

*BAHAN TAMBAHAN MAKANAN
ANTIOKSIDAN & SEKUESTERAN*



RAHMA G. MERONDA

*FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Teknologi pengolahan pangan dewasa ini berkembang cukup pesat, termasuk di Indonesia. Untuk memperoleh produk pangan olahan yang bercita rasa lezat, berpenampilan menarik, tahan lama, mudah dalam pengangkutan dan pendistribusiannya digunakan berbagai bahan pendukung yang lazim disebut bahan tambahan makanan (BTM, food additives).

Dulu dikenal bahan tambahan makanan dari sumber alami seperti daun suji atau kunyit untuk pewarna, pati untuk pengental, rempah-rempah untuk memberi cita rasa khas, dll. Namun kini telah banyak diproduksi bahan tambahan makanan yang merupakan hasil ekstrak bahan alami maupun sintetis yang dapat digunakan secara cepat dan praktis. Walaupun pemakaian bahan tambahan makanan sintetis cukup membantu dalam pengolahan makanan, seringkali masih ditemukan penyimpangan dalam masyarakat terutama dalam hal pemilihan dan dosis pemakaiannya. Semua bahan kimia, termasuk bahan tambahan makanan, akan berubah sifatnya dari aman dan menguntungkan menjadi racun yang berbahaya bila dosis pemakaiannya tidak tepat. Penyimpangan ini umumnya disebabkan karena ketidak tahuan produsen terhadap kegunaan, bahaya, dosis dan dampak yang mungkin timbul akibat pemakaian bahan bersangkutan. Padahal dampak pemakaian bahan tambahan makanan baru terasa setelah jangka waktu yang lama, misalnya timbul gangguan kesehatan. Sebab lain penyimpangan bahan tambahan makanan adalah karena kesengajaan produsen biasanya untuk menekan biaya produksi, misal penggunaan pewarna tekstil untuk mewarnai makanan karena harganya lebih

murah. Dalam pemilihan bahan tambahan makanan untuk industri, perlu memperhatikan jenis produk apa yang dihasilkan dan bagaimana bahan tambahan makan mempengaruhi mutu produk tersebut. Dengan demikian dapat dipilih bahan tambahan makanan yang mempunyai fungsi seperti yang diharapkan dan tidak bertentangan dengan peraturan yang ada serta terjamin keamanannya selama di gunakan dalam batasan yang diperbolehkan sesuai dengan peraturan yang berlaku.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

BAHAN TAMBAHAN MAKANAN

Bahan Tambahan Makanan (BTM) atau food additives didefinisikan sebagai senyawa yang sengaja ditambahkan ke dalam makanan dan terlibat dalam proses pengolahan, pengemasan dan atau penyimpanan dan bukan merupakan bahan (ingredient) utama.

BTM yang ditambahkan adalah untuk membantu teknologi pengolahan pangan, ada yang memiliki nilai gizi namun ada juga yang tidak. Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI No.722/MENKES/PER/1988 yang di maksud dengan Bahan Tambahan Makanan adalah bahan yang biasanya tidak digunakan sebagai makanan dan biasanya bukan merupakan ingredien khas makanan, mempunyai dan tidak mempunyai nilai gizi yang dengan sengaja ditambahkan ke dalam makanan untuk maksud teknologi (termasuk organoleptik) pada pembuatan, pengolahan, penyiapan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, penyimpanan atau pengangkutan makanan untuk menghasilkan atau diharapkan menghasilkan (langsung atau tidak langsung) suatu komponen atau mempengaruhi sifat khas makanan tersebut.⁽¹⁾

Bahan Tambahan Makanan ini dibagi dalam beberapa golongan, yaitu ⁽¹⁾:

1. Antioksidan
2. Antikempal
3. Pengatur keasaman
4. Pemanis buatan
5. Pemutih dan pematang tepung
6. Pengemulsi, pemantap, dan pengental
7. Pengawet

8. Pengeras
9. Pewarna
10. Penyedap rasa dan aroma, penguat rasa
11. Sekusteran

ANTIOKSIDAN

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat oksidasi di dalam bahan. Penggunaannya meliputi bahan, antara lain lemak hewani, minyak nabati, produk pangan dengan kadar lemak tinggi, produk pangan berkadar lemak rendah, produk daging, produk ikan, dan produk lain-lain.⁽²⁾

Meskipun kerusakan mikrobiologis merupakan factor utama yang perlu diperhatikan dalam pengawetan bagian karbohidrat dan protein suatu produk pangan, namun oksidasi adalah factor utama yang mempengaruhi kualitas lemak, minyak, dan bagian lemak dari pangan. Lemak dan minyak mudah mengalami oksidasi yang mengakibatkan kerusakan karena timbulnya bau dan cita rasa yang menyimpang.⁽²⁾

Antioksidan efektif dalam mengurangi ketengikan oksidatif dan polimerisasi tetapi tidak mempengaruhi hidrolisis atau reverse.⁽²⁾

Komposisi antioksidan terdiri dari dua, yaitu antioksidan alam dan antioksidan sintetik, yang termasuk antioksidan alam antara lain turunan fenol, kumarin, hidroksi sinamat, tokoferol, difenol, nonfenol, kathekin, dan asam askorbat. Antioksidan sintetik antara lain butyl hidroksianisol, butyl hidroksitoluen, propil gallat dan etoksiquin.⁽²⁾

Berdasarkan PERMENKES No.722 tahun 1988, antioksidan yang diizinkan penggunaannya adalah Asam askorbat, asam eritorbat, askorbil palmitat, askorbil stearat, butyl hidroksianisol (BHA), butyl hidroksitoluen (BHT), butyl hidrokinon

tersier, dilauril tioidipropionat, propil gallat, timah (II) klorida, alpha tocoferol, dan tocoferol campuran pekat.⁽²⁾

Sifat-sifat kimia pada antioksidan antara lain sinergisme, dapat diartikan sebagai peranan gabungan antara dua atau lebih agensia sedemikian rupa sehingga masing-masing agensia bila tanpa dilakukan penggabungan. Mekanisme kerja antioksidan dalam mencegah ketengikan bahan di antaranya secara inhibitor dan pemecah peroksida.⁽²⁾

EFEK TERHADAP KESEHATAN ⁽²⁾

1. Asam L-Askorbik (Vitamin C)

Sulit untuk kesehatan gusi, gigi, tulang, kulit dan pembuluh darah. Dosis tinggi dapat menyebabkan diare dan erosi pada gigi. Mengonsumsi lebih dari 10 gram per hari mudah terkena batu ginjal.

2. Natrium L-Askorbat (Vitamin C; Natrium L-(+)-Askorbat)

Dalam dosis standar tidak bersifat toksik. Tetapi dari hasil percobaan yang dilakukan pada tikus tampak memberikan pertambahan, yaitu efek karsinogen yang merugikan. Efek pada manusia memerlukan penelitian yang lebih lanjut.

3. Kalsium L-Askorbat (Kalsium Askorbat)

Kalsium askorbat dapat membentuk batu kalsium oksalat pada urine yang akhirnya akan mengendap pada ginjal dalam bentuk batu ginjal.

4. Asam 6-O-Palmitoil-L-Askorbik (Askorbil palmitat)

Telah diketahui tidak menimbulkan efek yang merugikan.

5. Ekstrak Tokoperois Alam (Vitamin E) dan sintetiknya.

Membantu pengiriman oksigen ke hati dan otot. Sangat esensial untuk memperpanjang waktu hidup sel darah merah.

6. Propil Gallat; Oktil Gallat; dan Dodekil Gallat.

Semua alkil galat menyebabkan iritasi pada lambung dan kulit, memberikan efek negative pada penderita asma dan mereka yang sensitive terhadap Aspirin. Penggunaannya tidak diizinkan untuk pangan bayi atau pangan anak kecil.

7. Butil Hidroksianisol (BHA)

BHA tidak diperkenankan untuk pangan bayi dan anak kecil kecuali pengawet Vitamin A.

Penggunaan pada level tinggi sering dilaporkan bersifat toksik. Pada dosis tinggi mendorong timbulnya kanker sekitar lambung pada tikus dan tupai. Diduga juga BHA memacu timbulnya tumor sekitar lambung melalui penghambatan hubungan antara sel.

8. Butil Hidroksitoluen (BHT)

Telah dilaporkan oleh LANCET bahwa BHT menyebabkan kulit menjadi kasar seperti yang diderita wanita-wanita muda di negeri Prancis. Dalam dosis tinggi menyebabkan liver membesar, hal ini dikarenakan bahwa BHT menyebabkan tumor paru-paru pada tikus, tumor hati serta kandung kemih. BHT tidak diperkenankan untuk pangan bayi dan anak kecil. BHT merupakan salah satu bahan tambahan pangan oleh *Hyperactive Children's Support Group* yang dilarang penggunaannya pada anak-anak.

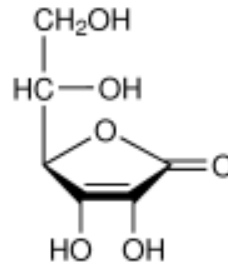
URAIAN BEBERAPA ANTIOKSIDAN

1. Asam Askorbat ^(3,4)

Nama Resmi	: Acidum Ascorbicum (FI)
Sinonim	: Asam Askorbat; Cevitamic acid; C-97; 2,3-didehydro-L- threo-hexono-1,4-lactone; E300; 3-oxo-L-gulofuranolactone,enol form; Vitamin-C.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : $C_6H_8O_6$ / 176,13

Rumus Bangun :



Pemerian : Hablur atau serbuk putih atau agak kuning. Oleh pengaruh cahaya lambat laun menjadi berwarna gelap. Dalam keadaan kering stabil di udara, dalam larutan cepat teroksidasi. Melebur pada suhu lebih kurang 190° .

Kelarutan : Mudah larut dalam air; agak sukar larut dalam etanol; tidak larut dalam kloroform, dalam eter dan dalam benzene.

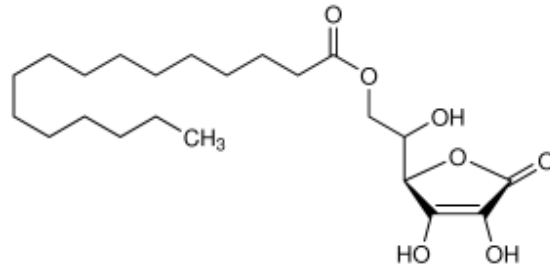
2. Askorbil Palmitat⁽⁴⁾

Nama Resmi : Ascorbyl Palmitate (BP)

Sinonim : L-Ascorbic acid 6-palmitate; E304; 3-oxo-L-gulofuranolactone 6-palmitate; Vitamin C palmitate.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : $C_{22}H_{38}O_7$ /414,54

Rumus Bangun :



Pemerian : Askorbil palmitat praktis tidak berbau, serbuk putih hingga kekuningan.

Kelarutan : 1 bagian Askorbil Palmitat larut dalam 15 bagian aseton, 3300 bagian kloroform , 8 bagian etanol (70°C), 132bagian eter, 5,5 bagian methanol, 3300 bagian minyak kacang, dan praktis tidak larut dalam air.

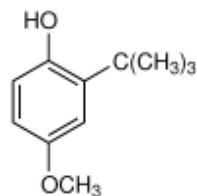
3. Butil Hidroksianisol⁽⁴⁾

Nama Resmi : Butylated Hydroxyanisole (USP)

Sinonim : Antracine 12; BHA; Tetr-butyl-4-methoxyphenol; Embanox BHA.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : $C_{11}H_{16}O_2/180,25$

Rumus Bangun :



Pemerian : Serbuk Kristal putih, hampir putih atau putih kekuningan, padatan seperti lilin dengan karakteristik bau aromatis.

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air; larut dalam methanol ; mudah larut dalam \geq campuran etanol-air 50%, propilenglikol, kloroform, eter, heksan, minyak kacang dan larutan alkali hidroksida.

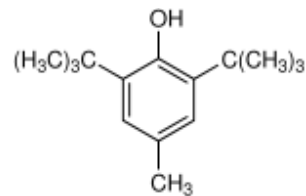
4. Butil Hidroksitoluen ⁽⁴⁾

Nama Resmi : Butylated Hydroxytoluene (USP)

Sinonim : Advastab-401; BHT; Annulex BHT; 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol; Topanol; Vianol.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : $C_{15}H_{24}O$ / 220,35

Rumus Bangun :



Pemerian : Kristal padat atau serbuk berwarna putih atau kuning pucat dengan karakteristik bau khas.

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air, propilenglikol, gliserin, larutan alkali hidroksida dan asam mineral encer. Mudah larut dalam aseton, benzene, etanol(95%), eter, methanol, toluene dan minyak mineral. Lebih larud

dalam minyak makan dan lemak dibandingkan dengan butyl hidroksianisol.

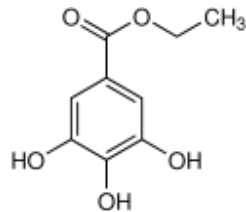
5. Propil Gallat (4)

Nama Resmi : Propyl Gallate (BP)

Sinonim : 3,4,5-trihydroxybenzoate; Tenox PG; Progallin P; n-propyl gallate.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : $C_{10}H_{12}O_5$ / 212,20

Rumus Bangun :



Pemerian : Serbuk Kristal putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau, dengan sedikit rasa adstringen.

Kelarutan : 1 bagian propil gallat, larut dalam 200 bagian minyak mineral, 2000 bagian minyak kacang, 2,5 bagian propilenglikol (pada 25°C), 100 bagian minyak kedelai (pada 100°C) dan dalam 1000 bagian air.

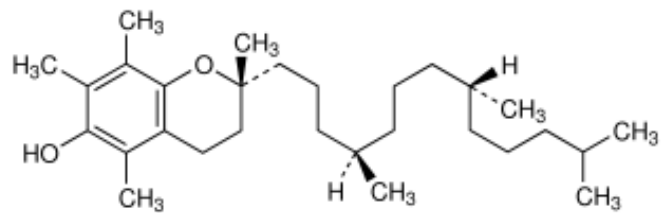
6. Alpha Tocopherol ⁽⁴⁾

Nama Resmi : Alpha Tocopherol (BP)

Sinonim : Vitamin E, E307; dl- α -tocopherol; 5,7,8-trimethyltolcol.

Rumus Molekul, Bobot Molekul ; $C_{29}H_{50}O_2$ / 430,72

Rumus Bangun :



Pemerian : Alfa tocoferol merupakan produk alam. Minyak kental praktis tidak berbau, jernih, tidak berwarna, kuning, kuning-kecoklatan, atau kuning keabuan.

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air; mudah larut dalam aseton, etanol, eter, dan minyak sayur.

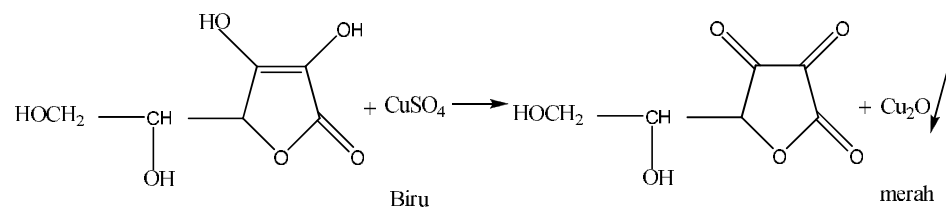
ANALISA ANTIOKSIDAN (KUALITATIF)

Asam Askorbat. ^(5,6,7)

1. Reaksi warna :

Asam askorbat + perak nitrat (amoniakal) \longrightarrow Hitam

Asam askorbat + pereaksi Benedict \longrightarrow Merah



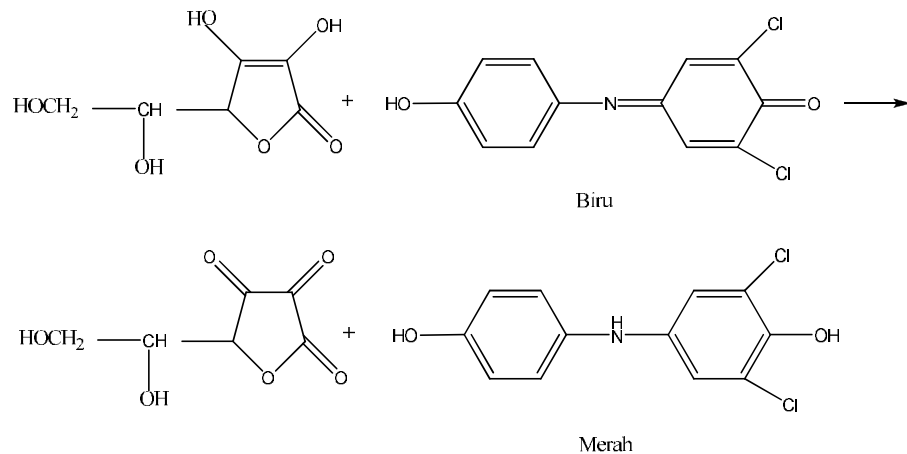
Asam askorbat + pereaksi Nessler \longrightarrow Hitam

Asam Askorbat + palladium klorida \longrightarrow Hitam

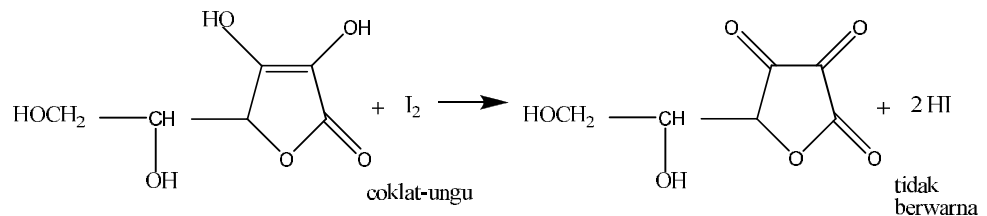
Asam Askorbat + kupri tartrat (larutan alkali) \longrightarrow Merah

(reaksi yang dihasilkan serupa dengan hasil reaksi pada pereaksi benedict, yaitu pembentukan endapan merah dari Cu_2O).

Asam Askorbat + 2,6-diklorofenol indofenol \longrightarrow Merah muda



Asam askorbat + larutan Iodium \longrightarrow warna coklat-ungu Iod hilang



Instrumentasi :

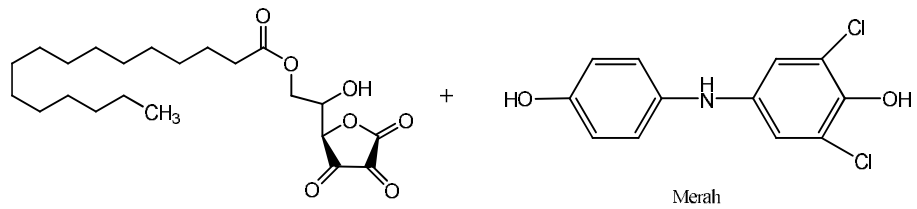
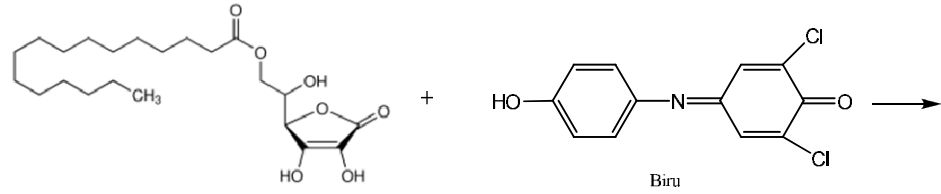
Spektrum Ultra Violet : Aqueous acid—243 nm ($A_1^1=556a$).

Spektrum Infra Merah : Principal peaks at wavenumbers 1026, 1111, 1312, 1136, 1653, 990 cm^{-1}

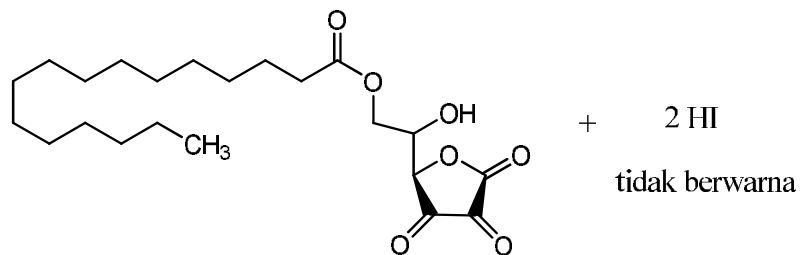
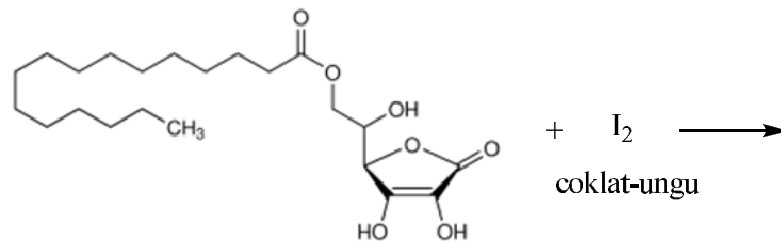
2. Askorbil Palmitat ⁽⁶⁾

Reaksi Warna :

Askorbil palmitat + 2,6-diklorofenol indofenol \longrightarrow Merah muda, lalu perlahan-lahan warna hilang.



Askorbil palmitat + larutan iodium \longrightarrow warna coklat-ungu lod hilang



3. Butil Hidroksianisol ^(5,6)

Reaksi warna :

BHA + larutan boraks + larutan 2,6-diklorokuinon-klorimida \longrightarrow Biru

BHA + larutan H₂SO₄-Feri ammonium sulfat \longrightarrow Hijau-Biru

Instrumentasi :

Spektrum Ultra Violet : Acid ethanol—228 ($A^1_{1}=340a$), 292 nm ($A^1_{1}=205a$).

Spektrum Infra Merah : Principal peaks at wavenumbers 1202, 1220, 1050, 805, 1185, 1294 cm^{-1}

4. Butil Hidroksitoluen ^(5,6)

Reaksi Warna :

BHT + larutan boraks + larutan 2,6-diklorokuinon-klorimida \longrightarrow Biru

BHT + 2 mL larutan Natrium nitrat + 5 mL larutan diasidin dihidroklorida

\longrightarrow Orange - Merah + Kloroform, kocok \longrightarrow Warna Ungu - Magenta pada lapisan kloroform.

Instrumentasi :

a. Spektrum Ultra Violet : Dehydrated alcohol—278 nm ($A^1_{1}=85a$)

5. Alfa Tokoferol ^(8,9)

Reaksi warna :

a. Alfa tokoferol + alcohol dehidrat + asam nitrat \longrightarrow Orange-Merah terang.

Instrumentasi :

a. Spektrum Ultra Violet : Alfa tokoferol dalam etanol 95% menunjukkan absorban maksimum pada 292 nm dan minimum pada 257 nm. Jika digunakan pelarut sikloheksan, menunjukkan absorban maksimum pada 298 nm dan minimum pada 257 nm.

6. Analisis Kualitatif Antioksidan dengan TLC (SNI, 1992 ; AOAC, 1995) ⁽²⁾

Prinsip :

Setelah melalui tes berwarna, minyak diekstraksi berturut-turut dengan methanol dan asetonitril, ekstrak mungkin mengandung gallat, BHA, NDGA, dan BHT. Ekstrak tersebut merupakan campuran, melalui kromatografi plat tipis silika gel dan pelarut benzen sebagai pengembang, maka akan terjadi pemisahan di mana kromatogram yang terbentuk

dilakukan reaksi penyemprotan. Hasilnya jika terdapat BHA dan BHT akan terpisah, sedangkan gallat dan NDGA akan berada di bawah garis dasar.

Alat :

Rotary Evaporator, Seperangkat peralatan TLC, Silica Gel.

Bahan :

Etanol 80%, Asetonitril, Benzen, pereaksi GIBB'S (larutan 2,6-dikloroquinon klorimid 0,01% dalam etanol), larutan standar (larutan 1% dalam etanol 70%^{v/v}), Ferri klorida heksahidrat 0,2% (segar), α - α -dipiridil (larutan 0,2 g zat murni dalam 0,5 mL etanol 100%, lalu diencerkan sampai 100 mL dengan air destilasi).

Cara Kerja :

Tambahkan 25 mL metanol kepada 10 g sampel, jaga suhunya pada 40°C sampai 10 menit, goyangkan sesring mungkin. Dinginkan lalu di dekantasi lapisan metanoliknya dan lakukan tes dengan ferri klorida dan larutan α - α -dipiridil. Tes akan memberikan larutan berwarna merah ini menunjukkan bahwa terdapat zat pereduksi termasuk tokoferol bebas tetapi tidak dalam bentuk ester tokoferol. Jika terdapat zat pereduksi, ekstraksi dilanjutkan, kemudian dengan TLC.

Tambahkan benzen sebagai pelarut pengembang dan pereaksi GIBB'S sebagai fase diam (*chromogenic agent*) berikutnya dapat dicoba plat dengan Silica Gel G.

Larutan Pengembang :

1. Hexan : Eter = 90 : 10
2. Etilen triklorida : Asam asetat : Asam format : Isobutanol = 15 : 1 : 2 : 2
3. N-Hexan atau Petroleum eter : Benzen : Asam asetat = 40 : 40 : 30. Ini baik untuk pemisahan NDGA dan galat; "run for" 130 mm, nidimensional.

Pereaksi Penyemprot :

- a. Jika penyemprotan digunakan pereaksi 20% asam pospomolibdik dalam metanol, antioksidan muncul dalam bentuk noda berwarna biru atau abu-abu. Jika perlakuan pada plat menggunakan uap *ammonia background* akan menjadi putih bersih dan antioksidan muncul berbentuk noda berwarna biru atau hijau.
- b. Jika reaksi warna pada uji pendahuluan positif, tetapi pada plat TLC tidak didapatkan noda, maka hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel terdapat antioksidan alam dan zat pereduksi.
- c. Ditambahkan 100 mL asetonitril. Untuk mendapatkan semua BHT ekstraksi dengan asetonitril sangat sulit kecuali dengan menggunakan destilasi uap.
- d. Uapkan 2 mL hasil ekstrak dengan rotary evaporator di bawah tekanan reduksi pada 40°C (dibawah nitrogen). Kemudian teteskan sejumlah 20 µL dan 40µL secara terpisah pada plat TLC dan kembangkan dengan pelarut benzen setinggi 10 cm. Keringkan diudara dan semprotkan dengan pereaksi GIBB'S.

Data Nilai Rf beberapa Antioksidan

Antioksidan	Rf hasil hitung	Warna
Propil, Oktil, Dodekil Gallat	0,00	Abu-abu - Ungu
Nonhidroguaiiretik (NDGA)	0,00	Ungu
2-BHT	0,21	Biru – Ungu
3-BHT	0,36	Biru – Ungu
BHT	1,00	Kuning
Tokoferol bebas	0,4 – 0,6	

METODE IUPAC II. C.9

Secara substansi mirip tetapi dengan menggunakan pelarut sebagai berikut :

- 40-60°C B.R. Petroleum eter : Benzen : Asam asetat glasial = 40 : 40 : 20.
Siapkan dalam keadaan segar.
- Petroleum eter : Benzen : Etil asetat : Asam asetat glasial = 40 : 40 : 25 :
4. Siapkan dalam keadaan segar.
- Kloroform : Metanol : Asam asetat glasial = 90 : 10 : 2.

Laporan IUPAC tentang Rf Hasil Hitung

Antioksidan	Larutan Pengembang			Warna setelah treatment dengan Ammonia lalu pereaksi GIBB'S
	A	B	C	
PG	0,08	0,25	0,58	Abu-abu kehijauan
OG	0,16	0,40	0,64	Abu-abu kehijauan
DG	0,22	0,45	0,66	Abu-abu kehijauan
BHA	0,62	0,87	0,92	Ungu
BHT	0,89	0,99	0,88	Kuning dengan lingkaran ungu

Hexan : eter (9 : 1) dan trikloretilen : asam asetat : asam format : butann
2-ol (15 : 1 : 2 : 2). Dapat juga digunakan larutan pengembang n-heksan :
Benzen : Asam asetat (40 : 40 : 20) untuk memisahkan NDGA dan gallat
dengan silica gel G. Petroleum eter (40-60° BR.) dapat menggantikan n-
heksan.

Asam fosfomolibdik 20% dalam metanol merupakan pereaksi
penyemprot alternatif. Antioksidan akan muncul dengan noda berwarna

biru atau abu-abu. Reaksi plat dengan uap ammonia akan menjadikan background tidak berwarna, sehingga antioksidannya akan muncul dengan noda berwarna biru atau hijau. Pada metode AOAC, untuk mendeteksi adanya BHA di gunakan asam diazolis sulpanilic (Pereaksi Erlich's) sedangkan untuk mendeteksi BHT digunakan dianisidin (3,3'-dimetoksibenzidin).

Untuk mendeteksi NDGA, AOAC menyarankan sebagai berikut :

Lakukan ekstraksi pada 30 gram lemak dengan 60 mL petroleum eter 3 X 15 mL air, goyang-goyangkan dengan hati-hati selama satu menit atau lebih. Propil gallat akan tertarik, kemudian hasil ekstraksi lemak-eter ini dicampur dengan 20, 30, dan 30 mL asetonitril, goyang-goyangkan selama 2 menit. Larutkan ekstrak asetonitril dengan 400 mL air, tambahkan 2-3 mL eter selama 2 menit. Lakukan ekstraksi 2 X larutan asetonitril dengan 2 X 20 mL petroleum eter. Petroleum hasil ekstraksi mengandung BHA dan BHT asetonitril dan goyang-goyangkan selama 2 menit. Pisahkan lapisan yang mengandung eter, lalu uapkan (hanya untuk mengeringkan) di dalam gelas kimia. Tambahkan 4 mL alkohol 50%, aduk lalu tambahkan 1 mL larutan $\text{Bu}(\text{OH})_2$ 1%. Warna biru menunjukkan adanya NDGA. Pereaksi $\text{Bu}(\text{OH})_2$ harus dihindari dari atmosfer karena atmosfer mengandung gas CO_2 .

ANALISA ANTIOKSIDAN (KUANTITATIF)

1. Analisis Kuantitatif Asam Askorbat

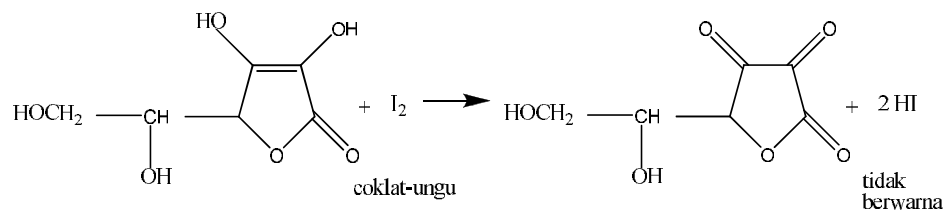
a. Metode Iodometri ⁽⁹⁾

Prosedur :

Lebih kurang 400 mg Asam askorbat yang ditimbang seksama, larutkan dalam campuran yang terdiri dari 100 mL air bebas karbondioksida dan

25 mL asam sulfat encer. Titrasi dengan Iodium 0,1 N menggunakan indicator kanji sampai terbentuk warna biru yang tetap. Tiap mL Iodium setara dengan 8,806 mg Asam askorbat.

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :

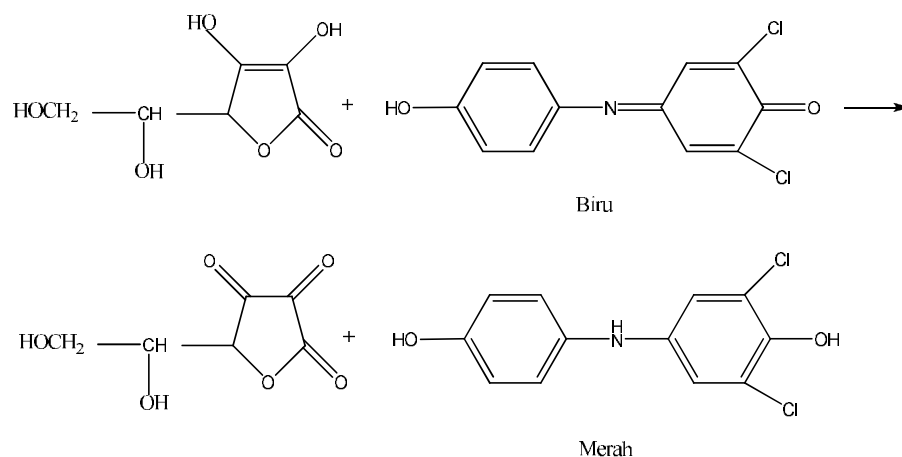


b. Metode 2,6-diklorofenol Indofenol⁽⁹⁾

Prosedur :

Sejumlah serbuk yang ditimbang seksama setara dengan lebih kurang 50 mg Asam askorbat, dilarutkan dalam 25 mL Asam metafosfat 20%, encerkan dengan air secukupnya hingga 250 mL. Titrasi 10,0 mL larutan secara cepat dengan larutan 2,6-diklorofenol indofenol hingga berwarna merah jambu yang terjadi mantap selama 10 detik. Titrasi tidak boleh lebih lama dari 2 menit. Lakukan titrasi blanko.

Reaksi yang terjadi :



c. Metode Kolorimetri 4-metoksi-2-nitroanilin⁽⁹⁾

Prosedur :

Pada 2 mL pereaksi ditambahkan 2 mL natrium nitrit 0,2%, aduk hingga warna jingga hilang, tambahkan 75 mL n-butanol, campur. Tambahkan 25 mL natrium hidroksida 10% dan 150 mL etileter, gojok dengan baik-baik dan diamkan memisah. Pisahkan lapisan bawah dan cuci lapisan organik tiga kali, tiap kali dengan 15 mL natrium hidroksida 10%. Pada kumpulan sari dan cairan cucian encerkan dengan air hingga 200 mL. Blanko dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan pereaksi. Ukur absorban larutan terhadap blanko pada 570 nm.

d. Metode Spektrofotometri ⁽⁷⁾

Asam askorbat menunjukkan absorbansi maksimum pada 265 nm dalam larutan air yang netral; serapan maksimum ini akan bergeser ke 245 nm dengan adanya sejumlah asam mineral.

2. Analisis Kuantitatif Gallat

a. SNI, 1992 ; AOAC, 1995 ⁽²⁾

Prinsip :

Setelah antioksidan diekstraksi dengan methanol 95%. Aliquot yang mengandung ekstrak metanolik di tambahkan aseton, lalu dengan serbuk Ammonium sulfat, maka akan timbul warna biru kemudian warna biru ini dibandingkan dengan warna standar.

Alat :

Spektrofotometer atau kolorimeter

Bahan :

Methanol 95%, Kalsium karbonat, Serbuk Ammonium sulfat, larutan standar n-propil atau n-dodekil gallat (larutkan 0,1 g dalam methanol 95% dan encerkan sampai 10 mL(1000). Buat larutan standar antara 5-50 mg/L)

Cara Kerja :

1. Campurkan 10 g sampel cair atau leburan dengan 25 mL methanol 95%, goyang-goyangkan dengan kuat selama 1 menit di dalam tabung setrifus. Seperti telah dijelaskan oleh Cassidy dan Fisher atau tabung Werner-Schimidt (dengan atau tanpa kran samping). Masukkan kedalam waterbath pada suhu 40-50°C dan biarkan kira-kira 15 menit sampai terjadi pemisahan. Tuang lapisan atas ke dalam labu kembali lalu encerkan sampai tanda batas. Tambahkan 1 gram Kalsium karbonat, goyang-goyangkan dan saring dengan kertas saring (Whatman No.1 atau sejenisnya), sisakan filtrate beberapa mL hingga yakin bahwa Kalsium karbonat tertinggal pada sisa filtrate.
2. Ambil dengan tepat 10 mL filtrate, tambahkan 1 mL aeton lalu tambahkan pula kira-kira 10 mg Ammonium sulfat. Goyangkan selama 1 menit. Setelah setengah jam, ukur absorban pada panjang gelombang 580 nm untuk warna biru di dalam sel 1 cm bandingkan dengan warna 10 mL larutan standar 95%.

Perhitungan :

Jumlah Gallat dalam mg/Kg sampel :

$$\frac{\text{Absorban}_{\text{sampel}}}{\text{Absorban}_{\text{standar}}} \times \text{konsentrasi standar dalam mg/L} \times \frac{50}{10}$$

Perhitungan Absorban Antioksidan Tiga jenis Gallat yang Umum.

Antioksidan	Pendekatan Absorban *)	Absorbktivitas	Berat Molekul	Absorbktivitas
Propil Gallat	0,1777	17,68	212	3749
Oktil Gallat	0,140	14,01	282	3952
Dodekil Gallat	0,116	11,55	338	3305

*) menggunakan larutan 10 ppm

3. Analisa Kuantitatif BHA

a. AOAC, 1995 ⁽²⁾

Prinsip :

Filtrat yang berasal dari alikuot yang telah dipersiapkan untuk penentuan Gallat direaksikan dengan pereaksi GIBB'S menghasilkan warna indofenol yang stabil.

Alat :

Spektrofotometer

Bahan :

Methanol 95% v/v, Natrium tetraborat dekahidrat 0,5%, 2,6-dikloro-p-benzoquinon-4-kloramin (Pereaksi GIBB'S), n-butanol, BHA standar (25 mg/L dalam methanol 95%).

Cara Kerja :

- a. Siapkan ekstrak dengan menambahkan methanol 95% seperti yang telah dilakukan pada penentuan Gallat. Ambil dengan tepat 2 mL ekstrak tersebut tambahkan 2 mL methanol 95%, 8 mL larutan borat dan 2 mL pereaksi GIBB'S. Setelah 15 menit larutkan dengan n-butanol hingga tepat mencapai volume 20 mL.
- b. Siapkan 2 mL larutan blanko methanol 95% dan larutan standar BHA 25 mg/L. Baca absorban pada panjang gelombang 610 nm.

Catatan :

Untuk lebih sensitive dapat dilakukan tes dengan cara mengambil 4 mL ekstrak methanol, karena jika terdapat antioksidan lain seperti gallat, maka gallat akan mereduksi warna secara intensif. Sebagai contoh 200 mgr/L propil gallat akan mereduksi warna dari 200 mcr/L BHA kira-kira satu setengah kali di bawah kondisi tes standar.

BHA komersial mengandung lebih dari 90% isomer 3-BHA yang lebih responsive terhadap pereaksi GIBB'S memberikan warna biru. Pereaksi α,α -dipiridil- FeCl_3 , seperti yang telah dijelaskan (Mahon dan Chapman 1951) di samping bereaksi dengan 2-BHA juga bereaksi dengan antioksidan lain.

Perhitungan :

BHA dalam sampel dalam mgr/L =

$$\frac{A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}}{A_{\text{standar}} - A_{\text{blanko}}} \times 25 \times \frac{50}{10}$$

4. Analisa Kuantitatif BHT

a. SNI, 1992 ; AOAC, 1995 ⁽²⁾

Prinsip :

Sampel diperlukan dengan cara destilasi uap. Destilat yang mengandung BHT ditentukan secara reaksi berwarna dengan pereaksi o-diasinidin dan natrium nitrat.

Alat :

1. Seperangkat destilasi uap seperti modifikasi JENDEN dan TAYLOR atau KOZELKA dan HINE.
2. Pemanas 160°C , dengan beaker gelas ukuran 1 Liter, berisi $\frac{1}{2}$ penuh paraffin. Juga pemanas minyak dapat digunakan.
3. Corong pisah tipe Squibb, yang dicat hitam ukuran 60 mL.
4. Labu volumetric 10 mL dicat hitam.
5. Generator uap yang dilengkapi : labu dasar ukuran 1 Liter untuk tempat air destilasi, pemanas mantel, plastic penghubung uap luar

dengan kepala labu destilasi atau bola, dan soket digunakan secara bersamaan.

Bahan :

1. Kloroform
2. Larutan magnesium klorida, larutan 100 g heksahidrat dalam 50 mL air.
3. O-dianisidin, larutkan 0,25 g dalam 50 mL methanol, tambahkan 100 mgr arang aktif, goyang-goyangkan selama 5 menit dan saring. Campurkan 40 mL larutan jernih tersebut dengan 60 mL HCl 1N, siapkan dengan segera dan lindungi dari sinar.
4. Natrium nitrat, 0,3% dalam air.
5. Larutan standar BHT 500 mgr/L, larutkan 50 mgr dalam methanol lalu encerkan sampai 100 mL, siapkan larutan standar yang mengandung 1-5 mg/L larutkan dengan 50% v/v methanol.

Cara Kerja :

- a. Masukkan 15 ml larutan Magnesium Klorida ke dalam labu 100 ml (JENDEN dan TAYLOR) atau tabung G (modifikasi KOZELKA dan HINE), atau tambahkan \pm 5 gr sampel, disarankan lebih baik BHT yang dikandung kira-kira 0,4 mgr. Lumasi dasr gelas lalu hubungkan ke labu. Panaskan pemanas yang berisi air destilasi pada suhu 160°C-100°C. Atur generator uap agar destilat air yang keluar memiliki laju 4 ml per menit. Jaga kondisi tersebut hingga air mengalir terus-menerus. Hubungkan kondensator dengan generator uap ke labu destilasi dan benamkan ke dalam pemanas. Destilasi uap ini harus bekerja dengan baik.
- b. Tampung sebanyak 100 ml di dalam labu volumetric 200 ml yang berisi 50 ml methanol. Copot labu destilasi dari generator uap dan

kembalikan labu destilasi ke panas. Jika ujung kondensor telah dingin, copot kondensor dari labu destilasi aliri segera dengan uap air. Cuci kondensor dengan 5 porsi methanol masukkan hasil pencucian ke dalam labu volumetric. Dinginkan sampai temperatur kamar dan encerkan dengan methanol sampai 200 ml lalu aduk.

- c. Bersihkan dan keringkan 3 buah corong pisah 60 ml tipe Squibb beri tanda B, S, X ke dalam masing-masing corong pisah, masukkan B 25 ml methanol 50% v/v melalui pipet, S 25 ml larutan standar yang mengandung 1-3 mg BHT per ml, X 25 ml methanol 50% (destilat) sampel. Kepada masing-masing corong pisah tambahkan 5 ml larutan dianisidin, tutup corong pisah lalu goyang-goyangkan dengan hati-hati. Kemudian juga kepada masing-masing corong pisah ditambahkan 2 ml larutan Natrium nitrat 0,3%, tutup kembali lalu goyang-goyangkan kembali dengan hati-hati. Biarkan 10 menit lalu tambahkan lagi kepada masing-masing corong pisah 10 ml CHCl_3 . Lakukan ekstraksi ini sampai terbentuk warna kompleks dengan menggoyang-goyangkan selama 30 detik. Biarkan selama 2-3 menit hingga terbentuk 2 lapisan terpisah sempurna.
- d. Beri tanda kepada labu volumetrik B, S, dan X. pipet 2 ml methanol absolute lalu masukkan ke dalam masing-masing labu. Pisahkan dan masukkan lapisan kloroform (lapisan yang berada di bawah) ke masing-masing labu volumetric kocok dengan baik-baik.
- e. Bacalah absorban larutan masing-masing dengan alat spektrofotometer atau kolorimetri pada panjang gelombang 520 nm dengan menggunakan campuran 2 ml methanol dan 8 ml kloroform sebagai blangko. 50 mg BHT akan memberikan absorban kira-kira 0,39 dengan tebal sel 1 cm *recovery* dihasilkan kira-kira $97 \pm 2\%$.

Perhitungan :

BHT di dalam sampel mg/Kg =

$$\frac{A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko}}}{A_{\text{standar}} - A_{\text{blanko}}} \times \text{standar} \times \frac{200}{\text{Berat sampel}}$$

SEKUESTERAN

Menurut Permenkes No. 722/MENKES/PER/IX/1988, yang di maksud dengan Sekuesteran adalah bahan tambahan makanan yang dapat mengikat ion logam yang ada dalam makanan.⁽¹⁰⁾

Sekuesteran merupakan bahan penstabil yang digunakan dalam berbagai pengolahan bahan makanan. Sekuesteran dapat mengikat logam dalam bentuk ikatan kompleks sehingga dapat mengalahkan sifat dan pengaruh jelek logam tersebut dalam bahan. Dengan demikian senyawa ini dapat membantu menstabilkan warna, cita rasa dan tekstur. Logam terdapat dalam bahan alami dalam bentuk senyawa kompleks misalnya Mg dalam klorofil; Fe sebagai feritin, rufin, porfirin, serta hemoglobin; Co sebagai Vitamin B12; Cu, Zn dan Mn dalam berbagai enzim. Ion-ion logam ini dapat terlepas dari ikatan kompleksnya karena hidrolisis maupun degradasi. Ion logam bebas mudah bereaksi dan mengakibatkan perubahan warna, ketengikan, kekeruhan maupun perubahan rasa. Sekuesteran akan mengikat ion logam tersebut sehingga menjaga kestabilan bahan.⁽¹¹⁾

Ligan atau sekuesteran dapat berupa senyawa organik seperti asam sitrat, EDTA, maupun senyawa anorganik seperti polifosfat. Senyawa ini dapat pula menghambat proses oksidasi, merupakan sinergik antioksidan karena dapat

menghilangkan ion-ion logam yang mengkatalisis proses oksidasi. Dalam penggunaan sekuesteran sebagai sinergik antioksidan harus diperhatikan kelarutannya. Asam dan ester-ester sitrat (20-30 ppm) dengan propilenglikol larut dalam lemak sehingga efektif sebagai sinergik dalam semua lemak. Sebaliknya Na₂EDTA dan Na₂Ca-EDTA hanya sedikit larut dalam lemak, karena itu kurang efektif dalam lemak murni; tetapi garam-garam EDTA (500 ppm) sangat efektif sebagai antioksidan dalam system emulsi karena adanya fase air yang kontinyu, misalnya untuk mayonnaise, margarine dan lain-lain.⁽¹¹⁾

Asam sitrat dan fosfat juga digunakan dalam minuman selain berfungsi sebagai asidulan (pengasam), juga berguna untuk mengikat logam yang dapat mengkatalisis oksidasi komponen cita rasa dan warna. Dalam minuman hasil fermentasi malt, pengkhelet akan mengkompleks Cu. Cu bebas akan mengakibatkan oksidasi senyawa polifenol yang kemudian dengan protein, menyebabkan terjadinya kekeruhan.⁽¹¹⁾

EFEK TERHADAP KESEHATAN

Penggunaan EDTA yang berlebihan dalam bahan makanan akan menyebabkan tubuh kekurangan Ca dan mineral lain. Hal ini disebabkan EDTA sangat efektif mengkhelet ion logam. Karena itu dalam garam EDTA ditambahkan juga Ca dalam bentuk garam EDTA dari Na dan Ca.⁽¹¹⁾

Asam sitrat (derivate/turunannya) dalam dosis tinggi dapat merubah sifat penyerapan logam berat dan radionuclide dari usus. Asam fosfat (derivate/turunannya), merupakan senyawa yang diragukan, dapat merubah sifat penyerapan dari usus, mengganggu metabolisme Ca²⁺; sering di kontaminasi oleh Arsen, Cadmium dan Fluor.⁽¹²⁾

Dosis yang berlebihan dari dinatrium EDTA, dapat menyebabkan kerusakan pada system retikuloendotelial.⁽¹³⁾

URAIAN BEBERAPA SEKUESTERAN

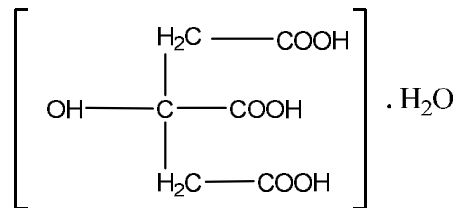
1. Asam Sitrat Monohidrat^(3,4)

Nama Resmi : Acidum Citricum

Sinonim : 2-hydroxy propane-1,2,3-tricarboxylic acid monohydrate.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : C₆H₈O₇.H₂O / 210,14

Rumus Bangun :



Pemerian : Hablur bening, tidak berwarna atau serbuk hablur granul sampai halus, putih; tidak berbau atau praktis tidak berbau; rasa sangat asam. Bentuk hidrat mekar dalam udara kering.

Kelarutan : Sangat mudah larut dalam air; mudah larut dalam etanol; agak sukar larut dalam eter.

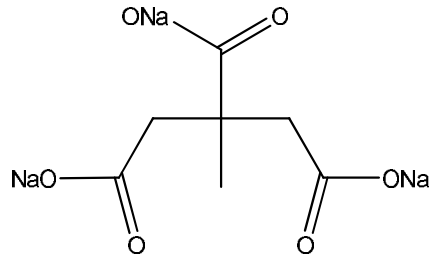
2. Natrium Sitrat⁽⁴⁾

Nama Resmi : Sodium Citrate (USP)

Sinonim : E331; Trisodium citrate; Sodium citrate tertiary; Citric acid trisodium salt.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : C₆H₅Na₃O₇.2H₂O / 294,10

Rumus bangun :



Pemerian : tidak berbau, tidak berwarna, Kristal monosiklik atau serbuk kristalin putih dengan rasa asin yang dingin.

Kelarutan : 1 bagian natrium sitrat larut dalam 1,5 bagian air; 0,6 bagian air mendidih, praktis tidak larut dalam etanol(95%).

3. Natrium Fosfat⁽⁴⁾

Nama Resmi : Sodium phosphate (BP)

Sinonim : Disodium hidrogen phosphate, disodium phosphate, E339, Sodium ortho phosphate.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : Na_2HPO_4 / 141,96

Kelarutan : Sangat larut dalam air, terutama dalam air panas atau air mendidih, praktis

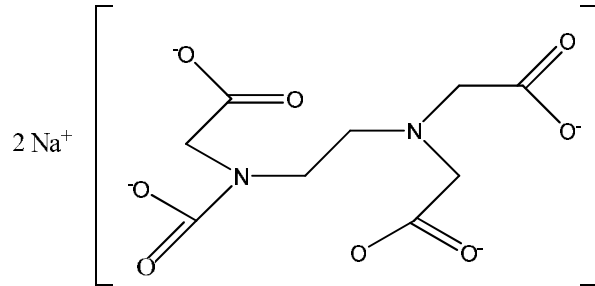
4. Dinatrium Etilendiamina Tetra Asetat (Dinatrium EDTA)^(4,13)

Nama Resmi : Dinatrium Etilendiamina Tetra Asetat

Sinonim : Disodium salt dehydrate, Edetic acid disodium, edentate disodium, disodium edathamil, disodium EDTA, Versene disodium.

Rumus Molekul, Bobot Molekul : $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$ / 336,21

Rumus Bangun :



Pemerian : Serbuk kristalin putih tidak berbau dengan sedikit rasa asam.

Kelarutan : Larut dalam 500 bagian air, larut dalam larutan alkali hidroksida.

ANALISA SEKUESTERAN (KUALITATIF)

1. Asam Sitrat (beserta garam Kalium dan Natriumnya) ^(14,15)
 - a. Larutan bereaksi asam kuat dan jika dinetralkan memberikan reaksi terhadap sitrat.
 - b. Memberikan reaksi terhadap natrium dan terhadap sitrat.
2. Asam Fosfat (beserta garam Natrium dan Kaliumnya) ⁽¹⁴⁾
 - a. Netralkan hati-hati dengan larutan natrium hidroksida P 4,0% b/v menggunakan indikator fenolftalein LP; larutan memberikan reaksi fosfat.
3. Dinatrium EDTA ⁽⁶⁾
 - a. Test natrium (uji nyala)
 - b. 5 mL air ditambah 2 tetes ammonium tiosianat dan 2 tetes FeCl₃, campurkan, terbentuk warna merah tua. Lalu tambahkan dinatrium EDTA, terbentuk warna kuning.

ANALISA SEKUESTERAN (KUANTITATIF)

1. Asam Sitrat (beserta garam Kalium dan Natriumnya) ⁽¹⁴⁾

- a. Timbang seksama lebih kurang 3 g, larutkan dalam 100 mL air. Titrasi dengan natrium hidroksida 1 N dengan menggunakan indicator fenolftalein LP. Tiap mL natrium hidroksida 1 N setara dengan 70,05 mg $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
2. Asam Fosfat (beserta garam Kalium dan Natriumnya) ⁽¹⁴⁾
 - a. Timbang seksama lebih kurang 1 g dalam labu bersumbat kaca yang telah di tara, encerkan dengan air hingga lebih kurang 120 mL. Titrasi dengan larutan natrium hidroksida 1 N dengan menggunakan indicator 10 tetes timolftalein LP sehingga terjadi wana biru. Lakukan penetapan blanko. Tiap mL natrium hidroksida 1 N setara dengan 49,00 mg H_3PO_4 .
3. Dinatrium EDTA ⁽⁶⁾
 - a. Dengan metode instrumentasi (spektrofotometri inframerah)

BAB III PENUTUP

Bahan Tambahan Makanan adalah bahan yang sengaja ditambahkan ke dalam produk makanan dengan tujuan untuk memperoleh produk yang menarik dan stabil dalam penyimpanan.

Antioksidan adalah bahan tambahan yang mencegah terjadinya oksidasi pada produk, mencegah terjadinya ketengikan dan untuk stabilitas produk akhir.

Sekuesteran adalah bahan tambahan untuk mengikat/mengkhelat logam-logam, ditambahkan untuk mencegah terjadinya pengendapan logam dan stabilitas produk akhir.

Antioksidan dan sekuesteran dapat digunakan bersama-sama dengan efek yang sinergis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fakultas Farmasi UNAIR, Bahan Tambahan Makanan , www.Food-Drugs-Info.Blogspot.com, diakses 13 November 2008.
2. Wisnu Cahyadi, 2006, Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Makanan, Bumi Aksara, Jakarta.
3. Farmakope Indonesia Edisi Keempat, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
4. Arthur H. Kibbe, 2000, Handbook of Pharmaceutical Excipients 3rd Edition, Pharmaceutical Press, London.
5. Laurent C. Galichet, 2005, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 3rd Edition (Electronic Version), Pharmaceutical Press, London.
6. Darrell R. Abenerthy, et.all., 2007, US Pharmacopeia 30 – NF 25 (Electronic Version), The United States Pharmacopeial Convention, USA.
7. Takeru Higuchi, Einar Brochmann-Hanssen, 1961, Pharmaceutical Analysis, Interscience Publishers, New York.
8. Sean C. Sweetman, et.all., 2007, Martindale : The Complete Drugs Reference 35th Edition (Electronic Version), Pharmaceutical Press, London.
9. Sudjadi, Abdul Rohman, 2004, Analisis Obat dan Makanan, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
10. Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 722/MENKES/PER/IX/88. www.sni.com, diakses 13 November 2008.
11. F. G. Winarno, 1992, Kimia Pangan dan Gizi, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

12. Anonim, Hati-hati Terhadap Bahan Tambahan Makanan Kode E, www.google.com, diakses 13 November 2008.
13. Alfonso R. Gennaro, 1990, Remington's Pharmaceutical Science 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania.
14. Departemen Kesehatan RI, 1980, Kodeks Kosmetika Indonesia Volume I, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
15. Departemen Kesehatan RI, 1986, Kodeks Kosmetika Indonesia Volume II, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.