



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PH, KOMPOSISI SERTA LAJU ALIR FASA GERAK
PADA PENENTUAN KADAR NATRIUM BENZOAT DAN KALIUM
SORBAT DALAM BAHAN MAKANAN DENGAN TEKNIK HPLC**

SKRIPSI

MERRY

0806452942

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

JANUARI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PH, KOMPOSISI SERTA LAJU ALIR FASA GERAK
PADA PENENTUAN KADAR NATRIUM BENZOAT DAN KALIUM
SORBAT DALAM BAHAN MAKANAN DENGAN TEKNIK HPLC**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

MERRY

0806452942

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI KIMIA

DEPOK

JANUARI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

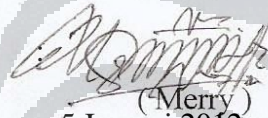
Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Merry

NPM : 0806452942

Tanda Tangan

Tanggal : 5 Januari 2012



(Merry)

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Merry
NPM : 0806452942
Program Studi : Kimia
Judul Skripsi : Optimasi PH, Komposisi Serta Laju Alir Fasa Gerak Pada Penentuan Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat Dalam Bahan Makanan dengan Teknik HPLC

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing	: Drs. Sunardi, M.si	(...  ...)
Penguji I	: Prof. Dr. Endang Asijati W, M.Sc	(...  ...)
Penguji II	: Dr. rer. nat. Widayanti Wibowo	(...  ...)
Penguji III	: Dra. Susilowati Hadisusilo, M.Sc	(...  ...)

Ditetapkan di : Departemen Kimia Universitas Indonesia
Tanggal : 5 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan berkat dan karunia-Nya selama ini sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta melengkapi tahapan penulisan skripsi ini dengan baik dan tepat waktu. Adapun tujuan penulisan skripsi berjudul “*Optimasi PH, Komposisi Serta Laju Alir Fasa Gerak Pada Penentuan Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat Dalam Bahan Makanan dengan Teknik HPLC*” diajukan sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains dari Departemen Kimia Universitas Indonesia.

Pada kesempatan kali ini, penulis ingin mempersembahkan skripsi ini khusus kepada kedua orang tua penulis yang tiada hentinya memberi dukungan moril dan materil selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Kimia, Universitas Indonesia. Selain itu penulis juga tidak lupa mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada saudara perempuanku, Erni yang selalu memotivasi penulis saat menghadapi kesulitan-kesulitan selama periode perkuliahan dan juga selama periode penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa dorongan dan bimbingan dari berbagai pihak, maka penulis tidak dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini dengan baik dan lancar. Oleh sebab itulah, pada kesempatan ini penulis secara khusus mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah berjasa baik secara langsung maupun tidak langsung membantu dan membimbing penulis selama periode penelitian berlangsung dan juga dalam menyelesaikan skripsi ini. Adapun pihak-pihak tersebut antara lain :

1. Bapak Dr. Ridla Bakri, M.Phil selaku ketua Departemen Kimia Universitas Indonesia.
2. Ibu Dra.Tresye Utari, M.Si selaku koordinator penelitian Departemen Kimia Universitas Indonesia.
3. Bapak Drs. Sunardi, M.Si selaku pembimbing penelitian yang sangat membantu penulis dalam memberi saran dan kritik yang membangun selama

penelitian berlangsung serta dalam memberikan dukungan semangat yang tiada hentinya kepada penulis sehingga penulis dapat menyusun skripsi ini dengan baik.

4. Bapak Dr. Yoki Yulizar, M.Sc selaku pembimbing akademik yang selama ini telah membimbing penulis dalam memberikan saran yang sangat membangun seputar masalah akademik.
5. Bapak Dr. Asep Saefumillah, PhD M.Phil sebagai ketua Koordinator Bidang Analisis yang telah memberikan banyak masukan kepada penulis yang berguna bagi jalannya proses penelitian.
6. Kak Zora, Kak Rasyid, Kak Puji, Kak Rispa serta seluruh asisten di Laboratorium Afiliasi yang telah banyak membantu penulis selama penelitian berlangsung.
7. Seluruh Staff pengajar Departemen Kimia Universitas Indonesia untuk bekal ilmu yang telah diberikan selama periode perkuliahan berlangsung.
8. Pak Hedi, Mbak Cucu dan Mbak Ina yang turut membantu penulis selama proses penelitian.
9. Sahabat- sahabatku : Ochi, Umar, Lidia dan Adi yang selalu menyemangati penulis dikala penulis menghadapi kesulitan selama periode perkuliahan serta teman-teman seperjuangan penelitian lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat sebagai sumber referensi yang dapat memberikan banyak informasi kepada para pembaca yang akan melakukan penelitian yang berkaitan dengan instrumentasi. Namun penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan skripsi ini.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Merry
NPM : 0806452942
Program Studi : Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Optimasi PH, Komposisi Serta Laju Alir Fasa Gerak Pada Penentuan Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat Dalam Bahan Makanan dengan Teknik HPLC.

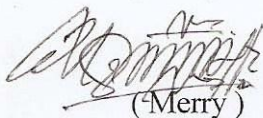
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 5 Januari 2012

Yang menyatakan



(Merry)

vi

ABSTRAK

Nama : Merry
Program Studi : Kimia
Judul : Optimasi PH, Komposisi Serta Laju Alir Fasa Gerak Pada Penentuan Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat Dalam Bahan Makanan dengan Teknik HPLC

Natrium benzoat dan kalium sorbat merupakan bahan tambahan pangan yang secara luas digunakan pada bahan makanan ataupun minuman guna mencegah atau menghambat kerusakan bahan pangan yang dapat disebabkan oleh jamur, bakteri ataupun mikroba pembusuk. Penentuan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat dalam bahan makanan seperti kecap dan saus tomat dilakukan dengan teknik HPLC fasa terbalik dengan kolom C18 dan menggunakan fasa gerak berupa campuran metanol dan buffer fosfat. Kondisi optimum pemisahan kedua bahan pengawet diperoleh pada komposisi fasa gerak metanol : buffer fosfat (15:85) dengan pH buffer 6,8 serta laju alir eluen 1,0 mL/min. Kondisi optimum pemisahan kedua bahan pengawet tersebut memenuhi parameter validasi dengan persen perolehan kembali > 90% dan %RSD < 2% untuk uji presisi. Batas deteksi (LoD) untuk natrium benzoat dan kalium sorbat berturut-turut 2,305 mg/L dan 0,390 mg/L sementara limit kuantisasi (LOQ) natrium benzoat dan kalium sorbat masing-masing sebesar 7,685 mg/L dan 1,300 mg/L.

Kata Kunci : natrium benzoat, kalium sorbat, pengawet makanan, *high performance liquid chromatography*, optimasi, validasi.
xii+77 halaman : 17 gambar; 5 tabel
Daftar Pustaka : 23 (1988-2010)

ABSTRACT

Name : Merry
Study Program : Chemistry
Title : Optimization of PH, Composition and Flow Rate of Mobile Phase for The Determination of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Foods by HPLC Technique

Sodium benzoate and potassium sorbate are food additives which widely used in foods or beverages to prevent or to delay the decay of foodstuffs that can be caused by fungi, bacteria, or microbe. Determination of the amount of sodium benzoate and potassium sorbate in foods namely soy sauce and tomato sauce was done by HPLC technique in reverse phase with C18 column and the blend of methanol and phosphate buffer as mobile phase. The optimum separation condition for both preservatives was achieved at methanol and phosphate buffer blending ratio of 15 : 85 in which the buffer's pH was 6,8 and the flow rate was 1,0 mL/min. The optimum separation condition for both preservatives agreed to the validation parameters with the percent recovery higher than 90% and %RSD smaller than 2% for the presicion. The limit of detection for sodium benzoate and potassium sorbate were 2,305 mg/L and 0,390 mg/L respectively, while the limit of quantization for sodium benzoate and potassium sorbate were 7,685 mg/L and 1,300 mg/L respectively.

Key Words : sodium benzoate, potassium sorbate, food preservative, high performance liquid chromatography, optimization, validation.
xii+77 pages : 17 pictures; 5 tables
Bibliography : 23 (1988-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I : PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Bahan Penyedap Makanan	6
2.1.1. Kecap	6
2.1.2. Saus Tomat	6
2.2. Bahan Pengawet dan Kegunaannya	7
2.3. Jenis- Jenis Bahan Pengawet	7
2.4 Natrium Benzoat	9
2.4.1 Sifat Fisik dan Kimia Natrium Benzoat	9
2.4.2 Pemanfaatan Natrium Benzoat	10

2.4.3	Konsentrasi Maksimum Penambahan Natrium Benzoat ke Dalam Bahan Makanan dan Minuman	11
2.5	Kalium Sorbat	11
2.5.1	Sifat Fisik dan Kimia Kalium Sorbat	11
2.5.2	Pemanfaatan Kalium Sorbat	12
2.5.3	Konsentrasi Maksimum Penambahan Kalium Sorbat ke Dalam Bahan Makanan dan Minuman	13
2.6	Validasi Metode Analisis	13
2.6.1.	Linieritas dan Rentang	14
2.6.2.	Kecermatan (<i>accuracy</i>)	14
2.6.3.	Keseeksamaan (<i>precision</i>)	14
2.6.4.	Selektifitas	16
2.6.5.	Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi	16
2.6.6.	Ketangguhan Metode (<i>ruggedness</i>)	17
2.6.7.	Kekuatan (<i>robustness</i>)	17
2.7.	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	17
2.7.1	Skema Instrumen HPLC dan Parameter Pemisahan	18
2.7.1.1	Waktu Retensi (t_r)	19
2.7.1.2	Tailing Factor	19
2.7.1.3	Selektifitas (α)	19
2.7.1.4	Jumlah Pelat Teoritis (N) dan Nilai HETP	20
2.7.1.5	Resolusi (R)	21
2.7.2	Kolom dan Fasa Diam	21
2.7.2.1	Mekanisme Pemisahan	22
2.7.3	Fasa Gerak	23

BAB III : METODE PENELITIAN

3.1	Alat dan Bahan Penelitian	24
3.1.1	Alat	24
3.1.2	Bahan- Bahan	24
3.2	Kondisi Kromatografi	25
3.3	Prosedur Penelitian	25
3.3.1	Preparasi Fase Gerak	25
3.3.1.1	Buffer Fosfat pH 6.8	25
3.3.1.2	Buffer Fosfat pH 4.5	26
3.3.1.3	Buffer Ammonium Asetat pH 4.5	26
3.3.1.4	Fase Gerak Metanol	26
3.3.2	Preparasi Larutan Induk Baku Natrium Benzoat	26
3.3.3	Preparasi Larutan Induk Baku Kalium Sorbat	26
3.3.4	Preparasi Larutan Standar Natrium Benzoat	27
3.3.5	Preparasi Larutan Standar Kalium Sorbat	27

3.3.6	Persiapan Instrumen HPLC	27
3.3.7	Optimasi Kondisi Kromatografi	27
3.3.8	Validasi Standar	28
3.3.8.1	Linearitas	28
3.3.8.2	Akurasi	28
3.3.8.3	Presisi	28
3.3.8.4	Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi	29
3.3.9	Pengujian Sampel	29
3.3.9.1	Analisis Kualitatif	29
3.3.9.2	Analisis Kuantitatif	29

BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Pemisahan Natrium Benzoat dan kalium Sorbat	30
4.2	Optimasi Kondisi Kromatografi	30
4.2.1	Optimasi Dengan Eluen Metanol : Buffer Fosfat pH 4.5	30
4.2.2	Optimasi Dengan Eluen Metanol : Buffer Asetat pH 4.5.	33
4.2.3	Optimasi Dengan Eluen Metanol : Buffer Fosfat pH 6.8.	35
4.3	Pengaruh Fasa Gerak Terhadap Pemisahan Kedua Bahan Pengawet.	40
4.3.1.	Peranan Metanol dan Buffer Fosfat.	40
4.3.2	Pengaruh pH Buffer Sebagai Fasa Gerak.	40
4.3.3.	Pengaruh Komposisi Metanol : Buffer	41
4.4	Pengaruh Fasa Diam dan Struktur Bahan Pengawet.	43
4.5	Validasi Larutan Standar Natrium Benzoat dan kalium Sorbat.	43
4.5.1	Linearitas dan Rentang	43
4.5.2	Presisi	46
4.5.3	Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantisasi (LoQ)	46
4.6	Analisa Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat Pada Sampel	47
4.6.1	Persen Perolehan Kembali (% Recovery)	49

BAB V : KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	51
5.2	Saran	52

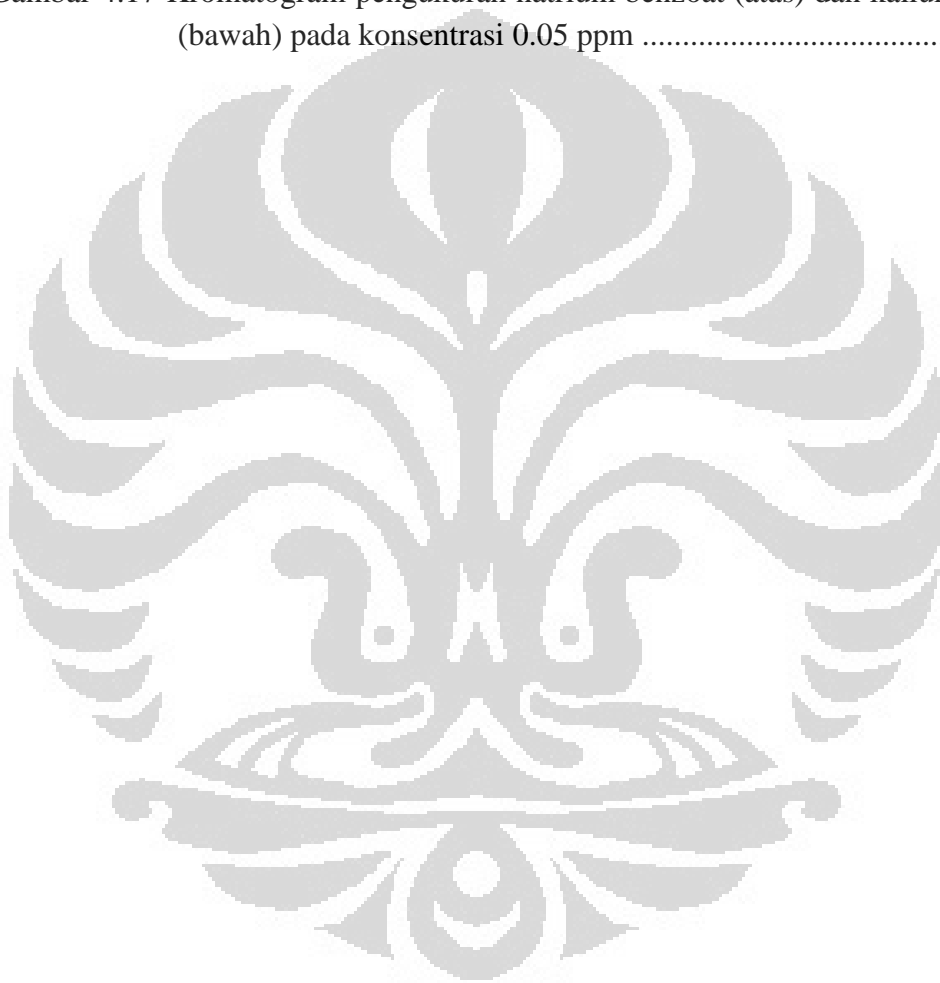
DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Rumus struktur natrium benzoat.	10
Gambar 2.2 Rumus struktur kalium sorbat	12
Gambar 2.3 Skema sederhana instrumen HPLC	18
Gambar 2.4 Pengukuran tailing factor.....	19
Gambar 4.1 Grafik hubungan nilai HETP dengan komposisi fasa gerak.....	31
Gambar 4.2 Grafik hubungan jumlah pelat dengan komposisi fasa gerak.....	31
Gambar 4.3 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 4.5 (25:75) pada laju 1.0 mL/min.....	32
Gambar 4.4 Grafik hubungan nilai HETP dengan komposisi fasa gerak.....	33
Gambar 4.5 Grafik hubungan jumlah pelat dengan komposisi fasa gerak.....	33
Gambar 4.6 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm dan 225 nm dengan eluen metanol: buffer asetat pH 4.5 (25:75) pada laju 1.0 mL/min.....	34
Gambar 4.7 Grafik hubungan nilai HETP dengan komposisi fasa gerak.....	35
Gambar 4.8 Grafik hubungan jumlah pelat dengan komposisi fasa gerak.....	36
Gambar 4.9 Grafik hubungan tailing factor dengan komposisi fasa gerak.....	37
Gambar 4.10 Grafik hubungan nilai resolusi dengan komposisi fasa gerak pada panjang gelombang 225 nm.....	38
Gambar 4.11 Grafik hubungan nilai resolusi dengan komposisi fasa gerak pada panjang gelombang 254 nm.....	38
Gambar 4.12 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm dan 225 nm dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 6.8 (15:85) pada laju 1.0 mL/min.....	39
Gambar 4.13 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm dan 225 nm dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 6.8 (35:65) pada laju 0.8 mL/min.....	42

- Gambar 4.14 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm dan 225 nm dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 6.8 (35:65) pada laju 1.0 mL/min.....42
- Gambar 4.15 Kurva linearitas larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat.....44
- Gambar 4.16 Kurva rentang larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat.....45
- Gambar 4.17 Kromatogram pengukuran natrium benzoat (atas) dan kalium sorbat (bawah) pada konsentrasi 0.05 ppm47



DATAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Contoh bahan pengawet organik dan anorganik.....	9
Tabel 2.2 Modifikasi silika pada kolom serta aplikasinya.....	22
Tabel 4.1 Kadar natrium benzoat dan kalium sorbat yang terkandung dalam masing- masing sampel kecap dan saus.....	48
Tabel 4.2 Persen recovery dari hasil penambahan baku natrium benzoat 40 ppm ke dalam sampel kecap.....	49
Tabel 4.3 Persen recovery dari hasil penambahan baku kalium sorbat 40 ppm ke dalam sampel kecap.....	49
Tabel 4.4 Persen recovery dari hasil penambahan baku natrium benzoat 40 ppm ke dalam sampel saus.....	50
Tabel 4.5 Persen recovery dari hasil penambahan baku kalium sorbat 40 ppm ke dalam sampel saus.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Parameter pengukuran fasa gerak metanol dan buffer fosfat pH 4.5.....	55
Lampiran 2. Parameter pengukuran fasa gerak metanol dan buffer asetat pH 4.5.....	56
Lampiran 3. Parameter pengukuran fasa gerak metanol dan buffer fosfat pH 6.8.....	57
Lampiran 4. Presisi larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat.....	58
Lampiran 5. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) natrium benzoat.....	59
Lampiran 6. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) kalium sorbat.....	60
Lampiran 7. Analisa kuantitatif natrium benzoat pada sampel kecap	61
Lampiran 8. Analisa kuantitatif natrium benzoat pada sampel saus.....	62
Lampiran 9. Analisa kuantitatif kalium sorbat pada sampel kecap.....	63
Lampiran 10. Analisa kuantitatif kalium sorbat pada sampel saus	64
Lampiran 11. Persen perolehan kembali natrium benzoat pada sampel kecap.....	65
Lampiran 12. Persen perolehan kembali kalium sorbat pada sampel kecap.....	66
Lampiran 13. Persen perolehan kembali natrium benzoat pada sampel saus.....	67
Lampiran 14. persen perolehan kembali kalium sorbat pada sampel saus.....	68

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penambahan bahan pengawet ke dalam makanan ataupun minuman kini telah menjadi hal yang umum dalam teknologi pembuatan makanan dan minuman moderen serta produk obat-obat herbal. Salah satu tujuan utama dilakukannya penambahan bahan pengawet ke dalam makanan atau minuman adalah untuk mencegah dan menghambat kerusakan yang disebabkan oleh jamur, bakteri dan mikroba pembusuk sehingga produk makanan atau minuman tersebut dapat bertahan dalam jangka waktu yang cukup lama.

Bahan pengawet makanan yang paling umum hadir dalam produk-produk makanan ataupun minuman diantaranya adalah natrium benzoat yang merupakan garam natrium dari asam benzoat serta kalium sorbat yang merupakan garam kalium dari asam sorbat. Kedua bahan pengawet tersebut sering dijumpai penggunaannya dalam produk-produk makanan cair seperti kecap dan saus oleh karena harganya yang relatif murah dan juga karena sifatnya yang dapat bekerja dengan baik dalam suasana asam untuk mencegah pertumbuhan bakteri dan mikroba.

Di Indonesia, natrium benzoat dan kalium sorbat dikelompokkan sebagai bahan pengawet organik yang diizinkan penggunaannya oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Berdasarkan PERMENKES RI Nomor 772/Menkes/Per/IX/1988 batas maksimum penambahan kedua bahan pengawet tersebut berbeda-beda untuk setiap produk, misalnya kadar maksimum penambahan natrium benzoat dan kalium sorbat ke dalam kecap adalah sebesar 600 mg/kg sedangkan kadar maksimum penambahan kedua bahan pengawet ke dalam saus adalah sebesar 1000 mg/kg.

Beredarnya berita tentang penggunaan dua bahan pengawet yaitu natrium benzoat dan kalium sorbat yang berlebihan pada produk-produk penyedap makanan seperti kecap dan saus ditemukan pada lebih dari 10 produk yang tersebar di seluruh pelosok Indonesia (Sumber : Republika, 1Maret 2007). Hal ini

tentu saja membahayakan konsumen karena konsumsi makanan atau minuman berbahan pengawet natrium benzoat secara berlebihan dapat memicu tekanan darah tinggi atau hipertensi yang dapat meningkatkan resiko penyakit jantung, ginjal serta stroke. Selain itu, konsumsi bahan pengawet ini secara berlebihan juga dapat mempersempit aliran pernapasan sehingga memicu terjadinya asma dan masih banyak bahaya lainnya. Hal yang sama juga berlaku untuk kalium sorbat. Konsumsi kalium sorbat yang berlebihan dapat menyebabkan migrain dan hiperkalemia (Sumber: <http://www.livestrong.com/article>. diakses tanggal 6 oktober 2011).

Pengembangan metode analisa bahan pengawet dengan kromatografi cair kinerja tinggi atau HPLC telah menjadi metode yang paling sering dilakukan saat ini karena cukup mudah untuk dioperasikan serta waktu analisisnya yang relatif singkat. Pada penelitian-penelitian sebelumnya, umumnya teknik analisis yang dikembangkan pada penentuan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat dengan HPLC dilakukan dengan mekanisme fasa terbalik menggunakan kolom C18 yang bersifat non polar serta menggunakan fasa gerak berupa campuran pelarut organik yaitu asetonitril dan buffer asetat pH 4.4 dan 4.5.

Kolom C18 dengan bahan isian silika yang gugus silanolnya dimodifikasi dengan gugus alkil yaitu rantai hidrokarbon $C_{18}H_{37}$ secara luas digunakan untuk analisis bahan pengawet yang bersifat polar dengan mekanisme fasa terbalik. Adanya interaksi di antara bahan pengawet dengan gugus silanol yang tidak terlindungi memungkinkan terjadinya penahanan kedua bahan pengawet tersebut di dalam kolom dengan waktu yang berbeda-beda sesuai dengan derajat kepolaran dari masing-masing bahan pengawet. Sementara itu, fasa gerak yang pada umumnya digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya yaitu campuran asetonitril dengan buffer asetat adalah campuran pelarut yang bersifat polar. Adanya interaksi natrium benzoat dan kalium sorbat yang lebih kuat dengan fasa gerak membuat kedua bahan pengawet tersebut dapat dikeluarkan dari dalam kolom C18. Peranan buffer asetat pH 4.4 ataupun 4.5 sebagai pengontrol pH bagi natrium benzoat dan kalium sorbat dalam kolom juga turut mempengaruhi kondisi pemisahan kedua bahan pengawet tersebut.

Analisa kualitatif dan kuantitatif natrium benzoat dan kalium sorbat dengan menggunakan kolom C18 serta fasa gerak berupa campuran pelarut asetonitril dan buffer asetat pH 4.4 dengan perbandingan (40:60) memang memberikan hasil pemisahan yang baik dengan waktu retensi yang relatif singkat yaitu sekitar 4 menit untuk natrium benzoat dan 5 menit untuk kalium sorbat (R Khosrokhavar.,et al, 2010). Sementara pada penelitian lainnya dengan menggunakan kolom yang sama yaitu C18 dan fasa gerak yang tidak jauh berbeda yaitu campuran pelarut asetonitril dan buffer asetat pH 4.5 dengan perbandingan (10:90), pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat juga berlangsung dengan baik dengan waktu retensi 6 menit dan 10 menit untuk natrium benzoat dan kalium sorbat berturut-turut (Pylypiw, H.M., & Grether, M.T, 2000).

Harga asetonitril di pasaran yang semakin mahal serta ketersediaannya yang semakin langka membuat metode pemisahan dengan pelarut asetonitril tidak lagi bersifat efisien. Fasa gerak berupa campuran metanol dan buffer asetat ataupun buffer fosfat yang juga merupakan campuran pelarut polar diharapkan dapat menjadi pelarut yang lebih efektif untuk menghasilkan pemisahan optimum natrium benzoat dan kalium sorbat.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang menjadi dasar penelitian ini adalah karakteristik fasa gerak seperti apa yang dapat memberikan pemisahan yang optimum bagi natrium benzoat dan kalium sorbat dengan mekanisme fasa terbalik menggunakan kolom C18. Karakteristik fasa gerak yang dimaksud mencakup komposisi metanol dan buffer, jenis buffer, pH buffer serta laju alir yang digunakan. Selain itu permasalahan yang juga turut mendasari penelitian ini adalah apakah kondisi optimum kromatografi pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat yang diperoleh dapat memenuhi parameter-parameter validasi atau tidak.

Permasalahan lain yang juga menjadi sorot utama dari penelitian ini adalah apakah bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat yang terkandung dalam sampel uji kecap dan saus yang beredar di pasaran mengandung kadar di dalam batas aman yang ditetapkan PERMENKES RI Nomor 772/Menkes/Per/IX/1988 atau tidak.

1.3 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah :

- ❖ Analisa kualitatif dan kuantitatif natrium benzoat dan kalium sorbat dengan teknik HPLC fasa terbalik menggunakan kolom C18 dan fasa gerak berupa campuran metanol dan buffer dapat memberikan hasil analisa yang optimal.
- ❖ Terdapat beberapa merek kecap dan saus yang mengandung kadar natrium benzoat dan kalium sorbat melebihi batas aman yang telah ditentukan oleh BPOM dalam PERMENKES RI Nomor 772/Menkes/Per/IX/1988.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh dan mengembangkan kondisi analisa natrium benzoat dan kalium sorbat secara optimal dengan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) fasa terbalik menggunakan kolom C18 dan menggunakan fasa gerak berupa campuran pelarut metanol dan buffer asetat ataupun buffer fosfat yang divariasikan komposisinya, pH buffernya serta laju alirnya. Validasi terhadap metode analisa pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat yang diperoleh dari kondisi optimum kromatografi juga menjadi tujuan penelitian ini guna membuktikan bahwa metode tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan pada analisa- analisa selanjutnya yang diterapkan pada sampel uji.

Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui kadar rata-rata natrium benzoat dan kalium sorbat yang digunakan sebagai bahan pengawet pada beberapa merek kecap dan saus yang beredar secara luas di pasaran. Penentuan kadar dari bahan-bahan pengawet tersebut bukan hanya penting bagi kualitas produk pangan tetapi juga penting guna melindungi masyarakat sebagai konsumen.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat dalam mengembangkan metode alternatif untuk menciptakan kondisi kromatografi yang lebih optimum pada pemisahan bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat dengan mekanisme fasa terbalik menggunakan kolom C18. Penelitian ini juga bermanfaat untuk memberikan

informasi kepada masyarakat sebagai konsumen mengenai kadar bahan pengawet di dalam produk makanan seperti kecap dan saus yang beredar secara luas di pasaran sehingga masyarakat dapat lebih berhati-hati dalam memilih produk-produk pangan yang aman untuk dikonsumsi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bahan Penyedap Makanan

2.1.1 Kecap

Kecap digunakan sebagai bumbu pada berbagai makanan. Menurut SNI (SNI 3543-1999), kecap didefinisikan sebagai produk cair yang diperoleh dari hasil fermentasi dan atau cara kimia (hidrolisis) kacang kedelai (*Glycine max L.*) dengan atau tanpa penambahan bahan makanan lain dan bahan pengawet yang diizinkan. Proses fermentasi pembuatan kecap menggunakan bakteri *Aspergillus oryzae* atau *Aspergillus soyae*.

Banyak senyawa-senyawa penting yang dibutuhkan tubuh yang terkandung di dalam kecap diantaranya adalah protein, vitamin dan mineral. Protein dari kecap tentunya berasal dari asam amino yang terdapat dalam kedelai karena pada umumnya bahan utama pembuatan kecap adalah kacang kedelai. Selain senyawa-senyawa tersebut, pada kecap juga terkandung bahan pengawet untuk memperpanjang masa penyimpanan kecap. Pengawet yang paling umum digunakan adalah asam dan garam benzoat serta asam dan garam sorbat. Selain berfungsi sebagai penyedap makanan, kecap juga berfungsi sebagai pemberi aroma yang khas pada makanan atau masakan.

2.1.2 Saus Tomat

Saus tomat adalah saus yang dibuat dari buah tomat yang sudah masak ditambah gula, garam, cuka dan rempah-rempah seperti cengkeh dan kayu manis. Bawang bombay, seledri dan sayuran lain juga sering ditambahkan ke dalam saus tomat (SNI 01-3546-2004). Untuk memperpanjang umur simpan dari produk-produk saus yang beredar dalam kemasan botol maupun kemasan saset, penambahan bahan pengawet sangat diperlukan dan yang paling umum digunakan adalah garam benzoat dan garam sorbat karena harganya yang relatif murah dan mudah didapat. Sama seperti kecap, saus tomat juga ditambahkan ke dalam makanan untuk menyedapkan makanan.

2.2. Bahan Pengawet dan Kegunaannya

Bahan pengawet atau yang sering disebut sebagai bahan tambahan pangan merupakan bahan yang ditambahkan pada makanan guna mencegah atau menghambat kerusakan atau busuknya makanan. Kerusakan tersebut dapat disebabkan oleh fungi, bakteri dan mikroba lainnya. Sementara menurut peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 722/Menkes/Per/IX/1988, pengawet merupakan bahan tambahan pangan yang mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman atau peruraian lain terhadap pangan yang disebabkan oleh mikroorganisme.

Secara umum kegunaan utama dari bahan pengawet yang ditambahkan ke dalam makanan adalah untuk memelihara kesegaran dan mencegah kerusakan makanan atau bahan makanan yang diakibatkan karena pertumbuhan mikroba pembusuk. Beberapa pengawet yang termasuk antioksidan berfungsi mencegah makanan menjadi tengik yang disebabkan oleh perubahan kimiawi dalam makanan tersebut. Sementara menurut (Wisnu, 2002) penambahan bahan pengawet pada pangan bertujuan:

- ❖ menghambat pertumbuhan mikroba pembusuk pada pangan baik yang bersifat patogen maupun tidak patogen
- ❖ memperpanjang umur simpan pangan
- ❖ tidak menurunkan kualitas gizi, warna, cita rasa, dan bau bahan pangan yang diawetkan
- ❖ tidak untuk menyembunyikan keadaan pangan yang berkualitas rendah
- ❖ tidak digunakan untuk menyembunyikan penggunaan bahan yang salah atau yang tidak memenuhi persyaratan, dan
- ❖ tidak digunakan untuk menyembunyikan kerusakan bahan pangan

2.3 Jenis-Jenis Bahan Pengawet

Secara umum bahan pengawet dibedakan menjadi tiga jenis, antara lain :

- ❖ GRAS (*Generally Recognized as Safe*) yang umumnya bersifat alami, sehingga aman dan tidak berefek racun sama sekali. Contohnya adalah Garam, gula, asam cuka, dan bahan pengawet alami lainnya

- ❖ ADI (*Acceptable Daily Intake*), yang selalu ditetapkan batas penggunaan hariannya (*daily intake*) guna melindungi kesehatan konsumen. Contohnya adalah natrium benzoat dan kalium sorbat dan bahan pengawet buatan lainnya.
- ❖ Zat pengawet yang memang tidak layak dikonsumsi karena berbahaya seperti boraks, formalin dan rhodamin B. Formalin, misalnya, bisa menyebabkan kanker paru-paru serta gangguan pada alat pencernaan dan jantung. Sedangkan penggunaan boraks sebagai pengawet makanan dapat menyebabkan gangguan pada otak, hati, dan kulit.

Sementara, berdasarkan aturan dari PERMENKES RI NOMOR 1168/MENKES/PER/X/1999, bahan pengawet dikelompokkan menjadi dua yaitu bahan pengawet yang diperbolehkan dan bahan pengawet yang tidak diperbolehkan. Bahan pengawet yang tidak diizinkan penggunaannya dalam bahan makanan diantaranya adalah formalin, natrium tetraborat, rhodamin B, asam salisilat dan garamnya, dietilpirokarbonat, dulsin, kalium klorat, kloramfenikol, minyak nabati yang dibrominasi, nitrofurazon, dan kalium bromat. Alasan utama dilarangnya penggunaan bahan pengawet tersebut pada makanan adalah karena adanya dampak negatif dan berbahaya bagi kesehatan jika dikonsumsi oleh manusia.

Bahan Pengawet yang diizinkan penggunaannya dalam bahan makanan dibagi menjadi dua kelompok yaitu bahan pengawet alami dan buatan. Contoh bahan pengawet alami antara lain gula, asam cuka dan garam, bahkan akhir-akhir ini, gel lidah buaya yang memiliki kandungan enzim oksidase sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dalam peningkatan daya simpan bahan pangan. Selain itu, kitosan juga mulai banyak dicoba pemanfaatannya sebagai bahan pengawet. Namun bahan pengawet alami masih jarang dimanfaatkan karena disamping harganya relatif lebih mahal dari bahan pengawet buatan, bahan pengawet alami biasanya hanya dapat mengawetkan bahan makanan ataupun minuman dalam jangka waktu yang relatif singkat.

Bahan pengawet buatan dapat dibagi menjadi bahan pengawet organik dan bahan pengawet anorganik. Berikut merupakan contoh-contoh dari bahan pengawet organik maupun anorganik pada makanan dan minuman.

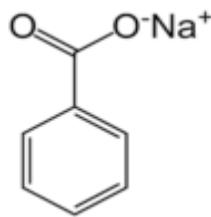
Tabel 2.1 Contoh bahan pengawet organik dan anorganik

Bahan Pengawet Organik	Bahan Pengawet Anorganik
Asam Benzoat	Belerang Dioksida
Asam Propionat	Kalium Bisulfit
Asam Sorbat	Kalium Metabisulfit
Kalium Benzoat	Kalium Nitrat
Kalium Propionat	Kalium Nitrit
Kalium Sorbat	Kalium Sulfit
Kalsium Benzoat	Natrium Bisulfit
Metil-p-hidroksi benzoat	Natrium Metabisulfit
Natrium Benzoat	Natrium Nitrat
Nisin	Natrium Nitrit
Propil-p-hidroksi benzoat	Natrium Sulfit

2.4 Natrium Benzoat

2.4.1 Sifat Fisik dan Kimia Natrium Benzoat

Natrium benzoat atau sodium benzoat memiliki rumus molekul $C_7H_5O_2Na$ dan berat molekul sebesar 144.11 gram/mol serta memiliki titik leleh diatas $300^\circ C$. Natrium benzoat berupa granul atau serbuk hablur berwarna putih, tidak berbau dan stabil di udara. Natrium benzoat sangat larut dalam pelarut air yaitu sekitar 550-630 gram/liter pada $20^\circ C$ dan bersifat higroskopik pada kelembapan relatif diatas 50%. Derajat keasamannya atau pH nya sekitar 7.5 pada konsentrasi 10 gram/liter air. Natrium benzoat juga dapat larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol dan etilen glikol. Rumus struktur dari natrium benzoat dapat dilihat pada gambar 2.1. Padatan natrium benzoat memiliki muatan elektrik yang dapat membentuk campuran eksplosif ketika serpihannya terdispersi dalam udara (WHO, 2000).



Gambar 2.1 Rumus struktur natrium benzoat

2.4.2 Pemanfaatan Natrium Benzoat

Natrium benzoat dibuat dari proses netralisasi asam benzoat dengan natrium hidroksida atau NaOH. Asam benzoat dan garamnya, yaitu natrium benzoat seringkali dimanfaatkan sebagai bahan pengawet pada bahan makanan maupun minuman karena sifatnya yang efektif sebagai agen antimikroba. Namun penggunaan natrium benzoat lebih sering digunakan dibandingkan asam benzoat karena natrium benzoat lebih mudah larut dalam air sekitar 200 kali lebih besar dibandingkan asam benzoat. Selain itu, biasanya penambahan sekitar 0.1% natrium benzoat kedalam bahan makanan ataupun minuman sudah dapat mengawetkan produk- produk tersebut yang berada pada derajat keasamaan sekitar 4.5 atau dibawahnya (WHO, 2000). Pada suasana asam, natrium benzoat dapat berubah menjadi bentuk asamnya yaitu asam benzoat. Mikroba- mikroba dapat tumbuh dengan kehadiran sejumlah konsentrasi asam yang digunakan dalam bahan pengawet pada beberapa nilai pH yang lebih kecil dari nilai pKa bahan pengawet. Pada nilai pH yang rendah (pKa asam benzoat = 4.19), asam benzoat ini berada dalam bentuk tidak terdisosiasi, yaitu bentuk dimana bahan tersebut memiliki potensi menjadi inhibitor bagi pertumbuhan mikroba (Glevitzky M., et al, 2009).

Penggunaan natrium benzoat sebagai bahan pengawet sebagian besar ditemukan pada industri minuman ringan. Natrium benzoat juga digunakan secara luas sebagai bahan pengawet pada produk makanan dan minuman seperti jus buah, kecap, margarin, mentega, minuman ringan, sambal, saus salad, saus tomat, selai, sirup buah, dan lainnya, serta tak jarang digunakan dalam bidang farmasi yaitu sebagai pengawet dalam obat-obatan yang berwujud liquid atau cair. Natrium benzoat secara alami terdapat pada apel, cengkeh, cranberry, kayu manis, dan lain-lain.

2.4.3 Konsentrasi Maksimum Penambahan Natrium Benzoat Ke Dalam Bahan Makanan dan Minuman

Konsentrasi maksimum penggunaan natrium benzoat pada bahan makanan dan minuman berbeda-beda untuk setiap negara. Misalnya di Filipina, penambahan natrium benzoat pada bahan makanan ditetapkan pada 20 mg/ liter hingga 2000 mg/ liter. Lain halnya dengan di Jepang, penambahan natrium benzoat pada bahan makanan dan minuman ditetapkan pada 50 mg/ liter hingga 200 mg/ liter. Sedangkan di Indonesia, penggunaan natrium benzoat sebagai bahan pengawet diatur dalam PERMENKES RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/1988 berdasarkan persetujuan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) yaitu batas maksimum penambahan natrium benzoat pada produk makanan seperti kecap adalah sebesar 600 mg/ kg sementara batas maksimum pada saus adalah sebesar 1000 mg/kg.

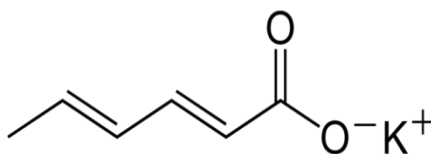
International Programme on Chemical Safety tidak menemukan adanya dampak terhadap kesehatan manusia dengan dosis sebesar 647-825 mg/kg berat badan per hari. Degradasi Sodium Benzoat (yang dihasilkan dalam tubuh dari garam sodium) telah dipelajari secara detail dan menunjukkan bahwa bahan-bahan ini tidak berbahaya. Sekitar 75-80% dikeluarkan dalam jangka waktu 6 jam dan seluruh dosis akan dikeluarkan dari dalam tubuh dalam jangka waktu sekitar 10 jam. Batasan yang ditentukan untuk Sodium Benzoat dalam makanan bukan karena sifat racunnya, melainkan karena jumlahnya melebihi 0.1%, bahan ini dapat meninggalkan rasa tertentu di mulut. Sementara pada penderita asma dan urticaria sangat sensitif terhadap asam benzoat, sehingga jika dikonsumsi dalam jumlah besar dapat mengiritasi lambung.

2.5 Kalium Sorbat

2.5.1 Sifat Fisik dan Kimia Kalium Sorbat

Kalium Sorbat atau potassium sorbat memiliki rumus kimia $C_6H_7O_2K$ dan memiliki berat molekul sebesar 150.22 gram/ mol serta memiliki titik leleh sekitar $270^{\circ}C$. Kalium sorbat berbentuk kristal putih atau berbentuk tepung yang berbau khas. Sama halnya seperti natrium benzoat, kalium sorbat juga memiliki kelarutan yang besar di dalam air yaitu sekitar 58.2% pada suhu $20^{\circ}C$ dan juga

larut dalam pelarut organik seperti etanol dan propilen glikol, namun sukar larut dalam aseton, kloroform, eter dan tidak larut dalam pelarut benzen (WHO, 2000).



Gambar 2.2 Rumus struktur kalium sorbat

Kalium sorbat merupakan garam dari asam sorbat yang merupakan asam lemak monokarboksilat yang berantai lurus dan mempunyai ikatan tidak jenuh. Bentuk yang umum digunakan adalah Na-, Ca- dan K- Sorbat. Tujuan penambahannya adalah untuk mencegah pertumbuhan bakteri, jamur dan kapang (Rimbawan, 2001). Rumus struktur dari kalium sorbat dapat dilihat pada gambar 2.2. Kalium sorbat merupakan suatu asam lemak tak jenuh yang memiliki dua ikatan ganda yang terkonjugasi.

2.5.2 Pemanfaatan Kalium Sorbat

Kalium sorbat adalah suatu garam asam sorbat dan dapat dibuat dari proses netralisasi kalium hidroksida dengan asam sorbat yang merupakan suatu asam karboksilat tak jenuh. Asam sorbat beserta garamnya, seperti kalium sorbat secara luas digunakan pada produk- produk makanan dan minuman sama seperti produk- produk dalam kemasan oleh karena sifat dari asam sorbat dan garamnya yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri, mikroba dan jamur dalam bahan makanan. Namun, penggunaan kalium sorbat lebih umum digunakan sebagai bahan pengawet makanan dan minuman dari pada bentuk asamnya yaitu asam sorbat. Hal ini dikarenakan garam sorbat (kalium sorbat) lebih mudah larut dalam pelarut air dari pada bentuk asamnya. Selain itu, alasan lain yang menyebabkan penggunaan garam sorbat lebih sering digunakan adalah karena garam sorbat efektif bekerja sebagai pengawet makanan dan minuman diatas pH 6.5 tetapi keefektifan ini akan semakin meningkat seiring dengan menurunnya pH. Semakin rendah pH suatu produk makanan atau minuman, maka akan semakin sedikit kalium sorbat yang dibutuhkan untuk proses pengawetan (WHO, 2000).

Penggunaan kalium sorbat ditemukan pada sejumlah produk minuman seperti minuman ringan dan jus buah. Selain itu kalium sorbat juga digunakan secara luas pada produk makanan seperti yogurt, kecap, saus, sambal, keju dan makanan-makanan kemasan kaleng. Sementara pada bidang farmasi, kalium sorbat sering ditemukan pada produk-produk suplemen agar tidak ada mikroba dan jamur yang tumbuh, meningkatkan umur simpan serta digunakan pada jumlah atau konsentrasi yang tepat sehingga tidak menimbulkan efek negatif pada kesehatan.

2.5.3 Konsentrasi Maksimum Penambahan Kalium Sorbat Ke Dalam Bahan Makanan dan Minuman

Sama halnya seperti bahan pengawet lainnya, penambahan kalium sorbat sebagai bahan pengawet ke dalam produk makanan ataupun minuman di Indonesia juga diatur oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) berdasarkan PERMENKES RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/1988 tentang bahan tambahan makanan yang mengizinkan penambahan kalium sorbat pada batasan maksimum sebesar 600 mg/ kg untuk produk kecap dan 1000 mg/ kg untuk saus.

Kalium sorbat dapat dikategorikan sebagai pengawet makanan yang tidak terlalu berbahaya bagi kesehatan karena pada dasarnya garam sorbat tergolong non toksik sehingga aman untuk dikonsumsi. Namun penambahan kalium sorbat pada konsentrasi yang berlebihan dapat memberikan efek negatif bagi kesehatan karena karakter sintetikanya yang tidak terlalu familiar oleh para ahli. Efek negatif yang dapat ditimbulkan dari konsumsi kalium sorbat berlebihan pada bahan makanan diantaranya dapat memicu terjadinya alergi, diare hingga hilangnya nutrisi pada makanan itu sendiri. Sementara paparan berlebihan terhadap garam sorbat ataupun asam sorbat dapat menyebabkan iritasi kulit dan mata sehingga bahan- bahan pengawet tersebut harus digunakan secara hati-hati.

2.6 Validasi Metode Analisis

Validasi metoda analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. (Harmita, 2004). Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi

bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya. Terdapat beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diantaranya adalah :

2.6.1 Linearitas dan Rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon sebanding terhadap konsentrasi analit dalam sampel (WHO, 1992). Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit.

2.6.2 Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan atau *accuracy* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (WHO, 1992). *Accuracy* dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. *Accuracy* dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi dan metode penambahan baku (*standard addition method*), namun yang paling sering dilakukan adalah metode penambahan baku karena relatif lebih mudah dilakukan.

Pada metode adisi (penambahan baku), sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit atau standar yang akan diperiksa ditambahkan ke dalam sampel untuk dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar analit/standar yang sebenarnya. Persen *recovery* dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Biasanya persyaratan untuk *recovery* adalah tidak boleh lebih dari 5%. Berikut ini merupakan persamaan untuk mencari persen *recovery*.

$$\% Recovery = \frac{C_b - C_a}{C_a^*} \times 100\% \quad (2.1)$$

Dimana, C_b = konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan analit

C_a = konsentrasi sampel sebelum penambahan sejumlah analit

C_a^* = konsentrasi analit yang ditambahkan

2.6.3 Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan atau *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 (WHO, 1992). Presisi ditentukan dengan parameter standar deviasi relatif (RSD) dengan persamaan sebagai berikut :

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2.2)$$

dimana, RSD = standar deviasi relatif

SD = standar deviasi

\bar{x} = kadar rata-rata natrium benzoat dan kalium sorbat

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) kurang dari atau sama dengan 2%. Uji presisi terdiri dari *repeatability* (keterulangan) dan *reproducibility* (ketertiruan).

- ❖ *Repeatability* (keterulangan) : adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek.
- ❖ *Reproducibility* (ketertiruan) : adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula.

2.6.4 Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (WHO, 1992). Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa campuran senyawa yang dianalisis dengan membandingkan waktu retensinya. Senyawa tersebut akan terpisah karena adanya perbedaan sifat dari masing-masing.

2.6.5 Batas Deteksi (*Limit Of Detection*) dan Batas Kuantisasi (*Limit Of Quatification*)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas (WHO, 1992). Batas kuantisasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Cara menentukan limit deteksi dan limit kuantisasi adalah sebagai berikut :

$$\text{Limit Deteksi (LOD)} = \frac{3 \times SB}{\text{slope}} \quad (2.3)$$

$$\text{Limit Kuantisasi (LOQ)} = \frac{10 \times SB}{\text{slope}} \quad (2.4)$$

dimana SB = simpangan baku

$$SB = \sqrt{\frac{\sum(Y - Y_i)^2}{n-2}} \quad (2.5)$$

LOD dan LOQ dari suatu sistem analisis tergantung kepada *noise* dan deteksi oleh instrumen. LOD tidak hanya tergantung pada detektor saja tetapi juga tergantung pada kehadiran oksigen di dalam fasa gerak, sistem penginjeksian, peak yang melebar pada kolom dan perbedaan temperatur diantara komponen-komponen dalam sistem.

2.6.6 Ketangguhan Metode (*Ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji (WHO, 1992).

2.6.7 Kekuatan (*Robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. Sebagai contoh, perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan prosedur HPLC dapat mencakup (tapi tidak dibatasi) perubahan komposisi organik fase gerak, pH fase gerak dan perubahan temperatur kolom (WHO, 1992).

2.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

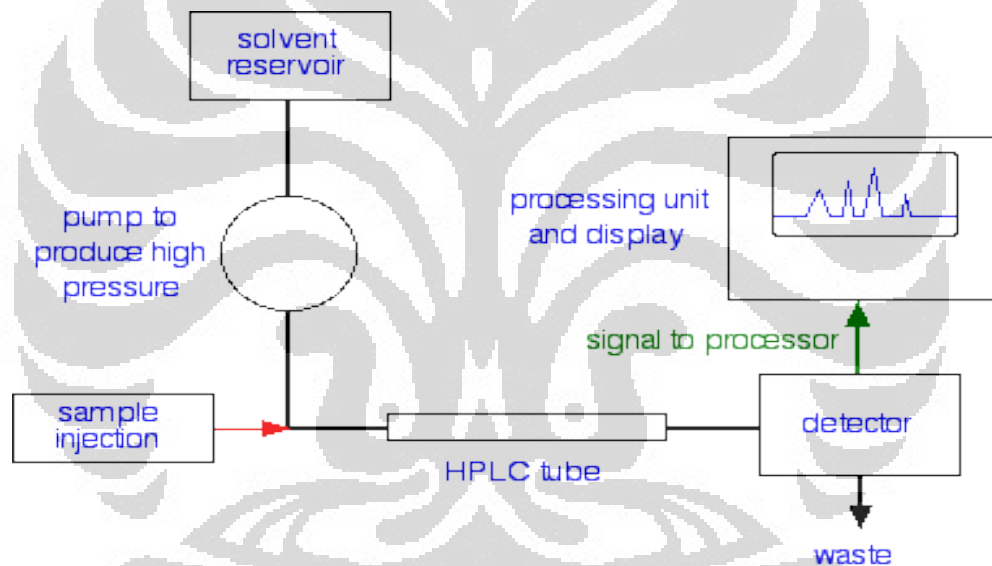
Kromatografi merupakan teknik analisis yang telah banyak digunakan dan dikembangkan saat ini karena keunggulan yang dimilikinya dalam metode pemisahan berbagai senyawa. Ada berbagai macam jenis kromatografi, mulai dari gas kromatografi hingga kromatografi cair. Jenis kromatografi didasarkan pada jenis fasa geraknya dan HPLC merupakan salah satu jenis kromatografi cair karena fasa geraknya berupa zat cair.

Proses pemisahan pada kromatografi gas ataupun cair didasarkan pada distribusi dua senyawa atau lebih di antara dua fasa yaitu fasa diam (stasioner) dan fasa gerak (mobil). Fasa diam merupakan bahan isian dari kolom tempat dimana sampel akan dipisahkan. Fasa diam pada instrumen HPLC dapat berupa partikel padatan berpori ataupun permukaan bahan aktif dalam bentuk partikel kecil atau lapisan film tipis. Sementara fasa geraknya bermacam macam mulai dari pelarut tunggal ataupun campuran dua atau lebih pelarut. HPLC memiliki keunggulan dibandingkan kromatografi cair lainnya (Sunardi, 2010), diantaranya adalah :

- ❖ Kolom HPLC dapat dipakai berulang kali tanpa diregenerasi
- ❖ Tercapainya pemisahan yang memuaskan pada kolom
- ❖ Peralatan HPLC dapat dioperasikan secara otomatis dan kuantitatif
- ❖ Waktu analisis yang relatif singkat
- ❖ Untuk keperluan preparatif dapat dilakukan dalam skala besar

2.7.1 Skema Instrumen HPLC dan Parameter Pemisahan

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam. Berikut ini merupakan skema peralatan HPLC.



Gambar 2.3 Skema sederhana instrumen HPLC

(sumber: HPLC Kromatograf Cair Kinerja Tinggi. <https://lansida.blogspot.com> diakses tanggal 13 September 2011)

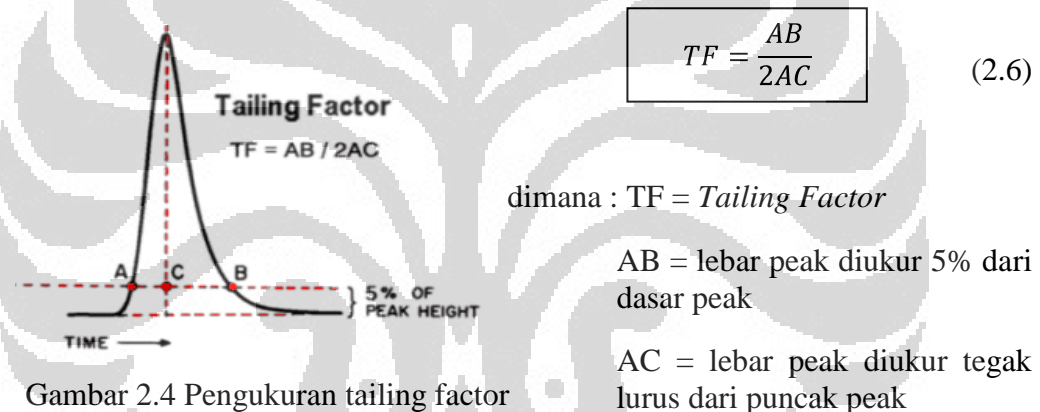
Pada teknik kromatografi, terdapat beberapa parameter atau faktor penting yang dapat menentukan baik atau tidaknya hasil pemisahan senyawa-senyawa di dalam sampel uji, parameter-parameter tersebut antara lain :

2.7.1.1 Waktu retensi (t_r)

Waktu retensi didefinisikan sebagai sebagai waktu yang diperlukan untuk membawa keluar suatu komponen dari dalam kolom kromatografi. Waktu retensi biasanya digunakan untuk menentukan kuat lemahnya interaksi analit di dalam kolom kromatografi.

2.7.1.2 Tailing factor (*Peak Tailing*)

Tailing factor berhubungan dengan kesimetrisan dari peak yang dihasilkan dalam kromatogram (Dolan J.W., 2002). *Tailing factor* biasanya diukur berdasarkan faktor keasimetrisan yang nantinya konversikan menjadi faktor tailing. *Tailing factor* dapat dinyatakan melalui persamaan sebagai berikut :



Gambar 2.4 Pengukuran tailing factor

(Sumber: *Tailing Factor*. www.lcresources.com. diakses: 10 november)

Semakin kecil nilai *tailing factor* maka semakin simetris peak yang dihasilkan dan semakin baik pemisahan yang dihasilkan.

2.7.1.3 Selektifitas (α)

Selektifitas merupakan besaran yang menunjukkan pemisahan relatif antara dua puncak dalam suatu kromatogram. Selektifitas sangat berhubungan dengan efisiensi dari kolom kromatografi. Kolom dinyatakan baik jika cukup selektif artinya mampu menahan berbagai komponen dengan kekuatan yang cukup berbeda. Agar terjadi pemisahan yang baik maka nilai selektivitas (α) harus lebih besar daripada 1, dimana semakin besar nilai α maka pemisahannya akan semakin baik. Selektifitas sangat ditentukan oleh

faktor retensi dari masing-masing komponen dalam suatu campuran. Berikut ini merupakan persamaan untuk menentukan besarnya nilai selektifitas.

$$\alpha = \frac{t_{r2}}{t_{r1}} \quad (2.7)$$

Dimana, α = selektifitas

t_{r1} = waktu retensi komponen 1

t_{r2} = waktu retensi komponen 2

Bila nilai α bernilai 1 maka dua komponen dalam suatu campuran tidak dapat dipisahkan karena waktu retensi kedua komponen dalam campuran bernilai sama. Nilai α dapat diatur dengan cara, mengubah fasa gerak (misalnya dengan memperbesar polaritas), mengubah fasa diam, dan mengubah temperatur, karena pada umumnya kenaikan temperatur akan memperkecil waktu retensi.

2.7.1.4 Jumlah pelat teoritis (N) dan nilai HETP

Jumlah pelat teoritis (N) dinilai dengan mengukur derajat ketajaman dari puncak kromatogram yang didapatkan. Nilai N yang tinggi menandakan proses *packing* pada kolom yang lebih baik, panjang kolom serta kondisi aliran fasa gerak yang optimum. Kolom dengan nilai efisiensi yang tinggi berarti dapat memisahkan campuran yang terdiri atas komponen yang memiliki faktor pemisahan atau nilai selektifitas (α) yang mirip.

HETP (*Height Equivalent to Theoretical Plate*) adalah tinggi ekuivalen dari pelat teoritis. Semakin kecil nilai HETP maka pemisahan komponen-komponen dalam campuran akan semakin baik. Nilai HETP dapat diperkecil dengan menambah jumlah pelat teoritis. Berikut ini merupakan persamaan yang menggambarkan hubungan antara HETP dengan N.

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (2.8)$$

Dimana, N= jumlah pelat teoritis

L= panjang kolom

2.7.1.5 Resolusi (R)

Keterpisahan antara dua puncak kromatogram dinyatakan dengan resolusi (R), yaitu ukuran besar kecilnya pemisahan. Nilai resolusi dari dua puncak tergantung pada nilai selektifitas (α), jumlah pelat teoritis (N) dan faktor retensi (K). Jika nilai $R \geq 1,5$ maka pemisahan senyawa-senyawa dalam campuran dapat memberikan hasil yang baik (Dolan J.W, 2002).

Resolusi dapat dinyatakan dengan persamaan sebagai berikut :

$$\frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_1 + W_2} \quad (2.9)$$

Dimana, t_{r2} = waktu retensi komponen 2

t_{r1} = waktu retensi komponen 1

W_1 = lebar puncak komponen 1

W_2 = lebar puncak komponen 2

2.7.2 Kolom dan Fasa Diam

Kolom merupakan tempat dilakukannya pemisahan terhadap komponen-komponen dalam suatu campuran atau tempat berlangsungnya proses pemisahan analit. Ada dua jenis kolom pada HPLC yaitu kolom konvensional (kolom standar) yang pada umumnya memiliki diameter internal sekitar 4-5 mm dan panjang sekitar 10-25 cm. Sedangkan kolom lainnya adalah *narrow-bore column* (kolom mikrobor) yang memiliki diameter internal lebih kecil dibandingkan kolom standar yaitu sekitar 2mm dengan panjang sekitar 20-50 cm (Angelika, 2001).

Fasa diam merupakan bahan isian dari kolom kromatografi. Sifat bahan pengisi dalam kolom bervariasi. Variasi fasa diam yang banyak digunakan dapat berdasarkan partikel yang *porous* dan *nonporous*. Kebanyakan fasa diam pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi oleh gugus fungsional. Permukaan silika adalah polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen dimana reagen-reagen ini nantinya akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional yang lain.

Oktadesil silika (ODS atau C18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar. Silika-silika aminopropil dan sianopropil (nitril) lebih cocok sebagai pengganti silika yang tidak dimodifikasi. Silika yang tidak dimodifikasi akan memberikan waktu retensi yang bervariasi disebabkan karena adanya kandungan air yang digunakan. Modifikasi silika pada kolom dan aplikasinya dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Modifikasi silika pada kolom serta aplikasinya

Kolom	Pelarut	Aplikasi
C ₁₈	asetonitril, metanol, air	non polar umum
C ₈	asetonitril, metanol, air	non polar umum
NH ₂	asetonitril, metanol, air, THF, CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂	anion
CN	asetonitril, metanol, air, THF	keton, aldehid
Phenyl	asetonitril, metanol, air	asam lemak, ikatan rangkap
Diol	asetonitril, metanol, air, THF, garam buffer	protein
SAX	asetonitril, metanol, air, garam buffer	anion
SCX	asetonitril, metanol, air, garam buffer	kation
SI	hexane, mehylene chloride, chloroform	organik polar, isomer fungsi

[Sumber : Ramos, 2009, p.21]

2.7.2.1 Mekanisme pemisahan

Fasa diam HPLC dapat diklasifikasikan berdasarkan mekanisme pemisahan molekul-molekul oleh fasa diam. Mekanisme tersebut antara lain fasa terbalik, fasa normal, fasa penukar ion dan yang terakhir adalah pasangan ion (Angelika, 2001).

Saat ini, jenis fasa yang paling sering digunakan sebagai fasa diam adalah fasa terbalik (*reverse phase*) dimana pemisahan dapat tercapai melalui partisi dan melalui adsorpsi oleh gugus silanol yang tak terlindungi. Pada kromatografi fasa terbalik, fasa diam (stasioner) bersifat non polar atau kurang polar dibandingkan fasa geraknya sehingga analit dapat ditahan sampai fasa gerak (pelarut) yang cukup polar melusinya keluar kolom.

2.7.3 Fasa Gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk jenis elusi, secara umum ada dua jenis tipe elusi, yaitu elusi isokratik dan elusi gradien. Elusi isokratik merupakan aliran fasa gerak yang konstan selama elusi analit berlangsung sedangkan elusi gradien adalah aliran fasa gerak yang berubah-ubah yang diatur selama elusi analit berlangsung.

Dalam pemilihan fasa gerak (Meyer, F.R., 2004), ada beberapa faktor yang perlu diperhatikan diantaranya adalah :

- ❖ fasa gerak tidak berinteraksi dengan fasa diam
- ❖ fasa gerak memiliki kemurnian yang tinggi
- ❖ toksisitas yang rendah
- ❖ relatif murah dan mudah didapat

Sebelum fasa gerak digunakan maka harus dilakukan “*degasing*” untuk mengeluarkan gas terlarut yang tidak diinginkan. Adanya gas dalam pelarut kemungkinan dapat bereaksi dengan fasa gerak atau fasa stasionernya selain itu dapat mengganggu kerja detektor (Angelika, 2001).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- ❖ Seperangkat instrumen HPLC lengkap (Shimadzu DGU-20 A₃) dengan pompa prominence (LC-20 AB Liquid chromatograph), degasser (DGU 20 AS), injektor (Rheodyne 7225i), kolom shimpac VP-ODS (4,6 mm x 250 mm), Shimadzu Degasser (DGU-20A₅), Shimadzu Column Oven (CTO-10 AS vp), Prominence UV/Vis detector (SPD-20A)
- ❖ Pompa vakum
- ❖ Ultrasonicator (Branson 2510)
- ❖ pH meter (Metrohm)
- ❖ syringe 100 µl (SGE)
- ❖ Neraca analitik (mettler Toledo)
- ❖ Cellulose nitrat membran filter (Whattman No 42)
- ❖ Peralatan gelas seperti beaker glas, labu ukur, pipet ukur, gelas ukur, dan lain-lain.

3.1.2 Bahan-bahan

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- ❖ kalium sorbat (C₆H₇O₂K)
- ❖ natrium benzoat (C₇H₅O₂Na)
- ❖ dikaliumhidrogenfosfat (K₂HPO₄)
- ❖ kaliumdihidrogenfosfat (KH₂PO₄)
- ❖ asam fosfat (H₃PO₄)
- ❖ ammonium asetat (CH₃COONH₄)
- ❖ asam asetat glasial (CH₃COOH glasial)

- ❖ Metanol p.a
- ❖ Aquabides
- ❖ Berbagai macam merek kecap, dan saus yang beredar di pasaran

3.2 Kondisi Kromatografi

Kondisi kromatografi pada instrumen HPLC pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- ❖ Detektor : UV-Vis detector (SPD 20 A)
- ❖ panjang gelombang : 225 nm dan 254 nm
- ❖ Kolom : kolom shimpac VP-ODS (4,6 mm x 250 mm)
- ❖ Fasa gerak : campuran metanol-buffer fosfat pH 6.8 dan 4.5 serta metanol- buffer ammonium asetat pH 4.5 berbagai komposisi
- ❖ Aliran : elusi isokratik
- ❖ Injeksi sampel : 20 μ L
- ❖ Temperatur kolom : 25 $^{\circ}$ C
- ❖ Laju aliran : 0.8 mL/min dan 1.0 mL/min
- ❖ Waktu analisis : \pm 20 menit

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Preparasi Fase Gerak

3.3.1.1 Buffer Fosfat pH 6.8

Preparasi buffer fosfat pH 6,8 dilakukan dengan menimbang padatan K_2HPO_4 sebesar 0.8709 gram dan padatan KH_2PO_4 sebesar 0.7074 gram di dalam botol timbang. Kedua padatan tersebut kemudian dilarutkan dengan aquabides di dalam labu 1 L hingga tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen. Buffer fosfat selanjutnya di saring dan dilakukan degassing selama kurang lebih 20 menit untuk menghilangkan gas-gas terlarut.

3.3.1.2 Buffer Fosfat pH 4.5

Preparasi buffer fosfat pH 4.5 dilakukan dengan menimbang padatan KH_2PO_4 sebesar 0.7074 gram di dalam botol timbang. Padatan tersebut kemudian dilarutkan dengan aquabides di dalam labu 1 L hingga tepat tanda batas. Selanjutnya tambahkan H_3PO_4 pekat hingga pH larutan menjadi 4.5. Buffer fosfat selanjutnya di saring dan dilakukan degassing selama kurang lebih 20 menit untuk menghilangkan gas-gas terlarut.

3.3.1.3 Buffer Ammonium Asetat pH 4.5

Preparasi buffer ammonium asetat pH 4.5 dilakukan dengan menimbang padatan $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ sebesar 3.840 gram di dalam botol timbang. Kemudian padatan tersebut dilarutkan dengan aquabides di dalam labu 1 L hingga tepat tanda batas labu, selanjutnya ditambahkan asam asetat glasial hingga pH mencapai 4.5 dan dikocok hingga homogen. Buffer ammonium asetat selanjutnya di saring dan dilakukan degassing selama kurang lebih 20 menit untuk menghilangkan gas-gas terlarut.

3.3.1.4 Fase gerak Metanol

Metanol p.a disaring dengan menggunakan membran filter whatmann No.42 untuk menghilangkan gelembung yang mungkin dapat mempengaruhi kolom HPLC.

3.3.2 Preparasi Larutan Induk Baku Natrium Benzoat (LIB NB)

Larutan induk baku natrium benzoat 500 ppm dibuat dengan cara menimbang natrium benzoat sebesar 0.05 gram dan dilarutkan dengan aquabides dalam labu ukur 100 mL hingga tepat tanda batas.

3.3.3 Preparasi Larutan Induk Baku Kalium Sorbat (LIB KS)

Larutan induk baku kalium sorbat 500 ppm dibuat dengan cara menimbang kalium sorbat sebesar 0.05 gram dan dilarutkan dengan aquabides dalam labu ukur 100 mL hingga tepat tanda batas.

3.3.4 Preparasi Larutan Standar Natrium Benzoat

Larutan standar natrium benzoat 0.05 ppm hingga 450 ppm dibuat dengan cara pengenceran bertahap dengan menggunakan larutan induk baku natrium benzoat.

3.3.5 Preparasi Larutan Standar Kalium Sorbat

Larutan standar kalium sorbat 0.05 ppm hingga 450 ppm dibuat dengan cara pengenceran bertahap dengan menggunakan larutan induk baku kalium sorbat.

3.3.6 Persiapan Instrumen HPLC

Kolom yang digunakan pada penelitian ini adalah Shimpac VP-ODS (4.6 mm x 250 mm), dan detektor UV-Vis. Pompa yang digunakan merupakan mode aliran tetap atau elusi isokratik untuk memperoleh komposisi fase gerak yang konstan selama analisis. Detektor diatur pada panjang gelombang 225 nm dan 254 nm berturut-turut sebagai panjang gelombang yang memberikan absorbansi atau serapan maksimum untuk natrium benzoat dan kalium sorbat. Sementara suhu kolom diatur pada suhu ruang yaitu 25°C.

Pertama-tama Instrumen HPLC dipersiapkan dengan melakukan *purging* terhadap kolom HPLC guna menghilangkan sisa-sisa eluen yang masih terdapat pada kolom. Setelah *purging*, maka dilanjutkan dengan *pumping* terhadap eluen atau fasa gerak selama kurang lebih 40 menit hingga diperoleh *baseline* detektor serta *baseline pump* yang datar, menandakan bahwa sistem telah stabil dan instrumen HPLC siap digunakan untuk analisis.

3.3.7 Optimasi Kondisi Kromatografi

Kondisi kromatografi diatur sedemikian rupa dengan cara memvariasikan beberapa parameter guna mendapatkan kondisi optimum pemisahan kedua bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat. Adapun parameter-parameter tersebut antara lain adalah jenis fasa gerak, komposisi serta laju alir fasa gerak yang digunakan.

Jenis fasa gerak yang divariasikan merupakan campuran dari metanol dan buffer, dimana buffer yang digunakan terdiri dari 3 jenis yaitu buffer fosfat pH 6.8 dan pH 4.5 serta buffer ammonium asetat yang diatur pH nya pada 4.5. Sementara

komposisi fasa gerak (metanol : buffer) juga difariasikan pada (40:60) ; (35:65) ; (25:75) ; (20:80) dan (15:85) dimana masing masing komposisi dijalankan sebanyak dua kali pengulangan dengan menggunakan laju aliran 0.8 mL/menit dan 1.0 mL/menit. Kondisi optimum kromatografi yang terpilih merupakan kondisi yang akan menghasilkan hasil pemisahan kedua bahan pengawet dengan baik dengan waktu retensi yang relatif singkat, pelat teoritis yang optimal, HETP minimum serta faktor pemisahan yang lebih besar dari 1.

3.3.8 Validasi Standar

3.3.8.1 Linearitas

Linearitas natrium benzoat dan kalium sorbat dilakukan dengan membuat deret standar dari masing masing larutan standar berbagai konsentrasi. Masing-masing konsentrasi larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat ditentukan sebanyak 6 kali pengulangan sehingga diperoleh persamaan garis lurus dengan $R^2 > 0,996$.

3.3.8.2 Akurasi

Akurasi terhadap kedua bahan pengawet dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku atau spiking. Sejumlah larutan standar natrium benzoat 40 ppm ditambahkan kedalam sampel terpilih lalu dianalisa kembali kadarnya. Hal yang sama juga dilakukan pada larutan standar kalium sorbat 40 ppm dan ditentukan kembali kadarnya setelah penambahan standar. Akurasi ditentukan dengan menghitung persen perolehan kembali (% *recovery*) guna mengetahui persen analit yang ditambahkan dimana persyaratan untuk % *recovery* adalah tidak boleh lebih dari 5%.

3.3.8.3 Presisi

Uji presisi dilakukan terhadap masing-masing larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat. Nilai presisi akan diwakilkan oleh nilai simpangan deviasi (SD) dan persen simpangan deviasi relatif (%RSD) dari keterulangan atau repeatability masing- masing deret standar yang diukur pada suatu konsentrasi dengan multi replikasi (6 kali pengulangan).

3.3.8.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi dilakukan terhadap larutan standar dengan batasan konsentrasi yang lebih luas yaitu dari 0.05 ppm hingga 450 ppm. Dari deret standar yang diukur kemudian ditentukan konsentrasi terkecil dimana natrium benzoat dan kalium sorbat masih dapat terdeteksi dengan baik oleh instrumen dan masih dapat memberikan respon seksama.

3.3.9 Pengujian Sampel

3.3.9.1 Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif terhadap sampel dilakukan dengan membandingkan hasil analisa waktu retensi dari masing-masing sampel kecap, saus dan sambal yang akan diuji dengan waktu retensi larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat.

3.3.9.2 Analisis Kuantitatif

Masing- masing sampel yang akan diuji kadarnya ditimbang sebanyak 10 gram dan dilarutkan dengan pelarut (fasa gerak dengan komposisi tertentu yang menghasilkan kondisi optimal pemisahan kedua bahan pengawet) di dalam labu 50 mL hingga tepat tanda batas lalu kocok selama kurang lebih 10 menit. Kemudian dilakukan pengambilan 2.5 mL dari sampel yang telah diencerkan tersebut dan diencerkan kembali dengan pelarut dalam labu 25 mL . Masing- masing sampel yang telah dilarutkan kemudian disaring dengan membran filter 0.45 μm untuk menghilangkan padatan-padatan lain yang tidak diinginkan agar tidak mempengaruhi kolom kromatografi.

Setelah itu masing-masing sampel diinjeksikan kedalam sistem HPLC dan diukur luas peak dari natrium benzoat dan kalium sorbat kemudian dilakukan perhitungan dengan menggunakan persamaan garis dari kurva linearitas untuk menentukan kadar dari natrium benzoat dan kalium sorbat yang terkandung dari masing- masing sampel.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemisahan Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat

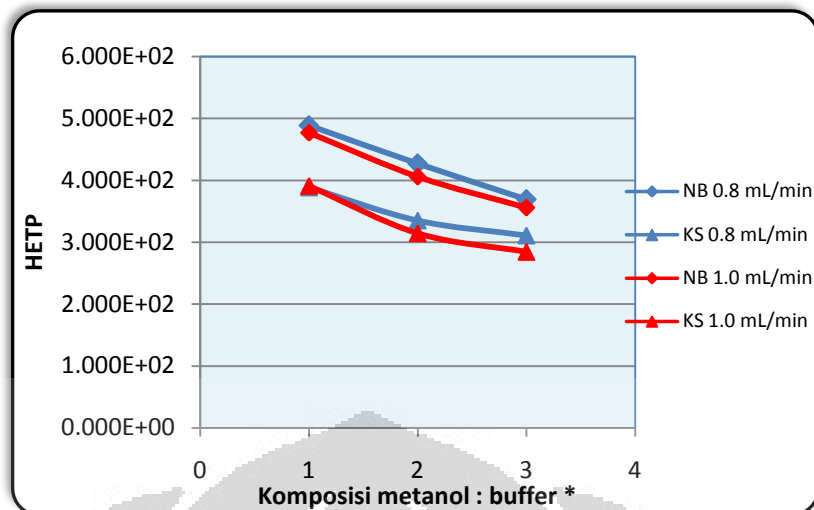
Pemisahan kedua bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat berdasarkan percobaan yang telah dilakukan menghasilkan pemisahan yang baik pada kolom C18. Berdasarkan analisa yang dilakukan pada larutan standar yang mengandung campuran natrium benzoat dan kalium sorbat, diamati bahwa natrium benzoat akan terelusi lebih dulu dibandingkan dengan kalium sorbat. Hal ini terjadi karena natrium benzoat memiliki kepolaran yang lebih besar dari pada kalium sorbat. Perbedaan proses elusi pada campuran natrium benzoat dan kalium sorbat yang disebabkan oleh perbedaan kepolaran juga menyebabkan terjadinya perbedaan waktu retensi diantara kedua bahan pengawet tersebut sehingga waktu retensi natrium benzoat lebih kecil dari pada waktu retensi kalium sorbat.

Sementara itu, adanya perbedaan interaksi kedua analit di dalam kolom C18 juga disebabkan oleh pengaruh komposisi fasa gerak serta pH dari buffer yang digunakan sebagai campuran fasa gerak. Dalam hal ini waktu retensilah yang dapat digunakan sebagai parameter untuk melihat kuat lemahnya interaksi yang dihasilkan diantara analit dengan fasa diam.

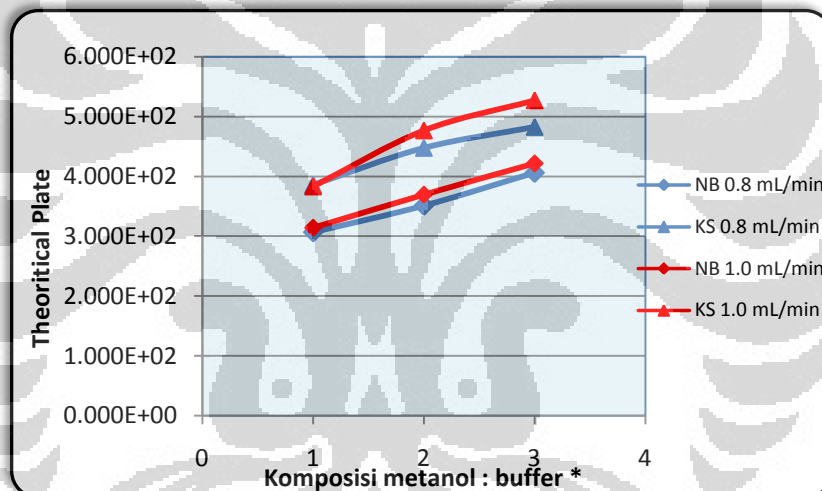
4.2 Optimasi Kondisi Kromatografi

4.2.1 Optimasi Dengan Eluen Metanol : Buffer Fosfat pH 4.5

Ketika dilakukan analisa pemisahan kedua bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat dengan menggunakan campuran fasa gerak metanol dan buffer fosfat pH 4.5 berbagai komposisi, diamati bahwa pemisahan terbaik dari kedua bahan pengawet dengan nilai HETP minimum dan jumlah pelat (N) yang maksimum diperoleh pada laju fasa gerak 1.0 mL/min dengan komposisi metanol : buffer (25:75) seperti yang dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2.



Gambar 4.1 Grafik hubungan nilai HETP dengan komposisi fasa gerak



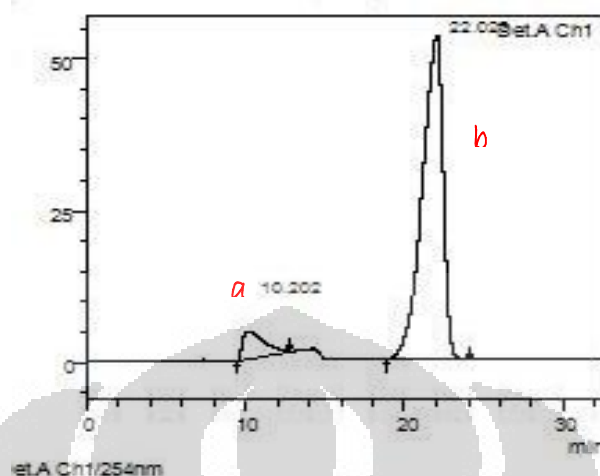
Gambar 4.2 Grafik hubungan jumlah pelat dengan komposisi fasa gerak

Keterangan : *) Komposisi metanol : buffer

- 1 = (40:60)
- 2 = (35:65)
- 3 = (25:75)
- NB = Natrium Benzoat
- KS = Kalium Sorbat

Tailing factor saat komposisi metanol : buffer (25:75) dan laju alirnya 1.0 mL/min juga bernilai minimum yaitu sebesar 0.679 untuk natrium benzoat dan 0.821 untuk kalium sorbat (ada pada lampiran 1). Komposisi metanol sebagai pelarut organik juga relatif kecil, sehingga pemisahan kedua bahan pengawet pada komposisi fasa gerak seperti ini dan pada laju alir 1.0 mL/min memberikan hasil

pemisahan yang cukup baik seperti yang dapat dilihat pada kromatogram dibawah ini.



Gambar 4.3 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 4.5 (25:75) pada laju 1.0 mL/min.

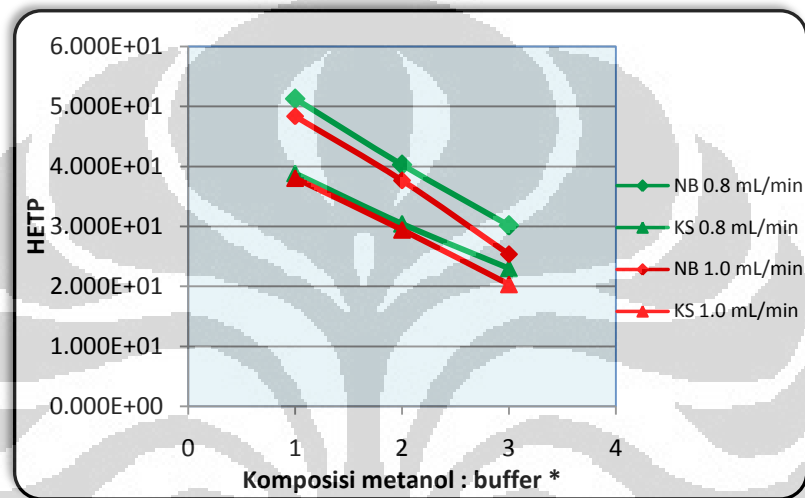
Keterangan : a : Natrium Benzoat b : Kalium Sorbat

Namun waktu retensi atau waktu terelusinya kedua bahan pengawet yang cukup lama yaitu menit ke-10 untuk natrium benzoat dan menit ke-22 untuk kalium sorbat menjadikan metode ini kurang efektif. Berdasarkan hasil analisa yang diperoleh dengan menggunakan eluen berupa campuran metanol dan buffer fosfat pH 4.5 teramati bahwa waktu elusi kedua bahan pengawet semakin bertambah dengan meningkatnya komposisi buffer fosfat. Hal ini terjadi karena pengaruh dari pH buffer fosfat yang rendah dan juga jumlah komposisi buffer yang digunakan sebagai campuran fasa gerak.

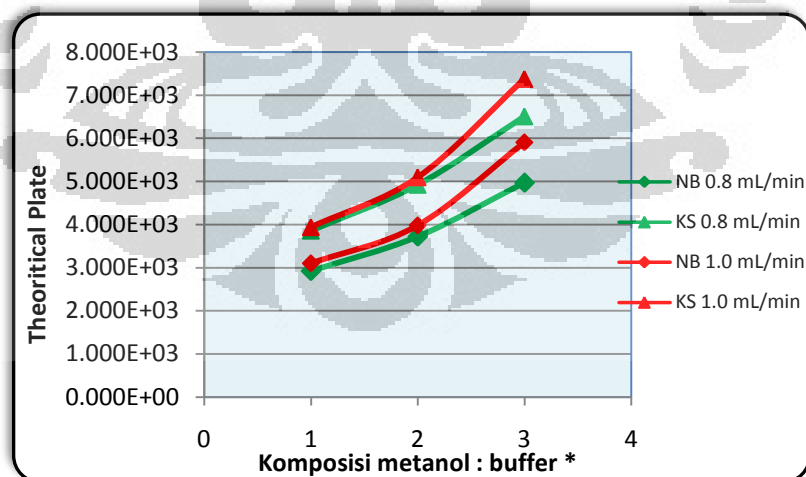
Pengaruh pH eluen yang sangat asam menyebabkan natrium benzoat dan kalium sorbat sebagian besar berubah menjadi bentuk asamnya. Pada bentuk asamnya, kedua bahan pengawet akan berinteraksi lebih kuat dengan gugus silanol pada permukaan fasa diam. Selain itu, pH fasa gerak yang asam membuat kedua bahan pengawet tersebut sulit untuk terionisasi sehingga retensi di dalam kolom C18 semakin kuat. Oleh sebab itulah, semakin banyak komposisi buffer yang digunakan maka interaksi kedua analit dengan fasa diam akan semakin kuat sehingga waktu retensi kedua analit juga semakin bertambah.

4.2.2 Optimasi Dengan Eluen Metanol : Buffer Asetat pH 4.5

Proses pemisahan kedua bahan pengawet dengan menggunakan campuran eluen metanol dan buffer asetat pH 4.5 berbagai komposisi menghasilkan pemisahan yang cukup baik pada laju fasa gerak 1.0 mL/min dengan komposisi metanol : buffer (25:75). Nilai HETP yang minimum dan jumlah pelat (N) yang maksimum seperti yang dapat dilihat pada gambar 4.4. dan 4.5 membuat kondisi analisa ini menjadi kondisi optimum.



Gambar 4.4 Grafik hubungan nilai HETP dengan komposisi fasa gerak



Gambar 4.5 Grafik hubungan jumlah pelat dengan komposisi fasa gerak

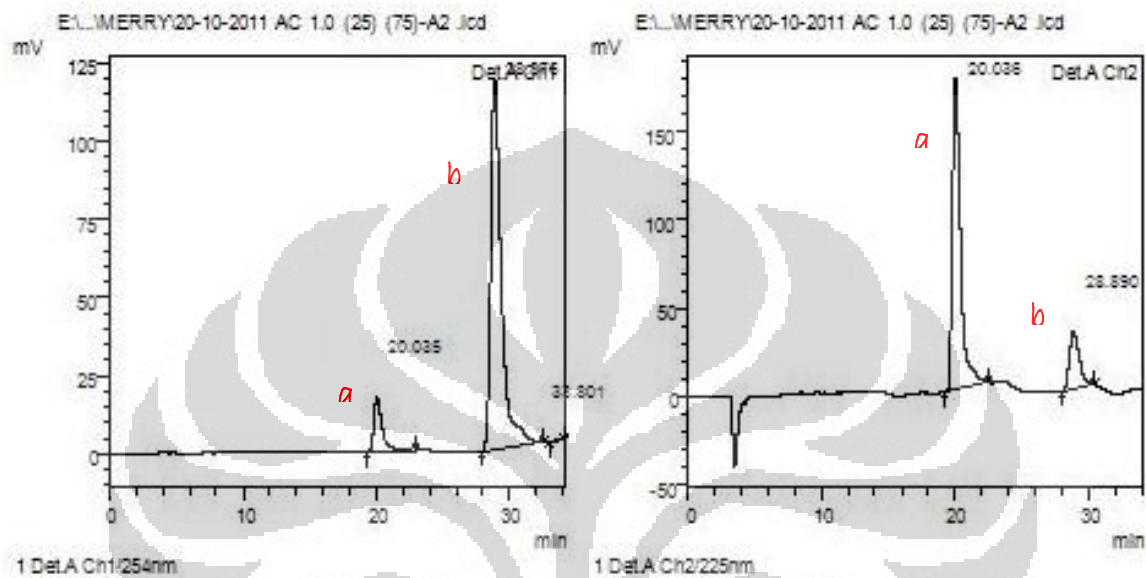
Keterangan : *) Komposisi metanol : buffer

- 1 = (40:60) NB = Natrium Benzoat
- 2 = (35:65) KS = Kalium Sorbat
- 3 = (25:75)

Universitas Indonesia

Nilai *tailing factor* kedua bahan pengawet yang juga minimum yaitu sebesar 1.953 untuk natrium benzoat dan 1.959 untuk kalium sorbat (ada pada lampiran 2) menghasilkan peak yang cukup simetris seperti dapat dilihat pada kromatogram dibawah ini.

<Chromatogram>



<Results>

Gambar 4.6 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm (kiri) dan 225 nm (kanan) dengan eluen metanol: buffer asetat pH 4.5 (25:75) pada laju 1.0 mL/min.

Keterangan : a : Natrium Benzoat b : Kalium Sorbat

Namun waktu retensi atau waktu elusi kedua analit dari dalam kolom jauh lebih besar dibandingkan dengan menggunakan buffer fosfat pH 4.5 dimana natrium benzoat terelusi pada menit ke-20 sedangkan kalium sorbat terelusi di menit ke- 28. Waktu retensi yang besar membuat kondisi analisa ini tidak efektif dan efisien sehingga tidak dipilih menjadi kondisi optimal kromatografi.

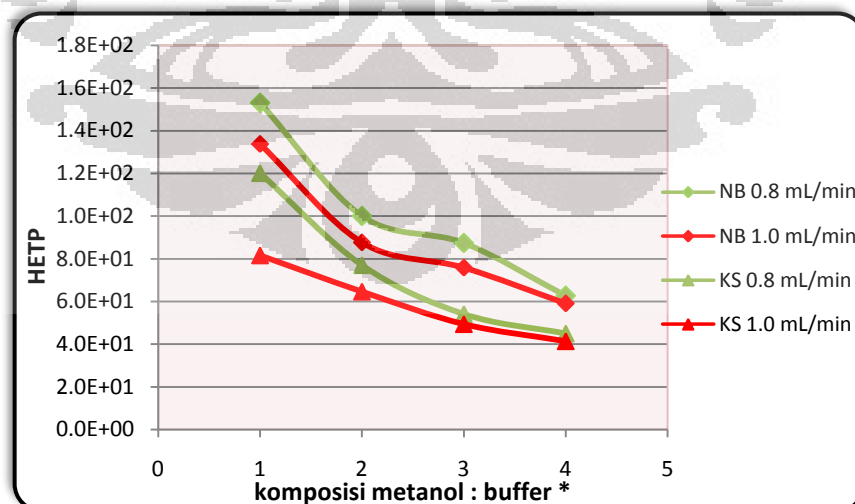
Waktu elusi kedua bahan pengawet dipengaruhi oleh pH fasa gerak yang cukup asam serta komposisinya yang lebih besar dibandingkan dengan komposisi pelarut organik yang digunakan. Buffer asetat pH 4.5 sebagai campuran fasa gerak memberikan pengaruh yang besar terhadap daya elusi kedua analit di dalam kolom. Sifat fasa gerak yang cukup asam cenderung menekan atau menghambat ionisasi analit di dalam kolom C18. Selain itu pada kondisi yang asam, kedua

analit akan berubah menjadi bentuk asamnya yang kurang polar dibandingkan bentuk garamnya. Hal ini mengakibatkan kedua bahan pengawet lebih terikat semakin kuat dengan gugus silanol yang memang bersifat asam sehingga kemampuan elusi oleh fasa gerak semakin menurun dengan berkurangnya komposisi metanol sebagai campuran fasa gerak.

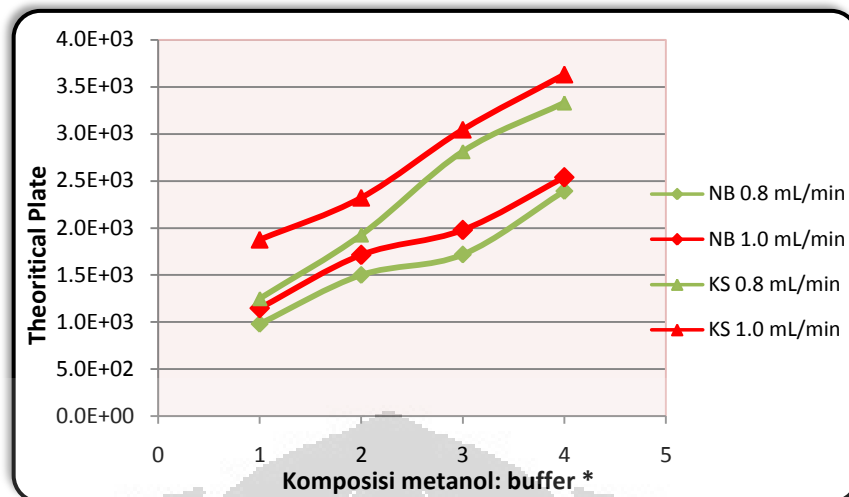
4.2.3 Optimasi Dengan Eluen Metanol : Buffer Fosfat pH 6.8

Kondisi analisa pemisahan campuran natrium benzoat dan kalium sorbat dengan menggunakan campuran fasa gerak metanol dan buffer fosfat pH 6.8 berbagai komposisi menghasilkan kondisi pemisahan yang jauh lebih baik bila dibandingkan dengan menggunakan buffer yang bersifat asam. Kondisi dengan nilai HETP minimum serta jumlah pelat maksimum untuk kedua bahan pengawet dihasilkan saat komposisi fasa gerak metanol : buffer bernilai 15:85 pada laju alir 1.0 mL/min. Hubungan nilai HETP dan jumlah pelat teoritis dengan berbagai komposisi fasa gerak disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 4.7 dan 4.8.

Dari grafik hubungan nilai HETP dengan berbagai komposisi campuran fasa gerak pada gambar 4.7, terlihat bahwa semakin besar komposisi buffer yang digunakan maka nilai HETP semakin kecil, sebaliknya semakin besar komposisi metanol yang digunakan maka nilai HETP semakin bertambah besar.



Gambar 4.7 Grafik hubungan nilai HETP dengan komposisi fasa gerak



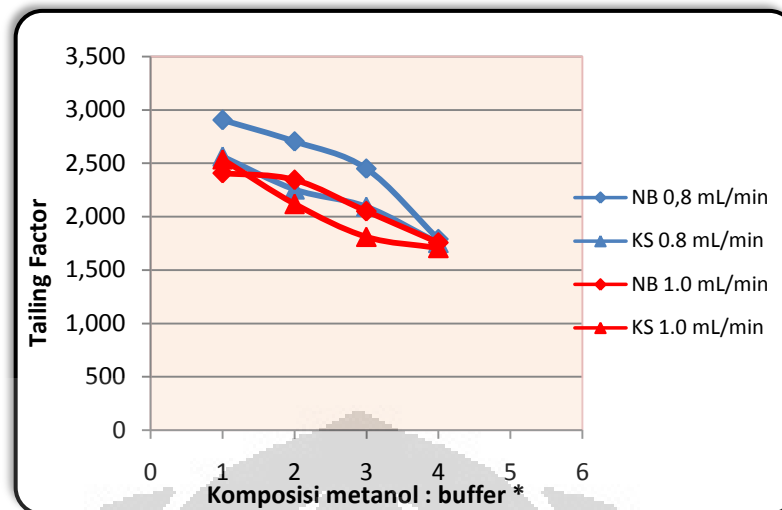
Gambar 4.8 Grafik hubungan jumlah pelat dengan komposisi fasa gerak

Keterangan : *) Komposisi metanol: buffer

- 1= (35:65)
- 2= (25:75)
- 3= (20:80)
- 4= (15:85)
- NB = natrium benzoat
- KS = kalium sorbat

Sementara berdasarkan grafik hubungan antara jumlah pelat dengan berbagai komposisi campuran fasa gerak pada gambar 4.8, terlihat bahwa jumlah pelat teoritis semakin meningkat dengan bertambahnya komposisi buffer fosfat yang digunakan. Kondisi ini sangat berbanding terbalik dengan nilai HETP karena pelat teoritis memiliki hubungan yang berbanding terbalik dengan nilai HETP sesuai dengan persamaan 2.8 (bab 2 tinjauan pustaka). Berdasarkan kedua grafik tersebut maka nilai HETP minimum dengan jumlah pelat maksimum dihasilkan oleh kondisi analisa saat komposisi metanol: fasa gerak bernilai 15:85 dengan laju alir 1.0 mL/min.

Untuk meyakinkan bahwa kondisi tersebut merupakan kondisi optimal pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat maka dibuat juga suatu hubungan antara nilai *tailing factor* dengan berbagai komposisi campuran fasa gerak yang disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 4.9.



Gambar 4.9 Grafik hubungan tailing factor dengan komposisi fasa gerak

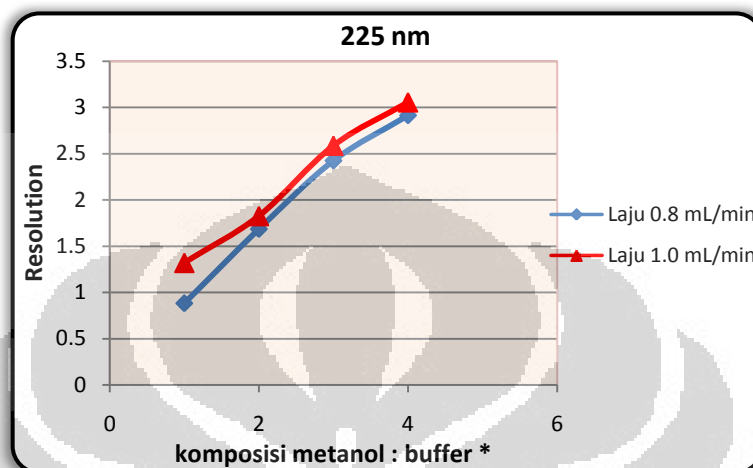
Keterangan : *) Komposisi metanol: buffer

- 1= (35:65)
- 2= (25:75)
- 3= (20:80)
- 4= (15:85)
- NB = natrium benzoat
- KS = kalium sorbat

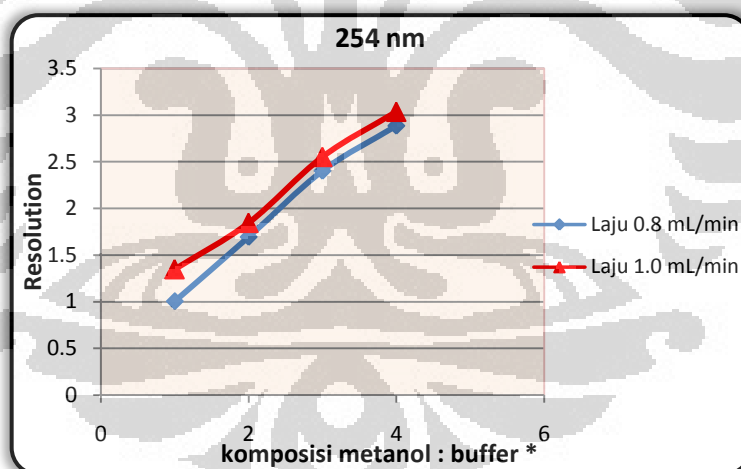
Berdasarkan gambar 4.9 dapat disimpulkan bahwa *tailing factor* semakin kecil dengan bertambahnya komposisi buffer yang digunakan. *Tailing factor* sangat berhubungan dengan faktor asimetris dari peak yang dihasilkan. Kesimetrisan sebuah peak tidak lepas dari pengaruh buffer yang digunakan sebagai fasa gerak karena pemilihan pH buffer yang tepat dapat menghasilkan peak yang tajam dan simetris. Semakin besar nilai *tailing factor* maka bentuk peak yang dihasilkan akan semakin tidak simetris, sebaliknya semakin kecil nilai *tailing factor* maka semakin simetris peak yang dihasilkan dan semakin baik pemisahan yang dihasilkan. Dari gambar 4.9 terlihat bahwa *tailing factor* minimum untuk kedua bahan pengawet dihasilkan pada saat komposisi metanol: buffer bernilai 15:85 dengan laju alir 1.0 mL/min.

Selain *tailing factor*, parameter lainnya yang juga penting dalam menentukan kondisi optimum kromatografi adalah resolusi (R) dimana nilai resolusi agar dihasilkan pemisahan yang baik harus bernilai lebih besar atau sama dengan 1.5. Berdasarkan grafik hubungan antara komposisi fasa gerak dengan

nilai resolusi pada panjang gelombang 225 nm dan 254 nm pada gambar 4.10 dan gambar 4.11, baik natrium benzoat maupun kalium sorbat memberikan resolusi maksimum saat komposisi metanol : buffer bernilai (15:85) dengan laju alir 1.0 mL/min.



Gambar 4.10 Grafik hubungan nilai resolusi dengan komposisi fasa gerak pada panjang gelombang 225 nm



Gambar 4.11 Grafik hubungan nilai resolusi dengan komposisi fasa gerak pada panjang gelombang 254 nm

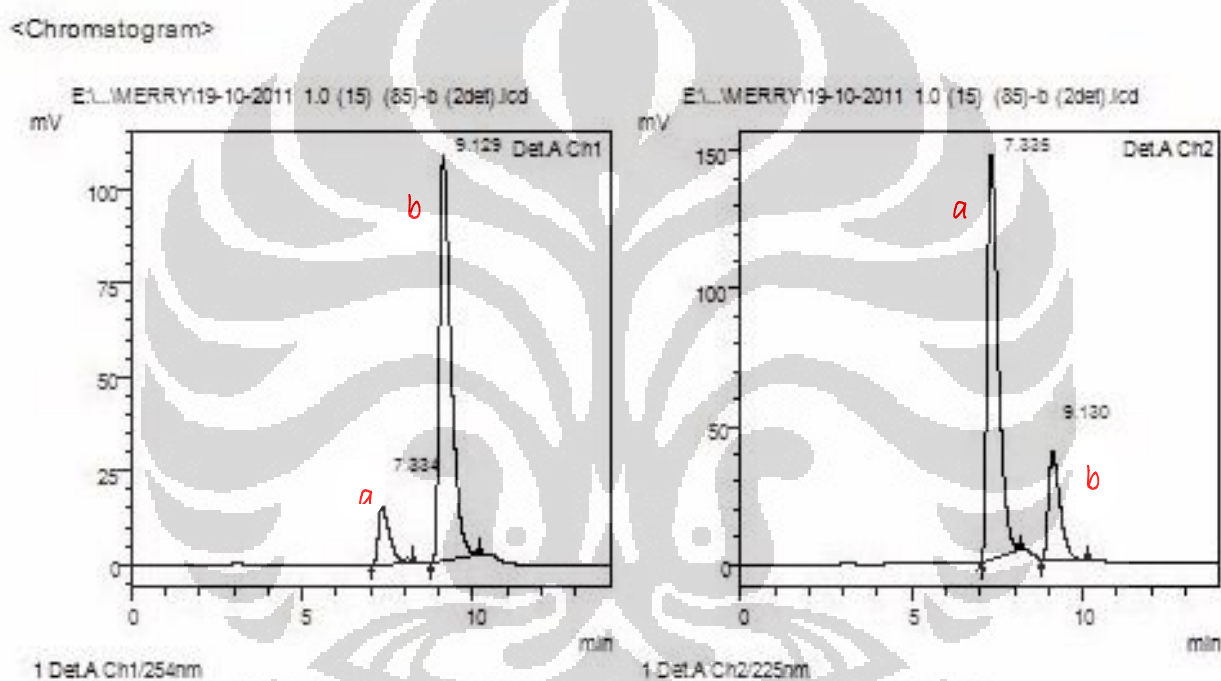
Keterangan : *) Komposisi metanol: buffer

- 1= (35:65)
- 2= (25:75)
- 3= (20:80)
- 4= (15:85)

• KS = kalium sorbat

• NB = natrium benzoat

Resolusi menyatakan ukuran besar kecilnya pemisahan. Semakin besar nilai resolusi maka pemisahan kedua analit di dalam kolom semakin baik. Dari keempat parameter pemisahan yaitu HETP, jumlah pelat, nilai tailing factor dan resolusi maka dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum kromatografi ditetapkan pada laju fasa gerak 1.0 mL/min dengan komposisi metanol : buffer (15:85). Kondisi optimum ini juga didukung oleh waktu retensi yang relatif singkat bila dibandingkan dengan menggunakan campuran buffer asetat ataupun buffer fosfat ataupun pH 4.5 dimana natrium benzoat terelusi di menit ke-7 sedangkan kalium sorbat terelusi pada menit ke-9



Gambar 4.12 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm (kiri) dan 225 nm (kanan) dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 6.8 (15:85) pada laju 1.0 mL/min.

Keterangan : a : Natrium Benzoat b : Kalium Sorbat

Kondisi optimum kromatografi pada pemisahan campuran natrium benzoat dan kalium sorbat dipengaruhi oleh pH buffer fosfat yang digunakan dimana pada pH yang relatif besar maka interaksi analit dengan gugus silanol pada fasa diam menjadi lebih lemah dibandingkan dengan menggunakan fasa gerak pH asam karena kecenderungan analit untuk berubah menjadi bentuk asamnya semakin berkurang pada pH yang lebih besar. Hal ini mengakibatkan

daya elusi semakin meningkat seiring dengan meningkatnya komposisi buffer. Pada suasana basa, kedua analit akan terionisasi dengan mudah sehingga interaksinya dengan fasa diam di dalam kolom C18 semakin menurun dan waktu retensi kedua analit semakin berkurang dengan bertambahnya jumlah komposisi buffer fosfat yang digunakan.

4.3 Pengaruh Fasa Gerak Terhadap Pemisahan Kedua Bahan Pengawet

4.3.1. Peranan Metanol dan Buffer

Secara umum buffer memiliki peranan yang sangat penting bagi kondisi pemisahan kedua analit di dalam kolom. Pemilihan buffer serta pH buffer yang tidak tepat dalam analisa menggunakan kromatografi cair seperti HPLC dapat menghasilkan peak yang melebar, asimetris dan peak yang berekor. Pemilihan buffer yang tepat sebagai fasa gerak sangat penting dalam keberhasilan pemisahan analit dengan mekanisme fasa terbalik guna memperoleh bentuk peak, limit deteksi dan waktu retensi yang optimal.

Buffer yang digunakan sebagai campuran fasa gerak berfungsi sebagai pengontrol pH fasa gerak untuk mengatur ionisasi ataupun protonasi analit di dalam kolom sehingga kuat lemahnya interaksi analit dengan gugus silanol dapat diatur melalui pemilihan pH buffer yang tepat. Sementara peranan metanol sebagai campuran fasa gerak adalah untuk membantu proses elusi kedua bahan pengawet keluar dari kolom. Metanol dapat membuat afinitas dari kedua analit yang berinteraksi dengan fasa diam menjadi relatif lebih lemah dibandingkan dengan interaksi analit dengan fasa gerak. Selain itu, metanol juga dapat mengurangi kecenderungan terjadinya deaktivasi fasa diam yang dapat disebabkan oleh pengaruh buffer yang sangat polar.

4.3.2 Pengaruh pH Buffer

pH fasa gerak akan menentukan derajat ionisasi dari sampel-sampel di dalam kolom yang juga akan mempengaruhi retensi. Sebagai contoh, komponen-komponen netral lebih bersifat hidrofobik pada kromatografi cair pada pemisahan dengan mekanisme fasa terbalik sehingga komponen-komponen tersebut lebih tertahan dari pada komponen-komponen terionisasi yang bersifat polar. bentuk

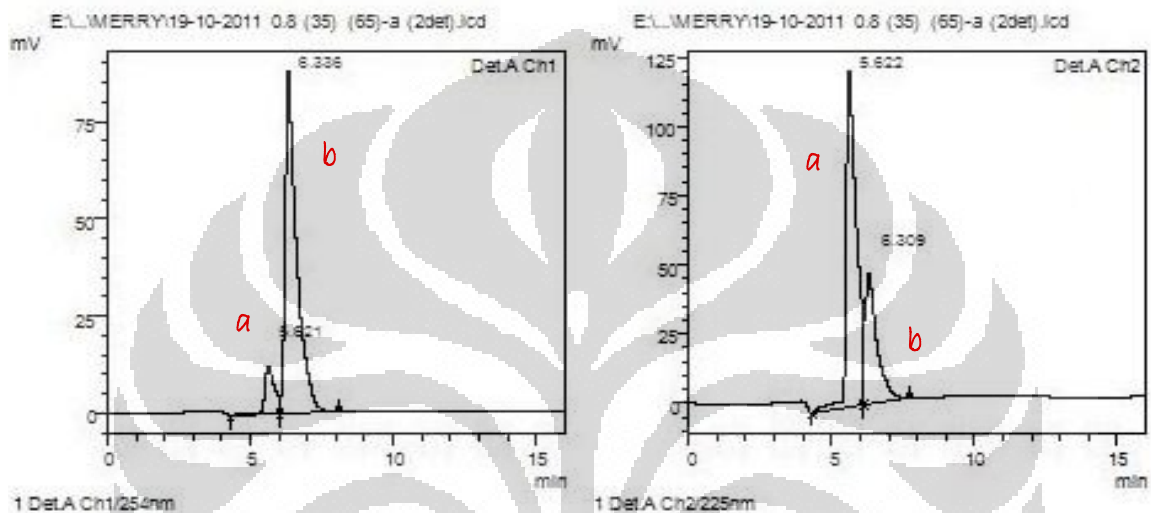
peak dapat juga dipengaruhi oleh derajat ionisasi dari sebuah kolom atau sampel. Oleh karena itu, hal ini sangat penting bagi buffer sebagai fasa gerak untuk mengontrol selektifitas dan untuk memperoleh pemisahan optimum yang ketertiruannya tinggi dengan bentuk peak yang dapat diterima sebagai standar. (Tindal G.W, 2002)

Buffer akan diperlukan untuk menjaga komponen yang bersifat asam terprotonasi selama pemisahan. Pada umumnya gugus alifatik dan asam aromatik memiliki nilai pK_a sekitar 3 atau lebih dalam pelarut air. Pada pH 2, senyawa asam ini akan terprotonasi sempurna sehingga hampir semua tertahan di dalam kolom kromatografi. Pengaturan pH buffer sangat penting. Jika ada sepasang komponen bersifat asam dengan nilai pK_a yang berbeda tidak terpisah ketika terprotonasi sempurna dalam pH rendah, maka komponen-komponen tersebut pasti akan terpisah dengan baik pada nilai pH yang lebih tinggi dimana kedua komponen akan terdisosiasi parsial. Retensi akan sangat dipengaruhi oleh perubahan pH karena pH dapat mempengaruhi jumlah relatif derajat disosiasi (Tindal G.W, 2002). Natrium benzoat dan kalium sorbat akan terprotonasi sehingga kedua bahan pengawet tersebut berubah menjadi bentuk asamnya pada pH fasa gerak yang rendah (seperti pada penggunaan buffer asetat dan buffer fosfat pH 4.5) dan mengakibatkan retensi di dalam kolom C18 semakin besar. Untuk itulah diperlukan pH fasa gerak yang lebih tinggi (seperti pada penggunaan buffer fosfat pH 6.8) dimana kedua analit dapat terionisasi dan terelusi dari kolom C18.

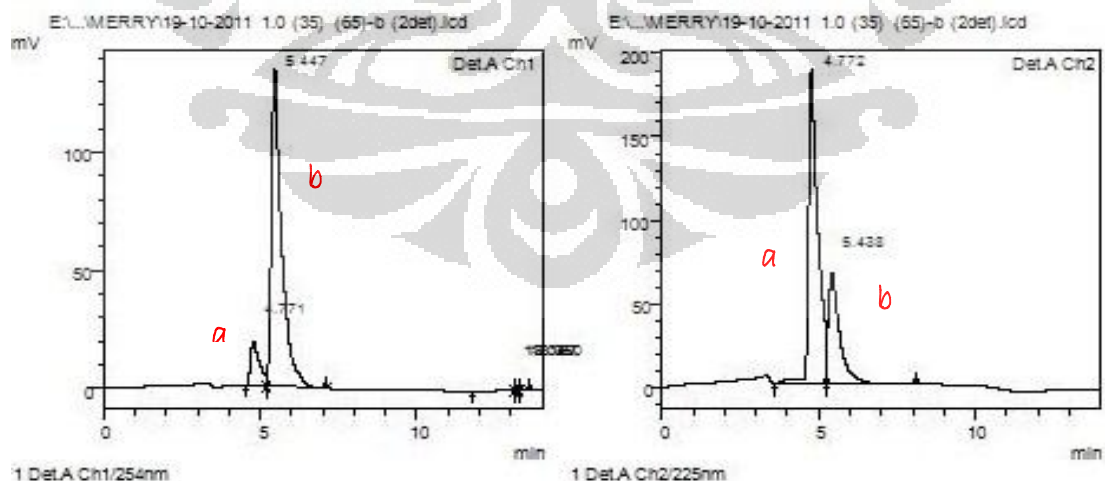
4.3.3. Pengaruh Komposisi Metanol : Buffer

Penambahan sejumlah metanol sebagai fasa gerak dapat merubah nilai pH dari analit dan juga sedikit perubahan pH buffer. pH kedua analit akan meningkat seiring dengan meningkatnya komposisi metanol yang ditambahkan sebagai fasa gerak (Tindall G.W, 2002). Itulah sebabnya, pada pH fasa gerak yang asam (seperti pada penggunaan buffer asetat dan buffer fosfat pH 4.5), semakin banyak komposisi metanol yang ditambahkan maka akan semakin tinggi nilai pH kedua analit di dalam kolom C18 sehingga kecenderungan kedua analit terionisasi akan semakin besar dan retensi dalam kolom semakin berkurang. Namun pada pH

fasa gerak yang lebih tinggi (seperti pada penggunaan buffer fosfat pH 6.8), kemampuan ionisasi kedua analit cukup besar, sehingga semakin besar komposisi metanol yang digunakan sebagai campuran fasa gerak maka nilai pH analit semakin bertambah besar sehingga waktu bagi kedua analit untuk tertahan dan terpisah dalam kolom semakin kecil. Hal ini menyebabkan kedua analit tidak terpisah secara sempurna oleh karena terelusi dalam waktu yang hampir bersamaan seperti terlihat pada kromatogram gambar 4.13 dan 4.14



Gambar 4.13 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm (kiri) dan 225 nm (kanan) dengan eluen metanol: buffer fosfat pH 6.8 (35:65) pada laju 0.8 mL/min.



Gambar 4.14 Kromatogram pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm (kiri) dan 225 nm (kanan) dengan eluen metanol: buffer Fosfat pH 6.8 (35:65) pada laju 1.0 mL/min.

Keterangan : *a* : Natrium Benzoat *b* : Kalium Sorbat

4.4 Pengaruh Fasa Diam dan Struktur Bahan Pengawet

Adanya gugus silanol (Si-OH) sebagai fasa diam yang bersifat polar dan asam (pKa silanol = 4.5) mengakibatkan kedua bahan pengawet dapat berinteraksi dan tertahan dalam kolom C18. Kuat atau lemahnya interaksi fasa diam dengan analit di dalam kolom dapat diatur dengan mengontrol beberapa parameter penting seperti pH fasa gerak dan komposisi antara buffer dengan pelarut organik yang digunakan.

Bentuk atau struktur molekul analit juga mempengaruhi retensi kedua bahan pengawet di dalam kolom. Secara umum analit dengan luas permukaan hidrofob yang lebih besar seperti C-H, C-C dan ikatan atom non polar lainnya seperti S-S akan menghasilkan retensi yang lebih lama karena ikatan- ikatan non polar tersebut menurunkan derajat kepolaran pada permukaan analit sehingga semakin meminimalkan interaksinya dengan struktur air yang terkandung dalam fasa gerak. Sebaliknya, gugus-gugus polar seperti -OH, -NH₂, COO⁻, atau NH₃⁺ dapat mengurangi retensi pada fasa diam karena gugus-gugus polar tersebut berinteraksi dengan baik dengan fasa gerak. Berdasarkan struktur dari kedua bahan pengawet maka kalium sorbatlah yang berinteraksi lebih kuat dengan fasa diam sehingga retensinya semakin besar dibandingkan retensi natrium benzoat di dalam kolom C18 .

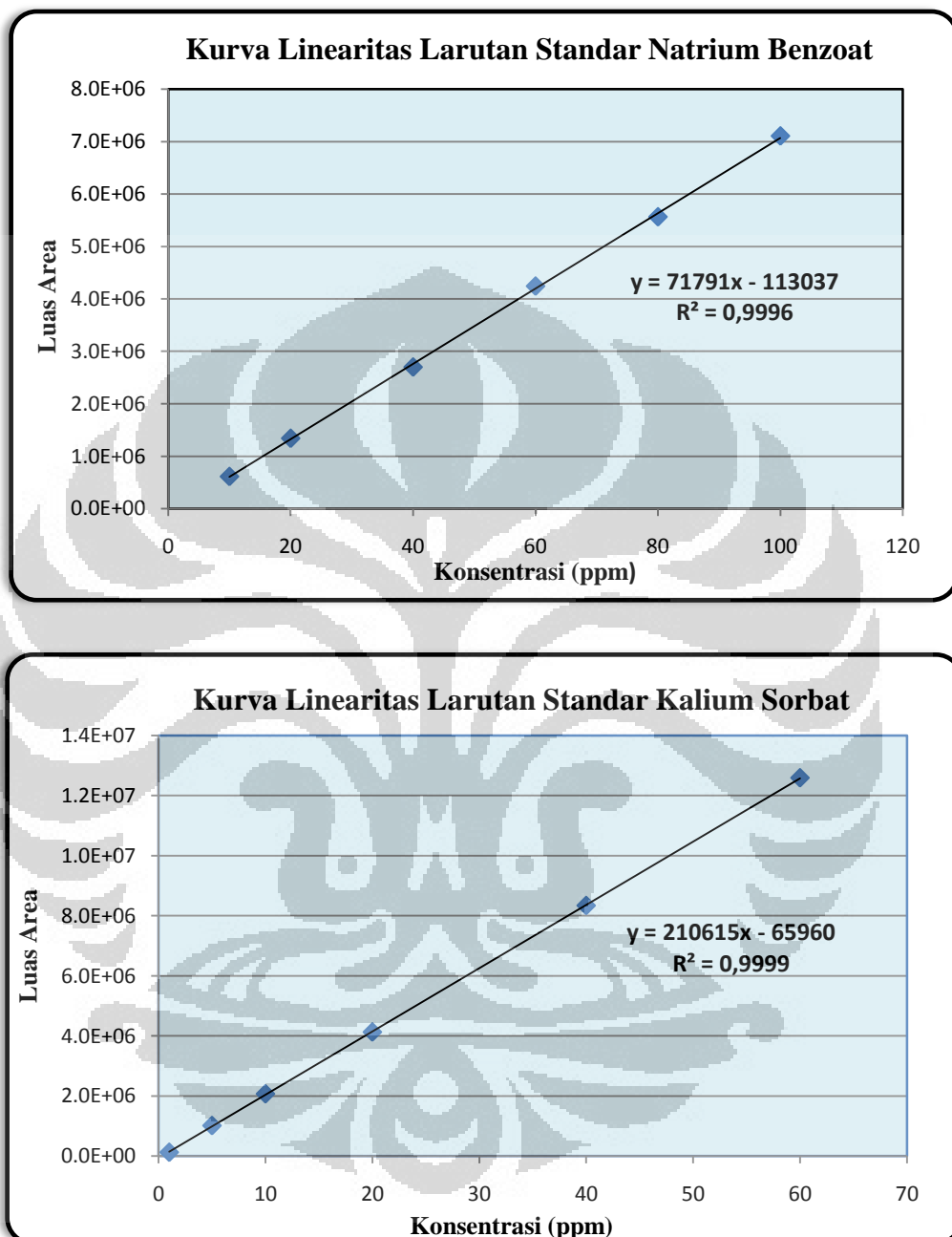
4.5 Validasi Larutan Standar Natrium Benzoat dan kalium Sorbat

4.5.1 Linearitas dan Rentang

Berdasarkan pengukuran terhadap luas area dari larutan standar natrium benzoat pada panjang gelombang 225 nm dan kalium sorbat pada panjang gelombang 254 nm pada rentang konsentrasi 5 ppm-500 ppm dengan pengulangan sebanyak ≥ 6 kali untuk setiap standar, maka diperoleh persamaan garis lurus dengan $R^2 \geq 0,996$ seperti dapat dilihat pada gambar 4.15.

Linearitas larutan standar natrium benzoat berada pada konsentrasi 10 ppm-100 ppm yang menghasilkan persamaan garis lurus $y= 71791 x - 113037$ dengan nilai R^2 sebesar 0.9996 sedangkan linearitas larutan kalium sorbat berada

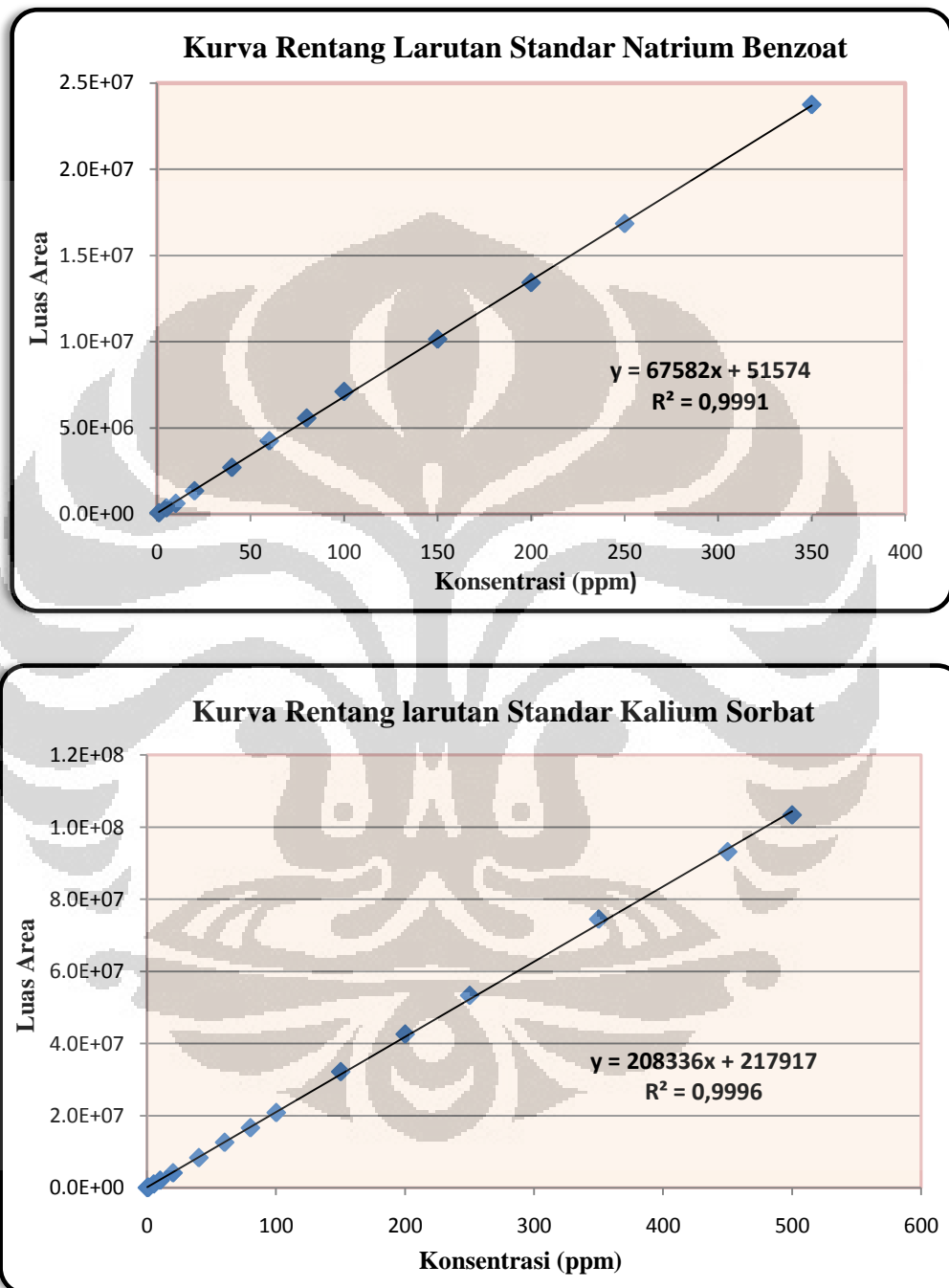
pada konsentrasi 5 ppm-60 ppm yang menghasilkan persamaan garis lurus $y=210615x - 65960$ dengan nilai R^2 sebesar 0,9999.



Gambar 4.15 Kurva linearitas larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat

Sementara rentang yang merupakan batas terendah dan tertinggi analit yang masih dapat memberikan respon linier, berbeda untuk masing-masing bahan pengawet. Untuk kalium sorbat, konsentrasi tertinggi yang masih memberikan respon linier adalah sampai 500 ppm sedangkan untuk natrium benzoat,

konsentrasi tertinggi yang masih memberikan respon linier hanya sampai 350 ppm. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4.5 dimana nilai R^2 untuk masing – masing bahan pengawet masih berada pada $R^2 \geq 0,996$.



Gambar 4.16 Kurva rentang larutan Standar natrium benzoat dan kalium sorbat

4.5.2 Presisi

Nilai presisi yang dinyatakan dengan parameter standar deviasi relatif (RSD) dimana kriteria seksama diperoleh jika metode memberikan simpangan baku relatif kurang $\leq 2\%$. Uji presisi yang dilakukan merupakan *repeatability* atau uji keterulangan dengan melakukan pengukuran terhadap luas area dan waktu retensi secara berulang sebanyak ≥ 6 kali pengulangan pada kondisi yang sama untuk masing-masing larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat.

Nilai RSD dari kedua bahan pengawet, natrium benzoat dan kalium sorbat memberikan yang dihasilkan memberikan simpangan baku relatif kurang dari 2% dimana RSD untuk natrium benzoat bernilai 0,7873 dan RSD untuk kalium sorbat bernilai 0,5414 sehingga dapat disimpulkan bahwa pengukuran presisi yang dilakukan memenuhi kriteria seksama atau dengan kata lain presisi pengukurannya sangat baik. Hasil analisa luas area dan waktu retensi dari masing-masing larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat disajikan dalam bentuk tabel pada lampiran 4.

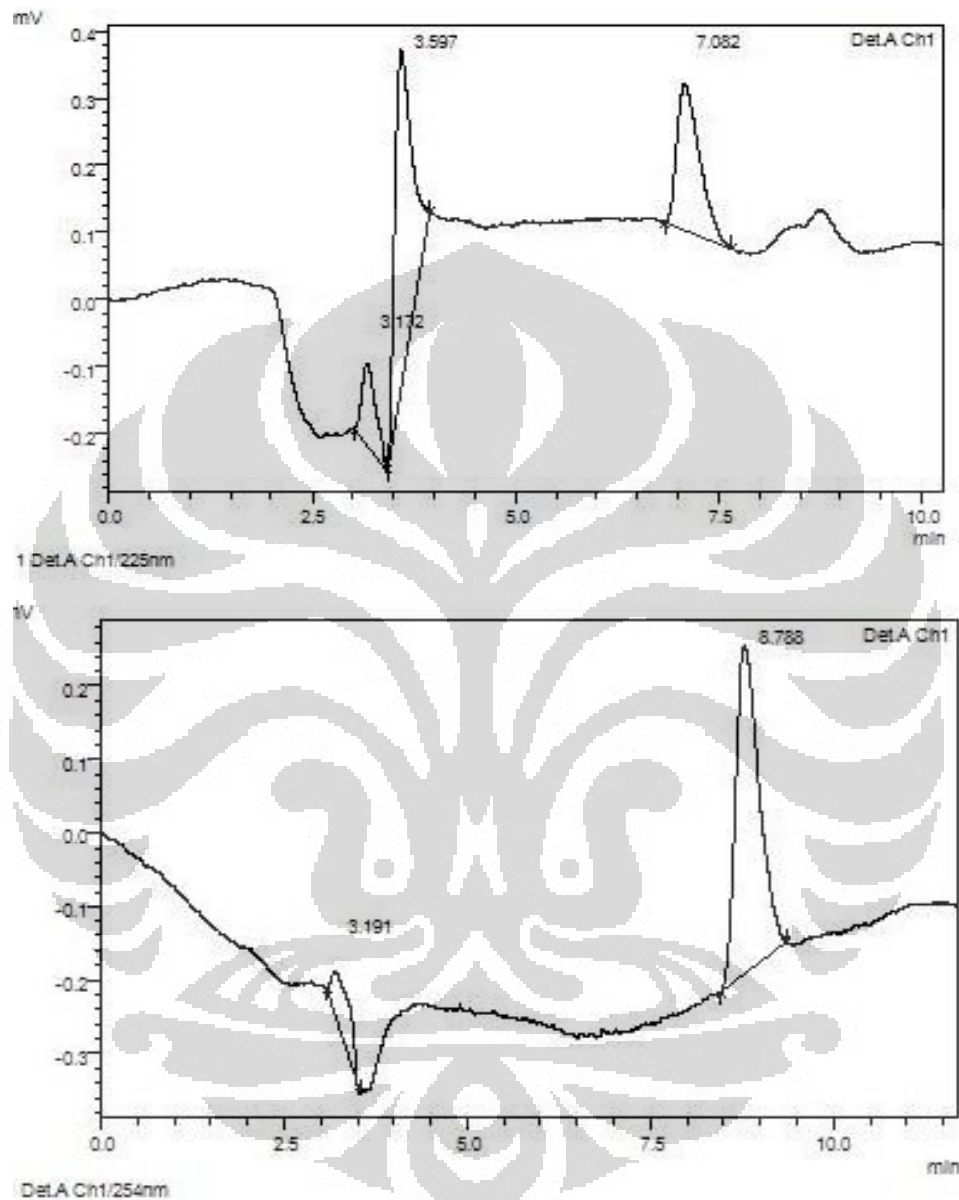
4.5.3 Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantisasi (LoQ)

Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi dari natrium benzoat dan kalium sorbat dilakukan dengan pengukuran dari masing-masing larutan standar dengan rentang konsentrasi yang lebih luas yaitu 0.05 ppm hingga 500 ppm dengan pengulangan sebanyak ≥ 6 kali untuk setiap larutan standar.

Dari hasil perhitungan (ada pada lampiran 6 dan 7) diperoleh batas deteksi (LoD) natrium benzoat dan kalium sorbat berturut-turut adalah sebesar 2,305 ppm dan 0,390 ppm sedangkan batas kuantisasi (LoQ) untuk natrium benzoat dan kalium sorbat berturut-turut adalah 7,685 ppm dan 1,300 ppm.

Pengukuran larutan standar kedua bahan pengawet dibawah konsentrasi limit deteksi yaitu pada konsentrasi 0.05 ppm terlihat bahwa hasil pengukuran tidak lagi sensitif seperti dapat dilihat pada gambar 4.17. Baseline yang dihasilkan tidak linear dan peak yang dihasilkan juga sudah tidak dapat dibedakan dari *noise*

yang ada. Dapat disimpulkan bahwa hasil pengukuran larutan standar dibawah konsentrasi limit deteksi tidak lagi bersifat valid dan juga respon instrumen tidak lagi sensitif terhadap pengukuran kedua analit.



Gambar 4.17 Kromatogram pengukuran natrium benzoat (atas) dan kalium sorbat (bawah) pada konsentrasi 0.05 ppm

4.6 Analisa Kadar Natrium Benzoat dan Kalium Sorbat Pada Sampel

Dari 6 sampel yang diambil secara acak yang terdiri dari 3 sampel kecap dan 3 sampel saus, ditentukan kadar bahan pengawet natrium benzoat ataupun

kalium sorbat yang terkandung didalam tiap sampel. Sebelum dianalisa kadarnya dengan instrumen HPLC, sampel kecap dan saus yang bersifat *viscous* harus dilakukan *treatment* terlebih dahulu untuk mengurangi komponen-komponen lain yang terdapat dalam matriks sampel. *Treatment* terhadap sampel dilakukan dengan mencampurkan sampel dengan eluen metanol : buffer (15:85) dengan perbandingan 1:5 dan kemudian dilakukan pengenceran kembali dengan pelarut yang sama.

Berdasarkan hasil analisa kualitatif yang dilakukan terhadap sampel-sampel tersebut, terbukti bahwa semua sampel mengandung bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat meskipun ada beberapa sampel yang tidak mencantumkan salah satu dari kedua bahan pengawet tersebut dalam label komposisi kemasan. Sementara berdasarkan analisa kuantitatif terhadap sampel-sampel tersebut, teramati bahwa kadar natrium benzoat dan kalium sorbat yang terkandung dalam sampel kecap dan saus hampir sebagian besar melebihi batas aman yang ditentukan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) berdasarkan PERMENKES RI Nomor 772/Menkes/Per/IX/1988. Kadar natrium benzoat yang terkandung dalam sampel-sampel uji tersebut sangat bervariasi seperti disajikan dalam tabel 4.1

Tabel 4.1 Kadar natrium benzoat dan kalium sorbat yang terkandung dalam masing-masing sampel kecap dan saus

Sampel	Komposisi Kemasan		Kadar Hasil Analisa (mg/Kg)	
	NB	KS	NB	KS
Kecap A	T	T	517,1068 ± 5,3705	1413,5883 ± 7,9315
Kecap B	T	TT	495,2376 ± 8,3267	1413,0091 ± 14,0896
Kecap C	T	TT	978,7789 ± 7,8484	325,3916 ± 7,8886
Saus A	T	T	1471,7615 ± 7,1598	--
Saus B	T	TT	940,1025 ± 5,6024	326,1070 ± 3,2483
Saus C	T	TT	1871,2993 ± 13,0282	48,1255 ± 0,3763

Keterangan : NB = Natrium Benzoat T = Tercantum

KS = Kalium Sorbat TT = Tidak Tercantum

Sampel kecap dan saus yang dianalisa merupakan produk- produk yang beredar di pasaran dan pada umumnya dijual dengan harga yang relatif murah dan terjangkau. Dari hasil analisa yang telah dilakukan terhadap sampel-sampel tersebut maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat dalam bahan makanan secara berlebihan masih marak terjadi terutama pada kecap dan saus yang tergolong sebagai bahan penyedap makanan.

4.6.1 Persen Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Persen perolehan kembali sangat penting dilakukan guna menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya sebagai salah satu parameter keandalan metode. Persen perolehan kembali dilakukan dengan metode penambahan baku atau *spiking* yaitu dengan menambahkan sejumlah larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat dalam sampel tertentu.

Dari pengukuran yang dilakukan terhadap sampel kecap yang telah ditambahkan standar natrium benzoat dan kalium sorbat maka persen perolehan kembali yang diperoleh lebih dari 90% yaitu 94% untuk natrium benzoat dan 92% untuk kalium sobat. Datanya dapat dilihat pada tabel 4.2 dan tabel 4.3.

Tabel 4.2 Persen recovery dari hasil penambahan baku natrium benzoat 40 ppm ke dalam sampel kecap

	Luas	x	Luas*	x*	% recovery
	620946	10,22389	3410692	49,08316	93,66304
	636006	10,43366	3297431	47,50551	
	631354	10,36886	3249179	46,83339	
Rata-rata	629435,33333	10,34214	3319100,6667	47,80735	

Tabel 4.3 Persen recovery dari hasil penambahan baku kalium sorbat 40 ppm ke dalam sampel kecap

	Luas	x	Luas**	x**	% recovery
	5854039	28,10815	13637829	65,06559	92,33022
	5890706	28,28225	13549785	64,64756	
	5920749	28,42490	13813236	65,89842	
Rata-rata	5888498	28,27177	13666950	65,20385	

Keterangan :

- Luas* = Luas setelah penambahan standar natrium benzoat
- Luas** = Luas setelah penambahan standar kalium sorbat
- x* = Kadar setelah penambahan larutan baku natrium benzoat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 71791 x - 113037$
- x** = Kadar setelah penambahan larutan baku kalium sorbat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 210615 x - 65960$

Sementara dari pengukuran yang dilakukan pada salah satu sampel saus yang telah ditambahkan standar natrium benzoat dan kalium sorbat maka persen perolehan kembali yang diperoleh juga bernilai lebih dari 90% yaitu 92% dan 93% untuk natrium benzoat dan kalium sorbat berturut-turut. Data untuk uji akurasi pada sampel saus dapat dilihat pada tabel 4.4 dan tabel 4.5.

Tabel 4.4 Persen recovery dari hasil penambahan baku natrium benzoat 40 ppm ke dalam sampel saus

	Luas	x	Luas*	x*	% recovery
	1240022	18,84719	3837677	55,03077	92,44316
	1227622	18,67447	3856193	55,28868	
	1242699	18,88448	3980377	57,01848	
Rata-rata	1236781	18,80205	3891415,66667	55,77931	

Tabel 4.5 Persen recovery dari hasil penambahan baku kalium sorbat 40 ppm ke dalam sampel saus

	Luas	x	Luas**	x**	% recovery
	1317597	6,56913	9238546	44,17779	93,49920
	1292086	6,44800	9147993	43,74785	
	1313418	6,54929	9167364	43,83982	
Rata-rata	1307700,33333	6,52214	9184634,33333	43,92182	

Keterangan :

- Luas* = Luas setelah penambahan standar natrium benzoat
- Luas** = Luas setelah penambahan standar kalium sorbat
- x* = Kadar setelah penambahan larutan baku natrium benzoat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 71791 x - 113037$
- x** = Kadar setelah penambahan larutan baku kalium sorbat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 210615 x - 65960$

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka kesimpulan mengenai hasil penelitian ini antara lain :

- a. Pemisahan natrium benzoat dan kalium sorbat dengan teknik HPLC diperoleh dengan menggunakan fasa gerak berupa campuran metanol dan buffer fosfat pH 6.8 dengan perbandingan 15:85 pada laju alir 1.0 mL/min.
- b. Uji presisi natrium benzoat dan kalium sorbat dengan metode keterulangan memberikan %RSD < 2%
- c. Natrium benzoat memiliki batas deteksi (LoD) sebesar 2,305 ppm dan limit kuantisasi (LoQ) sebesar 7,685 ppm sedangkan kalium sorbat memiliki batas deteksi (LoD) sebesar 0,390 ppm dan limit kuantisasi sebesar 1,300 ppm.
- d. Uji akurasi terhadap kedua bahan pengawet dalam sampel kecap dengan metode penambahan baku menghasilkan %recovery sebesar 94% untuk natrium benzoat dan 92% untuk kalium sorbat sedangkan pada sampel saus adalah 92% dan 93% untuk natrium benzoat dan kalium sorbat berturut-turut.
- e. Berdasarkan hasil analisa kualitatif yang dilakukan terhadap sampel-sampel tersebut, teramati bahwa sebagian besar sampel mengandung bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat.
- f. Berdasarkan hasil analisis kuantitatif terhadap sampel kecap dan saus, kadar natrium benzoat yang terkandung dalam sampel berkisar antara 500-1800 mg/kg sedangkan kadar kalium sorbat berkisar antara 40-1400 mg/kg.
- g. Terdapat beberapa produk yang menggunakan bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat melebihi batas aman yang ditentukan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) berdasarkan PERMENKES RI Nomor 772/Menkes/Per/IX/1988.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini maka saran yang dikemukakan oleh penulis adalah :

- a. Dilakukan treatment terhadap sampel- sampel bahan makanan dengan menggunakan metode solid phase extraction (SPE) guna meminimalisasi pengaruh pengotor-pengotor dalam matriks sampel sehingga diperoleh persen perolehan kembali yang lebih mendekati kadar analit sebenarnya.
- b. Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penentuan kadar Natrium benzoat dan Kalium sorbat pada bahan pangan melalui teknik HPLC dengan variasi parameter lainnya seperti tipe aliran fasa gerak, jenis fasa gerak dan suhu kolom.
- c. Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penentuan kadar natrium benzoat dan kalium sorbat pada bahan pangan dengan instrumen LCMS agar diperoleh hasil analisa yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelika., Hüsgen G., & Schuster R. (2001). *HPLC for Food Analysis*. Germany: Agilent Technologies Company.
- Ditjen POM, Depkes RI. (1988). *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.722/ Menkes/Per/IX/88 Tentang Bahan Tambahan Makanan*. Depkes RI, Jakarta.
- Dolan, J.W. (2002). *Peak Tailing and Resolution*. LC Resources Inc, Walnut Creek, California, USA.
- Glevitzky M., et al. (2009). *Studies Regarding The Use of Preservatives on Soft Drinks Stability*. Chem.Bull. "POLITEHNICA" Univ.(Timisoara). Vol. 54 (68),I.
- Harmita. (2004). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian. Vol.I, No 3:117-135.
- HPLC Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. <https://lansida.blogspot.com> diakses Tanggal 13 September 2011
- <http://www.balipost.co.id/mediadetail/republika1maret2007> diakses Tanggal 4 November 2011
- <http://www.livestrong.com/article> diakses Tanggal 6 oktober 2011
- Meyer, F.R. FORTH EDITION. (2004). *Practical High-Perfomance Liquid Chromatography*. A John Wiley & Sons, Inc, Publication
- Pylypiw, H.M., & Grether, M.T. (2000). *Rapid High-Perfomance Liquid Chromatography method for the analysis of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Foods*. Journal of Chromatography A. Vol. 883. Hal 299-304.
- R Khosrokhavar., et al. (2010). *Simultaneous Determination of Preservatives (Soduim Benzoate and Potassium Sorbate) in Soft Drinks and Herbal Extracts using High Perfomance Liquid Chromatography (HPLC)*. Journal of Medicinal Plants. Vol. 9, No. 35.
- Ramos. (2009). *Optimasi dan Validasi Metode Penetapan Melamin Dalam Pakan Ternak Dengan Teknik HPLC*. Karya Utama Sarjana Departemen Kimia : FMIPA UI.

- Rimbawan. (2001). *Analisa Bahaya dan Pencegahan Keracunan Pangan*. Hal 28. SNI 01-3546-2004. *Saus Tomat*. Departemen Perindustrian RI. Jakarta. Hal. 1-14.
- SNI 3543-1999. *Kecap Kedelai*. Departemen Perindustrian RI. Jakarta. Hal. 1-7.
- Sunardi. (2010). *Penuntun Praktikum Kimia Analisa Instrumentasi*. Depok :
Departemen kimia- FMIPA UI.
- Tailing Factor*. <http://www.lcresources.com/resources> diakses Tanggal 10
November 2011
- Tindall, G.W. (2002). *Mobile Phase Buffers, Part II-Buffer Selection and Capacity*. LC Resources Inc, Walnut Creek, California, USA.
- Universitas Indonesia. (2008). *Pedoman Teknis Penulisan Tugas Akhir Mahasiswa Universitas Indonesia*. Depok.
- WHO. (1992). *The International Pharmacopoeia*. Fourth Edition. Electronic Version Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2000). *Concise International Chemical Assessment Document 26*. Version Geneva: World Health Organization
- Wisnu. (2002). *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan*. Penerbit Bumi Aksara. Hal. 1-52.
- Wood R., Foster L., Damant A., & Key P. (2000). *Analytical Methods For Food Additives*. Woodhead Publishing Limited : Cambridge, England.

Lampiran 1. Parameter pengukuran dengan fasa gerak metanol dan buffer fosfat pH 4.5

Laju (mL/min)	Metanol : Buffer	Waktu Retensi		HETP		Theoretical Plate		Tailing Factor		Resolution	
		NB	KS	NB	KS	NB	KS	NB	KS	225	254
0.8	40:60	9.040	12.438	4,884E+02	3,885E+02	3,071E+02	3,861E+02	2.028	2.216	2.079	2.101
		8.669	11.863	4,869E+02	3,649E+02	3,081E+02	4,111E+02	1.986	2.247	2.135	2.140
	10.109	14.829	4,268E+02	3,349E+02	3,515E+02	4,479E+02	2.061	2.463	1.814	1.808	
	10.050	14.717	4,173E+02	3,285E+02	3,594E+02	4,567E+02	2.112	2.508	1.853	1.828	
	20.390	28.447	3,670E+02	3,032E+02	4,088E+02	4,947E+02	1.738	1.949	1.565	1.543	
	20.267	28.595	3,691E+02	3,105E+02	4,064E+02	4,830E+02	1.765	1.837	1.498	1.538	

Laju (mL/min)	Metanol : Buffer	Waktu Retensi		HETP		Theoretical Plate		Tailing Factor		Resolution	
		NB	KS	NB	KS	NB	KS	NB	KS	225	254
1.0	40:60	7.781	10.569	4,749E+02	3,928E+02	3,158E+02	3,818E+02	2.169	2.373	1.790	1.786
		7.034	9.627	4,770E+02	3,911E+02	3,145E+02	3,835E+02	2.053	2.376	2.119	2.120
	7.736	11.361	4,058E+02	3,143E+02	3,697E+02	4,772E+02	2.016	2.506	1.974	1.967	
	7.777	11.340	4,055E+02	3,104E+02	3,699E+02	4,833E+02	2.019	2.454	2.007	1.952	
	10.213	22.023	3,557E+02	2,843E+02	4,218E+02	5,276E+02	0.665	0.719	4.449	4.881	
	15.165	22.643	3,468E+02	2,934E+02	4,325E+02	5,113E+02	0.679	0.821	3.105	3.197	

Lampiran 2. Parameter pengukuran dengan fasa gerak metanol dan buffer asetat pH 4.5

Laju (mL/min)	Metanol : Buffer	Waktu Retensi		HETP		Theoretical Plate		Tailing Factor		Resolution	
		NB	KS	NB	KS	NB	KS	NB	KS	225	254
0.8	40:60	12.190	15.416	5,130E+01	3,886E+01	2,924E+03	3,860E+03	2.062	2.001	3.444	3.401
		12.214	15.450	5,068E+01	3,820E+01	2,960E+03	3,926E+03	2.066	1.992	3.454	3.428
	15.162	19.978	3,910E+01	3,004E+01	3,837E+03	4,993E+03	2.014	1.970	4.601	4.562	
	15.206	19.998	4,029E+01	3,046E+01	3,723E+03	4,924E+03	2.029	1.951	4.458	4.513	
	26.480	35.089	3,017E+01	2,304E+01	4,972E+03	6,510E+03	1.967	1.978	7.210	7.176	
	26.485	35.130	3,127E+01	2,313E+01	4,797E+03	6,451E+02	2.006	1.955	7.323	7.198	

Laju (mL/min)	Metanol : Buffer	Waktu Retensi		HETP		Theoretical Plate		Tailing Factor		Resolution	
		NB	KS	NB	KS	NB	KS	NB	KS	225	254
1.0	40:60	9.984	12.675	4,771E+01	3,763E+01	3,144E+03	3,986E+03	2.060	1.993	3.650	3.552
		9.943	12.610	4,839E+01	3,807E+01	3,100E+03	3,940E+03	2.066	1.994	3.592	3.521
	12.445	16.455	3,769E+01	2,944E+01	3,980E+03	5,096E+03	2.027	1.968	4.692	4.675	
	12.405	16.398	3,816E+01	2,939E+01	3,931E+03	5,105E+03	1.933	1.958	4.705	4.688	
	20.035	28.787	2,496E+01	2,042E+01	6,009E+03	7,345E+03	2.008	1.961	7.465	7.337	
	20.036	28.876	2,539E+01	2,034E+01	5,908E+03	7,376E+03	1.953	1.959	7.482	7.705	

Lampiran 3. Parameter pengukuran dengan fasa gerak metanol dan buffer fosfat pH 6.8

Laju (mL/min)	Metanol : Buffer		Waktu Retensi		HETP		Theoretical Plate		Tailing Factor		Resolution	
			NB	KS	NB	KS	NB	KS	NB	KS	225	254
0.8	35:65		5.622	6.336	1,516E+02	1,193E+02	9,895E+02	1,257E+03	2.843	2.560	0.883	0.984
			5.593	6.296	1,545E+02	1,210E+02	9,707E+02	1,239E+03	2.906	2.565	0.853	1.006
	25:75		6.840	8.062	1,004E+02	7,909E+01	1,494E+03	1,870E+03	2.707	2.172	1.679	1.675
			6.861	8.074	9,965E+01	7,508E+01	1,505E+03	1,981E+03	2.673	2.257	1.685	1.695
	20:80		7.817	9.485	8,974E+01	6,094E+01	1,671E+03	2,461E+03	2.452	2.094	2.183	2.191
			7.872	9.605	8,504E+01	4,744E+01	1,764E+03	3,162E+03	2.534	1.668	2.425	2.403
15:85		9.073	11.284	6,317E+01	4,519E+01	2,374E+03	3,320E+03	1.792	1.755	2.903	2.883	
		9.036	11.229	6,222E+01	4,490E+01	2,411E+03	3,341E+03	1.785	1.744	2.914	2.886	

Laju (mL/min)	Metanol : Buffer		Waktu Retensi		HETP		Theoretical Plate		Tailing Factor		Resolution	
			NB	KS	NB	KS	NB	KS	NB	KS	225	254
1.0	35:65		5.044	5.765	1,141E+02	7,017E+01	1,314E+03	2,138E+03	2.408	2.538	1.320	1.350
			4.772	5.447	1,535E+02	9,313E+01	9,771E+02	1,611E+03	2.399	2.584	1.052	1.184
	25:75		5.662	6.683	9,047E+01	6,523E+01	1,658E+03	2,299E+03	2.342	2.120	1.826	1.847
			5.616	6.622	8,493E+01	6,406E+01	1,766E+03	2,342E+03	2.345	2.106	1.822	1.842
	20:80		6.394	7.779	7,451E+01	5,163E+01	2,013E+03	2,905E+03	2.051	1.812	2.051	1.812
			6.692	8.223	7,728E+01	4,711E+01	1,941E+03	3,184E+03	2.157	1.610	2.587	2.554
15:85		7.361	9.171	6,002E+01	4,023E+01	2,499E+03	3,729E+03	1.757	1.707	3.056	3.038	
		7.335	9.129	5,823E+01	4,246E+01	2,576E+03	3,533E+03	1.762	1.718	3.045	2.988	

Lampiran 4. Presisi larutan standar natrium benzoat dan kalium sorbat

Natrium Benzoat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area			Waktu Retensi (tr)		
	Rata-rata	SD	RSD	Rata-rata	SD	RSD
10	616315,1667	7472,748609	1,21248819	7,344166667	0,071641934	0,975494389
20	1343978,833	14179,39902	1,055031424	7,32	0,014764823	0,201705233
40	2701656,333	11837,39793	0,438153358	7,403166667	0,056428421	0,762220051
60	4244446	24148,20793	0,568936627	7,332	0,013928388	0,189967107
80	5564886,833	41441,94411	0,744704166	7,3655	0,043246965	0,587155865
100	7105791,5	50087,06151	0,7048766	7,371166667	0,029020108	0,393697623
rata-rata	3596179,111	24861,12652	0,787365061	7,356	0,038171773	0,518373378

Kalium Sorbat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area			Waktu Retensi (tr)		
	Rata-rata	SD	RSD	Rata-rata	SD	RSD
1	122071,1667	881,1482093	0,721831562	8,8534	0,032608281	0,368313655
5	1010609,167	15231,6499	1,507175118	8,7738	0,088145902	1,004649089
10	2067041,667	6370,390935	0,308188801	8,8345	0,035138298	0,397739523
20	4145767,667	15969,78802	0,385207018	8,800333333	0,018228183	0,207130601
40	8336153,333	16430,4126	0,197098253	8,857666667	0,026189056	0,295665407
60	12587020,17	16198,83852	0,128694785	8,773333333	0,020867838	0,237855297
rata-rata	4711443,861	11847,03803	0,541365923	8,815505556	0,036862926	0,418558929

Keterangan :

- SD : Standar deviasi
- RSD : Standar deviasi relatif

Lampiran 5. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) natrium benzoat

n	x_i	y_i	x_i^2	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i^2	$x_i y_i$	\bar{y}_i	$(y_i - \bar{y}_i)^2$
1	10	616315,1667	100	1736,111111	3,79844E+11	6163151,667	604875,5913	130863884,6
2	20	1343978,833	400	1002,777778	1,80628E+12	26879576,67	1322788,436	449032939,1
3	40	2701656,333	1600	136,111111	7,29895E+12	108066253,3	2758614,125	3244190077
4	60	4244446	3600	69,44444444	1,80153E+13	254666760	4194439,815	2500618558
5	80	5564886,833	6400	802,777778	3,0968E+13	445190946,7	5630265,504	4274370604
6	100	7105791,5	10000	2336,111111	5,04923E+13	710579150	7066091,194	1576114328
Jumlah	310	21577074,67	22100	6083,333333	1,08961E+14	1551545838	21577074,67	12175190392
Rata-rata	51,66666667							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{12175190392}{6-2}} = 55170,6226$$

$$\text{LoD} = \frac{3 \times \text{SD}}{\text{slope}} = \frac{3 \times 55170,6226}{71791} = 2,30545 \text{ ppm}$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{slope}} = \frac{10 \times 55170,6226}{71791} = 7,68486 \text{ ppm}$$

Lampiran 6. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) kalium sorbat

n	x_i	y_i	x_i^2	$(x_i - \bar{x})^2$	y_i^2	$x_i y_i$	\tilde{y}_i	$(y_i - \tilde{y}_i)^2$
1	1	122071,1667	1	469,4444444	14901369731	122071,1667	144655,8156	510066365,2
2	5	1010609,167	25	312,1111111	1,02133E+12	5053045,833	987117,988	551835477,5
3	10	2067041,667	100	160,4444444	4,27266E+12	20670416,67	2040195,703	720705741
4	20	4125060	400	7,111111111	1,70161E+13	82501200	4146351,134	453312406,2
5	40	8336153,333	1600	300,4444444	6,94915E+13	333446133,3	8358661,996	506639915,3
6	60	12587020,17	3600	1393,777778	1,58433E+14	755221210	12570972,86	257516101
jumlah	136	28247955,5	5726	2643,333333	2,5025E+14	1197014077	28247955,5	3000076006
Rata-rata	22,66666667							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \tilde{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{3000076006}{6-2}} = 27386,47479$$

$$\text{LoD} = \frac{3 \times \text{SD}}{\text{slope}} = \frac{3 \times 27386,47479}{210615} = 0,39009 \text{ ppm}$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{\text{slope}} = \frac{10 \times 27386,47479}{210615} = 1,30031 \text{ ppm}$$

Lampiran 7. Analisa kuantitatif natrium benzoat pada sampel kecap

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Kecap A	620946	10,223886	511,1943001	5,370556025	517,1068 \pm 5,3705
	636006	10,4336616	521,6830801		
	631354	10,36886239	518,4431196		
Rata-rata	629435,3333	10,34213667	517,1068333		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Kecap B	584239	9,712582357	485,6291179	8,326697756	495,2376 \pm 8,3267
	604497	9,994762575	499,7381287		
	605369	10,00690894	500,3454472		
Rata-rata	598035	9,904751292	495,2375646		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Kecap C	1284752	19,47025393	973,5126966	7,848390344	978,7789 \pm 7,8484
	1286923	19,50049449	975,0247245		
	1305265	19,75598613	987,7993063		
Rata-rata	1292313,333	19,57557818	978,7789091		

Keterangan :

x = Kadar natrium benzoat (mg/L) dihitung dari persamaan garis $y = 71791x - 113037$ yang diperoleh dari kurva linearitas natrium benzoat

SD = standar deviasi kadar natrium benzoat dalam sampel kecap

Lampiran 8. Analisa kuantitatif natrium benzoat pada sampel saus

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Saus A	2011938	29,59946233	1479,973116	7,159760791	1471,7615 \pm 7,1598
	1995445	29,36972601	1468,486301		
	1993060	29,33650458	1466,825229		
Rata-rata	2000147,667	29,43523097	1471,761549		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Saus B	1240022	18,84719533	942,3597665	5,60242148	940,1025 \pm 5,6024
	1227622	18,67447173	933,7235865		
	1242699	18,88448413	944,2242064		
Rata-rata	1236781	18,8020504	940,1025198		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Saus C	2568158	37,34723015	1867,361508	13,02824934	1871,2993 \pm 13,0282
	2558585	37,21388475	1860,694237		
	2594693	37,71684473	1885,842236		
Rata-rata	2573812	37,42598654	1871,299327		

Keterangan :

x = Kadar natrium benzoat (mg/L) dihitung dari persamaan garis $y = 71791x - 113037$ yang diperoleh dari kurva linearitas natrium benzoat

SD = standar deviasi kadar natrium benzoat dalam sampel saus

Lampiran 9. Analisa kuantitatif kalium sorbat pada sampel kecap

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Kecap A	5854039	28,10815469	1405,407734	7,931478321	1413,5883 \pm 7,9315
	5890706	28,2822496	1414,11248		
	5920749	28,42489376	1421,244688		
Rata-rata	5888498	28,27176602	1413,588301		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Kecap B	5953882	28,58220924	1429,110462	14,08964044	1413,0091 \pm 140896
	5843640	28,05878024	1402,939012		
	5860653	28,13955796	1406,977898		
Rata-rata	5886058,333	28,26018248	1413,009124		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Kecap C	1266530	6,326662393	316,3331197	7,888634335	325,3916 \pm 7,8886
	1327261	6,615013176	330,7506588		
	1320270	6,581819908	329,0909954		
Rata-rata	1304687	6,507831826	325,3915913		

Keterangan :

x = Kadar kalium sorbat (mg/L) dihitung dari persamaan garis $y = 210615x - 65960$ yang diperoleh dari kurva linearitas kalium sorbat

SD = standar deviasi kadar kalium sorbat dalam sampel kecap

Lampiran 10. Analisa kuantitatif kalium sorbat pada sampel saus

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Saus B	1317597	6,569128505	328,4564252	3,248318763	326,1070 \pm 3,2483
	1292086	6,448002279	322,400114		
	1313418	6,549286613	327,4643307		
Rata-rata	1307700,333	6,522139132	326,1069566		

Sampel	Luas	x	kadar (mg/Kg)	SD	kadar \pm SD
Saus C	138284	0,969750493	48,48752463	0,376297415	48,1255 \pm 0,3763
	135120	0,954727821	47,73639105		
	136873	0,963051065	48,15255324		
Rata-rata	136759	0,962509793	48,12548964		

Keterangan :

x = Kadar kalium sorbat (mg/L) dihitung dari persamaan garis $y = 210615x - 65960$ yang diperoleh dari kurva linearitas kalium sorbat

SD = standar deviasi kadar kalium sorbat dalam sampel saus

Lampiran 11. Persen perolehan kembali natrium benzoat pada sampel kecap

	Luas	x	Luas*	x*	% recovery
	620946	10,223886	3410692	49,08315806	93,6630404
	636006	10,4336616	3297431	47,50550905	
	631354	10,36886239	3249179	46,83339137	
Rata-rata	629435,3333	10,34213667	3319100,667	47,80735283	

Keterangan :

Luas* = Luas setelah penambahan standar natrium benzoat

x = Kadar (mg/L) sebelum penambahan larutan baku natrium benzoat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 71791 x - 113037$

x* = Kadar (mg/L) setelah penambahan larutan baku natrium benzoat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 71791 x - 113037$

$$\% Recovery = \frac{\bar{x}^* - \bar{x}}{C_a^*} \times 100\%$$

dimana $C_a^* = 40$ ppm

$$\% Recovery = \frac{47,80735283 - 10,34213667}{40} \times 100\% = 93,6630404 \%$$

Lampiran 12. Persen perolehan kembali kalium sorbat pada sampel kecap

	Luas	x	Luas**	x**	% recovery
	5854039	28,10815469	13637829	65,06558887	92,33022339
	5890706	28,2822496	13549785	64,64755597	
	5920749	28,42489376	13813236	65,89842129	
rata-rata	5888498	28,27176602	13666950	65,20385538	

Keterangan :

Luas** = Luas setelah penambahan standar kalium sorbat

x = Kadar (mg/L) sebelum penambahan larutan baku kalium sorbat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 210615x - 65960$

x** = Kadar (mg/L) setelah penambahan larutan baku kalium sorbat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 210615x - 65960$

$$\% Recovery = \frac{\bar{x}^{**} - \bar{x}}{C_a^*} \times 100\%$$

dimana $C_a^* = 40$ ppm

$$\% Recovery = \frac{65,20385538 - 28,27176602}{40} \times 100\% = 92,33022339\%$$

Lampiran 13. Persen perolehan kembali natrium benzoat pada sampel saus

	Luas	x	Luas*	x*	% recovery
	1240022	18,84719533	3837677	55,03076987	92,44315676
	1227622	18,67447173	3856193	55,28868521	
	1242699	18,88448413	3980377	57,01848421	
Rata-rata	1236781	18,8020504	3891415,667	55,7793131	

Keterangan :

Luas* = Luas setelah penambahan standar natrium benzoat

x = Kadar (mg/L) sebelum penambahan larutan baku natrium benzoat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 71791 x - 113037$

x* = Kadar (mg/L) setelah penambahan larutan baku natrium benzoat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 71791 x - 113037$

$$\% Recovery = \frac{\bar{x}^* - \bar{x}}{C_a^*} \times 100\%$$

dimana $C_a^* = 40$ ppm

$$\% Recovery = \frac{55,7793131 - 18,8020504}{40} \times 100\% = 92,44315676\%$$

Lampiran 14. Persen perolehan kembali kalium sorbat pada sampel saus

	Luas	x	Luas**	x**	% recovery
	1317597	6,569128505	9238546	44,1777936	93,49920471
	1292086	6,448002279	9147993	43,74784797	
	1313418	6,549286613	9167364	43,83982148	
Rata-rata	1307700,333	6,522139132	9184634,333	43,92182102	

Keterangan :

Luas** = Luas setelah penambahan standar kalium sorbat

x = Kadar (mg/L) sebelum penambahan larutan baku kalium sorbat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 210615x - 65960$

x** = Kadar (mg/L) setelah penambahan larutan baku kalium sorbat yang dihitung melalui persamaan garis $y = 210615x - 65960$

$$\% Recovery = \frac{\bar{x}^{**} - \bar{x}}{C_a^*} \times 100\%$$

dimana $C_a^* = 40$ ppm

$$\% Recovery = \frac{43,92182102 - 6,522139132}{40} \times 100\% = 93,49920471\%$$