

VALIDASI METODE PENENTUAN SAKARIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Agus Kembaren dan Tiasina Harahap

Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Medan, Medan
Alumni Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Medan
email: agus.kembaren@yahoo.co.id

Abstract. This research was aimed to validation analytical method of Saccharine and to determine saccharine concentration in soft drink High Performance Liquid Chromatography. Sodium Saccharine salts are used as standard. Sodium Saccharine salts dissolve in mobile phase methanol : fosfat buffer (60:40). Concentration of standard saccharine solution made in 20, 40, 60, 80, and 100 ppm. HPLC Agilent Technology 1260 Infinitely Series, Poroshell/C18 column- 50 mm length- id 4.6 mm - particles size 2.7 μ m, UV-detector in λ 265 nm, injection volume 20 μ L , and flow rate 1 mL/minutes were used in this research. Method validation parameters were determined by liness, precision, accuracy, LOD, LOQ, and selectivity. The results show that linearity with $R = 0.998702$, precision with $RSD = 0.192\%$, accuracy with % recovery = 100.26%, $LOD = 0.172$ ppm, $LOQ = 0.573$, and selectivity with $R_s = 0.2$. Testing for the 'Sprite Zero' soft drink show that 117.6 mg/kg saccharine (under the maximum content in carbonated/noncarbonated soft drink). Conclusion from this research is, HPLC method can use in analysis saccharine content in soft drink

Kata kunci: metode penentuan, sakarin, kromatografi kinerja tinggi

PENDAHULUAN

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Dengan kata lain tujuan dari validasi metode analisis adalah untuk mengkonfirmasi atau memastikan metode analisis yang dipakai sesuai untuk peruntukannya. Adapun parameter-parameter tersebut antara lain adalah akurasi (kecermatan), presisi (keseksamaan), selektifitas, linieritas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitas, ketangguhan metode, kekuatan metode.

Akurasi, adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut

seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur. Kriteria penerimaan akurasi (% *recovery*) adalah 98% - 102% (Mulyati, dkk. 2011, Shabir, 2003).

% Perolehan kembali

$$(\text{recovery}) = \frac{C_p}{C_t} \times 100\%$$

C_p = konsentrasi sampel yang diperoleh dari pengukuran (praktek).

C_t = konsentrasi sampel teoritis.

Presisi 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. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2004). Menurut Shabir (2003), prosedur spesifik untuk penentuan presisi suatu metode dilakukan minimal sembilan penentuan untuk menentukan *range* dari prosedur

(tiga konsentrasi dengan tiga kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi). Presisi dapat dihitung dengan cara sebagai berikut :

1. Hasil analisis adalah $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$ maka simpangan bakunya adalah

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

2. Simpangan baku relatif (SBR) adalah :

$$SBR = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Selektifitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahanlain yang ditambahkan. Penyimpanagn hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektifitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (R_s) dimana syarat resolusinya adalah $\geq 1,5$ (Shabir, 2003). Resolusi adalah ukuran yang menunjukkan bagaimana dua peak yang dihasilkan terpisah dengan baik. Menurut *Food and Drug Administration* (1994), rumus resolusi (R_s) adalah sebagai berikut :

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 (t_{w1} + t_{w2})} \text{dimana :}$$

t_R = retention time of analyte, dan t_w = peakwidth measured at baseline.

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk memberikan responsecara langsung atau tidak langsung, dengan bantuan

transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Wells dan Dantus, 2005). Linearitas suatu metode diuji untuk memastikan adanya hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon detektor. Koefisien korelasi (R) adalah parameter yang menunjukkan adanya hubungan linier antara respon analitik (luas area) dengan konsentrasi analit yang diukur pada kurva kalibrasi. Suatu metode dikatakan memenuhi kriteria lineritas jika nilai koefisien korelasi (R) mendekati 1 (Novelina, dkk. 2009). Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Menurut Shah, *et al.* (2000) dalam Wells dan Dantus (2005),prosedur untuk penentuan linearitas suatu metode dilakukan minimal dengan tiga konsentrasi yang menggambarkan *range* dari kurva kalibrasi yaitu konsentrasi yang dekat dengan nilai LOQ, konsentrasi pertengahan, dan konsentrasi yang merupakan batas terendah dari kurva kalibrasi.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $Y = ax + b$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

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

Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula dibawah ini dapat digunakan untuk perhitungan :

$$Q = \frac{k \times SD}{S}$$

dimana : Q = Batas deteksi atau Batas kuantitas., k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitas, SD= Standar Deviasi intersep pada persamaan regresi linier., S = Slope dari persamaan regresi linier (nilai a pada $y = ax+b$) (ICH, 1996)

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. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan antar analis.

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 organic fase gerak (1%), pH fase gerak ($\pm 0,2$ unit) dan perubahan temperature kolom ($\pm 2 - 3^\circ\text{C}$). Perubahan lainnya dapat dilakukan bila sesuai dengan laboratorium. Identifikasi sekurang – kurangnya 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila diganti atau diubah (Harmita, 2004).

METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA UNIMED Jl. Williem Iskandar Psr V Medan Estate, Medan. Penelitian ini berlangsung selama 5 bulan, selain perencanaan dan analisis data.

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : Natrium Sakarin (Supelco), Standar Natrium Siklomat (Supelco), Methanol

HPLC Grade (Merck), KH_2PO_4 (Merck), K_2HPO_4 (Merck), Aquades, dan Aquabides. Semua bahan kimia yang digunakan memiliki kemurnian yang tinggi (pa).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : KCKT (HPLC Agilent Technology 1260 Infinitely Series) detektor UV, Kolom C_{18} , Neraca analitik, Kertas saring, penyaring vakum, Vial dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium kimia. Semua peralatan merupakan milik Laboratorium Kimia Universitas Negeri Medan.

Prosedur Kerja

Kolom yang digunakan Poroshell/ C_{18} -panjang 50 mm, diameter dalam 4,6 mm dengan ukuran partikel 2,7 μm , Detektor UV set pada panjang gelombang 265 nm, Volume Injeksi 20 μL , Fase Gerak Datar Posfat : Metanol (60:40), Laju Alir 1 mL/menit, Temperatur Kolom 24°C

Sebanyak 0,9524 g K_2HPO_4 dan 1,2551 g dan KH_2PO_4 ditimbang dan dimasukkan kedalam labu takar 500 mL. Sediaan ini dilarutkan dengan 25 mL metanol dan aquabides sampai tanda tera, lalu dihomogenkan.

Larutan baku diperoleh dengan menimbang sebanyak 100 mg standar Na- sakarin lalu dimasukkan ke dalam labu 100 mL dan dilarutkan dengan fase gerak sampai tanda tera, dihomogenkan (larutan mengandung 1.000 ppm). Persiapan standar yang akan digunakan dengan membuat deret standar yang memiliki konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Larutan-larutan tersebut diperoleh melalui pengenceran dengan memipet 1, 2, 3, 4 dan 5mL larutan baku standar sakarin 1.000 ppm diencerkan dengan fase gerak hingga volume 50 mL. Larutan kemudian disaring, dan siap untuk digunakan.

Preparasi sampel

Ditimbang kurang lebih 0.5293 g sampel dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL kemudian tambahkan larutan fase gerak hingga tanda batas, dihomogenkan dan disaring. Filtrat

yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam vial. Larutan siap untuk diinjeksikan (Novelina, dkk. 2009).

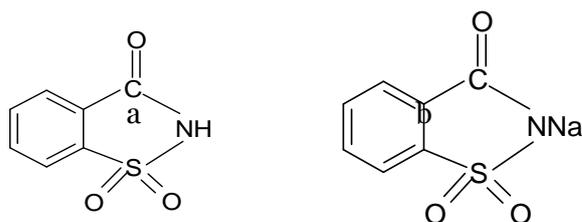
Beberapa aspek yang diukur dalam validasi metode adalah selektifitas, linieritas, presisi, akurasi, limit deteksi, limit kuantitasi. Penetapan selektifitas dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa placebo (sediaan farmasi) dengan hasil analisis sampel lain dengan kondisi kerja yang sama. Sedangkan uji linieritas diperoleh dari data pengukuran larutan deret standar yang telah dibuat sehingga diperoleh kurva kalibrasi dan persamaan regresinya. Uji presisi dilakukan dengan cara pengulangan (*repeatability*) 3 kali larutan standar yang di buat sesuai prosedur yang diinjeksikan pada hari yang sama sehingga diperoleh data yang akan dinyatakan nilai presisinya sebagai simpangan baku relatif (% SBR). Uji akurasi (uji perolehan kembali) dilakukan dengan membuat larutan standar sesuai prosedur diulangi sebanyak 3 kali dan masing-masing diinjeksikan ke dalam alat KCKT. Nilai akurasi dinyatakan sebagai % *recovery*. Pengukuran limit deteksi dilakukan dengan mengolah data yang diperoleh

dari hasil pengukuran linieritas standar sehingga diperoleh nilai *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantitation (LOQ)*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekilas Sakarin dan metode analisis

Sakarin ditemukan secara tidak sengaja oleh Fahbelrg dan Remsen pada tahun 1987. Ketika pertama kali ditemukan sakarin digunakan sebagai pengawet, tetapi sejak tahun 1900 digunakan sebagai pemanis (Cahyadi, 2006). Sakarin adalah pemanis buatan yang memiliki struktur dasar *Sulfinida Benzoat* tidak menghasilkan kalori. Sakarin jauh lebih manis dibandingkan sukrosa dengan perbandingan rasa manis kira-kira 350 kali lebih tinggi dari kemanisan sukrosa (angka perbandingan ini berdasarkan nilai ambang batas) (Woodroof, 1974). Rumus molekul sakarin adalah $C_7H_5NO_3S$ dan berat molekulnya 183,18. Sakarin memiliki struktur kimia terlihat pada gambar 1.a. Sakarin lebih stabil dalam bentuk garam sehingga sering dijumpai dalam bentuk garam Natriumnya dengan struktur seperti terlihat pada gambar 1.b.



Gambar 1. Struktur Kimia a) Sakarin, b) Na-Sakarin

Dalam perdagangan dikenal dengan nama glucid, gucide, garantose, saccharimol, saccharol dan sykosa. Secara umum, garam sakarin berbentuk kristal putih, tidak berbau atau berbau aromatik lemah, dan mudah larut dalam air, serta berasa manis (SNI 01-6993-2004). Penggunaan sakarin tergantung dari intensitas kemanisan yang dikehendaki. Pada konsentrasi tinggi,

sakarin akan menimbulkan rasa pahit-getir (nimbrah), hal ini disebabkan oleh kemurnian yang rendah dari proses sintesis (Winarno, 1991). Natrium sakarin didalam tubuh tidak mengalami metabolisme sehingga diekskresikan melalui urine tanpa perubahan kimia. Sakarin memiliki tingkat kemanisan relatif sebesar 300 sampai dengan 500 kali tingkat kemanisan sukrosa tanpa

nilai kalori (SNI 01-6993-2004). Nilai kalori : 0 kkal/g atau setara dengan 0 kJ/g dan ADI (*Acceptable Daily Intake*) : 5 mg/kg berat badan.

Sakarin banyak dipakai sebagai pengganti gula pada penderita kencing manis atau untuk makanan yang berkalori rendah. Meskipun masih diperbolehkan sebagai pemanis bahan makanan di Amerika Serikat namun pemakaiannya sangat dibatasi. Pada tahun 1971, suatu penelitian yang dilakukan oleh *Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF)* membuktikan bahwa sakarin tergolong pada zat penyebab kanker (*carcinogen*).

Dari 15 ekor tikus yang diberi sakarin, 5% atau 7 ekor diantaranya menderita kanker pada kantung empedu setelah memakan sakarin dalam ransumnya selama 2 tahun (Wightman, 1977 dalam Djojosoebagio dan Wiranda, 1996). Kemudian pada tahun 1977, *Canada's Health Protection Branch* melaporkan bahwa sakarin bertanggung jawab terhadap terjadinya kanker kantung kemih. Sejak itu, sakarin dilarang digunakan di Kanada kecuali sebagai pemanis yang dijual di apotek dengan mencantumkan label peringatan (Cahyadi, 2006). Menurut Sinulingga (2011), penggunaan sakarin yang berlebihan, dapat menimbulkan bahaya bagi kesehatan manusia, antara lain migran atau sakit kepala, kehilangan daya ingat, bingung, insomnia, iritasi, asma, hipertensi, diare, sakit perut, alergi, impotensi dan gangguan seksual, kebotakan, kanker otak dan kanker kantung kemih.

Untuk menghindari dampak tersebut diatas maka telah ditetapkan batasan maksimum sakarin kategori minuman ringan berkarbonasi dan non-karbonasi sebesar 500 mg/kg (SNI 01-6993-2004). Namun, terkait masalah penambahan pemanis buatan dalam minuman masih terdapat kadar sakarin atau garamnya yang melebihi ambang batas dalam minuman yang beredar di pasaran seperti pada penelitian Ranitha Sinulingga (2004) yang mendapatkan kadar natrium sakarin dalam es doger yang termasuk kategori minuman jajanan yang dipasarkan di SD Negeri

No. 064025 Jln. Flamboyan Kelurahan Simpang Selayang Kecamatan Medan Tuntungan sebanyak 310,5 mg/kg dari batas maksimal 300 mg/kg yang ditetapkan SNI 01-6993-2004 begitu juga dengan penelitian yang dilakukan Subani (2008) yang mendapatkan kadar natrium sakarin sebesar 564 mg/kg dalam sirup markisa pohon pisang dari batas maksimal 300 mg/kg yang ditetapkan SNI 01-6993-2004.

Metode analisis yang dapat dilakukan untuk analisis sakarin dalam minuman antara lain adalah spektrofotometri (MA PPOM No.47/MA/93), volumetri, dan kromatografi cair kinerja tinggi. Namun beberapa metode tersebut memiliki beberapa kelemahan seperti pada spektrofotometri memiliki kelemahan yaitu membutuhkan banyak perlakuan pada sampel yang dikhawatirkan akan memperbesar kesalahan pengukuran, terlalu banyak jumlah bahan yang digunakan, dan waktu yang dibutuhkan relatif lama. Kemudian pada metode volumetri meski merupakan metode yang memiliki kelebihan seperti murah, tahan dan mampu memberikan ketepatan (presisi) yang tinggi namun keterbatasan metode ini adalah bahwa metode ini kurang spesifik. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi juga memiliki beberapa kelemahan namun dibanding dengan metode yang lainnya metode ini lebih banyak memiliki kelebihan untuk proses analisis.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair, pada awalnya dilakuka dalam kolom gelas berdiameter besar dalam kondisi tekanan atmosfer. Waktu yang dibutuh untuk suatu analisis relatif lama. Pada akhir tahun 1960-an, telah dilakukan berbagai upaya untuk mengembangkan kromatografi cair sehingga dapat mengimbangi penggunaan kromatografi gas. Upaya-upaya tersebut kemudian menghasilkan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Kemajuan teknologi instrumentasi dan pengepakan kolom telah mempercepat pemanfaatan

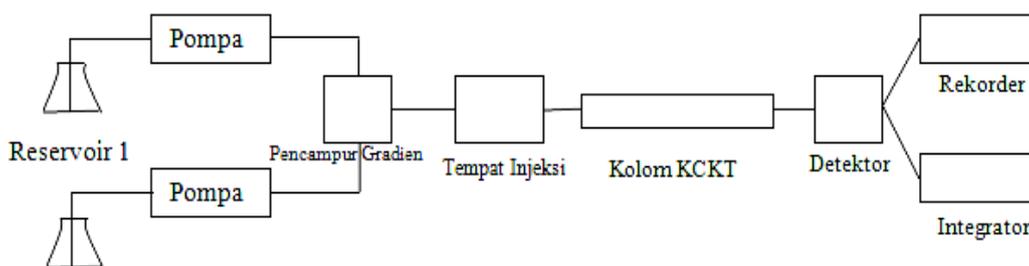
menjadi setara dengan kromatografi gas.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya (Snyder dan Kirkland, 1979; Johnson dan Stevenson, 1978). Kelebihan itu antara lain: mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, mudah mengoperasikannya, kecepatan dan kepekaan yang tinggi, resolusi yang

baik, dapat menggunakan bermacam-macam detektor, mudah melakukan "sample recovery", dapat pula ditandemkan dengan instrumen lain.

Sebagai mana instrumen lainnya, KCKT juga memiliki kelemahan/kekurangan. Kekurangan metode ini antara lain : larutan harus dicari fase diamnya terlebih dahulu, mengetahui kondisi yang optimum antara pelarut, analit dan gradien elusi, dan harganya yang relatif mahal sehingga penggunaannya dalam lingkup penelitian sangat terbatas.

Komponen-komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat dilihat pada gambar 2.



Reservoir 2

Gambar 2. Diagram Blok KCKT

Sebagaimana metode analisis lainnya, analisis dengan KCKT tentu memerlukan validasi metode (penentuan kinerja analitis). Terkait keberadaan di Laboratorium Kimia FMIPA Unimed dan berdasarkan pernyataan-pernyataan diatas maka dilakukanlah penelitian untuk mempelajari validasi metode penentuan kadar sakarin dalam minuman ringan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Hasil Uji Linieritas Standar

Uji linieritas adalah suatu metode analisis yang dilakukan untuk melihat kemampuan suatu metode analisis dalam memberikan respon yang baik padaberbagai macam konsentrasi analit. Koefisien korelasi (R) adalah parameter yang menunjukkan adanya hubungan linier antara respon analitik (luas area) dengan konsentrasi analit yang diukur pada kurva kalibrasi.

Tabel 1. Luas Area, Tinggi Puncak dan Waktu Retensi Kromatogram Larutan Standar Sakarin Dengan Konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

No	Konsentra	Replikasi	Luas Area	Tinggi Puncak	R _t (menit)
1	20 ppm	1	1673,98804	296,82367	0,583
		2	1664,66931	290,26624	0,581
		3	1663,93774	285,81686	0,581
2	40 ppm	1	3239,83179	545,77930	0,574
		2	3233,34473	539,02576	0,577
		3	3222,23438	526,70325	0,570
3	60 ppm	1	5122,33253	813,26843	0,565

		2	5131,63281	787,13086	0,569
		3	5117,39355	813,57080	0,562
4	80 ppm	1	6504,45020	1013,06299	0,563
		2	6508,63379	979,13727	0,566
		3	6496,99268	967,48199	0,561
5	100 ppm	1	8525,14746	1088,20728	0,555
		2	8499,14160	1109,39282	0,550
		3	8501,92383	1114,08960	0,551

Pada penelitian ini larutan standar sakarin dipreparasi dengan fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm yang kemudian diinjeksikan sebanyak tiga kali untuk setiap konsentrasi kedalam KCKT sehingga menghasilkan respon analitik berupa luas area kromatogram, tinggi puncak kromatogram dan waktu retensi (R_t). Data luas area, tinggi puncak

kromatogram dan waktu retensi dapat dilihat pada Tabel 1. Dari data pada Tabel 1. dapat dicari persamaan garis regresi linier untuk setiap tahap replikasi (pengulangan) dari deret konsentrasi standar. Persamaan regresi linier untuk setiap replikasi (pengulangan) deret standar dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai a, b dan R pada persamaan garis regresi linier untuk setiap replikasi deret standar.

Replika	Nilai Pada Persamaan Garis Regresi Linier ($y = ax+b$)		
	a	b	R
1	84,834686	-76,931173	0,998665
2	84,721168	-75,785644	0,998751
3	84,753652	-84,722708	0,998692
\bar{x}	84,769835	-79,146508	0,998702

Dari tabel 2. dapat dilihat bahwa dari ketiga replikasi yang dilakukan nilai koefisien korelasi (R) rata-rata adalah 0,998702 dimana nilai ini sangat baik karena mendekati 1. Suatu metode dikatakan memenuhi kriteria linieritas jika nilai koefisien korelasi (R) mendekati 1 (Novelina, dkk. 2009). Nilai koefisien korelasi (R) ini menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan telah memenuhi kriteria linieritas dari rentang konsentrasi 20-100 ppm. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa KCKT ini memberikan respon analitik yang baik terhadap deret konsentrasi standar yang dianalisis.

Hasil Uji Presisi , akurasi, limit deteksi dan selektifitas

Uji presisi dilakukan dengan cara mempreparasi larutan standar sakarin dengan fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm kemudian diinjeksikan kedalam KCKT sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian sebagai hasilnya diperoleh luas area kromatogram. Perhitungan kadar dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 2). Hasil perhitungan dengan berdasarkan persamaan garis regresi linier menunjukkan bahwa rata-rata % SBR (Simpangan Baku Relative) pada *range* konsentrasi 20-100 ppm adalah 0,192%. Presisi suatu metode dikatakan telah memenuhi syarat keberterimaan jika nilai dari % SBR \leq 2% (Harmita, 2004). Dari hasil presisi yang diperoleh,

dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan telah memenuhi syarat keberterimaan. Hal ini juga menjadi suatu informasi bahwa sistem operasional alat dan analisis memiliki nilai presisi yang baik terhadap metode dengan respon yang relatif konstan.

Akurasi merujuk pada pengertian ketepatan atau kecermatan, dimana merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil yang diperoleh dalam analisis dengan nilai sebenarnya. Akurasi memenuhi syarat keberterimaan jika nilai % perolehan kembali (*recovery*) adalah 98% - 102% (Mulyati, dkk. 2011, Shabir, 2003). Pada penentuan nilai akurasi ini tidak berbeda jauh dengan presisi. Penentuan

dilakukan dengan cara mempreparasi larutan standar sakarin dengan fase gerak sehingga diperoleh konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm kemudian diinjeksikan kedalam KCKT sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Luas area kromatogram yang dihasilkan masing-masing dimasukkan kedalam persamaan garis regresi linier yang telah diperoleh dari kurva kalibrasi deret standar. Kadar analit yang terukur untuk setiap konsentrasi dirata-ratakan, maka diperoleh % perolehan kembali (*recovery*) 100,26% yang berada pada rentang 97,06% - 103,02% dalam *range* konsentrasi 20-100 ppm. Hasil uji akurasi dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Data Hasil Uji Akurasi

No	Konsentrasi Standar	Konsentrasi Praktek	% <i>Recovery</i>
1	20 ppm	20,604	103,02%
2	40 ppm	39,058	97,64%
3	60 ppm	61,377	102,28%
4	80 ppm	77,651	97,06%
5	100 ppm	101,308	101,31%
Rata-rata			100,26%

Nilai rata-rata hasil dari uji akurasi yang menunjukkan % *recovery* 100,26% menunjukkan bahwa tingkat akurasi metode ini memenuhi syarat keberterimaan. Menurut Mulyati, dkk. (2011), Shabir (2003), kriteria penerimaan akurasi (% *Recovery*) adalah 98% - 102%. Hasil % *recovery* yang berada pada rentang 97,06% - 103,02% juga merupakan indikator kecenderungan terjadinya kesalahan acak yang terjadi pada praktek yang disebabkan oleh senyawa pengganggu yang masih terbawa oleh matriks meskipun telah dilakukan penyaringan. Oleh karena adanya senyawa pengganggu ini menyebabkan konsentrasi yang terukur oleh alat sebagian lebih rendah dan sebagian yang lain lebih tinggi dari 100%. Menurut Novelina, dkk. (2009) kesalahan acak ini dapat diminimalisasi dengan melakukan sonikasi terhadap larutan uji pada rentang waktu tertentu.

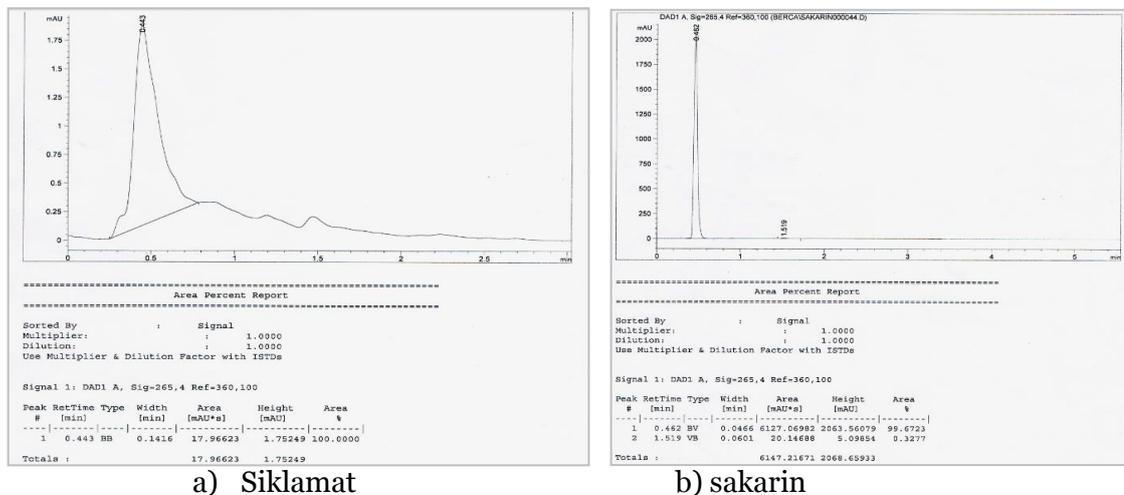
Pembahasan mengenai limit deteksi dan limit kuantitasi ini tidak dapat dipisahkan karena keduanya memiliki hubungan yang sangat kuat. Secara praktis cara evaluasi keduanya dapat dikatakan tidak ada perbedaan yang signifikan. Perbedaan antara keduanya hanya pada sifat kuantitatif data yang diperoleh (Novelina, dkk. 2009). Limit deteksi diartikan sebagai konsentrasi analit terendah yang dapat dideteksi tetapi tidak secara kuantitatif sedangkan untuk limit kuantitasi diartikan sebagai konsentrasi terendah dari analit yang dapat dideteksi secara kuantitatif. Pada penelitian ini perhitungan dari limit deteksi dan limit kuantitasi diperoleh dari nilai intersep dari persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi (lihat tabel 2) yang telah dihasilkan. Pada penelitian ini nilai limit deteksi (LOD) yang diperoleh 0,172 ppm sedangkan nilai limit kuantitasi (LOQ) 0,573 ppm.

Uji selektifitas pada penelitian ini dilakukan dengan cara membandingkan kromatogram standar sakarin yang akan dianalisis dengan kromatogram senyawa lain sebagai pembanding, dalam penelitian ini senyawa yang digunakan sebagai pembanding adalah siklamat. Kromatogram yang diperoleh berasal dari kondisi kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang sama yaitu dengan konsentrasi 1000 ppm, volume injeksi 20 μ L, panjang gelombang UV 265 nm. Retensi dari siklamat 0,443 menit (t_{R1}) dan sakarin 0,462 menit (t_{R2}) dibandingkan dan diperoleh nilai resolusi (R_s) sebesar 0,2. Hal ini menunjukkan bahwa keselektifitasan KCKT ini belum baik karena hanya menghasilkan resolusi (R_s) < 1,5 sedangkan menurut Shabir (2003) peak analit harus mempunyai resolusi $\geq 1,5$ dari seluruh komponennya. Dari nilai resolusi yang diperoleh menunjukkan bahwa tidak boleh melakukan analisis terhadap senyawa sakarin pada kondisi kerja analisis untuk sakarin dengan kehadiran siklamat didalamnya karena hal ini akan mengganggu analisa terhadap senyawa sakarin sendiri. Hal lain yang dapat dilakukan untuk mengatasi ketidakselektifan metode ini adalah dengan meminimalisir kesalahan acak yang terjadi selama penelitian seperti melakukan penyaringan terhadap semua komponen yang

digunakan dengan cermat, menggunakan pelarut murni yang khusus untuk HPLC karena penggunaan pelarut murni non HPLC menyebabkan adsorpsi ireversibel dari kotoran pada kolom. Kotoran ini memblokir situs adsorpsi, mengubah selektifitas kolom, serta melakukan homogenitas larutan uji dengan sonikasi pada rentang waktu tertentu (Novelina, dkk. 2009). Kromatogram standar sakarin dan standar siklamat dapat dilihat pada gambar 3.

Hasil penentuan kadar sampel

Uji kadar sampel pada penelitian ini dilakukan dengan cara menimbang sampel Sprite Zero sebanyak 0,5293 gram, dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan fase gerak sampai tanda tera kemudian disaring dengan kertas saring. Larutan sampel diinjeksi kedalam KCKT dan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali. Luas area kromatogram yang dihasilkan dari setiap injeksi sampel dirata-ratakan dan diperoleh rata-rata luas area sebesar 0,552. Dari luas area rata-rata yang diperoleh dapat dihitung kadar sakarin dalam sampel dengan cara memasukkan nilai luas area kedalam persamaan garis regresi linear kurva kalibrasi. Kadar sakarin yang terdapat dalam sampel sebesar 117,6 mg/kg.



Gambar 3. Kromatogram Standar

Jumlah ini menunjukkan kadar sakarin yang masih berada di bawah dari jumlah maksimum yang diperbolehkan untuk kategori minuman ringan berkarbonasi dan non-karbonasi yaitu 500 mg/kg (SNI 01-6993-2004). Dari analisis penentuan kadar sakarin dengan sampel Sprite Zero, sampel ini memiliki kadar sakarin yang aman untuk dikonsumsi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat dikemukakan beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat digunakan untuk penentuan kadar sakarin ditunjukkan oleh limit deteksi sebesar 0,172 ppm, limit kuantitasi sebesar 1,573 ppm, koefisien korelasi (R) pada parameter linieritas sebesar 0,998702, nilai % Simpangan Baku Relatif (uji presisi) sebesar 0,192%, nilai % *recovery* (uji akurasi) sebesar 100, 26%, dan nilai resolusi (uji selektifitas) sebesar 0,2.
2. Hasil dari penentuan kadar sakarin dalam minuman ringan merek Sprite Zero sebesar 117,6 mg/kg, kadar yang terdapat dalam kemasan sampel 108 mg/kg dan persen perbedaan hasil sebesar 8,9%. Nilai ini menunjukkan jumlah yang masih berada dibawah dari jumlah maksimum yang dianjurkan oleh pemerintah sebesar 500 mg/kg.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standarisasi Nasional-BSN, SNI 01-6993-2004, *Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan – Persyaratan Penggunaan Dalam Produk Pangan*, Jakarta.
- Cahyadi, Wisnu., (2006), *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan*, Bumi Aksara, Jakarta.
- Djojosoebagio, Soewondo., dan G. Wiranda., (1996), *Fisiologi Nutrisi Volume I*, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- FDA, (1994), *Reviewer Guidance :Validation of Chromatographic Methods*. Food and Drug Administration : Center for Drug Evaluation and Research.
- Harmita, (2004), Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, Review Artikel, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. I No.3 : 117-135 ISSN : 1693-9883, Departemen Farmasi FMIPA – UI, Jakarta.
- ICH, (1994), *Text on Validation of Analytical Procedures: Q2A. Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process*. International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use.
- Johnson, E. L., and Steven son, R., (1978), *Basic Liquid Chromatography*, Varian, California.
- MA PPOM No.45/MA/92.
- Mulyati, Ade Heri., Sutanto, dan Apriyani, Dewi., (2011), Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol Hidroklorida Dalam Sediaan Tablet Cystelis Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Jurnal Ekologia*, Vol. 11No.2 : 36 – 45, FMIPA, Universitas Pakuan, Bogor.
- Novelina, Yus Maria., Sutanto, dan Fatimah, Alia., (2009), Validasi Metoda Analisis Penetapan Kadar Senyawa Siklamat dalam Minuman Ringan, *Prosiding PPI Standarisasi 2009*, Jakarta.
- Shabir, G. A., (2003), Validation of High- Performance Liquid chromatography Methods for Pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* 987 : 57-66.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J. W., Hill, W. M., Hulse, J. D.,

- McGilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C. T., Yacobi, A., (2000), Bioanalytical method validation: a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* 17(12): 1551-1557.
- Sinulingga, Ranitha., (2011), *Penentuan Kadar Sakarin Dalam Beberapa Jenis Minuman Jajanan Yang Dipasarkan di SD Negeri No. 064025 Jln. Flamboyan Kelurahan Simpang Selayang Kecamatan Medan Tuntungan Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*, Skripsi, FMIPA Universitas Sumatera Utara.
- Snyder, L. R., and Kirkland J.J., (1979), *Introduction to modern liquid chromatography. second edition*, John Wiley & Sons, Inc NewYork, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Subani, (2008), *Penentuan Kadar Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, dan Natrium Sakarin Dalam Sirup Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Di Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan Medan*, Karya Ilmiah, Program Studi Diploma III Kimia Analis FMIPA Universitas Sumatera Utara.
- Wells, Margaret., and Dantus, Mauricio., (2005), *Analytical Instrumentation Handbook "Validation of Chromatographic Methods"*, Merck & Co. Inc, Rahway, NJ, USA.
- Winarno, G.F., (1991), *Kimia Pangan dan Gizi*, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Woodroof, J.G., and G.F, Philips., (1974), *Beverages : Carbonated and Noncarbonated*, The AVI Publishing Company, Inc, Westport, Connecticut.