

PENDAHULUAN

Makanan olahan seperti jus buah, soda, kecap, keju, dan banyak produk lainnya dijual dengan mengandung bahan tambahan pangan untuk mencegah kerusakan produk (Pylypiw & Grether 2000). Menurut *Food and Drug Administration* (FDA) diacu dalam Watson (2002), bahan tambahan pangan merupakan zat yang secara sengaja ditambahkan ke dalam makanan untuk menghasilkan sifat fungsional tertentu pada makanan baik secara langsung atau tidak langsung dan menjadi bagian dari makanan tersebut.

Penambahan bahan pengawet dengan sifat antimikroba pada produk minuman komersial bertujuan mencegah kehilangan nutrisi akibat perubahan kimia dan mempertahankan produk selama masa simpan (Costa *et al.* 2008). Bahan pengawet utama yang digunakan dalam jus untuk menghambat pertumbuhan kapang, mencegah kerusakan produk, dan mempertahankan kesegaran adalah natrium benzoat dan/atau kalium sorbat (Pylypiw & Grether 2000), juga terdapat pada makanan dan minuman dengan pH rendah (Tfouni & Toledo 2002).

Menurut *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) diacu dalam Tfouni & Toledo (2002), penggunaan bahan tambahan pangan yang aman diungkapkan dalam *Acceptable Daily Intake* (ADI) atau asupan harian yang dapat diterima. Nilai ADI natrium benzoat sebesar 0-5 mg/kg dan kalium sorbat sebesar 0-25 mg/kg. Efek negatif pemberian dosis natrium benzoat yang sangat tinggi adalah metabolik asidosis, sawan, *hyperpnoea*, dan asma. Kalium sorbat memiliki toksisitas rendah, yaitu *pseudo*-alergi (Tfouni & Toledo 2002). Oleh sebab itu, penentuan natrium benzoat dan kalium sorbat menjadi penting untuk mencegah efek negatif yang merugikan konsumen.

Beberapa metode analitik untuk penentuan bahan pengawet natrium benzoat dan kalium sorbat menggunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair mempergunakan resin anionik bersamaan dengan ekstraksi fase padat. Kedua metode ini menghasilkan sensitivitas tinggi, tetapi diperlukan banyak langkah yang mengakibatkan kehilangan analit selama persiapan sampel (Pylypiw & Grether 2000). Natrium benzoat dan kalium sorbat menunjukkan serapan ultraviolet (UV) yang kuat, sehingga deteksi UV merupakan metode yang biasanya dipilih dengan perbedaan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Kalium sorbat menunjukkan absorbans

tertinggi sehingga dapat dideteksi lebih sensitif menggunakan cara ini (Ötles 2005).

Teknik spektrofotometri yang dikombinasikan dengan kalibrasi multivariat menunjukkan daerah linear dinamis pada kalibrasi satu komponen untuk natrium benzoat dari 2 hingga 54 mg/L dan kalium sorbat dari 1 hingga 20 mg/L (Saragih 2007). Pengukuran konsentrasi natrium benzoat dan kalium sorbat dengan membandingkan spektrofotometri dan kromatografi cair kinerja tinggi menunjukkan hasil yang berbeda untuk sampel minuman berenergi sehingga penentuan simultan natrium benzoat dan kalium sorbat menggunakan spektrofotometri UV pendekatan kalibrasi multivariat belum dapat digunakan pada sampel akibat adanya matriks-matriks pengganggu (Septaningsih 2008).

Berdasarkan penelitian Septaningsih (2008), maka dalam penelitian ini dilakukan pengembangan metode dengan menggunakan *H-Point Standard Addition Method* (HPSAM) atau metode penambahan standar titik-H untuk memperbaiki galat sistematis yang konstan dari penentuan suatu analit dan matriks sampel, menentukan konsentrasi analit akibat adanya gangguan langsung, serta menentukan konsentrasi pengganggu yang berada di dalamnya. Metode ini didasarkan oleh spektrofotometri dua panjang gelombang dan metode penambahan standar (Bosch-Reig & Campins-Falco 1988); memiliki presisi, akurasi, selektivitas, dan kecepatan yang baik sekali dengan metode yang relatif sederhana (Safavi *et al.* 2004). HPSAM menggunakan perhitungan secara matematis untuk menentukan simultan konsentrasi natrium benzoat dan kalium sorbat.

TINJAUAN PUSTAKA

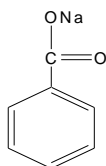
Natrium Benzoat

Natrium benzoat (C_6H_5COONa) merupakan bahan pengawet yang umum digunakan. Natrium benzoat berupa padatan putih, tak berbau, larut dalam air, serta memiliki BM 144.11 g/mol dan titik leleh di atas 300°C (Chipley 1983). Asam benzoat terdapat secara alami pada beri, prem, kayu manis, dan cengkeh. Asam benzoat yang tidak berdisosiasi memiliki aktivitas antimikroba yang optimum pada kisaran pH 2.5–4.0, cocok digunakan dalam makanan asam seperti jus buah, minuman berkarbonasi, dan acar. Umumnya digunakan garam natrium dari asam benzoat, yang larut dalam air daripada

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

bentuk asamnya (Fennema 1996). Struktur kimia natrium benzoat ditampilkan oleh Gambar 1.



Gambar 1 Struktur kimia natrium benzoat.

Natrium benzoat sering digunakan dalam kombinasi dengan asam sorbat atau paraben, dan tingkat penggunaannya berkisar dari 0.05 sampai 0.1% (b/v) (Fennema 1996). Batas maksimum penggunaan natrium benzoat dalam minuman ringan sebesar 600 mg/kg (SNI 1995).

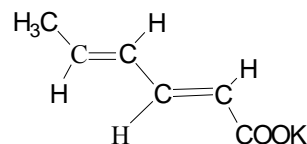
Natrium benzoat bekerja dengan baik dalam media asam untuk menghambat pertumbuhan khamir, kapang, dan bakteri. Natrium benzoat digunakan dalam beragam produk, seperti kosmetik dan obat-obatan, tetapi lebih banyak terdapat dalam makanan dan minuman seperti soda dan jus buah untuk mempertahankan kesegaran (Pylypiw & Grether 2000).

Natrium benzoat lebih efektif menghambat khamir dan bakteri daripada kapang, dan pada keasaman yang tinggi (konsentrasi 25 ppm) akan menghambat pertumbuhan kapang. Pemakaian natrium benzoat tidak diperbolehkan melebihi konsentrasi *enzymatic* dan *non-enzymatic browning*, tidak bereaksi dengan zat-zat dari kandungan bahan pangan seperti halnya SO_2 , dan tidak menyebabkan korosi pada kaleng (Muchtadi 2008).

Menurut Lopez *et al.* (1998), mekanisme kerja bahan pengawet yang terdiri dari asam-asam organik adalah berdasarkan permeabilitas dari membran sel mikroba terhadap molekul-molekul asam yang tidak terdisosiasi. Isi sel mikroba mempunyai pH yang selalu netral. Bila sitoplasma mempunyai pH yang lebih asam atau basa maka akan terjadi gangguan pada organ-organ sel sehingga metabolisme dalam sel menjadi terhambat. Jika gangguan ini sampai merusak isi sel maka mikroba akan mati. Asam atau garam organik dapat menembus sel mikroba. Namun, bila berada dalam sel mikroba yang mempunyai pH netral maka asam atau garam organik tersebut akan terdisosiasi di dalamnya dan ion yang dibentuk menyebabkan pH sel menjadi rendah (suasana asam) sehingga akan merusak sel mikroba.

Kalium Sorbat

Asam sorbat (asam 2,4-heksadienat) lazim digunakan dalam bentuk garam kalium sorbat, mempunyai spektrum yang luas dalam menghambat khamir dan kapang, tetapi tidak efektif menghambat bakteri. *Lactobacilli*, *Staphylococci*, dan *Clostridia* (termasuk *Clostridium botulinum*) tidak dapat dihambat dengan kalium sorbat (Muchtadi 2008). Kalium sorbat tergolong asam lemak tak jenuh yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan kapang dalam jus (Pylypiw & Grether 2000). Kalium sorbat berbentuk serbuk hablur dan butiran warna putih sampai agak coklat kekuning-kuningan, tidak berbau atau berbau lemah, dan memiliki titik leleh sebesar $270^\circ C$ (CFNP TAP 2002).



Gambar 2 Struktur kimia kalium sorbat.

Penggunaan asam sorbat dan garamnya untuk makanan bervariasi bergantung pada jenis makanannya (Tfouni & Toledo 2002). Kalium sorbat dengan kadar 0.1-0.2% (b/v) digunakan sebagai bahan pengawet dalam minuman (Pylypiw & Grether 2000). Batas maksimum penggunaan kalium sorbat dalam minuman ringan sebesar 600 mg/kg (SNI 1995).

Bahan pengawet menunjukkan reaktivitas rendah dan dapat dengan mudah diisolasi dari makanan atau matriks minuman menggunakan distilasi uap setelah asidifikasi, ekstraksi distilat dengan pelarut yang sesuai. Akan tetapi harus diperhatikan bahwa rantai karbon pada kalium sorbat tidak jenuh sehingga mengalami oksidasi dalam larutan encer (*Official Methods of Analysis of AOAC International* diacu dalam Ötles 2005).

Asam sorbat lebih efektif pada keasaman yang tinggi daripada asam benzoat. Kalium sorbat digunakan dalam pembuatan kue, keju dan produk-produk keju, dan pada beberapa bahan pangan semi basah, bertindak sebagai antimikotik atau antikapang (Muchtadi 2008). Asam sorbat terutama efektif dalam mencegah pertumbuhan kapang, dan menimbulkan sedikit rasa pada konsentrasi sampai 0.3% (b/v). Aktivitas asam sorbat meningkat dengan menurunnya pH, menunjukkan bahwa bentuk tidak berdisosiasi lebih bersifat inhibitor daripada bentuk terdisosiasi. Secara



umum, asam sorbat efektif sampai pH 6.5, di atas kisaran pH efektif asam benzoat (Fennema 1996).

Kalium sorbat larut dalam air dan etanol. Kelarutan asam sorbat dalam air akan meningkat dengan meningkatnya suhu (Chipley 1983). Semakin rendah pH semakin tinggi jumlah molekul asam sorbat yang terdisosiasi. Molekul-molekul asam sorbat yang tidak terdisosiasi dapat menghambat aktivitas mikroorganisme dengan cara mengganggu sistem pengambilan substrat seperti asam amino, fosfat organik, dan sebagainya (Mihyar *et al.* 1997).

Asam sorbat tidak menyebabkan gangguan fisiologis dalam tubuh. Hal ini dikarenakan asam sorbat dimetabolisme menjadi CO₂ dan H₂O sama halnya dengan asam lemak lain yang secara normal ditemukan dalam tubuh, tidak berbau, dan tidak berasa (Mihyar *et al.* 1997). Asam sorbat juga tidak menyebabkan korosi, mudah dicampurkan sehingga dapat digabungkan dengan bahan pengawet lain. Sebagai bahan pengawet, asam sorbat dan garamnya termasuk dalam kelompok GRAS (*Generally Recognized as safe*) (Tfouni & Toledo 2002).

Spektrofotometri Ultraviolet-Sinar Tampak (UV-Vis)

Metode analisis dengan spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada pengukuran daya sinar ultraviolet atau tampak yang diserap oleh sejumlah grup fungsional (kromofor) yang mengandung elektron valensi dengan energi eksitasi rendah sebagai fungsi dari panjang gelombang. Alat yang digunakan, yaitu spektrofotometer (Skoog *et al.* 2004). Prinsip spektrofotometer terdiri dari sumber radiasi, monokromator, sel absorpsi, detektor radiasi, dan alat pembacaan persen transmitansi atau absorbans (Khopkar 1990).

Spektrum elektromagnetik yang dihasilkan berada pada daerah UV dengan panjang gelombang berkisar dari 190 sampai 400 nm dan daerah tampak dari 400 sampai 750 nm. Adanya ikatan ganda terkonjugasi menyebabkan tingkat-tingkat energi elektronik pada kromofor bergerak lebih dekat. Oleh sebab itu, energi yang dibutuhkan untuk transisi berkurang dan panjang gelombang menjadi lebih besar (Pavia *et al.* 2009).

Penyerapan UV/Vis biasanya hasil dari eksitasi elektron ikatan sehingga panjang gelombang puncak-puncak serapan dapat dihubungkan dengan tipe-tipe ikatan yang ada dalam senyawa. Senyawa-senyawa organik

mampu menyerap radiasi elektromagnetik karena mengandung elektron valensi yang dapat tereksitasi ke tingkat energi lebih tinggi (Skoog *et al.* 2004).

Penyerapan sinar tampak dan UV oleh suatu molekul dapat dihubungkan dengan kandungan analit dalam contoh. Hukum Lambert menyatakan bahwa fraksi penyerapan sinar tergantung dari tebal media yang dilalui sinar, sedangkan hukum Beer menyatakan bahwa penyerapan sebanding dengan jumlah molekul yang dapat menyerap. Berdasarkan hukum Lambert-Beer dapat diketahui hubungan antara absorbans, ketebalan media, dan konsentrasi suatu bahan. Persamaan Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

A adalah serapan analit (absorbans), ϵ adalah absorptivitas molar (L mol⁻¹ cm⁻¹), b adalah ketebalan lapisan larutan analit atau panjang jalur serapan (cm), dan C adalah konsentrasi analit (mol/L) (Sudjadi 1985).

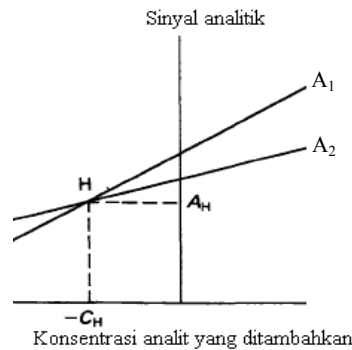
Metode Penambahan Standar Titik-H

Analisis dua komponen pada metode penambahan standar konvensional didasarkan oleh nilai absorptivitas molar (ϵ) dari kedua spesi dan pengukuran absorbans sampel yang mengandung kedua spesi pada dua λ_{maks} dari masing-masing spesi. Nilai absorbans sampel pada dua λ_{maks} tersebut merupakan jumlah dari persamaan Lambert-Beer pada kedua spesi. Lalu dilakukan substitusi pada salah satu persamaan sehingga konsentrasi kedua spesi dalam sampel dapat diketahui. Galat yang kecil dalam salah satu absorptivitas molar atau absorbans akan menyebabkan galat yang besar dalam penentuan konsentrasi spesi (Harvey 2000). Oleh sebab itu, pengembangan metode penambahan standar perlu dilakukan.

Metode penambahan standar titik-H (HPSAM) yang dikembangkan oleh Bosch-Reig & Campins-Falco (1988) merupakan modifikasi dari metode penambahan standar yang dapat mentransformasi galat yang tak dapat diperbaiki akibat adanya gangguan langsung pada penentuan suatu analit menjadi galat sistematis yang konstan yang dapat dievaluasi dan diperbaiki. Keuntungan HPSAM dapat menghilangkan keberadaan pengganggu dan pereaksi blangko, serta menentukan dua komponen secara simultan dengan cakupan luas bahkan dalam spektrum yang bertumpang tindih sempurna. Metode ini juga dapat memperbaiki secara langsung galat

proporsional dan konstan yang dihasilkan oleh matriks sampel (Afkhami & Sarlak 2005).

HPSAM menggunakan data sinyal analitik pada dua panjang gelombang terpilih. Gambar 3 merupakan plot antara sinyal analitik dan konsentrasi analit yang ditambahkan, dua buah garis lurus akan dihasilkan yang saling berpotongan pada sebuah titik yang disebut sebagai titik-H dengan koordinat $-C_H$, A_H . Nilai pada titik $-C_H$ merupakan konsentrasi analit yang tak diketahui dan A_H adalah sinyal analitik dari pengganggu (Bosch-Reig & Campins-Falco 1988).



Gambar 3 Plot HPSAM.

HPSAM dapat diaplikasikan untuk resolusi campuran dari dua komponen dalam suatu campuran yang tumpang tindih sebagian ataupun sempurna dengan bentuk spektrum yang berbeda walaupun mempunyai λ_{maks} yang hampir sama. Oleh karena itu, metode ini umumnya digunakan untuk analisis multikomponen (Campins-Falco *et al.* 1992). Metode ini telah diaplikasikan pada spesiasi logam seperti Fe dan V (Abdollahi *et al.* 2003), Co dan Ni (Afkhami & Bahram 2004), Fe dan Co (Safavi & Nezhad 2004), Zn dan Co (Arvand *et al.* 2007), Cr(VI) dan Mo(VI) (Aulina 2007), serta Cr(III) dan Cr(VI) (Rafi 2009); analisis data kinetika dengan adanya tambahan variabel waktu untuk spesiasi logam seperti Sb(IV) dan Sb(III) (Abbaspour *et al.* 2004) dan Be dan Al (Afkhami & Zarei 2004a), dan studi kesetimbangan kompleks pada sistem misel (Abdollahi & Zeinali 2004). Selain digunakan untuk analisis simultan logam, metode ini dapat juga digunakan untuk analisis simultan bahan organik seperti hidrazin dan asetaldhidrazin (Afkhami & Zarei 2004b), penentuan simultan beberapa pewarna makanan/minuman (Hajimahmoodi *et al.* 2008), fenol dan *o*-cresol (Bosch-Reig *et al.* 1996), serta parasetamol dan kafein (Tavallali & Sheikhaei 2009).

Evaluasi Parameter Analitik

Suatu evaluasi parameter analitik dibutuhkan untuk mengukur sejauh mana suatu metode analisis dapat dipercaya. Menurut *International Conference on Harmonization (ICH)* diacu dalam Huber (2007), ada tujuh jenis parameter analitik yaitu akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linearitas, dan rentang.

Metode analisis menentukan parameter analitik yang perlu dievaluasi. Menurut *International Conference on Harmonization (ICH)* diacu dalam Huber (2007), parameter yang dievaluasi pada penentuan kadar adalah akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, dan rentang.

Akurasi adalah kedekatan hasil yang diperoleh terhadap nilai sesungguhnya. Presisi adalah derajat kesesuaian antara hasil analisis individu jika metode analisis diterapkan berulang-ulang terhadap contoh berganda dari suatu contoh homogen. Spesifisitas untuk menilai dengan jelas analit di antara adanya komponen lain di dalam suatu sampel. Linearitas adalah kemampuan metode memberikan hasil (dalam batas rentang yang ditetapkan) yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel. Rentang adalah suatu interval antara tingkat konsentrasi analit terbesar dan terkecil yang menunjukkan hasil analisis dengan akurasi, presisi, dan linieritas yang baik (Huber 2007).

Batas deteksi untuk membenarkan bahwa jumlah analit berada di atas atau di bawah suatu konsentrasi tertentu. Batas kuantitasi adalah jumlah analit yang paling rendah dalam suatu sampel yang dapat ditetapkan (Huber 2007).

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan kaca, neraca analitik (Sartorius), spektrofotometer UV-Vis model UV-1700 (Shimadzu) dengan tebal kuvet 1 cm dan dilengkapi dengan peranti lunak UV-Probe versi 2.21.

Bahan-bahan yang digunakan adalah natrium benzoat (Aldrich), kalium sorbat (Sigma-Aldrich), sampel minuman isotonik, dan air bebas ion.