

Pengembangan dan Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Analisis Pewarna Merah Sintetik pada Beberapa Merek Saus Sambal Sachet

(Development and validation of thin layer chromatography-densitometry method for determination and quantification of synthetic red coloring agent in sauce sambel sachet)

Fithriani Armin*, Bitu Revira, & Adek Zamrud Adnan

Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Keywords:
TLC-densitometri;
sauce sambel; coloring
agent.

Kata kunci:
KLT-densitometri;
saus sambel;
pewarna sintetik.

ABSTRACT: Chili sauce sachet A, B and C containing synthetic red coloring agent were taken from three fast food premises in Padang. Synthetic red coloring agent were a food additives used by food manufacturers to enhance color of food products. The use of food coloring agent in Indonesia were regulated in The Rule of Head of the Supervisory Food Board of the Republic of Indonesia Number 37 Year 2013 about the Limit Use of Food Coloring Agent. Thin-layer chromatography (TLC) -densitometry was a precision method for the analysis of food additives. Development and validation of TLC method for chromatographic separation used GF254 silica plate eluted with a mixture of ethanol: butanol: distilled water (4: 5: 5) and spots were detected visually. A red spots on the sample B was identified as Ponceau 4R with Rf value of 0.76. It was then followed by quantitative analysis using densitometry. The linearity of the method was found in the range of 2-10µg/ml with a correlation coefficient of 0.994. Precision intra-day and inter-day relative standard deviation was shown from 1.11% and 2.69% respectively. Accuracy of the method was shown on the percentage of recovery of the 3 different concentrations of solution which gave the average percentage of 108.17%. Limit of detection and limit quantitation was 0.8306µg/ml and 2.7687µg/ml. The concentration of Ponceau 4R in the sample B was 11.9520mg/kg of material. This value was not exceeded the maximum concentration of food coloring agent as stated in the rule which should not be above 70mg/kg of material.

ABSTRAK: Saus sambel sachet A, B dan C yang mengandung pewarna merah sintetik diambil ditiga tempat makanan cepat saji dikota padang. Pewarna merah sintetik merupakan salah satu bahan tambahan pangan yang digunakan oleh produsen pangan untuk memberikan sensasi warna pada produk pangannya. Penggunaan pewarna pangan ini diatur dalam Peraturan Kepala Badan Pengawas Makanan Republik Indonesia Nomor 37 Tahun 2013 Tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pewarna. Metoda yang presisi untuk analisis bahan tambahan pangan ini adalah kromatografi lapis tipis (KLT)-densitometri. Pengembangan dan validasi metoda KLT untuk pemisahan secara kromatografi digunakan pelat silica GF254 dengan fasa gerak campuran etanol:butanol: aquadest (4:5:5) dan bercak yang nampak dideteksi secara visual. Sebuah bercak merah pada sampel B teridentifikasi mengandung ponceau 4R dengan nilai Rf 0,76 dan dilanjutkan dengan analisis kadar dengan densitometri. Linieritas metode yang dilakukan ditemukan pada rentang 2-10 µg/ml dengan koefisien korelasi 0,994. Presisi *intra-day* ditunjukkan dari standar deviasi relative 1,11% dan *inter-day* 2,69%. Akurasi metode ditunjukkan dari persentase perolehan kembali terhadap 3 konsentrasi yang berbeda dengan persentase rata-rata 108,17%. Batas deteksi dan batas kuatitasi yang didapatkan adalah 0,8306µg/ml dan 2,7687µg/ml. Kadar ponceau 4R yang dikandung dalam sampel B adalah 11,9520 mg/kg bahan yang tidak melebihi batas maksimum penggunaan bahan pewarna menurut peraturan di atas yakni 70mg/kg bahan.

*Corresponding Author: Fithriani Armin (Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Pauh, Padang, 25163, Sumatera Barat)
email: fithriani.far@gmail.com

Article History:

Received: 10 May 2015

Published: 1 Nov 2015

Accepted: 25 Aug 2015

Available online: 13 Jan 2016

PENDAHULUAN

Peningkatan perekonomian kehidupan seseorang cenderung menyebabkan perubahan gaya hidup, salah satunya yaitu terjadinya perubahan pola makan yang mengarah kepada makanan cepat saji. Saus sambal merupakan salah satu pelengkap makanan cepat saji yang sering dijumpai. Zat warna sering ditambahkan ke dalam olahan makanan oleh produsen makanan [1]. Adanya perubahan warna pada makanan dapat digunakan sebagai salah satu indikator terjadinya sesuatu perubahan pada makanan, seperti munculnya warna coklat yang disebabkan oleh reaksi pencoklatan pada makanan tersebut [2]. Kualitas makanan dapat diamati dari salah satu kriteria yakni dari warnanya. Untuk meningkatkan kualitas terhadap makanan dengan meningkatkan penampilan sehingga menarik keinginan konsumen terhadap makanan tersebut maka zat warna sering ditambahkan ke dalam makanan [3]. Disamping itu, penambahan zat warna pada makanan akan memberikan keseragaman pada produk makanan serta zat warna yang ditambahkan dapat mengembalikan kembali warna makanan yang hilang atau berubah selama proses pengolahan yang menyerupai warna asli dari bahan dasar makanan [4].

Pada mulanya, makanan diwarnai dengan zat warna alami yang diperoleh dari tumbuhan, hewan, atau mineral. Namun untuk memperoleh zat warna alami memerlukan proses yang panjang dengan biaya yang tidak murah serta zat warna yang didapatkan tidak sebanyak yang diharapkan. Disamping itu, kebanyakan zat warna alami tidak tahan terhadap pengaruh cahaya dan panas, sehingga jarang digunakan oleh industri makanan. Oleh sebab itu penggunaan zat warna sintetik semakin meluas. Banyak keunggulan-keunggulan yang dijumpai pada zat warna sintetik diantaranya adalah lebih stabil dan lebih tahan terhadap berbagai kondisi lingkungan, daya mewarnainya

lebih kuat dan memiliki rentang warna yang lebih luas. Selain itu zat warna sintetik lebih murah dan lebih mudah untuk digunakan [2].

Didalam penggunaan zat warna sintetik ada peraturan yang mengaturnya. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan Republik Indonesia nomor 37 tahun 2013 mengatur tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pewarna [5]. Ketidaktahuan masyarakat terhadap peraturan dan batas penggunaan zat warna bisa saja menyebabkan terjadinya penyalahgunaan [6]. Beberapa zat warna merah sintetik memiliki sifat toksik dan karsinogenik jika terakumulasi dalam tubuh karena dikonsumsi dalam jumlah besar atau berulang-ulang [7].

Banyak metode yang telah digunakan peneliti dalam analisis zat warna merah yang digunakan pada makanan. Beberapa hasil penelitian menggunakan metode kromatografi lapis tipis dalam analisis kualitatif pewarna pada beberapa kudapan [8], kromatografi kertas-densitometri dengan fasa gerak etanol : butanol : air (20:25:25) dalam menganalisis pewarna sintetik pada makanan [9], HPLC-PDA dalam analisis berbagai macam pewarna makanan [10], spektrofotometri derivative dan HPLC menganalisis pewarna dalam minuman [11].

Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian terhadap pewarna sintetik yang terdapat pada saus sambal sachet sebagai pelengkap makanan cepat saji di kota Padang dengan melakukan pengembangan dan memvalidasi terhadap metoda yang telah dilakukan [8] terutama pengembangan terhadap jenis zat warna yang dianalisis menggunakan metode KLT-densitometri serta menentukan apakah kadarnya sesuai dengan batasan yang diatur menurut peraturan diatas.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan: Chamber, Spektrofotometer UV-Vis (Pharmaspec 1700), TLC scanner, timbangan analitik, pipet kapiler 5 μ l, kertas saring dan alat-alat gelas lainnya.

Bahan

Bahan yang digunakan: Beberapa merek saus sambal sachet A, B dan C yang diambil di tiga tempat makan cepat saji di kota Padang, baku pembanding ponceau 4R (ROHA), eritrosin (ROHA), karmoisin (ROHA), pelat KLT silika GF254, etanol p.a, butanol p.a, aquades.

Cara Kerja

- Persiapan larutan sampel: timbang saksama masing-masing 10 gram sampel, dilarutkan dengan beberapa mL etanol 70%, disaring ke dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan dengan etanol 70% sampai tanda batas.
- Dibuat larutan masing-masing baku pembanding dengan konsentrasi 20 μ g/mL dengan pelarut etanol 70%.
- Identifikasi zat warna merah pada larutan sampel: Larutan sampel dan baku pembanding ditotolkan diatas pelat KLT dan pelat dikembangkan dengan perbandingan pengembang etanol:butanol:aquades (4:5:5) hingga batas pengembangan. Amati bercak dan hitung nilai Rf-nya.
- Validasi Metode: parameter validasi metode yang dilakukan meliputi: Pertama akurasi yang di hitung berdasarkan persentase perolehan kembali terhadap tiga konsentrasi baku 40, 80, dan 120% yang ditambahkan pada larutan sampel. Kedua presisi *intra-day* dilakukan terhadap konsentrasi baku 6 μ g/mL yang diamati simpangan baku relatifnya pada satu hari dengan 3 kali pengulangan pengukuran dan dalam jam yang berbeda serta presisi *inter-day* diamati selama tiga hari berturut-turut. Ketiga

linearitas yang dihitung dengan menggunakan lima konsentrasi bertingkat dari bercak masing-masing baku pembanding terhadap luas areanya sehingga didapatkan persamaan linieritas $y = a + bx$ dengan koefisien korelasinya mendekati 1. Keempat dan kelima adalah batas deteksi dan batas kuantitasi yang dihitung menggunakan rumus berdasarkan persamaan linieritas yang didapat.

- Penetapan kadar zat warna merah sintetik pada larutan sampel dengan Densitometri: Larutan sampel dan larutan baku pembanding masing-masing ditotolkan sebanyak 5 μ l di atas pelat KLT. Pelat KLT dimasukkan kedalam bejana yang telah dijenuhkan dengan campuran pengembang etanol : butanol : aquades (4:5:5), bejana ditutup dan dibiarkan campuran pengembang naik sampai batas atas. Setelah dikembangkan, pelat KLT di scan dengan densitometer pada panjang gelombang maksimum masing-masing pembanding. Didapatkan data luas area sampel. Hitung konsentrasi pewarna merah sintetik dalam sampel menggunakan persamaan linearitas dan tentukan kadarnya.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil

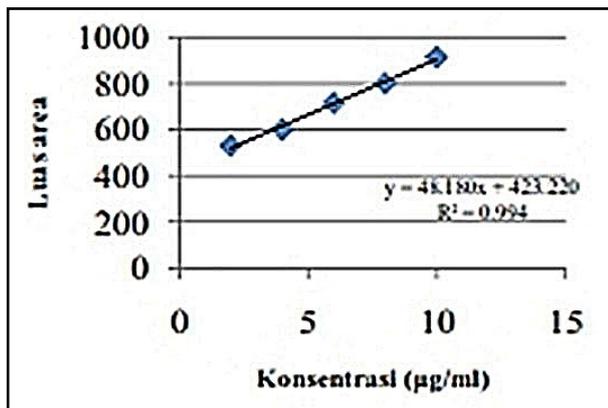
Hasil identifikasi zat warna merah pada larutan sampel dengan mengamati bercak larutan sampel dan baku pembanding yang telah dikembangkan pada pelat KLT menunjukkan bahwa bercak larutan sampel B memiliki tinggi bercak dan nilai Rf yang sama dengan zat warna merah sintetik ponceau 4R. (tabel 1).

Validasi Metode: Perolehan kembali ponceau 4R setelah ditambahkan baku sebanyak 40, 80, dan 120% adalah 110,54%, 106,54%, dan 107,42%.

Tabel 1. Nilai Rf masing-masing bercak pada pelat KLT

Bercak	Faktor retensi
Sampel A (A)	-
Sampel B (B)	0,76
Sampel C (C)	-
Eritrosin (E)	0,96
Karmoisin (K)	0,85
Ponceau 4R (P)	0,78

Presisi *intra-day* dan *inter-day* memberikan nilai RSD berturut-turut 1,110% dan 2,696%. Kurva kalibrasi ponceau 4R dibuat pada rentang 2-10µg/mL memberikan persamaan linearitas $y=423,22+48,18x$ dengan koefisien koreasi $r=0,994$ (gambar 1). Batas deteksi dan batas kuantitasi ponceau 4R yang didapatkan pada percobaan ini adalah 0,8306µg/mL dan 2,7687µg/mL.



Gambar 1. Kurva kalibrasi beberapa konsentrasi ponceau 4R terhadap luas area masing-masingnya.

Penetapan kadar zat warna merah sintetik pada larutan sampel dengan densitometri: Konsentrasi rata-rata ponceau 4R pada larutan sampel B adalah 4,789µg/mL dengan kadar rata-rata ponceau 4R dalam sampel B adalah 11,952mg/kg, sedangkan jumlah ponceau 4R dalam satu sachet sampel B adalah 0,09127mg (tabel 2).

Diskusi

Penelitian ini dilakukan pada sampel berupa saus sambal sachet yang diambil pada tiga tempat

makan cepat saji di Kota Padang. Pada saus sambal ini dilakukan identifikasi apakah terdapat zat warna makanan sintetik yang diizinkan atau tidak yang diuji dengan metode KLT dengan fasa diam silica GF254 dan fasa gerak etanol:butanol:aquades (4:5:5) [8] kemudian ditentukan kadarnya dengan metode densitometri. Dari hasil pengembangan terhadap sampel (A, B, dan C) dan baku perbandingan khusus untuk pewarna merah, didapatkan hasil, bahwa sampel B yang teridentifikasi mengandung pewarna merah sintetik ponceau 4R. Bercak sampel B pada pelat KLT memberikan pola bercak yang sama dengan bercak ponceau 4R dimana Rf sampel B dan Rf ponceau 4R masing-masing adalah 0,76 dan 0,78 (tabel 1).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan No.033 tahun 2012 tentang bahan tambahan pangan, pada label makanan yang mengandung bahan tambahan makanan, khususnya pewarna wajib mencantumkan nama jenis bahan tambahan makanan, nomor index pewarna, tulisan pewarna makanan yang ditulis dengan huruf besar berwarna hijau dalam kotak persegi panjang berwarna hijau, serta logo huruf “M” didalam suatu lingkaran berwarna hitam [12]. Pada kemasan saus sambal sachet B, tidak dicantumkan pewarna ponceau 4R sebagai pewarna yang digunakan. Hanya ada beberapa bahan tambahan makanan jenis lain seperti penguat rasa dan pengental. Peneliti sendiri tidak mengetahui alasan kenapa produsen tidak mencantumkan pewarna yang digunakan pada kemasan, namun diduga karena jumlah pewarna yang ditambahkan sangatlah kecil.

Beberapa parameter telah digunakan untuk memvalidasi suatu metoda analisis. Parameter akurasi merupakan kedekatan antara hasil terukur (nilai rata-rata hasil analisis) dengan yang diterima sebagai nilai sebenarnya [13]. Akurasi dilaporkan sebagai persen peroleh kembali dari penambahan baku sebanyak 40, 80, dan 120% ke dalam larutan sampel B, dan didapatkan hasil secara berturut-

Tabel 2. Kadar ponceau 4R dalam sampel B

Pengulangan ekstraksi sampel	Luas Area	Konsentrasi (µg/ml)	Kadar (mg/kg)	Rata-rata kadar (mg/kg)	Rata-rata kadar (mg/kg)	Rata-rata kadar/sachet (mg)
I	688,6	5,51	13,743	12,430		
	641,9	4,53	11,299			
	659,9	4,91	12,247			
II	635,5	4,41	11,014	11,580	11,952	0,09127
	651,1	4,73	11,813			
	653,4	4,77	11,913			
III	633,0	4,35	10,849	11,846		
	660,0	4,91	12,246			
	664,9	4,99	12,445			

turut adalah 110,56; 106,56; dan 107,416%. Data hasil uji akurasi memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi untuk persen peroleh kembali, yakni 85%-115% [14]. Parameter presisi diamati dari nilai RSD *intra-day* dan *inter-day* ponceau 4R pada satu konsentrasi. Hasil yang diperoleh didapatkan secara berturut-turut nilai RSD *intra-day* dan *inter-day* ponceau 4R adalah 1,110% dan 2,69%. Nilai ini memasuki kriteria penerimaan uji presisi, dimana RSD yang diperbolehkan adalah kurang dari 15% [14]. Parameter linearitas ponceau 4R yang didapatkan dari kurva kalibrasi antara berbagai konsentrasi bertingkat terhadap luas area masing-masing bercak konsentrasi adalah $y = 423,22 + 48,18x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,994$ (gambar 1). Dari nilai r tersebut dapat dikatakan bahwa kurva kalibrasi ponceau 4R cukup linear pada konsentrasi 2-10 µg/mL. Dari persamaan linieritas tersebut di dapatkan pula nilai batas deteksi dan batas kuantitasi ponceau 4R adalah 0,8306 µg/mL dan 2,7687 µg/mL. Batas deteksi adalah konsentrasi minimum analit agar bisa terdeteksi oleh densitometer serta batas kuantitasi adalah konsentrasi analit terendah agar bisa terkuantitasi secara akurat dan presisi oleh densitometer. Konsentrasi analit atau sampel harus melebihi dari batas deteksi dan kuantitasi.

Dari hasil pengujian terhadap kadar ponceau

4R dalam larutan sampel B menggunakan metoda KLT-densitometer yang telah memenuhi persyaratan validasi diketahui rata-rata kadar ponceau 4R dalam saus sambal sachet B adalah 11,952 mg/kg (tabel 2). Angka ini menunjukkan bahwa kadar ponceau 4R dalam saus sambal sachet B tidak melebihi batas maksimum pewarna merah sintetik ponceau 4R yang boleh ditambahkan ke dalam bahan makanan, yakni 300mg/kg bahan makanan [5]. Berat rata-rata satu sachet saus sambal B adalah 7,637gram, maka kadar ponceau 4R dalam satu sachet saus sambal B adalah 0,09127mg. Angka *Acceptable Daily Intake* (ADI) ponceau 4R adalah 4 mg/kgBB/hari atau 280 mg/hari jika dianggap berat badan manusia dewasa adalah 70 kg. Angka ini menunjukkan jumlah ponceau 4R yang dapat dikonsumsi setiap hari selama hidup tanpa menimbulkan efek merugikan terhadap kesehatan. Jika setiap kali makan di tempat makan cepat saji seseorang mengonsumsi dua sachet saus sambal B, maka seseorang tersebut mengonsumsi 0,18254mg ponceau 4R. Angka ini tidak melebihi dari ADI ponceau 4R. Di Indonesia, ponceau 4R bersama dengan karmosin, merah alura, dan eritrosin merupakan pewarna merah sintetik yang diizinkan untuk makanan dengan batas maksimum tertentu [5]. Namun, Ponceau 4R (Acid Red No.18) tidak termasuk dalam pewarna

merah yang diizinkan untuk makanan di Amerika [15]. Beberapa zat warna merah sintetis memiliki sifat toksik dan karsinogenik jika terakumulasi dalam tubuh karena dikonsumsi dalam jumlah besar atau berulang-ulang [7]. Dengan pola hidup masyarakat masa kini yang gemar mengonsumsi makanan cepat saji, akumulasi ponceau 4R dalam tubuh bisa saja terjadi. Beberapa penelitian mengenai efek merugikan ponceau 4R terhadap kesehatan tubuh dilakukan terhadap hewan uji. Ponceau 4R menimbulkan reaksi hipersensitivitas atau sensitivitas silang terhadap pewarna azo lainnya, aspirin, dan benzoat. Salah satu hasil penelitian menunjukkan bahwa ponceau 4R, amaranth dan merah alura menimbulkan kerusakan DNA kolon pada mencit jantan mulai dari dosis 10 mg/kg BB [16].

Walaupun kadar ponceau 4R dalam saus sambal B dibawah batas maksimum dan tidak melebihi dari ADI, konsumen diminta untuk tetap mengontrol jumlah saus sambal sachet yang dikonsumsi. Selain disebabkan oleh kemungkinan terjadinya akumulasi dalam tubuh, didalam saus sambal sachet juga mengandung bahan tambahan pangan lainnya yang dapat menimbulkan efek tidak diinginkan terhadap tubuh, seperti penegawet sintetis yang bersifat karsinogenik.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa KLT-densitometri dengan fasa diam silika GF254 dan fasa gerak campuran etanol:butanol:aquades (4:5:5) dapat digunakan untuk analisis pewarna merah sintetis ponceau 4R. Saus sambal sachet B teridentifikasi mengandung ponceau 4R dengan kadar 11,952mg/kg atau 0,09127mg/Sachet. Kadar ponceau 4R dalam sampel B tidak melebihi batas maksimum penggunaan ponceau 4R dalam makanan menurut Peraturan Kepala BPOM tahun 2013 tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pewarna.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winarno, F. G. (2004). Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
2. deMan, J. M. (1997). Kimia Makanan, Edisi Kedua, Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih, P. Penerbit ITB, Bandung.
3. Sweetman, C. S. (ed.). (2009) Martindale 36th Edition: The Complete Drug Reference, Pharmaceutical Press, London.
4. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). (2012). Bahaya Rhodamin B sebagai Pewarna pada Makanan, Direktorat SPKP, Deputi III, Badan Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
5. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). (2013), Peraturan Kepala Badan POM Republik Indonesia No. 37 tahun 2013 tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pewarna, Direktorat SPKP, Deputi III, Badan Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
6. Nugraheni, M. (2014). Pewarna Alami: Sumber dan Aplikasinya pada Makanan dan Kesehatan. Graha Ilmu, Yogyakarta.
7. Cahyadi, W. (2008). Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan, Edisi Kedua. Penerbit Bumi Aksara, Jakarta.
8. Karunia, F. B. (2013). Kajian Penggunaan Zat Adiktif Makanan (Pemanis dan Pewarna) Pada Kudapan Bahan Pangan Lokal di Pasar Kota Semarang. *Food Science and Culinary Education Journal*, 2(2), 72-78.
9. Azizahwati, Kurniadi, M. K., & Hidayati H. (2007). Analisis Zat Warna Sintetik Terlarang untuk Makanan yang Beredar di Pasaran. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 4(1), 7-25.
10. GL Science Inc. Analysis of Colorants by HPLC-PDA, <http://www.9/sciencences.com/products/contact.html/>, diakses tanggal 7-4-2015,
11. Turak, F., Dinç, M., Dölger, Ç., & Şzğzr, M. U. (2014). Four Derivative Spectrophotometric Methods for the Simultaneous Determination of Carmoisine and Ponceau 4R in Drinks and Comparison with High Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 2014.
12. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012, Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033/Menkes/Per/12 tentang Bahan Tambahan Pangan, Jakarta, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
13. Rohman, A. 2009, Kromatografi untuk Analisis Obat, Graha Ilmu, Yogyakarta.
14. Food and Drug Administration (FDA). (2013), Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, Revision I, Federal Register, USA.
15. US. Food and Drug Administration. (2013). Summary of Color Additives for Use in the United States in Food, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. Diakses 19 Desember 2014, [ives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm](https://www.fda.gov/oc/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm)
16. Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., & Sasaki, Y. F. (2001). DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences*, 61(1), 92-99.