

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Zat Pewarna**

Zat pewarna merupakan bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada makanan. Aneka jenis pewarna ada yang berupa bubuk, pasta atau cairan. Pewarnaan pada makanan pada dasarnya untuk menarik para konsumen agar menjadi lebih berminat dengan suatu produk yang dijual. Selain itu warna dalam bahan pangan dapat menjadi ukuran terhadap mutu. Warna juga dapat digunakan sebagai indikator kesegaran atau kematangan juga menambahkan apabila suatu produk pangan memiliki nilai gizi yang baik, enak dan tekstur yang sangat baik akan tetapi jika memiliki warna yang tidak sedap dipandang akan memberi kesan bahwa produk pangan tersebut telah menyimpang (Putri and Kasih, 2020).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan No. 033 tahun 2012, keberadaan bahan tambahan dalam pangan memang diizinkan untuk jenis dan batas tertentu. Pewarna sintetis (*food grade*) banyak digunakan untuk berbagai jenis makanan, terutama produk jajanan pasar serta berbagai makanan olahan yang dibuat oleh industri kecil atau industri rumah tangga juga ditemukan pada berbagai jenis makanan yang dibuat oleh industri besar (Tahir, Nardin and S, 2019).

Bahan pewarna yang sering digunakan dalam makanan olahan yaitu pewarna sintetis (buatan) dan pewarna natural (alami). Pewarna sintetis terbuat dari bahan kimia tartrazin untuk warna kuning atau allura *red* untuk warna merah, namun pengusaha yang nakal menggunakan pewarna buatan untuk memberikan warna pada makanan agar mendapatkan keuntungan, produsen sering menggunakan pewarna tekstil untuk makanan. Salah satunya yaitu menggunakan Rhodamin B pewarna tekstil untuk mewarnai terasi, kerupuk dan minuman sirup, sedangkan pewarna tersebut dilarang keras karena bisa menimbulkan kanker dan penyakit lainnya. Pewarna sintetis yang boleh digunakan untuk makanan harus dibatasi penggunaannya, karena pada dasarnya setiap senyawa sintetis yang masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan efek (Hikma, Zainuddin and Lisnawaty, 2021).

## **B. Macam-Macam Zat Pewarna Makanan**

Berdasarkan sumbernya dibagi menjadi dua jenis zat pewarna yang termasuk dalam golongan bahan tambahan makanan, yaitu bahan pewarna alami dan bahan pewarna sintetis (buatan).

### **1. Pewarna alami**

Zat warna alami adalah zat warna yang diperoleh dari alam atau tumbuhan baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tradisional zat warna alami diperoleh dengan ekstraksi atau perebusan tanaman. Dapat menurunkan risiko terjadinya kanker prostat dan kanker payudara. Selain itu juga dapat menurunkan oksidasi LDL dan menurunkan penyakit hati dan juga katarak (Farid *et al.*, 2019).

Banyak warna cemerlang yang dimiliki oleh tanaman dan hewan dapat digunakan sebagai pewarna untuk makanan. Beberapa pewarna alami ikut menyumbangkan nilai nutrisi (karotenoid, riboflavin, dan kobalamin) merupakan bumbu (kunir dan paprika) atau pemberi rasa caramel ke bahan olahannya (Rahmah, 2019).

Pewarna alami lebih aman untuk kesehatan dibandingkan dengan pewarna sintetis. Zat warna alami terdapat pada sayur-sayuran yang sering dikonsumsi, dapat dimanfaatkan untuk mewarnai makanan. Zat warna alami yang terdapat pada sayur-sayuran dapat memberi warna pada makanan yaitu: klorofil (zat hijau daun terdapat pada daun pandan dan daun suji), karotenoid (pigmen warna kuning, merah *orange* terdapat pada kunyit dan wortel), antosianin (warna merah, biru dan ungu terdapat pada buah anggur, ubi ungu dan Bunga rosella (Aji, Trisnawati and Winarno, 2022). Bahan pewarna alami yang diizinkan di Indonesia terdapat dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 033 Tahun 2012 Tentang Bahan Tambahan Pangan yang ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Bahan Tambahan Pangan Pewarna Alami**

No	Nama BTP Pewarna Alami (Natural Color)	INS
1	Kurkumin CI.No 75300 ( <i>Curcumin</i> )	101 (i)
2	Riboflavin ( <i>Riboflavins</i> ):	
	a. Riboflavin (Sintetik) ( <i>Riboflavin Synthetic</i> )	101 (i)
	b. Riboflavin <sup>5'</sup> -Natrium Fosfat Riboflavin <sup>5'</sup> -Phosphate sodium)	101 (i)
3	Karmin dan ekstrak cochineal CI. No. 75470 ( <i>Carmines and cochineal extract</i> ):	
	a. Karmin CI. No 75740 ( <i>Carmines</i> )	120
	b. Ekstrak cochineal No. 75470 ( <i>Cochineal extract</i> )	120
4	Klorofil CI. No 75810 ( <i>Chlorophyll</i> )	140
5	Klorofil dan klorofilin tembaga kompleks sci. No. 75810 ( <i>Chlorophyll and chlorophyllins, copper complexes</i> )	141
6	Karamel I ( <i>Caramel I-plain</i> )	150a
7	Karamel III ammonia proses ( <i>Caramel III-ammonia process</i> )	150c
8	Karamel IV ammonia sulfit proses ( <i>Caramel IV-sulphite ammonia process</i> )	150d
9	Karbon tanaman CI. 77266 ( <i>Vegetable carbon</i> )	153
10	Beta-karoten (sayuran) CI. No. 75130 ( <i>Carotenes, beta(vegetables)</i> )	160a (ii)
11	Ekstrak anato CI. No 75120 (berbasis bixin) ( <i>annatto extracts, bixin based</i> )	160b (ii)
12	Karotenoid ( <i>Carotenoids</i> ):	
	a. Beta-karoten (sintetik) CI. No 40800 (beta Carotenes, synthetic)	160a (i)
	b. Beta-karoten dari <i>Blakeslea trispora</i> (beta Carotenes ( <i>Blakeslea Trispora</i> ))	160a (ii)
	c. Beta-apo-8-Karotenal CI. No 40825 (beta-apo-8- <i>Carotenoidic acid ethyl ester</i> )	160f
13	Merah bit ( <i>Beet red</i> )	162
14	Antosianin ( <i>anthocyanins</i> )	163
15	Titanium dioksida CI. No. 77891 ( <i>titanium dioxide</i> )	171

Sumber: Permenkes Nomor 033 Tahun 2012 Tentang Bahan Tambahan Pangan

## 2. Pewarna Sintetis (buatan)

Pewarna sintetis untuk bahan tambahan pangan yang dibuat secara kimia oleh pabrik industri kimia. Bahan pewarna ini dijual di pasaran dengan tanda khusus pada label atau kemasannya, yaitu tulisan FD&C (*Food, Drugs, Cosmetic*). Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 33 Tahun 2012 menyatakan bahwa Bahan Tambah Pangan (BTP) merupakan bahan yang ditambahkan dalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan. Peraturan tersebut juga menyatakan bahwa rhodamin B merupakan Bahan Tambah Pangan yang dilarang penggunaannya dalam makanan (Mamay and Gunawan, 2018).

Penyalahgunaan zat sintetis yang sering terjadi adalah penggunaan bahan tambahan makanan baik pewarna, penyedap rasa, aroma, antioksidan, pemanis, pengawet dan pengental. Rhodamin B

merupakan salah satu jenis zat aditif yang digunakan sebagai pewarna dalam industri tekstil, namun masyarakat menggunakannya sebagai pewarna makanan. Jenis pewarna sebagai Bahan Tambah Pangan (BTP) yang memberikan kesan warna merah selain 15 jenis pewarna alami terdapat 11 jenis pewarna sintetis yang diizinkan untuk digunakan. Pewarna sintetis yang paling sering digunakan dalam produk snack atau minuman yaitu Karmoisin CI. No. 14620 dapat memberikan warna merah hingga maroon, Merah allura CI. No 16035 memberikan warna merah kekuningan hingga merah *oranye*, Eritrosin CI. No. 45430 dapat memberikan warna merah cherry *pink* (Amelia and Zairinayati, 2021).

Ciri-ciri pangan yang mengandung zat warna sintetis yang dilarang yaitu warnanya cerah mengkilap dan lebih mencolok, terkadang warna terlihat tidak rata, ada gumpalan warna pada produk dan bila dikonsumsi rasanya sedikit lebih pahit. Biasanya produk pangan yang mengandung zat warna sintetis yang dilarang tidak mencantumkan kode, label, merek, atau identitas lengkap lainnya (Adriani and Zarwinda, 2019). Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 33 Tahun 2012 yang mencantumkan daftar pewarna yang diizinkan untuk ditambahkan ke dalam bahan pangan dalam jumlah secukupnya Tabel 2.2.

**Tabel 2. Bahan Pewarna Sintetis yang Diizinkan di Indonesia**

Pewarna	Nomor Indeks Warna (C.I.No.)
Tartrazin ( <i>Tartrazine</i> )	19140
Kuning kuinolin ( <i>Quinoline yellow</i> )	47005
Kuning FCF ( <i>Sunset yellow FCF</i> )	15985
Karmoisin ( <i>carmoisine</i> )	14720
Ponceau 4R (Ponceau 4R)	16255
Eritrosin ( <i>Erythrosine</i> )	45430
Merah Allura (Allura red)	16035
Indigotin ( <i>Indigotine</i> )	73015
Biru berlian FCF ( <i>Brilliant blue FCF</i> )	42090
Hijau FCF ( <i>Fast green FCF</i> )	42053
Coklat HT ( <i>Brown HT</i> )	20285

Sumber: Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 tahun 2012.

Selain itu ada juga bahan pewarna sintetis yang tidak diizinkan. Jenis pewarna makanan yang sering dilarang digunakan dan dilarang oleh BPOM berdasarkan Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Pangan Nomor : 00386/C/SK/II/90 tentang perubahan lampiran Peraturan Menteri Kesehatan Nomor : 239/Menkes/Per/V/85 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya

ditetapkan beberapa bahan pewarna sintetis yang dilarang untuk ditambahkan pada pangan, yaitu Auramin, Ponceau 3R dan Rhodamin B untuk pewarna merah atau orange dan Methanyl *Yellow* untuk pewarna Kuning (Kurniaty and Salamah, 2023). Bahan pewarna sintetis yang tidak diizinkan di Indonesia terdapat dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 239/MenKes/Per/V/85 yang ditunjukkan pada Tabel 3.

**Tabel 3. Bahan Pewarna Sintetis yang Tidak Diizinkan di Indonesia**

<b>Pewarna</b>	<b>Nomor Indeks Warna</b>
Auramine (C.I. <i>Basic Yellow 2</i> )	41000
Alkanet	75520
<i>Butter Yellow</i> (C.I <i>Solvent Yellow 2</i> )	11020
<i>Black 7984</i> ( <i>Food Black 2</i> )	27755
<i>Burn Unber</i> ( <i>Pigment Brown 7</i> )	77491
Chrysoidine (C.I <i>Basic Orange 2</i> )	11270
Chrysoine (C.I <i>Food Yellow 8</i> )	14270
Citrus Red No. 2	12156
<i>Chocolate Brown FB</i> ( <i>Food Brown 2</i> )	-
<i>Fast Red E</i> (C.I <i>Food Red 4</i> )	16045
<i>Fast Yellow AB</i> (C.I <i>Food Yellow 2</i> )	13015
<i>Guinea Green B</i> (C.I <i>Acid Green No. 3</i> )	42085
<i>Indanthrene Blue RS</i> (C.I <i>Food Blue</i> )	69800
<i>Magenta</i> (C.I <i>Basic Violet 14</i> )	42510
<i>Metanil Yellow</i> ( <i>Ext. D&amp;C Yellow No. 1</i> )	13065
<i>Oil Orange SS</i> (C.I <i>Solvent Orange 2</i> )	12100
<i>Oil Orange XO</i> (C.I <i>Solvent Orange 7</i> )	12140
<i>Oil Yellow AB</i> (C.I <i>Solvent Yellow 5</i> )	11380
<i>Oil Yellow OB</i> (C.I <i>Solvent Yellow 6</i> )	11390
<i>Orange G</i> (C.I <i>Food Orange 4</i> )	16230
<i>Orange GGN</i> (C.I <i>Food Orange 2</i> )	15980
<i>Orange RN</i> ( <i>Food Orange 1</i> )	15970
Orchid and Orcein	-
Ponceau 3R ( <i>Acid Red 6</i> )	16155
Ponceau SX (C.I <i>Food Red 1</i> )	14700
<i>Ponceau 6R</i> (C.I <i>Food Red 8</i> )	16290
<i>Rhodamin B</i> (C.I <i>Food Red 15</i> )	45170
<i>Sudan I</i> (C.I <i>Solvent Yellow 14</i> )	12055
<i>Scarlet GN</i> ( <i>Food Red 2</i> )	14815
<i>Violet 6 B</i>	42640

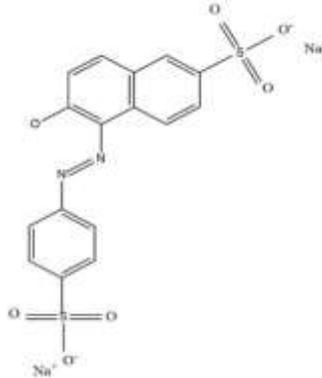
Sumber: Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 239/Menkes/Per/V/85

### C. *Yellow FCF*

*Yellow FCF* atau dengan nama lain *Sunset yellow* merupakan salah satu pewarna yang juga sering digunakan, bahkan penggunaannya sering dikombinasikan dengan pewarna tartrazine. *Sunset yellow* juga merupakan jenis pewarna sintetis yang terdaftar atau diizinkan oleh

Pemerintah digunakan untuk pewarna makanan dan minuman, kosmetik dan obat-obatan.

Pewarna *sunset yellow* ini memiliki sifat – sifat atau karakteristik (monografi) seperti, berbentuk serbuk atau granul, warna *orange*, kelarutan mudah larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol 95%, mudah larut dalam gliserol dan glikol, memiliki berat molekul 534, 37, adapun kegunaan zat pewarna sintetik yang memiliki rumus kimia  $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ .



**Gambar 1. Struktur kimia *Sunset yellow***

*Sunset yellow* sebagian kecil diserap pada saluran pencernaan dan sebagian besar dosis oral diekskresikan melalui tinja. *Sunset yellow* kemungkinan akan dipecah oleh reduksi azo-usus. Urin juga didominasi produk azo-reduksi (sulphanilic asam, asam 1-amino-2-naftol-6-sulfonat, dan bentuk bentuk N-asetilasi) (Kizil *et al.*, 2022).

Beberapa penelitian mencatat adanya kandungan amina aromatik unsulphonated didalam pewarna *Sunset yellow* dengan konsentrasi sampai 100 mg / kg. Meskipun beberapa amina aromatik mungkin terkait dengan genotoxicity atau bahkan carcinogenicity, *sunset yellow* menunjukkan hasil yang negatif pada genotoxicity secara *in vitro* juga seperti dalam studi carcinogenicity jangka panjang. Dapat disimpulkan bahwa potensi genotoxicity *sunset yellow* telah sepenuhnya diteliti baik secara *in vitro* dan *in vivo*, dan tidak ada indikasi adanya potensi genotoksik pada pewarna *sunset yellow* atau metabolitnya (Kizil *et al.*, 2022).

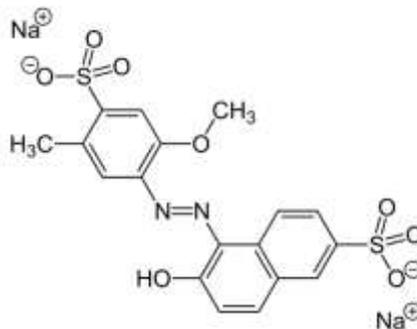
Sebuah penelitian Mc Cann *et al*, melakukan uji pada bahan tambahan makanan menyimpulkan bahwa paparan dalam makanan untuk dua campuran dari empat warna sintetik ditambah pengawet natrium benzoat, Mix A dan Mix B, keduanya mengandung *Sunset*

*yellow* mengakibatkan hiperaktif meningkat pada umur 3 tahun, 8 tahun dan anak-anak yang berusia 9 tahun pada populasi (Balram *et al.*, 2023).

Batas normal pewarna *sunset yellow* yang diizinkan oleh Pemerintah Indonesia berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor : 722/MEN.KES.PER/IX/88 Tentang Bahan Tambahan Makanan adalah 70 µg/mL produk siap dikonsumsi untuk minuman dan makanan cair. Sedangkan berdasarkan WHO adalah ADI 0 – 2,5 mg/kg. Sedangkan LD<sub>50</sub> dari *sunset yellow* 5000mg/kg pada tikus (Ellyke, Riski and Akbar, 2023).

#### D. Allura Red AC

Allura Red AC, juga dikenal sebagai FD&C Red 40, adalah pewarna azo merah yang umum digunakan dalam makanan, kosmetik, dan obat-obatan. Pewarna ini memberikan warna merah cerah pada berbagai produk seperti minuman ringan, saus, dan sirup buah beraroma ceri. Senyawa ini tidak larut dalam minyak dan dapat larut dalam air, glycerol, propylene glycol, dan etanol. Rumus kimia allura Red AC C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>, memiliki berat molekul 496,4 g·mol<sup>-1</sup>. Allura Red AC dianggap aman untuk dikonsumsi dalam jumlah kecil, tetapi terlalu banyak dapat berbahaya bagi kesehatan.



Gambar 2. Struktur kimia Allura Red Ac

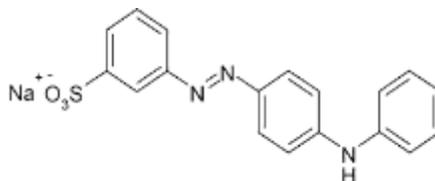
Allura Red AC digunakan dalam berbagai produk, termasuk permen kapas, minuman ringan, produk obat anak-anak, produk susu, serta alat tulis seperti pensil warna dan spidol. Di Amerika Serikat, Allura Red AC disetujui oleh FDA untuk digunakan dalam kosmetik, obat-obatan, dan makanan. Uni Eropa juga menyetujui penggunaan Allura Red AC sebagai pewarna makanan (Li *et al.*, 2020).

Allura *red* AC, pewarna substansi, makanan sintetis dan disetujui sebagai pewarna makanan di Uni Eropa, dan itu tercantum dalam Annex I dari Directive 94/36/EC 12 dari 30 Juni 1994 untuk sejumlah bahan makanan dengan tingkat maksimum diizinkan penggunaan 25-500 mg/kg makanan untuk berbagai bahan makanan. Allura merah AC juga diperbolehkan dalam minuman beralkohol pada tingkat sampai dengan 200 mg/l dan minuman non-alkohol pada tingkat sampai dengan 100 mg/l. Brilian biru berlian FCF (E133) adalah pewarna triarylmethane resmi sebagai zat tambahan makanan di Uni Eropa dan sebelumnya telah dievaluasi oleh *Joint* FAO / WHO *Expert Committee on Food Additives* (JECFA) pada tahun 1970 dan Komite ilmiah Uni Eropa untuk makanan (SCF) pada tahun 1975. Komite telah membentuk ADI bw 12.5 mg/kg/hari. Pada tahun 1984, SCF direvisi ADI bw 10 mg/kg/hari, berdasarkan studi jangka panjang yang baru. (Mehmandoust *et al.*, 2022).

## E. Methanil Yellow

### 1. Struktur Metanil Yellow

Metanil *yellow* mempunyai nama lain tropaeolin G. rumus kimia  $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$  dengan berat molekul 375, 391. Berdasarkan struktur kimianya, metanil yellow dan beberapa pewarna sintetis dikategorikan dalam golongan azo. Namun, metanil *yellow* termasuk pewarna golongan azo yang telah dilarang digunakan pada pangan. Pada umumnya, pewarna sintetis azo bersifat lebih stabil daripada kebanyakan pewarna alami.



Gambar 3. Struktur Kimia Metanil Yellow



Gambar 4. Pewarna Metanil Yellow

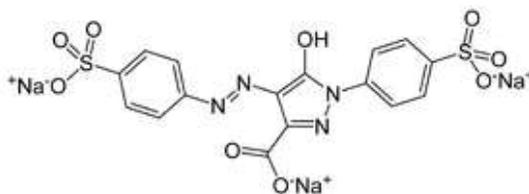
Pewarna azo stabil dalam berbagai rentang pH, stabil pada pemanasan, dan tidak memudar bila terpapar cahaya atau oksigen. Hal tersebut menyebabkan pewarna azo dapat digunakan pada hampir semua jenis pangan. Salah satu kekurangan pewarna azo adalah sifatnya yang tidak larut dalam minyak atau lemak. Hanya bila pewarna azo digabungkan dengan molekul yang bersifat larut lemak atau bila pewarna azo tersebut didispersikan dalam bentuk partikel halus, maka lemak atau minyak dapat terwarnai (BPOM, 2014).

Pewarna metanil *yellow* tidak boleh digunakan sebagai pewarna makanan. Pewarna ini banyak digunakan sebagai pewarna produk, tekstil, kayu, cat lukis, wool, nilon, kulit, kertas, alumunium, detergen, bulu, kayu, dan kosmetik. Akan tetapi, para produsen yang tidak bertanggung jawab telah menyalahgunakan metanil *yellow* sebagai pewarna makanan karena menghasilkan warna kuning cerah dan menarik. Produk yang sering ditambah metanil *yellow* adalah minuman, sirup, pisang goreng, dan manisan buah. Bahan untuk membuat metanil *yellow* adalah dari asam metanilat dan difenilamin (BPOM, 2014).

## F. Tartazine

Tartrazine merupakan jenis pewarna sintetik yang terdaftar atau diizinkan oleh Pemerintah digunakan untuk pewarna makanan dan minuman. Selain untuk makanan dan minuman Tartrazine juga digunakan untuk kosmetik dan obat – obatan (Lansamigi *et al.*, 2021).

Pewarna tartazine memiliki sifat atau karakteristik yang berbentuk serbuk atau tepung dengan warna yang dimilikinya kuning jingga. Tartazine mudah larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol 95%, mudah larut dalam gliserol dan glikol dengan berat molekul : 534, 4. Senyawa pewarna ini memiliki rumus kimia  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$



**Gambar 5. Struktur kimia Tartrazine**

Tartrazine adalah pewarna makanan kuning yang telah digunakan selama bertahun-tahun, namun telah ditemukan dapat menghasilkan reaksi intoleran dalam beberapa individu. Penggunaan tartrazine pada jangka waktu yang lama dapat memberikan efek yang

berbahaya. Reaksi merugikan yang telah dilaporkan termasuk urtikaria (ruam kulit alergi), rhinitis (pilek), asma, purpura (kulit memar keunguan) dan anafilaksis sistemik (Shock). Reaksi samping ini lebih umum pada penderita asma dan orang-orang yang peka terhadap aspirin (Timothy, 2023).

Pewarna kuning tartrazine yang digunakan dalam obat-obatan dan makanan dapat menyebabkan gejala reaksi alergi (urtikaria, rhinitis, atau asma) dapat terjadi setelah paparan bahan kimia yang digunakan untuk warna, bumbu, atau mengawetkan makanan dan obat-obatan, tapi tartrazine (FD & C kuning No 5) adalah warna yang paling sering dicurigai. Intoleransi terhadap tartrazine pertama kali dilaporkan pada tahun 1959, dan bagian dalam induksi dari urtikaria telah diakui sejak tahun 1975. *Non-thrombocytopenic* purpura juga dilaporkan karena hipersensitivitas terhadap tartrazine yang menunjukkan kemungkinan bahwa tartrazine dapat bertindak sebagai haptens yang terikat pada sel endotel pembuluh darah kecil.

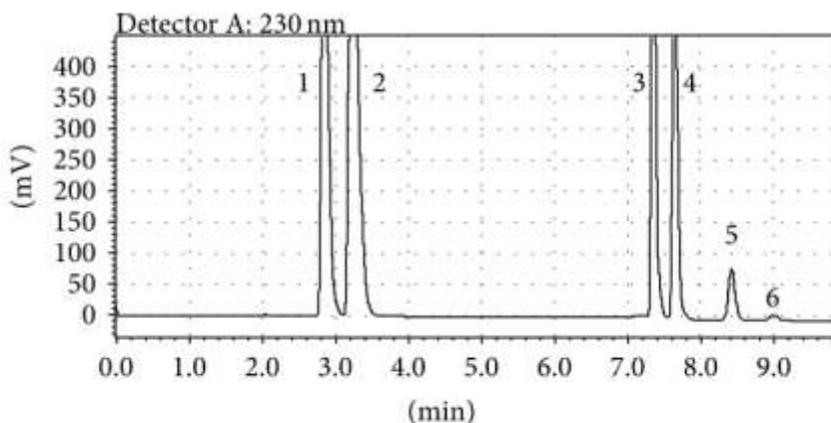
Penyerapan, distribusi, metabolisme dan ekskresi tartrazine telah dipelajari secara ekstensif di hewan dan manusia. Sementara sebagian besar studi selama 40-50 tahun yang lalu dengan teknik dan metode yang digunakan untuk identifikasi senyawa induk dan metabolitnya adalah digunakan untuk menjelaskan dan mengidentifikasi dengan metabolisme sebagian besar dari jalur xenobiotik. Setelah pemberian secara oral dari tartrazine utuh penyerapan pada kisaran dosis yang rendah diabaikan (<5%) dan tartrazine utuh pada saat diekskresikan warnanya tidak berubah dalam urin (Wahyuni, 2013).

Batas normal pewarna tartrazine yang diizinkan oleh Pemerintah Indonesia berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor :722/MEN.KES.PER/IX/88 Tentang Bahan Tambahan Makanan adalah 70 µg/mL produk siap dikonsumsi untuk minuman dan makanan cair (Departemen Kesehatan RI,1988). Sedangkan berdasarkan ADI (Acceptable daily intake) 0 – 7,5 mg/kg berat badan (BPOM Nomor 11 Tahun 2019).

### **G. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)***

Kromatografi adalah suatu teknik analisis berdasarkan proses pemisahan suatu zat atau molekul karena perbedaan sifat. Menurut fase geraknya, kromatografi dibedakan menjadi kromatografi cair dan gas.

Salah satu kromatografi cair yang banyak digunakan di dalam analisis bidang farmasi yaitu kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau lebih dikenal dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknik analisis kromatografi cair yang digunakan baik dalam analisis kualitatif yaitu dalam bentuk pemisahan senyawa maupun dalam analisis kuantitatif yaitu penentuan jumlah senyawa di dalam suatu larutan. Adapun prinsip dari HPLC yaitu suatu sampel berupa larutan diinjeksikan ke dalam kolom yang berisi fase diam dan fase gerak, kemudian diberikan tekanan tinggi sehingga fase gerak dapat mengelusi sampel keluar dari kolom dan terdeteksi oleh detektor yang kemudian dihasilkan kromatogram (Anggraena, 2018).



**Gambar 6. Kromatogram Campuran** (Aşçi, 2016)

Kelebihan dari teknik kromatografi cair kinerja tinggi diantara mempunyai yang tinggi, kolom yang terbuat dari bahan gelas atau stainless steel dan berdiameter kecil yang bisa memberikan hasil pemisahan yang sempurna, proses analisis berlangsung cepat, tekanan yang diberikan oleh fase gerak relatif tinggi, laju alir dapat diatur sesuai kebutuhan (Chiorcea-Paquim, 2022).

Metode kromatografi cair kinerja tinggi, merupakan teknik kromatografi cair kinerja tinggi yang berasal dari kromatografi kolom klasik, dimana teknik kromatografi ini bertambah maju setelah kromatografi cair kinerja tinggi dikemas dengan partikel yang sangat kecil ( $\sim 10\mu\text{m}$ ) dan beroperasi pada tekanan tinggi (Goisser *et al.*, 2020).

Teknik kromatografi cair kinerja tinggi merupakan suatu metode kromatografi cair – cair yang dapat digunakan baik untuk analisis pemisahan maupun analisis secara kuantitatif. Analisis

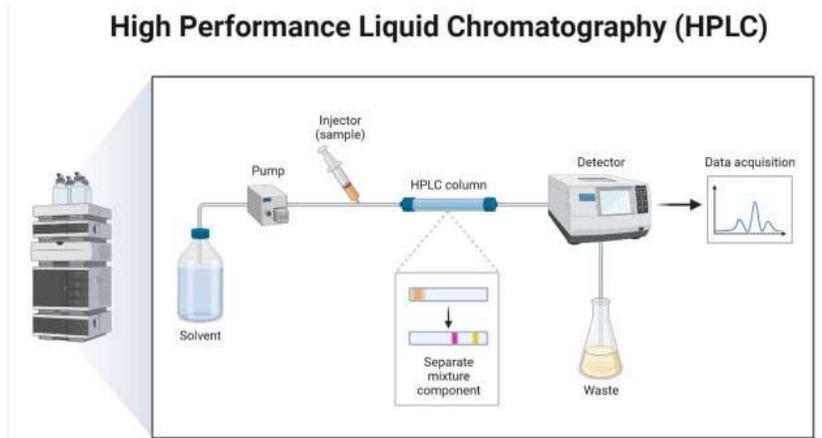
kuantitatif dengan teknik kromatografi cair kinerja tinggi didasarkan pada pengukuran luas area standar. Pada prakteknya, metode perbandingan area standard dan area sampel kurang menghasilkan data yang akurat bila hanya melibatkan suatu konsentrasi standar. Oleh karena itu, dilakukan dengan menggunakan teknik kurva kalibrasi (Matos, 2021).

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan suatu metode yang sensitif dan akurat untuk penentuan kuantitatif serta baik untuk pemisahan senyawa yang tidak mudah menguap seperti asam amino, protein, pestisida, dan lain lain (Safitri *et al.*, 2021). Pemisahan dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional seperti waktu analisis yang cepat, biaya yang rendah, dan kemungkinan untuk menganalisis sampel yang tidak stabil (Khandekar, 2021).

Pada saat ini, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan metode kromatografi cair yang pemakaiannya telah sangat berkembang, baik untuk analisis rutin maupun untuk preparative pada banyak laboratorium. Dibandingkan dengan kromatografi gas, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dioperasikan pada suhu kamar, dimana senyawa yang tidak tahan panas dapat ditentukan dengan mudah dan sifat fase gerak dapat diubah dengan merubah komposisi dari fase gerak digunakan (Weisz, James and Perez-Gonzalez, 2020).

### **1. Instrumentasi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

Instrumentasi HPLC pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detector, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Weisz, James and Perez-Gonzalez, 2020).



**Gambar 7. Instrumentasi HPLC**

## 2. Analisa Kuantitatif dan kualitatif HPLC

Analisis kuantitatif dan kualitatif senyawa dalam sampel cair dapat dilakukan dengan teknik pemisahan High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Dalam kromatografi, tujuan analisis kuantitatif adalah untuk menentukan konsentrasi atau jumlah senyawa tertentu dalam sampel, sedangkan analisis kualitatif bertujuan untuk mengidentifikasi komponen sampel dan memahami komposisi kimianya. Proses pada analisis kuantitatif ini melibatkan beberapa langkah utama seperti berikut:

- a. **Persiapan Sampel:** Sampel harus disiapkan dengan hati-hati, dan konsentrasi yang diperlukan untuk analisis kuantitatif harus diketahui atau diukur dengan tepat.
- b. **Kalibrasi:** Sebuah kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan standar dengan konsentrasi yang sudah diketahui. Standar kalibrasi berfungsi untuk menghubungkan respons detektor dengan konsentrasi senyawa.
- c. **Injeksi Sampel:** Sampel dimasukkan ke dalam sistem HPLC, dan reaksi setiap komponen dicatat oleh detektor.
- d. **Elusi dan Deteksi:** Sampel mengalir melalui kolom HPLC dan masing-masing komponen sesuai dengan waktu retensi. Detektor mengukur respons deteksi, seperti absorbansi sinar matahari, dan kemudian mengirimkan sinyal kepada setiap komponen.
- e. **Kuantifikasi:** Respon detektor sampel dihubungkan dengan konsentrasi yang tepat melalui penggunaan kurva kalibrasi. Response detektor dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi senyawa dalam sampel.

- f. Verifikasi dan Validasi: Hasil kuantitatif divalidasi dan diverifikasi dengan menggunakan parameter seperti presisi, akurasi, batas deteksi, dan batas.

Analisis kualitatif pada HPLC melibatkan beberapa langkah seperti:

- a. Pemisahan Sampel: Setelah sampel dimasukkan ke dalam kromatografi, sampel dibagi menjadi konstituennya sesuai dengan afinitasnya terhadap fase gerak dan fase diam.
- b. Waktu Retensi: Waktu retensi adalah jumlah waktu yang diperlukan oleh setiap komponen untuk terelusi dari kolom kromatografi. Dengan membandingkan durasi retensi sampel dengan standar atau database yang diakui, analisis dapat menemukan bahan kimia yang ada dalam sampel.
- c. Deteksi Spektral: Dalam beberapa kasus, spektrum (absorbansi, rasio massa terhadap muatan, atau inframerah) dapat diperoleh melalui penggunaan detektor seperti spektrofotometer UV-Vis, spektrometer massa, atau spektrometer inframerah. Spektrum ini dapat memberikan informasi tambahan tentang identitas senyawa.
- d. Interpretasi Data Kualitatif: Untuk menemukan dan memastikan keberadaan senyawa atau golongan senyawa tertentu dalam sampel, analisis menggunakan data yang dikumpulkan, yang mencakup informasi spektral, waktu retensi, dan perbandingan dengan senyawa referensi.

### **3. Fase gerak pada HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)**

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur dan secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi tersebut ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen – komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar dibandingkan fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar dibandingkan fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Elusi pada HPLC ada dua cara yakni cara isokratik dan cara gradient. Cara isokratik, komponen fase gerak tetap selama elusi sementara untuk cara gradient komponen fase gerak berubah – ubah selama elusi. Deret eluotropik yang disusun berdasarkan tingkat kepolaran pelarut merupakan panduan yang berguna dalam memilih fase gerak yang akan digunakan pada

penetapan metode dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Nilai pemenggalan UV (*UV cut-off*) merupakan panjang gelombang pada kuvet 1 cm, pelarut akan memberikan absorbansi lebih dari 1,0 satuan absorbansi. Pengetahuan tentang pemenggalan UV ini sangat penting untuk analisis yang menggunakan detector UV-Visible dan fluorometri. Oleh karena itu sangat dianjurkan untuk menggunakan panjang gelombang deteksi yang tidak bertepatan atau disekitar angka pemenggalan UV pelarut yang digunakan sebagai fase gerak (Matos, 2021).

Fase gerak yang digunakan dalam HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) biasanya fase terbalik adalah campuran hidro organik. Senyawa organik yang umumnya digunakan adalah methanol dan asetonitril atau campuran keduanya.

Konsentrasi dari larutan organik dalam fase gerak merupakan faktor dominan yang mempengaruhi retensi analit dalam sistem HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pertimbangan dalam memilih solvent fase gerak meliputi kompatibilitas antar solvent, kelarutan sampel dalam eluen, polaritas, transmisi cahaya, viskositas, stabilitas dan pH. Solvent yang digunakan sebagai fase gerak harus dapat bercampur serta tidak menimbulkan presipitasi saat dicampur. Sampel harus dapat terlarut dalam fase gerak karena apabila tidak, maka dapat terjadi presipitasi di dalam kolom. Transmisi cahaya penting diperhatikan apabila digunakan deteksi UV yang akan menentukan *UV cut off* masing – masing solvent. Solvent yang memiliki nilai *UV cut off* lebih tinggi dibandingkan panjang gelombang sampel yang dianalisis tidak dapat digunakan. Tabel menunjukkan nilai *UV cut off* untuk beberapa solvent yang sering digunakan. Solvent yang terlalu kental menyebabkan bentuk puncak kromatogram yang melebar (Safitri *et al.*, 2021).

**Tabel 4. UV cutoff solvent yang digunakan sebagai fase gerak (Kazakevich dan Lobrutto, 2007).**

Pelarut	UV cutoff
Asetonitril	190
Isopropil alkohol	205
Methanol	205
Ethanol	205
Uninhibit THF	215
Etil asetat	256
DMSO	268

## H. Komponen HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Komponen HPLC terdiri dari beberapa komponen, sebagai berikut:

### 1. Kolom

Kolom merupakan bagian dari HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yang terdapat fase diam didalamnya. Fase diam pada HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) berupa lapisan film cair yang terikat pada basis partikel silika. Tujuan terikatnya lapisan film ini adalah untuk mencegah kemungkinan terjadinya kebocoran cairan fase diam dari kolom. Lapisan film cair ini terikat pada partikel silika melalui ikatan kovalen (Matos, 2021).

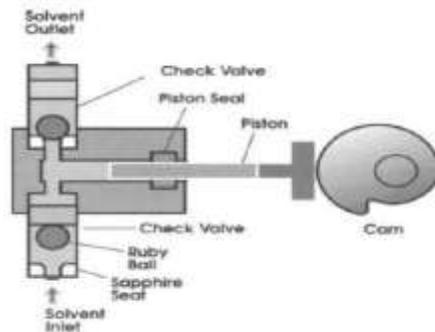
### 2. Injektor

Sampel – sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup Teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kelebihannya akan dikeluarkan ke pembuangan. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak melewati keluk sampel dan menggelontor sampel ke dalam kolom. Presisi penyuntikan dengan keluk sampel ini dapat mencapai nilai RSD 0,1%. Penyuntik ini mudah digunakan untuk otomatisasi dan sering digunakan untuk autosampler pada HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Weisz, James and Perez-Gonzalez, 2020).

### 3. Pompa

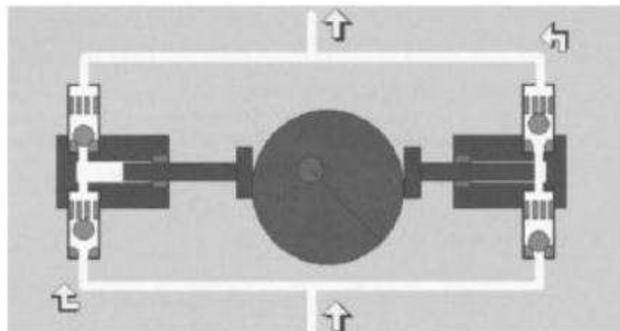
Pompa yang digunakan dalam HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dalam pompa yang memenuhi syarat wadah pelarut, yakni: pompa harus inert terhadap fase gerak. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 3 ml setiap menitnya. Pompa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dapat diklasifikasikan berdasarkan rentang kecepatan alir, mekanisme kerjanya atau berdasarkan metode pencampurannya. Pompa yang biasa digunakan dalam analisis umumnya memiliki rentang kecepatan alir 0,001 sampai 10 mL tiap menitnya. Kebanyakan pompa menggunakan mekanisme resiprok. Sedangkan berdasarkan metode pencampurannya

biasa menggunakan kondisi pencampuran tekanan rendah atau tekanan tinggi (Paquim, 2022).



**Gambar 8. Skema pompa piston resiprok tunggal**

Kebanyakan pompa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) menggunakan desain piston resiprok seperti gambar diatas. Pada gambar dapat dilihat terdapat *cam* bermotor yang dapat menjalankan piston secara depan ke belakang untuk mengalirkan solven melalui suatu vulva *inlet* dan *outlet*.



**Gambar 9. Skema pompa dual piston dengan pompa parallel**

Sedangkan pada gambar diatas merupakan pompa yang menggunakan piston ganda dimana terdapat satu motor yang menjalankan dua piston pada pompa yang berbeda. Hasil yang diperoleh pada pompa model ini lebih stabil (Paquim, 2022).

#### 4. Detektor

Salah satu detector yang sering digunakan adalah detector UV-Visibel. Detector tersebut didasarkan pada penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Visibel) pada kisaran panjang gelombang 190 nm sampai 800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur- struktur atau gugus – gugus kromoforik. Sel detector umumnya berupa tabung dengan diameter 1 mm dan panjang celah optiknya 10 mm, serta diatur sedemikian rupa sehingga mampu

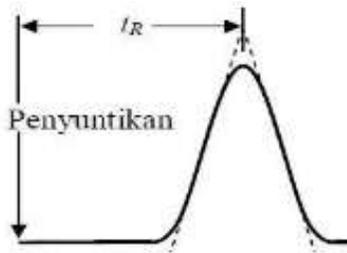
menghilangkan pengaruh indeks bias yang dapat merubah absorbansi yang terukur (Safitri *et al.*, 2021).

### I. Parameter *High Performance Liquid Chromatography*

Optimasi kondisi HPLC dilakukan dengan beberapa parameter yaitu, waktu retensi ( $t_R$ ), faktor kapasitas (K), jumlah plat teoritis (N), Resolusi ( $R_s$ ), Selektivitas ( $\alpha$ ), dan faktor *tailling* (Ft).

#### 1. Waktu Retensi

Waktu retensi, yang dihitung berdasarkan waktu sampel diinjeksi sampai menunjukkan ketinggian puncak maksimum senyawa, adalah waktu yang dibutuhkan senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor (Arbianto *et al.*, 2020).



Gambar 10. Ilustrasi waktu retensi senyawa

#### 2. Faktor Kapasitas

Faktor kapasitas adalah ukuran kemampuan kolom untuk mempertahankan komponen sampel. Faktor kapasitas adalah jumlah waktu yang diperlukan oleh zat terlarut untuk berada dalam fase diam dibandingkan dengan waktu yang diperlukan untuk berada dalam fase gerak. Nilai faktor kapasitas ini dapat ditemukan dengan menggunakan persamaan (Arbianto *et al.*, 2020).

$$k' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Keterangan : K : faktor kapasitas

$T_R$ : waktu tambat suatu senyawa

$t_0$  : waktu tambat hampa

Koefisien partisi (K) menunjukkan rasio mol senyawa dalam fase diam dan fase gerak. Faktor kapasitas, yang berbanding lurus dengan koefisien partisi, dan *volume* fase diam berbanding terbalik dengan *volume* fase gerak atau avoid (Silitonga, 2019).

### 3. Jumlah Plat Teoritis

Jumlah plat teoritis (N) merefleksikan jumlah waktu senyawa berpartisipasi antara dua fase selama melalui kolom dan menggambarkan efisiensi kolom. Jumlah plat teoritis dalam suatu kromatografi dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$N = \frac{41,7 \left( \frac{t_R}{W_{0,1}} \right)^2}{\left( \frac{b}{a} \right) + 1,25}$$

Keterangan : N : Jumlah Plat Teoritis

$t_R$ : Waktu retensi senyawa

$W_{0,1}$  : Lebar dasar puncak pada posisi 10% dari dasar tinggi puncak

$a=b$  : Lebar salah satu sisi kromatogram

### 4. Resolusi

Jarak antara dua puncak pita dibagi dengan luas rata-rata pita adalah resolusi, atau daya pemisahan dua pita yang berdekatan. Nilai resolusi yang lebih besar dari 1,5 menunjukkan bahwa kedua puncak terpisah secara sempurna. Pengembangan metode harus dilakukan sampai resolusi setidaknya 2 (Silitonga, 2019). Resolusi dua senyawa dapat di hitung dengan rumus .

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_2 + W_1)}$$

Keterangan :  $R_s$  : Resolusi dari dua pita

$t_{R1}$  : Waktu retensi senyawa pertama

$t_{R2}$  : Waktu retensi senyawa kedua

$w_1$  : Luas area pita pertama

$w_2$  : Luas area pita kedua

### 5. Selektivitas

Nilai selektivitas, yang dihitung sebagai rasio perbandingan faktor kapasitas dari senyawa yang berbeda, adalah kemampuan HPLC untuk memisahkan berbagai senyawa. Nilai selektivitas harus lebih besar dari 1 untuk pemisahan sempurna. Sifat senyawa dan cara mereka berinteraksi dengan permukaan fase diam dan fase gerak menentukan selektivitas senyawa (Silitonga, 2019). Selektivitas dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

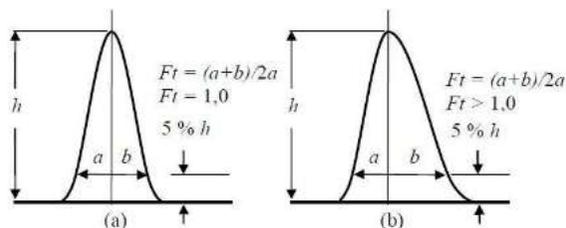
Keterangan :  $\alpha$  : Selektivitas

$K_1$  : Faktor kapasitas senyawa pertama

$K_2$  : Faktor kapasitas senyawa kedua

## 6. Faktor *Tailing*

Faktor *tailing* adalah puncak yang akan dikuantitatifkan, dan dikenal sebagai asimetri (tidak setangkap). Oleh sebab itu, metode yang baik untuk mengontrol sistem kromatografi adalah dengan menghitung asimetrisitas. Resolusi, batas deteksi, dan persisi akan menurun jika puncak asimetri meningkat. Faktor *tailing* dan asimetris dapat digunakan untuk menghitung derajat asimetris puncak. Untuk menghitung faktor *tailing*, lembar puncak ditinggikan 5% menggunakan persamaan yang ditunjukkan pada gambar 10.



Gambar 11. Pengukuran faktor *tailing* : (a)Puncak simetris dan (b)puncak asimetris.

Jika nilai faktor *tailing* berada di luar batas yang diizinkan, yaitu  $0,9 \leq ft \leq 1,2$ , maka kromatogram tersebut normal. Persyaratan umum untuk pemisahan rutin adalah  $ft < 2$ . Puncak utama *tailing* ( $ft > 2$ ) sangat merugikan untuk analisis kuantitatif dan pemisahan (Silitonga, 2019).

## J. Validasi Metode Analisis

### 1. Akurasi

Akurasi adalah analisis yang mengukur tingkat kedekatan antara hasil pengujian dan prosedur yang divalidasi terhadap nilai yang benar. Analisis akurasi ini harus dilakukan untuk mencakup rentang nilai yang tepat. Hal ini dapat dicapai dengan menerapkan prosedur pada analit yang diketahui murni (seperti bahan pembanding) atau dengan membandingkan hasil analisis dengan prosedur lain yang telah ditetapkan sebelumnya (Badan POM, 2014).

Akurasi dapat dihitung sebagai presentase dari penetapan jumlah analit yang ditambahkan dan jumlah yang diketahui ke dalam sampel, atau sebagai selisih antara hasil rata-rata dan hasil benar yang diterima bersama dengan batas (Badan POM, 2014).

Nilai presen perolehan kembali dari berbagai rentang pengujian atau linieritas hubungan antar konsentrasi yang dihitung terhadap konsentrasi sebenarnya adalah beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengevaluasi akurasi. Garis lurus hubungan harus berada di sekitar 1,0 atau mendekati 1,0 (Badan POM, 2014).

## **2. Presisi**

Presisi adalah analisis tingkat kedekatan diantara hasil uji individual dengan metode yang digunakan berulang kali untuk sampel ganda atau homogen. Salah satu cara yang paling umum untuk menunjukkan presisi adalah dengan menggunakan simpangan baku atau simpangan baku *relative* (koefisien variasui) dari satu set pengukuran. Penetapan presisi dilakukan dengan menentukan jumlah larutan sampel homogen yang memadai untuk menghitung secara statistik hasil pengujian dari simpangan baku atau baku *relative* (Badan POM, 2014).

## **3. Spesifitas**

Spesifitas adalah kemampuan untuk menguji analit dengan adanya komponen lain dan memperkirakan ada hasil degradasi dan matriks sampel dikenal sebagai spesifitas. Uji identifikasi dan kemurnian, yang memastikan penetapan akurat (senyawa sejenis dan cemaran organik yang mudah menguap), dapat digunakan untuk mengatasi ketiadaan spesifitas dari prosedur analisis (Badan POM, 2014).

Penetapan spesifitas ini harus menunjukkan kemampuan untuk memilih antara senyawa yang sangat berkaitan dengan strukturnya. Hasil positif didapat dari sampel yang mengandung analit dan dikonfirmasi bahwa hasil positif tersebut tidak didapat dari bahan yang berstruktur atau berdekatan dengan analit. Tidak adanya efek cemaran atau eksipien pada prosedur dapat menunjukkan seberapa efektif penetapan kadar (Badan POM, 2014).

## **4. Linieritas**

Kemampuan untuk menunjukkan hasil uji secara langsung atau melalui tranformasi matematika yang tepat terhadap konsentrasi analit dalam sampel yang diberikan dikenal sebagai linieritas. Linieritas

menunjukkan hubungan linier yang ada antara konsentrasi dan hasil pengukuran pengujian. Untuk mencapai linieritas, hasil pengukuran dapat ditransformasi dalam bentuk logaritma, akar kuadrat, atau resiprokal (Badan POM, 2014).

Penetapan linieritas dapat dihitung dari panjang rentang prosedur analisis, yang digambarkan secara visual sebagai fungsi dari konsentrasi analit antara signal. Hasil uji dapat ditentukan dengan menggunakan teknik statistik jika ada hubungan linier. Perkiraan derajat linieritas seperti koefisien korelasi, perpotongan sumbu y, arag garis regresi, dan jumlah kuadrat seridu regresi yang dapat diterima dapat ditunjukkan dengan bantuan data garis regresi (Badan POM, 2014).

Rentang prosedur divalidasi dengan membuktikan bahwa prosedur analisis memberikan presisi, akurasi dan linieritas yang dapat diterima. Ketika diterapkan pada sampel yang mengandung analit pada konsentrasi ekstrim yang berada pada rentang (Badan POM, 2014).

## **5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

*Limit of Detection* (LOD) merupakan karakteristik uji batas dengan konsentrasi terendah senyawa dalam sampel yang dapat dideteksi. Sedangkan *Limit of Quantitation* (LOQ) adalah karakteristik penetapan kuantitatif pada aras rendah dari senyawa dalam matriks sampel dengan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang ditetapkan dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Nilai LOD dan LOQ dapat divalidasi dengan menganalisis sejumlah sampel dan dihitung secara statistik melalui persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi (Badan POM, 2014).

## **K. Landasan Teori**

Zat pewarna makanan adalah bahan kimia yang ditambahkan ke makanan untuk memberikan warna tertentu. JECFA atau *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* adalah lembaga internasional yang melakukan penilaian risiko keamanan pewarna makanan dan bahan tambahan makanan lainnya. Mereka mengembangkan panduan dan menetapkan batas maksimum untuk penggunaan pewarna makanan yang dianggap aman bagi konsumsi manusia (Alifudin dan Miftakhurrohmat, 2015). Pada mulanya zat warna yang digunakan adalah zat warna alami dari tumbuhan dan hewan. Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi saat

ini, penggunaan zat warna alami semakin berkurang dalam industri pangan yang digantikan lebih banyak oleh zat warna sintetik (Kamilania and Husni, 2023).

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 722/Menkes/Per/IX/88, Bahan Tambahan Makanan (BTM) adalah bahan yang biasanya tidak digunakan sebagai makanan dan biasanya bukan merupakan bahan utama makanan. Bahan ini mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi dan dengan sengaja ditambahkan ke dalam makanan. Bahan Tambahan Makanan antara lain, pengawet, penyedap rasa, anti gumpal, pemucat, dan pengental. Salah satu makanan yang sering ditambahkan BTM adalah makanan dan minuman seperti minuman serbuk, manisan mangga, kembang gula, mie instan, makanan ringan dan tahu kuning.

Pewarna makanan *Yellow FCF*, *Allura*, *Methanil Yellow*, dan *Tartrazine* adalah jenis pewarna makanan yang digunakan untuk memberikan warna dan penampilan visual pada makanan dan minuman. *Yellow FCF* adalah pewarna kuning yang sering digunakan dalam minuman berkarbonasi dan makanan pencuci mulut. *Allura* adalah pewarna merah yang umumnya digunakan dalam produk seperti permen dan minuman. *Methanil*, juga dikenal sebagai *Methyl Tartrazine* adalah pewarna kuning atau oranye yang umumnya digunakan dalam minuman ringan dan makanan ringan (Nurfadhila *et al.*, 2023)

Secara khusus, pewarna-pewarna yang disebutkan memiliki sifat-sifat kimia tertentu yang memerlukan metode analisis yang dapat memisahkan dan mengidentifikasi mereka secara simultan. *Yellow FCF*, *Allura*, *Methanil Yellow*, dan *Tartrazine* adalah pewarna sintetis yang sering digunakan dalam industri makanan dan minuman untuk memberikan warna yang menarik.

HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), adalah teknik analisis laboratorium yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur komponen dalam campuran cair. Menggunakan HPLC, senyawa dalam sampel dipisahkan berdasarkan interaksi mereka dengan fase bergerak (larutan) dan fase diam (kolom), memungkinkan analisis yang akurat dan sensitif. Ini sering digunakan dalam kimia, farmasi, dan bioteknologi untuk analisis kualitas dan kuantitas senyawa. HPLC memungkinkan pemisahan komponen-komponen dalam campuran kompleks dengan resolusi tinggi. Ini sangat

penting untuk memisahkan dan mengidentifikasi berbagai pewarna sintesis yang mungkin hadir dalam sampel. menggunakan detektor yang tepat, seperti detektor UV-Vis atau fluoresensi, HPLC dapat mendeteksi dan mengukur konsentrasi pewarna sintesis bahkan dalam konsentrasi yang sangat rendah (Agbokponto *et al.*, 2022).

Penelitian Abriyani *et al.*, 2024 artikel yang bersumber dari berbagai jurnal yang telah direview menunjukkan bahwa dengan perbedaan kriteria metode yang ditinjau, HPLC menjadi metode analisis yang sudah umum digunakan dalam identifikasi senyawa maupun dalam industri farmasi dengan aplikasi yang melibatkan analisis bahan baku, formulasi obat, dan pengendalian kualitas produk jadi. Pengembangan metode dan penetapan kadar zat pewarna, seperti *Yellow fcf*, *Allura*, *Methanil Yellow*, dan *Tartrazine*, secara simultan pada makanan dan minuman dengan menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) memerlukan landasan teori yang mendalam dari berbagai aspek.ba

Didasarkan pada perbedaan interaksi atau afinitas antara analit dan fase diam, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menghasilkan waktu retensi yang berbeda untuk setiap zat. Dalam kasus di mana fase geraknya polar dan fase diamnya non-polar, kromatografi fase terbalik analit yang lebih polar terelusi lebih cepat daripada analit yang kurang polar. Dalam ranah akademis, metode analisis menggunakan HPLC menjadi relevan karena HPLC merupakan teknik kromatografi cair yang canggih dan dapat memberikan hasil yang sangat akurat (Khandekar, 2021).

Salah satu langkah penting dalam menjamin kualitas analisis kuantitatif adalah validasi metode. Hal ini dilakukan menurut United States Pharmacopocia (USP) untuk memastikan bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduksibel, dan tahan dalam kisaran analit yang akan dianalisis. Tujuan akhir dari validasi metode adalah untuk memastikan bahwa setiap pengukuran di masa depan dalam analisis rutin harus cukup dekat dengan nilai sebenarnya dari analit yang teliti (Yulia, 2021).

## **L. Hipotesis Penelitian**

Berdasarkan landasan teori yang telah dijabarkan diatas, maka dapat disusun hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Pengembangan metode penetapan kadar zat pewarna Yellow fcf, Allura Red, Methanil , dan Tartrazine secara simultan menggunakan HPLC menghasilkan kondisi terbaik pada panjang gelombang, pH fase gerak, perbandingan fase gerak, laju alir, dan resolusi.
2. Metode yang dikembangkan untuk penetapan kadar zat pewarna Yellow fcf, Allura Red, Methanil, dan Tartrazine secara simultan dengan metode HPLC akan memenuhi syarat validasi, termasuk linearitas ( $r > 0,999$ ), presisi ( $RSD < 2\%$ ), akurasi, selektivitas, dan LOD dan LOQ.
3. Validasi metode yang dikembangkan memastikan bahwa waktu retensi untuk masing-masing zat pewarna *Yellow fcf*, *Allura Red*, *Methanil*, dan *Tartrazine* konsisten dengan  $RSD < 1\%$ , dan resolusi antar puncak  $> 1,5$  memenuhi syarat untuk analisis simultan.