

Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Analisis Rhodamin B Dalam Saos Tomat

Novi Yantih, Zuhelmi Aziz, Heidy Aprillia

ABSTRACT: *Rhodamine B is a synthetic red dye which is commonly used as textile dyes and banned its use in food and beverages. The red dye is harmful to health and it can cause poisoning symptoms if it is swallowed, and it can damage the liver when it is taken long term. Although it has been banned because of its toxicity, but there is abuse of rhodamine B as a food coloring, such as in tomato sauce product. The purpose of this study is to validate the high performance liquid chromatography (HPLC) for analysis of rhodamine B in a tomato sauce. The analytical method used is HPLC with reverse phase system. The analytical method has met the requirements of method validation according to the International Conference of Harmonization with the detection and quantitation limits, 1 ppm and 3 ppm respectively. Based on the results of the qualitative analysis of rhodamine B in tomato sauce samples, one of the three samples of tomato sauce that is not listed in NA-DFC (The National Agency of Drug and Food Control) showed positive result, it was shown with the same retention time between samples and standards (5.5 minutes). Average level of rhodamine B in the sample was 25 µg/g of tomato sauce.*

Keywords: *Rhodamine B, tomato sauce, high performance liquid chromatography*

ABSTRAK: Rhodamin B adalah zat warna merah sintetik yang umumnya digunakan sebagai pewarna tekstil dan dilarang penggunaannya pada makanan dan minuman. Pewarna merah ini berbahaya bagi kesehatan dan jika tertelan dapat menimbulkan gejala keracunan serta dapat merusak fungsi hati bila dikonsumsi jangka panjang. Meski telah dilarang karena toksisitasnya, namun masih terdapat penyalahgunaan rhodamin B sebagai pewarna makanan seperti pada saos tomat. Tujuan penelitian ini adalah memvalidasi metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk menganalisis rhodamin B dalam saos tomat. Metode analisis yang digunakan adalah KCKT dengan sistem fase balik. Metode analisis telah memenuhi syarat validasi metode sesuai *International Conference of Harmonisation* dengan batas deteksi dan batas kuantitasi berturut-turut adalah 1 dan 3 bpj. Berdasarkan hasil analisis kualitatif rhodamin B pada sampel saos tomat, didapatkan satu dari tiga sampel saos tomat yang tidak terdaftar di BPOM menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan waktu retensi yang hampir sama antara sampel dan standar (5,5menit). Kadar rata-rata rhodamin B dalam sampel tersebut adalah 25µg/g saos tomat.

Kata kunci: Rhodamin B, saos tomat, kromatografi cair kinerja tinggi.

Fakultas Farmasi,
Universitas Pancasila,
Jakarta, Indonesia

Korespondensi:

Novi Yantih

email: novi_yantih@yahoo.com

PENDAHULUAN

Rhodamin B menurut SK Menteri Kesehatan RI No.239/MenKes/Per/V/85 dan telah direvisi melalui SK Menteri Kesehatan RI No 722/MenKes/Per/IX/88 mengenai bahan tambahan makanan termasuk pewarna yang dilarang digunakan untuk makanan dan minuman (1). Erlani dan Murniati (2) telah mendeteksi penyalahgunaan rhodamin B pada saos yang beredar di lingkungan *mall* di Makassar dan sekolah dasar di Kabupaten Labuhan Batu Selatan, Sumatera Utara. Dari hasil penelitian Erlani dan Murniati diketahui bahwa 2 (40%) dari 5 sampel saos Lombok mengandung rhodamin-b antara 0,3-0,6 bpi (2).

Penelitian mengenai deteksi rhodamin B dalam makanan telah banyak dilakukan dengan metode analisis yang bervariasi. Analisis rhodamin B menggunakan teknik kromatografi telah dilakukan secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) oleh Chen (2007) dan secara kromatografi lapis tipis (KLT)-densitometri oleh Permatasari (2007) (3,4). Chen menggunakan metode KCKT dengan fase diam kolom C-18 (Waters Novapak C-18 Column, 150x3,9mm, volume injeksi 10 μ L, fase gerak tetrahidrofur-asetonitril-larutan heptansulfonat 5mM (10:70:20) untuk menganalisis rhodamin B dalam tinta produk Steadtler 430 Mand Corvina 81 dengan laju alir 1,2mL/menit dan fase gerak asetonitril-metanol-larutan heptansulfonat 5mM (45:35:20) untuk produk tinta Bic Red dan Micron Red dengan laju alir 0,8mL/menit. Detektor yang digunakan oleh Chen adalah detektor fluoresen dan *photo diode array detector*. Sementara, Permatasari menunjukkan kondisi optimum untuk analisis kuantitatif rhodamin B secara KLT-densitometri adalah etanol 70% sebagai pelarut, etanol-amoniak (19:1) sebagai eluen, lempeng KLT silika gel F254 sebagai fase diam pada 549nm, memberikan hasil yang selektif, spesifik, akurat, dan teliti. Selain itu, Prasetya (2013) telah melakukan optimasi kondisi kromatograf cair kinerja tinggi untuk analisis rhodamin B dalam kue bolu kukus dengan fase diam berupa kolom

C-18, fase gerak berupa campuran asetonitril -dapat fosfat pH 3,50 (70 : 30), detektor UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 544nm, laju alir 1,2mL/menit, volume injeksi 20 μ L (5). Qi (2014) telah menentukan kadar rhodamin B dalam cabai menggunakan KCKT dengan detektor fluoresen (6). Rhodamin B dalam makanan juga telah dianalisis oleh Su (2015) secara KCKT menggunakan kolom C18, fase gerak asetonitril - air (8:2) dengan laju alir 1mL/menit, volume injeksi 20 μ L, dan panjang gelombang deteksi di 556nm (7). Penyiapan sampel yang telah dilakukan oleh Su (2015) cukup kompleks dengan cara ekstraksi menggunakan *solid phase extraction* (SPE) (7), sedangkan metode yang dikembangkan oleh Prasetya (2013) lebih sederhana (5).

Penelitian ini memvalidasi metode KCKT sesuai kondisi optimum yang dilaporkan oleh Prasetya (2013) untuk analisis rhodamin B dalam saos tomat karena metode tersebut sederhana. Metode analisis divalidasi karena digunakan sampel saos tomat yang memiliki matriks berbeda dengan matriks kue bolu. Parameter analitik yang divalidasi meliputi uji linearitas, uji batas deteksi, dan batas kuantitasi, serta uji akurasi dan presisi (8).

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Saos tomat berwarna merah buatan sendiri dan saos komersial yang teregistrasi BPOM (3 produk) dan tidak teregistrasi (3 produk), rhodamin B, *aquabidestilata*, asetonitril *pro* HPLC, metanol, dapat fosfat pH 3,50.

Alat Penelitian

Timbangan analitik, sonikator ultrasonik (LC-30H Elma), tangas air, *homogenizer* (Thermolyne type 37600 mixer), *centrifuge* (PLC series), *ultra basic pH meter* (Hanna HI 2211), corong Buchner, kompor, blender, kromatograf cair kinerja tinggi (Shimadzu LC-20 AD), kolom C-18 (oktadesisilan

– Grace 250mm), *syringe*, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800), kertas saring *Millipore*, mikropipet 0,5-10 μ L, 10-100 μ L dan 100-1000 μ L.

Metode Penelitian

Pembuatan dapar fosfat pH 3,50

Natrium fosfat dibasa dodekahidrat P dan kalium fosfat monobasa P masing-masing sebanyak 5 dan 3 g dilarutkan dengan air sampai 1 L. pH diatur dengan menggunakan asam asetat glasial P.

Pembuatan saos tomat simulasi

Buah tomat dicuci dan dimasukkan ke dalam air mendidih selama 3 menit atau sampai kulitnya terkelupas. Tomat diangkat dan ditiriskan. Setelah dingin, kulit dikupas dan buang biji serta bekas melekatnya tangkai buah yang keras. Daging buah tomat yang sudah bersih, ditimbang kemudian diblender selama 15 menit. Hancuran daging tomat dimasak selama 30 menit dengan api kecil sampai menjadi pasta. Ekstrak rempah-rempah dibuat dengan cara melarutkan lada, cengkeh, bawang putih, dan kayu manis dengan 100 mL air dan dididihkan selama 5 menit. Ekstrak bumbu rempah-rempah tersebut disaring.

Pasta tomat dicampurkan dengan tepung jagung dengan cara diblender selama 5 menit. Campuran pasta tersebut dimasak dengan api kecil. Gula, garam, dan ekstrak rempah-rempah ditambahkan ke dalam campuran pasta kemudian diaduk rata dan pemanasan dilanjutkan sampai terbentuk kekentalan yang diinginkan. Cuka dan natrium benzoat ditambahkan ke dalam campuran pasta lalu diaduk rata selama 2 menit dan api dimatikan. Saos tomat diangkat dan segera dikemas dengan kemasan botol beling steril dan tertutup rapat.

Optimasi dan validasi metode KCKT untuk penetapan kadar rhodamin B dalam saos tomat simulasi

Pemilihan pelarut

Sejumlah lebih kurang 100 g saos tomat

simulasi yang mengandung rhodamin B ditimbang, lalu dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi. Masing-masing ditambah air, metanol, dan asam klorida 5 N sebanyak 4 mL. Pelarut yang mampu melarutkan rhodamin B dari matriks saos tomat paling baik dipilih sebagai pelarut.

Penetapan panjang gelombang serapan maksimum

Larutan uji dibuat dengan cara dipipet sejumlah 10, 20, dan 30 μ L larutan induk rhodamin B 1000 bpj ke dalam labu tentukur 10 mL lalu ditambah 3 mL metanol, kemudian dicukupkan dengan air suling sampai tanda. Diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 1, 2, dan 3 bpj. Sementara larutan blangko dibuat dengan cara dimasukkan larutan metanol sebanyak 3 mL ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan air sulingsampai tanda. Panjang gelombang optimum diukur pada daerah visibel 400-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Uji kesesuaian sistem

Larutan induk rhodamin B 1000 bpj dipipet sejumlah 10 μ L ke dalam labu tentukur 10 mL lalu ditambah 3 mL metanol. Kemudian dicukupkan dengan *aquabidestilata* sampai tanda. Konsentrasi larutan uji yang diperoleh adalah 1 bpj. Sebanyak 20 μ L larutan uji 1 bpj disuntikkan ke dalam kromatograf sebanyak 5 kali, kemudian diukur luas puncaknya dan nilai simpangan baku relatif dihitung.

Pembuatan kurva baku

Satu seri larutan rhodamin B yang terdiri dari beberapa konsentrasi, yaitu 6, 9, 12, 15, 18, 21, dan 24 bpj dibuat dengan cara dipipet larutan induk rhodamin-B 1000 bpj masing-masing sebanyak 60, 90, 120, 150, 180, 210, dan 240 μ L lalu ditambahkan 3 mL metanol dan dimasukkan ke labu tentukur 10 mL. Larutan diencerkan dengan *aquabidestilata* sampai tanda. Sejumlah 20 μ L masing-masing

larutan uji, disuntikkan ke dalam kromatograf kemudian diukur luas puncaknya, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dan luas puncak (sumbu y), selanjutnya dibuat persamaan garis regresi dan dihitung nilai koefisien korelasinya.

Uji linearitas

Satu seri larutan baku rhodamin B yang terdiri dari 7 konsentrasi berbeda, dibuat dengan cara dipipet larutan induk rhodamin B 10000 bpj masing-masing sebanyak 60, 90, 120, 150, 180, 210, dan 240 μL ke dalam labu tentukur 10mL dan diencerkan dengan menggunakan *aquabidest* sampai tanda.

Selanjutnya, larutan uji dibuat dari sampel saos tomat simulasi yang ditambahkan larutan baku. Saos tomat simulasi ditimbang saksama lebih kurang 200 mg lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL larutan rhodamin B dengan konsentrasi 60 bpj, lalu dipanaskan di tangas air selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan metanol sebanyak 3mL lalu divorteks sampai homogen dan dipisahkan dengan cara dipusingkan. Semua filtrat ditampung dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan *aquabidest*, dikocok lalu disaring dan disonikasi (kandungan baku rhodamin B = 6 bpj).

Untuk pembuatan saos tomat yang mengandung rhodamin B 9, 12, 15, 18, 21, dan 24 bpj dilakukan dengan langkah berupa ditimbang saksama lebih kurang 200mg saos tomat simulasi, lalu dipipet 1,0 mL masing-masing larutan rhodamin B 90, 120, 150, 180, 210, dan 240 bpj. Selanjutnya dilakukan dengan cara yang sama seperti membuat larutan uji dengan kandungan baku rhodamin B 6 bpj.

Penetapan batas deteksi dan batas kuantitasi

Dengan menggunakan persamaan garis regresi yang diperoleh dari uji linearitas, dihitung simpangan baku respon, batas deteksi dan batas kuantitasi untuk mengetahui

konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi dan masih ditetapkan kadarnya dengan presisi dan akurasi yang masih dapat diterima.

Uji presisi dan akurasi

Larutan uji dibuat dari sampel saos tomat simulasi yang ditambahkan larutan baku dengan cara yang sama seperti pada uji linearitas. Konsentrasi larutan baku rhodamin B yang ditambahkan adalah 12, 15, dan 18 bpj. Percobaan diulang masing-masing sebanyak 3 kali.

Penetapan Kadar Rhodamin B dalam Saos Tomat Komersial

Saos tomat komersial ditimbang sejumlah lebih kurang 2,5 g, lalu ditambahkan metanol, kemudian divorteks sampai homogen, lalu dipisahkan dengan cara dipusingkan. Dari filtrat yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan air, dikocok, disaring, dan disonikasi. Sebanyak 20 μL larutan uji disuntikkan ke dalam kromatograf kemudian diukur luas puncaknya dan kadar rhodamin B yang terdapat dalam saos tomat komersial dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva baku.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi metode KCKT untuk analisis rhodamin B dalam saos tomat yang telah dilakukan meliputi pemilihan pelarut dan penentuan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}). Pemilihan pelarut bertujuan untuk mendapatkan pelarut yang dapat menarik rhodamin B yang terikat pada matriks saos tomat secara optimal. Penentuan λ_{maks} adalah untuk mengetahui λ yang digunakan pada detektor.

Dari hasil percobaan, metanol diketahui memberikan hasil yang paling baik dibandingkan pelarut lainnya dan dapat menarik rhodamin B yang terikat pada matriks saos tomat yang

ditandai dengan warna larutan merah muda yang jernih dan warna merah pada saos tomat hilang. Larutan rhodamin B dalam metanol menunjukkan λ_{maks} 553,50 nm (Gambar 1). Panjang gelombang deteksi pada detektor kromatograf menggunakan panjang gelombang 554 nm. Panjang gelombang tersebut masih sesuai dengan Farmakope Indonesia Edisi IV, yaitu selisih panjang gelombang untuk pengukuran lebih kurang 2 nm dari λ_{maks} (9).

Puncak rhodamin B dapat dideteksi pada kromatogram pada waktu retensi sekitar 5,5 menit pada kondisi sistem kromatograf menggunakan kolom C-18 GRACE 250 mm (oktadesilsilan), fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3,50 (70 : 30) dengan laju alir 1,2 mL/menit, dan detektor 554 nm (Gambar 2 dan 3). pH dapar fosfat sebesar 3,50 meningkatkan afinitas rhodamin B yang

bersifat polar terhadap fase diam dalam sistem fase balik, sehingga waktu retensi analit tidak terlalu cepat, yaitu pada sekitar 5,4 menit. Hal ini dapat meningkatkan selektivitas metode terhadap senyawa polar yang ada dalam sampel.

Pembuatan kurva baku dilakukan untuk memperoleh persamaan garis linear yang digunakan untuk perhitungan kadar rhodamin B, sedangkan uji linearitas untuk melihat linearitas hubungan repon instrumen terhadap konsentrasi analit dalam matriks saos tomat. Dari kurva baku rhodamin B, diperoleh persamaan garis regresi $y = -11698,7857 + 207937,6905x$, dengan nilai koefisien determinasi 0,996 yang linear pada rentang konsentrasi 6-24 bpj (Gambar 4).

Hasil uji linearitas rhodamin B diperoleh nilai koefisien determinasi 0,998 (mendekati 1) yang menunjukkan repon instrumen terhadap

Tabel 1. Perolehan kembali dan simpangan baku relatif (SBR) pada uji akurasi dan presisi metode KCKT

Kandungan Analit Pada Saos Simulasi (%)	Bobot uji (mg)	Luas Puncak	C (bpj)	Perolehan kembali		SB	SBR (%)
				%	\bar{x} (%)		
80	202,0	2629329	12,64	105,33	106,44	1,13	1,06
	205,4	2644424	12,77	106,42			
	203,1	2672781	12,91	107,58			
100	204,8	3330552	16,07	107,13	106,71	0,37	0,35
	203,1	3308862	15,97	106,46			
	204,0	3311196	15,98	106,53			
120	207,4	3914567	18,88	104,90	3106,58	1,53	1,4
	207,4	3991130	19,25	106,94			
	204,8	4026099	19,42	107,89			

Tabel 2. Kadar rhodamin B dalam saos komersial

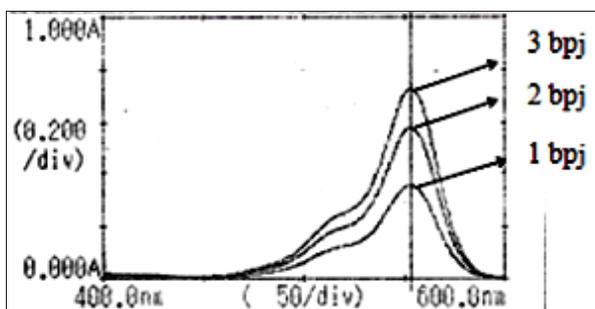
Bobot (mg)	Luas Puncak	Kadar		SB	SBR (%)
		($\mu\text{g/g}$)	\bar{x} (bpj)		
2573,9	1326332	24,98			
2589,9	1329289	24,90			
2584,0	1336962	25,12	25,00	0,0787	0,31
2564,4	1321369	25,00			
2592,7	1336112	25,00			

konsentrasi analit dalam matriks saos tomat linear pada rentang konsentrasi 6-24 bpj. Pada uji linearitas diperoleh persamaan garis $y = -57452,4286 + 226937,3333x$ (Gambar 5).

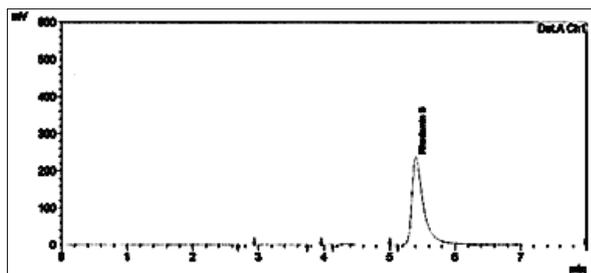
Dari persamaan garis pada uji linearitas dapat ditentukan sensitivitas metode dengan menentukan batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK). Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi terendah rhodamin B dalam sampel saos tomat yang masih dapat dideteksi adalah sebesar 1 bpj. Sedangkan dari hasil uji batas kuantitasi diperoleh informasi bahwa konsentrasi terendah rhodamin B dalam saos tomat yang masih dapat ditetapkan kadarnya dengan presisi

dan akurasi yang masih dapat diterima sebesar 3 bpj. Dari hasil uji ini dapat disimpulkan bahwa konsentrasi terendah rhodamin B yang dipersiapkan untuk uji linearitas, uji presisi dan akurasi haruslah lebih besar dari batas kuantitasi yang diperoleh, yaitu 3 bpj. Metode ini sedikit lebih sensitif dari metode yang dilaporkan oleh Su (2015) yang menghasilkan BK metode sebesar 3,4 ug/mL (7).

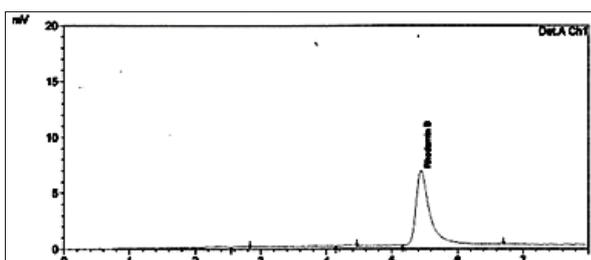
Parameter analitik lain yang divalidasi adalah akurasi dan presisi metode. Akurasi metode menunjukkan ketepatan hasil analisis dengan nilai sebenarnya, sedangkan presisi menunjukkan ketelitian metode. Penilaian akurasi metode berdasarkan hasil uji perolehan kembali, sedangkan untuk presisi metode berdasarkan nilai simpangan baku relatif dari beberapa kali pengulangan hasil uji. Dari hasil uji akurasi yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa metode penelitian yang digunakan mempunyai derajat



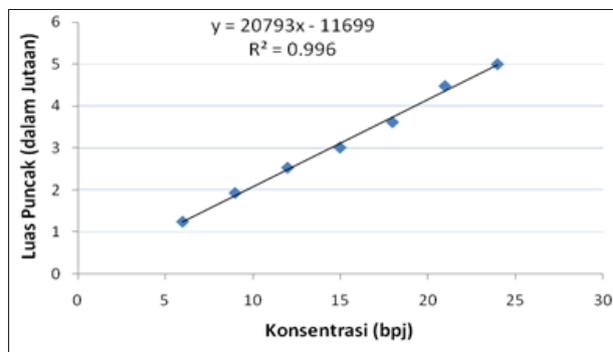
Gambar 1. Spektrum serapan ultraviolet larutan rhodamin B (1, 2, 3 bpj) secara overlay



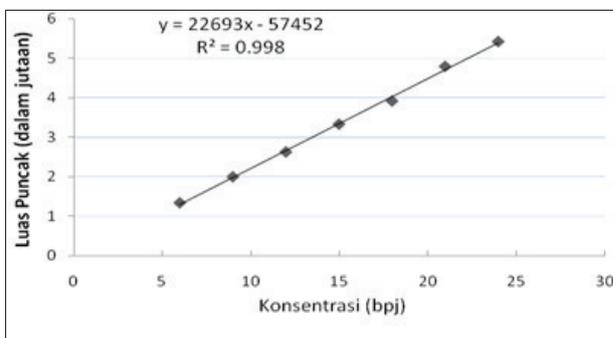
Gambar 2. Kromatogram larutan baku rhodamin B 15 bpj



Gambar 3. Kromatogram rhodamin B dalam sampel saos



Gambar 4. Kurva baku larutan rhodamin b dalam metanol



Gambar 5. Kurva hubungan luas puncak terhadap konsentrasi larutan rhodamin B pada uji linearitas

ketepatan yang baik dan memenuhi syarat yaitu untuk konsentrasi analit dalam matriks sampel ≥ 10 bpj, persen perolehan kembali adalah 90-110 %. Hasil ini menunjukkan metode yang divalidasi lebih akurat dari metode Su (2015) yang menghasilkan persen perolehan kembali sebesar 78,47-101,6 % (7). Hal ini kemungkinan karena penyiapan sampel dengan cara SPE lebih kompleks yang menyebabkan perolehan kembali lebih kecil dari 80 % (7). Metode penetapan kadar secara KCKT ini juga merupakan metode yang mempunyai ketelitian tinggi dengan nilai simpangan baku relatif ≤ 2 %. Parameter analitik yang divalidasi telah menunjukkan hasil yang memenuhi syarat *International Conference of Harmonisation* (9).

Aplikasi metode KCKT yang divalidasi untuk mendeteksi rhodamin B dalam saos tomat komersial menunjukkan 1 dari 6 saos komersial mengandung rhodamin B dengan konsentrasi sebesar 25 $\mu\text{g/g}$.

KESIMPULAN

Metode KCKT menggunakan kolom C-18 GRACE 250 mm (oktadesilsilan), fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3,50 (70 : 30) dengan laju alir 1,2 mL/menit, dan detektor 554 nm adalah metode yang valid untuk menentukan kadar rhodamin B dalam saos tomat. Saos tomat komersial yang positif mengandung rhodamin B diketahui mengandung rhodamin B sekitar 25 $\mu\text{g/g}$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Nomor: 00386/C/SK/II/90 tentang perubahan Lampiran Peraturan Menteri Kesehatan Nomor: 239/Men.Kes/Per/V/85 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 1990.
2. Erlani, Murniati. Analisis kandungan rhodamin B pada saus lombok yang beredar di Makassar Mall. Makassar: Jurusan Kesehatan Lingkungan Poltekkes Kemenkes; 2010.
3. Chen H. *Identification of Rhodamine 6g and Rhodamine B dyes present in ballpoint pen inks using High-performance Liquid Chromatography and UV-Vis Spectrometry*. Forensic Science Journal. 2007; 6 (1) : 21-37. Available online at: fsjournal.cpu.edu.tw.
4. Permatasari L. Analisis kuantitatif Rhodamin-B pada terasi produksi daerah Puger secara KLT-densitometri (skripsi). Program Studi Universitas Jember; 2007.
5. Prasetya AD. Uji spesifisitas dan sensitivitas pereaksi pendeteksi Rhodamin B dalam kue bolu berwarna merah (skripsi). Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 2013.
6. Qi P, Z Lin, J Li, C Wang, W Meng, H Hong, X, Zang. Development of a rapid, simple, and sensitive HPLC-FLD method for determination of rhodamin B in chili-containing products. Food Chemistry. 2014; Vol 164: 98-103. Elsevier Ltd.
7. Su X, X Li, J Li, M Liu, F Lei, X Tan, P Li, W Luo. Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and determination of rhodamin B in food. Food Chemistry. 2015; Vol 171; 292-7. Elsevier Ltd.
8. Ditjen POM Depkes RI, Farmakope Indonesia, ed. IV, Depkes RI, Jakarta, 1995; 1016-17.
9. International Conference on Harmonization, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); 2005.