

**PENETAPAN KADAR NATRIUM BENZOAT DALAM
KECAP MANIS MENGGUNAKAN METODE
KLT VIDEO DENSITOMETRI**

LAPORAN TUGAS AKHIR

**HENDY SAHPUTRA SINULINGGA
13151014**



**PROGRAM STUDI STRATA I FARMASI
SEKOLAH TINGGI FARMASI BANDUNG
BANDUNG
2017**

**PENETAPAN KADAR NATRIUM BENZOAT DALAM
KECAP MANIS DENGAN MENGGUNAKAN
METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu

**HENDY SAHPUTRA SINULINGGA
13151014**

Bandung, Agustus 2017

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

Tursino, M.Si., Apt.

Fenti Fatmawati, M.Si.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SODIUM BENZOATE IN SOY SAUCE USING TLC VIDEO DENSITOMETRI

By

HENDY SAHPUTRA SINULINGGA

13151014

Sodium benzoate is a preservative that often used in soy sauce. The function of adding Sodium benzoate is to prevent the growth of microbes. Excess Sodium benzoate can lead to Edema, elevated blood pressure and other diseases. The allowable limit value of 600 mg / kg of material in accordance with Permenkes No. 722 / Menkes / per / IX / 1988. The study aimed at the development of detection method of Sodium benzoate content in sweet soy sauce. The method used TLC video densitometri. Spots observed using ImageJ application yield linear regression equation $y = 25.712x + 1177.8$ with r value of 0.9986, detection limit 18.85 mg/L, quantity limit 62,83 mg/L, accuracy with concentration 80, 240 and 480 (mg/L) were 97.00%, 94.45%, 95.54% and precision 8.80%. So the method that not used in this research could determine the Sodium benzoate in sweet soy sauce. The concentration of Sodium benzoate in soy sauce were A 356.67 mg/kg, soy sauce B 481.25 mg/kg and soy sauce C 367.9 mg/kg.

Keywords: ImageJ software, Sodium benzoate, soy sauce, TLC

ABSTRAK

PENETAPAN KADAR NATRIUM BENZOAT DALAM KECAP MANIS DENGAN MENGGUNAKAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI

Oleh :

HENDY SAHPUTRA SINULINGGA

13151014

Natrium benzoat merupakan zat pengawet yang sering digunakan di dalam kecap. Fungsi penambahan Natrium benzoat yaitu mencegah pertumbuhan mikroba. Kelebihan Natrium benzoat dapat mengakibatkan edema, naiknya tekanan darah dan penyakit lainnya. Nilai batas kadar Natrium benzoat yang diperbolehkan yaitu 600 mg/kg bahan sesuai dengan Permenkes No 722/Menkes /per/IX/1988. Penelitian dilakukan untuk pengembangan metode deteksi kadar Natrium benzoat dalam kecap manis. Metode yang digunakan KLT video densitometri. Bercak diamati menggunakan aplikasi *ImageJ* menghasilkan persamaan regresi linear $y = 25,712x + 1177,8$ dengan nilai r 0,9986, batas deteksi 18,85 mg/L, batas kuantitasi 62,83 mg/L, akurasi dengan konsentrasi 80, 240 dan 480 (mg/L) adalah 97%, 94,45%, 95,54% dan presisi 8,80%. Sehingga metode tidak dapat digunakan untuk menentukan kadar Natrium benzoat. Kadar Natrium benzoat pada kecap A 356,67 mg/kg, kecap B 481,25 mg/kg dan kecap C 367,9 mg/kg.

Kata Kunci: Aplikasi *ImageJ*, kecap, Natrium benzoat, KLT

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan hanya kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat kasih sayang, kenikmatan dan kemudahan yang begitu besar, sehingga dapat menyelesaikan penyusunan laporan tugas akhir dengan judul penetapan kadar Natrium benzoat dalam kecap manis dengan menggunakan KLT video densitometri. Laporan tugas akhir ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan kelulusan Program Strata 1 Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Bandung (STFB).

Dalam penyusunan Laporan Tugas Akhir ini penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Entris Sutrisno, S.Farm., M.H.Kes., Apt. selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
2. Bapak Tursino, M.Si., Apt. dan ibu Fenti Fatmawati, M.Si. selaku dosen pembimbing utama dan pembimbing serta yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing dan mengarahkan penulis dari persiapan hingga selesainya Laporan Tugas Akhir ini.
3. Kedua orang tua dan keluarga besar penulis yang selalu memberikan doa yang tiada hentinya, memberikan dukungan moril maupun materil, serta dukungan berupa semangat selama kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
4. Seluruh dosen yang telah memberikan ilmu dan bimbingan selama perkuliahan di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung dan seluruh staf Sekolah Tinggi Farmasi Bandung yang telah banyak memberikan

bantuan selama perkuliahan. Serta teman-teman seperjuangan, khususnya kelas ekstensi angkatan 2015, atas dukungan semangat dan kebersamaan yang tidak ternilai.

Penulis menyadari atas segala kekurangan dan kelemahan dalam penulisan dan penyusunan Laporan Tugas Akhir, baik dari segi isi, bahasa serta penyajian. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun penulis terima dengan lapang dada demi perbaikan dan penyempurnaan penulisan proposal ini.

Akhir kata, atas segala bantuan yang penulis terima, semoga amal dan kebaikan yang telah diberikan mendapat balasan yang berlipat ganda dari Tuhan Yang Maha Esa. Semoga laporan tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Bandung, Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
Bab I Pendahuluan	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Batasan Masalah	2
I.3 Tujuan Penelitian.....	2
Bab II Tinjauan Pustaka.....	3
II.1 Bahan Tambahan Makanan.....	3
II.2 Kecap dan Fungsi Bahan Pengawet Dalam Kecap .	4
II.3 Faktor-Faktor Penentu Daya Tahan Kecap	6
II.4 Natrium Benzoat dan Fungsi Natrium Benzoat Dalam Kecap.....	6
II.5 Kromatografi.....	9
II.6 Kromatografi Lapis Tipis dan Video Densitometri	10
II.7 Validasi Metode Analisis.....	15
Bab III Metodologi Penelitian.....	22
Bab IV Alat dan Bahan	23
Bab V Prosedur Penelitian	24
II.7 Validasi Metode Analisis	15
V.1 Preparasi Larutan Natrium Benzoat.....	24
V.2 Optimasi Kondisi Pemisahan.....	24
V.3 Validasi Metode Analisis	25

Bab VI Hasil dan Pembahasan	28
Bab VII Kesimpulan dan Saran	35
VII.1 Kesimpulan	35
VII.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

			Halaman
Lampiran	1	Hasil BD dan BK Baku tanpa DLLME ...	36
Lampiran	1	Kurva Kalibrasi.....	39
Lampiran	2	Nilai Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	40
Lampiran	3	Uji Akurasi	42
Lampiran	4	Uji Presisi Natrium Benzoat	44
Lampiran	5	Penetapan Kadar Natrium Benzoat	48

DAFTAR GAMBAR

			Halaman
Gambar	II.1	Struktur kafein	8
Gambar	1	Penentuan Rf.....	49
Gambar	2	Hasil Regresi Linear Dari Aplikasi <i>Imagej</i>	50
Gambar	3	Gambar Hasil Akurasi Dari Aplikasi <i>Imagej</i>	50
Gambar	4	Gambar Hasil Presisi Dari Aplikasi <i>Imagej</i>	52
Gambar	5	Hasil Gambar Penetapan Kadar Duplo....	54

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	x
Bab 1 Pendahuluan	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
I.4 Manfaat Penelitian	3
I.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	4
Bab II Tinjauan Pustaka.....	5
II.1 Kopi	5
II.2 Kafein.....	7
II.3 DLLME.....	10
II.4 Spektrofotometri UV.....	11
II.5 Validasi Metode.....	15
Bab III Metodologi Penelitian	18
Bab IV Alat dan Bahan	19
Bab V Prosedur Kerja	20
V.1 Pembuatan Larutan	20
V.2 Pembuatan Larutan Standar.....	20
V.3 Penentuan Panjang Gelombang	20
V.4 Validasi Metode Analisis	21

V.5	Penentuan Kadar Kafein.....	23
V.6	Analisis Data	23
Bab VI	Hasil dan Pembahasan.....	24
Bab VII	Kesimpulan.....	33
	Daftar Pustaka.....	34
	Lampiran.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

			Halaman
Lampiran	1	Hasil BD dan BK Baku tanpa DLLME ...	36
Lampiran	2	Hasil BD dan BK dengan DLLME	37
Lampiran	3	Hasil Uji Akurasi	38
Lampiran	4	Hasil Uji Presisi	40
Lampiran	5	Hasil Penetapan Kadar Kafein dalam Kopi Bubuk	41

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar	II.1 Struktur kafein	8
Gambar	II.2 Instrumentasi spektrofotometer.....	13
Gambar	VI.1 Spektrum baku kafein.....	25
Gambar	VI.2 Kurva kalibrasi baku kafein	26
Gambar	1 Alat-alat penelitian.....	43
Gambar	2 Kopi bubuk	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Klasifikasi Tekanan Darah	7
Tabel VI.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum.	25
Tabel VI.2 Absorbansi Baku.....	26
Tabel VI.3 Hasil Pengukuran Simpangan Baku, BD, dan BK.....	27
Tabel VI.4 Hasil Akurasi	28
Tabel VI.5 Hasil Presisi	29
Tabel VI.6 Hasil Kadar Kafein	31
Tabel 1 Hasil Perhitungan BD dan BK Baku tanpa DLLME.....	36
Tabel 2 BD dan BK Baku dengan DLLME	37
Tabel 3 Hasil Perhitungan Uji Akurasi	38
Tabel 4 Hasil Perhitungan Uji Presisi.....	40
Tabel 5 Hasil Perhitungan Kadar Kafein	41

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL	x
Bab I Pendahuluan	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Perumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian.....	4
I.4 Manfaat penelitian	5
Bab II Tinjauan Pustaka.....	6
II.1 Hipertensi	6
II.2 Terapi Hipertensi	7
II.3 Sifat Farmakokimia dan Farmakologi zat aktif.....	8
II.4 Metode KLT Video Densitometri.....	12
II.5 Validasi metode	18
Bab III Metodologi Penelitian	22
Bab IV Alat dan Bahan	23
IV.1 Alat	23
IV.2 Bahan	23
Bab V Prosedur Kerja.....	24
V.1 Preparasi Larutan Baku Hidroklorotiazid dan Irbesar	24

V.2	Penyiapan Kondisi Optimum Pemisahan	25
V.3	Penyiapan Kondisi Kamera dan Perangkat Lunak	26
V.4	Validasi Metode Analisis	29
V.5	Penetapan Kadar Hidroklorotiazid dan irbesartan dalam sampel.....	32
Bab VI	Hasil dan Pembahasan	34
VI.1	Pencarian Kondisi Optimum Pemisahan.....	34
VI.2	Visualisasi dan Perekaman Bercak	37
VI.3	Pengukuran Bercak Secara Densitometri	38
VI.4	Pencarian Kondisi Terendah.....	39
VI.5	Validasi Metode.....	40
VI.6	Penetapan kadar	48
Bab VII	Kesimpulan dan Saran	50
VII.1	Kesimpulan	50
VII.2	Saran	51
	DAFTAR PUSTAKA.....	52
	LAMPIRAN.....	55

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran	1 Uji Selektivitas.....	55
Lampiran	2 Kurva Kalibrasi.....	57
Lampiran	3 Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	58
Lampiran	4 Uji Akurasi	60
Lampiran	5 Uji Presisi	62
Lampiran	6 Penetapan Kadar	68

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar	II.1 Struktur molekul irbesartan	9
Gambar	I.2 Struktur molekul hidroklorotiazid	11
Gambar	II.3 Instrumentasi densitometri TLC scenner 4 CAMAG.....	16
Gambar	VI.1 Hasil optimasi fase gerak.....	36
Gambar	VI.2 Rangkaian peralatan KLT video Densitometri	37
Gambar	VI.3 Analisis pengukuran densitas bercak Menggunakan ImageJ	39
Gambar	VI.4 Konsentrasi terendah irbesartan	39
Gambar	VI.5 Konsentrasi terendah hidroklorotiazid.....	40
Gambar	VI.6 Hasil uji selektivitas	41
Gambar	VI.7 Kurva baku irbesartan	43
Gambar	VI.8 Kurva baku hidroklorotiazid	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Sistem pemisahan yang pernah dilakukan	14
Tabel V.1 Komposisi sampel simulasi	31
Tabel VI.1 Kondisi pemisahan KLT Silika Gel Menggunkan berbagai komposisi pelarut	35
Tabel VI.2 Hasil uji batas deteksi dan batas kuantisasi ...	44
Tabel VI.3 Data Akurasi Hidroklorotiazid dan Irbesartan.	46
Tabel VI.4 Data Presisi Hidroklorotiazid dan Irbesartan ..	47
Tabel VI.5 Data Hasil Kadar	49

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Identifikasi masalah.....	4
I.3 Tujuan Penelitian.....	4
I.4 Manfaat Penelitian.....	5
Bab I Pendahuluan.....	1
Bab II Tinjauan Pustaka.....	6
II.1 Diabetes Melitus.....	6
II.2 Metformin Hidriklorida.....	7
II.3 Glimepirid.....	9
II.4 Spektrofotometri.....	12
II.4 Spektrofotometri UV-Vis.....	12
Bab III Metodologi Penelitian.....	15
Bab IV Alat dan Bahan.....	16
VI.1 Alat.....	16
VI.2 Bahan.....	16
Bab IV Alat dan Bahan.....	16
Bab V Prosedur Penelitian.....	17

V.1	Pembuatan Larutan Induk	17
V.2	Penyiapan Larutan Baku	18
V.3	Optimasi Metode	18
V.4	Validasi Metode.....	19
V.5	Penetapan Kadar Sample.....	22
Bab VI	Hasil dan Pembahasan	24
Bab VII	Kesimpulan dan Saran	36
VII.1	Kesimpulan	36
VII.2	Saran	36
DAFTAR PUSATAKA		37
LAMPIRAN.....		40

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar	II.1 Rumus struktur kimia metformin HCl.....	7
Gambar	II.2 Spektrum serapan maksimum metformin HCl dalam berbagai pelarut.....	7
Gambar	II.3 Rumus struktur kimia glimepirid	10
Gambar	II.4 Spektrum serapan maksimum glimepirid dalam berbagai pelarut	10
Gambar	II.5 Penentuan gradient dari spektrum derivat kenol	14
Gambar	II.6 Spektrum derivat kenol sampai kedua.....	14
Gambar	V.1 (a) matriks 5 µg/mL, (c) glimepirid 0,44 µg/mL, (b) metformin 11 µg/mL, dan (d) campuran.....	24
Gambar	VI.2 Spektrum derivat pertama metformin HCl (5-20 µg/mL)	25
Gambar	VI.3 Spektrum derivat pertama glimepirid (0,02 0,08 µg/mL)	26
Gambar VI.4	Spektrum overlay derivat pertama (a) metformin HCl 11 µg/mL, (b) glimepirid 0,044 µg/mL, (c) campuran 11 dan 0,044 µg/mL.....	27
Gambar VI.5	Kurva baku metformin amplitudo 243 nm.....	29

	
Gambar VI.6	Kurva baku glimepirid pada amplitudo 213 nm	29

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel II.1	Data spektrum serapan maksimum metformin hidroklorida	7
Tabel II.2	Data spektrum serapan maksimum glimepirid.....	10
Tabel V.1	Penimbangan bahan simulasi.....	21
Tabel VI.1	Data Kurva linearitas Metformin HCl dan Glimepirid	28
Tabel VI.2	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi Metformin HCl dan Glimepirid	31
Tabel VI.3	Hasil Perhitungan Akurasi Metformin HCl dan Glimepirid.....	32
Tabel VI.4	Hasil Perhitungan Presisi Metformin HCl dan Glimepirid	34
Tabel VI.5	Hasil Penetapan Kadar Metformin HCl dan Glimepirid	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Perhitungan Nilai Batas Deteksi dan Kuantisasi Metformin HCl.....	40
Lampiran 2	Perhitungan Nilai Batas Deteksi dan Kuantisasi Gkimepirid.....	41
Lampiran 3	Perhitungan Akurasi Metformin HCl	42
Lampiran 4	Perhitungan Akurasi Glimepirid.....	47
Lampiran 5	Perhitungan Presisi Metformin HCl.....	53
Lampiran 6	Perhitungan Pesisi Glimepirid.....	55
Lampiran 7	Perhitungan Kadar Metformin HCl.....	57
Lampiran 8	Perhitungan Kadar Glimepirid.....	59
Lampiran 9	Perhitungan Akurasi Metformin HCl dan Glimepirid pada 213 nm.....	61
Lampiran 10	Certificate of Analysis Metformin HCl..	62
Lampiran 11	Certificate of Analysis Glimepirid.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1 Penentuan Rf.....	49
Gambar 2 Hasil Regresi Linear Dari Aplikasi <i>Imagej</i>	50
Gambar 3 Gambar Hasil Akurasi Dari Aplikasi <i>Imagej</i>	50
Gambar 4 Gambar Hasil Presisi Dari Aplikasi <i>Imagej</i>	52
Gambar 5 Hasil Gambar Penetapan Kadar Duplo.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 Kurva Kalibrasi.....	39
Lampiran 2 Nilai Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	40
Lampiran 3 Uji Akurasi	42
Lampiran 4 Uji Presisi Natrium Benzoat	44
Lampiran 5 Penetapan Kadar Natrium Benzoat	48

Bab I Pendahuluan

I.1 Latar Belakang

Pangan merupakan salah satu kebutuhan pokok bagi manusia. Perlu adanya suatu peningkatan kualitas produk pangan yang diproduksi oleh pabrik pengolah makanan, dari produsen sampai ke konsumen. Penanganan dari produksi sampai konsumsi sangat erat kaitannya dengan teknologi pangan dan bahan kimia yang dibutuhkan agar mutu dan kualitasnya baik. Salah satu bahan pangan yang sering dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah kecap. Kecap adalah salah satu jenis produk yang banyak dikonsumsi masyarakat, bisa dicampur dengan makanan maupun tidak dicampur dengan makanan. Kecap merupakan salah satu menu harian sebagian besar masyarakat Indonesia. Sehingga dari tahun ketahun kebutuhan produk kecap terus bertambah atau meningkat. Saat ini produk makanan dan minuman yang diproduksi oleh industri dilakukan pengolahan terlebih dahulu agar dapat disukai oleh konsumen atau masyarakat (Tranggono, 1990).

Banyaknya produk kecap yang beredar dengan merk yang berbeda-beda menyebabkan besarnya persaingan. Hal ini membuat produsen kecap bersaing meningkatkan daya tahan kecap. Pada produk kecap biasanya ditambahkan bahan pengawet agar produknya bertahan lebih lama. Salah satunya dengan menambahkan bahan tambahan makanan yang berfungsi sebagai pengawet seperti Natrium benzoat, pemanis buatan dan lain-lain. Bahan tambahan makanan tersebut harus memiliki suatu dosis batas karena dapat mengakibatkan bahaya pada tubuh jika zat tersebut melebihi batas kadarnya. Natrium benzoat merupakan zat pengawet yang sering digunakan pada kecap. Natrium

benzoat berfungsi untuk mempengaruhi sifat dan bentuk makanan. Fungsi penambahan Natrium benzoat yaitu mencegah pertumbuhan mikroba, biasanya pada makanan yang telah dibuka dari kemasannya. Natrium benzoat memiliki batas kadar yang diperbolehkan yaitu 600 mg/kg bahan sesuai dengan Permenkes No 722/Menkes/per/IX/1988 (Cahyo, 2006).

Dalam hal ini pembatasan bahan tambahan pengawet pada kecap harus dijaga agar tidak terjadinya keracunan. Mengonsumsi Natrium benzoat berlebihan dalam suatu bahan makanan tidak dianjurkan karena akan terus bertambah di dalam tubuh dan dapat membahayakan kesehatan tubuh manusia. Kelebihan Natrium benzoat dapat mengakibatkan edema, naiknya tekanan darah dan penyakit lainnya.

I.2 Batasan Masalah

Apakah metode yang digunakan dapat menentukan kadar Natrium benzoat dalam kecap manis?

I.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengembangan metode analisis serta melakukan penetapan kadar Natrium benzoat menggunakan KLT Video Densitometri.

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Bahan Tambahan Makanan

Penggunaan bahan tambahan makanan atau zat aditif pada makanan semakin meningkat dikarenakan penemuan-penemuan bahan kimia yang baru atau mensintetis bahan kimia yang lebih praktis, lebih mudah dan lebih mudah diperoleh. Tujuan dari penambahan tambahan makanan ini agar meningkatkan mutu pada suatu produk sehingga mampu bersaing di pasaran. Bahan tambahan tersebut diantaranya adalah pewarna, penyedap rasa dan aroma, pengawet, pemanis, dan pengental. Secara umum bahan tambahan ini dibedakan menjadi dua yaitu:

1. Aditif sengaja

Aditif yang secara sengaja ditambahkan untuk meningkatkan konsistensi, cita rasa, mengendalikan keasaman/kebasaan, dan memantapkan bentuk dan rupa.

2. Aditif tidak sengaja

Aditif yang memang telah ada dalam makanan (walaupun sedikit) sebagai akibat dari proses pengolahan.

Bahan pengawet yang ada dalam makanan dapat meningkatkan kualitas suatu produk makanan seperti tahan lama, rasa dan tekstur yang lebih sempurna. Penggunaan bahan pengawet dapat membebaskan/menghambat pertumbuhan mikroba baik bersifat patogen maupun non patogen yang dapat merusak makanan (Tranggono dkk., 1990).

II.2 Kecap dan Fungsi Bahan Pengawet Dalam Kecap

Kata kecap diduga berasal dari bahasa China *koechiap* atau *ke-tsiap*. Kecap bermula dari daratan China sekitar 3000 tahun yang lalu atau sekitar 1000 SM. Kecap diperkenalkan bersamaan dengan berkembangnya agama budha di Jepang pada tahun 600-500 SM. Di China dan Jepang fermentasi pembuatan kecap dilakukan selama 1-3 tahun. Hal ini agar memperoleh cita rasa yang khas. Sedangkan di Indonesia fermentasinya hanya selama 1-3 bulan. Kecap identik dengan kecap kedelai dan memiliki bermacam-macam nama yaitu *shoyu*, *soja*, *japanese tamari*, *tao-yu*, *toyo*, dan *soy sauce* (Purwandari, 2007).

Kecap memiliki bahan tambahan kimia yang dicampur dalam pengolahannya, setiap bahan kimia yang ditambahkan dapat meningkatkan rasa atau pun kualitas suatu kecap. Berikut adalah bahan tambahan kimia pada kecap (Purwandari, 2007).

1. Asam sitrat

Asam sitrat adalah salah satu unsur untuk mengasamkan kecap. Asam sitrat juga menambah efektivitas Natrium benzoat sebagai bahan pengawet. Takaran yang digunakan adalah 0,5% atau 5 g/kg kecap.

2. Natrium benzoat

Zat ini digunakan sebagai bahan pengawet. Biasanya disebut juga sebagai Sodium benzoat. Pada dasarnya fungsinya sama dan akan lebih efektif bila digunakan pada bahan bersifat asam. Takaran yang digunakan adalah 0,01% - 0,02% atau 0,1 – 0,2 g/kg kecap.

3. Asam sorbat

Asam sorbat juga berfungsi sebagai pengawet, terutama setelah botol dibuka hingga kecap habis terpakai. Takaran yang digunakan adalah 0,2% atau 0,2 g/kg kecap.

4. Bahan pengental dan penstabil suspensi

Kecap yang baik tidak mengendap walaupun disimpan dalam waktu yang cukup lama. Sehingga dibutuhkan penstabil suspensi pada kecap. Bahan pengental dibutuhkan untuk pembuatan kecap manis. Bahan kimia yang digunakan sebagai pengental dan penstabil suspensi adalah CMC (*carboxy methyl cellulose*) dengan takaran 1,5% atau 15 g/kg kecap. Pepaya matang juga bisa dijadikan sebagai bahan pengental dengan takaran 10% - 30% atau 100-300 g/kg kecap atau agar-agar dengan takaran 0,15% atau 1,5 g/kg kecap. Sedangkan pada kecap asin memerlukan pengental yang lebih sedikit. Bahan yang digunakan adalah CMC 0,2% atau agar-agar 0,01 - 0,02% (Purwandari, 2007).

Selain standar di atas, produk juga harus memenuhi syarat mutu kecap menurut standar industri Indonesia (SII) No. 32/SI/74.

Persyaratannya adalah sebagai berikut:

1. Protein untuk mutu I min 6% dan mutu II minimal 2%
2. Logam berbahaya (Hg, Pb, Cu, Au) negatif untuk mutu I dan II
3. Bau, rasa, warna, dan kenampakan normal untuk mutu I dan II.

II.3 Faktor-Faktor Penentu Daya Tahan Kecap

Berikut adalah faktor-faktor penentu daya tahan kecap:

a. Penerapan sistem pengawet

Sistem pengawetan yang dapat dilakukan dalam proses pembuatan kecap terdiri atas pencucian, sanitasi, dan sterilisasi alat produksi serta botol kemasan; penggunaan bahan kimia yang dapat berfungsi sebagai pengawet; dan pasteurisasi botol kemasan beserta isinya (produk yang dikemas didalamnya) (Suprapti, 2005).

b. Kerapatan penutupan botol kemasan

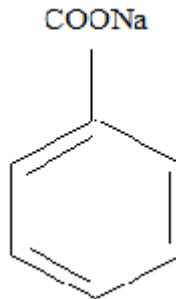
Pemasangan tutup botol kemasan yang kurang baik (bocor) memungkinkan mikroba untuk menerobos masuk dan mengkontaminasi kecap yang dikemas sehingga menurunkan kualitas kecap.

c. Kadar gula atau garam

Kandungan garam (kecap asin) dan gula (kecap manis) dapat berfungsi sebagai bahan pengawet kecap.

II.4 Natrium Benzoat dan Fungsi Natrium Benzoat Dalam Kecap

Berdasarkan Farmakope edisi IV Natrium benzoat dengan nama resmi *Sodium benzoicum*, nomor BM 144.1, rumus kimia $C_7H_5NaO_2$. Pemerian Natrium benzoat yaitu berbentuk granul atau serbuk hablur, putih, tidak berbau, atau praktis tidak berbau, stabil diudara. Mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol dan mudah larut dalam etanol 90%.



Gambar II.1 Struktur Natrium benzoat

Natrium benzoat sering digunakan sebagai pengawet bahan makanan olahan, seperti minuman ringan dan sari buah. Garam Natrium dari Asam benzoat lebih sering digunakan karena memiliki sifat larut dalam air, dari pada bentuk asamnya. Natrium benzoat lebih berpotensi terhadap ragi dan bakteri dan paling efektif untuk menghambat pertumbuhan kapang. Penggunaan Natrium benzoat sering dikombinasikan dengan Asam sorbat dan ditambahkan dalam jumlah sekitar 0,05 – 0,1% per berat bahan (Cahyo, 2006).

Di berbagai negara, senyawa Asam benzoat dan garamnya lebih banyak dimanfaatkan sebagai bahan pengawet makanan. Sebagai bahan pengawet makanan, Asam benzoat dan Natrium benzoat akan efektif apabila digunakan pada pH 2.5 – 4 dan menjadi kurang efektif apabila digunakan pada pH di atas 4.5 (Rohman, 2007).

Tabel II.1: Aturan Penggunaan Bahan Pengawet Natrium Benzoat

Nama BTP	Jenis makanan	Maksimal penggunaan
Natrium benzoat	Kecap	600 mg/kg
	Minuman ringan	600 mg/kg
	Acar mentimun dalam botol	1 g/kg (tunggal atau campuran dengan kalium dan natrium benzoat atau kalium sorbat)
	Margarin	1 g/kg (tunggal atau campuran dengan garamnya atau dengan asam sorbat dan garamnya)
	Pekatan sari nanas	1 g/kg (tunggal atau campuran dengan garamnya dan senyawa sulfit, yang tidak boleh lebih dari 500 mg/kg)
	Saus tomat	1 g/kg
	Makanan lain	1 g/kg

Sumber: (Peraturan Menkes RI No.033/Menkes/per/IX/12)

II.5 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan suatu komponen (berupa molekul) yang berada pada larutan (Sanagi, 1998).

Teknik pemisahan campuran senyawa dalam suatu sampel berdasarkan perbedaan interaksi sampel dengan fasa diam dan fasa gerak. Contoh fasa diam bisa berupa padatan atau cairan yang diletakkan pada fasa pendukung, fasa gerak bisa berupa gas atau cairan. Teknik-teknik kromatografi dibagi menjadi dua yaitu

kromatografi gas dan kromatografi cair. Pembagian kromatografi berdasarkan fase gerak cair adalah kromatografi kertas, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis (KLT), *high performance liquid chromatography* (HPLC) (Dwiwarso, 2016).

Jenis interaksi yang ada dalam proses kromatografi bermacam-macam tergantung pada kombinasi fasa diam dan fasa geraknya. Adapun interaksi yang mungkin terjadi selama proses pemisahan dengan teknik kromatografi adalah:

1. Interaksi Adsorpsi

Senyawa diserap oleh permukaan padatan dan terjadi keseimbangan jumlah solut dalam fasa diam dan fasa gerak.

2. Interaksi partisi

Lapisan cairan sebagai fasa diam yang disatukan pada suatu padatan akan mendistribusi senyawa yang akan dipisahkan dan membentuk keseimbangan dengan fasa gerak.

3. Interaksi penukaran ion

Senyawa ion dengan muatan berlawanan akan terikat oleh fasa diam melalui gaya elektrostatik.

4. Interaksi molekular eksklusi/permeasi gel/gel filtrasi

Teknik pemisahan berdasarkan ukuran molekul. Dalam keadaan ideal, tidak ada keterikatan senyawa pada fasa diam.

5. Interaksi afinitas

Merupakan kromatografi yang menggunakan interaksi spesifik antara molekul jenis tertentu dengan molekul lain yang terikat secara kovalen pada fasa diam (Rubiyanto, 2016).

II.6 Kromatografi Lapis Tipis dan Video Densitometri

Pemisahan KLT terjadi karena fenomena adsorpsi atau partisi atau gabungannya bergantung pada sifat adsorben plat dan sistem pelarut pengembang yang digunakan. Jenis kromatografi lapis tipis untuk KLT densitometri dapat dibagi dua yaitu kromatografi lapis tipis (KLT) datar dan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (KLTKT). KLT dilakukan menggunakan lembaran tipis dari kaca, aluminium atau plastik yang dilapisi dengan lapisan fase diam, biasanya silika gel. Namun, pelapis lainnya seperti alumina, florisil, poliamida, selulosa, C-18, C-8, penukar ion, dan lapisan amino terikat secara kimia, diol, atau fenol juga dapat digunakan (Fried, 1999). Prinsip kerja dari KLT adalah memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Pada KLT ini menggunakan fase diam dari bentuk plat silika gel dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Eluen adalah larutan atau campuran larutan yang digunakan. Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (Skoog dkk., 1996).

Video densitometri merupakan metode yang prinsip kerjanya pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik. Keuntungan metode ini dalam kromatografi lapis tipis dapat menghasilkan akuisisi data cepat dan simultan, desain instrumen sederhana, terjadi peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data (Phattanawasin, 2012).

KLT video densitometri secara singkat dapat dijelaskan yaitu pemindaian optik berlangsung secara elektronik, video densitometri

tidak dapat menyaingi pemindaian densitometri dalam hal sensitivitas, resolusi dan ketersediaan pengukuran berbagai panjang gelombang, menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator, dan optik yang tepat untuk menerangi plat dan fokus gambar ke perangkat *charge-coupled* (CCD) kamera video. Daya tarik utama video densitometri untuk deteksi dalam kromatografi lapis tipis adalah akuisisi data cepat dan simultan, desain instrumen sederhana tanpa bagian yang bergerak, peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data.

Video densitometri menggunakan sistem pencitraan yang terdiri dari Kamera CCD resolusi tinggi dengan zoom untuk fokus dan memperbesar kromatogram, jika diperlukan dan sistem pencahayaan yang sesuai, Kamera ini dihubungkan ke komputer (biasanya PC) dan printer video, perangkat lunak untuk mengatur kamera dan semua parameter seperti kecerahan, kontras, keseimbangan warna dan intensitas, kromatogram dapat disajikan dalam bentuk gambar pada printer video dan dapat diukur untuk mengetahui konsentrasi analit seperti pada pemindaian densitometri, untuk analit yang lemah berfluoresen, digunakan *aperture* kamera yang kecil (F:22) dapat digunakan dengan integrasi lama (Fried, 1999).

Pada penetapan kadar menggunakan metode KLT video densitometri terdapat empat sumber utama:

1. Penotolan bercak secara kuantitatif menggunakan jarum suntik, *microcap* atau *micropipettor*.
2. Pengambilan data dengan kamera digital.
3. Kuantifikasi dengan perangkat lunak pengolah gambar *ImageJ*

4. Diaplikasikan ke dalam persamaan matematika yang sederhana untuk mengubah data mentah kedalam bentuk linear.

Peralatan KLT video densitometri adalah:

1. Plat KLT

Plat yang digunakan adalah silika gel. Untuk memperkuat pelapisannya pada pendukung, silika gel perlu ditambahkan gips (kalsium sulfat). Sebagai pendukung biasanya lapisan tipis digunakan kaca degan ukuran $20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$, $10\text{ cm} \times 20\text{ cm}$, atau $5\text{ cm} \times 10\text{ cm}$. Pendukung yang umumnya dibuat oleh pabrik berupa lembaran aluminium atau plastik seperti ukuran diatas. Silika gel ada yang ditambahkan senyawa fluoresensi, agar bila disinari dengan sinar UV dapat berfluoresensi atau berpendar. Biasanya dikenal dengan silika gel GF₂₅₄ yang berarti silika gel dengan fluoresen yang berpendar pada 254 nm.

2. Pipa kapiler volumetrik

Pipa kapiler volumetrik digunakan untuk penotolan bercak dengan volume tetap (kapasitas 1-5 μL), harga yang murah dan memiliki kemampuan sangat baik dalam pembagian presisi maka nya microcap banyak dipilih untuk pemakaiannya, walaupun digunakan untuk sekali pakai. Tingkat kesalahan pada *microcap* adalah kurang lebih 1%. Ketika mengisi pipa kapiler volumetrik, *microcap* benar-benar terisi penuh dan harus benar-benar kosong. Bercak sampel harus benar-benar kering sebelum plat dimasukkan kedalam chamber.

3. Kamera digital

Plat difoto dengan menggunakan kamera digital setelah plat divisualisasikan dibawah sinar UV. Foto diambil di bawah sinar

254 nm dengan pencahayaan dari lampu ultraviolet. Teknik KLT video densitometri tidak ada kamera khusus yang digunakan. Untuk menghasilkan kuantifikasi yang baik, plat KLT pada saat difoto tidak memerlukan pencahayaan yang terlalu banyak.

II.6.1 Software Untuk Menganalisis Bercak

Metode KLT video densitometri adalah menggunakan analisis gambar. Penggunaan kamera digital untuk mendapatkan gambar kromatogram pada plat, lalu memasukkan hasil gambar tersebut ke komputer. Kemudian evaluasi kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan berbagai program perangkat lunak yang tersedia. Tanpa perlu membeli instrumen komersial (Sherma, 2014).

1. TLC Analyzer

Program komputer yang menganalisis gambar digital dari plat KLT yang dapat digunakan untuk membuat *scan* multispektral, densitogram, dan kurva kalibrasi. Pada sinar lampu UV memancarkan cahaya 254 nm yang dapat menekan silika gel diplat atau sampel pada permukaannya. Sampel harus memiliki koefisien pemadaman yang tinggi mendekati 254 nm agar sampel dapat menyerap sinar UV dan memblokirnya dari silika gel. Jumlah sampel yang terdapat di plat akan menentukan berapa banyak silika gel tersebut menyerap sinar UV. Bercak senyawa gelap itu menandakan konsentrasi sampel relatif tinggi, maka jika konsentrasi sampel relatif rendah, maka bercak yang akan muncul berwarna abu-abu kehijauan di bawah sinar UV. Pengolahan datanya menggunakan aplikasi *excel sheet* (Hess, 2007).

2. *JustTLC*

Generasi terbaru perangkat lunak untuk analisis KLT yang dapat memberikan hasil percobaan kimia hanya dengan menggunakan plat KLT. Hanya dalam hitungan waktu beberapa menit *justTLC* dapat mengukur akurasi yang tepat untuk pengamatan analisis.

Kelebihan dari *JustTLC*:

- a. Melakukan analisis kuantitatif plat KLT dalam hitungan menit.
- b. Secara otomatis dapat mendeteksi dan membandingkan kromatogram dalam tiga dimensi.
- c. Membandingkan data dari bercak yang terdapat pada plat KLT.
- d. Data dapat diekspor ke *excel sheet* atau perangkat lunak lainnya untuk keperluan analisis lebih lanjut.
- e. Dapat mencetak grafik, hasil plat dan lembar data (Johnsson, 2007).

3. *Sorbfil TLC*

Sorbfil merupakan perangkat lunak yang secara komersial tersedia dari *JSC sorbpolimer*. Melihat bercak yang ada dengan cara membuka file gambar plat. Mengatur titik terang disuatu bercak sekarang dapat digunakan menu lintasan drop. Gunakan tombol evaluasi track, akan menunjukkan hasil, kemudian mencetak hasilnya pada *excel sheet* (Phattanawasin, 2012).

4. *ImageJ*

Program komputer yang menganalisis gambar digital dari plat KLT yang dapat digunakan untuk membuat *scan* multispektral, densitogram, dan kurva kalibrasi. Pada sinar lampu UV memancarkan cahaya 254 nm yang dapat menekan silika gel diplat atau sampel pada permukaannya. Sampel harus memiliki koefisien

pemadaman yang tinggi mendekati 254 nm agar sampel dapat menyerap sinar UV dan memblokirnya dari silika gel. Jumlah sampel yang terdapat diplat akan menentukan berapa banyak silika gel tersebut menyerap sinar UV. Bercak senyawa gelap itu menandakan konsentrasi sampel relatif tinggi, maka jika konsentrasi sampel relatif rendah, maka bercak yang akan muncul berwarna abu-abu kehijauan di bawah sinar UV (Phattanawasin, 2012).

II.7 Validasi Metode Analisis

Validasi adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu pada prosedur penetapan yang dipakai untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Parameter analisis yang ditentukan pada validasi adalah selektivitas, linearitas, batas deteksi, dan batas kuantitasi, akurasi, presisi (Harmita, 2004).

1. Selektivitas (spesifisitas)

Kemampuan yang hanya mengukur zat tertentu saja, secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel. Selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran. Bisa juga dengan membandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *differential scanning colorimetry* (Harmita, 2004).

2. Linearitas

Linearitas kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematika yang baik. Rentang metode adalah ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (s_y). Semua perhitungan matematika tersebut dapat diukur (Harmita, 2004).

3. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$).

4. Kecermatan (akurasi)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Untuk mendapatkan hasil kecermatan yang tinggi alatnya harus dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan larutan yang baik,

pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Ada dua cara kecermatan yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standart addition method*). Dalam metode simulasi Sejumlah analit bahan murni ditambahkan kedalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan. Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (SBR). Syarat akurasi tergantung pada konsentrasi analit yang ada pada matriks (Harmita, 2004).

5. Keseksamaan (Presisi)

Ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat juga dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh

analisis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium - laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Percobaan keseksamaan dilakukan paling sedikit enam kali ulangan yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen (Harmita, 2004).

Bab III Metodologi Penelitian

Penelitian dibagi menjadi beberapa tahap yaitu, pencarian kondisi optimum fase gerak, pengaturan kondisi kamera, pengukuran luas di bawah kurva bercak, validasi metode dan penetapan kadar Natrium benzoat dalam produk kecap manis yang dijual di pasaran. Parameter yang digunakan dalam pencarian kondisi optimum pemisahan menggunakan metode KLT. Nilai R_f diusahakan sedemikian rupa sehingga diperoleh nilai antara 0,2 hingga 0,8 dengan cara memvariasikan jenis dan komposisi fase gerak. Visualisasi bercak KLT menggunakan lampu UV dan difoto menggunakan kamera. Hasil foto selanjutnya dianalisis menggunakan aplikasi *ImageJ* untuk menghitung luas di bawah kurva bercak yang diperoleh. Setelah didapatkan kondisi pemisahan yang optimum, selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Parameter validasi yang digunakan adalah selektivitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi. Setelah semua parameter validasi memenuhi persyaratan, maka metode dapat digunakan untuk menetapkan kadar Natrium benzoat dalam sediaan produk kecap manis.