

# Optimasi Komposisi Fasa Gerak dan pH Buffer Asetat Pada Analisa Zat Warna Sintetik Rhodamin B dan Ponceau 4R Menggunakan Metoda HPLC

Liza Olivia<sup>1</sup>, Budhi Oktavia<sup>2</sup>, Iryani<sup>3</sup>

*Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*

*Universitas Negeri Padang, Jl. Prof. Dr. Hamka Padang 25131, Indonesia*

<sup>1</sup>Lizaolivia48@yahoo.co.id, <sup>2</sup>budhi\_ukt@yahoo.com, <sup>3</sup>in.iryani@yahoo.co.id

**Abstract**—One of the food additives that is often used by many people is dye. More synthetic dyes are used in food and beverage than natural dyes time by time. According to Regulation of Health Ministry No.239/Menkes/Per/VI/85, Rhodamine B is synthetic dye which is banned because it is a carcinogen. However, Ponceau 4R is allowable synthetic dye. The way of using Ponceau 4R must be based on regulation of the Indonesia Health Ministry No. 722/Menkes/per/IX/88; 70 mg/kg for beverage and 300 mg/kg for food. The purpose of this research is to find the optimum condition of the mobile phase composition and pH buffer acetate. The analysis of the Rhodamine B and Ponceau 4R were done by optimizing the mobile phase composition and pH acetate buffer with methanol mobile phase: acetate buffer and stationary phase ODS C18 column used the HPLC method of the UV-Vis detector. The result of the optimization pH acetate buffer was pH 6 acetate buffer with a ratio composition of methanol: buffer (80:20) with a wavelength of 540 nm. Retention times obtained for Rhodamine B was 5,048 minutes and Ponceau 4R was 2,528 minutes. There were four samples containing dye Ponceau 4R and none containing dye Rhodamine B were found by using the HPLC method from the ten samples tested.

**Keywords**—Rhodamine B, Ponceau 4R, HPLC.

## I. PENDAHULUAN

Salah satu bahan tambahan pangan yang sering digunakan oleh masyarakat adalah pewarna makanan. Pewarna pangan telah lama digunakan pada bahan makanan dan minuman untuk memperbaiki tampilan produk pangan. Pada mulanya zat warna yang digunakan adalah zat warna alami yang berasal dari tumbuhan dan hewan. Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini, zat warna alami semakin berkurang penggunaannya dalam industri pangan dan sekarang lebih banyak digunakan zat warna sintetik. Pewarna makanan alami maupun sintetik yang sering ditambahkan ke dalam bahan makanan dan minuman ringan berfungsi untuk mempertahankan warna alami selama proses atau penyimpanan dan untuk menciptakan tampilan warna yang diinginkan. Saat ini, pewarna sintesis banyak digunakan untuk membuat makanan menjadi lebih menarik dan membangkitkan selera<sup>[8]</sup>.

Di Indonesia peraturan mengenai penggunaan zat pewarna yang diizinkan dan dilarang untuk pangan diatur melalui SK Menteri Kesehatan RI nomor 722/Menkes/per/IX/88 mengenai bahan tambahan pangan. Walaupun telah ada peraturan Menteri Kesehatan masih sering terjadi

penyalahgunaan pemakaian zat pewarna untuk bahan pangan, misalnya zat pewarna untuk tekstil dan kulit dipakai untuk mewarnai bahan makanan. Timbulnya penyalahgunaan tersebut antara lain disebabkan beberapa faktor, seperti ; kurangnya pengetahuan masyarakat mengenai zat pewarna untuk pangan, harga zat pewarna untuk industri jauh lebih murah dibandingkan dengan harga zat pewarna untuk pangan dan warna dari zat pewarna tekstil atau kulit biasanya lebih menarik<sup>[3]</sup>.

Rhodamine B adalah salah satu zat pewarna sintesis yang biasa digunakan pada industri tekstil dan kertas. Rhodamine B berbentuk serbuk merah keunguan, berwarna hijau dalam bentuk kristal dan dalam larutan akan berwarna merah terang berpendar. Zat ini ditetapkan sebagai zat yang dilarang penggunaannya pada makanan melalui Peraturan Menteri Kesehatan (Permenkes) No.239/Menkes/Per/VI/85. Rhodamine B sangat berbahaya jika terhirup, mengenai kulit, mengenai mata dan tertelan. Akibat yang ditimbulkan dapat berupa ; iritasi pada saluran pernafasan, iritasi pada kulit, iritasi saluran pencernaan dan kanker hati. Apabila tertelan maka dapat menimbulkan iritasi pada saluran pencernaan dan apabila terpapar Rhodamine B dalam waktu yang lama, maka dapat menyebabkan gangguan pada fungsi hati dan kanker hati. Zat warna Rhodamine B adalah pewarna sintesis yang dilarang penggunaannya pada makanan dan minuman, namun pada kenyataannya masyarakat masih banyak menggunakan pewarna Rhodamine B pada makanan dan minuman jajanan yang diperdagangkan. Penyalahgunaan Rhodamine B untuk

Corresponding Author :

Budhi Oktavia, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University, Padang, West Sumatera, Indonesia.



budhi\_ukt@yahoo.com

pewarna pangan telah ditemukan untuk beberapa jenis pangan. Pangan tersebut antara lain adalah kerupuk, terasi dan pangan jajanan yang berwarna merah [2].

Selain Rhodamin B, *Ponceau 4R(E124* atau *SX Purple)* adalah zat warna sintetis berwarna merah yang digunakan dalam berbagai produk, termasuk selai, kue, agar-agar dan minuman ringan. Ponceau 4R merupakan bahan pewarna sintetis yang diizinkan dalam makanan dengan ambang batas yang telah ditentukan oleh Menteri Kesehatan RI nomor 722/Menkes/per/IX/88. Namun di beberapa negara seperti Amerika, Norwegia dan Firlandia telah melarang penggunaan pewarna ini terhadap makanan atau minuman. Penggunaan zat ini secara berlebihan akan menyebabkan Hiperaktif yaitu suatu kondisi dimana seorang anak menjadi kesulitan untuk memusatkan perhatian dan mengontrol perilaku, selain itu pewarna ponceau 4R juga dianggap bersifat karsinogenik [4].

Kelompok zat pewarna sintetis dapat dianalisis dengan beberapa metode seperti spektrofotometri UV-Vis, kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi, dan kromatografi ion. Penentuan kadar zat pewarna sintetis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) merupakan teknik yang berkembang di kimia analitik. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau lebih dikenal dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu teknik pemisahan campuran secara modern, dimana sistem pemisahan dapat dilakukan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi, karena HPLC didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa bertekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif. HPLC mampu menganalisis cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik pada komponen tunggal maupun campuran

Berdasarkan uraian di atas maka penulis tertarik melakukan penelitian untuk menentukan kondisi optimum pada analisis zat warna sintetis Rhodamin B dan Ponceau 4R menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang dikenal dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menggunakan kolom ODS C18. Pemilihan metode HPLC ini disebabkan karena analisis dengan HPLC ini dapat dilakukan dengan cepat, daya pisah baik, peka, penyiapan sampel mudah, dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai [9].

## II. METODE PENELITIAN

### A. Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi seperangkat alat HPLC agilent tipe 1120 made in USA, Injektor agilent 50  $\mu$ L, kolom tipe agilent ODS C-18 4,6x250mm 5 $\mu$ m, syringe filter 0,45  $\mu$ m, hot plate, pH meter, kertas saring, neraca analitik, labu ukur, Erlenmeyer 250 mL, corong pisah, botol semprot, pipet tetes, ultrasonik untuk menghilangkan gas pada sampel larutan

Bahan utama yang digunakan adalah Pewarna sintetis Rhodamin B dan Ponceau 4R sebagai standar, metanol p.a, asam asetat, natrium asetat, aquabidest, ammonia 2%, alkohol 70%.

### B. Prosedur kerja secara umum penggunaan HPLC

Prosedur kerja HPLC secara umum adalah fasa gerak dialirkan dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Selanjutnya panjang gelombang di set pada ( $\lambda_{maks}$ ) yang telah ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga didapatkan base line yang stabil pada monitor. Setelah itu diinjeksikan sampel dan diperoleh kromatogram. Kromatogram yang diperoleh tersebut diprint dan dijadikan data untuk analisis.

### C. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan yaitu berupa beberapa makanan dan minuman berwarna merah yang beredar di masyarakat, sampel makanan berjumlah lima buah berupa roti (produksi pabrik dan rumah tangga) dan kerupuk merah produksi pabrik, dan sampel minuman berjumlah 5 buah yang berupa sirup (produksi pabrik) dan es serut (produksi industri rumah tangga). Sampel tersebut dianalisa pada kondisi optimum zat warna sintetis yang telah diperoleh, yaitu pada pH buffer asetat optimum dan komposisi fasa gerak yang optimum.

### D. Pembuatan Larutan Uji

#### 1. Sampel Minuman

Pada sampel minuman sebelum dianalisa harus disaring dengan syringe filter 0,45 $\mu$ m, ini dilakukan untuk menyaring partikel kotoran yang tersisa pada sampel untuk menghindari penyumbatan pada kolom, lalu di ultrasonik untuk menghilangkan gas agar sampel menjadi homogen.

#### 2. Sampel Makanan<sup>[6]</sup>

Sampel makanan seberat 5,0 gram ditimbang, kemudian sampel dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang bertutup asah dan diberi label. Sampel kemudian ditambahkan 100 mL larutan ammonia 2% dalam etanol 70% dan didiamkan semalam hingga semua pewarna larut. Larutan berwarna disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman Nomor 1 ke dalam Erlenmeyer. Hasil penyaringan tersebut dipindahkan ke gelas kimia kemudian diuapkan di atas hot plate selama 4 jam pada suhu 65°C. Sampel menjadi pekat selama proses penguapan, ekstrak pekat di ukur dan disaring menggunakan syringe filter 0,45  $\mu$ m dan di ultrasonik. Ekstrak siap dianalisa dengan HPLC.

### E. Pembuatan Larutan Standar Rhodamin B dan Ponceau 4R

Larutan standar 1000 ppm dapat dibuat dengan cara menimbang pewarna Rhodamin B sebanyak 100 mg lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Kemudian larutan ditambahkan dengan aquabidest hingga tanda batas dan dihomogenkan. Cara yang sama dilakukan juga untuk Ponceau 4R. Kemudian dibuat larutan standar 10 ppm. Larutan standar 10 ppm dapat dibuat dengan cara memipet 1 mL larutan induk 1000 ppm Rhodamin B dan masukkan kedalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan aquabidest sampai tanda batas dan di homogenkan. Hal yang sama dilakukan juga untuk membuat Ponceau 4R 10 ppm. Larutan standar Rhodamin B dan Ponceau 4R dengan konsentrasi 30 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang 200-750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, lalu dibuat kurva

serapannya. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum untuk analisis

#### F. Pembuatan Buffer Asetat

##### 1. Larutan asam asetat 0,2 M

Sebanyak 11,55 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  p.a diencerkan dengan aquabides hingga 1 liter.

##### 2. Larutan natrium asetat 0,2 M

$\text{CH}_3\text{COONa}$  sebanyak 16,4 gram dilarutkan dengan aquabides hingga 1 liter.

X mL larutan asam asetat 0,2 M dicampurkan dengan Y mL larutan natrium asetat 0,2 M dan encerkan hingga 100 mL dengan air suling. Untuk mencampurkan buffer asetat ini pada rentangan pH yang diinginkan sesuai tabel berikut:

TABEL 1  
PEMBUATAN BUFFER ASETAT

pH	mL asam asetat 0,2 M	mL natrium asetat 0,2 M	mL air suling
4,0	41,0	9,0	50
5,0	15,0	35,0	50
6,0	2,0	48,0	50

#### G. Penentuan Kondisi Optimum Untuk Penentuan Zat Warna Rhodamin B dan Ponceau 4R secara HPLC

##### 1. Variasi pH Buffer Asetat

Campuran larutan standar Rhodamin B dan Ponceau 4R diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ke dalam kolom menggunakan fasa gerak campuran metanol dengan buffer asetat pH 4,0 ; 5,0 ; 6,0 dengan perbandingan komposisi fasa gerak 80:20. Dipilih pH yang memberikan pemisahan terbaik berdasarkan waktu retensi ( $t_R$ ), resolusi (R), HETP dan jumlah pelat teoritis (N).

##### 2. Variasi Komposisi Fasa Gerak

Campuran larutan standar Rhodamin B dan Ponceau 4R diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ke dalam kolom menggunakan fasa gerak metanol:buffer asetat pH optimum dengan variasi 100:0 ; 90:10;80:20 ; 70:30 ; 60:40. Dipilih komposisi fasa gerak yang memberikan pemisahan terbaik berdasarkan waktu retensi ( $t_R$ ), resolusi (R), HETP dan jumlah pelat teoritis (N).

#### H. Penentuan Kurva Regresi Linear Dari Larutan Standar Ponceau 4R

Larutan standar 1000 ppm dapat dibuat dengan cara menimbang pewarna Ponceau 4R sebanyak 100 mg lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Kemudian larutan ditambahkan dengan aquabides hingga tanda batas dan dihomogenkan. Dari larutan standar 1000 ppm dibuat larutan standar Ponceau 4R dengan variasi konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm diinjeksikan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  kedalam kolom

HPLC menggunakan kondisi optimum analisa yang telah ditentukan sebelumnya. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan konsentrasi dan luas puncak yang dihasilkan

#### I. Analisa Kualitatif Pewarna Rhodamin B Dan Ponceau 4R Dengan Reaksi Warna <sup>[1]</sup>

Pada serbuk atau larutan zat warna, diteteskan asam sulfat pekat, asam klorida pekat, larutan amonia 10%, dan natrium hidroksida 10%. Perubahan warna yang terjadi diamati dan dibandingkan dengan larutan standar

#### J. Penentuan Kadar Ponceau 4R Secara HPLC

Kondisi optimum yang telah diperoleh kemudian digunakan pada analisis sampel. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  sampel diinjeksikan ke dalam kolom dan dicatat waktu retensi puncak-puncak yang dihasilkan sampel. Jika puncak-puncak tersebut mempunyai waktu retensi yang kurang lebih sama dengan waktu retensi puncak larutan standar, maka dapat disimpulkan bahwa pada sampel terdapat zat-zat tersebut.

#### K. Teknik Analisis Data

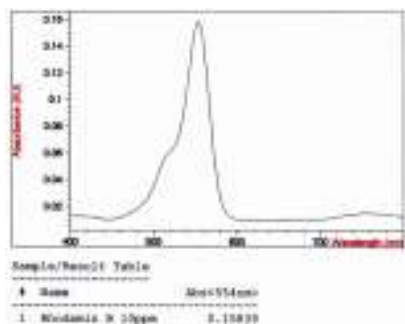
Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah data kuantitatif dengan melihat luas daerah dari Rhodamin B dan Ponceau 4R pada kromatogram HPLC, kemudian ditentukan kadarnya dengan menggunakan kurva linear dari larutan standar.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

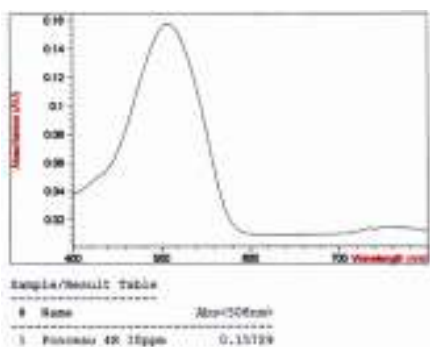
#### A. Penentuan $\lambda_{maks}$ Warna Sintetis Rhodamin B dan Ponceau 4R

Sebelum menganalisa zat warna Rhodamin B dan Ponceau 4R menggunakan HPLC terlebih dahulu harus diketahui panjang gelombang maksimum dari kedua zat warna tersebut karena pada HPLC menggunakan detektor UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum standar zat warna sintetis Rhodamin B dan Ponceau 4R dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 400-750 nm. Hal ini dilakukan karena Rhodamin B dan Ponceau 4R merupakan larutan berwarna yaitu warna merah. Sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Zat warna (Rhodamin B dan Ponceau 4R) dengan konsentrasi 10 ppm diukur menggunakan UV-VIS maka diperoleh  $\lambda_{maks}$  Rhodamin B adalah 554 nm (Gambar.1) dan  $\lambda_{maks}$  Ponceau 4R adalah 508 nm (Gambar.2).

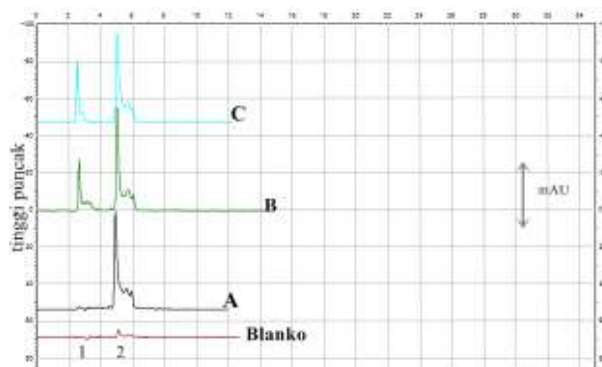
Pada pengukuran dengan HPLC digunakan panjang gelombang 540 nm untuk menganalisa kedua zat warna Rhodamin B dan Ponceau 4R. Pengukuran pada panjang gelombang 540 nm tersebut dilakukan dengan alasan karena pada panjang gelombang 540 nm Rhodamin B dan Ponceau 4R masih dapat terdeteksi oleh detektor karena pada panjang gelombang 540 nm kedua senyawa mempunyai kurva saling berpotongan pada satu titik dan juga untuk menghemat waktu analisis. Dari hasil pengukuran panjang gelombang diperoleh hasil sebagai berikut.



Gambar 1. Spektrogram Rhodamin B 10 ppm



Gambar 2. Spektrogram Ponceau 4R 10 ppm



Gambar 3. Variasi pH buffer asetat, laju alir 1 mL/menit,  $\lambda = 540$  nm, kolom ODS C 18, fasa gerak Metanol : Buffer Asetat, A (metanol : buffer Asetat pH 4), B (metanol : buffer Asetat pH 5), C (metanol : buffer Asetat pH 6). 1(ponceau 4R), 2(Rhodamin B)

### B. Penentuan Kondisi Optimum untuk Rhodamin B dan Ponceau 4R secara HPLC

Kolom HPLC yang digunakan dalam penelitian ini adalah kolom ODS-C18, dimana pada HPLC kolom merupakan bagian yang sangat penting karena pemisahan komponen-komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Kolom ODS C-18 yang bertindak sebagai fasa diam bersifat non polar sehingga eluen yang digunakan harus bersifat lebih polar dari fasa diam yang digunakan, hal ini lebih dikenal dengan HPLC fasa terbalik.

#### 1. Variasi pH Buffer Asetat

Penggunaan buffer asetat sangat berpengaruh terhadap kromatogram Rhodamin B dan Ponceau 4R yang diperoleh. Dari variasi pH buffer asetat yang telah dilakukan, diperoleh pH optimum untuk Rhodamin B dan Ponceau 4R adalah buffer asetat pH 6 dengan metanol:buffer asetat pH 6 (80:20). Pemilihan pH optimum ini didasarkan pada puncak Rhodamin B dan ponceau 4R yang paling bagus pada waktu retensi yang minimum, resolusi yang bagus dan puncak yang paling tinggi. Kondisi optimal yang diinginkan mengacu pada prinsip pemisahan sebaik mungkin dengan waktu analisis seminimal mungkin<sup>[10]</sup>.

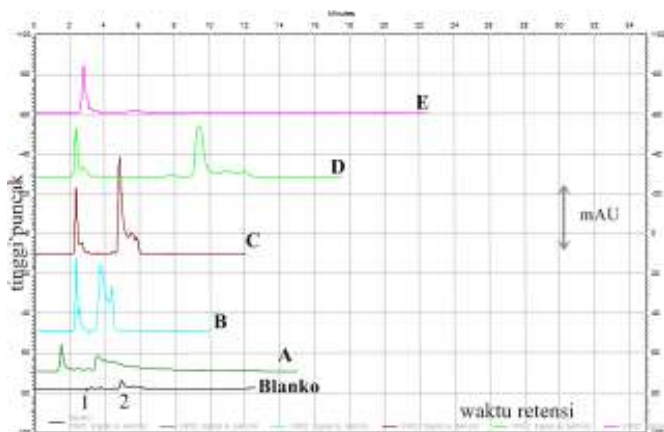
Dari kromatogram yang diperoleh terlihat bahwa Rhodamin B memiliki waktu retensi lebih lama dari pada Ponceau 4R. Hal ini disebabkan karena Ponceau 4R mempunyai sifat yang lebih polar sehingga lebih cepat keluar dari kolom, sebaliknya Rhodamin B memiliki waktu retensi lebih lama karena adanya interaksi antara Rhodamin B dengan fasa diam kolom ODS C-18. Komponen yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dahulu sedangkan komponen yang kuat berinteraksi dengan fasa diam maka komponen tersebut akan keluar dari kolom lebih lama<sup>[5]</sup>.

Pada penggunaan buffer asetat pH 4 dapat dilihat bahwa kromatogram dari Ponceau 4R tidak muncul karena Ponceau 4R bereinteraksi lebih lama didalam kolom. Pada penggunaan buffer asetat pH 5 kromatogram dari Ponceau 4R dan Rhodamin B kurang bagus karena banyaknya tailing pada kromatogram. Kondisi ini bukan merupakan kondisi yang optimal. Pada penggunaan buffer asetat pH 6 merupakan pH optimum hal ini dikarenakan menghasilkan puncak yang tinggi dan yang paling bagus. Fungsi buffer disini adalah untuk mempertahankan pH dan sebagai pengontrol pH untuk mengatur ionisasi ataupun protonasi analit didalam kolom sehingga kuat lemahnya interaksi analit dengan gugus silanol dapat diatur melalui pemilihan pH yang tepat<sup>[7]</sup>. Variasi pH yang digunakan adalah pH 4.00, 5.00, dan 6.00 dengan alasan bahwa jika pH yang digunakan terlalu asam atau sangat rendah maka akan merusak ikatan Si-C pada kolom.

#### 2. Variasi komposisi fasa gerak

Dari variasi komposisi fasa gerak yang telah dilakukan diperoleh komposisi fasa gerak optimum dari Rhodamin B dan Ponceau 4R adalah Metanol : buffer asetat pH 6 dengan perbandingan 80:20.





Gambar 4. Variasi komposisi fasa gerak terhadap waktu retensi. laju alir 1 mL/menit,  $\lambda = 540$  nm, kolom ODS C 18, fasa gerak metanol:buffer Asetat, A (metanol:buffer Asetat 100:0), B (metanol:buffer Asetat 90:10), C (metanol:buffer Asetat 80:20), D (metanol:buffer Asetat 70:30), E (metanol:buffer Asetat 60:40), 1 (Ponceau 4R), 2 (Rhodamin B)

Dari kromatogram diatas pada penggunaan 100% metanol (A), hasil yang diperoleh tidak maksimal karena luas puncak yang diperoleh kecil dan pada kromatogram Rhodamin B terjadi pelebaran puncak. Pada perbandingan komposisi metanol:buffer asetat pH 6 perbandingan 90:10 (B) kromatogram yang dihasilkan memiliki banyak tailing. Pada perbandingan komposisi 70:30 (D) kromatogram dari Rhodamin B memiliki waktu retensi 9 menit, hal ini bukan merupakan kondisi optimal karena waktu analisis yang lama. Pada perbandingan komposisi 60:40 dapat dilihat bahwa kromatogram dari Rhodamin B tidak muncul hal ini disebabkan Rhodamin B tertahan lama di dalam kolom karena tidak sesuai perbandingan komposisi eluen yang digunakan.

Hasil dari optimasi komposisi fasa gerak dan pH buffer asetat maka diperoleh data bahwa komposisi metanol:buffer asetat pH 6 dengan perbandingan 80:20 merupakan kondisi optimum pada analisa zat warna sintetik Rhodamin B dan Ponceau 4R. Kondisi optimum yang diperoleh di aplikasikan kepada sampel. Uji pendahuluan dilakukan dengan menggunakan reaksi warna

### 3. Analisis Sampel Secara Kualitatif Dengan Reaksi Warna

Uji kualitatif dilakukan dengan reaksi warna. Perubahan warna yang terjadi pada sampel diamati dan dibandingkan dengan standar Rhodamin B dan Ponceau 4R. Jika hasil dari pengujian warna menunjukkan bahwa warna sampel sama dengan standar Rhodamin B dan Ponceau 4R maka pewarna sintesis tersebut terdapat dalam sampel. Hasil yang diperoleh dari reaksi warna dapat dilihat pada Tabel 2.

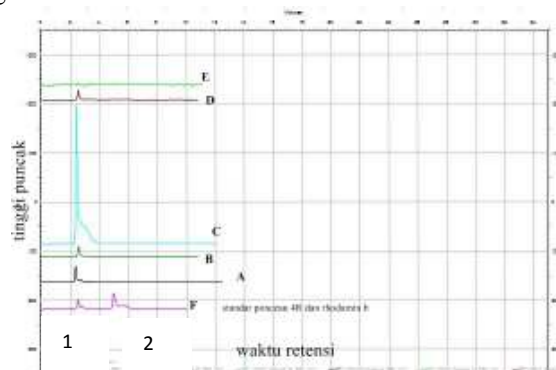
Dari sepuluh sampel yang telah diamati dengan reaksi warna. Semua sampel negatif mengandung Rhodamin B, Sedangkan ada enam sampel yang mengandung pewarna Ponceau 4R, yaitu ; sampel C, D, G, H, J dan K. Untuk lebih memastikan hasil dari uji reaksi warna diatas maka analisa

lanjut dilakukan menggunakan HPLC. Sepuluh sampel yang dianalisa Rhodamin B negatif pada semua sampel, maka untuk uji selanjutnya pada HPLC tes dilakukan hanya pada zat warna ponceau 4R.

Uji kualitatif Ponceau 4R pada HPLC dapat ditentukan dengan membandingkan waktu retensi sampel yang diduga mengandung Ponceau 4R dengan waktu retensi standar Ponceau 4R. Jika sampel menghasilkan puncak yang sama dengan puncak larutan standar Ponceau 4R maka pada sampel tersebut positif mengandung Ponceau 4R

### 4. Penentuan kadar Ponceau 4R pada sampel minuman

Kromatogram penentuan kadar Ponceau 4R pada sampel minuman yang telah di analisa menggunakan HPLC dengan kondisi optimum yang telah didapat dapat dilihat pada Gambar 5. Terdapat enam kromatogram, dimana A, B, C, D, E adalah sampel sedangkan F adalah Larutan standar campuran Rhodamin B dan Ponceau 4R dengan konsentrasi 25 ppm. Standar Ponceau 4R mempunyai waktu retensi 2,52 menit sedangkan Rhodamin B waktu retensinya adalah 5,04 menit. Pada kromatogram, empat sampel positif mengandung ponceau 4R. Ini dapat dilihat dari waktu retensi yang ditunjukkan standar ponceau 4R sama dengan waktu retensi yang ditunjukkan sampel, sedangkan untuk Rhodamin B, dari kelima sampel tidak satupun yang mengandung Rhodamin B karena pada waktu retensi 5 menit tidak terdapat kromatogram yang muncul.



Gambar 5. Kromatogram sampel minuman dan larutan standar Rhodamin B dan Ponceau 4R, laju alir 1 mL/menit  $\lambda = 540$  nm, kolom ODS C18, fasa gerak methanol:buffer Asetat (20:80), 1. Ponceau 4R, 2. Rhodamin B

Hasil yang diperoleh dari Kromatogram di atas dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

TABEL 2  
REAKSI WARNA ANALISA KUALITATIF RHODAMIN B DAN PONCEAU 4R

No	Zat Warna	Warna Asal	H2SO4 p.a	HCl p.a	Larutan ammonia 10 %	Larutan NaOH 10%	Ket	
							P*	R*
1	Rhodamin B	Hijau tua	Kuning	Merah Jingga	Ungu	Ungu	-	+
2	Ponceau 4R	Merah	Merah	Merah	Merah	Merah	+	-
3	Sampel A	Merah	Orange pekat	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan	-	-
4	Sampel B	Merah	Coklat pekat	Kecoklatan	Kecoklatan	Kecoklatan	-	-
5	Sampel C	Kemerahan	Kemerahan	Kemerahan	Kemerahan	kemerahan	+	-
6	Sampel D	Merah	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Merah muda	+	-
7	Sampel E	Pink	Kecoklatan	Kecoklatan	Coklat pudar	Coklat pudar	-	-
8	Sampel G	Merah	Merah kecoklatan	Merah kecoklatan	Merah muda	Merah muda	+	-
9	Sanpel H	Merah muda	Merah kecoklatan	Coklat	Merah kecoklatan	Merah kecoklatan	+	-
10	Sampel I	Bening ke merahmudaan	Merah muda hambar	Merah muda hambar	Bening merah muda	Bening Merah muda hambar	-	-
11	Sampel J	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Merah muda	Merah muda	+	-
12	Sampel K	Merah Kecoklatan	Merah Kecoklatan	Merah Kecoklatan	Merah Kecoklatan	Merah kecoklatan	+	-

\*P = Ponceau 4R  
R = Rhodamin B

TABEL 3  
LUAS PUNCAK PONCEAU 4R DARI MASING-MASING SAMPEL MINUMAN. LAJU ALIR 1 ml/menit,  $\lambda = 540$  nm, KOLOM ODS C18, FASA GERAK METANOL:BUFFER ASETAT PH 6 (80:20)

No	Sampel	Tinggi Puncak (mAU)	Lebar Puncak (menit)	Luas Puncak (mAU×mnt)	Luas Puncak Rata-Rata
1	A	26,624	0,455	6,056	5,899
		33,320	0,365	6,080	
		27,199	0,409	5,562	
2	B	21,339	0,432	4,609	4,741
		20,190	0,485	4,896	
		21,953	0,430	4,719	
3	C	252,334	0,746	94,120	87,543
		282,650	0,471	66,564	
		281,202	0,721	101,373	
4	D	32,029	0,378	6,053	4,894
		21,069	0,423	4,456	
		20,317	0,411	4,175	
5	E	-	-	-	-
		-	-	-	
		-	-	-	

Rhodamin B tidak ditemukan pada sampel minuman, hal ini bisa dilihat dari waktu retensi. Kadar dari Ponceau 4R dalam sampel dapat dihitung dengan memplotkan luas puncak ke persamaan regresi linear yang telah diperoleh yaitu  $Y = 0,267x - 4,706$  maka diperolehlah kadar dari ponceau 4R. Data bisa dilihat pada Tabel 3 dibawah ini :

TABEL 4  
KADAR PONCEAU 4R DAN RHODAMIN B DARI MASING-MASING SAMPEL MINUMAN.LAJU ALIR 1 ml/menit,  $\lambda = 540$  nm, KOLOM ODS C18, FASA GERAK METANOL : BUFFER ASETAT (80:20)

No	Sampel	Kadar Ponceau 4R(ppm)
1	A	44,468
2	B	1,131
3	C	221,571
4	D	3,520
5	E	-

## IV. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diperoleh beberapa kesimpulan, yaitu:

1. Panjang gelombang maksimum dari Rhodamin B adalah 554 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum dari Ponceau 4R adalah 508 nm. Analisis Rhodamin B dan Ponceau 4R pada HPLC dilakukan pada panjang gelombang 540 nm, Laju alir 1 mL/menit, kolom ODS C18 dengan fasa gerak metanol:buffer asetat pH 6 dengan perbandingan komposisi 80:20.
2. Pada sampel makanan dan minuman yang dianalisis tidak satupun yang mengandung pewarna sintetik Rhodamin B.
3. Ponceau 4R teridentifikasi pada beberapa makanan dan minuman yang dianalisa dengan kadar tertinggi terdapat pada sampel C yaitu 221,571.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada dosen penguji yaitu Bapak Dr. Mawardi, M.Si, Bapak Drs. Iswendi, M.S, dan Ibu Dra.Sri Benti Etika, M.Si atas bimbingan dan masukan nya.Serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

## REFERENSI

- [1] Azizahwati, Kurniadi, M., Hidayat, H. 2007. *Analisis Zat Warna Terlarang Untuk Makanan Yang beredar di Pasaran*. Majalah Ilmu Kefarmasian, IV, (1) 7-8. Departemen Farmasi FMIPA- Universitas Indonesia Depok.
- [2] BPOM. 2012. *Bahan Tambah Pangan*. Jakarta: Direktorat SPKP, Deputi III, Badan Pengawas Obat dan Makanan.
- [3] Cahyadi, Wisnu. 2009. *Analisis dan aspek kesehatan Bahan Tambah Pangan*. Edisi kedua. Jakarta : Bumi Aksara.
- [4] DepKes RI. 1998. *Pemantauan Nilai Keracunan Makanan*. Jakarta: DepKes Press.
- [5] Hendayana, Sumar. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- [6] Levita, Jutti., Sandra Megantara.,Mutakin.,2012. *Photometric Titration Method to Determine Bromination Of Red and Yellow Dyes in Crackers*. International Journal of Chemistry, Vol.4 No.3
- [7] Merry. 2012. Optimasi pH, Komposisi Serta Laju Alir Fasa Gerak Pada Penentuan Kadar Natrium Benzoat Dan Kalium Sorbat Dalam Bahan Makanan Dengan Teknik HPLC.
- [8] Vachirapatama, Narumol,et al. 2008. Identification and Determination Of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks On Monolithic C18 Column By High Performance Liquid Chromatography. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 16, No. 5, 2008, Pages 77-82
- [9] Weiss, Joachim. 1995. *Ion Chromatography*, 2 ed.
- [10] Zhu Y, Guo Y, Ye M, James FS. 2005. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. J Chromatography A 1085:143 – 146.