

PENGARUH pH PADA PENETAPAN KADAR NATRIUM BENZOAT DALAM SIRUP MELALUI ISOLASI DENGAN PELARUT ETER SECARA KCKT

THE EFFECT OF pH ON DETERMINATION OF SODIUMBENZOAT IN SYRUP THROUGH ETHER ISOLATION BY USING HPLC METHOD

Elina Hartono

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

ABSTRAK

Natrium benzoat adalah bahan pengawet makanan yang mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman atau peruraian lain terhadap makanan yang disebabkan oleh jasad renik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pH pada penetapan kadar natrium benzoat dalam sirup melalui isolasi dengan pelarut eter. Metode yang digunakan adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), fase terbalik dengan kondisi analisa kolom C18 RP, fase gerak metanol : air (1:3), kecepatan alir 1,2 ml/menit dan dideteksi dengan detektor UV-Vis (228 nm). Batas deteksi yang didapat dari hasil percobaan adalah 4,91 ppm. Batas kuantitasnya adalah 16,38 ppm. Kisaran kurva kalibrasi untuk asam benzoat adalah 20,04 ppm-80,16 ppm. Hasil yang didapat dari penelitian ini adalah penetapan kadar natrium benzoat dalam sirup melalui isolasi dengan pelarut eter secara KCKT dipengaruhi oleh pH. Sampel dengan pH 3 mengandung natrium benzoat sebanyak $(86,60 \pm 0,52)$ mg/kg, sampel dengan pH 4 $(100,74 \pm 1,41)$ mg/kg dan sampel dengan pH 5 $(79,56 \pm 0,16)$ mg/kg. Kadar optimum natrium benzoat terdapat pada sampel dengan pH 4, karena pada uji U didapat U_{teori} sebanyak 1,96 dan U_{hitung} sebanyak 1,94. Hal ini menunjukkan bahwa $U_{hitung} < U_{teori}$, sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar sebenarnya.

Kata kunci: pengaruh pH, natrium benzoat, sirup, KCKT

ABSTRACT

Sodium benzoate is an additional substance of food product which prevents or hampers the fermentation, turn into acid, or other food decomposition, which is caused by germ. The aim of this research is to know pH's effect in determine the content of natrium benzoate in the syrup through isolation with ether solvent. The analysis is performed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC), turn over fusion with column analysis condition C 18 RP, methanol: water (1:3) was used as a mobile phase, with flow rate 1.2 ml/minute. The analyte was detected with UV-Vis detector at 228 nm. The detection limit observed was 4.91 ppm. The quantity was 16.38 ppm. The concentration of benzoate acid for calibration curve was ranged from 20.04 ppm to 80.16 ppm. The result of this research shows that the determination of sodium benzoate in the syrup through the isolation with ether solvent through KCKT is affected by pH. The sample with pH 3, pH 4, pH 5 contain sodium benzoate (86.60 ± 0.52) mg/kg, (100.74 ± 1.41) mg/kg, (79.56 ± 0.16) mg/kg respectively. The analysis shows the optimum content of sodium benzoate is in the sample with pH 4, because from U-test is obtained $U_{theory} = 1.96$ and $U_{count} = 1.94$, so there is no significant difference with the true content.

Key words: pH's effect, natrium benzoate, syrup, HPLC

PENDAHULUAN

Sirup merupakan larutan gula (sakarosa) pekat yang digunakan sebagai bahan minuman dengan atau tanpa ditambah asam, aroma dan zat warna. Larutan gula merupakan media pertumbuhan bakteri dan jamur, sehingga sirup sebagai tempat hidup bakteri yang paling menyenangkan. Hal tersebut dapat dicegah dengan penambahan bahan pengawet, di mana tujuan pengawetan antara lain: mempertahankan mutu bahan, menghindari terjadinya keracunan, menghambat terjadinya kerusakan, mempermudah penanganan, penyimpanan dan

menghindari kerugian. Menurut Standar Industri Indonesia yang dipakai adalah asam benzoat dan garam-garamnya Na/K maksimum 250 mg/kg, jadi dalam pembuatan 1 kg sirup memerlukan 250 mg Natrium benzoat/ Kalium benzoat. Asam benzoat biasa dipakai dalam bentuk garamnya yaitu natrium benzoat yang lebih mudah larut daripada asamnya, tetapi bentuk yang aktif adalah asamnya dan garam natrium diubah menjadi asam bebas selama pemakaian. Rentang pH optimum untuk aktivitas antimikroba asam benzoat 2,5-4,0 yang menye-

babkan sangat cocok untuk makanan dan minuman berasam tinggi (De Man, 1997).

Penyarian merupakan proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur. Koefisien distribusi atau partisi yang merupakan tetapan keseimbangan merupakan kelarutan relatif dari suatu senyawa terlarut dalam dua pelarut yang tidak bercampur. Keseimbangan partisi hanya untuk asam benzoat yang tidak terdisosiasi dan keseimbangan disosiasi hanya terdapat pada fase air, karena asam benzoat tidak terdisosiasi dalam eter. Kesulitan timbul jika sebagai penyari digunakan benzena untuk menggantikan eter, karena asam benzoat dalam benzena sebagian mengalami dimerisasi. Kadar H^+ tinggi dalam suasana asam dan asam benzoat sebagian besar terdapat dalam lapisan organik. Kadar H^+ rendah dalam suasana basa dan asam benzoat akan terdapat dalam lapisan air.

Salah satu metode yang digunakan yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). KCKT merupakan teknik analisis yang ideal untuk menganalisis dalam sediaan karena cepat, sederhana, kepekaannya tinggi, dan diperoleh hasil yang teliti. Metode ini merupakan pengembangan lebih lanjut dari kromatografi kolom yang selalu dipilih untuk pemisahan senyawa. Hal penting dari KCKT adalah penggunaan absorben dengan partikel kecil (50 μ m dan kolom yang kecil diameter di dalamnya mengalir pengelusi dengan tekanan tinggi dan laju alir tetap). Cairan ini memperoleh pemisahan yang lebih baik (Munson, 1991).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pH dan pH optimum pada penetapan kadar natrium benzoat dalam sirup melalui isolasi dengan pelarut eter, dan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara kadar natrium benzoat dalam sirup pada pH 4 dengan kadar sebenarnya.

METODE PENELITIAN

Bahan: Sirup yang dibuat berdasarkan SII, standar asam benzoat, eter p.a, metanol, *aquabidestilata*, larutan dapar sitrat pH 3; pH 4 dan pH 5, $Na_2B_4O_7$, indikator *metil orange*, HCl 0,5 N dan fase gerak (metanol : air).

Alat : Pipet volume 1; 2; 5; 10 dan 25 ml, labu ukur 10,0 ml; 50,0 ml; 100,0 ml; 1000 ml, *Beaker glass* 50 ml ; 1000 ml, gelas ukur 10 ml, HPLC Shimadzu model LC-10 AS yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis, SPDA- 10A, kolom C18 RP (fase balik) panjang 30 cm, pemroses data C-R10, alat penyuntik dengan ujung tumpul, neraca analitik kepekaan 0,1 mg (Sartorius), penyaring 0,45 μ m (Whatman), pengaduk ultrasonik Branson, corong pisah gelas, cawan penguap,

penangas air, kertas saring, corong gelas, pembakar spiritus, *syringe*, pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis 1601(*Shimadzu*), pompa KCKT model LC- 6A.

Jalan Penelitian

Penentuan panjang gelombang maksimum

Membuat larutan standar asam benzoat 501 ppm dengan menimbang 50,1 mg standar asam benzoat kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100,0 ml. Larutkan dengan 5 ml metanol p.a kemudian tambahkan *aquabidestilata* sampai tanda batas. Mengambil 2,0 ml larutan tersebut dengan menggunakan pipet volume masukkan ke dalam labu takar 100,0 ml tambahkan *aquabidestilata* sampai tanda batas, kemudian larutan tersebut dimasukkan dalam kuvet, lakukan pembilasan dua kali. Isi kuvet 2/3 volumenya dengan larutan standar ini. Melakukan pengukuran serapan dari panjang gelombang 200 nm-260 nm dengan interval 2 nm. Menentukan panjang gelombang maksimumnya.

Pembuatan fase gerak metanol: air (1:1)

Mengambil 500 ml metanol dan 500 ml *aquabidestilata*, dimasukkan dalam botol dan dicampur sampai homogen.

Pembuatan fase gerak metanol: air (1:2)

Mengambil 500 ml metanol dan 1000 ml *aquabidestilata*, dimasukkan dalam botol dan dicampur sampai homogen.

Pembuatan fase gerak metanol: air (1:3)

Mengambil 250 ml metanol dan 750 ml *aquabidestilata*, dimasukkan dalam botol dan dicampur sampai homogen.

Pemilihan kondisi analisa

Menyuntikkan larutan standar asam benzoat 10 μ l dengan konsentrasi 20 ppm ke alat KCKT menggunakan panjang gelombang yang telah diperoleh pada poin pertama dengan fase gerak metanol: air 1:1; 1:2; 1:3 dan kecepatan aliran 0,8 ml/menit. Mengulangi percobaan yang sama seperti di atas hanya fase geraknya menggunakan metanol: air 1:1; 1: 2; 1: 3 dengan kecepatan aliran 1,0 ml/menit dan 1,2 ml/menit. Dipilih fase gerak yang memberikan pemisahan terbaik, berdasarkan waktu tambat (t_R), HETP dan jumlah pelat teoritis (N).

Pembuatan kurva kalibrasi

Menimbang 50,1 mg baku pembanding asam benzoat dengan seksama, masukkan labu ukur 100,0 ml dan larutkan dengan 5 ml metanol untuk KCKT, tambahkan *aquabidestilata* sampai tanda batas kemudian kocok sampai homogen. Membuat pengenceran baku dengan konsentrasi

20,04 ppm; 30,06 ppm; 40,08 ppm; 50,10 ppm; 60,12 ppm; 70,14 ppm dan 80,16 ppm kemudian disuntikkan masing - masing sebanyak 10 µl ke alat KCKT dan dianalisa hubungan antara luas puncak dan konsentrasi bahan perbandingan, serta dihitung penentuan limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ).

Penetapan kemurnian natrium benzoat

Menimbang dengan seksama ± 0,5 g dilarutkan dalam 50 ml air, ditambahkan 50 ml eter P dan 2 tetes larutan *metil orange*, kemudian dititrasi dengan asam klorida 0,5 N sambil terus menerus diaduk sampai warna indikator berubah dari kuning menjadi jingga. Pisahkan lapisan bawah, cuci lapisan eter dengan 10 ml air. Pada lapisan air tambahkan cairan cucian, 20 ml eter P. Lanjutkan titrasi dengan asam klorida 0,5 N sambil terus menerus diaduk. Replikasi diulang sebanyak lima kali, 1ml asam klorida 0,5 N ~ 72,055 mg C₇H₅NaO₂.

Pembuatan 1000 ml sirup

Menambahkan 650 gram gula pasir sedikit demi sedikit dalam 400 ml *aquadest* yang sudah mendidih di atas kompor gas, diaduk terus menerus hingga larut, menambah 176,4 mg natrium benzoat dan pewarna secukupnya, kemudian menambah *aquadest* sampai 800 ml dan ditunggu sampai semuanya mendidih. *Essence* ditambahkan secukupnya saat 800 ml sirup tersebut masih hangat, dimasukkan dalam labu takar 1000 ml secara kuantitatif, ditambah *aquadest* sampai garis batas.

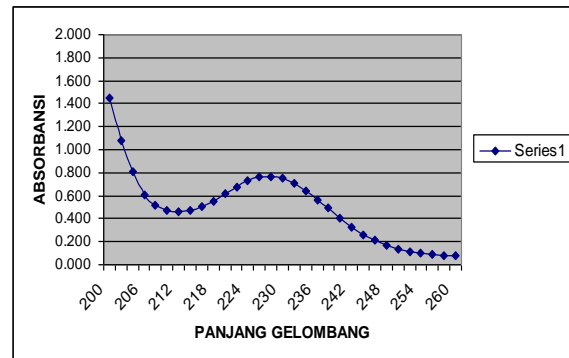
Penetapan kadar benzoat dalam sirup

Membuat sirup dengan pH 3, 4 dan pH 5, yaitu dengan menyiapkan tiga *Beaker glass* 100 ml, masing-masing diisi dengan 50 ml sirup glukosa dan ditambah beberapa tetes larutan dapar sitrat pH 3, 4 dan 5 sampai masing-masing mempunyai pH 3, 4 dan pH 5. Masing-masing sirup ditimbang dengan seksama ± 10 gram dan memasukkannya dalam labu takar 50 ml, kemudian ditambah *aquabidestilata* sampai tanda batas. Masing-masing dipipet 10,0 ml dimasukkan dalam corong pisah lalu diekstraksi sebanyak 3 kali dengan 10,0 ml eter. Hasil ekstraksi pada fase eter dicuci dengan *aquabidestilata*, ditampung dan diuapkan di atas penangas air kemudian dilarutkan dengan fase gerak dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml. Menyuntikkan 10 µl sampel tersebut ke alat KCKT sebanyak 3 kali. Kromatogram yang diperoleh dibandingkan dengan kromatogram baku perbandingan dan kadar dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji panjang gelombang (λ) maksimum

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari baku perbandingan asam benzoat dengan konsentrasi 501 ppm dengan rentang panjang gelombang 200 – 260 nm, interval 2 nm mempunyai serapan terbesar pada panjang gelombang maksimum 228 nm dengan nilai serapan 0,776 (Gambar 1).



Gambar 1—Spektrum serapan asam benzoat 501 ppm dari 200-260 nm, interval 2 nm.

Hasil uji kondisi analisa

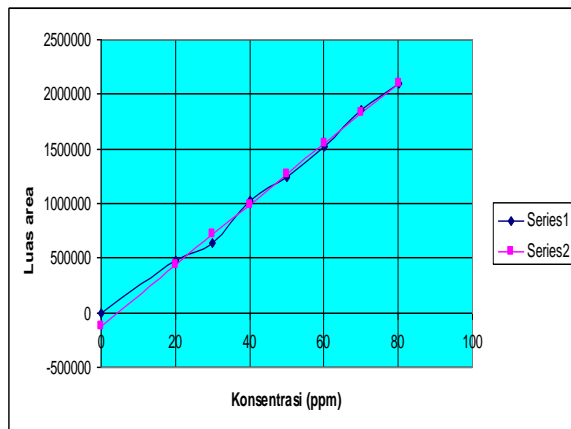
Kondisi analisa yang terbaik dari fase gerak adalah campuran metanol – air (1:3) dan kecepatan alir 1,2 ml/menit, karena nilai N yang paling besar yaitu 251,888 dan HETP paling kecil yaitu 0,119 (Tabel 1).

Tabel 1—Kondisi analisa

Kecepatan alir	Variabel		Perhitungan	
	Fase gerak	Waktu retensi	N	HETP
0,8 ml/menit	metanol-air (1:1)	3,185	138,4083	0,2167
	metanol-air (1:2)	3,145	177,778	0,1687
	metanol-air (1:3)	3,022	225	0,133
1,0 ml/menit	metanol-air (1:1)	2,614	196	0,1534
	metanol-air (1:2)	2,461	149,538	0,201
	metanol-air (1:3)	2,476	190,667	0,157
1,2 ml/menit	metanol-air (1:1)	2,141	212,066	0,1415
	metanol-air (1:2)	2,018	197,603	0,152
	metanol-air (1:3)	2,023	251,888	0,119

Hasil kurva kalibrasi

Hasil kurva kalibrasi diperoleh $Y = -120379,0357 + 27719,53593 X$ dengan nilai $r = 0,997623146$ (Gambar 2).



Gambar 2—Kurva kalibrasi asam benzoat pada λ maks 228 nm Kondisi analisa: fase gerak metanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L

Hasil uji batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ)

Hasil $LOD = 4,913313675$ ppm, $LOQ = 16,37771225$

Hasil penetapan kemurnian natrium benzoat

Hasil penetapan kemurnian natrium benzoat dalam sirup sebesar 76,51% atau 108,73 mg/kg.

Tabel 2—Hasil Penetapan kadar natrium benzoat dalam sirup

Hasil penetapan kadar kadar natrium benzoat dalam sirup pada :

- pH 3 = $(86,60 \pm 0,52)$ mg/kg
- pH 4 = $(100,74 \pm 1,41)$ mg/kg
- pH 5 = $(79,56 \pm 0,16)$ mg/kg (Tabel 2)

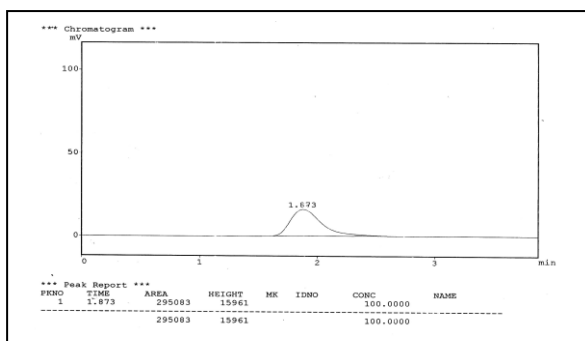
Uji deviasi normal (U) untuk mengetahui apakah terjadi suatu perbedaan yang signifikan antara kadar yang diperoleh dari hasil penelitian dengan hasil sebenarnya.

Hasil uji U hitung pada pH 3 ; pH 4 dan pH 5 pada taraf kepercayaan 95% :

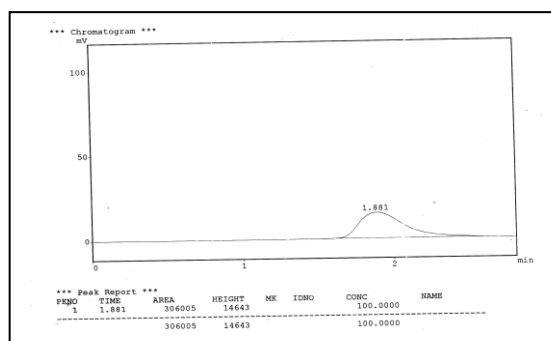
- pH 3 : U hitung = 43,84 > U tabel = 1,96, sehingga kadar natrium benzoat dalam sirup terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar sebenarnya.
- pH 4 : U hitung = 1,94 < U tabel = 1,96, sehingga kadar natrium benzoat dalam sirup tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar sebenarnya.
- pH 5 : U hitung = 202,48 > U tabel = 1,96, sehingga kadar natrium benzoat dalam sirup terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar sebenarnya.

Tabel 2—Hasil Penetapan kadar natrium benzoat dalam sirup

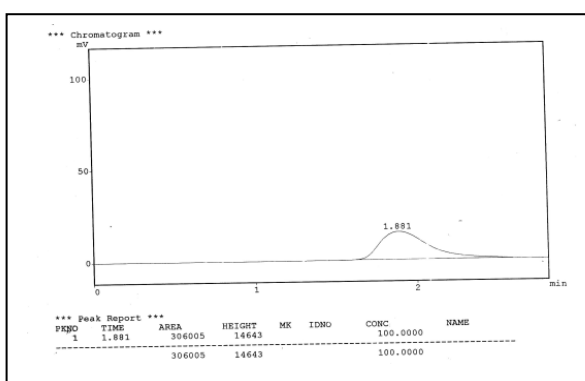
Sirup	Luas puncak (μ v/dtk)	Konsentrasi (ppm)	Berat asam benzoat dalam ± 10 g sirup(g)	Berat asam benzoat (g/kg)	Kadar natrium benzoat (mg/kg)
pH 3	285786	14,65266362	$7,32633181 \times 10^{-4}$	0,0730740562	86,232412
	306005	15,38207699	$7,69103849 \times 10^{-4}$	0,0767117015	90,525084
	289242	14,77734103	$7,38867051 \times 10^{-4}$	0,0736958328	86,966151
			Rata-rata SD		$(86,60 \pm 0,52)$ mg/kg
pH 4	295083	14,98805885	$7,49402942 \times 10^{-4}$	0,0764759308	90,246858
	347984	16,89649628	$8,44824814 \times 10^{-4}$	0,0862136515	101,738039
	338780	16,56445609	$8,28222804 \times 10^{-4}$	0,0845194305	99,738741
			Rata-rata SD		$(100,74 \pm 1,41)$ mg/kg
pH 5	241275	13,04690081	$6,5234504 \times 10^{-4}$	0,0663539616	78,302238
	247604	13,27522353	$6,63761176 \times 10^{-4}$	0,0675151659	79,672539
	246549	13,23716373	$6,61858186 \times 10^{-4}$	0,0673216013	79,44412
			Rata-rata SD		$(79,56 \pm 0,16)$ mg/kg



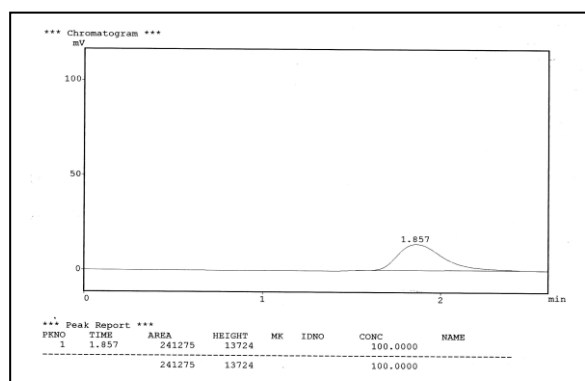
Gambar 3—Kromatogram sampel pH 3 penginjekan pertama
Kondisi analisa: fase gerak metanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



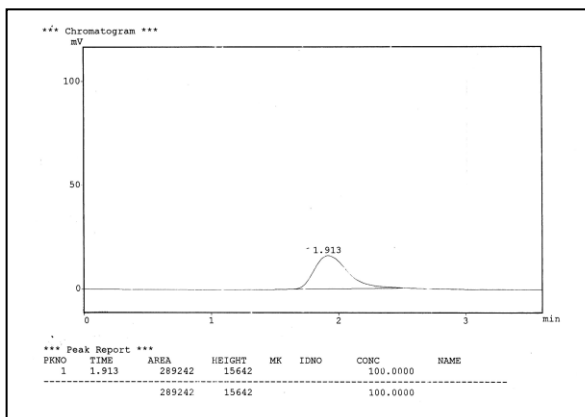
Gambar 6—Kromatogram sampel pH 4 penginjekan pertama
Kondisi analisa: fase gerak metanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



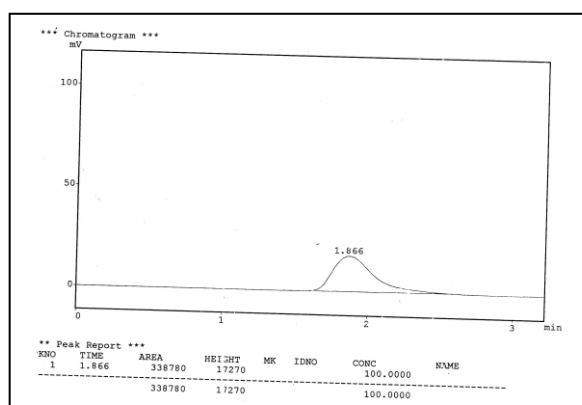
Gambar 4—Kromatogram sampel pH 3 penginjekan kedua
Kondisi analisa: fase gerak methanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



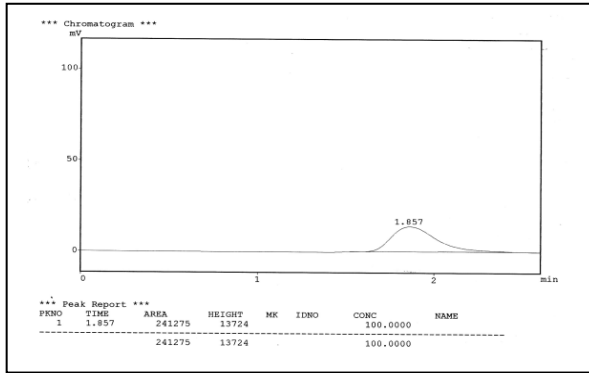
Gambar 7—Kromatogram sampel pH 4 penginjekan kedua
Kondisi analisa: fase gerak methanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



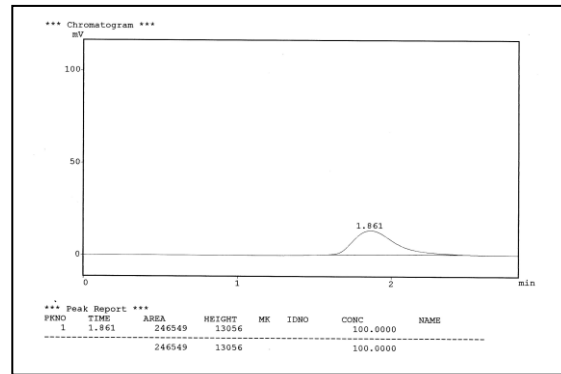
Gambar 5—Kromatogram sampel pH 3 penginjekan ketiga
Kondisi analisa: fase gerak metanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV-Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



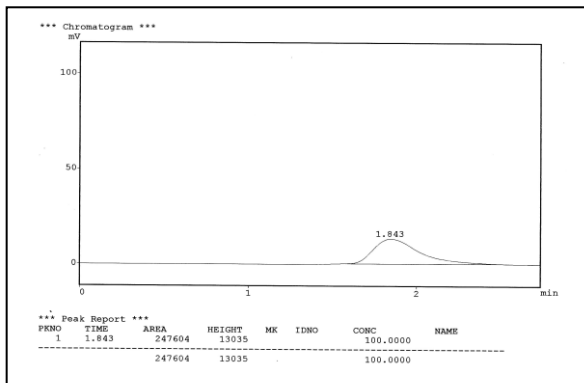
Gambar 8—Kromatogram sampel pH 4 penginjekan ketiga
Kondisi analisa: fase gerak metanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV-Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



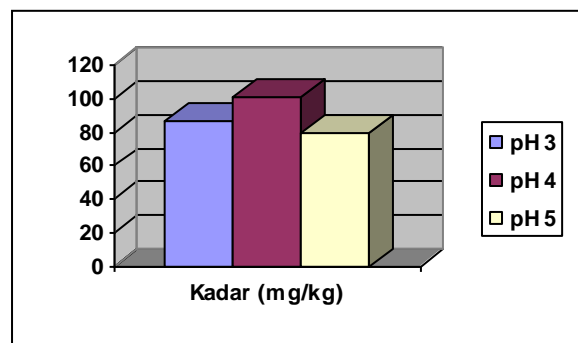
Gambar 9—Kromatogram sampel pH 5 penginjekan pertama
Kondisi analisa: fase gerak methanol : air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



Gambar 11—Kromatogram sampel pH 5 penginjekan ketiga
Kondisi analisa: fase gerak metanol: air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



Gambar 10—Kromatogram sampel pH 5 penginjekan kedua
Kondisi analisa: fase gerak metanol: air (1:3), kolom C18 RP panjang 30 cm, detektor UV- Vis ($\lambda = 228$ nm), kecepatan alir 1,2 ml/ menit, volume penginjekan 10,0 μ L



Gambar 12—Grafik kadar sampel

KESIMPULAN

Penetapan kadar natrium benzoat dalam sirup melalui isolasi dengan pelarut eter secara KCKT dipengaruhi dengan harga pH, pH optimum adalah 4 (empat). Kadar sampel dengan pH 4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan kadar sebenarnya, setelah dilakukan uji deviasi normal (U).

DAFTAR ACUAN

De Man, J.M., 1997, *Kimia Makanan*, Edisi ke-2, 529, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Institut Teknologi Bogor, Bandung

Mulja, M, dan Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, 244 dan 250, Airlangga University Press, Surabaya

Munson, J.W., 1991, *Analisis Farmasi Metode Modern*, 32–44, diterjemahkan oleh Parwan B, Airlangga University Press, Surabaya