

**VALIDASI METODE ANALISIS ASE Sulfam-K DAN
ASPARTAM DALAM MINUMAN SERBUK INSTAN DENGAN
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

SKRIPSI



Disusun oleh :

MUFIDAH

08613141

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JUNI 2012**

**VALIDASI METODE ANALISIS ASESULFAM-K DAN
ASPARTAM DALAM MINUMAN SERBUK INSTAN DENGAN
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



**Disusun oleh :
MUFIDAH
08613141**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JUNI 2012**

**VALIDASI METODE ANALISIS ASE-SULFAM-K DAN
ASPARTAM DALAM MINUMAN SERBUK INSTAN DENGAN
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

Yang diajukan oleh

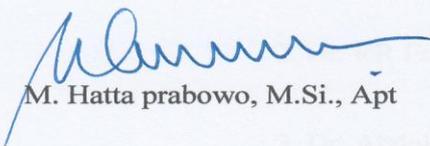
MUFIDAH

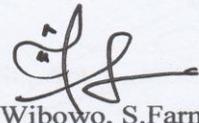
08613141

Telah disetujui oleh

Pembimbing Utama

pembimbing pendamping


M. Hatta prabowo, M.Si., Apt


Ari Wibowo, S.Farm., Apt

SKRIPSI
VALIDASI METODE ANALISIS ASESULFAM-K DAN
ASPARTAM DALAM MINUMAN SERBUK INSTAN DENGAN
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)

Oleh :

MUFIDAH
08613141

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 2 Juni 2012

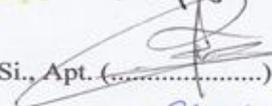
Ketua Penguji : M. Hatta Prabowo M.Si., Apt.



Anggota Penguji : 1. Ari Wibowo S.Farm., Apt.



: 2. Dr. RR Endang Lukitaningsih M.Si., Apt.



: 3. Dr. Abdul Rohman M.Si., Apt.



Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia




Yandi Syukri, M.Si., Apt.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, Mei 2012

Penulis,

Mufidah

HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrohmanirrohim...

Alhamdulillahirobbil'alamin.. Ya Allah terima kasih atas segala nikmat dan karuniaMu, akhirnya kewajibanku dijenjang perkuliahan Si dapat terselesaikan dan atas ridhoMu akan ku lanjutkan studi ku menuju ke jenjang yang lebih tinggi lagi..

Karya skripsiku ku persembahkan untuk.....

Orang tua tercinta, mamah, jidzh, jidi, chal, ati terima kasih atas doa, pengorbanan, segala kasih sayang, dan motivasi yang diberikan, sehingga dapat menyelesaikan studiku di Si. Untuk kakak2 ku Hana dan Najmah, adik2ku Nafilah, Iman, dan Fifi yang selalu memberikan semangat dan motivasi untuk mengerjakan menyelesaikan kuliahku dalam menuju keberhasilanku...

Thanks for All... insyaAllah I will do better and better...

Terima kasih juga untuk...

Sohib-sohibku tsayang Selly, Iya, Ida, Koto, Icha, Er, Rani, Adzl, Witry, Endah, Ayu, Moya, Nungki, Digah, yang selalu menemani, memberi dukungan, semangat, keceriaan, dan telah membuat hidupku indah menjadi lebih indah,, :) Mengenal kalian adalah suatu kebahagiaan dalam hidupku... :) Patner ngelabku Ilham yang telah membantu dalam penelitian ini.

“Man jadda wa jadda...

“Siapa yang bersungguh-sungguh pasti dapat”

“Choirunnas yanfau linnas”

Sebaik-baiknya manusia adalah yang bermanfaat bagi manusia lainnya..

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah segala rasa syukur penulis kehadiran Allah SWT, berkat rahmat dan inyah-Nya yang dilimpahkan sehingga penulis memperoleh kekuatan tenaga dan fikiran, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan segala kenikmatan-Nya. Shalawat serta salam penulis haturkan pada Nabi akhir zaman, Nabi Muhammad SAW yang senantiasa menuntun seluruh umat manusia ke jalan Allah SWT.

Skripsi ini ini disusun berdasarkan hasil penelitian penulis dengan judul **“VALIDASI METODE ANALISIS ASESULFAM-K DAN ASPARTAM DALAM MINUMAN SERBUK INSTAN DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)”** untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar sarjana Farmasi (S.Farm) Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

Dalam menyusun Skripsi ini penulis menyadari telah banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Yandi Syukri, S.Si., M.Si., Apt, selaku Dekan FMIPA Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.
2. Bapak M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt, selaku ketua Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Islam Indonesia Yogyakarta dan selaku pembimbing I, terima kasih untuk semua ilmu, nasehat dan sarannya.
3. Bapak Ari Wibowo, S.Farm., Apt, selaku pembimbing II, terima kasih untuk semua ilmu, kritik dan sarannya.
4. Ibu Dr. RR. Endang Lukitaningsih, M.Si., Apt, selaku penguji, terima kasih untuk semua ilmu, kritik dan sarannya.
5. Bapak Dr. Abdul Rohman, M.Si., Apt, selaku penguji, terima kasih untuk semua ilmu, kritik dan sarannya.

6. Dosen-dosen Program Studi Farmasi FMIPA UII, yang telah telah memberikan ilmu kepada penulis selama ini.
7. Orang tua, kakak, dan adik penulis yang telah memberi motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dalam penyusunan skripsi.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan sehingga penulis mengharapkan masukan dan saran dalam perbaikan skripsi ini. Sehingga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penerapan ilmu farmasi di masyarakat.

Yogyakarta, Mei 2012

Penulis,

Mufidah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
BAB II. STUDI PUSTAKA	
A. Tinjauan Pustaka	4
1. Pemanis buatan	4
2. Asesulfam-K (ACS)	4
3. Aspartam (ASP)	6
4. Metode analisis ACS dan ASP	7
a. Spektrofotometri UV-Vis.....	7
b. Spektrofotometri inframerah.....	8
c. Metode elektroforesis	8
d. Metode voltametri	8
e. Metode KCKT	8
5. Teori kromatografi	9
a. Prinsip kerja KCKT.....	9

b. Mekanisme pemisahan	9
c. Instrumen KCKT	10
6. Validasi metode.....	12
a. Definisi	12
b. Kategori uji yang terdapat dalam USP dan ICH	13
7. Parameter validasi	16
a. Akurasi	16
b. Presisi	16
c. LOD dan LOQ.....	17
d. Spesifitas	17
e. Linieritas dan rentang	17
f. Kekerasan	17
g. Ketahanan	18
B. Landasan Teori.....	19
C. Hipotesis.....	19
BAB III. METODE PENELITIAN	20
A. Alat dan Bahan	20
1. Alat	20
2. Bahan	20
B. Cara Penelitian.....	21
1. Pembuatan fase gerak	21
2. Penetapan waktu retensi.....	21
3. Kondisi KCKT	21
4. Pembuatan larutan stok.....	21
5. Pembuatan kurva baku.....	22
6. Validasi metode	22
7. Preparasi sampel dan penetapan kadar	23
C. Analisis Hasil	24
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Uji Kesesuaian Sistem	26
1. Faktor kapasitas	27
2. Resolusi.....	28

3. Faktor tailing.....	28
4. Jumlah plat teoritis.....	29
B. Validasi Metode	30
C. Penetapan kadar sampel minuman serbuk	37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	40
B. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur kimia ACS	5
Gambar 2. Struktur kimia ASP	6
Gambar 3. Instrumen KCKT	10
Gambar 4. Kromatogram standar (ACS, ASP) dan sampel (minuman serbuk instan yang mengandung ACS dan ASP).....	27
Gambar 5. Grafik kurva baku ACS	31
Gambar 6. Grafik kurva baku ASP	32

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Elemen-elemen data yang dibutuhkan untuk uji validasi	15
Tabel II.	Karakteristik validasi dan jenis prosedur analisisnya	15
Tabel III.	Data jumlah plat teoritis sampel	29
Tabel IV.	Parameter uji kesesuaian sistem metode KCKT yang digunakan pada analisis ACS dan ASP dalam sampel	29
Tabel V.	Luas area kurva baku ACS	30
Tabel VI.	Luas area kurva baku ASP	31
Tabel VII.	Nilai linieritas (r) dan V_{x0} ACS dan ASP	32
Tabel VIII.	Persyaratan RSD pada konsentrasi tertentu	33
Tabel IX.	Nilai presisi (<i>intraday</i>) luas area ACS dan ASP	33
Tabel X.	Nilai akurasi ACS	34
Tabel XI.	Nilai akurasi ASP	35
Tabel XII.	Nilai LOD- LOQ senyawa ACS dan ASP	36
Tabel XIV.	Hasil perhitungan kadar ACS dalam minuman serbuk rasa jeruk dan jambu	37
Tabel XV.	Hasil perhitungan kadar ASP dalam minuman serbuk rasa jeruk dan jambu	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Perhitungan faktor kapasitas	43
Lampiran 2.	Perhitungan resolusi	45
Lampiran 3.	Perhitungan faktor tailing	47
Lampiran 4.	Perhitungan jumlah plat (N)	59
Lampiran 5.	Perhitungan pengenceran seri kadar kurva baku campuran ACS dan ASP	51
Lampiran 6.	Perhitungan stok pembuatan sampel	53
Lampiran 7.	Perhitungan nilai V_{x0} ACS dan ASP	54
Lampiran 8.	Perhitungan LOD dan LOQ ACS dan ASP	56
Lampiran 9.	Perhitungan presisi ACS dan ASP	57
Lampiran 10.	Perhitungan akurasi ACS dan ASP	58
Lampiran 11.	Penetapan kadar ACS dan ASP	60
Lampiran 12.	Kromatogram standar ACS dan ASP	62
Lampiran 13.	Kromatogram presisi standar ACS dan ASP	64
Lampiran 14.	Kromatogram akurasi ACS dan ASP	65
Lampiran 15.	Kromatogram sampel standar ACS dan ASP	66

**VALIDASI METODE ANALISIS ASELSULFAM-K DAN ASPARTAM
DALAM MINUMAN SERBUK INSTAN DENGAN METODE
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

INTISARI

Asesulfam-K (ACS) dan aspartam (ASP) merupakan jenis pemanis buatan yang banyak digunakan pada produk minuman di pasaran. Kedua pemanis tersebut dapat menyebabkan efek yang merugikan kesehatan ketika dikonsumsi pada dosis tinggi. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk menjamin kadar ACS dan ASP yang terkandung dalam minuman serbuk instan masih memenuhi persyaratan *acceptable daily intake (ADI)*. Metode KCKT merupakan metode yang direkomendasikan oleh *British Standard* untuk menganalisis ACS dan ASP dalam campuran makanan dan minuman. Pada *British Standard* versi EN 12856 tahun 1999 menunjukkan waktu retensi untuk masing-masing ACS dan ASP adalah 5 dan 30 menit, dengan menggunakan fase diam C₁₈, fase gerak bufer fosfat : asetonitril (90 : 10), dan flow rate 0,8 ml/menit, sehingga perlu dilakukan pengembangan metode analisis untuk memperoleh waktu retensi dan resolusi yang lebih baik. Metode ini menggunakan fase diam C₁₈, fase gerak bufer fosfat : asetonitril (80:20), dan *flow rate* 1 ml/menit. Hasil penelitian menunjukkan perubahan waktu retensi untuk ACS (3,7 menit) dan ASP (6,4 menit) nilai resolusi 3,17 (ACS) dan 7,60 (ASP). Hasil parameter validasi berupa presisi RSD ACS (0,371%) dan ASP (0,014%), rata-rata akurasi 101,06% (ACS) dan 101,11% (ASP), linieritas (ACS) 0,9997 dan (ASP) 0,99992, LOD (ACS) 4,78 ppm dan (ASP) 0,74 ppm, LOQ ACS (14,51 ppm) dan ASP (2,2405 ppm) memenuhi persyaratan oleh AOAC. Kadar rata-rata pada sampel rasa jambu ACS (20,05 mg ± 0,00) dan ASP (50,89 mg ± 0,00). Pada sampel rasa jeruk ACS (27,25 mg ± 0,00) dan ASP (75,95 mg ± 0,00). Kadar ACS dan ASP yang terkandung dalam sampel masih dibawah nilai yang diperbolehkan oleh ADI (WHO).

Kata kunci: asesulfam-K, aspartam, KCKT, minuman, dan validasi metode.

**VALIDATION OF METHOD ANALYSIS ACESULFAME-K AND
ASPARTAME IN POWDER INSTANT BEVERAGE USED HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)**

ABSTRACT

Acesulfame-K (ACS) and aspartame (ASP) are part of artificial sweeteners that used in beverage products at market. ACS and ASP have several dangers effect when consumed in high dosage, so it need to research concerned amount in beverage products at the market. HPLC methods are recommended by British Standard to analysis ACS and ASP in compound food and beverages. *British Standard* versi EN 12856 ; 1999. ASP has retention time 30 minute and 5 minute for ACS, with stasionary phase C₁₈, mobile phase buffer phosphat : acetonitril (90:10), and flow rate 0,8 ml/menit. Finaly to get short time, its necessary to developed methods with modification mobile phase composition and flow rate 1 ml/minute, stasionary phase used in method is C₁₈ column, and mobile phase that consists of buffer phosphoric acid : acetonitrile (80:20), with UV detector at 217 nm (ASP) and 227 nm (ACS). The result of methods validation provide that are, the precision RSD (ACS) 0,371% and (ASP) 0,014%, accuracy (ACS) 101,06% and (ASP) 101,11%, linearity (ACS) 0,99970 and (ASP) 0,99992, LOD ACS (4,78 ppm) and ASP (0,74 ppm), and LOQ (ACS) 14,51 ppm dan (ASP) 2,24 ppm. That result is based on AOAC recommendation value. Avarage amount in the sampel guava taste is ACS (20,05 mg ± 0,00) and ASP (50,89 mg ± 0,00). Orange taste is ACS (27,25 mg ± 0,00) and ASP (75,95mg ± 0,00) This amount fulfill to the requirement are allowed in ADI (WHO).

Key word : acesulfame-K, aspartame, HPLC, Bevarage, and validation of method

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Keamanan pangan adalah upaya yang diperlukan untuk mencegah pangan dari kemungkinan cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan dan membahayakan kesehatan manusia. Pangan yang aman, bermutu, dan bergizi sangat penting peranannya bagi pertumbuhan, pemeliharaan, peningkatan derajat kesehatan dan kecerdasan masyarakat. Oleh karena itu, masyarakat perlu dilindungi dari pangan yang dapat merugikan atau membahayakan kesehatan, termasuk dalam penggunaan pemanis buatan yang berlebih sebagai tambahan pangan⁽¹⁾. Bahan tambahan pangan merupakan bahan yang sengaja ditambahkan ke dalam makanan⁽²⁾.

Pemanis buatan merupakan bahan tambahan pangan yang sering digunakan untuk memberikan rasa manis pada makanan atau minuman. Pemanis buatan sedikit atau tidak mempunyai nilai gizi. Pemanis buatan hanya boleh ditambahkan ke dalam produk pangan dalam jumlah tertentu⁽³⁾, sehingga perlu dilakukan penelitian terkait dengan kadar pemanis buatan yang digunakan pada produk-produk yang beredar dipasaran. Hal ini dilakukan untuk mengetahui tingkat keamanan dari produk yang banyak beredar di pasaran. Bahan-bahan pemanis yang sering digunakan diantaranya adalah Na sakarin, Na siklamat, aspartam dan asesulfam-K.

Asesulfam-K (ACS) dan aspartam (ASP) merupakan pemanis buatan yang paling dominan digunakan pada makanan dan minuman yang beredar di pasaran khususnya minuman instan. ACS 200 kali lebih manis daripada gula, sedangkan aspartam memiliki tingkat kemanisan relatif sebesar 60 - 220 kali. ASP merupakan pemanis buatan yang paling kontroversial karena potensi toksisitasnya⁽⁴⁾. Selain itu penggunaan ASP berbahaya bagi penderita penyakit fenilketonurik, karena penderita penyakit ini tidak dapat memetabolisme fenil alanin. Fenil alanin merupakan hasil metabolit dari ASP. Penimbunan fenil piruvat yang terbentuk dari fenil alanin dalam otak yang akhirnya dapat

menyebabkan kerusakan otak dan kecatatan mental⁽⁴⁾, sedangkan ACS tidak dapat dicerna, bersifat non glikemik dan non karsinogenik. Namun, percobaan pada tikus dengan menggunakan ACS dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan genetik pada tikus. JECFA (*Join Expert Committe on Food Additives*) mengizinkan ASP dan ACS sebagai pemanis buatan dengan nilai ADI ASP 50 mg/kg berat badan dan ACS 15 mg/kg berat badan^(4,5).

Sampai saat ini beberapa metode yang digunakan untuk menganalisis ASP dan ACS yaitu metode voltametri, kapiler elektroforesis, dan FTIR (*spektrofotometri infrared*), akan tetapi metode tersebut memerlukan proses preparasi sampelnya cukup panjang dengan penambahan beberapa reagen dan kurang sensitif^(6,7,8). Metode KCKT (kromatografi cair kinerja tinggi) merupakan metode analisis yang direkomendasikan oleh *British Standard* (BS EN) untuk menganalisis ASP dan ASP dalam campuran makanan dan minuman karena metode ini memiliki kemampuan pemisahan senyawa yang cukup baik, penyiapan sampel relatif mudah, lebih selektif dan sensitif. Oleh karena itu metode KCKT sangat cocok digunakan untuk menganalisis pemanis buatan ASP dan ACS dalam produk minuman yang menggunakan pemanis buatan⁽⁸⁾.

Pada penelitian ini akan dilakukan perubahan pada *flow rate* (kecepatan alir) dari 0,8 ml/menit menjadi 1 ml/menit sehingga akan mempercepat proses elusi dan waktu retensi ACS dan ASP. Selain itu untuk mendapatkan penyerapan yang maksimal, ACS dan ASP akan dilakukan pembacaan pada panjang gelombang yang maksimal untuk masing-masing senyawa yaitu dengan panjang gelombang 227 nm untuk ACS dan 217 nm untuk ASP, karena dilakukan perubahan prosedur analisis diantaranya yaitu *flow rate* 1 ml/menit, komposisi fase gerak, serta proses preparasi sampel, oleh karena itu perlu dilakukan validasi metode untuk memastikan metode analisis yang digunakan akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Parameter validasi yang diukur pada penelitian ini adalah akurasi, presisi, linieritas, LOD, dan LOQ. penelitian ini penting dilakukan supaya ditemukan metode penetapan kadar ACS dan ASP yang lebih baik. Sehingga dapat diterapkan dalam analisis penetapan kadar ACS dan ASP.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah parameter validitas metode analisis yang dikembangkan memenuhi parameter AOAC ?
2. Apakah metode analisis yang digunakan dapat menentukan untuk kadar ACS dan ASP dalam minuman serbuk instan?
3. Apakah kadar ACS dan ASP yang ada pada minuman serbuk instan sudah memenuhi persyaratan *Acceptable Daily Intake (ADI)* ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan :

1. Untuk mengetahui apakah parameter validitas metode analisis yang dikembangkan memenuhi parameter AOAC.
2. Untuk mengetahui metode analisis yang digunakan dapat menentukan kadar ACS dan ASP dalam minuman serbuk instan.
3. Untuk mengetahui kadar ACS dan ASP yang terkandung dalam minuman serbuk instan memenuhi persyaratan *Acceptable Daily Intake (ADI)*?

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat :

1. Penggunaan metode KCKT untuk menganalisis ACS dan ASP yang terkandung dalam minuman serbuk instan.
2. Dapat menjadi masukan kepada BPOM dalam menetapkan kadar pemanis buatan dengan metode KCKT yang validitasnya baik.
3. Memberikan jaminan informasi kepada masyarakat mengenai kewaspadaan terhadap pemanis buatan yaitu kadar ACS dan ASP pada minuman serbuk instan.

BAB II STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Pemanis

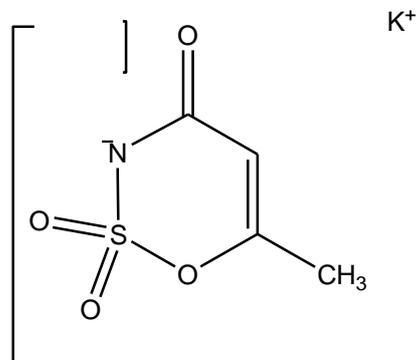
Pemanis buatan atau pengganti gula adalah zat kimia yang sering digunakan dari pada sukrosa (gula pasir) untuk memmaniskan makanan dan minuman. Karena pemanis buatan beberapa kali lebih manis daripada sukrosa, pemanis buatan hanya membutuhkan jumlah yang lebih kecil untuk memberikan rasa yang manis pada tingkat yang sama⁽¹¹⁾.

Pemanis buatan diperoleh secara sintesis melalui reaksi-reaksi kimia di laboratorium maupun skala industri. Karena diperoleh melalui proses sintesis dapat dipastikan bahan tersebut mengandung senyawa-senyawa sintesis. Penggunaan pemanis buatan perlu diwaspadai karena dalam takaran yang berlebih dapat menimbulkan efek samping yang merugikan kesehatan manusia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa jenis pemanis buatan berpotensi menyebabkan tumor dan bersifat karsinogenik. Oleh karena itu Organisasi Kesehatan Dunia *World Health Organization (WHO)* telah menetapkan batas-batas yang disebut *Acceptable Daily Intake (ADI)* atau kebutuhan per orang per hari, yaitu jumlah yang dapat dikonsumsi tanpa menimbulkan risiko. Sejalan dengan itu di negara-negara Eropa, Amerika dan juga indonesia telah ditetapkan standar penggunaan pemanis buatan pada produk makanan⁽¹¹⁾.

2. Asesulfam-K (ACS)

ACS dengan rumus kimia $C_4H_4KNO_4S$ atau garam kalium dari *6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide* atau garam Kalium dari *3,4-dihydro-6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4-one-2,2-di-oxide* merupakan senyawa yang tidak berbau, berbentuk tepung kristal berwarna putih, mudah larut dalam air dan berasa manis dengan tingkat kemanisan relatif sebesar 200 kali tingkat kemanisan sukrosa tetapi tidak berkalori. ACS stabil pada larutan encer pH 3,0-3,5 dalam suhu 20°C. Penggunaan ACS dikombinasi dengan asam aspartat dan

natrium siklamat bersifat sinergis dalam mempertegas rasa manis gula⁽¹²⁾ .
berikut gambar struktur kimia ACS dibawah ini:



Gambar 1. Struktur kimia ACS

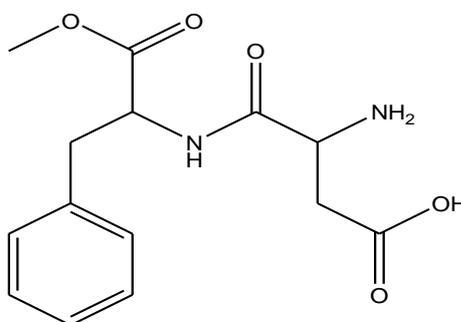
ACS ditemukan pada tahun 1967 oleh kimiawan Karl Clauss. Dia melihat rasa manis ketika dia menjilat jarinya saat bekerja di laboratorium. ACS disetujui di Amerika Serikat pada tahun 1988 untuk keperluan tertentu, termasuk pemanis tablet. Pada tahun 1998, FDA menyetujui ACS untuk digunakan dalam minuman. Secara khusus, ACS telah digunakan untuk mengurangi rasa pahit dari ASP dan dapat ditemukan dalam produk yang mengandung Nutrasweet. Pada tahun 2003, telah disetujui untuk penggunaan umum dalam makanan, termasuk daging atau unggas⁽⁴⁾ .

Stabilitas ACS

Stabilitas dan Kondisi Penyimpanan ACS memiliki stabilitas yang baik. Dalam bentuk *bulk* tidak menunjukkan tanda dekomposisi pada suhu lingkungan selama bertahun-tahun. Dalam larutan berair pKa 2,2 (pH 3,0-3,5 pada 20°C) tidak ada penurunan manis diamati selama jangka waktu sekitar 2 tahun. Stabilitas pada temperatur tinggi yang baik, meskipun beberapa dekomposisi tercatat penyimpanan berikut pada 40°C selama beberapa bulan. Sterilisasi dan pasteurisasi tidak mempengaruhi rasa ACS. Bahan massal harus disimpan dalam wadah tertutup baik dalam tempat kering dan terlindung dari cahaya⁽¹²⁾ .

3. Aspartam (ASP)

ASP atau aspartil fenilalanin metil ester (APM) dengan rumus kimia $C_{14}H_{18}N_2O_5$ atau *3-amino-N(α -carbomethoxy-phenethyl)succinamic acid*, *N-L- α -aspartyl-L-phenylalanine-1-methyl ester* merupakan senyawa yang tidak berbau, berbentuk tepung kristal berwarna putih, sedikit larut dalam air, berasa manis dan stabil dalam kondisi kering dan larutan encer. ASP memiliki tingkat kemanisan relatif sebesar 60 sampai dengan 220 kali tingkat kemanisan sukrosa, dengan nilai kalori sebesar 0,4 kkal/g atau setara dengan 1,67 kJ/g. Kombinasi penggunaan ASP dengan pemanis buatan lain dianjurkan terutama untuk produk-produk pangan dalam mempertegas cita-rasa buah^(11,12). Berikut struktur kimia ASP dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur kimia ASP

ASP pertama kali disetujui oleh FDA pada tahun 1981 sebagai *table top*, pada tahun 1996, itu disetujui sebagai pemanis umum tujuan dalam semua makanan dan minuman. Sejak persetujuan, ASP telah digunakan lebih dari 6.000 produk oleh ratusan juta orang di negara-negara di seluruh dunia⁽⁵⁾.

Ketika ASP dikonsumsi maka akan dihidrolisis di lumen usus ke dalam komponen-komponennya yaitu menjadi, asam aspartat, fenilalanin, dan metanol. Komponen ini kemudian diserap ke dalam darah dan masing-masing dimetabolisme. Telah dihipotesiskan bahwa baik ASP maupun komponen lain yang terakumulasi dalam tubuh, akan digunakan oleh tubuh dengan cara yang sama. Dosis tunggal ASP 34 mg/kg. Salah satu metabolit, metanol, telah terbukti untuk lebih dimetabolisme menjadi formaldehide dan asam formiat. Perkembangan asidosis metabolik telah terjadi dengan tingkat darah yang signifikan dari asam formiat⁽⁵⁾.

Penelitian baru dari Soffritti pada tahun 2007 memberikan bukti potensi karsinogenik dari senyawa ini. Penelitian ini dilakukan menggunakan tikus Sprague Dawley, hasil penelitian ini telah menunjukkan peningkatan yang signifikan dari tumor ganas pada laki-laki, peningkatan insiden limfoma dan leukemia pada laki-laki dan perempuan, dan peningkatan kejadian kanker payudara pada wanita. Hasil ini memperkuat dan mengkonfirmasi penelitian sebelumnya yang juga menunjukkan potensi karsinogenisitas ASP dan potensi karsinogenik meningkat jika paparan terjadi selama kehamilan. Hal ini dicatat bahwa dosis diuji didekati ADI untuk manusia⁽⁴⁾.

Stabilitas ASP

ASP memiliki pH 4,5-6 dalam air. ASP stabil dalam kondisi kering. ASP akan terdegradasi pada kondisi suhu yang tinggi, pH yang tinggi dan dalam kondisi lembab, ASP akan terhidrolisis membentuk produk degradasi membentuk fenilalanin, asam aspartat dan metanol. ASP stabil dalam larutan bufer dan pelarut organik pada suhu 25°C dengan pH 3,5-4,5 dan pKa 3,9. ASP juga terdegradasi selama suhu panas. ASP harus disimpan dalam wadah tertutup baik, di tempat yang sejuk dan kering. ASP tidak kompatibel dengan kalsium fosfat pada suasana basa dan juga dengan pelumas magnesium stearat, aspartam juga bereaksi dengan gula alkohol⁽¹¹⁾.

4. Metode analisis ACS dan ASP

Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk menganalisis aspartam antara lain spektrofotometri UV-Vis, FTIR, kapiler elektroforesis, dan potensiometri.

a. Spektrofotometri UV-Vis

Metode ini digunakan untuk menganalisis ASP dalam minuman berkarbonasi. Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis yang cepat, efektif dan efisien, namun metode ini memiliki kekurangan yaitu kurang sensitif, dan tidak dapat memisahkan campuran senyawa sehingga kurang selektif⁽¹⁹⁾.

b. Spektrofotometri Inframerah (FTIR)

Metode FTIR digunakan untuk menganalisis ACS dan ASP dalam *tabletop*. Metode FTIR memiliki beberapa kekurangan yaitu kurang sensitif dan kurang selektif sehingga tidak cocok digunakan untuk menganalisis senyawa dalam campuran karena dapat menyebabkan interferensi spektrum⁽⁸⁾.

c. Kapiler Elektroforesis

Metode ini digunakan untuk menganalisis ACS dan ASP. Metode kapiler elektroforesis merupakan metode analisis yang cepat dan efisien, namun metode ini memiliki beberapa kekurangan antara lain detektornya kurang sensitif, matriks sampel dapat menyebabkan pergeseran dalam waktu retensi dan variasi respon luas puncak⁽⁷⁾.

d. Metode Voltametri

Metode ini digunakan untuk menganalisis ACS dan ASP dalam bentuk campuran. Metode ini memerlukan proses ekstraksi khusus dalam proses preparasi sampel dengan penambahan beberapa reagen sehingga metode ini memerlukan waktu yang cukup lama untuk preparasi sampel dengan resiko analisis yang cukup tinggi, sehingga metode voltametri kurang praktis⁽⁶⁾.

e. Metode KCKT

Analisis bahan tambahan di dalam minuman pada penelitian ini menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), karena analisis dengan KCKT cepat, daya pisah baik, peka, penyiapan sampel relatif mudah, dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai. Beberapa pustaka menunjukkan bahwa metode KCKT fase terbalik merupakan metode terpilih untuk analisis campuran bahan tambahan tersebut, karena zat-zat tersebut bersifat polar dan larut dalam air sehingga sulit dipisahkan menggunakan KCKT fase normal yang menggunakan kolom polar dan fase gerak yang bersifat non polar⁽¹⁰⁾.

5. Teori Kromatografi

KCKT adalah bentuk modern dari kromatografi cair. Kromatografi cair (Teknik pemisahan fisik yang dilakukan dalam fase cair) sampel dipisahkan menjadi komponen-komponen penyusunnya (analit) dengan mendistribusikan antara fase gerak (cairan mengalir) dan fase stasioner (sorbent dikemas dalam kolom)⁽¹⁴⁾.

KCKT (Kromatografi cair kinerja tinggi) atau biasa disebut dengan HPLC (*high performance liquid chromatography*) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini KCKT merupakan teknik pemurnian yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang, antara lain: farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri makanan. Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan dan penentuan senyawa organik dan anorganik dalam suatu sampel khususnya sampel-sampel yang berkaitan dengan biologi, farmasi, makanan, lingkungan, industri, dll. KCKT paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat, dan protein-protein dalam fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis atau produk-produk degradasi dalam sediaan farmasi⁽¹⁰⁾.

a. Prinsip kerja KCKT

Prinsip kerja KCKT adalah perbedaan kekuatan interaksi antara solut-solut terhadap fase diam. Solut-solut yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar dari kolom lebih dahulu. Sebaliknya, solut-solut yang kuat berinteraksi dengan fase diam maka solut-solut tersebut akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram⁽¹⁵⁾.

b. Mekanisme Pemisahan

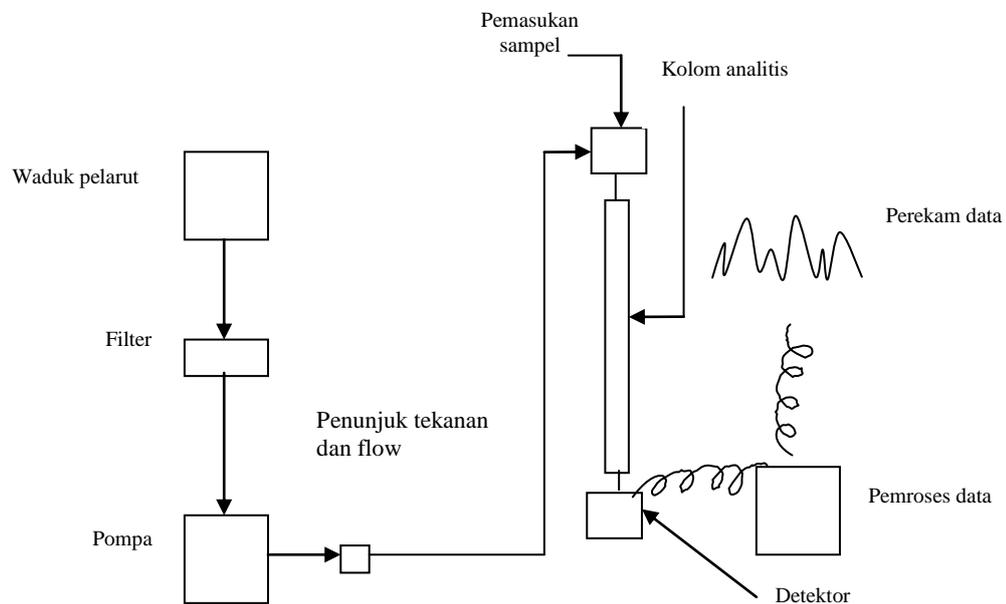
Berdasarkan Mekanisme retensi kromatografi cair kinerja tinggi dikelompokkan menjadi :

- (1) Adsorpsi Fase terikat (*bonded phase chromatography*)
- (2) Penukar ion (*ion exchange*)
- (3) Eksklusi ukuran (*size exclusion*)
- (4) Partisi (*partition*)

Analisa kadar ACS dan ASP dapat menggunakan mekanisme partisi. Retensi solut dan pemisahan dalam kromatografi partisi analog dengan proses ekstraksi cair-cair dalam sistem kromatografi fase terbalik (*reversed phase chromatography*). Biasanya fase gerak lebih polar dari pada fase diam⁽¹⁰⁾.

c. Instrumen KCKT

Pada dasarnya terdiri atas 8 komponen pokok yaitu: wadah fase gerak, sistem penghantar fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator atau perekam⁽¹⁵⁾. Beberapa instrumen akan dijelaskan dibawah ini



Gambar 3. Instrument HPLC⁽¹⁰⁾.

(1) Fase gerak

Fase gerak dalam KCKT adalah berupa zat cair dan disebut juga eluen atau pelarut. Fungsi fase gerak adalah membawa komponen-komponen campuran menuju fase diam dan juga berinteraksi dengan solut-solut. Pada KCKT fase gerak merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan proses pemisahan. Zat cair yang akan digunakan sebagai fase gerak KCKT harus memenuhi beberapa persyaratan sebagai berikut:

- (a) Zat cair harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk cuplikan yang akan dianalisis.
- (b) Zat cair harus murni untuk menghindarkan masuknya kotoran yang dapat mengganggu interpretasi kromatogram.
- (c) Zat cair harus jernih sekali untuk menghindarkan penyumbatan pada kolom. Biasanya pelarut disaring dengan saringan nilon berukuran diameter pori 0,45 μm . Pompa vakum biasanya digunakan untuk menyaring partikel kotoran sekaligus menghilangkan gas dari pelarut karena gas dapat mengganggu *base line*.
- (d) Zat cair harus mudah diperoleh, murah, tidak mudah terbakar, dan tidak beracun.
- (e) Zat cair tidak kental. Umumnya kekentalannya tidak melebihi 0,5 cP (centi poise).
- (f) Sesuai dengan detektor. Contoh untuk detektor UV pelarut tidak boleh menyerap cahaya pada panjang gelombang yang dipakai.

(2) Pompa

Pada KCKT pompa dapat dianalogikan dengan jantung pada manusia berfungsi mengalirkan fase gerak cair melalui kolom yang berisi serbuk halus. Pompa yang digunakan dalam KCKT harus memenuhi persyaratan: tekanan sampai 6000 psi ($\text{pounds}/\text{in}^2$), keluaran bebas pulsa, kecepatan alir berkisar antara 0,1-1,0 mL/menit dan bahan tahan korosi.

(3) Pemasukan cuplikan

Kadang kala faktor ketidaktepatan pengukuran KCKT terletak pada keterulangan pemasukan cuplikan ke dalam kolom. Masalahnya, terlalu banyak pemasukan cuplikan ke dalam kolom dapat menyebabkan *band broadening*. Oleh karena itu cuplikan yang dimasukkan harus sekecil mungkin, yaitu beberapa puluh mikroliter. Selain itu, perlu diusahakan tekanan tidak menurun ketika memasukkan cuplikan ke dalam aliran fase gerak.

(4) Kolom

Kolom KCKT biasanya terbuat dari *stainless steel* walaupun ada yang terbuat dari gelas berdinging tebal. Kolom utama berisi fase diam, tempat terjadinya pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya bergantung pada keperluannya kolom utama dapat digunakan untuk analisis preparatif. Untuk keperluan preparatif, setiap komponen yang keluar kolom ditampung pada tabung yang berbeda dan keluaran KCKT dihubungkan dengan *fraction collector*. Selain kolom utama dikenal pula kolom pengaman (*guard colum*)⁽¹⁵⁾.

(5) Detektor

Berbagai detektor untuk KCKT tersedia walaupun demikian detektor harus memenuhi persyaratan berikut: cukup sensitif, stabilitas, dan keterulangan tinggi, respon linier terhadap solut, waktu respon pendek sehingga tidak bergantung kecepatan alir, reliabilitas tinggi dan mudah digunakan dan tidak merusak cuplikan⁽¹⁵⁾.

6. Validasi Metode

a. Definisi

Validasi metode merupakan proses peninjauan ulang prosedur analisis secara berkala untuk memastikan bahwa prosedur tersebut masih sesuai bila dipergunakan untuk menyajikan hasil tes yang dapat dipercaya. Menurut *United State Pharmacopeia* (USP) validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis⁽¹⁰⁾.

Validasi metoda analisa adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya⁽¹⁸⁾.

b. Kategori uji yang terdapat dalam USP dan *International Conference on Harmonization* (ICH) :

(1) Kategori I

Metode untuk kuantifikasi komponen mayor dalam produk obat ruahan *Active Pharmaceutical Ingredient* (API), termasuk senyawa-senyawa pengawet dalam produk akhir obat, diklasifikasikan dalam kategori I. Metode uji dan keseragaman kandungan masuk dalam kategori ini. Metode kategori I menunjukkan bahwa klaim kandungan produk obat memenuhi persyaratan yang dikehendaki. Metode-metode pengujian biasanya dilakukan dengan menggunakan sampel komplit (misalkan 20 sampel), sementara penentuan keseragaman kandungan dilakakukan dengan satu unit sampel sediaan obat⁽²⁰⁾.

Analisis kelumit tidak disyaratkan pada uji keseragaman kandungan ini, karenanya penentuan *Limit Of Detection* (LOD) dan *Limit Of Quantitation* (LOQ) dalam uji ini tidaklah penting. Meskipun demikian, nilai LOD dan LOQ penting dilakukan jika penentuan keseragaman kandungan terhadap suatu produk obat yang mengandung zat aktif kedua yang mempunyai kandungan relatif 0,5% atau lebih kecil terhadap kandungan zat aktif mayor⁽²⁰⁾.

(2) Kategori II

Metode kategori II ditujukan untuk menentukan pengotor atau pengganggu impurities dalam ruahan obat (*bulk*), produk-produk degradasi dalam produk obat akhir atau dalam proses pembersihan (*cleaning process*). Metode ini lebih lengkap dibagi menjadi dua yaitu ke dalam uji kuantitatif dan uji batas (*limit test*)⁽²⁰⁾.

(a) Kuantitatif

Penentuan pengotor (*impurities*) dan produk-produk degradasi melibatkan analisis sekelumit yang mana komponen-komponen ini berada pada level kurang dari 1% terhadap konsentrasi senyawa aktif obat atau dari klaim label yang tertera dalam produk akhir obat. Semua parameter yang dibutuhkan untuk diuji pada kategori I dan nilai LOQ harus ditentukan untuk metode-metode jenis ini. Metode-

metode pembersihan (*cleaning method*) merupakan suatu kasus khusus yang mana metode ini dapat dimasukkan ke dalam uji kuantitatif ataupun ke dalam uji batas⁽²⁰⁾.

(b) Uji batas (*limit test*)

Dalam kasus uji batas, tidak ada proses kuantifikasi yang terlibat. Sampel dikerjakan terhadap standar yang disiapkan pada level tertentu. Respon sampel ditentukan baik di atas atau di bawah jumlah standar, dan hasilnya dinyatakan apakah memenuhi atau tidak terhadap spesifikasi yang ditentukan. Nilai LOQ tidak diperlukan dalam metode ini, akan tetapi LOD diperlukan. Spesivitas merupakan parameter lain selain ruggedness yang diperlukan untuk validasi jenis metode ini, meskipun akurasi dan kisaran mungkin juga ditentukan tergantung pada sifat metode⁽²⁰⁾.

(3) Kategori III

Metode-metode yang digunakan untuk menentukan karakteristik kinerja produk akhir jatuh pada kategori III. Uji disolusi (tidak termasuk pengukurannya) dan uji-uji pelepasan obat merupakan contoh metode yang masuk kategori ini. Presisi merupakan parameter yang dipersyaratkan untuk kategori III ini, meskipun parameter-parameter validasi yang lain juga dapat ditentukan sesuai dengan tujuan yang diinginkan⁽²⁰⁾. Elemen-elemen data yang dibutuhkan untuk uji validasi yang dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Elemen-elemen data yang dibutuhkan untuk uji validasi

Parameter Kinerja Analisis	Pengujian Kategori I	Pengujian kategori II		Uji Kategori III
		kuantitatif	Uji batas	
Akurasi	Ya	Ya	*	*
Presisi	Ya	Ya	Tida	Ya
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*
LOD	Tidak	Tidak	Ya	*
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	*
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*
Kisaran (range)	Ya	Ya	*	*
Ruggedness	Ya	Ya	Ya	Ya

*mungkin dibutuhkan tergantung pada uji spesifiknya

(4) Kategori IV

Uji identifikasi dalam kategori IV hanya membutuhkan uji spesifisitas untuk validasinya. Karakteristik validasi dan jenis prosedur analisisnya dapat dilihat pada tabel II .

Tabel II. Karakteristik validasi dan jenis prosedur analisisnya

Jenis prosedur Analisis	Uji kemurnian			
	identifikasi	kuantitatif	Uji batas	pengujian
Akurasi	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Presisi				
Repeatibilitas	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Persisi antara	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Spesifisitas	Ya	Ya	Ya	Ya
LOD	Tidak	Tidak	Ya	Tidak
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Linieritas	Tidak	Ya	Tidak	Ya

7. Parameter Validasi

a. Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan menggunakan *spiking* atau *addisi* pada suatu sampel⁽¹⁰⁾. Secara umum akurasi didefinisikan sebagai ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan⁽¹⁸⁾.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{CF - C^*A}{CA} \times 100 \%$$

Keterangan :

C_F : konsentrasi total sampel hasil pengukuran

CA: konsentrasi sampel sebenarnya

C^*A : konsentrasi analit yang ditambahkan

b. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berada secara statistik. Presisi terdiri atas 3 tingkat yaitu: keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*)⁽¹⁰⁾.

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

Keterangan :

x_i = nilai dari masing-masing pengukuran sampel

\bar{x} = rata-rata dari pengukuran sampel

n = jumlah sampel

c. LOD dan LOQ

LOD (*limit of detection*) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasikan. LOD adalah kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blangko (y_b) ditambahkan dengan 3 simpangan baku blangko ($3S_b$). LOQ (*limit of Quantitation*) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) untuk menghitung nilai LOD dan LOQ dapat digunakan 2 metode yaitu metode non instrumental visual dan dengan metode perhitungan. Metode non instrumental visual digunakan pada kromatografi lapis tipis dan metode titrimetri. LOD dapat juga dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku pada level yang mendeteksi LOD sesuai dengan rumus $LOD = 3,3 (SD/S)$. Untuk $LOQ = 10 (SD/S)^{(10)}$.

d. Spesifitas

Spesifitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matrik sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks⁽¹⁰⁾.

e. Linieritas dan rentang

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa kurva kalibrasi yang menghubungkan antara konsentrasi (X) dan respon (Y). Rentang adalah konsentrasi tertinggi dan terendah yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi dan linieritas yang mencukupi^(10,18).

f. Kekasaran

Kekasaran (*ruggedness*) merupakan tingkat reproduibel hasil yang diperoleh pada kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai standar deviasi relatif (%RSD). Kondisi ini meliputi laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda⁽¹⁰⁾.

g. Ketahanan

Ketahanan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti : persentasi pelarut organik, pH, persentase fase gerak, suhu kolom dan sebagainya kemudian dilihat efeknya terhadap nilai presisi dan akurasi⁽¹⁸⁾.

B. Landasan Teori

Penggunaan pemanis buatan seperti ACS dan ASP yang melebihi batas *acceptable daily intake* (ADI) dapat menimbulkan efek berbahaya, seperti tumor, kanker payudara, dan limfoma. Oleh karena itu, pengujian pemanis buatan dalam produk minuman yang beredar di pasaran perlu dilakukan secara rutin. Selain dapat memberikan informasi kadar pemanis buatan, hal ini juga sebagai bentuk pengawasan terhadap produk yang menggunakan pemanis buatan. Penelitian ini menggunakan metode KCKT yang direkomendasikan oleh *british standard* untuk menetapkan kadar ACS dan ASP. Metode ini perlu dikembangkan karena memiliki waktu retensi yang lama untuk kedua pemanis buatan tersebut. Pengembangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah perubahan komposisi fase gerak dapan : asetonitril (90 : 10) menjadi (80 : 20) dan perubahan *flow rate* 0,8 ml/menit menjadi 1 ml/menit. Meskipun perubahan kenaikan *flow rate* akan menurunkan efisiensi pemisahan, namun apabila nilai $N > 2000$ masih dikatakan baik. Setiap metode yang baru dikembangkan harus dilakukan upaya pembuktian kehandalannya sehingga perlu dilakukan proses validasi.

C. Hipotesis

1. Metode yang dikembangkan memenuhi persyaratan parameter validitas yang baik.
2. Metode yang dikembangkan dapat digunakan untuk menentukan kadar ACS dan ASP.
3. Kadar ACS dan ASP memenuhi persyaratan *Accepable Daily Intake* (WHO).

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dua tahap pekerjaan, yaitu persiapan analisis dan validasi metode uji ACS dan ASP yang mengacu pada *British Standard* versi EN 12856 tahun 1999. Pada validasi ini dilakukan uji presisi, akurasi, linieritas, limit deteksi, dan limit kuantitatif metode.

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat KCKT (Waters® e2695, USA), Detektor UV-Vis (Waters® 2489, USA), kolom C₁₈ (300 mm x 3,9 mm) 10 µm (phenomenex®, USA), timbangan analitik semi mikro (0,01mg), makrobalance (0,1mg) (Mettler Toledo®, USA), ultrasonic bath (Branson®, USA), seperangkat alat gelas (Iwaki pyrex) (labu takar 500ml, 200 ml, 100 ml, 50 ml, dan 10 ml. Pipet ukur 5 ml, dan 1 ml, Gelas ukur 250 ml, 200 ml, 100 ml), penyaring, kertas saring 0,45 µm, vakum penyaring.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah standar ACS, (pro analisis, supeleco, USA) standar ASP (pro analisis, supeleco, USA), Kalium dihidrogen ortofosfat (KH₂PO₄) (pro analisis, Merck, Germany), akuabides (PT. Ikapharmindo Putramas, Indonesia), sampel produk minuman serbuk instan, acetonitril (HPLC grade, Merck, Germany) larutan carrez I (pro analisis, Merck, Germany), larutan carrez II (pro analisis, Merck, Germany), asam phosfat (pro analisis Merck, Germany).

B. Cara Penelitian

1. Pembuatan Fase Gerak

a. Larutan Dapar fosfat (KH_2PO_4) pH 3,5

Dilarutkan 0,85 g kalium dihidrogen ortofosfat dengan 500 mL aquabidest di dalam gelas beker 500 mL, disesuaikan pH nya menjadi 3,5 menggunakan asam fosfat, kemudian ditambahkan akuabides sampai tanda batas.

b. Fase Gerak, Dapar phosfat dan acetonitril (80:20)

Larutan dapar fosfat sebanyak 400 mL dimasukkan dalam labu ukur 500 mL, ditambahkan acetonitril sebanyak 100 mL dan dicampur sampai homogen. fase gerak yang telah dibuat disaring menggunakan membran filter 0,45 μm dan dilakukan degas selama 5 menit menggunakan *ultrasonic bath*.

2. Penetapan Waktu Retensi (RT)

Dibuat campuran larutan baku ACS dan ASP masing-masing 10 ppm sebanyak 10 ml dilarutkan dengan fase gerak diinjeksi sebanyak 10 μL pada KCKT kemudian ditentukan waktu retensi dari ACS dan ASP.

3. Kondisi HPLC

Kolom : C_{18} 300 x 3,9 mm, 10 μm (phenomenex®)
Detektor : UV diatur panjang gelombangnya, ACS 227 nm dan ASP 217 nm.
Volume injeksi : 10 μl
Flow : 1 ml/min
Fase gerak : larutan dapar fosfat: acetonitril (80:20)

4. Pembuatan Larutan Stock 500 ppm

Ditimbang seksama 250,0 mg standar ACS, dan 250,0 mg ASP dimasukkan kedalam labu ukur 500 ml, kemudian dilarutkan dengan aquabidest sampai tanda batas (larutan ini masing-masing mengandung 500 ppm ACS dan ASP).

5. Pembuatan Kurva Baku

Dibuat larutan ACS dan ASP dengan konsentrasi seri kadar 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 200 ppm dengan menggunakan labu ukur ukuran 10 mL. Masing-masing konsentrasi tersebut diperoleh dengan memipet 0,2 ml, 0,4 ml, 0,8 ml, 2,0 ml, dan 4,0 ml dari larutan stock 500 ppm, kemudian dimasukkan dalam labu ukur ukuran 10 ml ditambahkan aquabides sampai tanda batas. diinjeksi sebanyak 10 μ L pada KCKT. Masing-masing nilai AUC yang diperoleh untuk asesulfam-K dan aspartam digunakan untuk membuat persamaan garis $Y = bx + a$

6. Validasi Metode

- (1) Penetapan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitatif (LOQ).

LOD dan LOQ ditentukan melalui kurva baku yang didapat Nilai LOD setara dengan $3,3 \times (S_y/x)/b$ sedangkan nilai LOQ setara dengan $10 \times (S_y/x)/b$.

- (2) Penentuan Presisi (Keseksamaan)

Uji presisi dilakukan untuk melihat kesesuaian antara hasil uji yang dilakukan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Pengujian dilakukan dengan metode rpitabilitas (keterulangan). Dibuat konsentrasi 40 ppm campuran ACS dan ASP, dengan memipet 0,8 ml dari larutan stok 500 ppm, dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan akuabides sampai batas, diinjeksikan 10 μ l pada KCKT sebanyak 6 kali, kemudian dari nilai luas area yang diperoleh, ditentukan nilai rata-rata luas area, SD, dan RSD.

- (3) Penentuan Linieritas

Uji linieritas diperoleh dari persamaan baku $y = bx+a$ yang dihasilkan. Dilihat nilai r nya.

- (4) Akurasi / perolehan kembali

Akurasi dilakukan dengan metode standar adisi. Sampel yang dianalisis adalah sampel ASP dan ACS. Tercantum kadar aspartam dan asesulfam-K adalah 32 ppm dan 93 ppm. Analit yang akan ditambahkan ke dalam sampel adalah 80%, 100%, dan 120%

(a) Perolehan kembali konsentrasi 80 %

Dimasukkan 4,5 mL sampel ke dalam labu ukur 50 mL (masing-masing mengandung ACS dan ASP dengan konsentrasi 36,5/91,4 ppm). Ditambahkan larutan standar ACS dan ASP dengan konsentrasi 29 / 73 ppm.

(b) Perolehan kembali konsentrasi 100 %

Dimasukkan 4,5 mL sampel ke dalam labu ukur 50 mL (masing-masing mengandung ACS dan ASP dengan konsentrasi 36,5/91,4 ppm). Ditambahkan larutan standar ACS dan ASP dengan konsentrasi 35,5/91 ppm.

(c) Perolehan kembali konsentrasi 120 %

Dimasukkan 4,5 mL sampel ke dalam labu ukur 50 mL (masing-masing mengandung ACS dan ASP dengan konsentrasi 36,5/91,4 ppm). Ditambahkan larutan standar ACS dan ASP dengan konsentrasi 43/ 110 ppm.

7. Preparasi Sampel dan penetapan kadar

Ditimbang satu bungkus (10,940g) sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, kemudian dilarutkan dengan aquabides, dan ditambahkan sampai tanda batas. Diambil 4,5 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml ditambahkan aquabides lalu ditambahkan 0,6 ml larutan carrez I dan ditambahkan 0,6 ml larutan carrez II, disaring dengan membran filter pori 0,45 µm.

C. Analisis Hasil

Data yang diperoleh pada penetapan kadar dari sampel di bandingkan dengan kadar ACS dan ASP yang disyaratkan ADI. Analisis hasil parameter validasi dapat dibandingkan dengan nilai parameter validasi yang direkomendasikan AOAC. Untuk perhitungan parameter validasi dapat dilakukan dengan rumus matematika dibawah ini :

1. Linieritas

Linieritas dapat ditentukan dengan menghitung koefisien korelasi (r) dari data kurva baku yang diperoleh.

2. Penetapan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitatif (LOQ)

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{y/x}}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - \hat{y}_1)^2}{N-2}}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$ = simpangan baku residual

b = respon dari kemiringan (*slope* pada persamaan garis $y = bx + a$)

3. Akurasi

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_F - C_A^*}{C_A} \times 100 \%$$

Keterangan :

C_F : konsentrasi total sampel hasil pengukuran

C_A : konsentrasi sampel sebenarnya

C_A^* : konsentrasi analit yang ditambahkan.

4. Presisi

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

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

Keterangan :

x_i = nilai dari masing-masing pengukuran sampel

\bar{x} = rata-rata dari pengukuran sampel

N = jumlah sampel

BAB IV

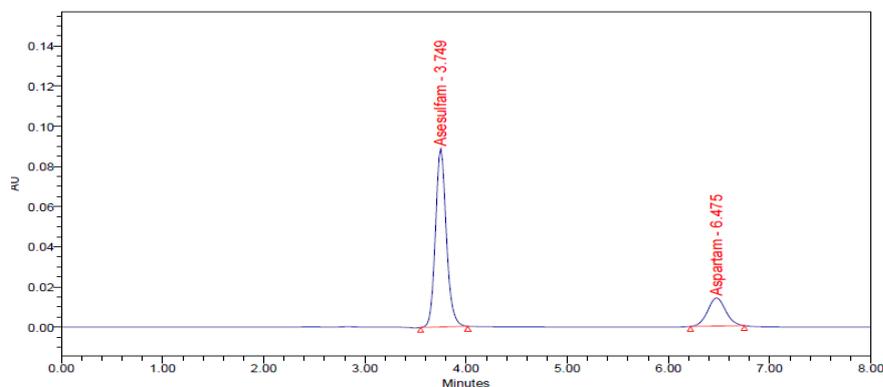
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemanis buatan merupakan bahan tambahan pangan. ACS dan ASP merupakan pemanis buatan yang sering digunakan dalam produk-produk minuman yang beredar dipasaran, untuk mengetahui keamanan minuman instan yang mengandung pemanis buatan maka perlu dilakukan penelitian dengan metode yang sensitif dan akurat yaitu metode KCKT. Metode KCKT merupakan metode yang direkomendasikan oleh *British Standard*, sehingga untuk diterapkan di Indonesia maka perlu dilakukan uji kesesuaian sistem dan verifikasi metode agar metode yang digunakan terbukti memiliki validitas yang baik.

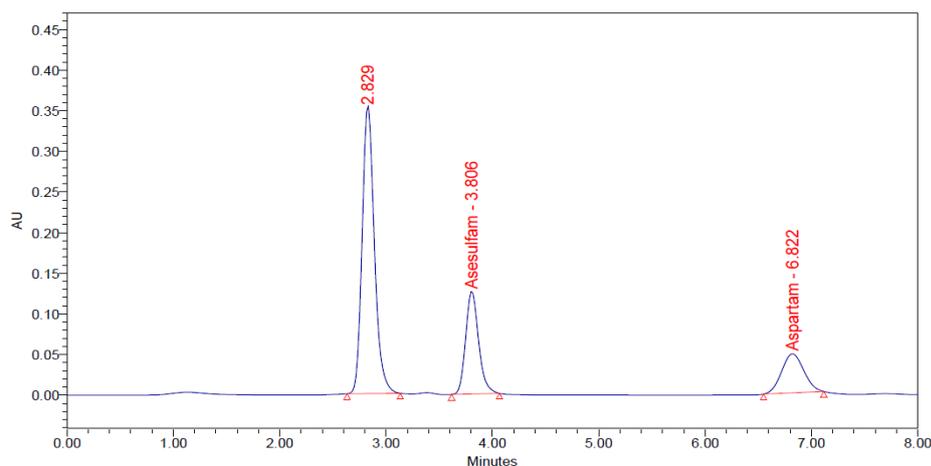
Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah kombinasi buffer fosfat : acetonitril (80:20) dan menggunakan fase diam C₁₈ (300 x 3,9 mm) ukuran partikel 10 µm yang diharapkan dapat memisahkan analit yang terdapat pada yaitu ACS dan ASP.

A. Uji kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem merupakan bagian integral dari kromatografi cair⁽²²⁾. Uji kesesuaian sistem lebih sering diterapkan pada instrumen analisis. Uji tersebut dirancang untuk mengevaluasi komponen-komponen sistem analisis secara periodik untuk menunjukkan bahwa kinerja sistem memenuhi standar yang dipersyaratkan metode tersebut. Uji kesesuaian sistem yang dilakukan diantaranya dengan menghitung faktor kapasitas, resolusi, faktor *tailing*, dan jumlah plat teoritis (N).



4A. Kromatogram standar ACS dan ASP.



4B. Kromatogram sampel (minuman serbuk instan yang mengandung ACS dan ASP).

Gambar 4. Kromatogram standar (ACS, ASP) dan sampel (minuman serbuk instan yang mengandung ACS dan ASP). Metode analisis menggunakan fase gerak bufer fosfat : asetonitril (80:20), fase diam C₁₈, laju alir 1 mL/menit dan detektor UV pada panjang gelombang ACS 227 nm dan ASP 217 nm.

1. Faktor kapasitas (k')

Faktor kapasitas adalah ukuran suatu puncak tertentu berhubungan dengan *void volume*, yaitu elusi dari komponen *unretained*⁽²³⁾. Nilai faktor kapasitas menunjukkan indikasi waktu yang dibutuhkan masing-masing komponen tertahan pada kolom. Faktor kapasitas lebih sering digunakan sebagai parameter kesesuaian sistem dibandingkan waktu retensi, karena waktu retensi tidak terlalu sensitif terhadap fluktuasi kondisi kromatografi seperti laju aliran⁽²⁴⁾. Nilai k yang dapat diterima antara 0,5-20. Puncak dengan nilai k = 0 menunjukkan bahwa analit tidak tertahan oleh fase diam dan apabila nilai k > 20 menunjukkan komponen terlalu tertahan oleh fase diam⁽¹⁴⁾. Hasil perhitungan faktor kapasitas untuk ACS sebesar 0,635 sedangkan ASP sebesar 1,796. Nilai faktor kapasitas yang diperoleh ini dapat diterima karena masuk range 0,5 – 20. Perhitungan untuk faktor kapasitas dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Resolusi

Resolusi adalah ukuran untuk menentukan seberapa baik pemisahan dua puncak yang saling berdekatan. Tujuan dari penentuan resolusi ini adalah agar nilai kuantitasi yang dihasilkan dapat dipercaya. Resolusi setidaknya dipengaruhi oleh perbandingan antara dua puncak yang terukur⁽²³⁾. ACS muncul pada menit ke 3,727 sedangkan ASP muncul pada menit ke 6,65. Hasil hitungan resolusi dapat dilihat pada lampiran 2.

Nilai resolusi rata-rata puncak ACS adalah 3,175, sedangkan resolusi rata-rata ASP adalah sebesar 7,606. Menurut FDA, untuk uji kesesuaian sistem nilai resolusi yang harus dicapai adalah > 2 , sedangkan menurut ICH resolusi yang harus dicapai adalah $> 1,5$. Berdasarkan data yang diperoleh, resolusi dari ACS dan ASP sudah termasuk baik.

3. Faktor *tailing*

Faktor *tailing* adalah pengukuran keasimetrian puncak. Semakin tinggi faktor *tailing*, semakin menurun keakuratan pengukuran. *Tailing* terjadi dikarenakan kesulitan yang dialami integrator untuk menentukan kapan atau di mana puncak tersebut berakhir. Pengaruh dari faktor *tailing* terhadap keakuratan pengukuran dikarenakan pengukuran didasarkan pada perhitungan luas area di bawah puncak⁽²³⁾.

Berdasarkan hasil perhitungan pada lampiran 3, rata-rata faktor *tailing* pada senyawa ACS lebih kecil dibandingkan ASP. Faktor *tailing* pada ACS dan ASP adalah 0,82. Nilai faktor *tailing* < 1 menunjukkan bahwa kromatogram tidak mengalami pengekoran (*tailing*). Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 3.

4. Jumlah plat teoritis

Jumlah plat teoritis (N) adalah ukuran efisiensi kolom, yaitu banyaknya puncak yang dapat ditemukan dalam tiap unit run-time dari kromatogram. Parameter yang dapat mempengaruhi N meliputi posisi puncak, ukuran partikel dalam kolom, tingkat aliran fase gerak, suhu kolom, viskositas fase gerak dan berat analit molekuler.

Tabel III. Data jumlah plat teoritis sampel

No.	Jumlah plat teoritis	
	ACS	ASP
1.	2065	2939
2.	2371	2819
3.	2345	2644
\bar{x}	2260	2801

Berdasarkan hasil perhitungan, rata-rata jumlah plat teoritis untuk ASP adalah 2801 dan ACS sebesar 2260. Menurut FDA, efisiensi kolom dikatakan baik apabila nilai $N > 2000$. Hasil perhitungan ACS dan ASP sudah baik karena nilai $N > 2000$ sehingga menunjukkan efisiensi kolom yang digunakan untuk analisis baik. Hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel IV. Parameter uji kesesuaian sistem metode KCKT yang digunakan pada analisis ACS dan ASP dalam sampel.

No.	Variabel	Hasil
1.	Fase gerak	Buffer fosfat: acetonitril (80:20)
2.	Fase diam	C-18 (300x3,9 mm) 10 μ m
3.	Kecepatan alir	1 ml/menit
4.	Panjang gelombang	227 nm (ACS); 217 nm (ASP)
5.	Faktor kapasitas	0,63 (ACS) ; 1,79 (ASP)
6.	Resolusi	3,17 (ACS) ; 7,60 (ASP)
7.	Faktor tailing	0,82 (ACS) ; 0,82 (ASP)
8.	Efisiensi kolom	2260 (ACS) ; 2801(ASP)

B. Validasi Metode

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu. Berdasarkan percobaan pada laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis⁽¹⁸⁾. Metode KCKT ini perlu divalidasi karena metode ini digunakan pada di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh

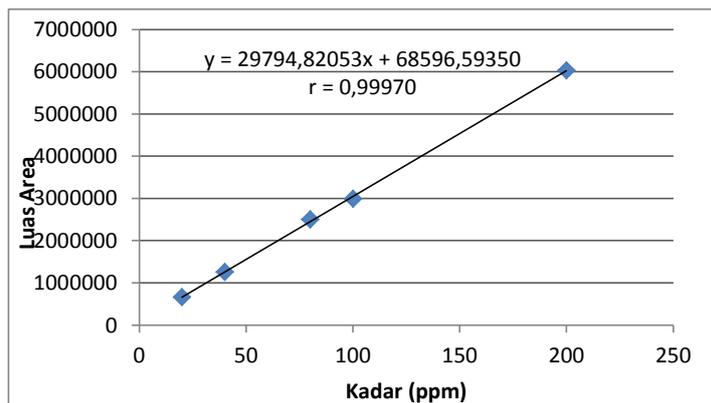
analisis yang berbeda, dan dikerjakan dengan alat yang berbeda. Untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan dalam penggunaannya. Parameter-parameter yang perlu diuji antara lain: linieritas, LOD, LOQ, presisi, dan akurasi.

1. Kurva Baku dan Linieritas

Kurva baku merupakan suatu kurva yang dibuat dengan membandingkan antar konsentrasi seri kadar dengan luas areanya. Melalui kurva baku, dapat diketahui linieritas dari metode yang digunakan. Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Koefisien relasi (r) yang direkomendasikan oleh AOAC adalah $> 0,99^{(23)}$. Apabila nilai r -nya kurang dari 0,999 masih bisa dikatakan baik apabila nilai V_{x_0} -nya kurang 5%⁽¹⁸⁾. V_{x_0} merupakan suatu parameter lain untuk mengetahui linieritas suatu metode, dengan mengukur kedekatan nilai luas area yang terukur oleh detektor dengan luas area yang didapat dari perhitungan persamaan kurva baku. Pada proses pembuatan kurva baku, dibuat seri kadar campuran dengan konsentrasi ACS dan ASP masing-masing 20, 40, 80, 100, dan 200 ppm. Dapat dilihat pada tabel V.

Tabel V. Luas area kurva baku ACS

No.	Kadar (ppm)	Luas area (menit AU)
1.	20	664119
2.	40	1256833
3.	80	2501519
4.	100	2995238
5.	200	6034995

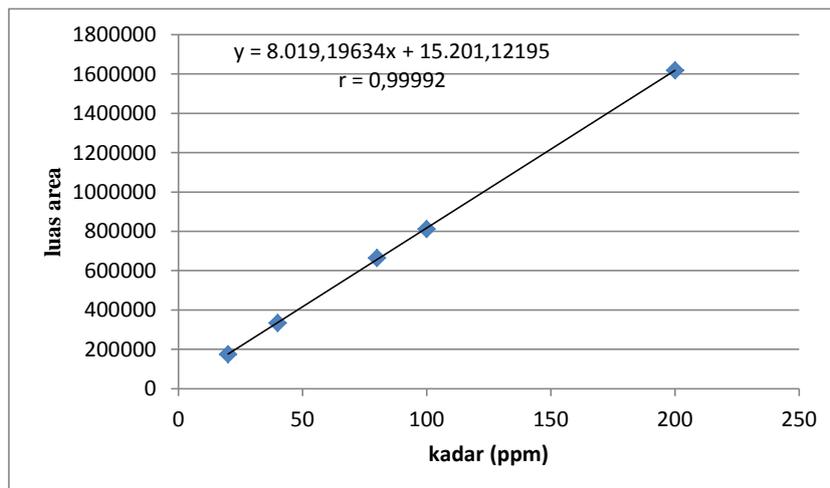


Gambar 6. Kurva baku ACS.

Linieritas pada kurva baku dihitung dengan membandingkan antara konsentrasi senyawa dengan nilai AUC. Untuk mendapatkan nilai linieritas nilai AUC dan kadar dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier. Perhitungan secara regresi terhadap data tersebut adalah persamaan garis $y = bx + a$, $y = 29794,82053x + 68596,59350$, dengan nilai korelasi 0,99970 dengan y adalah luas area, x adalah konsentrasi, b adalah *slope*, dan a adalah intersep.

Tabel VI. Luas area kurva baku ASP

No.	Kadar (ppm)	Luas area (menit AU)
1.	20	175170
2.	40	333399
3.	80	664865
4.	100	812226
5.	200	1618792



Gambar 7. Grafik kurva baku ASP

Tabel VII. Nilai linieritas asesulfam-K dan aspartam berdasarkan nilai r dan V_{x0}

No .	Nama senyawa obat	Persamaan kurva regresi linier	Nilai r	Nilai V_{x0}	Keterangan
1.	ACS	$Y = 29794 x + 68596,59$	0,9997	0,01648	Memenuhi syarat
2.	ASP	$Y = 8019,19x+15201,12$	0,9999	0,00254	Memenuhi syarat

Berdasarkan hasil yang tertera di tabel VII menunjukkan bahwa ACS dan ASP dengan rentang kurva baku 20 sampai 200 ppm dijamin linieritasnya dengan nilai korelasi (r) 0,9997 untuk ACS dan 0,9999 untuk ASP. Dengan demikian apabila digunakan untuk menghitung kadar sampel dengan kandungan ACS dan ASP yang masuk *range* tersebut dapat dijamin validitasnya.

2. Presisi (keseksamaan)

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik⁽¹⁰⁾. Presisi injeksi dinyatakan sebagai RSD (standar deviasi relatif) menunjukkan kinerja dari KCKT, termasuk pipa kolom dan kondisi lingkungan, pada saat sampel dianalisis. Perlu diketahui, persiapan dan pembuatan sampel dalam hal ini tidak dipertimbangkan⁽²⁴⁾.

Presisi yang dilakukan yaitu presisi dalam satu hari (*repeatability* atau *intraday precision*). Kadar yang dipilih adalah masing-masing 40 ppm untuk ACS dan ASP. Konsentrasi tersebut diinjek sebanyak enam kali. Kadar ini dipilih karena untuk mewakili kadar terkecil dan terbesar pada seri kadar ACS dan ASP. Menurut *Association of official analytical chemist* (AOAC) pada kadar 20-200 ppm, presisi dianggap memenuhi persyaratan apabila $RSD >$ dan RSD AUC-nya $< 6\%$ ⁽²⁵⁾.

Berikut tabel horwitz dan hasil nilai presisi dari ACS dan ASP yang disajikan pada tabel VII dan IX

Tabel VIII. Persyaratan RSD pada konsentrasi tertentu⁽²⁵⁾

Konsentrasi	RSD
100 %	1 %
10 %	1.5%
1 %	2 %
0,1%	3 %
0,01 %	4 %
10 ug/g (ppm)	6 %
1 ug/g	8 %
10 ug/kg (ppb)	15 %

Tabel IX. Nilai presisi (*intraday*) luas area ACS dan ASP

No.	ACS	ASP
1.	1242431	319528
2.	1248186	325677
3.	1250918	328168
4.	1256833	333399
5.	1249232	324272
6.	1249501	323436
\bar{x}	1249516,83	325748,33
SD	4637,91	4704,46
RSD	0,371%	0,0144%

Keterangan: contoh perhitungan presisi luas area ACS dan ASP dapat dilihat pada lampiran 9

3. Akurasi (perolehan kembali)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konversi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan⁽¹⁰⁾. Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen akurasi ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan dapat ditemukan⁽¹⁸⁾.

Pada proses akurasi peneliti menggunakan tiga macam konsentrasi standar ACS dan ASP yang akan ditambahkan kedalam sampel yaitu pada konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Digunakan tiga seri kadar yang berbeda untuk mengetahui nilai akurasi yang didapat apabila konsentrasi standar yang ditambahkan berbeda-beda. Menurut AOAC nilai akurasi yang baik untuk kadar 10-100 ppm adalah 80 – 115%⁽²⁵⁾. Penelitian yang dilakukan menghasilkan nilai akurasi ACS dan ASP seperti pada tabel X dan XI.

Tabel X. Nilai akurasi senyawa ACS pada tiga seri kadar yang berbeda

No.	Kadar Sebenarnya (ppm)	Kadar terukur (mg)	Akurasi (%)	Rata-rata (%)
1.	65,70	67,05	101,29	101,34
2.		67,06	101,33	
3.		67,07	101,38	
4.	73,00	74,11	99,63	99,72
5.		74,12	99,64	
6.		74,21	99,88	
7.	80,3	82,23	102,12	102,12
8.		82,10	101,82	
9.		82,37	102,43	
				101,06

Tabel XI. Nilai akurasi senyawa ASP pada tiga seri kadar yang berbeda

No.	Kadar yang Sebenarnya (ppm)	Kadar terukur (mg)*	Akurasi (%)	Rata-rata (%)
1.	164,52	164,50	102,88	102,25
2.		163,93	102,06	
3.		163,75	101,81	
4.	182,80	182,77	99,10	99,24
5.		182,83	99,17	
6.		183,10	99,46	
7.	201,08	202,88	101,56	101,84
8.		203,42	102,05	
9.		203,26	101,90	
				101,11

*hasil repitasi 3 kali

4. Batas deteksi (*limit of detection, LOD*) dan batas kuantitasi (*limit of quantitation, LOQ*)

LOD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantitasi. LOQ didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan⁽¹⁰⁾. LOD dan LOQ menunjukkan kesensitifan dari suatu metode, semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif pula metode tersebut begitu pula sebaliknya.

Pada penelitian ini perhitungan nilai LOD dan LOQ dihitung secara matematik melalui garis regresi linier dari kurva baku. Nilai pengukurannya akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = bx + a$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual $(s_{y/x})^{(10)}$. Setelah dilakukan penelitian, didapatkan nilai LOD dan LOQ seperti yang tertera pada tabel XII

Tabel XII. Nilai LOD- LOQ senyawa ACS dan ASP

No.	Nama senyawa	Nilai LOD (ppm)	Nilai LOQ (ppm)
1.	ACS	4,7870	14,5062
2.	ASP	0,7393	2,2405

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa metode KCKT dapat mendeteksi keberadaan ACS dalam sampel apabila kadar yang terkandung lebih dari sama dengan 4,7870 ppm. Untuk kadar ACS terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode ini adalah 14,5062 ppm. Metode KCKT dapat mendeteksi keberadaan ASP dalam sampel apa bila kadar yang terkandung dilebih dari sama dengan 0,7393 ppm. Untuk kadar ASP terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode ini adalah 2,2405 ppm.

Nilai LOD dan LOQ yang disebutkan diatas menunjukkan bahwa ASP memiliki nilai LOD dan LOQ lebih kecil dibandingkan dengan ACS. Ini dapat diartikan metode KCKT yang dikembangkan lebih sensitif terhadap ASP.

5. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan mengacu pada British Standard versi EN 12856 tahun 1999. Ditimbang satu bungkus sampel kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dilarutkan dengan aquabidest sampai tanda batas. Kemudian diambil 4,5 ml sampel setara dengan 1 gram serbuk sampel masukkan ke dalam labu ukur 50 ml tambahkan aquabidest kemudian tambahkan larutan *carrez* I dan *carrez* II sebagai pembersih larutan untuk mengendapkan lemak. Sehingga dapat terbentuk endapan. Lalu tambahkan aquabidest sampai tanda batas lalu di vortex agar homogen setelah itu disentrifuse untuk memisahkan cairan dengan endapan. Sebelum diinjeksikan kedalam kolom KCKT larutan tersebut disaring terlebih dahulu dengan microfilter dengan ukuran pori 0,45 μ . Volume sampel yang diinjeksikan sebanyak 10 μ l.

6. Penetapan kadar sampel minuman serbuk

Pengukuran kadar merupakan tahap akhir yang dilakukan dalam penelitian, setelah hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang akan digunakan valid. Metode yang valid akan menghasilkan pengukuran yang sesuai dengan kadar yang sebenarnya. Hal ini akan menguatkan pada saat menyimpulkan hasil penelitian. Pengukuran kadar sampel dilakukan dengan memasukkan AUC sampel, ke dalam persamaan kurva baku. Pengukuran kadar yang dilakukan, menghasilkan data seperti tertera pada tabel XIII dan XIV.

Tabel XIII. Hasil perhitungan kadar ACS dalam sampel minuman serbuk rasa jeruk dan jambu.

ACS	Kadar ACS (mg) Jeruk		Rata-rata / sachet (mg) \pm SD	Kadar ACS (mg) jambu	Rata-rata / sachet (mg) \pm SD
Repitasi 1	1.	1,87	27,33 \pm 0,00	1,85	20,28 \pm 0,00
	2.	1,87		1,85	
	3.	1,86		1,85	
Repitasi 2	1.	1,86	27,17 \pm 0,00	1,77	19,39 \pm 0,01
	2.	1,86		1,78	
	3.	1,85		1,76	
Repitasi 3	1.	1,85	27,09 \pm 0,00	1,87	20,49 \pm 0,01
	2.	1,85		1,87	
	3.	1,85		1,87	

Tabel XIV. Hasil perhitungan kadar ASP dalam minuman serbuk rasa jeruk dan jambu.

ASP	Kadar ASP (mg)/ 1g (jeruk)		Rata-rata/ sachet (mg) \pm SD	Kadar ASP (mg) jambu	Rata-rata/ sachet (mg) \pm SD
Repitasi 1	1.	5,21	75,70 \pm 0,05	4,73	51,40 \pm 0,01
	2.	5,12		4,67	
	3.	5,20		4,73	
Repitasi 2	1.	5,20	76,41 \pm 0,02	4,58	50,19 \pm 0,00
	2.	5,25		4,58	
	3.	5,22		4,58	
Repitasi 3	1.	5,18	75,73 \pm 0,01	4,69	51,10 \pm 0,02
	2.	5,18		4,64	
	3.	5,17		4,65	

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini kandungan ACS yang terdapat pada sampel minuman serbuk rasa jeruk sebesar 27,20 mg / 14,62 g dan ASP sebesar 75,95 mg / 14,62 g kadar ACS dan ASP yang tertera pada bungkus sampel adalah 32 mg / 14g ACS dan 93 mg / 14g ASP, hal ini menunjukkan kadar ACS dan ASP yang ada pada sampel lebih kecil dari kadar yang tertera pada bungkus minuman serbuk tersebut. Sedangkan sampel rasa jambu mengandung ACS sebesar 20,05 mg / 10,96 g, ASP 50,89 mg / 10,96 g. Kadar ACS dan ASP yang ditambahkan masih dibawah ambang batas maksimal yang diperbolehkan Menurut *Joint Expert Comitte on Food Additive* (JECFA) menyatakan ACS aman untuk dikonsumsi manusia sebagai pemanis buatan dengan ADI (*accept daily intake*) sebanyak 15 mg/kg berat badan. Sedangkan batas aman ASP untuk dikonsumsi adalah sebanyak 50 mg/kg BB. Jika ACS digunakan melebihi batas yang diijinkan maka dapat berakibat bahaya ACS tidak dapat dicerna, bersifat non glikemik dan non karsinogenik, percobaan pada tikus dengan menggunakan ACS dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan genetik pada tikus. Sedangkan ASP berbahaya bagi penderita penyakit fenilketonurik, karena penderita penyakit ini tidak dapat memetabolisme fenil alanin. Fenil alanin merupakan hasil metabolit dari ASP. Penimbunan fenil piruvat yang terbentuk dari fenil alanin dalam otak yang akhirnya dapat menyebabkan kerusakan otak dan kecatatan mental. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa kadar ASP dan ACS tergolong aman karena tidak melebihi batas. Jika sampel dikonsumsi dalam sehari dengan berat badan 50 kg maka batas maksimalnya adalah 750 mg perhari sedangkan untuk ASP yaitu 2500 mg perhari. Maka minuman sampel masih aman jika dikonsumsi sekitar tiga kali sehari atau lebih karena kadar pemanis yang digunakan masih diperbolehkan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Parameter validasi metode analisis yang digunakan (presisi, akurasi, linieritas, limit deteksi dan limit kuantitasi) memenuhi parameter AOAC.
2. Kadar pemanis buatan yang diperoleh dalam minuman serbuk rasa jambu adalah $20,05 \text{ mg} \pm 0,00$ (ACS) dan $57,89 \text{ mg} \pm 0,01$ (ASP), sedangkan untuk rasa jeruk sebesar $27,20 \text{ mg} \pm 0,00$ (ACS) dan $75,95 \text{ mg} \pm 0,02$ (ASP).
3. Kadar ACS dan ASP yang terkandung dalam minuman serbuk instan masih memenuhi persyaratan *accept daily intake* (ADI) oleh WHO.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian dengan jumlah sampel yang representatif dari produk-produk minuman yang beredar dipasaran.
2. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan sampel-sampel yang penggunaan pemanis buaatannya dicurigai melebihi syarat yang ditetapkan oleh ADI.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) BPOM, 2004, *Persyaratan Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan Dalam Produk Pangan*, Kepala Badan Pengawasan Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor : HK.00.05.5.1.4547, Jakarta.
- (2) Cahyadi, W, 2008, *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambang Pangan*, Bumi aksara, Jakarta 2, 3.
- (3) Anonim , 2004, *Keamanan Mutu dan Gizi Pangan*, Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 Http :// www.pom.go.id, (diakses 29 Desember 2011).
- (4) Christina R. Whitehouse, R., C., Boullata J., and Linda A. McCauley, A., L., 2008, The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners, *AAOHN Journal*, vol. 56, no. 6, 255.
- (5) Butchko, H.H., Stargel, W.W., comer, Phil., 2002, *aspartame: Review of safety*, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 35, Elsevier Science, USA 13, 14.
- (6) Herzog, G., Kam, V., Berduque, A., and Arrigan, D., 2008, Detection of Food Additives by Voltammetry at The Liquid-Liquid Interface, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (12): 4304-4310.
- (7) Frazier, R.A., Inns, E.L., Dossi, N., Ames, J.M., and Nursten, H.E., 2000, Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. *J. Chromatogr. A*, 876, 213-20.
- (8) Armenta, S., Garrigues S., 2004, FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in tabletop sweeteners, , *J. Agric. Food Chem.*, 52 (26): 798-803.
- (9) Anonim, 1999 ,*Foodstuffs – Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin – High performance liquid chromatographic method*, BSI.
- (10) Gandjar, Ibnu Gholib., Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, pustaka pelajar, Yogyakarta, 335-342,378-379.
- (11) Anonim, 2009, *Artificial Sweeteners and Cancer*, National Cancer Institute, USA, available at <http://www.cancer.gov>, (Diakses tanggal 19 oktober 2011).

- (12) Rowe, R., Sheskey, P.J., Quinn M.E., 2009, *Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th edition*, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, USA. 3, 4, 48, 49.
- (13) BPOM, 2000, *Kajian Keamanan Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan*, available at <http://www.pom.go.id>, (diakses 2 november 2011)
- (14) Dong, Michael W., 2006, *Modern HPLC For Practicing Scientists*, John Wiley & Sons, Inc, Canada, 13
- (15) Sample, R. H. B., Melvin, R. G., Martin, B. K., James W. S., 1978, *high pressure liquid Chromatographic assay of chloramphenicol in biological fluid*, Department of clinical of pathology and pediatrics University school of Medicines Indianapolis, Indiana, available at <http://www.aac.asm.org> (Diakses pada 3 November 2011).
- (16) Hendayana, S., 2006, *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi Dan Elektroforesis Modern*, PT Remaja Rosdakarya, Bandung, 69-94.
- (17) Harvey, D., 2000, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, America, 579.
- (18) Harmita, 2004, *Pentunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungan*, *Indonesian J. Pharm.*, Vol. I, No.3, 117-121
- (19) Alghamdi, A., Alghamdi, F., Ali, and Alwarthan, Abdulrahman A., 2005, *Determination of Content Levels of Some Food Additives in Beverages Consumed in Riyadh City*, *J King Saud Univ*, vol 18, 100, 101.
- (20) Anonim, 2009, *British Pharmacopoeia*, MNRH, London, 93, 438.
- (21) Rohman, A., 2009, *Kromatografi Untuk Analisis Obat*, Graha Ilmu, Yogyakarta, 217-222.
- (22) Anonim, 2005, *Validation of Analytical procedures: Methodology, adopted in 1996*, *International Conference of Harmonization Q2(R1)*, Geneva.
- (23) Anonim, 1994, *Reviewer Guidance : validation of chromatographic Methods*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 22
- (24) Hearn, G. M., 1992, *A Guide to Validation in HPLC*, Perkin-Elmer Corp. : Norwalk, USA.

- (25) Anonim, 2002, *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, available at <http://www.AOAC.org>, 25 (diakses pada 5 Maret 2012).

Lampiran 1: perhitungan faktor kapasitas

Faktor kapasitas

$$K' = \frac{T_R - T_0}{T_0} \quad T_0 = \frac{V_m}{F}$$

$$V_m = 0,5 \times L \times dc^2$$

V_m = void volum

L = panjang kolom (cm)

Dc^2 = diameter internal kolom (cm)

$$\begin{aligned} V_m &= 0,5 \times (0,30 \text{ cm}) \times (0,39)^2 \\ &= 2,28 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} T_0 &= \frac{2,28 \text{ ml}}{1 \text{ ml/menit}} \\ &= 2,28 \text{ menit} \end{aligned}$$

1. ACS

Repitasi 1

$$\begin{aligned} K' &= \frac{T_R - T_0}{T_0} \\ &= \frac{3,728 - 2,28}{2,28} \\ &= 0,635 \end{aligned}$$

Repitasi 2

$$\begin{aligned} K' &= \frac{T_R - T_0}{T_0} \\ &= \frac{3,727 - 2,28}{2,28} \\ &= 0,635 \end{aligned}$$

Lampiran 1 : lanjutan

Repitasi 3

$$\begin{aligned}K' &= \frac{T_R - T_0}{T_0} \\ &= \frac{3,725 - 2,28}{2,28} \\ &= 0,634\end{aligned}$$

2. ASP

Repitasi 1

$$\begin{aligned}K' &= \frac{T_R - T_0}{T_0} \\ &= \frac{6,376 - 2,28}{2,28} \\ &= 1,796\end{aligned}$$

Repitasi 2

$$\begin{aligned}K' &= \frac{T_R - T_0}{T_0} \\ &= \frac{6,376 - 2,28}{2,28} \\ &= 1,796\end{aligned}$$

Repitasi 3

$$\begin{aligned}K' &= \frac{T_R - T_0}{T_0} \\ &= \frac{6,376 - 2,28}{2,28} \\ &= 1,796\end{aligned}$$

Lampiran 2: perhitungan Resolusi

Perhitungan resolusi

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

Rs = resolusi

TR1 = waktu retensi puncak 1 (menit)

TR2 = waktu retensi puncak 2 (menit)

Tw1 = lebar puncak 1 (menit)

Tw2 = lebar puncak 2 (menit)

1. ACS

Replikasi 1

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = 2 \frac{69,338 - 52,007}{5,055 + 5,512}$$

$$= 3,28$$

Repitasi 2

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = 2 \frac{93,858 - 71}{6,936 + 7,731}$$

$$= 3,167$$

Repitasi 3

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = 2 \frac{96,284 - 72,213}{7,731 + 7,907}$$

$$= 3,078$$

Lampiran 2: lanjutan

2. ASP

Repitasi 1

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = 2 \frac{118,624 - 69,338}{7,59 + 5,055}$$

$$= 7,795$$

Repitasi 2

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = 2 \frac{160,498 - 93,858}{6,936 + 10,448}$$

$$= 7,666$$

Repitasi 3

$$R_s = 2 \frac{T_{R2} - T_{R1}}{(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = 2 \frac{164,807 - 96,284}{7,731 + 10,893}$$

$$= 7,358$$

Lampiran 3: perhitungan faktor tailing

Faktor tailing (T)

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

T= faktor tailing

 $W_{5\%}$ = lebar puncak yang terukur 5% dari tinggi puncak

f = jarak antara titik awal puncak dan titik maksimum puncak

1. ACS

Repitasi 1

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

$$T = \frac{10,45}{2(125,58 - 119,51)}$$

$$= 0,86$$

Repitasi 2

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

$$T = \frac{10,19}{2(125,83 - 119,16)}$$

$$= 0,76$$

Repitasi 3

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

$$T = \frac{6,67}{2(83,94 - 79,94)}$$

$$= 0,83$$

Lampiran 3: lanjutan

2. ASP

Repitasi 1

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

$$T = \frac{10,14}{2(150,57 - 144,07)}$$
$$= 0,78$$

Repitasi 2

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

$$T = \frac{15,83}{2(225,66 - 216,11)}$$
$$= 0,828$$

Repitasi 3

$$T = \frac{(W_{5\%})}{2f}$$

$$T = \frac{14,82}{2(225,66 - 216,87)}$$
$$= 0,84$$

Lampiran 4: perhitungan jumlah plat (N)

Jumlah plat (N)

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

N = jumlah plat teoritis

T_R = waktu retensi puncak

T_w = lebar puncak

1. ACS

Repitasi 1

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

$$N = 16 \left[\frac{123,37}{10,19} \right]^2$$

$$N = 2345,25$$

Repitasi 2

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

$$N = 16 \left[\frac{124,07}{10,19} \right]^2$$

$$N = 2371,94$$

Repitasi 3

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

$$N = 16 \left[\frac{123,73}{10,89} \right]^2$$

$$N = 2065,44$$

Lampiran 4: lanjutan

2. ASP

Repitasi 1

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

$$N = 16 \left[\frac{225,66}{16,65} \right]^2$$

$$N = 2939,00$$

Repitasi 2

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

$$N = 16 \left[\frac{225,66}{17} \right]^2$$

$$N = 2819,23$$

Repitasi 3

$$N = 16 \left[\frac{T_R}{T_W} \right]^2$$

$$N = 16 \left[\frac{155,57}{12,10} \right]^2$$

$$N = 2644,84$$

Lampiran 5: perhitungan pengenceran seri kadar kurva baku campuran ACS dan ASP

Perhitungan pengenceran seri kadar kurva baku campuran ACS dan ASP.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan : M1 : konsentrasi Stok ACS/ASP (500/500ppm)

V1 : Volume yang dicari

M2 : konsentrasi seri kadar yang diinginkan

V2 : volume seri kadar yang ingin dibuat (10ml)

Kadar 20/20 ppm: $M1 \times V1 = M2 \times V2$

$$500/500 \text{ ppm} \times V1 = 20/20 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,4 \text{ ml --- ad aquabides 10 ml}$$

Kadar 40/40 ppm: $M1 \times V1 = M2 \times V2$

$$500/500 \text{ ppm} \times V1 = 40/40 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,8 \text{ ml --- ad aquabides 10 ml}$$

Kadar 80/80 ppm: $M1 \times V1 = M2 \times V2$

$$500/500 \text{ ppm} \times V1 = 80/80 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 1,6 \text{ ml --- ad aquabides 10 ml}$$

Kadar 100/100 ppm: $M1 \times V1 = M2 \times V2$

$$500/500 \text{ ppm} \times V1 = 100/100 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 2 \text{ ml --- ad aquabides 10 ml}$$

Lampiran 5: lanjutan

Kadar 200/200 ppm: $M1 \times V1 = M2 \times V2$

$$500/500 \text{ ppm} \times V1 = 200/200 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = 4 \text{ ml} \text{ --- ad aquabides } 10 \text{ ml}$$

Kadar 500/500ppm : ditimbang masing-masing 25 mg ACS dan ASP, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml. Kemudian dilarutkan dengan aquabides hingga tanda batas.

Lampiran 6: Perhitungan stok pembuatan sampel

Sampel minuman serbuk rasa jambu

Berat penimbangan = 10,9450 g

Kemudian dicairkan dalam 50ml aquabides agar homogen sehingga memudahkan proses penyamplingan.

Volume yang dibutuhkan setara dengan 1 g serbuk (Nutri Sari)

$$= 50\text{ml}/10,9450 = 4,57 \text{ ml}$$

Kadar aspartam yang tertera pada satu bungkus nutrisari adalah 50mg

$$= 50\text{mg}/10,9450 = 4,57\text{mg}/1\text{g} \text{ --- } 4,57/50\text{ml} = 91,4 \text{ ppm}$$

Kadar asesulfam yang tertera pada satu bungkus nutrisari adalah 20mg

$$= 20\text{mg}/10,950 = 1,827\text{mg}/1\text{g} \text{ ---- } 1,827/50\text{ml} = 36,54 \text{ ppm}$$

Lampiran 7: lanjutan

2. ASP

No.	x	Y	y1	(y-y1)	(y-y1) ²	$\sum(y-y1)^2$	$\frac{\sum(y-y1)^2}{(n-2)}$	sy/x	V _{xo}
1.	20	1751	1755	415,048	1722	96864	322881	1796,7	0,002
		70	85		64,8	534	78,02	13	546
2.	40	3333	3359	-	66047				
		99	69	2569,975	72				
3.	80	6648	65673	8128,171	66067				
		65	6,8		164				
4.	100	8122	81712	-	23958				
		26	0,8	4894,756	636				
5.	200	16187	16190	-248,39	6169				
		92	40		7,59				
\bar{x}	88								
b	8019,1								
	96								
n-2	3								

Keterangan:

 \bar{x} = rata-rata

b = slope

n = jumlah seri kadar

lampiran 8: perhitungan LOD dan LOQ ACS dan ASP

$$LOD = 3,3 \times \frac{\frac{sy}{x}}{b}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\frac{sy}{x}}{b}$$

1. ACS

$$LOD = 3,3 \times \frac{43220,97}{29794,821} = 4,7870 \text{ ppm}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{43220,97}{29794,821} = 14,5062 \text{ ppm}$$

2. ASP

$$LOD = 3,3 \times \frac{1796,713}{8019,196} = 0,7393 \text{ ppm}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{1796,713}{8019,196} = 2,2405 \text{ ppm}$$

Lampiran 9 : Perhitungan presisi ACS dan ASP

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

1. ACS 40 ppm:

Contoh perhitungan presisi AUC 40 ppm

$$\bar{X} = \frac{1242431 + 1248186 + 1250918 + 1256833 + 1249232 + 1249501}{6} = 1249516,833$$

$$SD = \sqrt{\frac{(1249186 - 1249516,833)^2 + (1242431 - 1249516,833)^2 + \dots}{(6 - 1)}}$$

$$= 4637,910$$

$$RSD = \frac{4637,910}{1249516,833} \times 100\% = 0,3711\%$$

2. ACS 40 ppm

Contoh perhitungan presisi AUC 40 ppm

$$\bar{X} = \frac{319528 + 325677 + 328178 + 333399 + 324272 + 323436}{6} = 325748,333$$

$$SD = \frac{((319528 - 325748,33)^2 + (325677 - 325748,33)^2 + \dots)}{6 - 1} = 4704,467$$

$$RSD = \frac{4704,467}{325748,33} \times 100\% = 0,01444\%$$

Lampiran 10: perhitungan akurasi ACS dan ASP

$$\%Recovery = \frac{(luas\ area\ analit + sampel) - (luas\ area\ sampel)}{(luas\ area\ analityang\ ditambahkan)} \times 100\%$$

No	akurasi	AUC sampel + standar (adisi)		AUC standar	
		ACS	ASP	ACS	ACS
1.	80%	2066262	1334401	885294	565220
2.		2066633	1329782	888931	565566
3.		2067134	1328317	898490	568141
	\bar{x}	2066676,3	1330833	890905	566309
1.	100%	2276819	1480850	1113142	739350
2.		2276941	1481349	1113432	737382
3.		2279724	1483465	1124824	730280
	\bar{x}	2277828	1481888	1117132,6	735670,7
1.	120%	2518725	1642193	1324907	872513
2.		2514653	1646512	1330573	880248
3.		2522770	1645168	1324550	877426
	\bar{x}	2066262	1644624	1326676,67	876729

Contoh perhitungan asesulfam akurasi 80 ppm :

Rata-rata AUC (sampel + standar) = 2066676,33

Rata-rata AUC sampel = 1163863

Rata-rata AUC standar = 890905

$$\%Recovery = \frac{(2066676,33) - (1163863)}{(890905)} \times 100\% = 101,388 \%$$

Lampiran 10 (lanjutan)

Contoh perhitungan ASP akurasi 80 ppm :

Rata-rata AUC (sampel + standar) = 1330833

Rata-rata AUC sampel = 751769

Rata-rata AUC standar = 566309

$$\%Recovery = \frac{(1330833) - (751769)}{566309} \times 100\% = 102,882 \%$$

Lampiran 11 : penetapan kadar ACS dan ASP

Contoh perhitungan penetapan kadar ACS

Persamaan kurva baku : $y = 29794,82053x + 68596,59350$

Keterangan Y: rata-rata AUC sampel

X: kadar sampel (ppm)

$$y = 29794,82053x + 68596,59350$$

$$1182616 = 29794,82053x + 68596,59350$$

$$X = 37,38969 \text{ ppm}$$

$$37,3869 \text{ mg/1000ml}$$

Dilarutkan pada labu ukur 50ml

$$\frac{37,3869\text{mg}}{1000\text{ml}} = \frac{x}{50\text{ml}}$$

$$x = 1,869 \text{ mg/ 50ml}$$

dalam 50 ml terdapat 1 g serbuk sampel sehingga dalam 1 gram mengandung 1,869 mg ACS sedangkan dalam 1 bungkus (14,624g) mengandung ACS sebanyak 27,20 mg

Contoh perhitungan penetapan kadar ASP

Persamaan kurva baku : $y = 8019,196x + 15201,122$

$$y = 8019,196x + 15201,122$$

$$858042,679 = 8019,196x + 15201,122$$

$$x = 105,103 \text{ ppm}$$

$$105,103 \text{ mg/ 1000ml}$$

Dilarutkan pada labu 50 ml

$$\frac{105,103\text{mg}}{1000\text{ml}} = \frac{x}{50\text{ml}}$$

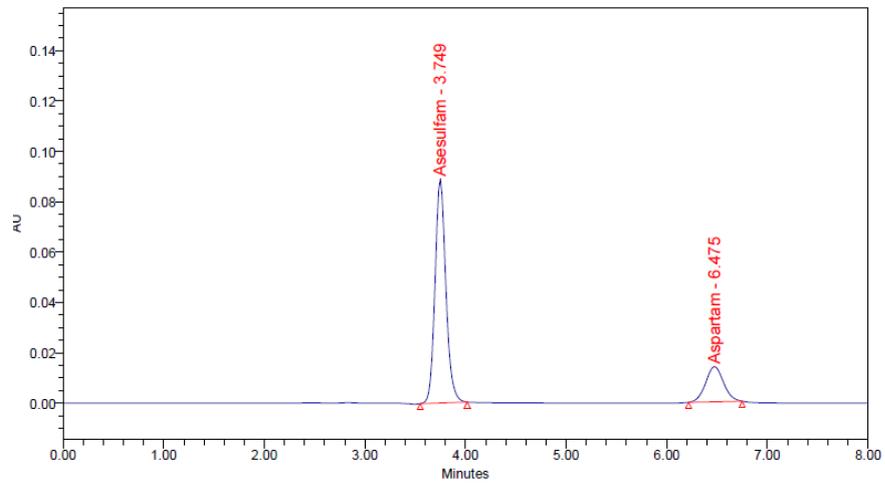
$$x = 5,255 \text{ mg/50ml}$$

lampiran 11 : lanjutan

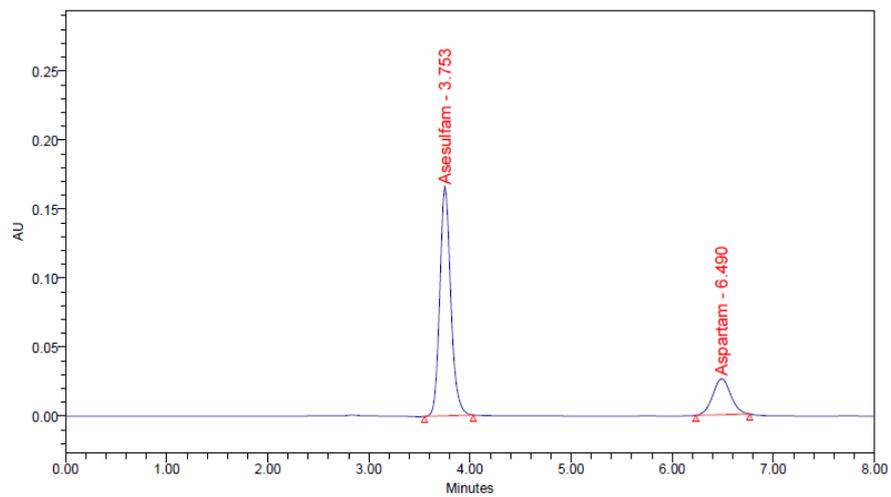
dalam 50 ml terdapat 1 g serbuk sampel sehingga dalam 1 gram mengandung 5,255 mg ACS sedangkan dalam 1 bungkus (14,624 g) mengandung ACS sebanyak 75,95 mg/bungkus

Lampiran 12

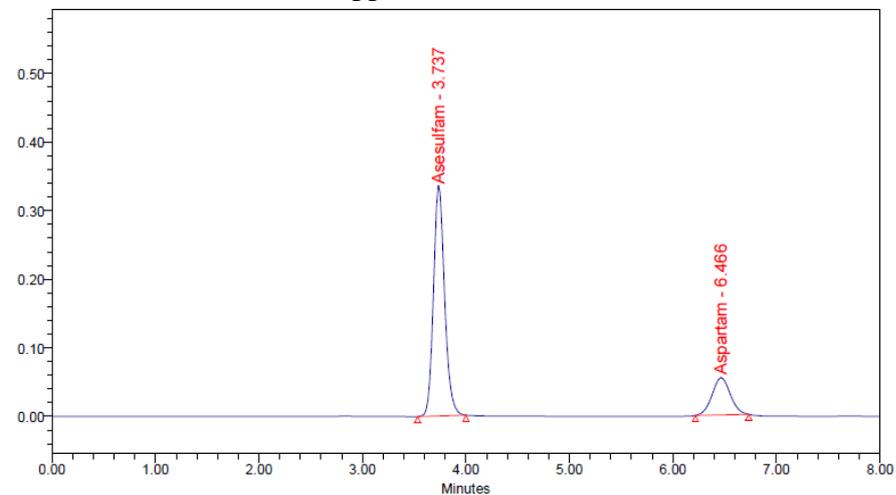
1. Standar ACS dan ASP konsentrasi 20 ppm



2. Standar ACS dan ASP 40 ppm

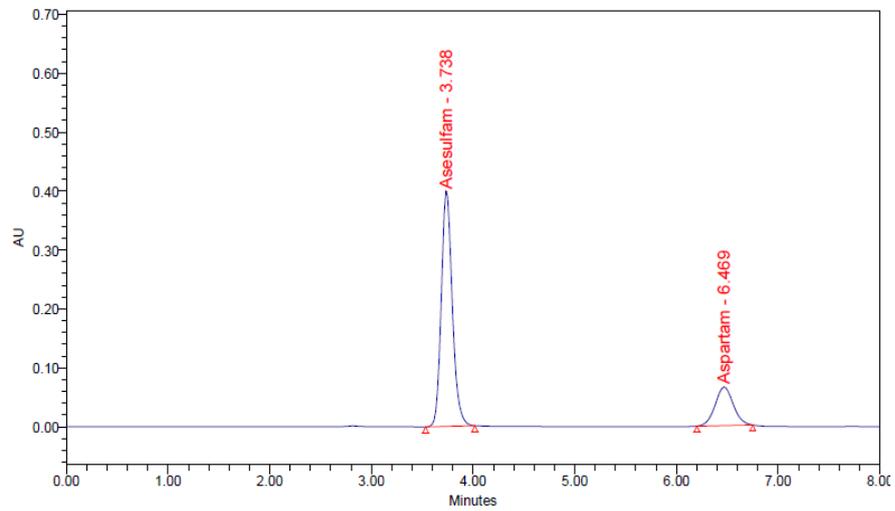


3. Standar ACS dan ASP 80 ppm

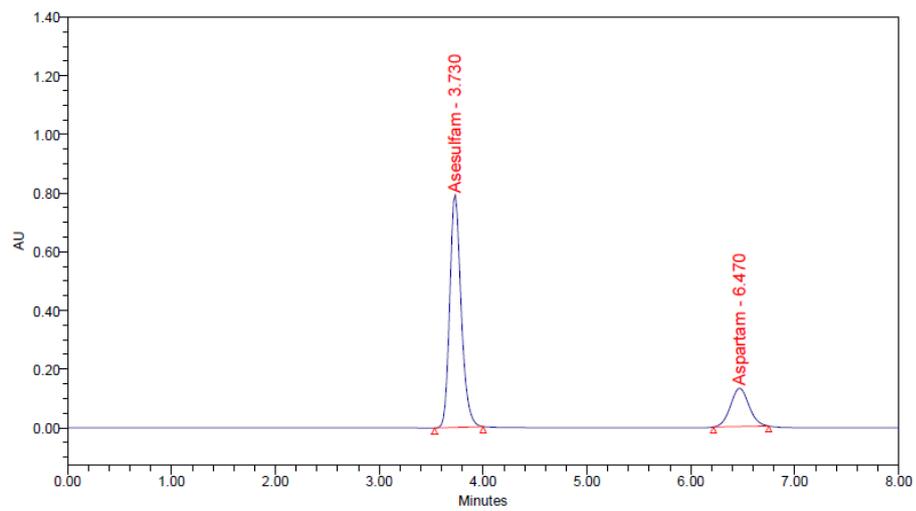


Lampiran 12 : lanjutan

4. Standar ACS dan ASP 100 ppm

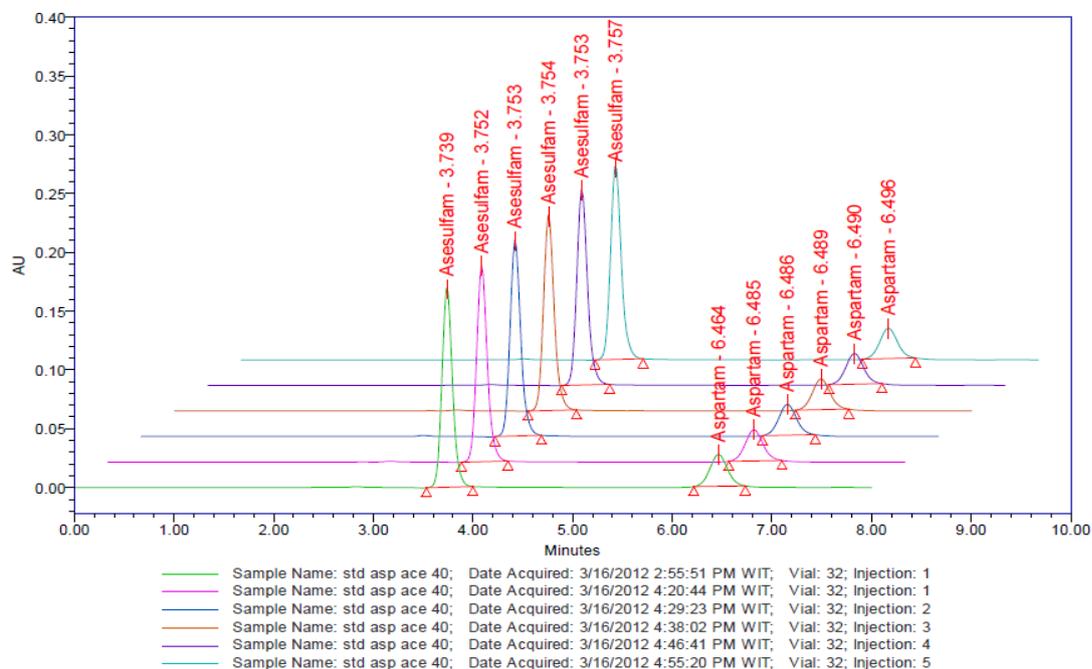


5. Standar ACS dan ASP 200 ppm



Lampiran 13

Presisi



Peak Summary with Statistics

Name: Aseulfam

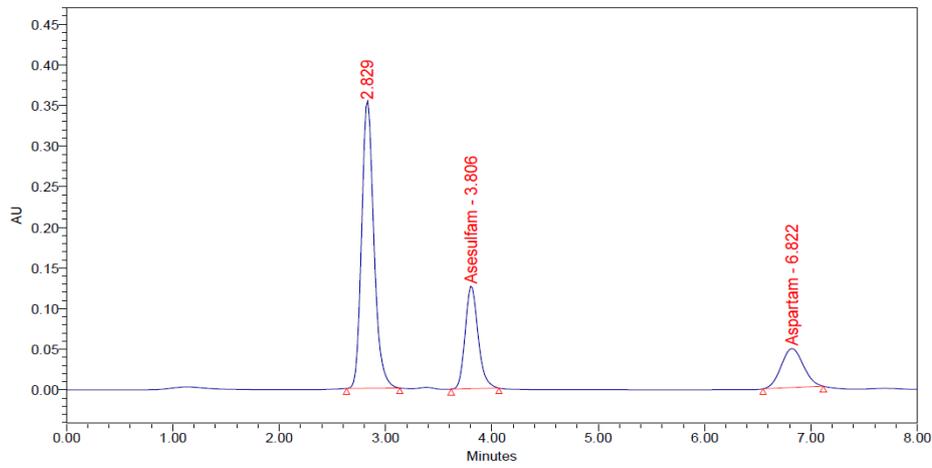
	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	std asp ace 40	32	5	Aseulfam	3.757	1242431	79.54	164823	39.5	ppm
2	std asp ace 40	32	2	Aseulfam	3.753	1248186	79.31	166443	39.7	ppm
3	std asp ace 40	32	4	Aseulfam	3.753	1249501	79.44	166226	39.8	ppm
4	std asp ace 40	32	1	Aseulfam	3.739	1256833	79.03	169912	40.0	ppm
5	std asp ace 40	32	3	Aseulfam	3.754	1249232	79.39	166026	39.8	ppm
6	std asp ace 40	32	1	Aseulfam	3.752	1250918	79.22	167059	39.8	ppm
	Mean				3.751					
	Std. Dev.				0.006					
	% RSD				0.16					

Peak Summary with Statistics

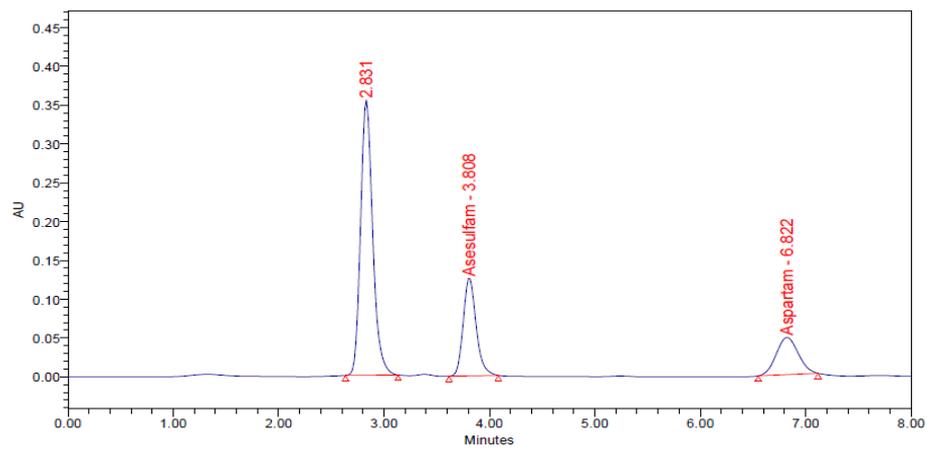
Name: Aspartam

	Sample Name	Vial	Inj	Name	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	std asp ace 40	32	4	Aspartam	6.490	323436	20.56	26103	38.8	ppm
2	std asp ace 40	32	3	Aspartam	6.489	324272	20.61	26132	38.9	ppm
3	std asp ace 40	32	5	Aspartam	6.496	319528	20.46	25806	38.3	ppm
4	std asp ace 40	32	1	Aspartam	6.485	328178	20.78	26464	39.4	ppm
5	std asp ace 40	32	1	Aspartam	6.464	333399	20.97	27171	40.0	ppm
6	std asp ace 40	32	2	Aspartam	6.486	325677	20.69	26259	39.1	ppm
	Mean				6.485					
	Std. Dev.				0.011					
	% RSD				0.17					

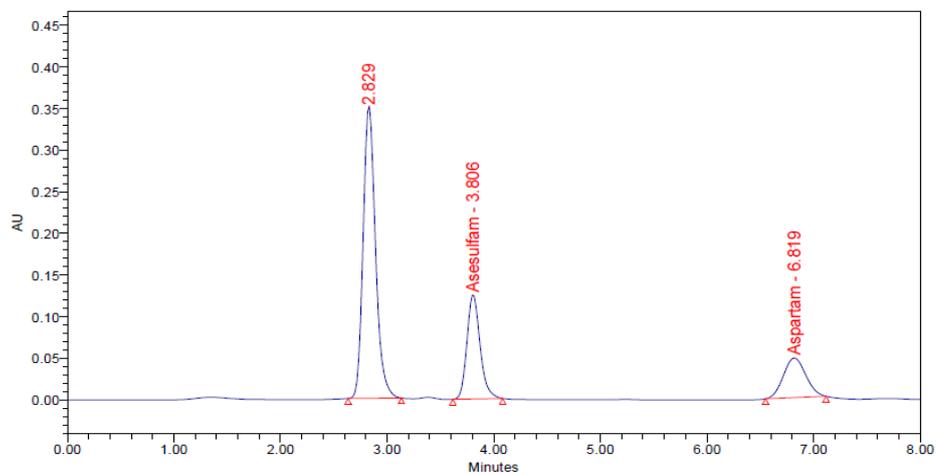
Lampiran 14
Sampel 1



1. Replikasi 2

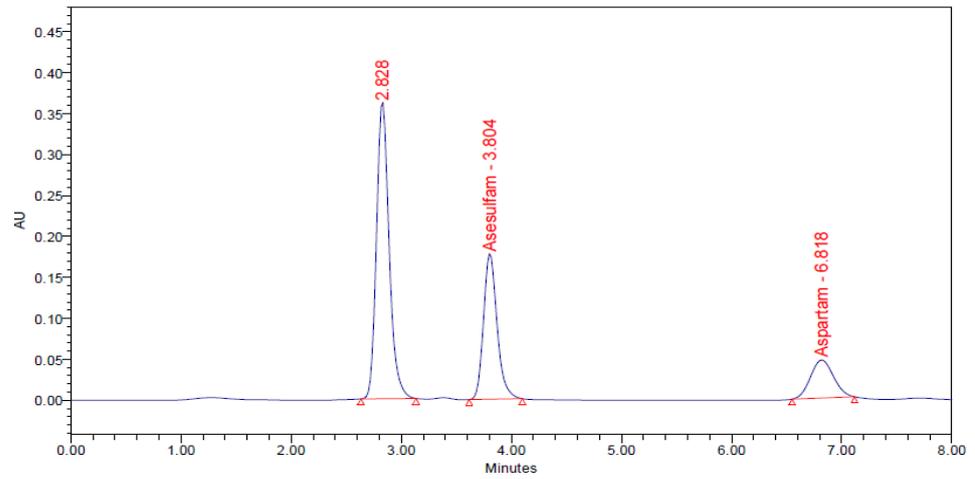


2. Replikasi 3

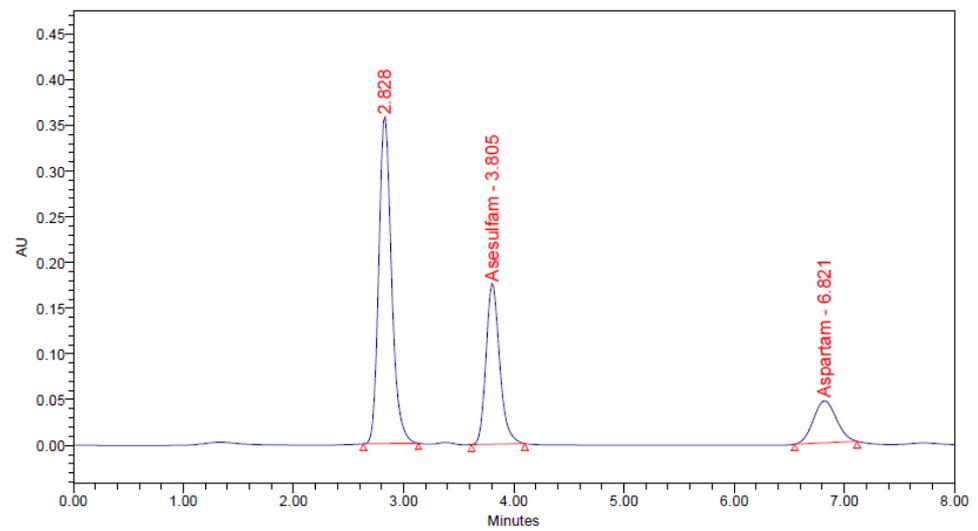


Lampiran 15

1. Akurasi 80% ACS dan ASP



2. Akurasi 100% ACS dan ASP



3. Akurasi 120% ACS dan ASP

