PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR SIKLAMAT BERBASIS KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI GUNA DIIMPLEMENTASIKAN DALAM KAJIAN PAPARAN

Budi Wibowotomo

***Abstract**: The aim of this research was to develop a method for determining cyclamate content in foods based on High Performance Liquid Chromatography for exposure assessment of cyclamate. The extraction procedure is conducted by decreasing pH sample until less than 2, and mobile phase is executed by applying the ratio of phosphate buffer-methanol as 75:25, 80:20, 85:15. The results of experiments be obtained colom: ODS RP-18, 5 μm, 250 x 4,6 mm ID; mobile phase: phosphate buffer/KH_2PO_4 pH 4,6 and metanol in a ratio of 85:15; flow rate: 1 ml/min; injection volume: 20 μl; and detector: UV-Vis 200 nm. The indication of extraction showed by parameter distribution ratio $D \approx K_D$ and the extraction efficiency of 83.04–94.92%. The exposure estimated of cyclamate based concentration analysis is about 28.41 mg/kg bw/day (258.27% ADI), where SNI 01-6993-2004 regulates 2.99 mg/kg bw/day (27.21% ADI).*

Abstrak: Tujuan penelitian adalah mengembangkan metode penetapan siklamat berbasis kromatografi cair kinerja tinggi untuk pengukuran konsentrasi siklamat. Prosedur ekstraksi menggunakan modifikasi pH sampel hingga pH lebih kecil 2, dan fase gerak diterapkan perlakuan rasio bufer fosfat–metanol 75 : 25, 80 : 20, dan 85 : 15. Hasil eksperimen diperoleh kolom: ODS RP-18, 5 μm, 250 x 4,6 mm ID; fase gerak: bufer fosfat/KH_2PO_4 pH 4,6 dan metanol rasio 85 : 15; laju aliran: 1 ml/menit; volume injeksi: 20 μl; dan detektor: UV-Vis 200 nm. Indikasi keberhasilan ekstraksi ditunjukkan dengan parameter rasio distribusi $D \approx K_D$ dan efisiensi ekstraksi 83,04–94,92%. Estimasi paparan berdasar konsentrasi analisis langsung sebesar 28,41 mg/kg bb/hari (258,27% ADI), sedang estimasi paparan berbasis SNI 01-6993-2004 sebesar 2,99 mg/kg bb/hari (27,21% ADI).

Kata-kata kunci: siklamat, KCKT, kajian paparan, ekstraksi

Pedoman persyaratan penggunaan Bahan Tambahan Pangan (BTP) pemanis buatan tertuang dalam SNI 01-6993-2004. Seiring dikeluarkannya peraturan tersebut, terdapat kebutuhan akan suatu metode analisis untuk penentuan BTP pemanis buatan pada produk pangan (BSN, 2004).

Budi Wibowotomo adalah Dosen Jurusan Teknologi Industri Fakultas Teknik Universitas Negeri Malang. Kampus: Jl. Semarang 5 Malang 65145

Siklamat merupakan salah satu pemanis buatan yang banyak menimbulkan kontroversi karena aspek keamanan jangka panjangnya (Ofitserova *et al*. 2005). Di Indonesia pemakaian siklamat dilaporkan sering disalahgunakan dan penggunaannya melebihi batas yang diijinkan (Badan POM, 2004). Siklamat dalam bentuk garam Ca- dan Na- siklamat mempunyai kelarutan tinggi dalam air (1 g/4-5 ml), bersifat elektrolit kuat, terionisasi kuat dalam larutan encer, serta mempunyai sedikit kapasitas bufer (Furia, 1980).

Kajian paparan BTP mengkombinasikan data konsumsi pangan yang mengandung BTP, dengan data tingkat penggunaan BTP dalam pangan. Hasil estimasi kemudian dibandingkan dengan *health reference* yaitu *ADI* (*Acceptable Daily Intake*). Untuk siklamat mempunyai nilai *ADI* 11 mg/kg bb/hari. Secara umum, persamaan kajian paparan adalah (JECFA, 2001): **Paparan = (Konsumsi Pangan × Konsentrasi BTP)/kg bb**.

Data konsentrasi dapat diperoleh melalui metode *TDS* (*Total Diet Study*), yaitu metode yang memprediksi paparan bahan kimia/BTP melalui analisis langsung konsentrasi bahan kimia pada pangan yang dikonsumsi (*as consumed level*) oleh suatu populasi (Badan POM, 2005). Penggunaan metode *TDS* dapat menghasilkan perkiraan paparan yang lebih mendekati nyata karena *uncertainty* yang rendah.

Di antara beberapa metode penetapan siklamat yang telah dilakukan seperti gravimetri, spektrofotometri, amperometri, TLC, HPLC, GC; HPLC atau KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) merupakan metode yang banyak dikembangkan. Hal ini disebabkan kemampuannya memisahkan analit target pada matriks pangan dengan penggunaan fase gerak dan fase stationer yang optimum (*Choi et al*. 2000). Beberapa keuntungan KCKT dibanding GC, misalnya adalah senyawa yang dianalisis tidak harus bersifat volatil serta dapat dilakukan tanpa pembuatan senyawa turunan (derivatisasi) (Gritter *et al*. 1991).

Sejumlah riset aplikasi KCKT untuk penetapan siklamat pada matriks pangan, mendasarkan pada dua prinsip yaitu derivatisasi menjadi *cyclohexylamine* (Hauck & Kobler, 1990; Ruter & Raczek, 1992); serta reaksi dengan reagen pewarna (Choi *et al*. 2000). Metode derivatisasi memiliki kendala dalam hal pereaksi yang spesifik dan terbatas, sedangkan penggunaan reagen pewarna berpotensi merusak kolom kromatografi (Swadesh, 2001).

Dalam kromatografi cair, sebagai bagian dari prosedur *sample cleanup* dapat diterapkan proses ekstraksi, salah satunya adalah *solvent extraction* (Snyder & Kirkland, 1999). Aplikasi *solvent extraction* yang umumnya menggunakan pelarut organik sebagai pengekstrak pada ekstraksi siklamat (asam, larut air) memerlukan perlakuan modifikasi untuk mencegah pengionan siklamat sehingga siklamat dapat terekstrak ke fase organik (Nur & Adijuwana, 1989; Handley, 1991).

Berdasarkan beberapa pertimbangan tersebut, maka dilakukan penelitian yang bertujuan mengembangkan metode penetapan siklamat berbasis KCKT, untuk pengukuran secara langsung konsentrasi siklamat pada pangan. Hasil penetapan kemudian digunakan sebagai data konsentrasi dalam kajian paparan yang dilakukan dengan metode TDS.

METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, IPB; Badan POM RI di Jakarta, dan Balai Besar POM Surabaya.

Bahan penelitian terdiri dari *food model*, standar siklamat, Na-siklamat, eter, H_2SO_4 10%, NaCl jenuh, kertas pH, air destilata, metanol, dan bufer fosfat KH_2PO_4 pH 4.6. Digunakan juga data sekunder hasil Survei Konsumsi Pangan Badan POM RI di Surabaya serta sampel

pangan hasil survei konsumsi. Alat-alat meliputi peralatan gelas (beker *glass*, gelas piala, pipet, labu takar, corong), corong pemisah, neraca analitik, blender/ mortar, kertas saring Whatman No. 4, membran *millipore* 0.45 µm, *ultrasonic bath*, tabung vial, serta seperangkat instrumen KCKT.

Penelitian ini terdiri dari dua kegiatan yaitu pengembangan metode penetapan siklamat dan kajian paparan siklamat. Pengembangan metode penetapan siklamat meliputi pengembangan metode ekstraksi dan pengembangan fase gerak KCKT. Prosedur KCKT menggunakan mode fase terbalik, dengan spesifikasi: a) kolom: ODS RP-18, partikel 5 µm, dimensi 250 mm × 4.6 mm ID; b) fase gerak: bufer fosfat/KH_2PO_4 pH 4.6 dan metanol; c) laju aliran: 1 ml/menit; d) tekanan: 75–78 kgf/cm^3; e) LC mode: *low pressure*, tipe isokratik; f) detektor: UV-Vis 200 nm, suhu oven 40°C; dan g) volume injeksi: 20 µl. Fase gerak pada kromatografi fasa terbalik lebih polar dari fase diam, sehingga untuk menghasilkan pemisahan siklamat (polar) yang optimal dilakukan dengan mengatur kepolaran eluen. Perlakuan rasio fase gerak yang diterapkan adalah bufer fosfat : metanol = 75 : 25, 80 : 20, 85 : 15. Percobaan optimasi dilakukan menggunakan standar siklamat. Parameter yang diamati adalah waktu retensi (t_r) dan daya pisah/resolusi (R).

Prosedur ekstraksi dilakukan dengan metode *solvent extraction* menggunakan eter sebagai pengekstrak. Teknik modifikasi yang ditempuh yaitu mengatur keasaman larutan sampel (pH < 2) dengan penambahan H_2SO_4 10%. Sebagai sampel digunakan 3 macam *food model* (minuman ringan, puding/agar, roti) yang difortifikasi dengan Na-siklamat dalam jumlah tertentu.

Ditimbang 20–25 g sampel, dimasukkan gelas piala 100 ml, ditambah ± 50 ml air dan diaduk hingga homogen [Vo]. Ditambah 5–10 ml H_2SO_4 10% atau hingga pH mencapai 1. Dimasukkan corong pemisah, ditambah 20–25 ml eter kemudian dikocok 20 kali hingga terbentuk 2 lapisan (eter di atas, fase cair di bawah). Pengocokan dapat dibantu dengan *shaker* selama 15 menit. Lapisan eter dipisahkan dari fraksi cairan dan dicuci dengan air 2 × 10 ml, lalu air cucian dikumpulkan dengan fraksi cairan. Ekstraksi diulangi 2 kali, setiap kali dengan 20–25 ml eter. Ekstrak eter hasil tiap kali ekstraksi dikumpulkan pada gelas piala 100 ml, lalu diuapkan fraksi eternya sampai hampir kering. Sisa penguapan dilarutkan dengan pelarut metanol dan ditetapkan hingga tanda tera pada labu takar 50 ml [V_E].

Beberapa indikator yang diamati antara lain:

$[S]_E$, $[S]_O$	: konsentrasi siklamat (ditentukan dengan KCKT) (E = fase organik, O = fase cairan)
$[V]_E$, $[V]_O$	: volume (*E* = pengekstrak, *O* = awal)
$[H^+]$	: $10^{-\log pH}$
K_D (koefisien distribusi)	: $[S]_E$ / $[S]_O$
D (rasio distribusi)	: K_D /{1+(K_a/$[H^+]$)}
%*E* (persen terekstrak)	: ($[S]_E$ V_E / ($[S]_E$ V_E + $[S]_O$ V_O)) x 100

Data konsumsi berdasarkan hasil Survei Konsumsi Pangan (SKP) Badan POM terhadap 716 responden anak sekolah dasar dari 31 SD di wilayah Surabaya tahun 2006. Untuk data konsentrasi, hasil pengembangan metode diimplementasikan pada sejumlah sampel pangan hasil survei. Langkah-langkah kajian paparan sebagai berikut.

Pengolahan data survei meliputi: tabulasi dan kompilasi, penyusunan *food list*,

daftar konsumsi pangan, *shopping list*, dan *food sampling*. Hasil analisis data survei adalah informasi jumlah konsumsi (kg/hari) dan macam pangan yang dikonsumsi.

Uji kualitatif dilakukan dengan KCKT. Sampel positif jika menghasilkan puncak dengan waktu retensi di sekitar waktu retensi larutan standar (Wasik & Buchgraber, 2007). Ditentukan pula *LOD* (*Limit of Detection*) instrumen.

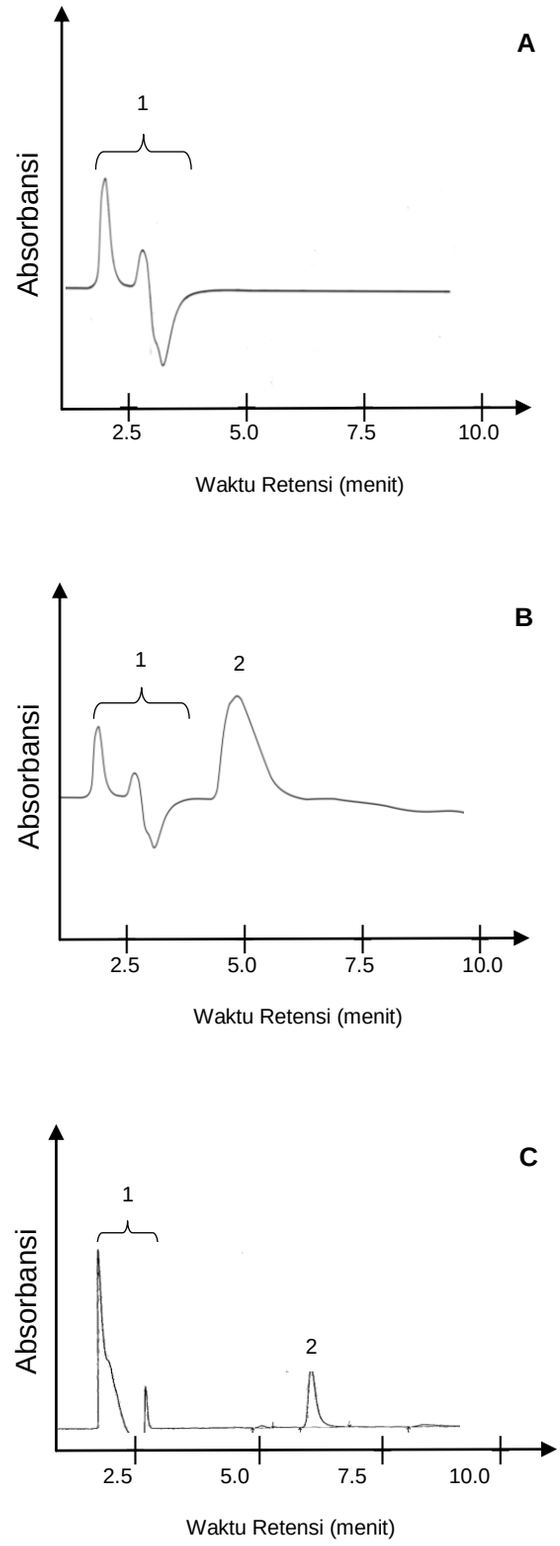
Uji kuantitatif dilakukan hanya terhadap sampel yang positif siklamat. Perhitungan konsentrasi dengan cara mengintegrasikan *peak area* sampel pada kurva kalibrasi standar. Dilakukan pula penentuan *LOQ* (*Limit of Quantification*).

HASIL

Optimasi Fase Gerak KCKT

Hasil pemisahan pada kromatografi umumnya ditunjukkan dengan kromatogram, yang menampilkan puncak/*peak* dari komponen. Kesempurnaan *peak* dilihat dari bentuknya yang menyerupai bentuk kurva Gauss (kurva normal) (Johnson & Stevenson, 1991). Pada Gambar 1A terlihat bahwa penggunaan komposisi fase gerak bufer fosfat–metanol (75 : 25) belum dapat memunculkan *peak* siklamat, sedangkan pada rasio bufer fosfat–metanol (80 : 20) sudah mulai terbentuk puncak tapi belum sempurna (Gambar 1B). Pembentukan puncak yang optimal terjadi pada komposisi fase gerak bufer fosfat–metanol (85 : 15) (Gambar 1C).

Dalam analisis komponen dengan KCKT, parameter yang umum diamati adalah waktu retensi. Waktu retensi (t_r) merupakan waktu yang diperlukan oleh suatu komponen setelah diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi hingga komponen tersebut mencapai detektor (Harris, 1999). Dalam uji kualitatif/identifikasi, waktu retensi merupakan identitas yang menunjukkan adanya komponen dalam campuran (Johnson & Stevenson, 1991).



Gambar 1. Kromatogram Standar Siklamat pada Berbagai Komposisi Fase Gerak Bufer Fosfat–metanol (1 = *peak* injeksi, 2 = *peak* siklamat)

Akan tetapi dalam penentuan kriteria pemisahan dan puncak kromatogram umumnya ditunjukkan dengan parameter faktor kapasitas (k').

Kriteria pemisahan yang baik yaitu bila menghasilkan nilai k' berkisar 0.5–20.0. Hasil uji kualitatif siklamat pada sampel model pangan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Waktu Retensi dan Resolusi *Food Model*

Model Pangan	Waktu Retensi (t_R) (menit)	Resolusi (R)	Faktor Kapasitas (k')[a]
Minuman Ringan	7.081	3.974	3.05
Puding/Agar	7.055	6.378	3.03
Roti	7.031	4.168	3.02

[a] $k' = (t_R - t_m) / t_m$ *

* t_m (metanol) ≈ 1.75

Parameter resolusi dari ketiga model pangan juga menunjukkan hasil yang sangat baik (R > 3). Resolusi atau daya pisah merupakan ukuran kemampuan instrumen untuk menunjukkan dua puncak yang terpisah dari dua komponen yang berbeda (Johnson & Stevenson, 1991). Kriteria yang umum adalah: jika daya pisah 0.4 atau kurang, puncak tidak menunjukkan pemisahan komponen. Jika daya pisah 0.5 atau lebih, pemisahan komponen dapat diidentifikasi dengan jelas. Pada umumnya diperlukan daya pisah sekitar 1.0 untuk melihat pemisahan yang jelas dari dua komponen.

Modifikasi Ekstraksi

Percobaan pengembangan metode ekstraksi dilakukan pada model pangan sebelum diterapkan pada produk pangan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas metode yang dikembangkan. Model pangan adalah pangan contoh yang sengaja dibuat dan ditambahkan dengan siklamat konsentrasi tertentu.

Parameter keberhasilan ekstraksi adalah koefisien distribusi (K_D) dan rasio distribusi (nilai D). Nilai K_D menunjukkan kecenderungan senyawa siklamat untuk terdistribusi ke dalam fase organik; sedangkan D merupakan ukuran perbandingan distribusi siklamat dalam fase cairan dan fase organik. Besaran nilai D yang mendekati K_D ($D \approx K_D$) mengindikasikan bahwa dalam proses ekstraksi terjadi perpindahan/distribusi hampir semua molekul/bentuk siklamat dari fase cairan ke dalam fase organik.

Efektivitas atau efisiensi ekstraksi juga dapat ditentukan dengan melihat tingkat penemuan kembali atau persen terekstrak (%*E*), yaitu perbandingan konsentrasi siklamat hasil analisis dengan konsentrasi siklamat awal (Prasetyaningtias, 2003). Kriteria (%*E*) adalah 95–105% untuk analit sejumlah 1,000 mg/kg (Swartz & Krull, 1997). Ringkasan pengamatan terhadap parameter ekstraksi disajikan pada Tabel 2.

Konsentrasi Siklamat pada Sampel Pangan Anak Sekolah

Hasil pengukuran siklamat pada sampel komposit (Tabel 3) menunjukkan kisaran konsentrasi antara 5.06 mg/kg untuk komposit Kudapan Ketan hingga 8882.71 mg/kg untuk komposit Minuman Santan dengan *LOD* 2.75 mg/kg dan *LOQ* 9.17 mg/kg. Nilai konsentrasi diperoleh setelah memperhitungkan dengan %*E* sesuai hasil Pengembangan Metode. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan laporan penelitian lain pengukuran siklamat pada sampel pangan dengan KCKT yang menunjukkan %*recovery* berkisar 88–101% dan LOD antara 0.4–5.0 mg/kg (Hauck & Kobler, 1990; Ruter & Raczek, 1992; Li & Yin, 1999; Choi *et al*., 2000).

Estimasi Paparan Siklamat

Perhitungan tingkat paparan melibatkan dua data utama yaitu data konsumsi dan data konsentrasi bahan kimia. Estima-

Tabel 2. Pengamatan Efisiensi Ekstraksi

Parameter	Minuman Ringan	Puding /Agar	Roti
$[S]_{FM}$ (konsentrasi siklamat pada *food model*) (mg/kg)	1004,00	1600,00	2016,80
$[S]_E$ (mg/kg) / (mg/l)	953.00	1328.68	1823.96
$[S]_O = [S]_{FM} - [S]_E$	51.00	271.32	192.00
pH larutan sampel		pH ≈ 1	
$[H^+]$ siklamat [1]	2.803×10^{-5}	3.546×10^{-5}	3.981×10^{-5}
K_D [2]	18.69	4.89	9.50
K_a (asam siklamat) (konstanta)		3.162×10^{-7}	
D [3]	18.50	4.84	9.41
%*E* [4]	94.92	83.04	90.44

1) Hasil perhitungan
2) $[S]_E / [S]_O$
3) $K_D / \{1+(K_a/[H^+])\}$
4) $\{[S]_E V_E / ([S]_E V_E + [S]_O V_O)\} \times 100$

Tabel 3. Perhitungan Konsentrasi Siklamat pada Sampel Komposit

Komposit	Siklamat Rerata (mg/kg) [a]	Konversi (%Recovery) [b]	Konsentrasi Siklamat (mg/kg) [c]
Komposit Minuman Coklat	1687.21	94.92	1601.50
Komposit Confectionery	92.08	90.44	83.28
Komposit Bakery Istimewa	43.14	90.44	39.01
Komposit Roti Manis	148.01	90.44	133.86
Komposit Minuman Ringan	6830.14	94.92	6483.17
Komposit Kopi, Teh & Minuman Herbal	139.28	94.92	132.21
Komposit Kudapan KETAN	5.60	90.44	5.06
Komposit Kudapan BERAS	41.46	90.44	37.50
Komposit Kudapan BUAH	197.84	83.04	164.28
Komposit Minuman Santan	10696.91	83.04	8882.71
Madu	17.88	83.04	14.85

a) Berdasarkan pengukuran dengan prosedur dan instrumen sesuai hasil pengembangan metode
b) %*Recovery* = %*E* (Tabel 2 baris terbawah)
c) (kadar siklamat × konversi) / 100

masi paparan siklamat ditentukan dari perkalian rerata konsumsi pangan yang mengandung siklamat dengan konsentrasi rerata siklamat dalam setiap jenis pangan, kemudian dibagi rerata berat badan responden. Hasil perkiraan paparan tersebut kemudian dibandingkan dengan nilai ADI siklamat.

Selanjutnya dilakukan juga estimasi paparan siklamat menggunakan konsentrasi maksimum siklamat yang diijinkan berdasar SK Kepala Badan POM No: HK.00.05.5.1.4547/2004. Perhitungan estimasi paparan dengan konsentrasi maksimum sesuai standar ini berguna sebagai acuan batas aman paparan siklamat sebagai bahan tambahan pangan. Suatu bahan tambahan pangan dianggap aman apabila penggunaan secara intensif menghasilkan asupan total kurang dari atau sama dengan ADI (Sparringa *et al*. 2004).

Hasil penelitian menunjukkan total perkiraan paparan siklamat pada anak sekolah dasar (usia 6–12 tahun) di Surabaya

diperoleh sebesar 28.41 mg/kg bb/hari (258.27% ADI). Adapun perkiraan paparan siklamat menggunakan acuan standar Badan POM diperoleh nilai 2.99 mg/kg bb/hari (27.21% ADI). Hasil kajian paparan siklamat di beberapa negara menunjukkan paparan pengkonsumsi tinggi siklamat (persentil 90-an) anak usia 0–12 tahun di Swedia mencapai 317% ADI (Ilback et al., 2003). Sementara di Australia, rerata paparan siklamat dan paparan pengkonsumsi tinggi siklamat (persentil 95^{th}) anak usia 2–11 tahun adalah 50% dan 200% ADI; sedangkan paparan pengkonsumsi tinggi siklamat (persentil 95^{th}) kelompok usia 12–17 tahun mencapai 245% ADI (FSANZ, 2004).

PEMBAHASAN

Elusi siklamat optimal dihasilkan oleh pengurangan fraksi metanol yang mengakibatkan penurunan kepolaran sistem fase gerak. Dalam sistem kromatografi fase terbalik, daya elusi (*eluent strength*) berbanding terbalik dengan kepolaran fase gerak. Semakin lemah kepolaran eluen/ fase gerak, semakin besar *eluent strength* (Harris, 1999). Adanya bufer diperkirakan juga membantu daya hidrofobik sistem dengan cara menekan ionisasi (Johnson & Stevenson, 1991).

Sistem kromatografi fase balik cukup baik digunakan untuk pemisahan molekul netral berberat molekul rendah atau senyawa organik bermuatan (Harris, 1999). Kemudahan pengoperasian sistem kromatografi ini terletak pada lemahnya energi permukaan dari fase terikat sehingga kekuatan tarik menarik antara molekul solut, fase diam, dan fase gerak juga lemah (Krstulovic & Brown, 1982). Karakteristik solut pada sistem kromatografi fase balik dapat meliputi solut hidrofobik maupun polar. Hal ini memungkinkan untuk analisa sejumlah besar substansi dengan beragam polaritas dan berat molekul.

Di samping keunggulan tersebut, kolom kromatografi fase balik juga mempunyai keterbatasan, di antaranya kisaran pH yang luas untuk stabilitas yaitu 2.0–7.5 (Johnson & Stevenson, 1991). Jika digunakan eluen dengan pH sangat rendah dapat merusak ikatan Si-C, sementara penggunaan solven sangat basa (pH > 8) dapat memicu disolusi matriks silika. Oleh karena itu dalam susunan fase gerak umumnya digunakan larutan bufer/penyangga.

Penentuan kriteria puncak kromatogram lebih ditunjukkan dengan parameter faktor kapasitas $(k') = (t_r - t_m)/t_m$; dimana t_m adalah waktu retensi komponen yang tidak ditahan (Harris, 1999). Contoh sampel minuman ringan, t_r = 7.0 dan t_m (dianggap pelarut metanol) ≈ 1.75, maka k' = 3. Hasil optimasi sistem KCKT disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Optimasi Sistem KCKT

Parameter	Hasil	Kriteria*
k'	k' ≈ 3	$0.5 \leq k' \leq 20$
Resolusi (R)	$R \geq 2$	$R \geq 2$
Tekanan (P)	1064 lb/in^2	$P \leq 2000$ lb/in^2
Faktor asimetrik	memenuhi syarat	$0.9 \leq$ f.asym ≤ 1.5

* Harris, 1999

Dalam *solvent extraction*, tingkat ekstraksi maksimum dapat dicapai dengan pelarut yang mempunyai polaritas (P') serupa dengan P' komponen (Snyder & Kirkland, 1999). Jadi untuk komponen nonpolar dapat digunakan heksan, toluen, eter; sedangkan komponen lebih polar umumnya menggunakan aseton, asetonitril, atau metanol. Dalam penelitian ini, prosedur ekstraksi cair pada siklamat menggunakan pelarut nonpolar yaitu eter. Hal ini dapat dilakukan dengan menerapkan langkah modifikasi pengaturan pH sehingga siklamat dapat terekstrak ke fase organik.

Dalam proses ekstraksi, distribusi solut di antara dua fase dinyatakan dengan

suatu konstanta yang disebut koefisien distribusi (K_D):

$$K_D = [S]_E / [S]_O \text{ atau}$$

$$K_D = [HS]_E / [HS]_O$$

Sedangkan dalam ekstraksi suatu asam lemah HS, misalnya siklamat, yang mempunyai konstanta disosiasi:

$$K_a = [H^+]_O [S^-]_O / [HS]_O$$

distribusi solut didefinisikan sebagai rasio distribusi (D):

$$D = \frac{[HS]_E}{[HS]_O + [S-]_O}$$

substitusi K_D dan K_a ke persamaan D, diperoleh hubungan K_D dan D:

$$D = K_D / (1 + (K_a/[H^+]_o))$$

Persamaan di atas menunjukkan pada pH rendah/$[H^+]$ tinggi, nilai D mendekati K_D, yang berarti sebagian besar asam terdapat dalam lapisan organik. Adapun pada pH tinggi/$[H^+]$ rendah, nilai D cenderung kecil sehingga sebagian besar asam terdapat dalam lapisan air (Nur & Adijuwana, 1989; Handley, 1991). Di dalam fase organik, solut asam lemah mengalami polimerisasi. Hal ini dapat terjadi dengan memodifikasi kondisi pH larutan kurang dari 2 (Peters *et al*., 1974), sehingga asam dalam fase cair tidak terdisosiasi. Data efisiensi ekstraksi (Tabel 3) memperlihatkan bahwa nilai D ≈ K_D yang mengindikasikan bahwa sebagian besar siklamat terdistribusi ke dalam fase organik.

Untuk parameter persen terekstrak (%*E*) atau %*recovery* terlihat bahwa efisiensi ekstraksi puding/agar paling rendah dan kurang memenuhi kriteria (95–105%). Ini berarti proses *solvent extraction* masih kurang optimal diterapkan pada pangan jenis puding/agar. Kadar penemuan kembali dapat ditingkatkan dengan penggunaan volume pelarut yang lebih besar, atau dengan penerapan teknik *succesive/continuous extraction* (Harris, 1999). Akan tetapi bila dibandingkan hasil penelitian lain, efisiensi ekstraksi yang diperoleh sudah cukup memadai. Breithaupt (2004), yang mengekstrak karotenoid secara ekstraksi cair-cair menghasilkan tingkat penemuan kembali 94–100%. Roch *et al*. (1995), pada ekstraksi aflatoksin dari kacang tanah dengan metode ekstraksi cair-cair memperoleh tingkat penemuan kembali berkisar 74.1–82.1%. Adapun Hanine *et al*. (1995) yang mengekstrak *acotinic acid* dari industri gula menggunakan ekstraksi cair-cair menghasilkan tingkat penemuan kembali lebih dari 98%.

Nilai %*E* puding/agar (sistem pangan ½ padat) lebih kecil dibanding roti (sistem pangan padat). Berdasar kompleksitas sistem matriks pangan, jika dilakukan proses pemisahan/ekstraksi, kemungkinan lebih mudah atau lebih besar hasilnya pada minuman ringan, diikuti puding/agar, lalu roti. Adanya perbedaan hasil ini diipengaruhi oleh faktor aktivitas air (a_w), *net electrical charge*, serta interaksi kimia komponen dengan *food constituent* lain (Dickinson & Stainsby, 1982; Sikorsky, 2002).

Data Konsumsi

Data konsentrasi pada kajian paparan umumnya dinyatakan berdasar analisis terhadap sampel komposit dengan pertimbangan meminimalkan jumlah sampel yang dianalisis (*WHO*, 1985). Penggunaan sampel komposit mempunyai keuntungan dalam hal kemampuannya menentukan perkiraan asupan hanya dengan menganalisis sejumlah kecil sampel. Adapun kelemahan mendasar pada pengkompositan adalah *dilution efect*, yaitu pangan dengan kandungan siklamat tinggi konsentrasinya menjadi lebih kecil manakala dicampur dengan pangan dengan kandungan siklamat rendah. Ini karena terdapat faktor pengenceran.

Kendala lain dari proses pengkompositan adalah data yang diperoleh dari suatu set sampel dibatasi hanya untuk

memperhitungkan asupan dari segmen populasi yang diwakili oleh sampel tersebut. Dalam kasus kajian paparan ini, model pengkompositan pangan anak sekolah dasar di Surabaya hanya dapat digunakan untuk memperkirakan paparan pada populasi tersebut yaitu kelompok anak-anak usia 6–12 tahun.

Pengukuran siklamat pada sampel komposit (Tabel 3) yang menunjukkan kisaran konsentrasi 5.06 hingga 8882.71 mg/kg dengan limit deteksi (LOD) 2.75 mg/kg dan limit kuantifikasi (LOQ) 9.17 mg/kg, memperlihatkan penggunaan metode hasil pengembangan dapat menghasilkan pengukuran kadar siklamat produk pangan dalam kisaran konsentrasi luas dan kadar yang rendah. Dihubungkan dengan standar pemanis buatan berdasar SK Kepala Badan POM No. HK.00.05.0.1.4547/2004 yang mengatur maksimum penggunaan siklamat pada produk pangan berkisar 250–3,000 mg/kg, adanya metode kuantifikasi ini dapat dimanfaatkan dalam monitoring penggunaan siklamat sesuai standar tersebut.

Penetapan perkiraan paparan yang menerapkan pengukuran langsung konsentrasi siklamat pada pangan yang dikonsumsi menunjukkan estimasi paparan pada anak sekolah dasar (usia 6–12 tahun) di Surabaya diperoleh sebesar 28.41 mg/kg bb/hari yang melebihi ADI (258.27% ADI) (Tabel 5).

Di Indonesia, kebutuhan uji langsung konsentrasi BTP pada sampel pangan menjadi penting, mengingat sering terjadinya penyimpangan terhadap batas penggunaan BTP (dalam hal ini siklamat). Adanya penyalahgunaan dapat menyebabkan interpretasi yang berbeda terhadap estimasi paparan, jika perhitungan paparan menggunakan acuan berdasar standar. Ini dibuktikan dengan perkiraan paparan siklamat berdasar SK Kepala Badan POM No. HK.00.05.0.1. 4547/2004, diperoleh tingkat paparan yang aman/di bawah ADI yaitu 2.99 mg/kg bb/hari (27.21% ADI).

SIMPULAN DAN SARAN

Kondisi optimal KCKT fase terbalik untuk penetapan siklamat adalah kolom ODS RP-18, partikel 5 μm, dimensi 250 mm × 4.6 mm ID; fase gerak bufer fosfat-metanol rasio 85:15; laju aliran 1 ml/menit; volume injeksi 20 μl; detektor UV-Vis 200 nm. Waktu retensi (t_R) terbentuknya puncak siklamat sekitar 7.0 menit. Parameter k' ≈ 3 dan resolusi (R) 3.9–6.3 menunjukkan kriteria pemisahan yang cukup baik. Penggunaan solven nonpolar (eter) pada proses ekstraksi siklamat dapat dilakukan dengan memodifikasi penambahan larutan H_2SO_4 10% untuk mengatur kondisi larutan sampel menjadi pH 1.

Proses esktraksi terhadap model pangan menunjukkan keberhasilan dengan diperolehnya rasio distribusi (D) minuman ringan, puding/agar, dan roti berturut-turut sebesar 18.50, 4.84, dan 9.41; sedangkan koefisien distribusi (K_D) masing-masing adalah 18.69, 4.89, dan 9.50. Untuk tingkat efisiensi ekstraksi (%*E*) diperoleh minuman ringan 94.92%, puding/agar 83.04%, dan roti 90.47%. Proses ekstraksi masih kurang optimal untuk pangan jenis puding/agar.

Pengukuran kadar siklamat pada sampel komposit menggunakan metode hasil pengembangan menunjukkan kisaran konsentrasi 5.06–8,882.71 mg/kg. Tiga sampel komposit yaitu minuman coklat, minuman ringan, dan minuman santan mempunyai konsentrasi siklamat di atas ambang batas yang diijinkan.

Kebutuhan uji langsung untuk kajian paparan di Indonesia menjadi penting karena dapat menyebabkan perbedaan penetapan tingkat paparan. Perkiraan paparan siklamat pada anak sekolah dasar di Surabaya berdasarkan data konsentrasi analisis langsung menunjukkan hasil 28.41 mg/kg bb/ hari yang melebihi ADI (258.27% ADI); sementara perkiraan paparan siklamat dengan acuan SK Kepala Badan POM No. HK.00.05.0.1.4547/2004

Tabel 5. Estimasi Paparan Siklamat berdasar Analisis Langsung dan MPL

Jenis Komposit	Konsumsi (g/hari) [a]	Estimasi Paparan berdasar Analisis Langsung			Estimasi Paparan berbasis MPL (SNI 01-6993-2004)		
		Konsen-trasi (mg/kg)[b]	Paparan (mg/kg bb/hari)[d]	% ADI [e]	Konsentrasi Maks (mg/kg) [c]	Paparan (mg/kg bb/hari)[d]	% ADI [e]
Komposit MINUMAN COKLAT	10.160	1601.50	0.583	5.302	500	0.182	1.656
Komposit CONFECTIONERY		83.28			500		
1. Permen Lunak	0.0109		0.000	0.000		0.000	0.001
2. Permen Karet	0.0107		0.000	0.000	3000	0.001	0.010
3. Permen Keras	0.0109		0.000	0.000		0.000	0.001
Komposit BAKERI ISTIMEWA		39.01			2000		
- Wafer	0.589		0.001	0.008		0.042	0.384
- Biskuit	0.337		0.000	0.004		0.024	0.220
- Donat	0.965		0.001	0.012		0.069	0.629
Komposit ROTI MANIS	7.818	133.86	0.038	0.341	2000	0.560	5.095
Komposit MINUMAN RINGAN		6483.17			1000		
1. Sari Buah	3.172		0.737	6.701		0.114	1.033
2. Minuman Isotonik	5.259		1.222	11.110		0.188	1.713
3. Minuman Karbonasi	7.277		1.691	15.372		0.261	2.371
4. Sirup	0.532		0.124	1.124		0.019	0.173
5. Minuman Serbuk	2.889		0.671	6.103		0.104	0.941
Komposit KOPI & TEH		132.21			-		
1. Teh dalam Kemasan	39.108		0.185	1.685		0.000	0.000
2. Kopi Bubuk	4.080		0.019	0.176		0.000	0.000
KUDAPAN KETAN (Bakpia)	1.893	5.06	0.000	0.004	1600	0.108	0.987
KUDAPAN BERAS		37.50			1600		
a. Kue Lapis	6.427		0.009	0.079		0.368	3.351
b. Serabi	1.318		0.002	0.016		0.075	0.687
KUDAPAN BUAH	20.974	164.28	0.137	1.253	250	0.188	1.708
MINUMAN BERSANTAN		8882.71			250		
a. Es Cincau	27.522		8.762	79.658		0.247	2.242
b. Es Dawet	26.586		8.464	76.949		0.238	2.166
c. Es Teler	11.169		3.556	32.327		0.100	0.910
d. Es Puter/Nong-Nong	6.924		2.204	20.040		0.062	0.564
MADU	2.260	14.85	0.001	0.012	500	0.040	0.368
TOTAL	**187.729**	-	**28.410**	**258.275**	-	**2.993**	**27.212**

menghasilkan nilai 2.99 mg/kg bb/hari yang masih di bawah ADI (27.21% ADI).

Berdasarkan simpulan, disarankan perlu dipertimbangkan penerapan metode ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) atau SPE (*Solid Phase Extraction*) untuk mengurangi kebutuhan pelarut (20–25 ml/ekstraksi).

Percobaan pengembangan metode analisis siklamat ini diperluas cakupannya menggunakan model pangan yang lebih beragam seperti pangan berlemak atau berbagai pangan emulsi.

Direkomendasikan untuk melakukan validasi terhadap metode hasil pengembangan, baik secara *intralaboratory* mau-

pun *interlaboratory*, sebelum diimplementasikan sebagai metode standar dalam kajian paparan. Perlu dikembangkan lebih jauh penggunaan metode TDS, sebagai dasar penetapan karakterisasi risiko BTP dan juga untuk evaluasi kebijakan dalam bidang keamanan pangan di Indonesia.

DAFTAR RUJUKAN

Badan POM (Badan Pengawasan Obat dan Makanan) Direktorat Surveilan dan Keamanan Pangan. 2005. *Modul Total Diet Study (TDS)*. Jakarta: Badan POM.

Badan POM (Badan Pengawasan Obat dan Makanan) Direktorat Surveilan dan Keamanan Pangan. 2005. *Surat Keputusan Kepala Badan POM RI No. HK.00.05.0.1.4547 tentang Peraturan Teknis Persyaratan Penggunaan Bahan Tambahan Pangan*. Jakarta: Badan POM.

BSN (Badan Standarisasi Nasional). 2004. *Standar Nasional Indonesia Nomor: 01-6993-2004 tentang Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan*. Jakarta: Deprindag.

Breithaupt, DE. 2004. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chem* 86:449–456.

Choi MMF, Hsu MY, Wong SL. 2000. Determination of cyclamate in low-calorie foods by high-performance liquid chromatography with indirect visible photometry. *Analyst* 125:217–220. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ sites/entrez (3 Sept 2006).

Dickinson E, Stainsby G. 1982. *Colloids in Food*. London: Applied Science Publishers.

Furia TE, editor. 1980. *Handbook of Food Additives*. Ohio: The Chemical Rubber Co.

Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE. 1991. Pengantar Kromatografi. Padmawinata K., penerjemah; Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: *Introduction to Chromatography*.

Handley AJ. 1999. *Extraction Methods in Organic Analysis*. Sheffield: Sheffield Academic Press.

Hanine H, Conte T, Mourgues J. 2005. Recovery of acotinic acid from stimulated aqueous effluents of the sugarcane industry through liquid-liquid extraction. *Biores Tech* 52:33–36.

Harris DC. 1999. *Quantitative Chemical Analysis*. New York:Freeman and Co.

Hauck M, Kobler H. 1990. Determination of cyclamate in complex matrix using HPLC after column derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *Z Lebensm Unters Forsch* 191(4–5): 322-324. (terhubung berkala). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ sites/entrez (3 Sept 2006).

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive). 2001. *Guidelines for the Preparation of Working Paper on Intake of Food Additive*. Geneva: JECFA FAO/WHO.

Johnson EL, Stevenson R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Padmawinata K, penerjemah; Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: *Basic Liquid Chromatography*.

Li Z, Yin Y. 1999. A rapid separation and quantification of sodium cyclamate in food by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Se Pu* 17(3):278-9.

Nur A, Adijuwana H. 1989. *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologis*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi.

Ofitserova M, Nerkar S, Pickering M. 2005. Artificial sulfonamide sweeteners in food products. *Food* & *Bev* Adv. Sup:55. http://www.pickering-labs.com (3 Sept 2006).

Roch OG, Blunden G, Coker RD, Nawaz S. 1995. The validation of a solid phase clean-up procedure for the analysis of

aflatoxins in groundnut cake using HPLC. *Food Chem* 52:93–98.

Ruter J, Raczek DI. 1992. Sensitive and selective HPLC methods with prechromatographic derivatization for the determination of cyclamate in foods. *Z Lebensm Unters Forsch* 194(6):520-523. (terhubung berkala). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ sites/entrez (3 Sept 2006).

Sikorsky ZE. 2002. *Chemical and Functional Properties of Food Components*. 2nd Ed. New York:CRC Press.

Snyder LR, Kirkland JJ, Gladch JL. 1997. *Practical HPLC Method Development*. Ed ke-2. New York: John Wiley and Sons Inc.

Sparringa RA, Kusumaningrum HD, Rahayu WP. 2004. *Aplikasi Kajian Risiko Bahan Tambahan Pangan*. Jakarta: Badan POM.

Swadesh JK. 2001. *HPLC:Practical and Industrial Applications*. Second Ed. Washington:CRC Press.

Wasik A, Buchgraber M. 2007. Foodstuff–Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. Validated method. European Commission, Directorate-General Joint Research Centre, IRMM: Geel, Belgium. http://www.irmm.jrc.be/ html/activities/foodadditives/index.htm (10 Juli 2007).

WHO (World Health Organization). 1985. *Guidelines for The Study of Dietary Intakes of Chemical Contaminants*. Geneva: WHO.

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 Chromatogr A* 1085:143–146.