

PENENTUAN KUANTITATIF ZAT WARNA KARMOISIN, PONCEAU 4R DAN MERAH ALURA YANG DITAMBAHKAN DALAM MINUMAN ANGREM (*Hibiscus sabdariffa*, Linn)

[Quantitative Determination of Carmoisine, Ponceau 4R and Allura Red Colouring Agents Added into Softdrink Containing the Aqueous Extract of (*Hibiscus Sabdariffa*, Linn)]

Embit Kartadarma, As'ari Nawawi, dan Halida

School of Pharmacy, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganeca 10 Bandung, 40132, Indonesia

Diterima 24 November 2006 / Disetujui 23 Agustus 2007

ABSTRACT

The synthetic food- colouring agent is still commonly used in soft drink to enhance the colour of the food and to make foods more attractive, particularly for the drink containing natural colour. Addition of colour is legally permitted by the government, however, the products sometime contain the substance more than the permissible maximum dosage, and it may possibly cause illhealth to the consumers. Preparation of soft drink containing the aqueous extract of Hibiscus sabdariffa fruits gave less intense colour due to the different quantity of natural colour content in the raw material. For this the products need the addition of the synthetic one to standardize its colour. The quantity of the synthetic food colour in soft drink must be determined quantitatively for food safety and the presence of natural colour in the products may affect the results.

Determination of three synthetic colouring agents, carmoisine, ponceau 4R and allura red added into softdrink containing the aqueous extract of Hibiscus sabdariffa was carried out. Results showed that the determination of such colouring agents can only be achieved after adjusting the pH up to 4.5 and the recovery of carmoisine, ponceau 4R and allura red were 99.8; 100.2 and 100.0%, with the accuracy of 0.1; 0.3 and 0.1% and the precision of 0.1; 0.3 and 0.1% respectively.

Key words: carmoisine, ponceau 4R allura red, hibiscus sabdariffa, Linn, soft drink, spectrophotometry

PENDAHULUAN

Penggunaan zat warna sintetik dalam minuman yang mengandung zat warna alami masih biasa digunakan menyeragamkan penampilan warna sediaan alami yang dibuat. Hal ini dilakukan karena penampilan warna sediaan yang diberikan oleh keseragaman warna yang tetap, sehingga diperlukan penambahan pewarna sintetik agar dapat mencapai tingkat pewarnaan yang seragam (Smith, 1991; Brannen 1990). Kandungan zat warna sintetik yang ditambahkan tidak boleh melebihi jumlah maksimum yang diizinkan (Depkes RI, 1988). Dalam perdagangan sediaan minuman ringan yang terbuat dari sari buah yang mengandung pewarna sintetik diduga penambahan zat pewarna sintetiknya melebihi dari jumlah maksimum yang disyaratkan sehingga perlu cara penetapan yang dapat menyakinkan akan pengaruh adanya senyawa pewarna alami terhadap penentuan zat warna sintetik dalam sediaan minuman yang banyak beredar dalam perdagangan.

Sebagai contoh minuman ringan yang menggunakan bahan dasar nabati seperti sirup strawberry dan sirup dari sari buah angrem (*Hibiscus sabdariffa*, Linn), dan warna alami dari kedua sirup ini tidak dapat seragam walaupun diperoleh dari buah yang

berasal dari daerah penanaman yang sama. Untuk menyeragamkan warna minuman ini diperlukan penambahan zat warna sintetik, seperti karmoisin, ponceau 4R dan merah alura, secukupnya sampai tingkat warna yang diinginkan (Otterstatter, 1995). Untuk keperluan keamanan pangan maka setiap penambahan pewarna sintetik ini perlu ditetapkan kuantitasnya, diantaranya dengan cara spektrofotometri sinar tampak.

Pengukuran kadar karmoisin, ponceau 4R dan merah alura dalam minuman secara langsung dengan cara spektrofotometri masih dapat terganggu oleh beberapa komponen, seperti zat warna alamai antosianin yang dapat bereaksi dengan senyawa ini dalam sediaan (Smith, 1991).

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui sejauh mana adanya zat warna alami berpengaruh terhadap penentuan zat warna sintetik yang sengaja ditambahkan ke dalam minuman ringan yang bersangkutan.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelopak angrem, *Hibiscus sabdariffa*, Linn., larutan karmoisin, ponceau 4R dan merah alur, sukrosa,

natrium benzoate, natrium hidroksida, aqua destillata. Alat yang digunakan adalah timbangan elektronik, pH-meter dan stu set UV-Visible Spektrophotometer.

Metode penelitian

Determinasi buah angrem

Kelopak buah angrem yang digunakan diperoleh dari daerah Pasir Muncang, Bandung simplisia kering. Selanjutnya untuk memastikan bahwa kelopak buah tersebut betul berasal dari tanaman *Hibiscus sabdariffa*, Linn., seperti diuraikan dalam Heyne, 1987, maka bahan tadi diperiksa di Laboratorium Herbarium, Departemen Biologi, Institut Teknologi Bandung.

Pembuatan minuman yang mengandung angrem

Minuman dibuat dengan cara menrendam 20 gram kelopak buah angrem kering dalam 1 liter air suling panas, selama 30 m3nit. Kemudian ditambahkan natrium benzoate 0,05% b/v dan sukrosa 10% b/v. Penambahan pewarna sintetik sebanyak 50 ppm. Pada minuman pelibanding (blanko) tidak ditambahkan zat pewarna sintetik.

Pembuatan larutan pewarna sintetik

Larutan karmoisin dibuat dengan melarutkan 50 mg karmoisin dalam labu tentukur 250 mL, tambahkan air suling sampai tanda batas. Sebanyak 25 mL larutan dari labu tentukur dipipet ke dalam tentukur 100 mL dan tambahkan air suling sampai tanda batas dan diperoleh kadar akhir karmoisin 50 ppm. Selanjutnya untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi zat yang lebih rendah dilakukan beberapa kali pengenceran.

Larutan ponceau 4R dibuat dengan melarutkan 50 mg ponceau 4R dalam labu tentukur 250 mL, tambahkan air suling sampai tanda batas. Sebanyak 25 mL larutan tersebut dipipet ke dalam labu tentukur 100

ml dan tambahkan air sampai tanda batas dan diperoleh larutan pewarna ini dengan kadar 500 ppm.

Larutan merah alura dibuat dengan melarutkan 50 mg merah alura dalam labu tentukur 250 mL, tambahkan air suling sampai tanda batas. Sebanyak 25 mL larutan ini dipipet ke dalam labu tentukur 100 mL dan tambahkan air hingga tanda batas, dan diperoleh larutan merah alura dengan kadar 50 ppm.

HASIL PEMBAHASAN

Penentuan panjang gelombang absorbansi maksimum

Setiap larutan pewarna sintetik dipipet 4 mL ke dalam labu tentukur 10 mL dan diencerkan dengan air sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi masing-masing zat warna 20 ppm. Masing-masing larutan zat warna tersebut diukur panjang gelombang maksimumnya dengan spektrofotometer sinar tampak. Untuk mengetahui kestabilan larutan zat warna ini, pengukuran panjang gelombang dilakukan setiap 5 menit sampai 720 menit setelah larutan dibuat (Tabel 1).

Stabilitas masing-masing pewarna sintetik dalam air sangat tinggi seperti terlihat pada Tabel, dan nilai keseksamaan masing-masing pewarna tidak lebih dari 2%. Namun setelah dicampurkan dengan cairan minuman angrem terjadi pergeseran absorbansi maksimum minuman angrem yang mengandung komponen antosianin dan pewarna sintetik sehingga memerlukan perlakuan khusus yaitu dicoba dengan mengatur pH larutan menjadi 4,% sebelum pengukuran dan dengan demikian gangguan adanya pewarna alami (antosianin) dapat dikurangi.

Hasil pengukuran masing-masing pewarna dalam air dan dalam minuman angrem selama 9 hari menunjukkan bahwa kadar masing-masing pewarna dalam air dan dalam minuman cukup stabil sejak hari pertama sampai hari ke 9 pengukuran.

Table 1. Stabilitas zat warna (20ppm) dalam pelarut air pada panjang gelombang maksimum

Waktu (menit)	Karmosianin, λ 526 nm	Ponceau 4R, 506 nm	Merah Alura, λ 526 nm
	Absorbansi	Absorbansi	Absorbansi
5	0,75219	0,60450	0,85324
10	0,73913	0,61271	0,85881
15	0,73496	0,61265	0,86076
20	0,73304	0,61103	0,86410
25	0,72922	0,61145	0,86387
30	0,73237	0,61253	0,86887
60	0,73097	0,61428	0,84574
120	0,73105	0,60622	0,86887
180	0,72355	0,61194	0,85065
240	0,72974	0,61307	0,84897
300	0,73119	0,60381	0,85291
720	0,73382	0,61021	0,86636
	X = 0,7334	X = 0,6112	X = 0,8578
	Sb = $6,9667 \times 10^3$	Sb = $4,552 \times 10^3$	Sb = $7,4033 \times 10^3$
	KV = 0,9499%	KV = 0,7404%	KV = 0,8631%

Penentuan serapan minimum minuman ringan angrem

Minuman ringan yang mengandung angrem tanpa penambahan pewarna sintetis diencerkan 2,5 kali, pH larutan ditingkatkan dengan penambahan larutan natrium hidroksida 1 N dalam larutan yang sama, kemudian dilihat profil absorpsinya dengan spektrofotometer sinar tampak.

Pengukuran kadar zat warna sintetis dalam air minuman

Sampel masing-masing minuman ringan dengan atau tanpa pewarna dipipet sebanyak 4 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan air sampai tanda batas. Tingkat pH-nya diatur dengan menggunakan penambahan larutan natrium hidroksida 1 N sampai pH-nya menjadi 4,5. Masing-masing diukur serapannya pada panjang gelombang absorpsi maksimum masing-masing pewarna, dengan blanko yang bersesuaian. Kemudian kadar dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi. Pengamatan dilakukan selama 9 hari. Hasil pengamatan kadar zat warna dibandingkan dengan larutan pewarna air (Tabel 2).

Uji-t-berpasangan

Untuk melihat perbedaan yang bermakna dalam hasil pengukuran pada dua sediaan larutan yang berlainan maka uji-t berpasangan ditentukan dengan

mengukur kadar masing-masing pewarna sintetis dalam air dan dalam minuman. Hasil pengukuran ini kemudian dibandingkan dan hasilnya pada Tabel 3.

Hasil penetapan kadar zat pewarna dalam air dan dalam minuman angrem dari semua zat warna yang diteliti ada perbedaan yang bermakna, ini menunjukkan adanya komponen tertentu yang mempengaruhi penentuan zat pewarna karmoisin, ponceau 4R dan merah alura, dimana hal ini perlu pembuktian lebih lanjut.

Pembuatan kurva kalibrasi zat pewarna sintetis

Dibuat larutan masing-masing pewarna sintetis dalam berbagai konsentrasi dalam pelarut air suling dan dalam minuman angrem yang telah diencerkan 2,5 kali. Kemudian masing-masing larutan diukur serapannya dengan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang maksimumnya. Pengukuran serapan dilakukan terhadap blanko air untuk larutan zat pewarna dalam air dan blanko minuman angrem tawar untuk pewarna minuman. Untuk setiap larutan yang mengandung angrem, diberi perlakuan dengan menyamakan pH minuman menjadi 4,5 dengan menambahkan larutan natrium hidroksida 1 N dalam larutan yang sama sebelum pengukuran. Data data analisis yang diperoleh dibuat persamaan regresi linier hubungan absorpsi terhadap konsentrasi zat warna. Hasil pengukuran pada Tabel 4.

Tabel 2. Hasil pengukuran kadar karmoisin, ponceau 4R, dan merah alura dalam air dan dalam minuman angrem selama 9 hari.

Hari ke-	Kadar (ppm)	Karmoisin (ppm)		Ponceau 4R		Merah Alura	
		(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
1	20	20,39	19,02	19,71	17,43	20,05	19,96
2	20	20,22	18,77	20,09	18,60	19,93	17,23
3	20	20,36	18,62	19,89	17,82	19,67	17,29
4	20	20,75	18,44	20,07	18,26	19,97	17,32
5	20	20,29	18,71	20,28	16,69	19,38	17,69
6	20	22,41	18,94	20,09	17,84	19,79	17,26
7	20	22,44	17,75	20,31	16,87	20,19	17,34
8	20	20,55	18,77	20,35	17,37	19,93	17,38
9	20	21,35	19,38	19,82	17,80	19,66	16,86

Keterangan : (A) = dalam air, (B) = dalam minuman angrem

Tabel 3. Hasil uji -t pengukuran zat pewarna sintetis karmoisin, ponceau 4R, dan merah alura dalam air minuman angrem

Zat pewarna	Dalam air			Dalam minuman angrem				
	Rataan	Sb.	KV (%)	Rataan	Sb.	KV (%)	t	t table
Karmoisin	20,972	0,890	4,246	18,709	0,446	2,386	6,817	1,746
Ponceau 4R	20,066	0,225	1,121	17,600	0,613	3,486	11,319	1,746
Merah Alura	19,841	0,241	1,217	17,370	0,306	1,762	19,011	1,746

Keterangan : Nilai t table diambil pada $\alpha = 0,05$ dan $DK = (n_a + n_b - 2) = 16$

Tabel 4. Hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi pewarna sintetik pada λ maksimumnya untuk pembuatan kurva kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	Karmoisin (ppm)		Ponceau 4R		Merah Alura	
	λ 516 nm		λ 506 nm		λ 500 nm	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
3	0,0968	0,1171	0,0928	0,0898	0,1154	0,1285
5	0,1742	0,2019	0,1540	0,1610	0,1937	0,2101
10	0,3628	0,4153	0,3075	0,3321	0,4232	0,4170
15	0,5477	0,6200	0,4605	0,4930	0,6358	0,6224
20	0,7349	0,8263	0,9251	0,6711	0,8619	0,8364
30	1,1156	1,2378	1,2372	1,0077	1,2674	1,2443
40	1,5042	1,6626	1,5521	1,3609	1,6836	1,6860

Keterangan : (A) = dalam air, (B) dalam minuman angram

Persamaan garis untuk :

- a. Karmoisin dalam air : $y = 0,037 x + 0,0184$, $R^2 = 0,9999$
 b. Karmoisin dalam minuman angram : $y = 0,0416 x + 0,0056$, $R^2 = 1$
 c. Ponceau 4R dalam air : $y = 0,031 x - 0,0034$, $R^2 = 1$
 d. Ponceau 4R dalam minuman ringan : $y = 0,0342 x - 0,0133$, $R^2 = 0,9999$
 e. Merah alura dalam air : $y = 0,0425x - 0,0066$, $R^2 = 0,99997$
 f. Merah alura dalam minuman angram : $y = 0,0419 x - 0,002$, $R^2 = 0,9998$

Dari Tabel 2 terlihat bahwa kurva kalibrasi dalam air dalam minuman angram yang ditentukan pada panjang gelombang 516 nm berturut-turut mempunyai persamaan garis $y = 0,037 x + 0,0184$ dengan linieritas $r = 0,9999$, dan $y = 0,0416 x + 0,0056$, dengan linieritas $r = 1$. Penetapan kadar karmoisin dalam minuman dengan cara ini menghasilkan perolehan kembali $99,8 \pm 0,1\%$ dengan keseksamaan $0,1\%$ untuk kadar nyata 20 ppm.

Kurva kalibrasi Ponceau 4R dalam air dan dalam minuman angram yang ditentukan panjang gelombang 506 nm berturut-turut mempunyai persamaan garis $y = 0,031 x - 0,0034$ dengan linieritas $r = 1$, dan $y = 0,0342 x - 0,0133$ dengan linieritas $r = 0,9999$. Penetapan ponceau 4R dengan cara ini menghasilkan perolehan kembali sebesar $100,2 \pm 0,3\%$ dengan keseksamaan $0,3\%$ untuk kadar nyata 20 ppm.

Kurva kalibrasi merah alura dalam air dan dalam minuman angram yang ditentukan pada panjang gelombang 500 nm berturut-turut mempunyai persamaan garis $y = 0,0425x - 0,0066$, dengan linieritas $r = 0,9997$, dan $y = 0,0419 - 0,002$ dengan linieritas $r = 0,9998$. Penetapan kadar merah alura dalam minuman angram menghasilkan perolehan kembali sebesar $100,06 \pm 0,1\%$ untuk kadar nyata 20 ppm.

Perolehan kembali karmoisin di dalam minuman angram yang lebih kecil dari 100% menunjukkan masih ada sebagian kecil zat warna ini yang terikat dengan komponen minuman angram, sedangkan untuk pewarna ponceau 4R dan merah alura, adanya zat warna alami antosiann tidak berpengaruh dalam penentuan kadar air.

Uji Inieritas

Persamaan regresi linier melalui hasil uji sintetik dalam sampel dengan berbagai konsentrasi pewarna diuji kelinierannya. Uji ini dilakukan seperti pada pembuatan kurva kalibrasi.

Uji kecermatan

Kecermatan merupakan ukuran kedekatan hasil uji terhadap nilai sebenarnya yang dapat diterima, ditentukan dengan menghitung perolehan kembali kadar zat uji dalam campuran.

$$\text{Perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar hasil pengujian}}{\text{Kadar yang ditimbang}} \times 100\%$$

Ke dalam labu ukur 250 mL terpisah ditimbang masing-masing 50 mg zat pewarna sintetik, kemudian dilarutkan dalam minuman angram sampai tanda batas. Dari labu ukur pertama dipipet 25 mL ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan minuman angram sampai tanda batas. Dari masing-masing labu ukur kedua pipet 4 mL larutan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan minuman angram sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi akhir 20 ppm. Masing-masing larutan diatur pH-nya dengan penambahan larutan natrium hidroksida 1 N hingga pH-nya menjadi 4,5 lalu diukur serapannya pada panjang gelombang maksimumnya. Kemudian hitung kadarnya dengan menggunakan persamaan regresi liniernya. Hasil perhitungan pada Tabel 5

Uji keseksamaan

Keseksamaan ditentukan dengan menghitung simpangan baku atau simpangan baku relatif persamaan berikut :

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum i(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Simpangan baku relative (koefisien variansi) dihitung dengan persamaan :

$$\%KV = \frac{S_b}{\bar{X}} \times 100\%$$

Tabel 5. Hasil uji kecermatan dan keseksamaan pengukuran zat pewarna sintetik dalam minuman angrem

Kadar Nyata : (ppm)	Rataan (%)			
	(Recovery)	(%)	Sb(%)	KV (%)
1. Karmoisin				
10	100,4467	0,4467	2,6738	2,6619
15	100,2616	0,2616	0,0960	0,0957
20	99,8387	0,1613	0,1259	0,1261
2. Ponceau 4R				
10	100,8553	0,8553	0,1267	0,1256
15	98,1187	0,1588	0,4574	0,4648
20	100,2580	0,2580	0,414	0,3405
3. Merah Alura				
10	99,9860	0,0024	0,2363	0,2363
15	99,3453	0,6547	0,0480	0,0483
20	100,0597	0,0597	0,1957	0,1955

Keterangan : Recovery – perolehan kembali

Dalam penelitian ini dipilih pH 4,5 untuk menghindari pengaruh penambahan komponen dalam penyusunan dapar larutan. Pengukuran absorbansi pada minuman yang sudah ditambahkan pewarna sintetik dan dilakukan pada 4.5 menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang yang sama dengan larutan pewarna sintetik dalam air.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pengukuran puncak absorbansi minuman angrem dengan cara spektrofotometri sinar tampak terjadi penurunan dengan meningkatnya pH minuman.

Penentuan kadar karmoisin, ponceau 4R dan merah alura dalam minuman angrem dapat dilakukan dengan spektrofotometri sinar tampak dengan memberikan perlakuan pengaturan pH menjadi 4,5 sebelum pengukuran.

Kadar karmosianin ponceau 4R dan merah alura dalam air dan dalam minuman angrem cukup stabil, namun kadar zat pewarna sintetik ini dalam minuman angrem mengalami penurunan perolehan kembali secara statistik dibandingkan dengan dalam air.

Saran

Disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut penyebab penurunan perolehan kembali dari kadar zat pewarna sintetik dalam minuman angrem

DAFTAR PUSTAKA

- Brannen, I.M., Davidson, P.M., and Salminen, S., 1990, Food Additives, Marcel Dekker Inc., New York
- Depkes RI, Permenkes RI, no. 722/Men.Kes/Per/IX/88, 1998, Tentang zat warna yang Diizinkan digunakan pada Obat dan makanan.
- Heyne, K., 1987, Tumbuhan berguna Indonesia, ed 3., terjemahan Badan Litbang Kehutanan, Yayasan Sarana Wanajaya, Jakarta, 1310-1311
- Otterstatter, G., 1995, Coloring of Foods, Drugs and Cosmetics, Marcell Dekker, Inc. New York, 130-131, 152, 159-160
- Smith, J. 1991, Food Additive User's Handbook, Blackie, London, 89,90,93,95,97,98-