

**VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR VANILIN PADA SAMPEL
VANILI (*Vanilla planifolia* Andrews) DENGAN KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI (KCKT)**

(Skripsi)

Oleh

**TASYA AGATHA
NPM 2017011065**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

2024

ABSTRAK

VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR VANILIN PADA SAMPEL VANILI (*Vanilla planifolia* Andrews) DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Oleh

TASYA AGATHA

Telah dilakukan penelitian tentang validasi metode penentuan kadar vanilin dalam sampel vanili menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode penentuan kadar vanilin dalam sampel vanili dengan metode KCKT menggunakan acuan *Internasional Organization for Standardization* (ISO) serta aplikasinya pada sampel vanili di laboratorium rempah-rempah BPMB, Kementerian Perdagangan, Jakarta Timur. Validasi metode yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan variasi parameter: linearitas, presisi, akurasi, LoD dan LoQ. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa parameter: linearitas $r = 0,9972$; presisi *repeatability* %RSD < 2/3 CV sebesar $2,4 < 2,78$; akurasi % *recovery* yang diperoleh pada setiap rata-rata variasi konsentrasi *spiking* 0,4%; 0,8%; dan 1,6% secara berturut-turut sebesar 138%, 101%, dan 73%; batas deteksi (LoD) = 4,59 ppm dan batas kuantifikasi (LoQ) = 15,31 ppm. Pengukuran kadar vanilin pada sampel vanili di laboratorium rempah-rempah BPMB, Kementerian Perdagangan, Jakarta Timur berada pada rentang 0,68 - 0,93%, nilai rentang tersebut masih berada di bawah syarat mutu SNI. Nilai parameter validasi metode penentuan kadar vanilin pada sampel vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) dengan KCKT ini telah menunjukkan hasil yang baik dan dapat digunakan untuk pengujian di laboratorium.

Kata kunci : Validasi metode, KCKT, vanilin, vanili, kadar

ABSTRACT

METHOD VALIDATION FOR DETERMINATION OF VANILLIN IN VANILLA (*Vanilla planifolia* Andrews) SAMPLE WITH HIGH LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

By

TASYA AGATHA

Research has been carried out on the validation of the method for determining vanillin levels in vanilla samples using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This research aims to develop a method for determining vanillin content in vanilla samples using the HPLC method using the International Organization for Standardization (ISO) reference and its application to vanilla samples in the BPMB spice laboratory, Ministry of Trade, East Jakarta. The method validation carried out in this research used a variety of parameters: linearity, precision, accuracy, LoD and LoQ. The method validation results show that the parameters: linearity $r = 0.9972$; repeatability precision $\%RSD < 2/3$ CV of $2,4 < 2,78$; the accuracy of % recovery obtained for each average variation in spiking concentration is 0,4%; 0,8%; and 1,6% respectively 138%, 101% and 73%; limit of detection (LoD) = 4,59 ppm and limit of quantification (LoQ) = 15,31 ppm. Measurement of vanillin content in vanilla samples at the BPMB spice laboratory, Ministry of Trade, East Jakarta is in the range of 0,68 – 0,93%, this range value is still below SNI quality requirements. The validation parameter values for the method for determining vanillin content in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) samples using HPLC have shown good results and can be used for laboratory testing.

Keywords: Method validation, HPLC, vanillin, vanilla, content

**VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR VANILIN PADA VANILI
(*VANILLA PLANIFOLIA* ANDREWS) DENGAN KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI (KCKT)**

Oleh

TASYA AGATHA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2024**

Judul Skripsi : **VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR
VANILIN PADA VANILI (*VANILLA
PLANIFOLIA* ANDREWS) DENGAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI (KCKT)**

Nama Mahasiswa : ***Tasya Agatha***

Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011065

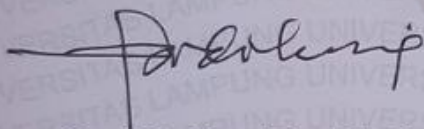
Program Studi : S1 Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

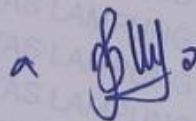


Prof. Dr. Drs. Hardoko Insan Qudus, SU.
NIP. 196102031987031002



Reni Zulfah, S.T.
NIP. 198607092009012001

2. Ketua Jurusan Kimia

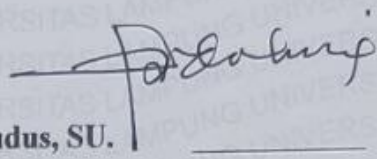


Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032000

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

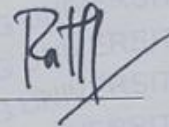
Ketua : Prof. Dr. Drs. Hardoko Insan Qudus, SU.



Sekretaris : Reni Zuliqa, S.T.



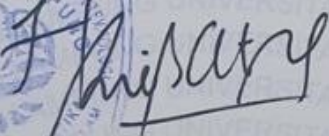
Penguji Bukan Pembimbing : Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, S.Si., M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 02 Juli 2024

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Tasya Agatha
NPM : 2017011065
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Validasi Metode Penentuan Kadar Vanilin pada Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)”** merupakan karya saya sendiri dan bukan hasil menjiplak karya orang lain. Selanjutnya, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, 12 Juli 2024

Yang Menyatakan,



Tasya Agatha

NPM. 2017011065

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Jaya, pada tanggal 22 April 2002 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara. Penulis telah menyelesaikan pendidikan formal di SD Kristen 3 Bandar Jaya pada tahun 2014. Kemudian pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 3 Terbanggi Besar yang diselesaikan pada tahun 2017, lalu melanjutkan ke pendidikan menengah atas di SMA Negeri 1 Terbanggi Besar yang diselesaikan pada tahun 2020.

Pada tahun 2020 penulis terdaftar sebagai mahasiswi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswi di Jurusan Kimia penulis aktif mengikuti kegiatan BKP Magang Industri Program Kompetisi Kampus Merdeka (PKKM) di PT *Indo Energy Solutions* Bandar Lampung pada tahun 2022 dengan melaksanakan *project* yang berjudul Pemanfaatan Limbah Cair *Palm Oil Mill Effluent* (POME) sebagai Bahan Penghasil Biogas Menggunakan Metode Anaerobik. Pada tahun 2023 penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan yang berjudul Penurunan Kadar Logam Besi (Fe) dan *Total Suspended Solid* (TSS) pada Limbah Cair Kelapa Sawit Menggunakan Metode Elektrokoagulasi di PT *Indo Energy Solutions* Bandar Lampung sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja dan penulis juga melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Jatimulyo, Kecamatan Jatiagung, Kabupaten Lampung Selatan sebagai bentuk pengabdian kepada masyarakat. Kemudian pada tahun yang sama penulis juga aktif mengikuti kegiatan BKP Riset Program Kompetisi Kampus Merdeka (PKKM) di Balai Pengujian Mutu Barang, Kementerian Perdagangan, Jakarta Timur.

MOTTO

“Segala perkara dapat kutanggung di dalam Dia yang memberi kekuatan kepadaku.”

(Filipi 4:13)

“Karena masa depan sungguh ada, dan harapanmu tidak akan hilang”

(Amsal 23:18)

“Sebab Tuhan, Dia sendiri akan berjalan di depanmu, Dia sendiri akan menyertai engkau, Dia tidak akan membiarkan engkau dan tidak akan meninggalkan engkau; janganlah takut dan janganlah patah hati.”

(Ulangan 31:8)

“Janganlah takut, sebab Aku menyertai engkau, janganlah bimbang, sebab Aku ini Allahmu; Aku akan meneguhkan, bahkan akan menolong engkau; Aku akan memegang engkau dengan tangan kanan-Ku yang membawa kemenangan.”

(Yesaya 41:10)

“Janganlah hendaklah kamu kuatir tentang apa pun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur.”

(Filipi 4:6)

PERSEMBAHAN

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Kupersembahkan karya ini kepada :

Kedua orang tua tercinta

Yang senantiasa selalu memberikan doa, motivasi, dukungan dan semangat yang selalu menyertaiku. Kuucapkan pula terima kasih sebesar-besarnya karena telah mendidik dan membesarkanku dengan cara yang terbaik dan dipenuhi kasih sayang yang tiada hentinya.

Rasa hormat dan bakti saya kepada :

Bapak Prof. Dr. Drs. Hardoko Insan Qudus, SU., Ibu Reni Zuliqa, S.T., dan Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, S.Si., M.Si., serta seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Terima kasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan pengetahuan dan wawasan selama penulis menempuh pendidikan di kampus. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas kebaikan bapak dan ibu kelak, Amin.

Serta

Almamaterku tercinta, Universitas Lampung

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "Validasi Metode Penentuan Kadar Vanilin pada Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)" dengan baik dan lancar.

Dalam melaksanakan kegiatan riset dan penyusunan skripsi ini, penulis banyak menerima bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Drs. Hardoko Insan Qudus, SU sebagai Pembimbing Utama dan pembimbing akademik yang selalu dapat meluangkan waktunya untuk dapat memberikan bimbingan, nasihat dan saran kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Ibu Reni Zuliqa, S.T sebagai Pembimbing Kedua yang juga selalu dapat meluangkan waktunya untuk membimbing penulis dalam memberikan nasihat dan saran untuk dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, S.Si., M.Si sebagai Pembahas yang telah memberikan masukan yang bermanfaat dalam perbaikan skripsi ini.
4. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerja Sama FMIPA Universitas Lampung.
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
7. Bapak Rudi Santoso, A.Md yang telah membantu segala urusan administrasi penulis di Jurusan Ilmu Kimia.
8. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu dan pengalaman kepada penulis untuk menjadi lebih baik.
9. Ibu Rukayyah, S.Tp., M.E selaku kepala Balai Pengujian Mutu Barang.
10. Bapak Harmoko, S.Si., M.T selaku Koordinator Teknis Balai Pengujian Mutu Barang.
11. Mbak Silviana dan Mas Ilham yang telah membantu, memberikan arahan, dan masukan kepada penulis saat di laboratorium.
12. Kedua orang tua tercinta, kakak dan adik tersayang yang selalu memberikan banyak doa, dukungan, semangat, motivasi, dan kasih sayang yang luar biasa tak terhingga kepada penulis.
13. Teman dekat yaitu Septiana Rahayu N, Safitri Hauratul J, Risvania Nisa L dan Olivia Agatha S. Terima Kasih telah berteman baik, memberikan dukungan dan semangat serta banyak membantu penulis dalam berbagai hal.
14. Teman-teman satu bimbingan yaitu Tiara Rahmadhani, Annisa Sisi Yani dan Siti Rafera. Terima kasih telah berteman baik dan membantu penulis dalam berbagai hal.

15. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, yang telah memberikan doa, semangat dan bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penulisan skripsi ini tidaklah lepas dari kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas semua kebaikan, bantuan dan doanya. Penulis juga berharap skripsi ini bisa bermanfaat bagi pembaca dan bisa digunakan dengan baik.

Bandar Lampung, Juli 2024

Penulis,

Tasya Agatha

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Vanili (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews)	5
2.1.1. Klasifikasi Vanili (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews)	5
2.1.2. Morfologi Vanili	5
2.2. Vanilin	7
2.3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	8
2.3.1. Instrumentasi KCKT.....	10
2.4. Validasi Metode	12
2.4.1. Presisi (Ketelitian)	12
2.4.2. Akurasi (Kecermatan).....	14
2.4.3. Linearitas	15
2.4.4. Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi.....	15
2.5. Balai Pengujian Mutu Barang (BPMB)	16

III. METODE PENELITIAN	19
3.1. Waktu dan Tempat.....	19
3.2. Alat dan Bahan.....	19
3.2.1. Alat	19
3.2.2. Bahan.....	19
3.3. Prosedur Penelitian	20
3.3.1. Pengumpulan Sampel	20
3.3.2. Pembuatan Larutan	20
3.3.3. Tahap Preparasi.....	21
3.3.4. Uji Validasi Metode.....	22
3.3.5. Penentuan Kadar Vanilin	23
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1. Validasi Metode.....	24
4.1.1. Linearitas	24
4.1.2. Presisi	26
4.1.3. Akurasi	28
4.1.4. Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantifikasi (LoQ).....	29
4.2. Penentuan Kadar Vanilin pada Sampel Vanili.....	30
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
5.1. Kesimpulan	32
5.2. Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Syarat umum vanili.....	6
2. Syarat mutu vanili.....	8
3. Kondisi awal instrumen KCKT.....	22
4. Data area variasi konsentrasi standar vanilin.....	25
5. Data hasil uji presisi.....	27
6. Data hasil uji akurasi.....	28
7. Data hasil pengukuran kadar vanilin pada sampel vanili.....	31
8. Perhitungan data uji presisi.....	41
9. Perhitungan data uji akurasi.....	42
10. Perhitungan LoD dan LoQ.....	43
11. Perhitungan kadar vanilin pada sampel vanili.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia vanilin.....	7
2. Seperangkat alat KCKT.....	9
3. Sistem kromatografi cair kinerja tinggi.....	10
4. Kromatogram larutan standar vanilin 5 ppm.....	25
5. Kurva standar vanilin	26
6. Kromatogram larutan standar vanilin 0 ppm.....	45
7. Kromatogram larutan standar vanilin 10 ppm.....	45
8. Kromatogram larutan standar vanilin 20 ppm.....	45
9. Kromatogram larutan standar vanilin 30 ppm.....	46
10. Kromatogram larutan standar vanilin 40 ppm.....	46
11. Kromatogram larutan standar vanilin 50 ppm.....	46
12. Kromatogram sampel presisi pengulangan ke-1	47
13. Kromatogram sampel presisi pengulangan ke-2	47
14. Kromatogram sampel presisi pengulangan ke-3	47
15. Kromatogram sampel presisi pengulangan ke-4	48
16. Kromatogram sampel presisi pengulangan ke-5	48
17. Kromatogram sampel presisi pengulangan ke-6	48
18. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 0,4% pengulangan ke-1	49
19. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 0,4% pengulangan ke-2	49
20. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 0,4% pengulangan ke-3	49
21. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 0,8% pengulangan ke-1	50
22. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 0,8% pengulangan ke-2	50
23. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 0,8% pengulangan ke-3	50

24. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 1,6% pengulangan ke-1	51
25. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 1,6% pengulangan ke-2	51
26. Kromatogram sampel akurasi <i>spiking</i> 1,6% pengulangan ke-3	51
27. Kromatogram sampel A	52
28. Kromatogram sampel B.....	52
29. Kromatogram sampel C.....	52
30. Kromatogram sampel D	53
31. Kromatogram sampel E.....	53
32. Kromatogram sampel F	53
33. Kromatogram sampel G	54
34. Kromatogram sampel H	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan pembuatan larutan fase gerak	39
2. Perhitungan pembuatan 100 ml larutan stok baku vanilin 300 ppm	39
3. Perhitungan larutan deret standar untuk uji linearitas	40
4. Data perhitungan uji presisi.....	41
5. Perhitungan menentukan massa standar vanilin untuk spiking 0,4%; 0,8%; dan 1,6% dari <i>stock</i> standar vanilin 99%.....	41
6. Data perhitungan uji akurasi.....	42
7. Data perhitungan LoD dan LoQ	43
8. Data perhitungan kadar vanilin pada sampel vanili.....	44
9. Data kromatogram larutan standar dan sampel vanilin	45

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) merupakan salah satu rempah yang mempunyai nilai ekonomi tinggi sebagai komoditas ekspor penghasil devisa yang masih potensial dikembangkan di Indonesia (Nurchayani, 2022). Menurut Chandrayani dkk. (2016) seperti dikutip oleh Anggraeni dkk. (2019), vanili merupakan salah satu rempah-rempah yang bermanfaat di sektor pangan dan nonpangan. Vanili banyak digunakan sebagai bahan baku dalam industri makanan dan minuman seperti industri biskuit, kue, roti, kopi, susu, es krim, dan lain-lain untuk meningkatkan aroma dan sebagai penambah cita rasa. Industri farmasi juga menggunakan vanili sebagai pembunuh bakteri dan untuk menutupi bau tidak sedap bahan-bahan lain. Selain itu, aroma vanili juga dapat digunakan sebagai parfum dan aromaterapi. Vanili mempunyai julukan si emas hijau karena masuk dalam salah satu rempah termahal di dunia (Abdat dkk., 2022).

Menurut data UN Comtrade (2022), di antara 82 negara eksportir vanili, Indonesia merupakan negara pengeksport vanili terbesar di Asia dan berada di peringkat ke-4 di dunia dengan nilai ekspor US\$39,9 juta. Permintaan pasar global akan vanili juga diprediksi akan terus mengalami peningkatan selama 2021 sampai dengan 2026. Pertumbuhan pasar vanili global ini didorong oleh peningkatan penggunaan vanili di berbagai industri mulai dari industri makanan dan minuman olahan hingga obat-obatan. Besarnya nilai ekspor vanili menunjukkan bahwa vanili sangat bernilai dan penting di pasar internasional (FAO, 2021).

Harga vanili di pasar internasional ditentukan oleh mutunya. Spesifikasi vanili yang diperdagangkan di pasaran dunia ditetapkan oleh *Internasional Organization for Standardization* (ISO) dan secara nasional mutu vanili telah ditetapkan oleh Badan Standardisasi Nasional dengan nama Standar Nasional Indonesia (SNI) (Wahyuningsih dkk., 2022). Salah satu syarat mutu spesifik vanili yang ditetapkan oleh Badan Standardisasi Nasional dengan nama Standar Nasional Indonesia (SNI) adalah kadar vanilin.

Kadar vanilin pada setiap jenis vanili berbeda-beda, perbedaan kadar tersebut disebabkan karena perbedaan agroklimat tempat tumbuhnya. Penentuan kadar vanilin pada produk vanili di Indonesia biasanya dilakukan dengan mengacu pada Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-0010-2002 dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Namun, penelitian lain juga telah melakukan penentuan kadar vanilin dengan menggunakan acuan yang berbeda seperti *Internasional Organization for Standardization* (ISO) dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatographic* (HPLC) atau biasa disebut juga Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (BIS, 2004).

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pengembangan terhadap metode penentuan kadar vanilin di laboratorium BPMB dengan mengekstraksi sampel vanili yang mengacu pada Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-0010-2002 dan dalam penentuan kadar vanilin akan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang mengacu pada ISO 5565-2 : 1999 dengan fase gerak asam fosfat dan metanol. Metode KCKT dipilih dalam penelitian ini karena metode KCKT memiliki berbagai keunggulan dalam proses pemisahan atau pemurniannya, yaitu dapat menghasilkan data analisis yang cepat dan akurat, memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, mudah dalam proses pengoperasiannya, memiliki resolusi yang baik, dapat menggunakan bermacam-macam detektor, mengurangi limbah dari eluen, serta dapat menghindari dekomposisi sampel yang dianalisis (Ardianingsih, 2009).

Penelitian dan pengembangan metode penentuan kadar vanilin menggunakan KCKT diperlukan untuk implementasi metode tersebut di laboratorium BPMB untuk pengujian rutin melalui validasi metode. Validasi metode merupakan hal penting yang perlu dilakukan di dalam laboratorium karena validasi merupakan kontrol kualitas dari suatu metode uji, di samping itu validasi dapat memberikan jaminan bahwa data yang dihasilkan dari suatu pengukuran dapat dipertanggungjawabkan dan mampu menghasilkan data yang valid sesuai tujuan tertentu. Apabila hasil uji dari parameter tersebut memperoleh data yang memenuhi persyaratan validasi maka kualitas metode yang sedang dikembangkan dapat dikategorikan sebagai metode yang valid (Taufiq *et al.*, 2020). Hal ini sesuai dengan sistem manajemen mutu standar Indonesia (SNI-17025:2017) yang mengharuskan laboratorium pengujian menggunakan metode pengukuran yang valid dalam kegiatan menganalisis suatu bahan.

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode penentuan kadar vanilin pada sampel vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) yang berada di laboratorium BPMB menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Variasi parameter validasi yang akan dievaluasi dalam penelitian ini adalah presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) berdasarkan protokol dan syarat keberterimaan yang telah ditetapkan.

1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Melakukan validasi metode penentuan kadar vanilin menggunakan KCKT dengan variasi parameter presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ).
2. Mengaplikasikan metode penentuan kadar vanilin pada sampel vanili menggunakan KCKT.

1.3 Manfaat Penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian yang telah dijelaskan di atas, maka manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai metode analisis penentuan kadar vanilin dengan KCKT yang telah tervalidasi.
2. Memberikan informasi kadar vanilin dalam sampel vanili yang berada di Balai Pengujian Mutu Barang, Kementerian Perdagangan, Jakarta.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews)

Vanili (*Vanilla planifolia* A.) merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko. Tanaman ini tumbuh subur di daerah yang beriklim tropis. Penduduk asli Meksiko menggunakan buah vanili sebagai penyegar minuman coklat dan penyadap tembakau. Tanaman vanili masuk ke Indonesia pada tahun 1819, dibawa oleh seorang ahli botani bernama Marchel. Vanili pertama kali ditanam di Kebun Raya Bogor (Rismunandar dan Sukma 2002).

2.1.1 Klasifikasi Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews)

Klasifikasi tanaman vanili dalam sistem klasifikasi Cronquist (1981) yaitu :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Liliopsida
Ordo	: Aspragales
Familia	: Orchidaceae
Genus	: <i>Vanilla</i>
Species	: <i>Vanilla planifolia</i> Andrews

2.1.2 Morfologi Vanili

Vanili termasuk tanaman monokotil yang mempunyai akar utamanya bercabang, berada pada dasar batang, dan tersebar pada lapisan tanah yang menyebabkan sistem perakarannya dangkal. Akar vanili terdiri dari akar perekat, akar gantung

dan akar tanah (Nurcahyani, 2022). Mempunyai batang monopodial berbuku-buku, berkelok-kelok, dan mudah patah dengan bentuk silindris yang permukaannya licin. Percabangan hampir tidak ada dan jika ada hanya 1-2 cabang saja. Batang vanili berwarna hijau, memiliki diameter 1-2 cm, dan batangnya tidak dapat tegak sendiri sehingga membutuhkan tonggak atau pohon sebagai tempat untuk melekat (Darmawan dan Baharsjah, 2015).

Vanili mempunyai bunga yang terdiri atas 15-20 bunga yang disebut sebagai bunga tandan. Bunga pada vanili akan muncul pada bagian ketiak daun dengan warna kuning kehijauan. Bunga vanili mempunyai tangkai daun yang pendek, dan bunga vanili tidak mampu melakukan penyerbukan sendiri karena kepala putik yang tertutup oleh rostellum sehingga dalam proses penyerbukannya harus dibantu. Lalu buah vanili berbentuk polong yang dikenal dengan *beam* dengan permukaan yang licin dan tangkai pendek yang memiliki diameter 5–15 cm dengan panjang 1–25 cm. Serta pada buah yang kering akan beraroma karena kandungan vanilin di dalamnya (Nurcahyani, 2022).

Selain itu berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 01- 0010-2002, vanili memiliki syarat umum yang ditunjukkan pada Tabel 1.

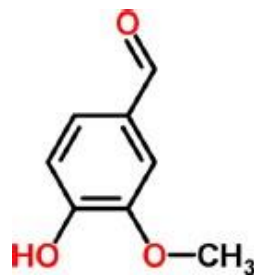
Tabel 1. Syarat Umum Vanili

Jenis Mutu	Persyaratan
Bau	Wangi khas vanili
Warna	Hitam mengkilap, hitam kecoklatan mengkilap, sampai coklat
Keadaan polong	Penuh berisi s/d kurang berisi, berminyak, lentur sampai dengan kaku
Benda-benda asing	Bebas
Kapang	Bebas

Sumber : SNI 01- 0010-2002

2.2 Vanilin

Buah vanili yang sudah masak petik dan mengering mengandung zat vanilin. Vanilin adalah senyawa organik dengan rumus molekul $C_8H_8O_3$ yang paling utama dan banyak terkandung dalam buah vanili (*Vanilla planifolia*). Senyawa inilah yang memberikan aroma khas pada vanili (Handayani *et al.*, 2011). Rumus struktur vanilin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Kimia Vanilin (Shakeel *et al.*, 2015)

Dalam sistem tata nama *the International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), Vanilin memiliki nama sistematis 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida. Vanilin merupakan aldehida yang mempunyai gugus benzen, hidroksil, dan metoksi. Gugus karbonil pada vanilin cenderung bersifat polar. Polaritas vanilin cenderung bersifat polar dibanding dari senyawa lainnya. Gugus aldehida (-CHO) cenderung bersifat polar sehingga vanilin kurang larut dalam lemak (Purwono *et al.*, 2007). Vanilin larut pada beberapa pelarut seperti etanol yang mempunyai kelarutan relatif tinggi dan bersifat *inert* sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Berat molekul vanillin 152,149 g/mol. Etanol memiliki titik didih yang rendah 65°C dan vanillin memiliki titik didih yang tinggi sehingga memudahkan proses pemisahan (Mukhrani, 2014).

Kadar vanilin pada setiap jenis vanili berbeda-beda, perbedaan kadar tersebut disebabkan karena perbedaan agroklimat tempat tumbuhnya. Sebagai contoh vanili yang berasal dari Meksiko (*Vanilla planifolia*) dengan kadar vanillin 1,32-1,86%, dari Reunion (*Vanilla planifolia*) 1,19-2% dan dari Tahiti (*Vanilla tahitensis*, *Vanilla pompona*) 1,55% (Charlot, 1920). Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) 01- 0010-2002, karakter vanili (*Vanilla planifolia*) digolongkan

ke dalam 3 jenis mutu. Untuk mutu I kadar vanilinnnya 2,25%, mutu II 1,50% dan mutu III 1%. Seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Syarat mutu vanili

Jenis Mutu	Persyaratan			
	Mutu I A	Mutu I B	Mutu II	Mutu III
Bentuk	Utuh	Utuh	Utuh / dipotong- potong	Utuh / dipotong- potong
Ukuran polong utuh	Min. 11 cm	Min. 11 cm	Min. 8 cm	Min. 8 cm
Ukuran potongan polong	Tidak ada	Tidak ada	Tidak dipersyaratkan	Tidak dipersyaratkan
Polong utuh yang pecah dan terpotong (b/b)	Maks 5%	Tidak dipersyaratkan	Tidak dipersyaratkan	Tidak dipersyaratkan
Kadar air (b/b)	Maks 38%	Maks 38%	Maks 30%	Maks 35%
Kadar vanilin (b/b kering)	Min 2,25%	Min 2,25%	Min 1,50%	Min 1,00%
Kadar abu (b/b kering)	Maks 8%	Maks 8%	Maks 9%	Maks 10%

Sumber : SNI 01- 0010-2002

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau biasa disebut juga *High Performace Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan jenis dari kromatografi kolom yang memiliki peran yang penting dalam analisis di laboratorium, selain KCKT dapat digunakan dalam analisis secara kualitatif

maupun kuantitatif, instrumen KCKT juga dapat digunakan dalam pemisahan atau pemurnian senyawa dari senyawa lainnya (Murningsih dan Chairul, 2000). Prinsip kerja KCKT adalah suatu molekul analit akan melewati celah berpori fase diam sehingga akan terjadi pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya. Pada KCKT fase gerak akan di pompa ke dalam kolom pada tekanan tinggi sehingga laju dan efisiensi pemisahannya akan semakin efektif (Kayaputri dkk, 2014). Instrumen KCKT dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Seperangkat alat KCKT

Jenis-jenis kromatografi pada KCKT berdasarkan fase diam dan geraknya, yaitu:

a. Kromatografi fase normal (*normal-phase chromatography*)

Pada kromatografi fase normal digunakan fase diam polar dan menggunakan fase gerak nonpolar. Dalam fase ini yang akan keluar terlebih dahulu adalah senyawa yang paling nonpolar. Fase diam yang biasanya digunakan adalah silika gel, sedangkan fase geraknya yaitu diklorometan, kloroform, dietil eter, heksana, dan lain-lain (Biomall, 2009).

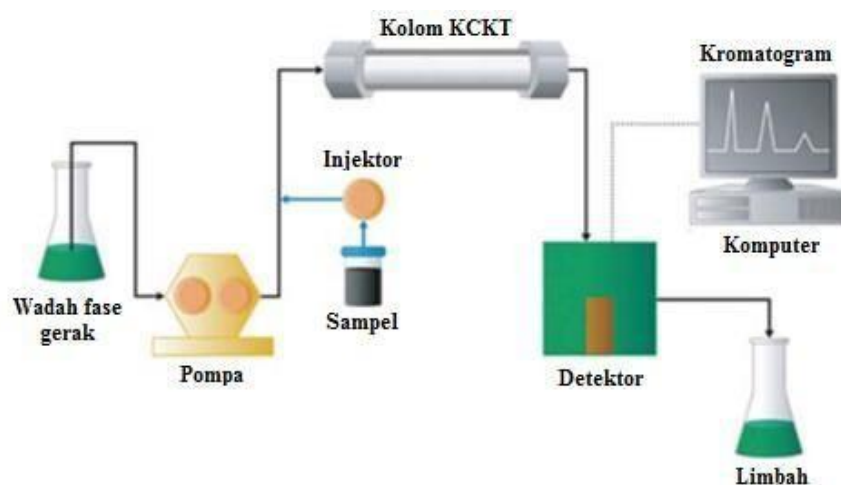
b. Kromatografi fase terbalik (*reverse-phase chromatography*)

Pada kromatografi fase terbalik digunakan fase diam nonpolar dan menggunakan fase gerak polar. Dalam fase ini yang akan keluar terlebih dahulu adalah senyawa yang paling polar. Fase diam yang biasanya digunakan adalah C18 (oktadesilsilan) atau C8 (oktilsilan), sedangkan fase

geraknya yaitu air, metanol, asetonitril, THF, dan lain-lain (Biomall, 2009).

2.3.1 Intrumentasi KCKT

Instrumen KCKT secara umum terdiri dari beberapa rangkaian alat seperti wadahpelarut, pompa, injektor, kolom, detektor, dan komputer, integrator, atau *recorder* yang masing-masing memiliki fungsi berbeda. Sistem KCKT dapat diilustrasikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (Anastasia, 2011)

a. Wadah Pelarut (*Solvent Reservoir*)

Wadah pelarut atau fase gerak harus bersih dan inert. Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak yang digunakan harus dilakukan penyaringan terlebih dahulu untuk menghindari adanya partikel kecil yang tidak diinginkan.

b. Pompa

Pompa merupakan alat yang digunakan untuk mendorong fase gerak menuju kolom. Bahan yang umum digunakan untuk pompa adalah terbuat dari bahan gelas, baja tahan karat, teflon atau batu nilam, di mana pompa harus bersifat inert terhadap fase gerak, memberikan tekanan yang tinggi serta mampu memberikan aliran sistem isokratik maupun gradien. Pompa yang digunakan

sebaiknya mampu memberikan tekanan hingga mencapai 5000 psi dan memungkinkan fase gerak untuk mengalir dengan kecepatan aliran hingga 3 mL/menit.

c. Tempat injeksi sampel (Injektor)

Injektor adalah alat yang digunakan untuk memasukkan sampel ke dalam kolom yang dapat dilakukan secara otomatis (*auto injector*) ataupun manual (*manual injector*). Injektor terbuat dari baja tahan karat dan dilengkapi katup teflon dengan cincin pengambilan sampel internal atau eksternal. Pada dasarnya tipe injektor terdiri dari *flow stopper*, deflektor dan *circumferential valve* (Kurniawati, 2016).

d. Kolom

Kolom adalah bagian dari HPLC sebagai fase diam untuk melakukan pemisahan zat terlarut atau analit. Kolom berbentuk tabung yang biasanya terbuat dari logam, stainless dan kaca yang dapat menahan tekanan tinggi. Pemisahan senyawa sangat bergantung pada kolom. Kolom atau fase diam adalah tempat terjadinya pemisahan komponen-komponen campuran karena adanya perbedaan kekuatan interaksi antara zat-zat terlarut terhadap fase gerak. Zat-zat yang lebih kuat interaksinya dengan fase gerak akan keluar lebih dahulu. Semakin lemah interaksi analit dengan fase diam, semakin cepat analit tersebut keluar kolom. Syarat fase diam adalah bersifat inert, stabil, tidak larut dalam fase gerak, tahan tekanan tinggi, memberikan aliran yang baik terhadap fase gerak, tidak berwarna, memiliki gugus fungsi aktif dan tidak mudah rusak (Susanti dan Dachriyanus, 2010).

e. Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi komponen sampel dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadar (analisis kuantitatif). Sinyal yang terdeteksi akan diplot terhadap waktu oleh komputer disebut kromatogram. Kromatogram akan menampilkan puncak-puncak yang memiliki karakteristik berbeda karena adanya senyawa yang berbeda. Syarat kromatogram yang baik adalah memiliki

bentuk puncak simetris dengan waktu retensi < 10 menit, dan resolusi $> 1,5$ (Rosdiati dan Saleh, 2019).

Detektor dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

1. Detektor universal : Detektor yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak spesifik, dan tidak selektif seperti detektor spektrofotometri massa dan detektor indeks bias.
2. Detektor spesifik : Detektor ini hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan detektor elektrokimia.

f. Komputer, Integrator, atau *Recorder*

Alat ini digunakan untuk mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mengubahnya menjadi kromatogram yang kemudian akan dievaluasi. Oleh karena itu, perangkat akuisisi data seperti komputer, integrator atau perekam harus dipastikan terhubung ke detektor.

2.4 Validasi Metode

Validasi metode adalah suatu penilaian terhadap parameter tertentu dengan percobaan laboratorium untuk membuktikan dan meyakinkan bahwa data hasil uji penelitian yang didapatkan dari suatu laboratorium yang bersangkutan merupakan hasil yang valid dan akurat sehingga dapat dipercaya (Harmita, 2004). Suatu metode yang telah dibuat atau digunakan harus dilakukan validasi dengan cara dievaluasi dan diuji (Riyanto, 2014). Beberapa parameter yang digunakan dalam validasi metode adalah presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi.

2.4.1 Presisi (Ketelitian)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual sampel yang diukur melalui rata-rata penyebaran hasil individual,

ketika prosedur metode analisis yang dilakukan secara berulang-ulang pada sampel yang diambil dari campuran homogen. Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis suatu sampel yang dibuat beberapa kali pengulangan. Selanjutnya ditentukan rata-rata (*mean*), simpangan baku (SD), dan persen simpangan baku relatif (% RSD) hasil pengukuran (Riyanto, 2014). Pada Persamaan 1 dan 2, SD adalah simpangan baku, x_i adalah nilai luas puncak larutan ke- i , $\bar{x}$ adalah nilai arus puncak rata-rata, $n-1$ adalah derajat kebebasan (dengan n adalah banyaknya pengulangan), RSD adalah simpangan baku relatif, dan x adalah konsentrasi rata-rata analit.

$$SD = \left[\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

$$\% RSD = \frac{SD}{x} \times 100\% \quad (2)$$

Penentuan presisi dapat dilakukan dengan cara yaitu dengan keterulangan (*repeatability*) dan ketertiruan (*reproducibility*). *Repeatability* adalah penentuan presisi yang dilakukan berulang dengan analisis yang sama pada kondisi yang relatif sama dan interval yang pendek (hari yang sama), sedangkan *reproducibility* adalah penentuan presisi yang dilakukan berulang pada analisis dan kondisi yang berbeda, misalnya interval yang panjang (hari yang berbeda) atau dilakukan pada laboratorium yang berbeda.

Menurut aturan Horwitz (1995), metode presisi yang baik menunjukkan % RSD yang diperoleh lebih kecil dari nilai batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz. Persen RSD Horwitz dapat dihitung menggunakan Persamaan 3, di mana C adalah rata-rata konsentrasi (fraksi konsentrasi).

$$\text{Horwitz CV} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (3)$$

Presisi suatu metode memenuhi persyaratan jika sesuai dengan syarat keberterimaan yaitu nilai %RSD lebih kecil dari 2/3 nilai koefisien variasi Horwitz (CVH) (AOAC, 2005).

2.4.2 Akurasi (Kecermatan)

Akurasi menyatakan kedekatan antara nilai yang terukur (baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan) dengan nilai yang diterima (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan metode *spiking* suatu sampel (Sudjaji, 2007).

Akurasi dapat ditentukan dengan 3 cara. Cara pertama adalah analisis bahan rujukan. Jika tidak dapat dilakukan cara pertama, dapat dilakukan cara kedua yaitu membandingkan hasil pada metode lain yang metode tersebut diketahui telah akurat. Jika tidak dapat dilakukan cara kedua, dapat dilakukan cara ketiga. Cara ketiga adalah uji perolehan kembali. Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode *spiking* (penambahan) jumlah tertentu suatu analit pada suatu sampel yang telah mengandung analit yang mana analit yang ditambahkan telah diketahui konsentrasinya (Christian dkk., 2014). Sampel dianalisis terlebih dahulu kemudian sampel spike dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (AOAC, 2012).

Perhitungan % *recovery* dari metode *spiking* dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 4.

$$\% Recovery = \frac{C_{\text{sampel spike}} - C_{\text{sampel}}}{C_{\text{spike}}} \times 100\% \quad (4)$$

Untuk melakukan prosedur akurasi, ICH merekomendasikan untuk menggunakan minimal 9 kali penetapan kadar dengan minimal 3 konsentrasi *spiking* yang berbeda (misal 3 konsentrasi *spiking* dengan 3 replikasi pada setiap konsentrasi) (*International Conference on Harmonisation*, 2005). Akurasi suatu

pengembangan metode dinyatakan valid apabila memenuhi persyaratan sesuai dengan syarat keberterimaan perolehan kembali yaitu nilai persen *recovery* berkisar antara 40-140% (Rahmawati dkk., 2018).

2.4.3 Linearitas

Linearitas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis yang memberikan respon secara langsung sehingga memperoleh hasil uji yang baik, serta proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Linearitas secara matematis dinyatakan sebagai persamaan garis linear seperti pada Persamaan 5 dengan a adalah *intercept* (Persamaan 6), b adalah *slope* (Persamaan 7) dan r adalah koefisien korelasi (Persamaan 8).

$$y = bx + a \quad (5)$$

$$a = \frac{\sum Y - b(\sum x)}{n} \quad (6)$$

$$b = \frac{n(\sum Y) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} \quad (7)$$

$$r = \frac{n(\sum Y) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}} \quad (8)$$

Linearitas dapat ditentukan dari nilai koefisien korelasi (r). Nilai (r) yang mendekati 1 menggambarkan bahwa konsentrasi larutan standar sebanding dengan respon / intensitas hasil pengukuran. Menurut Eurachem dan AOAC, nilai koefisien korelasi (r) yang memenuhi persyaratan adalah sebesar $\geq 0,990$ (Eurachem, 2014) dan $\geq 0,995$ (AOAC, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa hasil pengukuran tersebut dapat diterima sebagai acuan dalam pengukuran sampel.

2.4.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi

Batas deteksi atau *limit of detection* (LoD) merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel atau konsentrasi terendah yang dapat dideteksi melalui metode yang diterapkan yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan

blanko (Riyanto, 2014). Sedangkan batas kuantifikasi atau *limit of quantification* (LoQ) merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama serta parameter pada analisis renik (Harmita, 2004).

Batas deteksi dapat ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi. Respon instrumen y diasumsikan berhubungan linear dengan konsentrasi x standar untuk rentang konsentrasi yang terbatas. Hal ini dapat dinyatakan dengan persamaan regresi (Persamaan 5). Model ini dapat digunakan untuk menghitung batas deteksi dan batas kuantifikasi. Batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dihitung sesuai Persamaan 9 dan Persamaan 10, dimana $S_{y/x}$ adalah simpangan baku fungsi regresi (Miller and Miller, 1991).

$$LoD = \frac{3 S_{y/x}}{Slope} \quad (9)$$

$$LoQ = \frac{10 S_{y/x}}{Slope} \quad (10)$$

dengan,

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} \quad (11)$$

Keterangan :

S_y : simpangan baku respon analitik

y : nilai area yang muncul di detektor

y_i : nilai area didapat dari persamaan garis regresi

n : jumlah variabel konsentrasi yang digunakan

2.5 Balai Pengujian Mutu Barang (BPMB)

Balai Pengujian Mutu Barang (BPMB) merupakan Unit Pelaksana Teknis (UPT) dibidang pengujian mutu barang yang berada di bawah dan bertanggung jawab kepada Direktur Standardisasi dan Pengendalian Mutu, Direktorat Perlindungan Konsumen dan Tertib Niaga, Kementerian Perdagangan. BPMB telah terakreditasi

SNI ISO/IEC 17025:2017 oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN) dengan nomor registrasi LP-025-IDN untuk lebih dari 400 produk dan 3000 parameter uji, ISO 9001:2015 untuk sistem manajemen mutu serta ISO 37001:2016 untuk sistem manajemen anti penyuapan.

BPMB menjalin kerja sama dengan berbagai pihak salah satunya *dengan Ministry of Health, Welfare dan Labor Jepang*. BPMB juga tergabung dalam jaringan AFTLC (*ASEAN Food Testing Laboratory Committee*), serta aktif dalam berbagai pertemuan teknis tingkat nasional maupun internasional.

Beberapa jenis pelayanan laboratorium pengujian yang ada di BPMB adalah sebagai berikut.

1. Laboratorium Kimia dan Mikrobiologi

BPMB melayani pengujian untuk produk makanan baik bahan mentah, setengah jadi, maupun olahan seperti jagung, beras, minyak goreng, mentega, susu, biskuit, AMDK, tepung terigu, kakao bubuk, kopi, teh serta menjadi laboratorium acuan Nasional pengujian residu pestisida (penyelenggaraan uji profisiensi, penyediaan informasi *Certified Reference Material* (CRM) dan pengadaan pelatihan).

BPMB melayani pengujian organoleptik untuk produk makanan, minuman, dan komoditi pertanian seperti teh, kopi, dan kakao. Uji organoleptik antara lain pengujian terhadap kenampakan, bau, tekstur dan cita rasa. Metode pengujian yang digunakan adalah metode SNI yang berlaku.

BPMB melayani pengujian mikrobiologi untuk produk makanan, minuman, dan komoditi pertanian. Ruang lingkup pengujian mikrobiologi BPMB antara lain Pengujian Total Bakteri, Total kapang/khamir, Total organis lipolitik, *enterobacteriaceae*, *Coliform*, *E.Coli*, *Salmonella*, *S.aureus*, *B.cereus*, *Paeruginosa*, *C.perfringens*, *L. monocytogenes*, *Enterococci*. Metode pengujian yang digunakan adalah metode SNI, ISO, BAM, maupun metode independen yang dikembangkan oleh laboratorium.

BPMB melayani pengujian untuk produk hasil kimia, produk tambang, mineral, dan minyak bumi seperti minyak diesel, batu bara, pupuk, minyak pelumas, minyak atsiri, batu-batuan, kosmetik, tekstil, garmen, dan mainan anak.

2. Laboratorium Fisika dan Mekanika

BPMB melayani pengujian untuk produksi hasil hutan dan olahannya, produk otomotif dan bahan konstruksi seperti karet alam, kayu lapis, *furniture*, ban kendaraan bermotor, semen, dan helm.

3. Laboratorium Listrik

BPMB melayani pengujian untuk produk elektronika, barang listrik dan peralatan rumah tangga seperti kabel, batu baterai, lampu, kipas angin, tusuk kontak dan kotak kontak, setrika listrik, televisi, pompa air, kulkas dan peralatan rumah tangga lainnya.

Laboratorium-laboratorium di BPMB tersebut telah mendapatkan pengakuan secara nasional maupun internasional, diantaranya akreditasi dari Komite Akreditasi Nasional (KAN) untuk laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi, *Sri Lanka Standard Institute* (SLSI) untuk produk Indonesia yang diekspor ke Sri Lanka, *International Safe Transite Association* (ISTA-USA) reg No.ST-2215 untuk pengujian kemasan, *Saudi Arabian Standard Organization* (SASO) untuk produk kosmetik dan minyak atsin, *Standard of Nigeria Conformaty Assesment Programme* (SONCAP) untuk produk makanan, serta *ASEAN JEC Electronic* untuk produk peralatan elektronik berbasis kelistrikan.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2023 - November 2023 di Laboratorium Rempah-rempah Balai Pengujian Mutu Barang, Kementerian Perdagangan, Jakarta Timur.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat utama dan alat penunjang. Alat utama yang digunakan adalah KCKT Perkin Elmer *series* 200 dengan komponen yang terdiri dari : pompa, *autosampler*, detektor UV/VIS dan kolom KCKT Kinetex EVO C18 100OA dimensi 100 mm x 2,1 mm x 5 µm, Alat penunjang lainnya yang digunakan adalah neraca analitik (Percisa), *ultrasonic cleaner* (Transonic 660/H), alat penyaring fase gerak (*Millipore filter*), botol vial (Agilent), pompa vakum, mikropipet, alat-alat gelas, corong kaca dan spatula.

3.2.2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar vanilin 99% (Sigma-Aldrich, V1104-2G), etanol *p.a* (E. Merck), metanol *p.a* (E. Merck), *ortho-Phosphoric acid* (H₃PO₄) 85% *p.a* (E. Merck), kertas saring *Whatman* No. 40, membran filter *Millipore* 0,45 µm, *syringe* membran filter PTFE 0,45 µm (Agilent) dan vanili.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel vanili yang diperoleh dari laboratorium rempah-rempah di Balai Pengujian Mutu Barang, Kementerian Perdagangan, Jakarta Timur.

3.3.2 Pembuatan Larutan

a. Larutan fase gerak

Larutan asam fosfat 0,01 mol/L dibuat dengan cara melarutkan 0,675 mL *ortho-Phosphoric acid* (H_3PO_4) 85% yang dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dengan aquabides hingga tanda batas lalu dihomogenkan.

Larutan fase gerak dibuat dengan mencampurkan sebanyak 750 mL larutan asam fosfat 0,01 mol/L dan 250 mL larutan metanol kemudian dihomogenkan.

b. Larutan etanol 60%

Larutan etanol 60% dibuat dengan cara sebanyak 600 mL larutan etanol 100% dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL, selanjutnya ditambahkan aquabides hingga tanda batas dan dihomogenkan.

c. Larutan stok baku vanilin

Larutan stok baku 300 ppm dibuat dengan cara menimbang standar vanilin sebanyak 30 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambahkan larutan fase gerak hingga tanda batas lalu dihomogenkan.

d. Larutan standar vanilin

Larutan standar vanilin dibuat dengan cara melakukan pengenceran bertingkat larutan stok baku 300 ppm menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 5, 10, 20, 30, 40

dan 50 ppm yang dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, selanjutnya ditambahkan larutan fase gerak sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.3.3 Tahap Preparasi

a. Ekstraksi sampel vanili

Sampel vanili yang telah dihaluskan menggunakan blender ditimbang sebanyak 2,5 g dan direndam dengan 17,5 mL larutan etanol 60% dalam erlenmeyer 50 mL yang tertutup selama 4 jam. Hasil dari perendaman pertama tersebut dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL melalui penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No. 40, lalu kertas saring dibilas dengan 2,5 mL larutan etanol 60% dan disimpan untuk dipakai pada penyaringan kedua. Setelah perendaman pertama, sampel direndam kembali dengan 17,5 mL larutan etanol 60% selama 24 jam. Setelah itu, larutan disaring kembali menggunakan kertas saring yang sama dari perendaman pertama dan filtratnya disatukan dengan filtrat hasil perendaman pertama. Bilas sisa contoh dalam erlenmeyer dan kertas saring dengan larutan etanol 60% dan disatukan ke dalam labu ukur yang berisi saringan perendaman vanili dan ditepatkan dengan larutan etanol 60% sampai tanda batas, larutan tersebut adalah larutan sampel (SNI, 2002).

b. Preparasi fase gerak

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini yaitu campuran 75% asam fosfat dan 25% metanol. Fase gerak dimasukkan ke dalam wadah eluen dan dilakukan sonikasi selama 10-15 menit untuk menghilangkan gelembung-gelembung kecil. Sebelum disonikasi, fase gerak disaring menggunakan pompa vakum dan membran filter 0,45 μm .

c. Preparasi alat

Kondisi instrumen KCKT dibuat dalam kondisi awal seperti berikut:

Tabel 3. Kondisi awal instrumen KCKT

Parameter	Pengaturan
Kolom	C18
Sistem	Fase terbalik
Fase gerak	Asam fosfat 0,01 mol/L: metanol = 75: 25
Laju alir	0,2 mL/menit
Volume injeksi	20 μ l
Panjang gelombang	254 nm
Detektor	UV/VIS

3.3.4 Uji Validasi Metode

Uji validasi metode pada penelitian ini meliputi parameter yaitu linearitas, presisi, akurasi, batas deteksi dan batas kuantifikasi.

a. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi larutan standar vanilin secara linear dengan minimal 5 konsentrasi standar, dengan variasi konsentrasi (*International Conference on Harmonization*, 2014). Pada penelitian ini akan dibuat variasi konsentrasi larutan standar vanilin sebesar 5, 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Parameter linearitas dapat dihitung dengan melihat nilai koefisien korelasi (r) berdasarkan Persamaan 8 menggunakan larutan standar vanilin.

b. Presisi

Sebanyak 2,5 mL larutan sampel vanili dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan larutan fase gerak hingga tanda batas. Selanjutnya dilakukan pengulangan 6 kali replikasi pada hari yang sama dan diinjeksikan sebanyak 20 μ l pada sistem KCKT. Luas area puncak yang muncul diamat lalu dimasukkan ke persamaan garis regresi linear dan dihitung % RSD berdasarkan Persamaan 2 (Eurachem, 2014).

c. Akurasi

Sebanyak masing-masing 0,004 g; 0,008 g; 0,016 g *stock* standar vanilin 99% ditimbang dengan 3 kali pengulangan (3 kali replikasi) dan ditambahkan pada saat proses ekstraksi sampel. Selanjutnya sebanyak 2,5 mL larutan sampel akurasi vanili dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya, ditambahkan larutan fase gerak hingga tanda batas dan diinjeksikan sebanyak 20 µl pada sistem KCKT. Luas area puncak yang muncul diamati lalu dimasukkan ke persamaan garis regresi linear dan dihitung % *recovery* berdasarkan Persamaan 4 (Eurachem, 2014).

d. Batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ)

Penentuan LoD dan LoQ untuk sampel dapat dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi dengan konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dengan perhitungan statistik menggunakan Persamaan 9 dan Persamaan 10 (Miller and Miller, 1991).

3.3.5 Penentuan Kadar Vanilin

Larutan sampel vanili dipipet sebanyak 2,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian ditambahkan larutan fase gerak hingga tanda batas. Selanjutnya diinjeksikan sebanyak 20 µl pada sistem KCKT. Luas area puncak yang muncul diamat lalu dimasukkan ke persamaan garis regresi linear kemudian dihitung % kadar vanilin menggunakan Persamaan 12, di mana C_x adalah konsentrasi analit yang diukur dari persamaan regresi (ppm), F_p adalah faktor pengenceran, V_x adalah volume sampel dan B adalah bobot sampel (g).

$$\text{Kadar Vanilin (\%)} = \frac{C_x \times F_p \times V_x}{B} \times 100\% \quad (12)$$