selanjutnya dapat dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

2. Pencarian Kondisi Analisis Optimum Benzena

Kondisi analisis optimum untuk penetapan benzena adalah elusi dengan program suhu awal kolom 60°C yang dinaikkan hingga 120°C dengan kecepatan kenaikan suhu kolom 3°C/menit dan laju alir gas pembawa sebesar 1,50 ml/menit. Kondisi ini dipilih karena pemisahan benzena dan eter paling baik. Waktu retensi benzena adalah 5,3 menit. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar 8.

3. Validasi metode analisis Benzena

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas

Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan standar benzena dengan konsentrasi 10.340 bpj, kemudian diencerkan hingga didapat 7

konsentrasi yang berbeda yaitu 2,068; 4,136; 6,204; 8,272; 10,34; 12,408 dan 15,51 bpj. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi benzena adalah $y = 687,6154x - 583,2391$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Nilai S_{x0} adalah 0,0688 dan nilai V_{x0} adalah 0,0044. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 8 dan 9.

b. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Berdasarkan perhitungan statistik menggunakan persamaan regresi linier kurva kalibrasi standar benzena, diperoleh batas deteksi (LOD) sebesar 0,207 bpj dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 0,688 bpj. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9.

c. Uji Presisi Benzena

Larutan standar benzena dengan konsentrasi berbeda (rendah, sedang, tinggi) yaitu 2,068; 8,272; dan 15,51 bpj digunakan untuk uji presisi. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 1,04%; 1,88% dan 1,69%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 10.

d. Uji Perolehan Kembali Benzena

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode adisi. Tiga konsentrasi berbeda dari standar benzena ditambahkan ke dalam 3 sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari

pukul 09.00 hingga 18.00, yaitu pada sampel A: 2,4816; 3,102 dan 3,3088 bpj; sampel B: 3,7224; 4,9632 dan 5,7904 bpj dan sampel C: 4,136; 4,9632 dan 6,204 bpj masing-masing sebanyak 1 ml kemudian diekstraksi. Persentase perolehan kembali dari masing-masing konsentrasi mulai dari yang terendah adalah pada sampel A: 100,25%; 99,06%; dan 101,00%; sampel B: 99,85%; 98,57% dan 100,08%; dan sampel C: 99,42%; 100,58% dan 101,95%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 11.

4. Penetapan Kadar Sampel

Dari ketiga sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00, didapatkan bahwa semua sampel mengandung benzena dengan kadar yang bervariasi dan relatif kecil. Kadar benzena dalam sampel A sebesar 7,66 bpm; sampel B sebesar 12,55 bpm dan sampel C sebesar 12,97 bpm. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 9, 10, 11 serta Tabel 12.

B. PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini dilakukan validasi metode analisis dan penetapan kadar benzena dalam minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C secara kromatografi gas. Latar belakang penelitian ini adalah adanya postulat FDA bahwa benzena dengan konsentrasi rendah dapat terbentuk dalam beberapa minuman ringan sebagai hasil dari

dekarboksilasi asam benzoat oleh radikal bebas. Maka dari itu dirasakan perlunya dicari suatu metode valid yang nantinya dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar benzena dalam sampel.

Benzena sendiri bersifat karsinogenik. IARC mengklasifikasikan benzena sebagai group 1 yaitu senyawa karsinogen pada manusia. Keberadaan benzena dalam tubuh dapat menyebabkan leukemia.

Penelitian tentang benzena dalam minuman ringan telah banyak dilakukan dengan menggunakan *thermal desorption GC/MS*, kromatografi gas ionisasi nyala, kromatografi gas spektrometri massa dan yang terbaru menggunakan *headspace gas chromatography-mass spectrometry* (3, 4, 33, 34). Namun pada penelitian ini menggunakan metode kromatografi gas ionisasi nyala. Metode ini dipilih karena tingkat keberhasilan yang tinggi, waktu analisis yang cepat, sensitivitas yang tinggi pada sistem detektor, efisiensi pemisahan yang baik, analit yang akan dianalisis mudah menguap dan mampu menganalisis sampel dengan matriks yang kompleks.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C. Sebelum dianalisis sampel dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00. Pemaparan ini dilakukan sebagai proses dipercepat, mengingat masih banyak pedagang-pedagang yang menjual minuman ringan tidak memperhatikan kondisi penyimpanannya. Panas dan sinar matahari dapat

mempercepat reaksi dekarboksilasi asam benzoat oleh radikal hidroksi membentuk benzena.

Metode yang digunakan pada penelitian ini relatif lebih sederhana bila dibandingkan dengan metode yang telah dilakukan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Sejauh ini metode terbaru yang digunakan untuk analisis benzena adalah menggunakan *headspace gas chromatography-mass spectrometry* (4). Suatu kromatografi gas yang dilengkapi dengan sebuah perangkat *headspace* dan detektor spektrometer massa, sebuah detektor yang nantinya memberikan informasi spektrum ion molekul dan fragmen molekul spesifik yang dapat digunakan untuk identifikasi analit tertentu. Sehingga dengan menggunakan metode tersebut, kemungkinan positif palsu tidak terjadi. Namun demikian metode analisis benzena pada penelitian ini dapat dilakukan, hal ini dapat dilihat dari nilai parameter-parameter validasi yang masuk dalam batas yang diperbolehkan, dapat dikatakan metode yang digunakan pada penelitian ini sudah valid. Sehingga analisis benzena dengan metode ini dapat diaplikasikan untuk menentukan benzena dalam sampel.

Tahapan kerja yang dilakukan yakni mencari kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar benzena, lalu melakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar benzena dari kondisi analisis optimum yang diperoleh. Kemudian setelah memperoleh metode analisis yang telah divalidasi, metode tersebut digunakan untuk memperoleh kadar benzena dalam sampel minuman ringan.

1. Pencarian Kondisi Analisis Optimum Benzena

Larutan yang digunakan untuk pencarian kondisi analisis optimum ini berasal dari larutan induk standar benzena 10.340 bpj. Pada penelitian ini pencarian kondisi optimum analisis benzena dengan variasi laju alir gas pembawa yaitu 1,0 ml/menit; 1,5 ml/menit dan 2,0 ml/menit dengan suhu kolom 60°C dinaikan hingga 120°C dengan kecepatan kenaikan 3°C/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan suhu detektor diatur pada suhu 200°C dan 230°C.

Pada percobaan variasi laju alir gas pembawa dapat terlihat bahwa semakin tinggi laju alir gas pembawa semakin cepat pula waktu retensi benzena, semakin kecil nilai N dan semakin besar nilai HETP. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa semakin tinggi suhu kolom dan laju alir gas pembawa maka komponen sampel tersebut hanya sebentar berada di dalam fase diam, karena langsung menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga pemisahan yang terjadi kurang baik.

Dari hasil percobaan dengan menggunakan laju alir gas pembawa 1,5 ml/menit didapatkan waktu retensi benzena adalah 5,3 menit; pemisahan benzena dari pelarut eter baik dan waktu retensi tidak lama. Jadi dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk analisis benzena adalah laju alir gas pembawa 1,5 ml/menit.

2. Validasi Metode Analisis

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas

Sebelum melakukan penetapan kadar, metode yang telah ditetapkan perlu divalidasi. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi yang bertujuan untuk kepentingan analisis secara kuantitatif, yaitu menghitung kadar zat dalam sampel. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi analit yang berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat harus dipertimbangkan dengan matang agar hasil pengukuran luas puncak sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut, sehingga hasil pengukuran yang diperoleh lebih akurat.

Pada penelitian ini, pembuatan kurva kalibrasi benzena dilakukan dengan menghubungkan 7 titik konsentrasi berbeda yaitu 2,068; 4,136; 6,204; 8,272; 10,34; 12,408 dan 15,51 bpj. Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai pada sumbu x, sedangkan luas puncak yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai sumbu y. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi benzena yang diperoleh adalah $y = 687,6154x - 583,2391$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Harga koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

b. Uji presisi Benzena

Keseksamaan (*precision*) 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). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (KV) 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Koefisien variasi umumnya meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis.

Pada penelitian yang dilakukan, 3 konsentrasi benzena yang dibuat untuk uji presisi yaitu 2,068; 8,272; dan 15,51 bpj. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai KV berturut-turut 1,04%; 1,88% dan 1,69%. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria seksama.

c. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi (*limit of detection/ LOD*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi (*limit of quantitation/ LOQ*) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit

dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

Berdasarkan perhitungan secara statistik menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi standar benzena, diperoleh batas deteksi benzena sebesar 0,206 bpj dan batas kuantitasi benzena sebesar 0,688 bpj. Konsentrasi tersebut berada di bawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi.

d. Uji Perolehan Kembali Benzena

Pada penelitian ini dilakukan uji perolehan kembali (UPK) dengan metode adisi, dimana sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu ditambahkan ke dalam sampel minuman ringan yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan.

Pada penentuan UPK ini dibuat 3 konsentrasi benzena berbeda (rendah, sedang, tinggi) pada 3 sampel, yaitu pada sampel A: 2,4816; 3,102 dan 3,3088 bpj; sampel B: 3,7224; 4,9632 dan 5,7904 bpj dan sampel C: 4,136; 4,9632 dan 6,204 bpj. Sebanyak 1 ml standar ditambahkan ke dalam sampel, kemudian diekstraksi menggunakan eter 40 ml dengan dua kali

pengerjaan. Hasil ekstraksi ditambahkan Na_2SO_4 sebanyak 5 gram untuk menarik air dengan cara disentrifugasi supaya terjadi pemisahan yang sempurna.

Melalui uji perolehan kembali ini didapatkan hasil dari masing-masing konsentrasi mulai dari yang terendah adalah pada sampel A: 100,25%; 99,06%; dan 101,00%; sampel B: 99,85%; 98,57% dan 100,08%; dan sampel C: 99,42%; 100,58% dan 101,95%. Dengan demikian maka hasil UPK benzena memenuhi kriteria uji perolehan kembali, dimana nilai % *recovery* yang baik berada dalam rentang 80 – 120%.

e. Penetapan Kadar Benzena dalam Sampel Minuman Ringan

Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar benzena dari tiga sampel minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C yang sebelumnya telah dipaparkan sinar matahari selama 2 minggu pada tanggal 19 Oktober 2009 sampai 1 November 2009 dari pukul 09.00 hingga 18.00. Tahapan kerja yang dilakukan yakni mengekstraksi sampel minuman ringan menggunakan eter.

Penetapan kadar benzena dilakukan dengan memplot luas puncak benzena ke persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi benzena. Dari ketiga sampel minuman ringan yang dianalisis, didapatkan bahwa semua sampel mengandung benzena dengan kadar yang bervariasi. Kadar benzena dalam minuman ringan bergantung pada cara penyimpanan dan masuknya cemaran Fe dan Cu sebagai katalisator. Kandungan benzena

dalam sampel A sebesar 7,66 bpm; sampel B sebesar 12,55 bpm dan sampel C sebesar 12,97 bpm.

WHO menyatakan jumlah maksimum keberadaan benzena dalam air minum sebesar 10 bpm. Berdasarkan peraturan tersebut maka kadar benzena dalam sampel A masih berada di bawah jumlah maksimum yang diijinkan WHO sedangkan dalam sampel B dan C berada di atas jumlah maksimum yang diijinkan WHO.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar benzena adalah dengan menggunakan alat kromatografi gas Shimadzu GC-17A dengan kolom kapiler CBP-10 dan detektor FID. Dielusi menggunakan suhu terprogram dengan suhu awal kolom 60°C sampai 120°C dengan kecepatan kenaikan suhu 3°C/menit dan laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 200°C dan 230°C. Waktu retensi benzena pada kondisi analisis optimum adalah 5,3 menit.
2. Hasil validasi dari metode untuk penetapan kadar benzena yang digunakan menunjukkan bahwa kriteria validasi yaitu kurva kalibrasi, linearitas, uji presisi dan uji perolehan kembali memenuhi syarat yang ditetapkan.
3. Hasil analisis dari ketiga sampel minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C yang diperiksa menunjukkan bahwa semua sampel mengandung benzena dengan kadar yang bervariasi. Kadar benzena dalam sampel A sebesar 7,66 bpm; sampel B sebesar 12,55 bpm dan sampel C sebesar 12,97 bpm. Keberadaan benzena dalam sampel A masih berada di bawah jumlah maksimum yang diijinkan WHO

sedangkan dalam sampel B dan C berada di atas jumlah maksimum yang diijinkan WHO.

B. SARAN

1. Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan pada sampel-sampel lain terutama dalam produk makanan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C.
2. Untuk selanjutnya dapat dilakukan penelitian untuk melihat apakah dengan kadar pembentukan benzena dalam minuman ringan yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C dalam sampel dapat menyebabkan terjadinya leukemia pada manusia.
3. Untuk verifikasi peak benzena pada kromatogram, sebaiknya dilakukan pengujian dengan menggunakan Kromatografi Gas Spektrometer Massa.

DAFTAR ACUAN

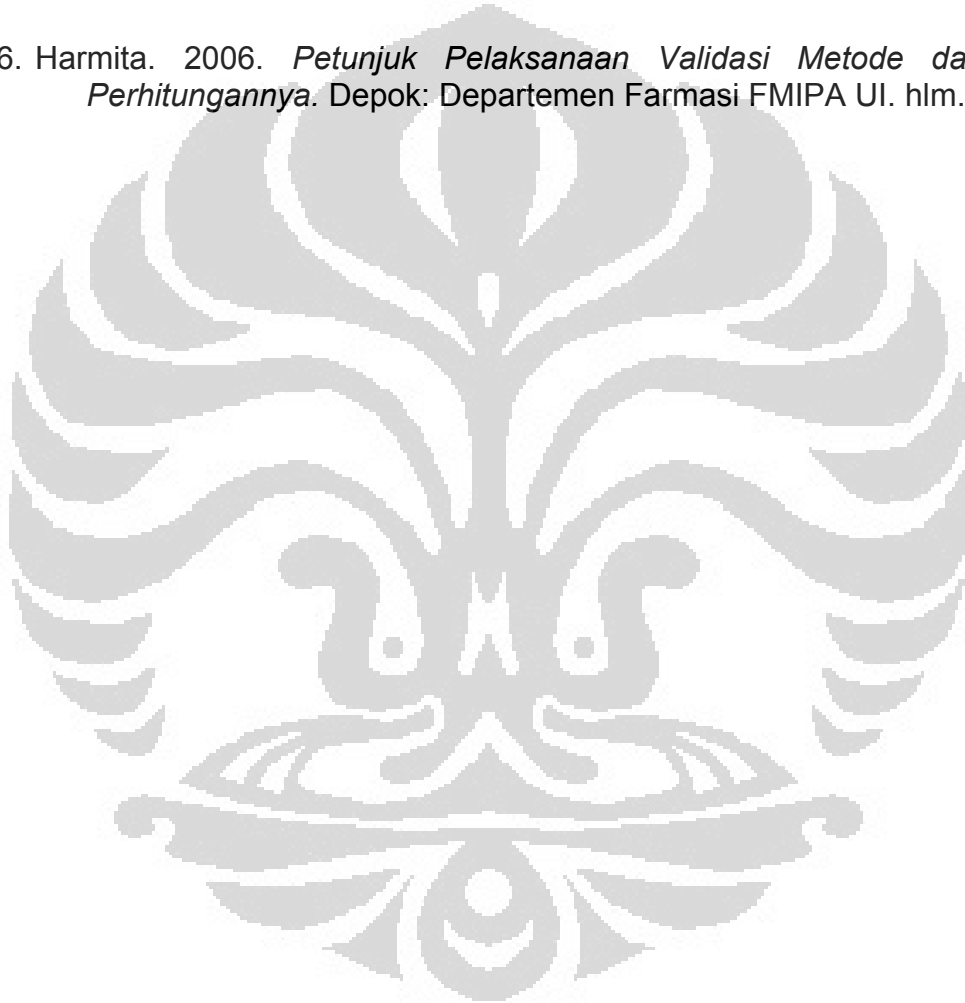
1. Anonim. 2009. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Foods Third Session Rotterdam, The Netherlands, 23 – 27 March 2009 Discussion Paper on Benzene in Soft Drinks (Prepared by the electronic working group led by Nigeria). Codex Alimentarius Commission.*
www.codexalimentarius.net, 4 Agustus 2009, pk. 17:00.
2. Nyman, P.J., Diachenko, G.W., Perfetti, G.A., McNeal, T.P., Hiatt, M.H., Morehouse, K.M. 2008. Survey Result of Benzene in Soft Drinks and Other Beverages by Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 571-576.
3. Anonim. 2007. *A Follow-up Survey of Benzene in Soft Drinks and Other Beverage Products*. Canada: Health Canada.
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/securit/benzene_follow_hra-ers-eng.pdf, 31 Juli 2009, pk. 16.00.
4. Khoschsorur, G.A., Petek, W. 2000. Rapid Determination of Benzene Metabolites Phenol and p-Cresol in The Urine Of Petrol Station Worker by Gas Chromatography. *Anal. Sci.*, **16**: 589-590.
5. Anonim. 2007. *Toxicological Profile for Benzene*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.html>. 31 Juli 2009, pk. 16.25.
6. Ju, H.K., Jeong, H.P., Sung, W.K. 2008. Evaluation of Headspace-Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Benzene in Vitamin C Drinks; Pitfalls Of Headspace In Benzene Detection. *Biomed Chromatogr.*, **22** (8): 900-905.

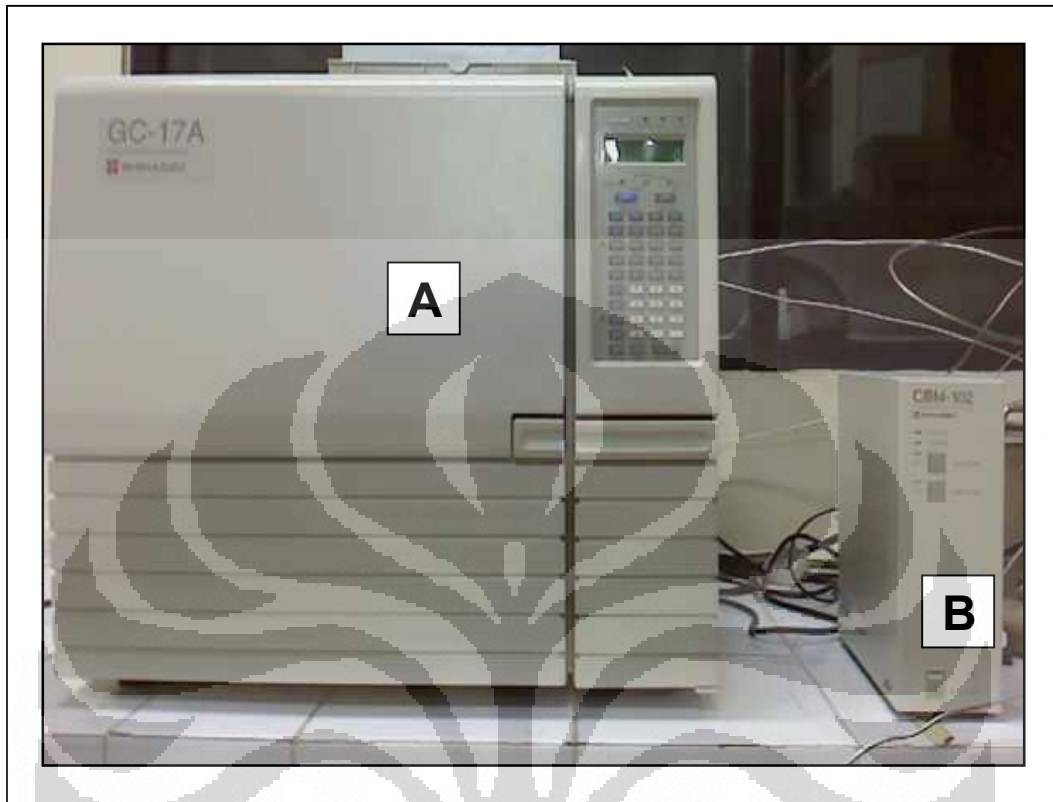
7. Anonim. 1987. *Overall Evaluations of Carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1-42*. Lyon: 120-122 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7).
8. Wu, Q.J., Hong, L., Wei, F., Jian, J.D., Hua, L.C. 2006. Investigation into Benzene, Trihalomethanes and Formaldehyde in Chinese Lager Beers. *J. Inst. Brew.*, **112** (4): 291-294.
9. Gardner, L. and Lawrence, G. 1993. Benzene Production from Decarboxylation of Benzoic Acid in the Presence of Ascorbic Acid and a Transition-Metal Catalyst. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 693-695.
10. Bayer, E. The GDCH-Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance (Editor). 1992. *Benzene*, BUA Report 24 (August 1988). USA: VCH Publisher, Inc.
11. Abdul Baktiansyah. 2003. Pengaruh Paparan Benzena terhadap Sistem Hematopoetik. *Majalah Kedokteran Indonesia*, **53** (11): 409-415.
12. Anonim. 1996. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol.2. *Health criteria and other supporting information*. Geneva: WHO. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/benzene.pdf, 3 Agustus 2009, pk. 16:30.
13. Anonim. 1988. Benzene. *Environment Control and Research Program*, (10):8. Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health. <http://dohs.ors.od.nih.gov/pdf/Benzene%20REVISED.pdf>, 3 Agustus 2009, pk. 17:00.
14. Anonim. 1979. *Farmakope Indonesia* edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
15. Poucke, C.V., Detavernier, C.L., Bocxlaer, J.F.V., Vermeleyen, R. 2008. Monitoring of Benzene Contents in Soft Drinks Using Headspace Gas Chromatography – Mass Spectrometry: A Survey of The Situation on The Belgian Market. *J. Agric. Food Chem.*, **56** (12): 4504-4510.

16. O'Donnell, D. 2008. *Time-Resolved Raman Studies of the Electron Adducts of Benzoate Anion in Water*. Notre Dame: University of Notre Dame, Radiation Laboratory, Department of Chemistry and Biochemistry.
17. Anonim. 2006. *Kategori Pangan*. Jakarta: Direktorat Standardisasi Produk Pangan Deputi Bidang Pengawasan Keamanan Pangan dan Bahan Berbahaya Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. hlm 263.
18. Eko Kusumawijaya. 1993. *Pembuatan Minuman Ringan Berkarbonat dari Teh*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Fakultas Teknologi Pertanian.
19. Anonim. 1979. *Kodeks Makanan Indonesia tentang Bahan Tambahan Makanan*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
20. Chipley, J.R. 1993. *Sodium Benzoate and Benzoic Acid*. In: Davidson, P.M. and Alfred, L.B. (eds). *Antimicrobials in Foods, Second Edition, Revised and Expanded*. USA: Marcel Dekker, Inc.
21. Mahindru, S.N. 2000. *Food Aditives Characteristics, Detection and Estimation*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited.
22. Srikandi Fardiaz, Ratih, D., Slamet, B. (Editor). 1987. *Risalah Seminar Bahan Tambahan Kimiawi (Food Additives)*. Jakarta 3-4 Oktober 1986. Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi-IPB, Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia, Gabungan Pengusaha Makanan dan Minuman Indonesia.
23. Anonim. 1994. *Kumpulan Makalah Simposium: Amankah Makanan Kita?* Ikatan Farmakologi Cabang Jakarta Bersama Bagian Farmakologi dan Terapeutik FKUI, Aula FKUI, 12 November 1994.
24. Hendra Budiman. 2002. Food Additive Dan Keamanan Pangan. *Majalah Kedokteran Atmajaya*. 1 (1): 74.

25. deMan, J.M. 1997. *Kimia Makanan* (Terjemahan), edisi II. Bandung: ITB. hlm. 408-530.
26. Anonim. 2003. *Produk Pangan dan Bahan Berbahaya*. Jayapura: Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan Jayapura.
27. Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI. hlm. 101-204.
28. McNair, H.M. and Bonelli, E.J. 1988. *Dasar Kromatografi Gas* terbitan ke-5. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB. hlm. 1-14.
29. Ibnu Ghatib Ganjar dan Abdul R. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. hlm. 419-480.
30. Basset, J., Denny, R.C., Jeffry, G.H., Mendham, J. 1994. *Buku Ajar Vogel: Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, edisi keempat. Diterjemahkan oleh A. Handayana Pudjaatmaka dan L. Setiono. Jakarta: EGC.
31. Khopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Diterjemahkan oleh A. Saptorahardjo. Jakarta: UI-Press. hlm. 160-168.
32. Johnson, E.L. and Stevenson, R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB. hlm. 16-26.
33. Frey, R., Ronald, E.S. II; Manura, J. 2007. *Detection of Benzene in Carbonated Beverages with Purge & Trap Thermal Desorption GC/MS*. Scientific Instrument Service, Inc. <http://www.sisweb.com/referenc/applnote/app-93.htm>, 25 Agustus 2009, pk. 00:34.

34. Abdul Hamid. 1996. *Pemisahan Karbon Tetraklorida, Formalin, Benzena dan Kloroform serta Penentuan Senyawa Fenol dengan Kromatografi Gas*. Yogyakarta: Program Pasca Sarjana UGM.
35. Satiadarma, K., Mulja, M., Daryono, H.T., Rahmana, E.K. 2004. *Asas Pengembangan Prosedur Analisis* edisi I. Surabaya: Airlangga University Press.
36. Harmita. 2006. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI. hlm. 1-32.





Gambar 6. Alat kromatografi gas Shimadzu GC-17A

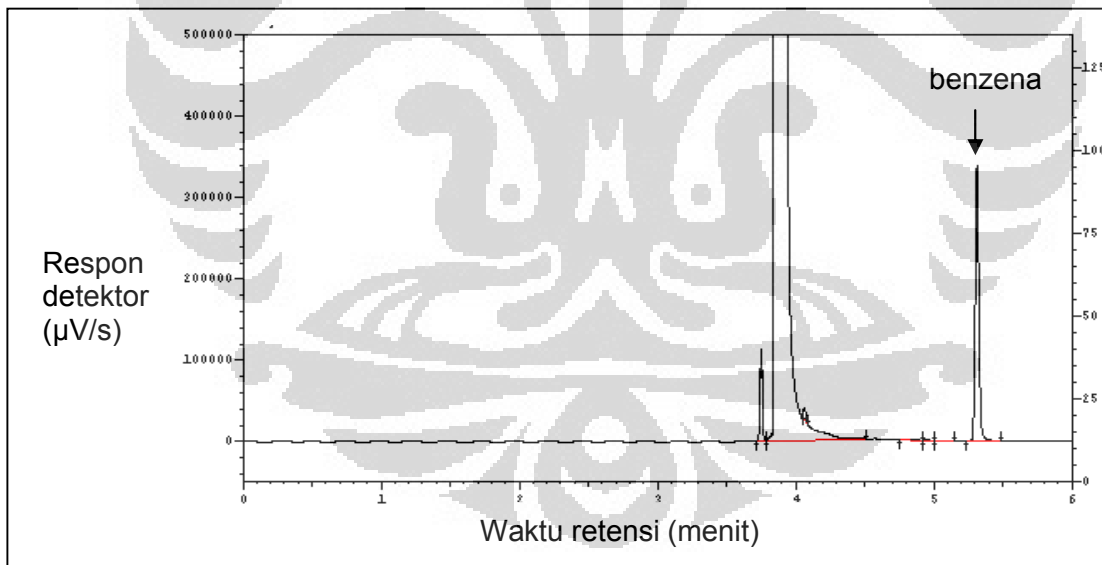
Keterangan:

A = Unit Utama

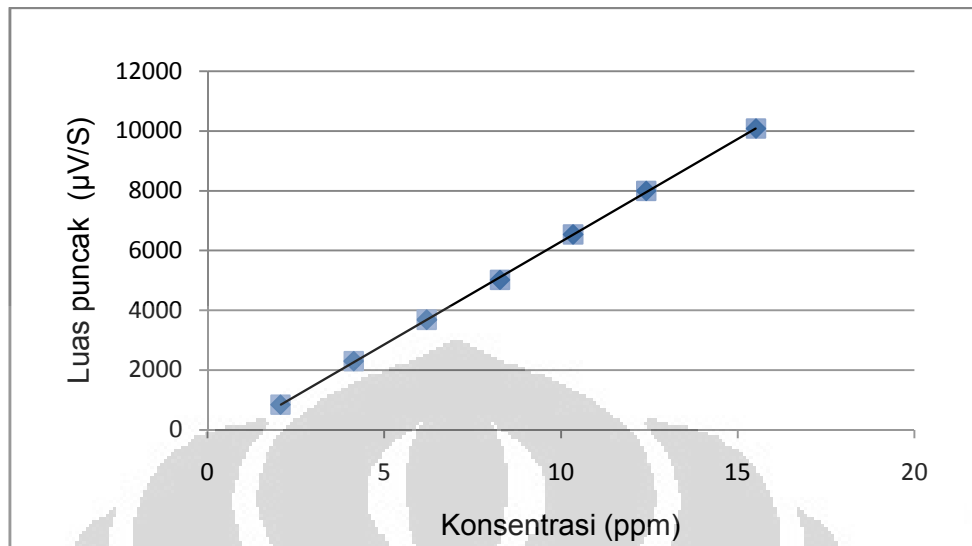
B = Sistem Kontrol / integrator CBM-102 (Shimadzu)



Gambar 7. Sampel yang mengandung asam benzoat, asam sitrat dan vitamin C yang telah dipaparkan sinar matahari: sampel A, sampel B, sampel C



Gambar 8. Kromatogram standar benzena murni 1.034 bpj dengan suhu awal kolom 60°C (suhu terprogram) dan laju alir gas 1,5 mL/menit (waktu retensi benzena adalah 5,3 menit).



Gambar 9. Kurva kalibrasi standar benzena

Keterangan:

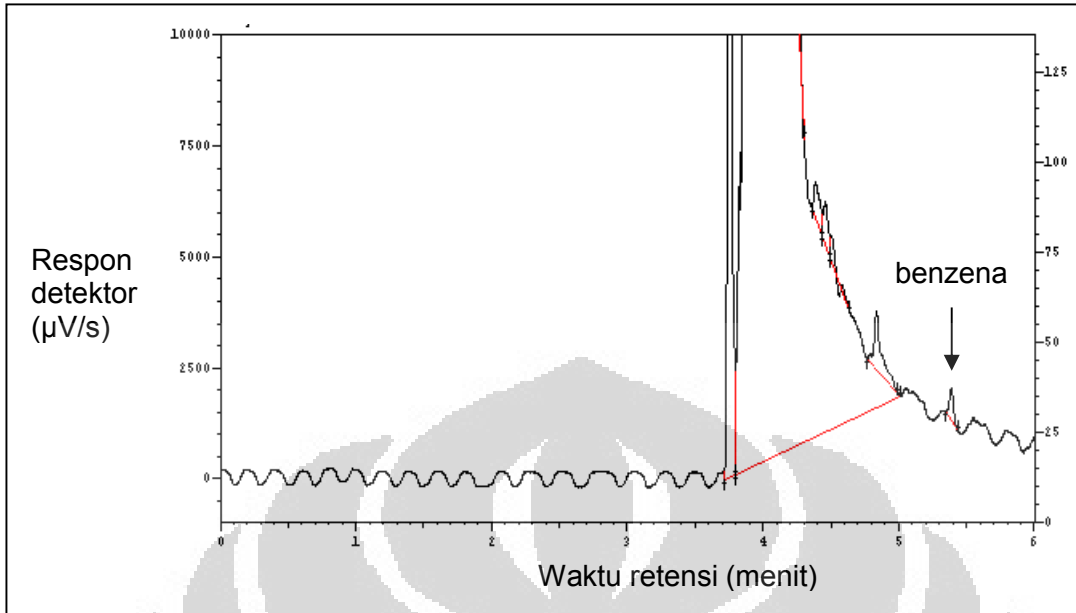
Persamaan regresi linier kurva kalibrasi standar benzena:

$$y = 687,6154x - 583,2391$$

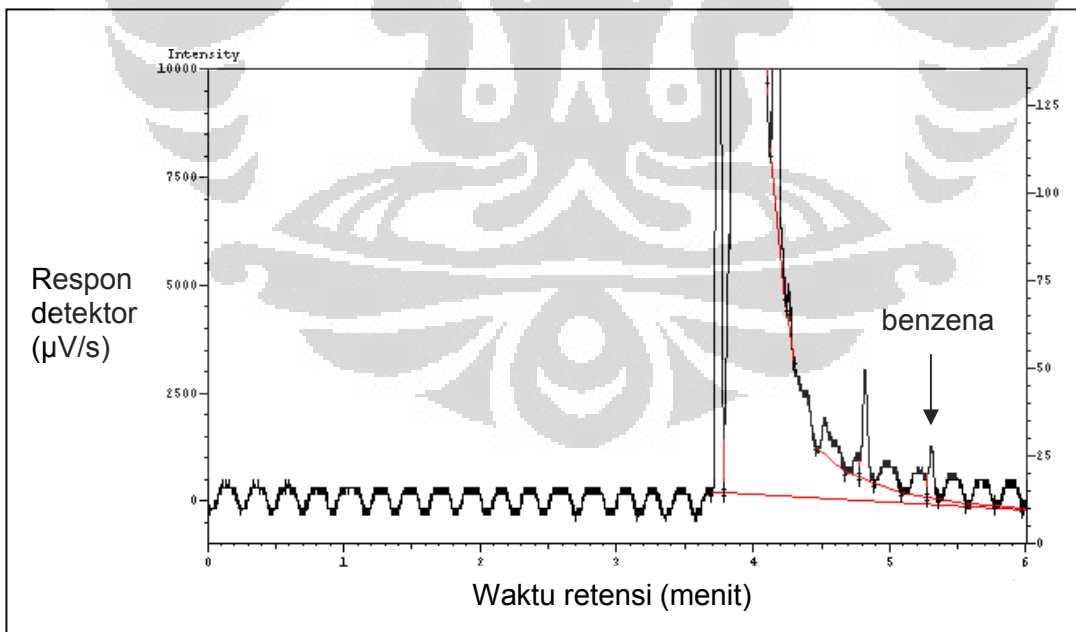
dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9999

Kondisi:

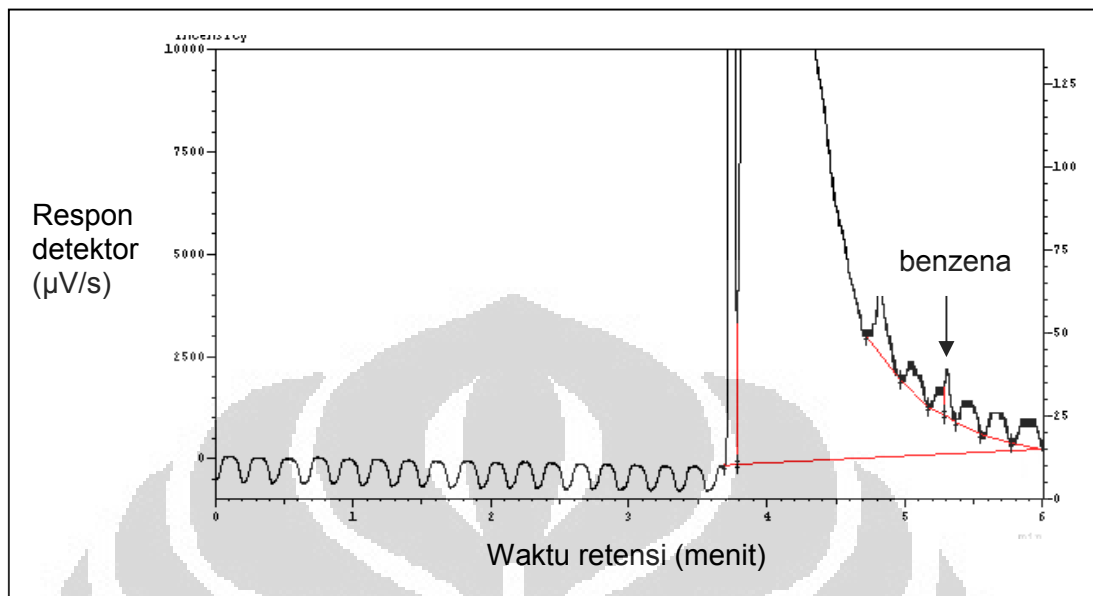
Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 230°C; suhu kolom 60°C dinaikan hingga 120°C dengan kecepatan kenaikan 3°C/menit; laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 µL.



Gambar 10. Kromatogram sampel minuman ringan A



Gambar 11. Kromatogram sampel minuman ringan B



Gambar 12. Kromatogram sampel minuman ringan C

Tabel 1

Batas maksimum penggunaan asam benzoat dalam berbagai jenis makanan

Jenis/Bahan Makanan	Batas Maksimum Penggunaan
Kecap	600 mg/kg
Minuman Ringan	600 mg/kg
Acar ketimun dalam botol	1 g/kg, tunggal atau campuran dengan kalium dan natrium benzoat atau dengan kalium sorbat
Margarin	1 g/kg, tunggal atau campuran dengan garamnya atau dengan asam sorbat dan garam-garamnya
Pekatan sari nanas	1 g/kg, tunggal atau campuran dengan garamnya atau dengan asam sorbat dan garamnya dan senyawa sulfit, tetapi senyawa sulfit tidak lebih dari 500 mg/kg
Saus Tomat	1 g/kg
Makanan Lain	1 g/kg

Tabel 2
Batas maksimum penggunaan natrium benzoat dalam berbagai jenis makanan

Jenis/Bahan Makanan	Batas Maksimum Penggunaan
Jem dan Jeli	1 g/kg, tunggal atau campuran dengan asam sorbat dan garam kaliumnya, atau dengan ester dari asam para hidroksi benzoate
Kecap	600 mg/kg
Minuman Ringan	600 mg/kg
Saus Tomat	1 g/kg
Makanan Lain	1 g/kg

Tabel 5

Batas maksimum penggunaan asam sitrat dalam berbagai jenis makanan sebagai pengasam

Jenis/Bahan Makanan	Batas Maksimum Penggunaan
Makanan pelengkap sereal	25 g/kg bahan kering
Makanan bayi kalengan	15 g/kg
Coklat, coklat bubuk dan campuran coklat dengan gula	5 g/kg, tunggal atau campuran dengan asam tartrat
Sediaan keju olahan	40 g/kg, tunggal atau campuran dengan pengasam lain dan pengemulsi dihitung terhadap bahan anhidrat
Buah zaitun	15 g/kg
Pasta tomat	Secukupnya hingga pH tidak lebih dari 4,3
Marmalad, Jam dan Jeli	Secukupnya hingga pH antara 2,8 dan 3,5
Bir, Anggur	Secukupnya
Minuman Ringan	Secukupnya
Udang, daging kepiting dan sardine kalengan	Secukupnya
Margarin, keju	Secukupnya
Saus apel kalengan	Secukupnya
Sayur dan buah kalengan	Secukupnya

Tabel 6

Batas maksimum penggunaan vitamin C dalam berbagai jenis makanan sebagai antioksidan

Jenis/Bahan Makanan	Batas Maksimum Penggunaan
Daging olahan, daging awetan	500 mg/kg, tunggal atau campuran dengan asam eritrobat dan garamnya
Ikan beku	400 mg/kg
Buah kalengan	700 mg/kg
Pekatan sari buah anggur	400 mg/kg produk akhir
Jem dan Jeli, Mamalad	500 mg/kg
Saus apel kalengan	150 mg/kg, tunggal atau campuran dengan asam eritrobat
Buah zaitun	200 mg/kg
Makanan pelengkap sereal, makanan bayi kalengan	500 mg/kg
Kaldu	1 g/kg produk siap dikonsumsi, tunggal atau campuran dengan garamnya

Tabel 7
Pemilihan kondisi optimum untuk analisis benzena dalam eter
dengan variasi kecepatan alir gas pembawa

Suhu kolom (°C)	Kecepatan alir gas pembawa (mL/menit)		Jumlah lempeng teoritis (N)		
	Tr	HETP	Resolusi		
60°C dinaikan hingga 120 °C, kecepatan kenaikan 3°C/menit	1,00	6,795	157607,217	0,0317	4,207
	1,50	5,314	198158,988	0,0252	2,365
	2,00	4,455	199971,557	0,0250	1,762

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 230°C; volume penyuntikan 1,0 µL.

Tabel 8
Data kurva kalibrasi standar benzena

Konsentrasi (bpj)	Luas Puncak Benzena ($\mu\text{V/s}$)
2,068	843
4,136	2296
6,204	3682
8,272	5016
10,340	6537
12,408	7993
15,510	10077

Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi benzena: $y = 687,6154x - 583,2391$
dengan koefisien korelasi $r = 0,9999$

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 230°C; suhu kolom 60°C dinaikan hingga 120°C, dengan kecepatan kenaikan 3°C/menit; laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 9
Data linearitas, batas deteksi dan kuantitasi benzena

Luas Puncak			
Konsentrasi	Luas Puncak	berdasarkan persamaan	
(bpj)	Benzena	regresi	
	($\mu\text{V/s}$)	(y_1)	($y-y_1$)²
2,068	843	838,75	18,066
4,136	2296	2260,70	1243,395
6,204	3682	3682,70	0,5283
8,272	5016	5104,70	7870,438
10,340	6537	6526,70	106,005
12,408	7993	7948,70	1963,129
15,510	10077	10082,00	21,863
			$\Sigma = 11205,358$
S (y/x)	= 47,340		
b	= 687,6154		
x rata-rata	= 8,420		
Sxo	= 0,0688		
Vxo	= 0,0044		
LOD	= 0,206 bpj		
LOQ	= 0,688 bpj		

Tabel 10
Data uji presisi benzena

Konsentrasi (bpj)	Luas Puncak	Konsentrasi		Simpangan baku (SD)	Koefisien variasi (KV) (%)
		(xi) (bpj)	rata-rata (bpj)		
2,068	843	2,0742	2,0965	0,0219	1,04
	858	2,0960			
	870	2,1134			
	847	2,0800			
	850	2,0844			
	882	2,1309			
8,272	5016	8,1430	8,1650	0,1542	1,88
	5011	8,1357			
	4917	7,9990			
	5214	8,4309			
	5080	8,2361			
	4949	8,0455			
15,510	10077	15,5030	15,731	0,2665	1,69
	10057	15,4740			
	10265	15,7770			
	10490	16,1040			
	10405	15,9800			

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 230°C; suhu awal kolom 60°C dinaikan hingga 120°C, dengan kecepatan kenaikan 3°C/menit; laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 µL.

Tabel 11
Data uji perolehan kembali benzena

Sampel	Konsentrasi				
	hasil ekstraksi sampel (bpj)	Konsentrasi analit yang ditambahkan (bpj)	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Terukur (bpj)	UPK (%)
A	3,066	2,4816	3236	5,554	100,25
		3,1020	3497	5,934	99,06
		3,3088	3823	6,408	101,00
B	5,021	3,7224	5425	8,738	99,85
		4,9632	6233	9,913	98,57
		5,7904	6854	10,816	100,08
C	5,188	4,1360	5814	9,304	99,42
		4,9632	7275	11,428	100,58
		6,2040	7333	11,513	101,95

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 230°C; suhu awal kolom 60°C dinaikan hingga 120°C, dengan kecepatan kenaikan 3°C/menit; laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Tabel 12

Data penetapan kadar benzena dalam sampel minuman ringan

Sampel	Luas Puncak ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Benzena (bpm)
A	1525	7,66
B	2869	12,55
C	2984	12,97

Kondisi:

Kolom kapiler CBP-10 dengan panjang kolom 50 m; suhu injektor 200°C; suhu detektor 230°C; suhu awal kolom 60°C dinaikan hingga 120°C, dengan kecepatan kenaikan 3°C/menit; laju alir gas pembawa 1,5 mL/menit; volume penyuntikan 1,0 μL .

Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum x.y) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(N(\sum x^2) - (\sum x)^2)(N(\sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

Lampiran 2
Cara perhitungan uji presisi

Rata-rata : $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

Simpangan baku : $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$

Koefisien variasi : $KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$

Contoh:

Hasil pengukuran standar benzena untuk data presisi konsentrasi sedang :

Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) = 8,1650 bpj

$$SD = \sqrt{\frac{(8,1430 - 8,1650)^2 + \dots + (8,0455 - 8,1650)^2}{6 - 1}} = 0,1542$$

$$KV = \frac{0,1542}{8,1650} \times 100\% = 1,88\%$$

Lampiran 3 Cara perhitungan uji perolehan kembali

Perhitungan UPK dengan metode adisi :

$$\text{Persen Perolehan Kembali: } \% \text{ UPK} = \frac{C_f - C_a}{C_a^*} \times 100\%$$

Keterangan:

C_f = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_a = konsentrasi sampel sebenarnya

C_a^* = konsentrasi analit yang ditambahkan

Contoh:

Persamaan kurva kalibrasi benzena $y = 687,6154x - 583,2391$

y = luas puncak benzena ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi benzena (bpj)

Misalnya pada konsentrasi sampel yang sebenarnya 3,066 bpj, konsentrasi analit yang ditambahkan 2,4816 diperoleh luas puncak sebesar 3236 $\mu\text{V/s}$ (y)

$$y = 687,6154x - 583,2391$$

$$3236 = 687,6154x - 583,2391$$

$$x = 5,554 \text{ bpj}$$

$$\% \text{ UPK} = \frac{5,554 - 3,066}{2,4816} \times 100\% = 100,25\%$$

Lampiran 4

Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas

$$\text{Simpangan baku residual} : S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

$$\text{Batas deteksi} : \text{LOD} = \frac{3 \times S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi} : \text{LOQ} = \frac{10 \times S(y/x)}{b}$$

$$\text{Standar deviasi dari fungsi} : S_{x0} = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi} : V_{x0} = \frac{S_{x0}}{x}$$

Lampiran 5

Cara perhitungan kadar benzena dalam sampel

Contoh perhitungan kadar benzena dalam sampel:

Persamaan kurva kalibrasi benzena : $y = 687,6154x - 583,2391$

y = luas puncak benzena ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi benzena (bpj)

Contoh:

Luas puncak benzena dalam sampel = $1525 \mu\text{V/s}$ → diplot ke persamaan regresi linier, maka $x = 3,066$ bpj, kemudian dibuat perbandingan terbalik antara volume hasil ekstraksi (1ml) dengan volume sampel awal (400ml).

$$\frac{400 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = \frac{3,066 \text{ ppm}}{z}$$

$$z = 0,00766 \text{ bpj}$$

$$= 7,66 \text{ bpm}$$

Jadi kadar benzena dalam 400 mL sampel = 7,66 bpm.

Lampiran 6
Sertifikat analisis standar benzena



Specification

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 07.12.2009

1.01783.0000 Benzene GR for analysis ACS,ISO,Reag. Ph Eur

	Spec. Values	
Purity (GC)	≥ 99.7	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/ 4 °C)	0.877 - 0.879	
Acidity	≤ 0.00005	meq/g
Alkalinity	≤ 0.00005	meq/g
Melting point	≥ 5.2	°C
Boiling point	79 - 81	°C
Thiophene	≤ 0.0001	%
Sulfur compounds (as S)	≤ 0.003	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.03	%

Specification

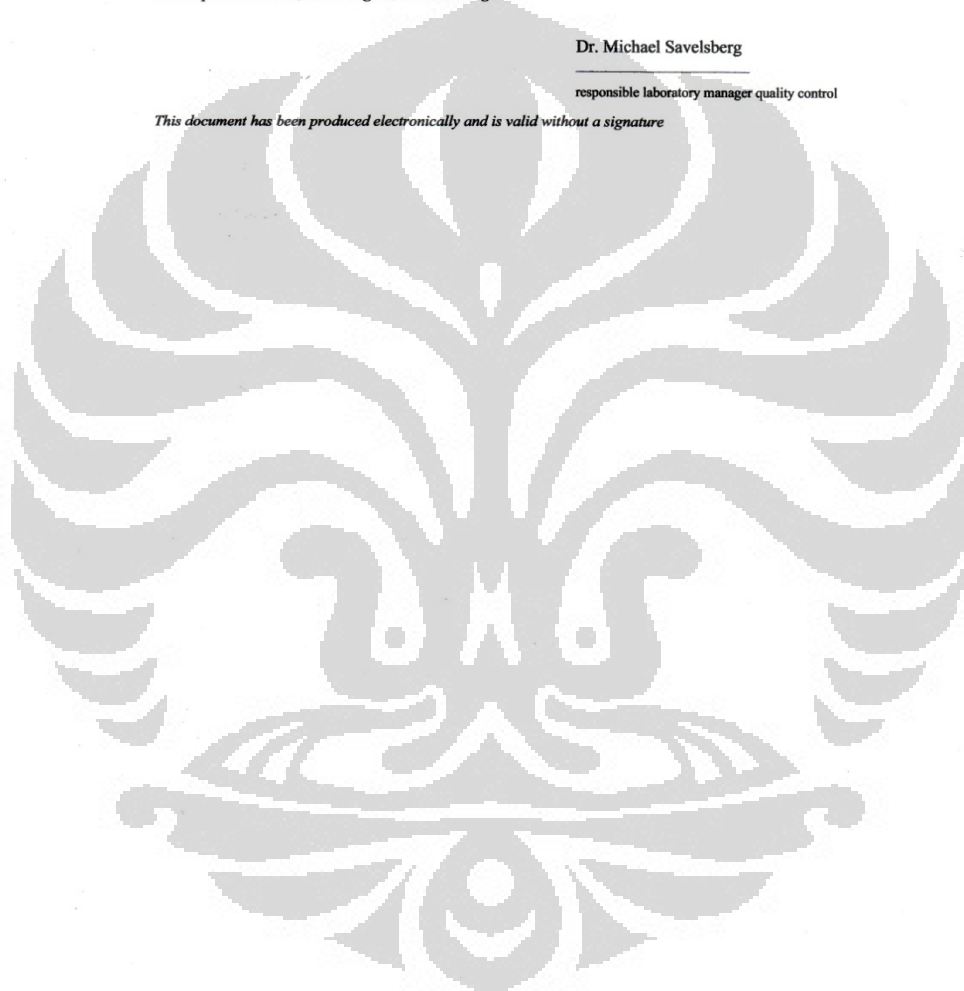
1.01783.0000 Benzene GR for analysis ACS,ISO,Reag. Ph Eur

Corresponds to ACS, ISO-reagent, Ph Eur-reagent

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature



Lampiran 7
Komposisi sampel minuman ringan

Komposisi sampel A: air, gula, asam sitrat, konsentrat jeruk, perisa jeruk, natrium benzoat, vitamin C, pewarna kuning FCF CI 15985, pewarna Tartrazin CI 19140.

Komposisi sampel B: air, CO₂, gula, ekstrak teh, asam sitrat, natrium sitrat, asam askorbat, natrium benzoat, konsentrat sari buah dan perisa.

Komposisi sampel C: air, gula, natrium klorida, asam sitrat, vitamin C, natrium sitrat, kalium klorida, kalsium laktat, magnesium klorida, perisa jambu, natrium benzoat.