

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS PEWARNA MAKANAN COKLAT HT DALAM BISKUIT COKLAT DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

¹Bertha Rusdi, ²Hilda Aprilia Wisnuwardhani

^{1,2}Jurusan Farmasi, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggagading No. 8 Bandung 40116

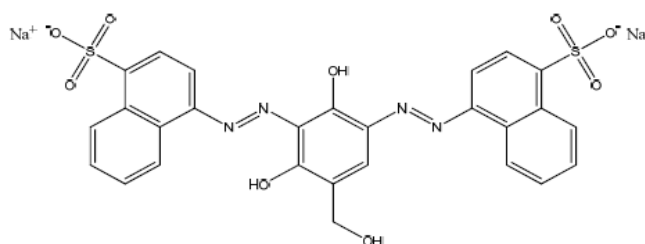
e-mail: bertha.rusdi@unisba.ac.id, hilda.aprilia@gmail.com,

Abstrak. Coklat HT adalah pewarna makanan yang memiliki batas maksimum penggunaan yang rendah. Pewarna ini umum digunakan sebagai pewarna dalam makanan berbasis coklat yang banyak disukai anak-anak, sehingga resiko konsumsi pewarna tersebut melebihi nilai ADI (acceptable daily intake) menjadi lebih besar. Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode analisis yang baik dan handal untuk mendukung pengawasan penggunaan pewarna coklat HT. Pada penelitian ini dilakukan optimasi preparasi sampel, fase gerak kromatografi dan tipe elusi. Optimasi preparasi sampel dilakukan dengan teknik ekstraksi cair-cair dan ekstraksi dengan benang wool. Optimasi fase gerak dilakukan dengan memvariasikan perbandingan dan komponen fase gerak, juga perbandingan tipe elusi isokratik dan landaian. Fase diam yang dipilih adalah kolom C₁₈. Hasil optimasi menunjukkan bahwa preparasi sampel dengan teknik ekstraksi cair-cair menggunakan campuran pelarut kloroform dan air (1:2) memberikan pemisahan yang cukup baik. Sistem kromatografi yang dipilih meliputi fase gerak adalah metanol – air = (5 : 5) dengan tipe elusi gradien, laju alir 1,2 mL/menit, detektor UV-sinar tampak panjang gelombang 460 nm. Uji kesesuaian sistem kromatografi memenuhi persyaratan, dengan nilai Simpangan Baku Relatif (% SBR) berturut-turut 1,08% untuk luas area dan 0,54% untuk waktu retensi. Validasi metode analisis memenuhi syarat untuk spesifisitas, keseksamaan, batas deteksi dan batas kuantisasi.

Kata kunci: Coklat HT, kuantitatif, KCKT, biskuit coklat

1. Pendahuluan

Coklat HT (CI No. 20285) (*Brown HT*) adalah pewarna makanan sintetik diazo dengan nama kimia 4,4-[(2,4-dihidroksi-5- (hidroksimetil 1,3-fenilen-bis-azo) di (naphtalensulfonat) (EFSA, 2010). Pewarna ini banyak digunakan untuk mewarnai berbagai jenis makanan seperti es krim, kue, biskuit, saos olesan dan juga minuman. Coklat HT diizinkan digunakan untuk makanan berdasarkan evaluasi yang dilakukan oleh *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) pada tahun 1977 dan 1984 serta oleh *EU Scientific Committee for Food* (SCF) pada tahun 1975 dan 1984. JECFA menyatakan nilai *Acceptable Daily Intake* (ADI) sebesar 0-1.5 mg/kg berat badan (bb)/hari, sementara SCF menetapkan nilai ADI sebesar 0-3 mg/kg bb/hari.



Gambar 1. Struktur Kimia Coklat HT

Indonesia sendiri mengizinkan penggunaan coklat HT dan menetapkan nilai ADI pewarna tersebut sebesar 0-1,5 mg/kg bb/hari berdasarkan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan RI (Per KBPOM) No. 37 tahun 2013 tentang batas maksimum penggunaan bahan tambahan pangan pewarna. Nilai ADI merupakan kadar maksimal yang dapat dikonsumsi oleh seseorang per kilogram berat badan per hari seumur hidup tanpa menimbulkan efek samping yang merugikan kesehatan. Maka jika nilai ADI suatu bahan tambahan makanan kecil menunjukkan bahwa bahan tersebut beresiko untuk menimbulkan efek yang merugikan bagi kesehatan. Coklat HT memiliki nilai ADI yang rendah jika dibandingkan dengan pewarna sintetik yang lain, data nilai ADI berbagai senyawa sintetik dapat dilihat pada table 1. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa kemungkinan terjadinya efek buruk terhadap kesehatan akibat konsumsi coklat HT relatif lebih besar dibandingkan dengan pewarna makanan lain.

Tabel 1
Nilai ADI Pewarna Sintetik yang Diizinkan (Per KBPOM No. 37 tahun 2013)

Pewarna Sintetik	Nilai ADI
Tartrazine	0-7,5 mg/kg berat badan
Kuning kuinolin	0-5 mg/kg berat badan
Kuning FCF	0-4 mg/kg berat badan
Karmoisin	0-4 mg/Kg berat badan
Ponceau 4 R	0-4 mg/kg berat badan
Merah Allura	0-7 mg/Kg berat badan
Indigotin	0-5 mg/kg berat badan
Biru berlian FCF	0-12,5 mg/kg berat badan
Hijau FCF	0-25 mg/kg berat badan
Coklat HT	0-1,5 mg/kg berat badan

Coklat HT adalah pewarna makanan berwarna coklat, umumnya ditambahkan ke dalam makanan yang berbasis coklat untuk memberikan warna yang seragam pada produk makanan dan minuman. Produk makanan atau minuman berbasis coklat sangat disukai oleh konsumen, terutama anak-anak. *European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS)* menyatakan bahwa berdasarkan hasil evaluasi diketahui bahwa 10% dari orang dewasa dan anak-anak usia 1-10 tahun yang menjadi objek evaluasi mengkonsumsi makanan/minuman yang mengandung coklat HT dengan kadar sedikit di atas nilai ADI (EFSA, 2010). Dengan demikian resiko terjadinya gangguan kesehatan akibat mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung coklat HT sangat mungkin terjadi. Meskipun pemerintah telah menetapkan batas maksimum penambahan pewarna ke dalam makanan atau minuman, namun banyak produsen makanan atau minuman terutama yang berskala kecil yang masih awam akan hal tersebut, sehingga mereka menambahkan pewarna tanpa takaran yang tidak jelas dan sangat mungkin lebih dari batas maksimum yang telah ditentukan.

Analisis kadar coklat HT perlu dilakukan untuk memastikan bahwa kadar coklat HT dalam makanan atau minuman memenuhi persyaratan batas maksimum. Analisis kadar coklat HT dalam makanan dan minuman yang berbasis coklat mengalami kendala karena adanya gangguan dari warna coklat yang berasal dari *cocoa* yang juga terkandung dalam makanan atau minuman tersebut.

Metode analisis coklat HT yang saat ini dilakukan di BPOM hanya melakukan analisis coklat HT secara kualitatif saja. BPOM sendiri belum memiliki metode analisis

kuantitatif coklat HT. Berdasarkan permasalahan yang telah disebutkan diatas maka pada penelitian ini akan dilakukan pengembangan metode analisis kadar coklat HT dalam makanan berbasis coklat. Dengan diperolehnya metode analisis kadar coklat HT, maka akan memudahkan pemantauan penggunaan coklat HT dalam makanan atau minuman, dan ke depannya dapat digunakan sebagai metode analisa untuk memantau paparan coklat HT pada konsumen melalui uji paparan.

2. Material dan Metode

Bahan yang digunakan

Baku pembanding Coklat HT, telur, tepung terigu, mentega, cocoa, gula tepung, kloroform p.a, metanol p.a, metanol pro HPLC, air bidestilata steril pro HPLC, air destilata

Alat yang digunakan

Seperangkat instrumen KCKT (Agilent), filter membran PTFE 0,45 μm , kolom KCKT C_{18} , alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam laboratorium

Optimasi fase gerak

Optimasi fase gerak dengan metode KCKT dilakukan dengan memvariasikan tipe elusi dan komposisi fase gerak yang digunakan. Komposisi fase gerak yang dicobakan adalah air dan metanol serta dapar fosfat dan metanol. Tipe elusi divariasikan menjadi dua metode yaitu tipe elusi isokratik dan tipe elusi gradient (landaian).

Pembuatan biskuit coklat simulasi

Telur, tepung terigu, mentega, cocoa, gula tepung dicampur dengan mixer hingga terbentuk massa yang dapat dicetak. Massa yang sudah dicetak sesuai selera kemudian dipanggang dengan oven hingga matang. Biskuit coklat yang sudah jadi kemudian dihaluskan dan ditimbang sebanyak 50 gram. Biskuit tersebut kemudian ditambahkan baku pembanding coklat HT sebanyak 500 mg, kemudian diaduk hingga homogen.

Untuk validasi metode analisis dibuat biskuit coklat simulasi dengan 3 konsentrasi yang berbeda, yaitu 400 mg dalam 50 gram, 500 mg dalam 50 gram dan 600 mg dalam 50 gram.

Preparasi sampel simulasi untuk analisis Coklat HT

Sampel biskuit coklat simulasi ditimbang sebanyak 50 gram, kemudian masukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan sebanyak 50 mL kloroform. Selanjutnya campuran tersebut diekstraksi dengan 2 x 50 mL air destilata selama masing-masing 30 menit. Fase air dan fase kloroform dipisahkan, kemudian fase air dikumpulkan dan siap untuk dilanjutkan ke proses analisis selanjutnya.

Uji Kesesuaian Sistem KCKT

Larutan standar coklat HT 1000 ppm yang telah disiapkan, disuntikkan sebanyak 6 kali ke dalam alat KCKT dengan sistem kromatografi yang sesuai, yaitu fase diam kolom C_{18} , fase gerak air : metanol dengan tipe elusi gradient, laju alir 1,5 mL/menit, panjang gelombang deteksi 460 nm, detektor UV-Sinar tampak. Hasil rekaman kromatogram untuk masing-masing penyuntikan kemudian dicatat untuk luas area uji dan waktu retensi. Nilai luas area uji dan waktu retensi kemudian dihitung simpangan baku relatifnya. Nilai Simpangan Baku Relatif (SBR) harus kurang dari 2,0%.

Analisis kualitatif dengan KCKT

Masing-masing larutan standar dan larutan uji diinjeksikan ke dalam KCKT dengan menggunakan sistem kromatografi yang telah dikembangkan. Kemudian masing-masing

kromatogram larutan standar dan uji diamati waktu retensinya. Waktu retensi kromatogram larutan standar harus sama dengan waktu retensi kromatogram larutan uji.

Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan baku (larutan standar) coklat HT dibuat dengan cara menimbang dengan seksama 10 mg baku pembanding coklat HT ke dalam labu takar 10 mL. Kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas (larutan coklat HT konsentrasi 1000 ppm atau 1 mg/mL). Larutan standar konsentrasi 1000 ppm kemudian dipipet masing-masing sebanyak 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 mL ke dalam labu takar 10 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas (konsentrasi akhir 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm). Masing-masing larutan tersebut kemudian diinjeksikan ke dalam KCKT dan direkam luas area ujinya, untuk selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dan ditentukan persamaan garis liniernya.

Validasi Metode Analisis

Spesifisitas

Spesifitas metode analisis diuji dengan menginjeksikan larutan uji dan larutan uji yang telah ditambahkan larutan standar (larutan baku ditambah), ke dalam alat KCKT. Masing-masing kromatogram yang dihasilkan kemudian dibandingkan luas area ujinya. Luas area uji larutan baku ditambah seharusnya memiliki luas area yang lebih besar dibandingkan dengan larutan uji. Selanjutnya dapat dibuktikan bahwa kromatogram coklat HT adalah benar dengan cara membandingkan kromatogram larutan uji dan larutan blanko, dimana seharusnya pada larutan blanko tidak memberikan luas area pada waktu retensi yang sama dengan larutan uji.

Linieritas

Linieritas diuji dengan cara menginjeksikan masing-masing larutan standar konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm ke dalam alat KCKT. Selanjutnya dari data luas area yang diperoleh, dibuat kurva antara konsentrasi dengan luas area. Dari data-data yang diperoleh kemudian bisa dihitung koefisien korelasi (r), dimana syaratnya harus $> 0,999$. Kemudian dihitung juga nilai koefisien variansi regresi linier (V_{x0}) dengan syarat maksimal 2,0%.

Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi

Batas deteksi dan batas kuantisasi diperoleh melalui perhitungan simpangan baku residual ($S_{y/x}$) dari kurva kalibrasi pada pengujian linieritas metode.

Penentuan kecermatan dan keseksamaan metode

Masing-masing sampel simulasi dianalisis dengan metode yang sudah dikembangkan. Selanjutnya dihitung persen perolehan kembali (% *recovery*), dengan syarat 80 – 120% dan simpangan baku relatif (% SBR) dengan syarat tidak lebih dari 20,0%.

3. Hasil dan pembahasan

Optimasi metode KCKT diawali dengan pemilihan fase diam (dalam bentuk kolom). Fase diam yang dipilih adalah kolom C_{18} karena coklat HT bersifat polar sehingga dengan menggunakan kolom yang bersifat non polar, maka coklat HT tidak akan ditahan terlalu lama di dalam kolom. Hal ini terkait dengan waktu analisis yang akan lebih efisien.

Selanjutnya dilakukan optimasi fase gerak berdasarkan jurnal ilmiah. Fase gerak dicoba dengan menggunakan dua tipe elusi yaitu isokratik dan gradient (landaian). Komposisi fase gerak yang dicobakan adalah kombinasi air : metanol dan kombinasi dapar fosfat pH 7.4 : metanol, dalam berbagai komposisi fase gerak (Hong dkk, 2012).

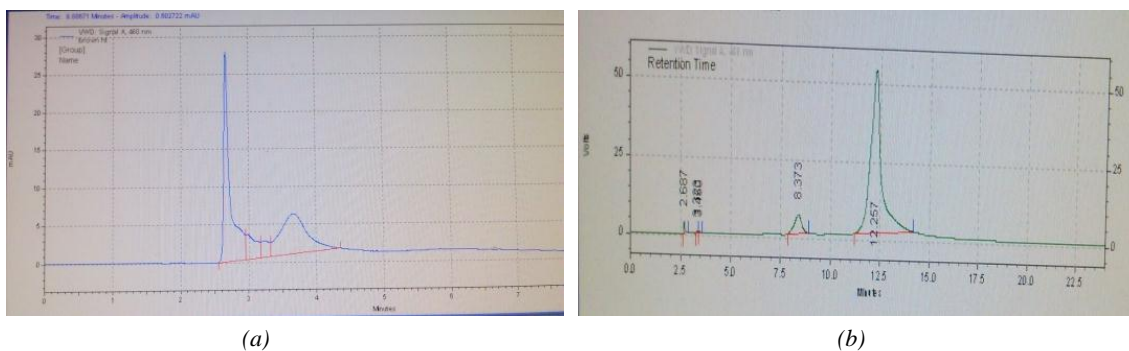
Kombinasi fase gerak dapar fosfat dan metanol tidak dipilih karena memberikan hasil yang tidak stabil, dimana kehadiran dapar fosfat cenderung menyebabkan pengkristalan di sekitar pompa KCKT sehingga tekanan alat cenderung menjadi tinggi dan memberikan hasil kromatogram yang kurang baik.

Komposisi fase gerak yang dipilih adalah metanol dan air dengan perbandingan 5: 5 (v/v), tipe elusi isokratik. Namun, ternyata menghasilkan kromatogram dengan waktu retensi yang terlalu rendah yaitu sekitan 2-3 menit, dimana waktu retensi tersebut sangat riskan tumpang tindih dengan waktu retensi pelarut dan fase gerak yang digunakan (Gambar 2a). Oleh karena itu, dicoba untuk menggunakan tipe elusi gradient yang menggunakan program waktu sebagai berikut (Gambar 2b).

Tabel 2
Komposisi fase gerak metanol – air = (5 : 5) berdasarkan program waktu (tipe elusi gradien)

Waktu (menit)	% Air
0	14
4,5	29
8	29
9	50
10,5	65
20,5	90
22	100
24	14

Penelitian selanjutnya dilanjutkan dengan melakukan uji kesesuaian sistem KCKT. Hal ini dilakukan untuk menguji apakah sistem kromatografi yang dipilih telah sesuai dan memenuhi persyaratan. Uji ini dilakukan dengan menginjeksikan secara berturut-turut larutan standar coklat HT ke dalam alat KCKT. Selanjutnya data masing-masing kromatogram yang terdiri dari luas area dan waktu retensi dihitung nilai simpangan baku relatifnya. Uji dikatakan memenuhi syarat karena nilai SBRnya sebesar 1,08% untuk luas area dan 0,54% untuk waktu retensi, dimana batas maksimumnya sebesar 2,0% (Tabel 3).

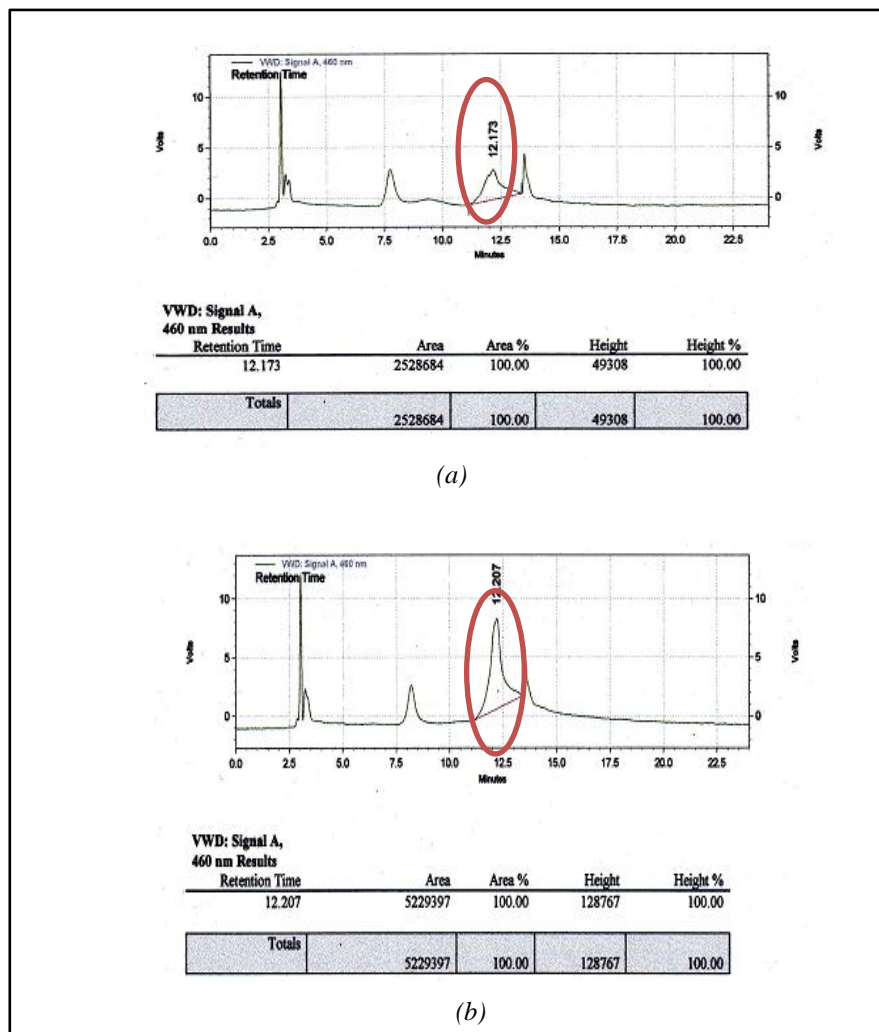


Gambar 2. Kromatogram larutan standar coklat HT dengan tipe elusi (a) isokratik: (b) landaian

Tabel 3
Uji Kesesuaian Sistem

Injeksi ke -	Luas Area	tR
1	22973514	12.377
2	22728442	12.307
3	22734463	12.437
4	22703823	12.327
5	22690576	12.257
6	23316137	12.277
Rataan	22857825.83	12.33
Simpangan baku	247822.85	0.07
SBR (%)	1.08	0.54

Untuk memastikan spesifisitas dari metode maka selanjutnya diinjeksikan berturut-turut larutan uji dan larutan baku tinambah (larutan uji yang telah ditambahkan larutan standar), dengan asumsi bahwa luas area pada waktu retensi coklat HT akan bertambah untuk larutan baku tinambah karena penambahan larutan standar. Hasil yang diperoleh sesuai seperti terlihat pada Gambar 3a dan Gambar 3b.



Gambar 3. Kromatogram (a) Larutan uji; (b) Larutan baku tinambah

Penelitian dilanjutkan dengan pengujian validasi metode analisis yang meliputi linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, serta kecermatan dan keseksamaan. Pengujian linieritas dilakukan bersamaan dengan pembuatan kurva kalibrasi. Linieritas metode analisis dilakukan untuk menilai kemampuan metode analisis dalam memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit (ICH, 2005). Hasil pengujian linieritas menunjukkan hasil yang memenuhi syarat yaitu koefisien korelasi sebesar 0,9995 (syarat >0,999) dan koefisien variansi regresi linier (V_{x0}) sebesar 1,66% (syarat maksimal 5,0%) (Ibrahim, 2005). Dari perhitungan linieritas juga dapat dihitung batas deteksi dan batas kuantitasi metode analisis, yaitu sebesar masing-masing 29,85 ppm dan 99,51 ppm.

Hasil kecermatan dan keseksamaan dapat dilihat pada Tabel 4. Dari hasil pengujian kecermatan (akurasi) diperoleh hasil yang tidak memenuhi syarat % perolehan kembali metode analisis sampel makanan yaitu 80 – 120%. Hal ini kemungkinan disebabkan belum optimalnya proses ekstraksi coklat HT pada bagian preparasi sampel makanan. Namun, untuk pengujian keseksamaan (presisi), pada pengulangan analisis sampel sudah diperoleh hasil simpangan baku relatif yang memenuhi syarat untuk metode analisis makanan yaitu maksimal 20%. Sehingga untuk selanjutnya perlu dilakukan pengembangan metode ekstraksi coklat HT yang lebih baik dengan metode lain yang lebih baik sehingga lebih akurat.

Tabel 4
Pengujian kecermatan dan keseksamaan

Konsentrasi Coklat HT	Konsentrasi hasil perhitungan	Perolehan kembali (%)	Rata-rata ± SD
400 mg/ 50 gram	787,63	19,691	20,717±2,398 SBR = 11,576%
	938,33	23,458	
	760,14	19,003	
500 mg/ 50 gram	1063,18	21,264	21,377±0,133 SBR = 0,625%
	1076,21	21,524	
	1067,12	21,342	
6 00 mg/ 50 gram	1293,11	21,552	20,819±1,710 SBR = 8,214%
	1322,40	22,040	
	1131,85	18,864	

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini telah dikembangkan metode analisis kualitatif dan kuantitatif coklat HT dalam sampel makanan dengan metode KCKT, yaitu dengan fase diam kolom C₁₈, fase gerak metanol – air = 5 : 5 dengan tipe elusi gradien, laju alir 1,2 mL/menit, detektor UV-sinar tampak dengan panjang gelombang detektor 460 nm. Hasil validasi metode analisis sampel menunjukkan hasil yang Memenuhi Syarat untuk spesifitas, linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, serta keseksamaan. Namun, Tidak Memenuhi Syarat untuk pengujian kecermatan.

Sampel makanan dipreparasi dengan cara diekstraksi dengan menggunakan air sebanyak dua kali dengan terlebih dahulu menambahkan kloroform untuk melarutkan komponen lemak dan protein yang dapat mengganggu analisis.

4.2 Saran

Perlu dilakukan optimasi metode ekstraksi coklat HT lanjutan dengan menggunakan ekstraksi fase padat (*solid phase extraction*, SPE) sehingga diperoleh persen perolehan kembali yang lebih baik dan memenuhi syarat, serta diharapkan dapat memperbaiki penampilan kromatogram larutan uji.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Islam Bandung atas terlaksananya acara Seminar Nasional Penelitian dan Pengabdian 2014 ini dan kepada pihak Panitia Prosiding atas kerjasamanya untuk memuat makalah seminar terpilih

Daftar Pustaka

- European Food Safety Authority (EFSA).(2010).Scientific Opinion on the re-evaluation of Brown HT (E 155) as a food additive1. *EFSA Journal*;8(4):1536
- Hong, Mi-Na, Hee-Jae Suh, Ok-Hwan Lee, Hyang-Sook Chun, Chan Lee, (2012). Improved Analytical Method of Synthetic Food Colour Additive, Brown HT By High Performance Liquid Chromatography; *Journal of International Scientific Publications: Agriculture and Food*; 2:68-75.
- Ibrahim, S. (2005).Berbagai Pendekatan Pengujian Kelinieran Kurva Baku pada Metode Analisis Instrumental, *Acta Pharm. Ind.*, 30(1), 30-34.
- International Conference on Harmonization (2005): Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1), 3, 7-13.
- Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 37 Tahun 2013 Tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pewarna.