

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ZAT PENGAWET NATRIUM BENZOAT PADA CABE MERAH GILING SECARA SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET

Regina Andayani¹, B.A. Martinus², Yudhea Gemilang Putri²

¹Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang

²Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang

Email : uniregina74@gmail.com,

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian pengembangan dan validasi metode analisis zat pengawet natrium benzoat pada cabe merah giling secara spektrofotometri ultraviolet. Analisis zat pengawet natrium benzoat pada cabe merah giling dengan mengekstraksi sampel menggunakan pelarut n-heksan. Penentuan kadar zat pengawet natrium benzoat pada ekstrak cabe merah giling menggunakan spektrofotometri ultraviolet pada panjang gelombang serapan maksimum baku pembanding asam benzoat 272,0 nm dengan menggunakan pelarut etanol. Hasil validasi metode analisis pengawet natrium benzoat pada cabe merah giling yang memenuhi kriteria validasi meliputi: Linearitas, Batas Kuantitasi, Batas Deteksi, Presisi, dan Akurasi. Hasil analisis zat aktif pengawet natrium benzoat pada cabe merah giling di Pasar Raya Kota Padang teridentifikasi mengandung natrium benzoat pada sampel A,B,C Sampel A=5,5330 g/kg, sampel B=6,4610 g/kg, dan sampel C=1,6898 g/kg. Sedangkan pada sampel D,E,F tidak teridentifikasi mengandung natrium benzoat yang melewati batas maksimum yang diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.772/MenKes/Per/IX/1988 yaitu maksimal 1 g/kg berat bahan.

Kata kunci : Cabe merah giling, Natrium benzoate, Spektrofotometri

ABSTRACT

Research had been done about development and validation of analysis method of sodium benzoate as preservative compound in ground red chilli. Sodium benzoate was extracted with n-hexane and its level was determined by spectrophotometer UV-Vis at wavelength 272 nm. Result of analysis method validation was fulfilled standard of validation included linearity, limit of detection, limit of quantification, precision and accuracy. Analysis result showed that preservative compound as sodium benzoate in ground red chilli in sample A, B, and C were 5,5330 g/kg; 6,4610 g/kg and 1,6898 g/kg respectively. In otherwise in sample D, E and F were not identified sodium benzoate that not exceeded maximum level in Regulation of the Minister of Health of Indonesian Republic No 772/MenKes/Per/IX/1988 that is maximum level at 1 g/kg material.

Keywords : Ground red chilli, Sodium benzoate, Spectrophotometry

PENDAHULUAN

Bahan pengawet merupakan salah satu bahan tambahan makanan (*food additive*) yang digunakan untuk mengawetkan pangan yang mudah rusak. Bahan ini dapat menghambat atau

memperlambat proses fermentasi, pengasaman, atau penguraian yang disebabkan oleh mikroba. Akan tetapi tidak jarang produsen menggunakannya pada pangan yang relatif awet dengan tujuan untuk memperpanjang masa simpan atau memperbaiki tekstur (Cahyadi, 2009).

Pengawet yang banyak dijual di pasaran digunakan untuk pengawetan berbagai bahan pangan adalah asam benzoat, yang umumnya terdapat dalam bentuk natrium benzoat atau kalium benzoat yang bersifat lebih mudah larut. Natrium benzoat sering digunakan untuk mengawetkan berbagai pangan dan minuman, seperti sari buah, minuman ringan, cabe merah giling, saus tomat, selai, jeli, manisan, kecap dan lain-lain (Cahyadi, 2009; Syamsinar, 1991).

Natrium benzoat merupakan garam dari asam benzoat yang banyak digunakan dari pada bentuk asamnya, karena kelarutannya lebih baik dalam air. Asam benzoat dan garamnya bekerja optimum menghambat pertumbuhan bakteri pada pH 2,5-4,0 karena itu sangat cocok digunakan pada makanan yang bearasam (Winarno, 1980). Natrium benzoat dapat menyebabkan efek yang berbahaya bagi tubuh bila digunakan diatas batas maksimum yang dibolehkan, seperti: keram perut, rasa kebas di mulut, dan kanker (Mukarni, 1999; Sartono, 2001; Butarbutar, 2007).

Untuk menghindari efek buruk yang ditimbulkan oleh cabe merah giling yang mengandung bahan pengawet natrium benzoat, maka dilakukan pengujian untuk menganalisis kandungan pengawet natrium benzoat pada cabe merah giling dengan menggunakan validasi metode analisis secara Spektrofotometri Ultraviolet dengan panjang gelombang 200-400 nm.

ALAT DAN BAHAN

Alat

Corong pisah, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, labu ukur, batang pengaduk, pipet tetes, plat tetes, cawan penguap, timbangan analitik, kaca arloji, pipet ukur, karet hisap, botol semprot, kertas saring, spatel, Rotary evaporator dan Spektrofotometer UV PGI +92 (Merck).

Bahan

Sampel (cabe merah giling), Aquadest, Asam Benzoat.p.a, Natrium

Klorida.p.a, Natrium Hidroksida.p.a, Asam Klorida (HCl).p.a, Ammonia.p.a, Etanol.p.a, n-heksan, Asam Sulfat.p.a, Perak Nitrat.p.a, Besi(III) Klorida.p.a, Amonium Hidroksida.p.a.

METODE PENELITIAN

a. Pengambilan Sampel

Sampel cabe merah giling dibeli di Pasar Raya Kota Padang, dimana sampel yang digunakan diambil di beberapa tempat di Pasar Raya Kota Padang.

b. Ekstraksi Pengawet dari Sampel

Sampel ditimbang sebanyak 20,0152 gram sampel A, 20,0135 gram sampel B, dan 20,0098 gram sampel C kemudian ditambahkan larutan NaCl jenuh 46 mL, pindahkan ke labu ukur 50 mL, tambahkan HCl 10% sampai 50 mL, kocok, kemudian masukkan ke corong pisah lalu tambahkan pelarut organik yaitu n-heksan. Larutan dikocok sampai terpisah menjadi 2 lapisan, lapisan n-heksan ditampung dan lapisan air/garam difraksinasi kembali dengan pelarut n-heksan sampai 4 kali kemudian n-heksan yang telah ditampung digabungkan. Selanjutnya dilakukan proses penguapan pelarut organik dengan *rotary evaporator* pada suhu 30-50°C. *rotary evaporator* bertujuan untuk menguapkan pelarut yang terdapat pada sampel tersebut agar pelarutnya tertarik sempurna, sehingga sampel dapat di ukur kadarnya dengan murni. Sampel di *rotary* sampai diperoleh volume hingga 5 mL, dan diuapkan lagi diatas waterbath hingga kering. Kemudian masukkan ekstrak kering ke dalam labu ukur 50 mL larutkan dengan etanol sampai tanda batas. Lalu di pipet 1 mL masukkan ke dalam labu ukur 25 mL tambahkan etanol sampai tanda batas. Diukur absorbansinya kemudian diplotkan dengan kurva standar untuk menentukan kadar asam benzoatnya.

Validasi Metode Penetapan Kadar Pengawet Natrium Benzoat Secara Spektrofotometri Ultraviolet

➤ Linearitas dan Kurva Kalibrasi

Linearitas dilakukan dengan analisis seri larutan standar asam benzoat (0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 $\mu\text{g/mL}$). Ukur absorban dengan panjang gelombang 272 nm Spektrofotometri Ultraviolet. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot antara konsentrasi larutan standar asam benzoat terhadap luas area masing-masing konsentrasi. Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi pada persamaan linear $y = a + bx$. Persamaan linear ini dapat digunakan jika faktor korelasinya $0,98 \leq r < 1$.

➤ **Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)**

Batas deteksi dan kuantitasi dapat di hitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$.

$$\text{Batas deteksi LOD} = \frac{3.SB}{b}$$

dan

$$\text{Batas kuantitasi LOQ} = \frac{10.SB}{b}$$

➤ **Presisi**

Pengukuran presisi *intra-day* dilakukan pada 3 tingkat konsentrasi Asam Benzoat standar yaitu 20, 40, dan 60 $\mu\text{g/mL}$. Dan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dalam satu hari pengerjaan. Sedangkan yang *interday* dilakukan pada tingkat konsentrasi yaitu 20, 40, dan 60 $\mu\text{g/mL}$, dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan selama tiga hari berturut-turut.

➤ **Akurasi**

Akurasi dinyatakan dengan penilaian % perolehan kembali (Recovery). Akurasi ditentukan dengan memasukkan sampel C3.3 kedalam masing - masing tiga labu ukur 50 mL kemudian untuk penambahan standar 40%, 80% dan 120% masing – masing ditambahkan dengan cara memipet 0,45 mL ; 0,89 mL ; 1,34 mL larutan induk asam benzoat 1000 ppm ke dalam 3 buah labu ukur 50 mL yang telah berisi larutan sampel C3.3. Kemudian tambahkan etanol sampai tanda batas. Larutan dianalisis dengan Spektrofotometri

UV. Absorban diukur sebanyak tiga kali pengulangan untuk setiap larutan hasil dinyatakan dalam % perolehan kembali (% Recovery).

➤ **Penetapan Kadar Natrium Benzoat dalam Sampel dengan Spektrofotometer Ultraviolet**

Ekstraks kering sampel cabe yang didapat masukkan ke dalam labu ukur 50 mL di pipet 1 mL masukkan ke labu ukur 25 mL kemudian tambahkan etanol sampai tanda batas. Ukur serapan larutan sampel dengan Spektrofotometer Ultraviolet pada panjang gelombang serapan maksimum.

$$K = \frac{C \times V \times Fp}{W}$$

Keterangan :

- K : Kadar asam benzoat yang terdeteksi sampel ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
 C : Konsentrasi asam benzoat yang terdeteksi dalam sampel yang diukur ke dalam Spektrofotometri UV
 V : Volume total sampel
 Fp : Faktor pengenceran
 W : Berat sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar natrium benzoat pada cabe merah giling yang dijual di Pasar Raya, kota Padang dengan metode Spektrofotometri Ultraviolet. Karena metode ini memiliki banyak keuntungan antara lain dapat digunakan untuk analisis suatu zat dalam jumlah kecil, pengerjaannya mudah, sederhana, cukup sensitif dan selektif, biayanya relatif murah dan mempunyai kepekaan analisis cukup tinggi (Munson, 1991). Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah cabe merah giling diambil secara acak dari beberapa tempat di Pasar Raya kota Padang sebanyak 6 sampel.

Dalam pengerjaan sebelum dilakukan pemeriksaan kadar natrium benzoat terlebih dahulu sampel di fraksinasi. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan suatu zat berdasarkan

perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan yang tidak saling larut, biasanya air dengan pelarut organik. Fraksinasi biasanya menggunakan pelarut organik seperti eter, aseton, benzena, etanol, n-heksan dan dikloroetana. Pelarut organik yang digunakan adalah n-heksan, mula-mula ke dalam sampel ditambahkan NaCl jenuh, bertujuan untuk proses *salting out* yaitu proses penambahan larutan elektrolit ke dalam fase air yang mengandung senyawa organik, penambahan larutan elektrolit ini difungsikan agar kelarutan senyawa organik dalam air bisa menurun dan juga konsentrasi senyawa organik dalam fase organik akan lebih besar dari pada dalam fase air. Kemudian larutan tersebut di encerkan dengan HCl 10% yang tujuan untuk menghidrolisis natrium benzoat menjadi asam benzoat dan air. Kocok, kemudian masukkan ke corong pisah lalu tambahkan pelarut organik yaitu n-heksan, pada lapisan heksan akan terekstraksi asam benzoat dan lapisan air terdapat senyawa senyawa lain yang bersifat polar, kemudian lapisan heksan ditampung dan digabung. Selanjutnya dilakukan proses penguapan pelarut organik dengan *rotary evaporator* pada suhu 30-50°C. Pemakaian *rotary evaporator* bertujuan untuk menguapkan pelarut yang terdapat pada sampel tersebut agar pelarutnya tertarik sempurna, sehingga sampel dapat di ukur kadarnya dengan murni. Sampel di *rotary* sampai diperoleh volume hingga 5 mL, dan diuapkan lagi diatas waterbath hingga kering.

Hasil ekstrak kering yang diperoleh dari sampel A,B dan C kemudian dilakukan analisis kualitatif, dengan menambahkan beberapa tetes NaOH + FeCl₃ 5% ke dalam sampel, jika mengandung asam benzoat akan terbentuk endapan orange kekuningan. Setelah dilakukan pemeriksaan semua sampel mengandung asam benzoat, kemudian ekstrak sampel dengan etanol dan H₂SO₄ dipanaskan menimbulkan bau etil benzoat (esterifikasi), dan ekstrak sampel dengan AgNO₃ menghasilkan endapan putih kemudian ditambah ammonia encer endapan putih hilang. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan menggunakan alat spektrofotometer ultraviolet terlebih dahulu dibuat larutan

induk untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah asam benzoat standar dan dijadikan sebagai pembanding dalam menganalisis kualitatif sampel, dapat dilihat dari perbandingan hasil spektrum asam benzoat standar dengan sampel, bahwa sampel tersebut berada dalam kurva asam benzoat standar sehingga dapat dikatakan sampel mengandung asam benzoat. Sedangkan pada sampel D,E dan F tidak menghasilkan endapan, perubahan warna dan tidak menimbulkan bau etil benzoat (esterifikasi).

Kemudian ekstrak kering Sampel A,B,C,D,E,F dilakukan analisis kuantitatif dengan menentukan absorbannya dengan menggunakan alat spektrofotometer ultraviolet. Ekstrak kering tersebut dilarutkan dengan pelarut etanol dalam labu ukur 50 mL, lalu dipipet 1 mL dari larutan tersebut masukkan dalam labu 25 mL tambahkan etanol sampai tanda batas. kemudian diukur absorbannya untuk menentukan kadar. Pada sampel A,B,C didapat absorban 0,308-0,710 secara kualitatif memberikan hasil yang negatif (tidak terdeteksi).

Pembuatan kurva kalibrasi natrium benzoat dengan menggunakan konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL diperoleh persamaan linearitas $y = 0,2069 + 0,005x$. Dengan nilai $a = 0,2069$, $b = 0,005$ dan nilai koefisien korelasinya r adalah 0,9999. Hasil menunjukkan bahwa nilai koefisien korelasi mendekati 1 sehingga kurva kalibrasi natrium benzoat memberikan nilai linearitas yang baik, dan penetapan kadar dengan kurva kalibrasi terjamin kebenarannya (Mulja, 2003).

Batas deteksi (LOD) = 1,50869 µg/mL dan batas kuantitasi (LOQ) = 5,0289 µg/mL. Perhitungan dilakukan secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Batas deteksi merupakan batas minimum suatu analit yang dapat dideteksi sedangkan batas kuantitasi merupakan batas minimum analit yang dapat dihitung kadarnya (Mulja, 2003). Dari hasil nilai batas deteksi dan batas kuantitasi terlihat bahwa nilai batas deteksi dan batas kuantitasi yang didapatkan lebih rendah daripada konsentrasi natrium benzoat dalam penetapan kadar. Oleh

karena itu, kurva kalibrasi yang diperoleh sebelumnya dapat digunakan untuk analisis kuantitatif senyawa natrium benzoat, selama konsentrasi yang digunakan berada di atas nilai batas kuantitasi.

Penentuan presisi *intra-day* dilakukan pada konsentrasi konsentrasi 20 µg/mL, 40 µg/mL, dan 60 µg/mL dengan nilai %KV pada konsentrasi 20 µg/mL yakni 0,56 %, konsentrasi 40 µg/mL yakni 0,29 % dan pada konsentrasi 60 µg/mL yakni 0,19 %.

Penentuan presisi *inter-day* natrium benzoat juga dilakukan pada konsentrasi 20 µg/mL, 40 µg/mL dan 60 µg/mL dengan nilai %KV pada konsentrasi 40 µg/mL yakni 0,56 %; 0,54 %; 0,55 % pada konsentrasi 40 µg/mL yakni 0,29 %; 0,75 %; 0,48 % dan pada konsentrasi 60 µg/mL yakni 0,19 %; 0,19 % ; 1,4 %. Berdasarkan literatur FDA (2013) suatu metode memberikan keterulangan yang baik jika nilai % KV atau koefisien variasi tidak melebihi 2 %, kecuali pada kadar analit yang dibawah batas kuantitas, dimana % KV tidak melebihi 2 %. Karena kadar analit berada di atas nilai batas kuantitas, maka kriteria penerimaan uji presisi pada metode ini adalah tidak melebihi 2 %. Penyimpangan yang terjadi baik *intra-day* maupun *inter-day*, masih dalam rentang yang diizinkan dan dapat dikatakan metode yang digunakan memiliki keterulangan yang baik dalam suatu analisis. Semakin kecil nilai % KV yang diperoleh maka semakin tepat analisis yang dilakukan dan semakin baik digunakan untuk analisis suatu senyawa kimia (Harmita, 2004).

Akurasi merupakan kedekatan nilai terukur (nilai rata-rata analisis) dengan nilai yang diterima sebagai nilai yang sebenarnya, baik nilai konvensi, nilai sebenarnya atau nilai rujukan (Rahman, 2009). Penentuan akurasi dapat ditentukan dengan uji perolehan kembali menggunakan cabe merah giling yang ditambahkan standar asam benzoat yang telah diketahui kadarnya. Lalu uji perolehan kembali diperoleh dengan membandingkan kadar hasil analisis dengan kadar cabe merah giling yang sebenarnya (Harmita, 2006). Persen perolehan kembali yang diperoleh pada sampel C dengan

penambahan baku 40 %, 80 % dan 120 % berturut – turut adalah 96,54 %, 97,10 % dan 98,05 %. Hasil analisis yang diperoleh memenuhi kriteria penerimaan uji akurasi untuk persen perolehan kembali yaitu 95-102 % (AOAC, 2002).

Hasil pengukuran kadar sampel A mengandung natrium benzoat sebesar 5,5330 g/kg. Sampel B mengandung natrium benzoat sebesar 6,4318 g/kg. Sampel C mengandung natrium benzoat 1,6902 g/kg. Dari tiga sampel cabe merah giling(sampel A,B, dan C) yang diuji semuanya mengandung pengawet natrium benzoat yang cukup tinggi, menurut persyaratan SNI batas maksimum penggunaan natrium benzoat adalah 1 g/kg sedangkan dalam sampel A 20,0152 g, Sampel B 20,0135 g dan Sampel C 20,0098 g cabe merah giling sudah mengandung 5,5330 g/kg; 6,4318 g/kg; dan 1,6902 g/kg. Perbedaan hasil kadar natrium benzoat pada sampel yang didapatkan karena kurangnya kontrol terhadap produsen karena produknya tidak memiliki izin DepKes RI, ketidaktahuan produsen terhadap efek yang ditimbulkan oleh benzoat yang berlebih terhadap orang yang mengkonsumsinya dan adanya keinginan produsen agar produknya awet dalam kurun waktu cukup lama sehingga penambahan bahan pengawet tidak memperhatikan ketentuan yang berlaku.

KESIMPULAN

Hasil validasi metode analisis pengawet natrium benzoat pada cabe merah giling telah memenuhi kriteria validasi meliputi: Linearitas, Batas Kuantitasi (BK), Batas Deteksi (BD), Presisi, dan Akurasi. Pada cabe merah giling di Pasar Raya Kota Padang teridentifikasi mengandung natrium benzoat pada sampel A,B,C dengan kadar masing-masing sebagai berikut: Sampel A= 5,5330 g/kg, sampel B= 6,4318 g/kg, dan sampel C= 1,6902 g/kg. Sedangkan pada sampel D,E,F tidak teridentifikasi mengandung natrium benzoat.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2002. *Guidelines For Validation of Microbiological Methods For Food and Environmental Surfaces*. AOAC International
- Butarbutar, S., 2007, *Analisa Kandungan Rhodamin B dan Natrium Benzoat Pada Cabai Merah (Capsicum annuum L.) Giling Yang Dijual Dibeberapa Pasar di Kota Medan*. (Skripsi). Medan: USU.
- Cahyadi, W., 2009, *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan*. Edisi Kedua. Jakarta: Penerbit Bumi Aksara.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117-135.
- Harmita. 2006. *Analisa Fisikomia*. Jakarta: UI Press.
- Mukarni, R., 1999, *Peranan Bahan Kimia Sebagai Bahan Tambahan Makanan*. Jakarta: Wahana.
- Mulja, M., dan Hanwar D, 2003. Prinsip-prinsip Cara Berlaboratorium yang Baik (Good Laboratory Practice). *Majalah Farmasi Airlangga*, 3 (2), 71-76.
- Munson, J.W., 1991. *Analisis Farmasi Metode Modern*. Penerjemah: Harjana. Parwa B. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Sartono, 2001, *Racun dan Keracunan*. Jakarta: Widya Medika.
- Syamsinar, 1991, *Peranan Bahan Tambahan Makanan dan Pengaturannya*. Jakarta: Direktorat Pengawasan Makanan dan Minuman.
- Winarno, F.G., Fardiaz, S., dan Fardiaz, D., 1980, *Pengantar Teknologi Pangan*. Jakarta: Penerbit EGC