

VALIDASI SPEKTROFOTOMETRI VISIBLE UNTUK PENENTUAN KADAR FORMALIN DALAM DAGING AYAM

SUDJARWO*, POEDJIARTI S*, PRAMITASARI A.R**

*) Pharmaceutical Chemistry Departement, Faculty of Pharmacy, Airlangga University

***) Undergraduate Student, Faculty of Pharmacy, Airlangga University

E-mail :sdjarwo@yahoo.com.

ABSTRACT

Formalin is a commercial name of formaldehyde solution 35-40% in water. Formalin kills virus, bacteria, fungi and parasite and has found wide use as a disinfectant with a broad efficiency. Formalin is often used as a food preservative with concentration range from 1,88–413,89 ppm (mg/kg), although it is not permitted since formalin is toxic for human consumption. Therefore the requirement of a chemical reagent for the examination of formalin in food is very necessary. The aim of this research is validating Spectrophotometric method to detect formalin in chicken meat. This research is conducted to develop method to detect formalin in chicken meat by reaction with chromotropic acid in strongly acidic media producing violet-red colour followed by detection with Spectrophotometric method at 567,0 nm. The research shows that the method is able to detect formalin in chicken with limit of detection is 0,0058 ppm and limit of quantitation is 0,0192 ppm. The standard curve gives regression $y = 0,5233x + 0,0397$, r value is 0,9998 ($p < 0,01$). Precision study shows Coefficient Variation 0,4039%. Recovery study shows (87,3934±1,0826)%. The samples of chicken collected from a traditional market in Surabaya are detected concentration formalin range from 74,7595-140,2042 ppm ($\mu\text{g/g}$; wet weight).

Keywords : validation, Spectrophotometric, formalin, chicken meat, chromotropic acid.

PENDAHULUAN

Validasi metode adalah proses yang dilakukan di laboratorium bahwa karakteristik metode analisis memenuhi persyaratan sesuai penggunaannya (Anonim, 2001). Menurut USP XXXI 2008), karakteristik metode analisis dinyatakan sebagai parameter analisis, yaitu selektifitas/spesifisitas, linieritas, batas kuantitasi, batas deteksi, presisi, akurasi, ruggedness dan ketegaran (*robustness*). Validasi metode dilakukan untuk menjamin reproduibilitas hasil. Metode Spektrofotometri sering dilakukan karena memiliki beberapa keuntungan, yaitu mempunyai sensitifitas yang tinggi, cara pengerjaan sederhana, cepat dan biaya relatif murah (Mulja & Syahrani, 1989).

Formalin adalah nama dagang larutan formaldehid dalam air dengan kadar 35–40%. Formalin biasanya mengandung golongan alkohol (metanol) sebanyak 10–15% yang berfungsi sebagai stabilisator supaya formaldehidnya tidak mengalami polimerasi (Arifin *et al.*, 2005). Formalin merupakan bahan pembunuh hama atau disinfektan, bahan pengawet mayat (Priyono, 2007 ; Koswara, 2009). Dan menurut BPOM (2005), kadar formalin dalam makanan adalah sekitar 1,88 – 413,89 ppm (mg/kg).

Ciri-ciri ayam yang diawetkan dengan formalin adalah berwarna putih bersih, tekstur daging lebih kenyal, tidak dihindangi lalat dan tidak mudah busuk (Suryadi *et al.*, 2008). Formalin dapat dianalisis dengan menggunakan pereaksi asam kromotropat dalam suasana asam kuat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah keunguan (Letourneau and Krog, 1952; Fagnani, 2003). Reaksi ini spesifik untuk formaldehid dan tidak dihasilkan pada reaksi dengan senyawa aldehid dan senyawa karbon lain, seperti keton dan asam karboksilat.

Optimasi pH, penambahan asam kromotropat dan penambahan asam sulfat pekat dan optimasi kestabilan warna adalah langkah awal yang harus dilakukan sebelum validasi metode.

METODE PENELITIAN

Alat : Spektrofotometer UV-Vis Lambda E201 Perkim Elmer, Neraca Analitik *O-Haus Adventurer*, alat – alat gelas yang biasa digunakan pada laboratorium kontrol kualitas.

Bahan : larutan formaldehid 37 % (teknis, UPT BPPTK LIPI), garam disodium asam kromotropat (p.a, E Merck, 1.02498.0025), asam sulfat pekat (p.a, Fluka, 30743), aquadestilata, ayam potong bebas formalin, ayam potong dari pasar tradisional

yang dikoleksi dari beberapa Pasar Tradisional di Surabaya pada periode Juni-Juli 2010.

Prosedur penelitian

Optimasi, dilakukan pengaruh pH, penambahan asam kromotropat, asam sulfat pekat dan kestabilan warna dari reaksi formalin dengan asam kromotropat

Penetapan kadar air ayam potong, dilakukan menurut AOAC 72, (1989).

Validasi Metode

Selektifitas, dilakukan pada larutan formalin, ayam potong yang tidak mengandung formalin dan ayam potong yang ditambahkan formalin. Selanjutnya ditambahkan larutan asam kromotropat 0,5% dan H_2SO_4 pekat. Diamati spektranya pada panjang gelombang 400-800 nm

Linieritas, larutan formalin berbagai konsentrasi, ditambahkan larutan asam kromotropat 0,5% dan asam sulfat pekat, kemudian diamati serapannya.

LOD/LOQ, larutan formalin berbagai konsentrasi terkecil dan blanko, ditambahkan larutan asam kromotropat 0,5% dan asam sulfat pekat, kemudian diamati serapannya.

Presisi, larutan formalin 0,444 ppm ditambahkan H_2SO_4 pekat dan larutan asam kromotropat 0,5%. Selanjutnya larutan diamati serapannya sebanyak sepuluh kali. **Akurasi**, ditimbang teliti kurang lebih

HASIL

Optimasi

Pengaruh pH,

Tabel 1 : Optimasi pengaruh pH

pH	Warna yang dihasilkan
1	(+) Ungu
2	(-) Tidak berwarna
3	(-) Tidak berwarna
4	(-) Tidak berwarna
5	(-) Tidak berwarna

Reaksi formalin dengan asam kromotropat berwarna ungu terjadi pada suasana pH=1, seperti yang dilaporkan Sakiara (1999)

Optimasi penambahan asam kromotropat

Penambahan asam kromotropat 0,5% optimum adalah 1,0–1,7 ml. Pada penelitian ini digunakan 1,2 ml dengan alasan bahwa

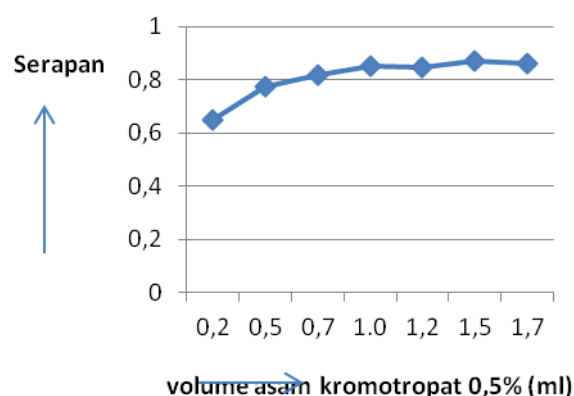
3,0 g daging ayam potong yang tidak mengandung formalin, kemudian ditambahkan larutan formalin berbagai konsentrasi, kemudian dидiamkan selama 3 menit. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml secara kuantitatif dengan bantuan kurang lebih 10 ml aquadest, kemudian disaring. Larutan tersebut dipipet 3,0 ml dan ditambahkan asam kromotropat 0,5% dan asam sulfat pekat, selanjutnya diukur serapannya.

Penetapan kadar formalin pada sampel ayam potong, Sampel ayam potong diambil dari salah satu pasar tradisional di Surabaya yang diduga mengandung formalin dengan memperhatikan ciri – ciri fisiknya, antara lain strukturnya yang kenyal, putih bersih dan tidak dihinggapai lalat.

Uji kualitatif, dilakukan dari reaksi warna yang terjadi dan spektrumnya.

Uji kuantitatif, ditimbang sampel (2,0 g), kemudian dihaluskan, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml secara kuantitatif dengan bantuan kurang lebih 10 ml aquadest, dan saring. Ekstrak 3,0 ml ditambahkan pereaksi asam kromotropat 0,5 % dan asam sulfat pekat, amati serapannya

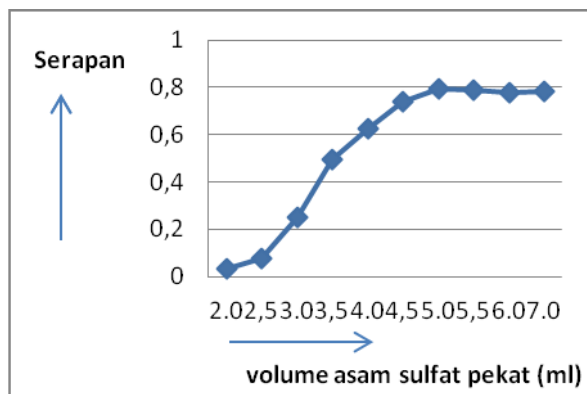
penambahan 1,2 ml asam kromotropat 0,5% sudah dapat membentuk warna merah-ungu.



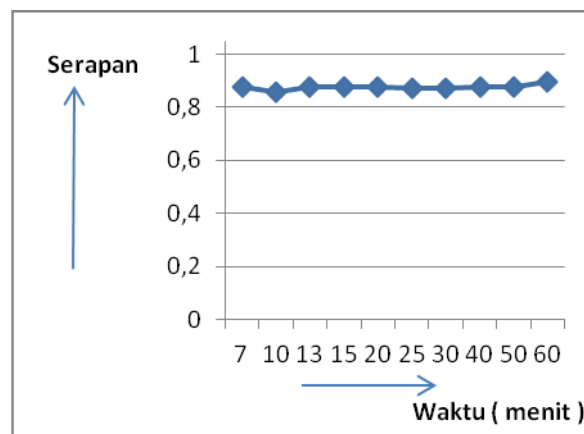
Gambar 1 : Kurva serapan terhadap optimasi penambahan asam kromotropat 0,5%

Optimasi penambahan asam sulfat pekat

Dari penambahan H_2SO_4 pekat optimum 5,0–7,0 ml, sehingga pada penelitian ini digunakan volume 6,0 ml.



Gambar 2 : Kurva serapan terhadap optimasi penambahan volume asam sulfat pekat



Gambar 3 : Grafik optimasi kestabilan warna

Optimasi kestabilan warna

Kestabilan warna dari formalin 2,22 ppm dengan asam kromotropat 0,5% dan asam sulfat pekat terjadi pada 15 – 60 menit. Pada penelitian ini digunakan menit ke-15 karena nilai serapan sudah stabil.

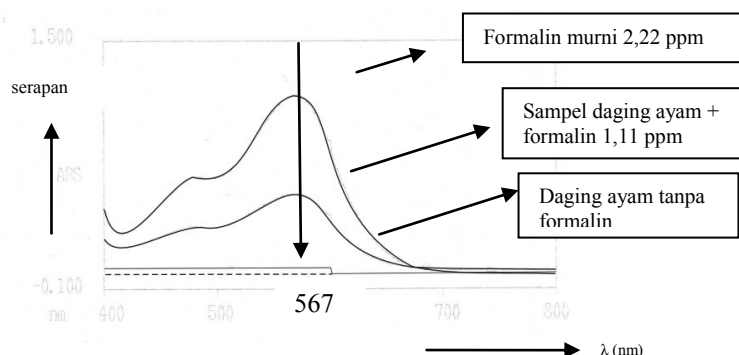
Penetapan kadar air daging ayam potong

Tabel 2 : Penetapan kadar air daging ayam potong

Sampel	Replikasi	Berat basah	Berat kering	Kadar air
Blanko	1	2,0425 g	0,6089 g	70,1885 %
	2	2,0612 g	0,6521 g	68,3769 %
	3	2,0500 g	0,6352 g	69,0146 %
	Rata-rata			69,1933 %
	SD			0,7503 %
	KV			1,0844 %
Pedagang A	1	1,9940 g	0,4571 g	77,0762 %
	2	1,9974 g	0,4742 g	76,2391 %
	3	1,9882 g	0,4668 g	76,5215 %
	Rata-rata			76,6123 %
	SD			0,3477 %
	KV			0,4539 %
Pedagang B	1	2,1413 g	0,4867 g	77,2708 %
	2	2,0769 g	0,4489 g	78,3861 %
	3	2,0698 g	0,4356 g	78,9545 %
	Rata-rata			78,2038 %
	SD			0,6993 %
	KV			0,8943 %
Pedagang C	1	2,0348 g	0,4368 g	78,5335 %
	2	2,0459 g	0,4902 g	76,0399 %
	3	2,0637 g	0,4696 g	77,2447 %
	Rata-rata			77,2727 %
	SD			1,0182 %
	KV			1,3177 %

Validasi Metode

Selektifitas

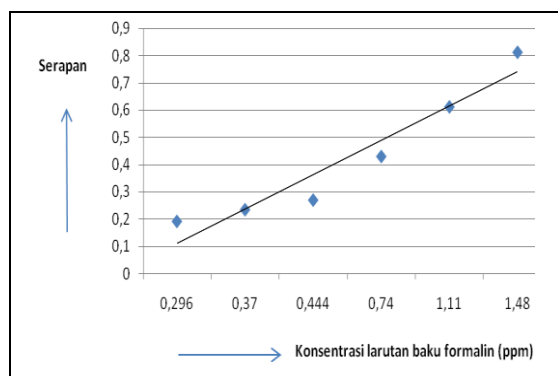


Gambar 4 : Spektra ekstrak daging ayam potong dibandingkan dengan spektra blanko dan formalin murni

Berdasarkan spektra di atas, maka dapat disimpulkan bahwa panjang gelombang 567,0 nm dapat digunakan sebagai panjang gelombang

terpilih penentuan kadar formalin di dalam daging ayam, karena panjang gelombang tersebut tidak terganggu oleh matriks sampel.

Linieritas



Gambar 5 : Kurva linieritas larutan formalin

Pada linieritas formalin, diperoleh persamaan regresi $y = 0,5233x + 0,0397$; $r = 0,9998$; ($p = 0,000$; $p < 0,01$), dan harga $V_{x0} = 4,2581\%$ ($< 5\%$). Berdasarkan data tersebut, maka dapat disimpulkan

bahwa terdapat hubungan linier antara konsentrasi dengan serapan, sesuai dengan Hukum Beer-Lambert.

LOD/LOQ

Tabel 3 : LOD/LOQ

No.	A _{Blank}	Formalin (ppm)	Absorbtion
1	0,011	0,0370	0,019
2	0,011	0,0444	0,028
3	0,011	0,0740	0,034
4	0,012	0,1480	0,074
5	0,010	0,1850	0,079
6	0,010		
7	0,011		
8	0,012		
9	0,010		
10	0,010		
Rata-rata	0,0108		
SD	0,0008		

$Y = 0,4160 x + 0,0062$
 $r = 0,9864$

$LOD = 3 \times 0,008 / 0,4160$
 $= 0,0058 \text{ ppm}$

$LOQ = 10 \times 0,0008 / 0,4160$
 $= 0,0192$

Berdasarkan nilai LOD = 0,0058 ppm dan LOQ = 0,0192 ppm, maka pada penentuan kadar formalin yang dapat dianalisis secara kuantitatif lebih besar

atau sama dengan 0,0192 ppm yang mempunyai kesalahan atau selektifitas yang dapat diterima

Presisi

Tabel 4 : Presisi

No.	Serapan
1	0,290
2	0,290
3	0,289
4	0,291
5	0,292
6	0,289
7	0,290
8	0,291
9	0,292
10	0,292
Rata-rata	0,2906
SD	$1,1730 \times 10^{-3}$
KV	0,4039%

Berdasarkan Koefisien Variasi (K.V)=0,4039%, maka presisi memenuhi syarat yaitu $KV \leq 2\%$ (Anonim, 2001)

Akurasi

Tabel 5 : Akurasi formalin di dalam sampel daging ayam potong

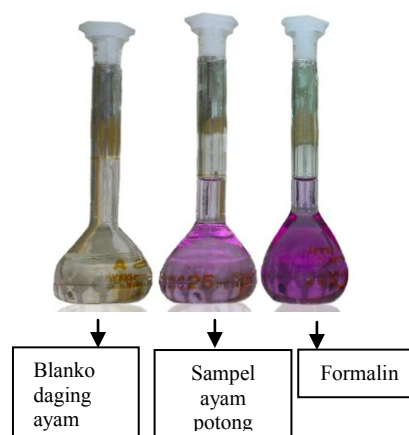
Berat Formalin yang ditambahkan (μg)	Pengamatan	Berat Formalin yang diperoleh (μg)	(%) Recovery
370,0000	1	326,8428	88,3359
	2	329,1609	88,9624
462,5000	1	398,7019	86,2058
	2	401,0199	86,7070
555,0000	1	489,1052	88,1271
	2	491,4233	88,5447
740,0000	1	635,3824	85,8584
	2	656,4634	88,7113
925,0000	1	797,7064	86,2385
	2	797,7064	86,2385
		Rata-rata	87,3930
		SD	1,2408
		KV	1,4198

Berdasarkan akurasi, diperoleh rata-rata % *recovery* sebesar $(87,3930 \pm 1,2408)\%$ dengan harga koefisien variasi 1,2388%, sehingga hasil akurasi tersebut memenuhi syarat, persyaratan akurasi untuk sampel biologis adalah 80-120% (Carr&Wahlich, 1990).

Penetapan kadar formalin dalam ayam potong Analisis kualitatif formalin dalam sampel ayam potong

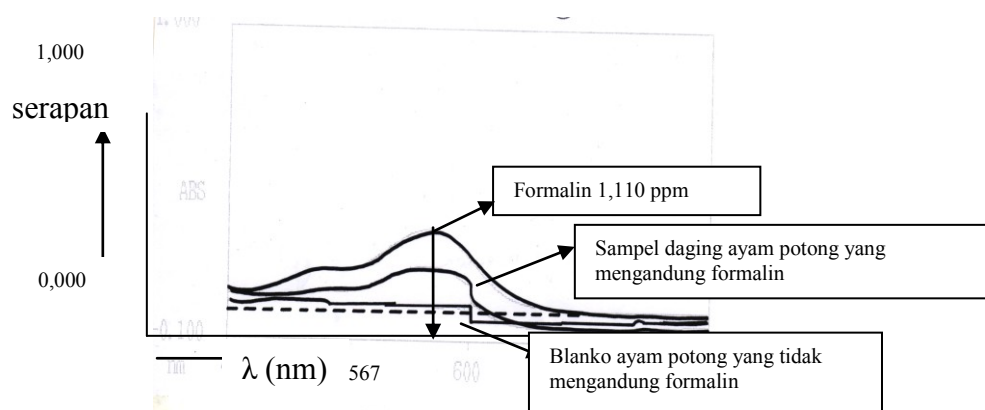
Reaksi warna

Dari hasil reaksi warna, dapat dilihat bahwa warna merah-ungu yang terbentuk dari ekstrak daging ayam potong sama dengan formalin murni, sehingga dapat disimpulkan sampel ayam potong tersebut mengandung formalin.



Gambar 6 : Reaksi warna dari ekstrak daging ayam potong yang mengandung formalin dibandingkan dengan formalin murni dan blanko ekstrak daging ayam potong yang tidak mengandung formalin

Spektra formalin



Gambar 7 : Spektra ekstrak daging ayam potong, ekstrak blanko daging ayam potong yang tidak mengandung formalin dibandingkan dengan spektra formalin murni

Analisis kuantitatif formalin dalam daging ayam potong

Tabel 6 : Kadar formalin dalam daging ayam potong

Sampel	Pengamatan	Kadar air (%)	Kadar formalin dalam daging ayam potong (ppm (µg/g);berat basah)
A	1	76,6677	76,7198
	2		72,7992
	Rata-rata		74,7595
B	1	78,2038	76,8572
	2		76,7179
	Rata-rata		76,7876
C	1	77,2727	139,0498
	2		141,3585
	Rata-rata		140,2042

Berdasarkan reaksi warna, spektra dan analisis kuantitatif, maka dapat disimpulkan bahwa sampel daging ayam potong tersebut mengandung formalin dengan kadar 74,7595-140,2042 ppm ($\mu\text{g/g}$; berat basah).

PEMBAHASAN

Penelitian ini termasuk dalam kategori 2, yang meliputi parameter validasi selektifitas/spesifisitas, linieritas, batas kuantitasi, batas deteksi, presisi dan akurasi (Anonim, 2001).

Dan dari optimasi pengaruh pH diperoleh hasil bahwa pada pH=1 terbentuk warna merah-ungu seperti yang dilaporkan Fagnani *et al* (2003). Penambahan asam kromotropat yang optimum adalah pada volume 1,2 ml, peneliti lain 5% asam kromotropat dalam aquadest sebanyak 300 μl (Fagnani *et al*, 2003 ; Gigante *et al*, 2003). Perbedaan tersebut terjadi karena literatur tersebut berdasarkan reaksi secara stoikiometri, sedangkan pada penelitian ini secara stoikiometri ternyata belum optimum. Pada penambahan asam sulfat pekat yang optimum adalah 6,0 ml, peneliti lain asam sulfat pekat untuk melarutkan asam kromotropat dengan konsentrasi 72% (Letourneau & Krog, 1952). Pada penelitian ini asam sulfat tidak untuk melarutkan asam kromotropat karena warna yang dihasilkan tidak konstan dan adanya penambahan aquadest akan mempengaruhi perbandingan asam sulfat yang digunakan terhadap volume akhir larutan (Olansky *et al*, 1975). Kestabilan warna diperoleh pada 15 menit, sedangkan peneliti lain kestabilan warna diamati 10 menit setelah penambahan asam kromotropat dan asam sulfat pekat ke dalam formalin (Olansky *et al*, 1975).

Uji selektifitas diperoleh pada panjang gelombang 567,0 nm karena tidak diganggu oleh matriks sampel. Peneliti lain melaporkan bahwa formalin dapat dianalisa pada panjang gelombang 570-580 nm (Fagnani *et al*, 2003). Selisih panjang gelombang tiga nm ini dapat dikatakan panjang gelombangnya sama.

Pada linieritas, diperoleh $y = 0,5233x + 0,0397$ ($r = 0,9998; p < 0,01$), berarti ada hubungan yang linier antara konsentrasi formalin dengan serapan dan memenuhi Hukum Lambert-Beer.

Pada penentuan LOD/LOQ, diperoleh LOD 0,0058 ppm dan LOQ=0,0192 ppm. Peneliti lain LOD=0,0441 ppm dan LOQ=0,1470 ppm (Suryadi

et al., 2008). Perbedaan LOD/LOQ ini tergantung ketelitian membuat larutan formalin.

Pada uji presesi diperoleh koefisien variasinya 0,4039%, dipersyaratkan $KV \leq 2\%$ (Anonim, 2001)

Daging ayam potong memiliki kandungan air yang sangat tinggi, sekitar 70% (Hidajati, 2005). Penetapan kadar air dilakukan sesuai dengan metode yang tertera pada AOAC (1989), diperoleh hasil kadar air pada daging ayam yang tidak mengandung formalin (sebagai blanko) 69,1933%, sedangkan kadar air dalam ayam potong dari pedagang A=76,6677%, pedagang B=78,2038% dan pedagang C=77,2727 %.

Uji akurasi, diperoleh rata-rata (%) $\text{recovery} = 87,3930 \pm 1,2408$. Dari hasil validasi diterapkan pada ayam potong di salah satu pasar tradisional di Surabaya yang dicurigai mengandung formalin. Dan dari hasil analisis kadar formalin yang terdapat dalam daging ayam, diperoleh kadar formalin dalam daging ayam dari pedagang A,B dan C dibandingkan terhadap berat basahnya adalah 74,7595, 76,7876, dan 140,2042 ppm ($\mu\text{g/g}$; berat basah).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian validasi metode Spektrofometri pada penetapan kadar formalin dalam ayam potong, dapat diambil kesimpulan : selektifitas menghasilkan panjang gelombang terpilih 567,0 nm; linieritas menghasilkan persamaan regresi $y = 0,5233x + 0,0397$ dan $r = 0,9998$ ($p = 0,000; p < 0,01$), dan harga $V_{x0} = 4,2581\%$ ($V_{x0} < 5\%$); LOD = 0,0058 ppm; LOQ = 0,0192 ppm; presisi=0,4039%; akurasi diperoleh (%) Recovery sebesar $(87,3930 \pm 1,2408)\%$. Penerapan validasi metode Spektrofotometri pada penentuan kadar formalin di dalam ayam potong di salah satu pasar tradisional di Surabaya = 74,7595-140,2042 ppm ($\mu\text{g/g}$; berat basah)

Saran

Hasil validasi metode pada penelitian ini dapat diterapkan pada identifikasi formalin di dalam

ayam potong yang beredar di pasaran untuk menjamin keamanan masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2001. **Kodeks Makanan Indonesia**. Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 6-9.
- Anonim. 2007. **Formalin No..!! Chitosan Yes..!!!**. Dinas Kelautan dan Perikanan Propinsi Banten, Banten.
- Anonim. 2008. **USP XXXI / NF XXVI**. The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville.
- Arifin, Z., Murdiati, T. B dan Firmansyah, R. 2005. **Deteksi Formalin dalam Ayam Broiler di Pasaran**. Balai Penelitian Veteriner, Bogor.
- Carr, G.P and Wahlich, J.C., 1990. A Practical Approach to Method Validation in Pharmaceutical and Analysis. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, 8: 613-626.
- Fagnani, E., Melios, C.B., Pezza, L., Pezza, H.R. 2003. Chromotropic acid/formaldehyde reaction in strongly acidic media. The role of dissolved oxygen and replacement of concentrated sulphuric acid. **Talanta**, Vol. 60, p. 171 – 176.
- Gigante, A. C., Gotardo, M.A., Tognolli, J.O., Pezza, L., Pezza, H.R. 2003. Spectrophotometric determination of formaldehyde with chromotropic acid in phosphoric acid medium assisted by microwave oven. **Microchemical Journal**, Vol. 77, p. 47–51.
- Horwitz, William. 1989. **Official Methods of Analysis of AOAC International 17th edition**. AOAC International, USA.
- Koswara, S. 2009. **Mengawetkan Tahu Tanpa Formalin**. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor : Bogor.
- Letourneau, Duane, dan Krog, Norman, 1952. **The Use of Chromotropic Acid for The Quantitative Determination of 2,4-Dichlorophenoxy-acetic Acid**. Scientific Journal Series of the Minnesota Agricultural Experiment Station, No 2817, hal. 822-823.
- Mulja, M., Syahrani, A., 1989. **Aplikasi Analisis Spektrofotometri UV-Vis**. Mephiso Grafika : Surabaya.
- Olansky, A.D.S and Deming, S.N. 1975. Optimization and Interpretation of Serapance Response in the Determination of formaldehid with chromotropic acid. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 83, p. 241-249.
- Prijono, E. 2007. **Masalah Pemakaian Formalin pada Pangan Ditinjau dari Aspek Hukum Keamanan Pangan**. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjajaran Bandung : Bandung.
- Sakiara, K.A., Pezza, L. , Melios, C.B., Pezza, H.R., Moraes, M. 1999. Spectrophotometric Determination of Dipyrone in Pharmaceutical Preparations by Using Chromotropic Acid. **Farmaco**, Vol. 54, p. 629–635.
- Suryadi, H., Hayun dan Harsono. 2008. **Pemilihan Metode Analisis Formalin Berdasarkan Pada Reaksi Warna dan Spektrofotometri UB – Tampak**. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Umboh, H. 2009. **Daging Berformalin**. Indonesian Veterinary-Peduli Kesehatan Hewan. www.hewan-sakit.com. Diakses tanggal 24 Januari 2009