



KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA  
NOMOR HK.01.07/MENKES/178/2024  
TENTANG  
SUPLEMEN KODEKS MAKANAN INDONESIA KETIGA

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA,

- Menimbang : a. bahwa penyelenggaraan keamanan pangan salah satunya dilakukan melalui pengaturan terhadap bahan tambahan pangan;
- b. bahwa Kodeks Makanan Indonesia sebagai standar dan persyaratan mutu bahan tambahan pangan yang telah ditetapkan melalui Keputusan Menteri Kesehatan Nomor HK.01.07/Menkes/261/2018 tentang Pemberlakuan Kodeks Makanan Indonesia, Keputusan Menteri Kesehatan Nomor HK.01.07/Menkes/1142/2022 tentang Suplemen Kodeks Makanan Indonesia, dan Keputusan Menteri Kesehatan Nomor HK.01.07/Menkes/24/2023 tentang Suplemen Kodeks Makanan Indonesia Kedua, perlu dilengkapi dan disesuaikan dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, serta kebutuhan dalam keamanan pangan;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan huruf b, serta untuk melaksanakan ketentuan Pasal 13 ayat (2) huruf a Peraturan Pemerintah Nomor 86 Tahun 2019 tentang Keamanan Pangan, perlu menetapkan Keputusan Menteri Kesehatan tentang Suplemen Kodeks Makanan Indonesia Ketiga;

- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 227, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5360);
2. Undang-Undang Nomor 17 Tahun 2023 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2023 Nomor 105, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6887);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 86 Tahun 2019 tentang Keamanan Pangan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2019 Nomor 249, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6442);
4. Peraturan Presiden Nomor 18 Tahun 2021 tentang Kementerian Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 83);
5. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 33 Tahun 2012 tentang Bahan Tambahan Pangan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 757);
6. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 5 Tahun 2022 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2022 Nomor 156);

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN TENTANG SUPLEMEN KODEKS MAKANAN INDONESIA KETIGA.

KESATU : Menetapkan Suplemen Kodeks Makanan Indonesia Ketiga sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Keputusan Menteri ini.

KEDUA : Suplemen Kodeks Makanan Indonesia Ketiga sebagaimana dimaksud dalam Diktum KESATU merupakan standar dan persyaratan mutu bahan tambahan pangan yang harus dipenuhi oleh pelaku usaha pangan.

- KETIGA : Pelaku usaha pangan sebagaimana dimaksud dalam Diktum KEDUA terdiri atas produsen bahan tambahan pangan, importir bahan tambahan pangan, distributor bahan tambahan pangan, dan produsen pangan olahan.
- KEEMPAT : Keputusan Menteri ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Jakarta  
pada tanggal 5 Maret 2024

MENTERI KESEHATAN  
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

BUDI G. SADIKIN

Salinan sesuai dengan aslinya

Kepala Biro Hukum  
Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan,



Indah Febrianti, S.H., M.H.  
NIP 197802122003122003

LAMPIRAN  
KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN  
REPUBLIK INDONESIA  
NOMOR HK.01.07/MENKES/178/2024  
TENTANG  
SUPLEMEN KODEKS MAKANAN  
INDONESIA KETIGA

**“SHADING” YANG MENUNJUKKAN PERUBAHAN PADA KODEKS MAKANAN  
INDONESIA**

*Shading* pada teks Kodeks Makanan Indonesia (KMI) digunakan untuk menandai bagian yang baru, mengalami perubahan, penghilangan atau penambahan.

Jika terdapat perubahan pada suatu parameter maka pada awal parameter yang diubah dituliskan kata ***Perubahan***. Jika terdapat penambahan parameter, dituliskan kata ***Tambahan persyaratan***. Untuk parameter yang dihilangkan pada awal parameter dituliskan ***Hilangkan persyaratan***.

Contoh:

***Perubahan***

Ukur serapan *Larutan uji* seperti tertera pada *Penetapan kadar* pada panjang gelombang antara 460 dan 488 nm. Ukur serapan larutan dengan kadar sepuluh kali dari kadar *Larutan uji* pada *Penetapan Kadar* pada panjang gelombang serapan maksimum 332 nm: perbandingan  $A_{488}/A_{460}$  antara 0,77 dan 0,85, perbandingan  $A_{332}/A_{460}$  antara 0,63 dan 0,75.

***Tambahan persyaratan***

Larutan dalam air memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 629 nm.

***Hilangkan persyaratan***

*Karotenoid* Warna larutan zat dalam aseton hilang setelah penambahan larutan *natrium nitrit P 5%* dan *asam sulfat 0,5 M*.

### **DAFTAR MONOGRAFI**

1. Amonium Hidroksida
2. Beta-Apo-8'-Karotenol CI.No.40820
3. Biru Berlian FCF CI.No.42090
4. Ekstrak Luo Han Guo
5. Ester Gliserol Resin Kayu
6. Etil Maltol
7. Glikosida Steviol
8. Gom Biji Asam Jawa
9. Pektin
10. Polidimetilsiloksan
11. Silikon Dioksida Halus

### **DAFTAR LAMPIRAN**

1. <85> Penetapan Kadar Glikosida Steviol
2. <851> Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol

## **DAFTAR PERUBAHAN**

### **DAFTAR MONOGRAFI BARU**

1. Amonium Hidroksida
2. Ekstrak Luo Han Guo
3. Etil Maltol
4. Gom Biji Asam Jawa
5. Polidimetilsiloksan

### **DAFTAR MONOGRAFI DENGAN PERUBAHAN**

1. Beta-Apo-8'-Karotenal CI.No.40820
2. Biru Berlian FCF CI.No.42090
3. Ester Gliserol Resin Kayu
4. Glikosida Steviol
5. Pektin
6. Silikon Dioksida Halus

### **DAFTAR LAMPIRAN BARU**

1. Penetapan Kadar Glikosida Steviol
2. Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol

## DAFTAR MONOGRAFI SUPLEMEN KODEKS MAKANAN INDONESIA KETIGA

### AMONIUM HIDROKSIDA

*Ammonium Hydroxide*

**INS** 527

**CAS** 7664-41-7 (Amonia)

**SINONIM** *Strong ammonia solution, aqueous ammonia, ammonia solution*

NH<sub>3</sub> (aqueous)

**BM** 17,03

Amonium hidroksida mengandung NH<sub>3</sub> tidak kurang dari 27% dan tidak lebih dari 30%.

**PEMERIAN** Cairan bening, tidak berwarna, bau khas yang sangat menyengat. Amonia menghilang dengan cepat setelah terpapar udara.

**PENGGUNAAN** Pengatur keasaman.

### IDENTIFIKASI

1. *Amonia* Basahi batang kaca dengan *asam hidroklorida P*, dekatkan pada zat: terbentuk asap putih pekat.
2. *Bobot jenis <904>* Lebih kurang 0,90.

### KEMURNIAN

1. *Residu tidak menguap <703>* Tidak lebih dari 0,02%; lakukan penetapan dengan menguapkan 11 ml (10 g) zat dalam cawan platina atau porselen yang telah ditara dan keringkan pada suhu 105° selama 1 jam.
2. *Zat mudah teroksidasi* Encerkan 4 ml zat dengan 6 ml air, tambahkan sedikit *asam sulfat encer LP* dan 0,1 ml *kalium permanganat 0,1 N*: terjadi warna merah muda yang tidak hilang sempurna dalam 10 menit.
3. *Timbal* Tidak lebih dari 2 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.

**PENETAPAN KADAR** Tara saksama labu bersumbat kaca 125 ml yang berisi 35,0 ml *asam sulfat 1 N*. Dinginkan zat dalam botol aslinya sampai suhu 10° atau lebih rendah. Pipet 10 ml zat dari dekat bagian dasar botol (jangan gunakan vakum untuk pengambilan zat). Bersihkan cairan yang menempel pada bagian luar pipet, buang 1 ml pertama. Pegang pipet tepat di atas permukaan *asam sulfat 1 N*, pindahkan 2 ml ke dalam labu, sisakan paling sedikit 1 ml di dalam pipet. Sumbat labu, aduk, timbang kembali untuk mendapatkan berat zat. Tambahkan *merah metil LP* dan titrasi kelebihan asam sulfat dengan *natrium hidroksida 1 N LV* hingga warna hilang.

Tiap ml natrium hidroksida 1 N  
setara dengan 17,03 mg NH<sub>3</sub>

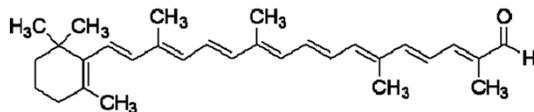
### **BETA-APO-8'-KAROTENAL**

*β-Apo-8'-Carotenal*

**INS** 160e;

**CAS** [1107-26-2];

**SINONIM** *CI Food Orange 6; CI (1975) No. 40820*



*Semua-trans-β-apo-8'-karotenal*

**C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>O**

**BM** 416,65

**DEFINISI** Spesifikasi berlaku untuk β-apo-8'-karotenal yang sebagian besar adalah all-trans-β-apo-8'-karotenal dan dapat juga mengandung sedikit karotenoid lain seperti all-trans-krosetindialdehid, all-trans-β-apo-12'-karotenal dan all-trans-β-karoten. Sediaan dalam perdagangan yang digunakan sebagai bahan tambahan pangan dibuat dari β-apo-8'-karotenal yang memiliki spesifikasi tersebut dan diformulasikan sebagai suspensi dalam minyak pangan, emulsi dan serbuk terdispersi air. Sediaan tersebut dapat memiliki rasio isomer cis.

β-apo-8'-karotenal mengandung **C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>O** tidak kurang dari 96% dihitung terhadap total zat pewarna.

**PEMERIAN** Hablur atau serbuk hablur, warna ungu tua dengan kilap logam, peka terhadap oksigen dan cahaya sehingga harus disimpan dalam wadah terlindung dari cahaya dan diisi gas inert.

**KELARUTAN** Tidak larut dalam air, sukar larut dalam etanol dan dalam minyak nabati.

**PENGGUNAAN** Pewarna.

### **IDENTIFIKASI**

#### ***Perubahan***

1. Ukur serapan *Larutan uji* seperti tertera pada *Penetapan kadar* pada panjang gelombang antara 460 dan 488 nm. Ukur serapan larutan dengan kadar sepuluh kali dari kadar *Larutan uji* pada *Penetapan Kadar* pada

panjang gelombang serapan maksimum 332 nm: perbandingan  $A_{488}/A_{460}$  antara 0,77 dan 0,85, perbandingan  $A_{332}/A_{460}$  antara 0,63 dan 0,75.

### **Hilangkan persyaratan**

2. **Karotenoid** Warna larutan zat dalam aseton hilang setelah penambahan larutan *natrium nitrit P 5%* dan *asam sulfat 0,5 M*.

### **KEMURNIAN**

1. *Abu sulfat Metode 1* Tidak lebih dari 0,1%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu <707>* menggunakan 2 g zat.
2. **Karotenoid selain  $\beta$ -apo-8'-karotenal** Tidak lebih dari 3% total zat warna. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi <903>*.

*Fase gerak* Larutkan 50 mg *butil hidroksitoluen* dalam 20 ml *2-propanol P* dan tambahkan 0,2 ml *N-etildiisopropilamin P*, 25 ml *amonium asetat P 0,2%*, 455 ml *asetonitril P* dan lebih kurang 450 ml *metanol P* dalam labu tentukur 1000-ml. Diamkan sampai suhu ruang dan encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Gunakan larutan dalam 2 hari.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml larutkan dan encerkan dengan *tetrahidrofuran P* (tambahkan larutan *butil hidroksitoluen P 0,025%* sebagai penstabil) sampai tanda. Pipet 10 ml larutan masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml encerkan dengan *etanol P* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 463 nm atau foto dioda *array*, kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi  $C_{18}$  atau yang setara dengan ukuran partikel 5  $\mu$ m, pertahankan suhu kolom pada suhu 30°, autosampler dingin pada suhu 15°, laju alir lebih kurang 0,6 ml per menit.

*Prosedur* Suntikkan lebih kurang 10  $\mu$ l *Larutan uji* ke dalam kromatogram eluasi selama 35 menit. Rekam kromatogram dan ukur semua respon puncak. Waktu retensi semua-trans- $\beta$ -apo-8'-karotenal berada dalam rentang 7 – 9 menit. Waktu retensi relatif minor karotenoid terhadap semua-trans- $\beta$ -apo-8'-karotenal adalah semua-trans-krokesindialdehid (0,54); semua-trans- $\beta$ -apo 12'-karotenal (0,84); semua-trans- $\beta$ -karoten (2,55). Hitung persentase karotenoid selain  $\beta$ -apo-8'-karotenal dengan rumus:

$$\left( \frac{A_1 - A_2}{A_1} \right) \times 100$$

$A_1$  = jumlah respon puncak semua kromatogram selain puncak pelarut

$A_2 =$  respon puncak  $\beta$ -apo-8'-karotenal

3. *Timbal* Tidak lebih dari 2 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom metode yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan *Kadar pewarna dengan spektrofotometri (metode 2)*, seperti tertera pada *Pewarna <1301>* menggunakan bobot zat lebih kurang 80 mg volume dari tiga labu tentukur =  $V_1 = V_2 = V_3 = 100$  ml; volume dari dua pipet =  $v_1 = v_2 = 5$  ml; ( $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) 2640. Ukur pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 461 nm. Hitung presentase dari total kandungan pewarna menggunakan rumus:

$$\left( \frac{A \times V_1 \times D}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times W} \right) \times 100$$

A = serapan dua kali pengenceran larutan pada 461 nm

D = faktor pengenceran  $(V_2 \times V_3) / (v_1 \times v_2)$

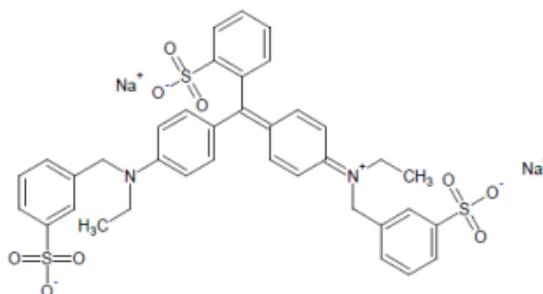
### **BIRU BERLIAN FCF**

*Brilliant Blue FCF*

**INS** 133;

**CAS** [3844-45-9];

**SINONIM** *CI Food Blue 2, FD&C Blue No.1, CI (1975) No. 42090*



*Dinatrium 3-[[N-etil-N-[4-[[4-[N-etil-N-(3-sulfonatobenzil)amino]fenil](2-sulfonatofenil)metilen]-2,5-sikloheksa-dien-1-yliden]ammoniumetil]benzensulfonat;*

*Garam dinatrium N-etil-N-[4-[[4-[etil-(3-sulfofenil)metil]amino]fenil](2-sulfofenil)metilen]-2,5-siklohexadien-1-yliden]-3-sulfobenzenmetanaminium;*

*Dinatrium;2-[[4-[etil-[(3-sulfonatofenil)metil]amino]fenil]-[4-[etil-[(3-sulfonatofenil)metil]azaniumylidien]sikloheksa-2,5-dien-1-yliden]metil]benzensulfonat;*

*Dinatrium a-(4-(N-etil-3-sulfonatobenzilamino)fenil)- a-(4-(N-etil-3-sulfonatobenzilamino)sikloheksa-2,5-dienyliden)toluen-2-sulfonat*

C<sub>37</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub>

**BM** 792,86

**DEFINISI** Biru berlian mengandung terutama dinatrium 3-[N-etil-N-[4-[[4-[n-etil-N-(3-sulfobenzil)-amino]fenil](2-sulfofenil)metilen]-2,5-sikloheksadien-1-yliden]ammoniometil]benzensulfonat dan isomernya serta zat warna lain bersama dengan natrium klorida dan/atau natrium sulfat sebagai dasar komponen utama bahan tak berwarna. Dibuat dengan kondensasi asam 2-formibenzensulfonat dengan campuran asam 3-[(N-etil-N-fenilamino)metil]benzelsulfonat dan 2- dan 4- isomer untuk membentuk prekursor *leuco base*. Oksidasi prekursor *leuco base* mengandung senyawa krom atau mangan menghasilkan pewarna yang menghasilkan pewarna yang dimurnikan dan diisolasi sebagai garam dinatrium.

[Catatan: Zat warna dapat dikonversi terhadap Aluminium lake dan berlaku Spesifikasi umum untuk aluminium lake dari zat warna]

Biru berlian mengandung C<sub>37</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> tidak kurang dari 85% total zat warna.

**PEMERIAN** Serbuk atau granul, biru.

**KELARUTAN** Larut dalam air, sedikit larut dalam etanol.

**PENGGUNAAN** Pewarna.

#### **IDENTIFIKASI**

##### ***Hilangkan persyaratan***

Pewarna <1301> Memenuhi uji.

##### ***Tambahan persyaratan***

Spektrum serapan larutan dalam air memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 629 nm.

##### ***Perubahan***

#### **KEMURNIAN**

1. *Susut pengeringan* <912> Tidak lebih dari 15% bersama klorida dan sulfat dihitung sebagai garam natrium. Lakukan pengeringan pada suhu 135°.

*Prosedur* Timbang 2,0–3,0 g zat (W<sub>1</sub>) dalam botol timbang yang sudah ditara dan sumbatnya. Panaskan dalam oven pada suhu 135° (±5°) hingga bobot tetap (W<sub>2</sub>). Dinginkan botol dan residu dalam desikator sebelum setiap penimbangan. Hitung susut pengeringan dengan rumus berikut:

$$100 \times \left(1 - \frac{W_2}{W_1}\right)$$

2. *Zat tidak larut air* <914> Tidak lebih dari 0,2%.

3. *Pewarna ikutan* Tidak lebih dari 6%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi* fase balik seperti tertera pada *Kromatografi <903>*

*Fase gerak A* Ammonium asetat 0,05 M dalam air.

*Fase gerak B* Ammonium asetat 0,05 M dalam metanol P.

*Pembanding* pewarna *Biru berlian FCF* atau setara (gunakan jika *pembanding* tidak tersedia).

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 500 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Jika perlu, encerkan untuk memisahkan pewarna ikutan dari komponen pewarna primer.

*Sistem kromatografi* Kromatografi cair kinerja tinggi dilengkapi dengan UV-Vis/PDA 629 nm, kolom 150 mm × 2,1 mm berisi C-18, dengan ukuran partikel 5 µm, laju alir 0,2 ml/menit.

Kromatograf diprogram sebagai berikut:

<b>Waktu (menit)</b>	<b>Fase gerak A (%)</b>	<b>Fase gerak B (%)</b>
0	90	10
7	60	40
15	52	48
30	45	55
39	30	70
39,1	0	100
44	0	100
44,1	90	10
54	90	10

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 2 µl) *Larutan uji* dan *pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respon puncak. Hitung persentase tiap zat pewarna ikutan dalam zat.

4. *Senyawa organik selain pewarna* Tidak lebih dari 1,5% jumlah 2-, 3- dan 4-asam formilbensensulfonat. Tidak lebih dari 0,3% asam 3-[[N-etil-N-(4-sulfofenil)amino]metil] bensensulfonat. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* fase balik seperti tertera pada *Kromatografi <903>*

*Fase gerak A* Ammonium asetat 0,05 M dalam air.

*Fase gerak B Ammonium asetat 0,05 M dalam metanol P.*

*Pembanding*

- Garam natrium, asam 2-formilbensensulfonat (gunakan untuk menghitung isomer 2-, 3-, dan 4- ); dan
- Garam kalsium, asam benzensulfonat 3-[[N-etil-N-(4-sulfofenil)amino]metil]

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 500 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatografi cair kinerja tinggi dilengkapi dengan UV-Vis/PDA 254 nm, kolom 150 mm × 2,1 mm berisi C-18, dengan ukuran partikel 5 µm, laju alir 0,2 ml/menit. Kromatograf diprogram seperti tertera pada *Pewarna ikutan*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volum sama (lebih kurang 2 µl) *Larutan uji* dan *Pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respon puncak. Hitung total persentase senyawa organik dalam zat.

5. *Leuco base dalam pewarna trietilmetan tersulfonasi <1306>* Tidak lebih dari 5%. Timbang saksama lebih kurang 130 mg zat dan lakukan menurut cara yang tertera pada prosedur *Leuco Base insulfonated triarylmethane Colours*. Serapan jenis (a) 164 g/L/cm pada panjang gelombang lebih kurang 629 nm. Rasio = 0,971.
6. *Amin aromatis primer tidak tersulfonasi <1305>* Tidak lebih dari 0,01% dihitung sebagai anilin.
7. *Zat terekstraksi eter <1303>* Tidak lebih dari 0,2%.
8. *Timbal* Tidak lebih dari 2 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.
9. *Kromium <712>* Tidak lebih dari 50 bpj.
10. *Mangan* Tidak lebih dari 100 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.

### **Perubahan**

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan seperti tertera pada *Prosedur 1* dalam *Kadar total pewarna secara spektrofotometri* seperti tertera pada *Pewarna <1301>*. Gunakan *amonium asetat 0,04 M* sebagai pelarut,

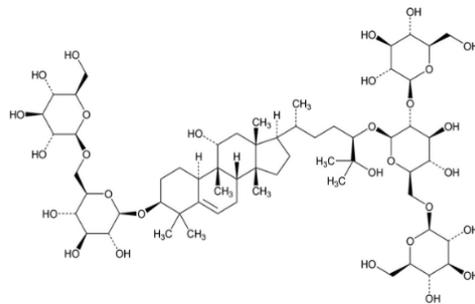
absorptivitas (a) 164 L/(g·cm). Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 629 nm.

## EKSTRAK LUO HAN GUO

*Luo Han Guo Extract*

**CAS** Mogrosida V [88901-36-4];

**SINONIM** *Monk fruit extract, Luo han fruit concentrate, Luo han guo concentrate, Monk fruit concentrate, Siraitia grosvenorii extract*



Mogrosida V

$C_{60}H_{102}O_{29}$

**BM** 1286

**DEFINISI** Ekstrak luo han guo merupakan ekstrak buah luo han guo (*Siraitia grosvenorii* Swingle, yang dikenal sebagai *monk fruit*) yang telah dipakatkan untuk memperoleh kadar optimal mogrosida V. Dibuat dari ekstraksi air dari buah yang dihancurkan secara mekanik. Enap tuangkan ekstrak air untuk menghilangkan endapan. Beningan didinginkan dan dilewatkan melalui resin kopolimer yang berkualitas pangan untuk mengikat senyawa target. Resin disemprot dengan etanol dingin untuk melepaskan senyawa yang terekstrak, dan larutan etanol dipanaskan dengan vakum untuk menghilangkan etanol, kemudian semprot kering. Ekstrak luo han guo terdiri dari glikosida cucurbitan, dikenal dengan mogrosida, dengan mogrosida V sebagai komponen pemanis utama. Komponen lainnya adalah mogrosida II, mogrosida III, mogrosida IV, mogrosida VI, flavonoid, melanoidin dan fragmen protein. Ekstrak luo han guo mengandung mogrosida V tidak kurang dari 30%.

**PEMERIAN** Serbuk, putih pucat sampai kuning muda.

**KELARUTAN** Sangat larut dalam air.

**PENGGUNAAN** Pemanis.

## IDENTIFIKASI

1. *Kromatografi lapis tipis*. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi lapis tipis <62>*

*Fase gerak n-butanol P – asam asetat P – air (4:1:1).*

*Larutan pembanding A* Timbang saksama sejumlah mogrosida V, larutkan dalam *metanol P* hingga kadar 7,5 mg per ml. Sonikasi untuk membantu kelarutan.

*Larutan pembanding B* Timbang saksama lebih kurang 50 mg ekstrak *luo han guo*, masukkan ke dalam corong pisah yang berisi 20-ml air. Ekstraksi dua kali, tiap kali dengan 10 ml *n-butanol P*, kumpulkan ekstrak *n-butanol*. Uapkan pada suhu ruang dan larutkan residu dalam 2 ml *metanol P*.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, dan lakukan seperti pada *Larutan pembanding B*.

*Penampak bercak* Larutan asam sulfat P 10%.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 2 µl) *Larutan pembanding A*, *Larutan pembanding B*, dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel G 0,25 mm*. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah berisi *Fase gerak*. Biarkan merambat hingga tiga per empat tinggi lempeng. Angkat lempeng, keringkan di udara, semprot dengan *Penampak bercak*, panaskan lempeng pada suhu 105°. Amati perubahan warna pada lempeng. Bercak utama *Larutan uji* mempunyai warna dan nilai Rf yang sama dengan bercak utama *Larutan pembanding A*. Kromatogram *Larutan uji* mempunyai warna dan bercak sama dengan *Larutan pembanding B*.

## **KEMURNIAN**

1. *Susut pengeringan* <912> Tidak lebih dari 6,0%. Lakukan pengeringan pada suhu 135° (±2°) selama 2 jam.
2. *Abu total* Tidak lebih dari 5,0%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu* <707> menggunakan 2 g zat pada suhu 600° selama 2 jam.
3. *Arsen* <708> Tidak lebih dari 0,5 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik ICP-AES yang sesuai tertera pada *Cemaran logam* <702>.
4. *Kadmium* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik ICP-AES yang sesuai tertera pada *Cemaran logam* <702>.
5. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik ICP-AES yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <903>

*Fase gerak Asetonitril P-air (22:78).*

*Larutan pembanding A* Timbang saksama sejumlah mogrosida V, larutkan dalam *Fase gerak* hingga kadar 0,10 mg/ml.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 30 mg zat, masukkan ke labu tentukur 50-ml dan tambahkan sejumlah *Fase gerak*. Sonikasi selama 40 menit, dinginkan sampai suhu ruang. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Saring melalui penyaring membrane 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 203 nm, kolom L1 4,6 x 250 mm, dengan ukuran partikel 5 µm, pertahankan suhu kolom pada 25°, laju alir 1 ml/menit.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume (20 µl) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respon puncak. [Catatan: Waktu retensi mogrosida V lebih kurang 15,7 menit]. Hitung persentase mogrosida V dalam *Larutan uji* menggunakan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

$r_u$  = Respon puncak mogrosida V dalam *Larutan uji*

$r_s$  = Respon puncak mogrosida V dalam *Larutan pembanding*

$C_s$  = Kadar (mg/ml) mogrosida V dalam *Larutan pembanding*

$C_u$  = Kadar (mg/ml) mogrosida V dalam *Larutan uji*

## **ESTER GLISEROL RESIN KAYU**

*Glycerol Ester of Wood Rosin*

**INS** 445

**CAS** [8050-30-4];

**SINONIM** *Ester gum*

**DEFINISI** Campuran kompleks ester tri- dan digliserol asam resin dari kayu rosin diperoleh dengan ekstraksi dari tunggul cemara yang telah tua umurnya dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair. Yang tidak termasuk spesifikasi di atas adalah zat turunan gum rosin, eksudat pohon cemara hidup, dan zat turunan minyak rosin, yang merupakan suatu produk pengolahan bubur kertas. Produk akhir terdiri dari kira-kira 90% asam-asam resin dan 10% senyawa netral bukan asam. Fraksi asam resin adalah campuran kompleks dari isomer diterpenoid asam monokarboksilat, dengan rumus empiris  $C_{20}H_{30}O_2$ , dimana komponen utama adalah dehidroabeiatat dan asam abietat. Bahan diproduksi dengan esterifikasi asam resin dengan gliserol *food grade*. Bahan dimurnikan dengan distilasi uap atau refluks.

**PEMERIAN** Padatan keras, kuning sampai coklat muda.

**KELARUTAN** Tidak larut dalam air, larut dalam aseton.

**PENGGUNAAN** Pengemulsi, pengental, peningkat volume, penstabil.

#### **IDENTIFIKASI**

1. Spektrum serapan inframerah lapisan tipis zat diantara dua lempeng *Kalium bromida P* menunjukkan maksimum pada bilangan gelombang yang sama seperti pembanding (lihat gambar IR).

#### **Tambahan persyaratan**

2. *Senyawa sulfur* Negatif. Timbang 40-50 mg zat ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 1-2 tetes Larutan natrium format 20% (b/v). Tempatkan selembat *kertas timbal asetat* di atas mulut tabung reaksi. Panaskan tabung sampai terbentuk asap yang menyentuh kertas uji. Lanjutkan pemanasan selama 2-5 menit. Pembentukan bintik hitam timbal sulfida menunjukkan adanya sulfur. (Batas Deteksi: 50 mg/kg sulfur)
3. *Asam resin* Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi <903>*.

*Natrium vitrida LP* Larutkan 70 g *natrium vitrida P* dalam 100 ml *toluen P*.

*Larutan natrium vitrida* Pipet 10 ml *natrium vitrida LP*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan *toluen P* sampai tanda.

*Larutan hidrolisis* Tambahkan perlahan-lahan 50 ml *asam sulfat P* ke dalam 200 ml air dalam tangas es sambil diaduk. Dinginkan hingga suhu ruang.

*Larutan uji* Timbang saksama 250-300 mg zat ke dalam labu Erlenmeyer 25 ml dengan pengaduk magnetik berlapis teflon. Pipet 5,0 ml *toluen P* ke dalam labu dan aduk sampai larut. Pipet 5,0 ml *Larutan natrium vitrida* ke dalam labu Erlenmeyer bersumbat, tutup labu dan aduk selama 30 menit. Sambil diaduk, pipet 3,0 ml *Larutan hidrolisis* ke dalam labu. Aduk selama 3 menit. Pindahkan isi labu tersebut ke dalam tabung sentrifuga (15 ml), tutup, dan kocok kuat-kuat. Ventilasi dan sentrifugasi 2800-3200 rpm selama 5 menit hingga terbentuk lapisan toluen.

*Sistem kromatografi* Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom DB-1 metil silikon yang dicrosslink dengan *wide-bore* kapiler berukuran 15 m x 0,53 mm setebal 1,5 µm. Injektor *flash vaporization*, laju alir gas pembawa helium lebih kurang 30 ml per menit pada 63 psi, laju alir hidrogen 30 ml per menit, dan laju alir udara 240 ml

per menit. Pertahankan suhu kolom pada 190°; injektor 250°; dan detektor 250°.

*Prosedur* Suntikkan 0,5 µl lapisan toluen ke dalam kromatograf, rekam kromatogram. Bandingkan dengan kromatogram gas seperti pada gambar untuk memverifikasi perkiraan urutan retensi alkohol resin. [Catatan : Kromatogram GC-FID dari zat berturut-turut akan menghasilkan pimaratan (18,8 menit), isopimaratan (22,4 menit), palustratan (23,1 menit), dehydroabietatan (25,9 menit), abietatan (29,6 menit), dan alkohol neoabietatan (35,2 menit). Produk-produk ini berasal dari sumber nabati yang dapat menunjukkan perbedaan dan relatif yang signifikan].

4. *Gliserol* Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi <903>*.

*Pembandingan gliserol >99%*

*Pembandingan internal 1,4-butanediol >99%*

*Larutan pembandingan* Timbang saksama masing-masing gliserol dan 1,4-butanediol, lebih kurang 100 mg dan masukan ke dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan air sampai tanda, kocok.

*Larutan uji* Timbang saksama 250-300 mg zat ke dalam labu Erlenmeyer 25 ml dengan pengaduk magnetik berlapis teflon. Pipet 5,0 ml toluen P ke dalam labu dan aduk sampai larut. Pipet 5,0 ml *Larutan natrium vitrida* ke dalam labu, tutup labu dan aduk selama 30 menit. Sambil diaduk, pipet 3,0 ml *Larutan hidrolisis* ke dalam labu. Aduk selama 3 menit. Pindahkan isi labu tersebut ke dalam tabung sentrifuga (15 ml), tutup, dan kocok kuat-kuat. Ventilasi dan sentrifugasi 2800-3200 rpm selama 5 menit hingga terbentuk lapisan toluen. Dengan menggunakan pipet atau jarum suntik, pisahkan lapisan toluen dan lapisan air. Masukkan sekitar 2 ml lapisan air ke dalam tabung sentrifuga. Tambahkan 1 tetes *fenolftalein LP* ke lapisan air di tabung sentrifuga dan dinetralkan dengan larutan *natrium hidroksida 4 M* hingga terbentuk garam aluminium.

*Sistem kromatografi* Kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom DB-WAX polietilen glikol yang dicrosslink dengan *wide-bore* kapiler berukuran 15 m x 0,53 mm setebal 1,0 µm. Laju alir gas pembawa helium lebih kurang 30 ml per menit pada 60 psi, laju alir hidrogen 30 ml per menit, dan laju alir udara 240 ml per menit. Atur suhu kolom pada 120°, naikkan hingga 200° dengan kenaikan 6° per menit. Pertahankan suhu injektor 250° dan detektor 250°.

*Prosedur* Suntikkan 1,0 µl cairan beningan ke dalam kromatograf dan rekam kromatogram. Suntikkan 1,0 µl larutan gliserol dan rekam kromatogram. Ukur waktu retensi dari setiap puncak yang diamati relatif terhadap *Pembanding internal*. Bandingkan waktu retensi dengan *Pembanding*.

## **KEMURNIAN**

1. *Bilangan asam <1101>* Antara 3 dan 9.

## **Perubahan**

2. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.
3. *Suhu pelunakan (metode cincin dan bola)* Tidak kurang dari 82°.

*Suhu pelunakan (metode cincin dan bola)* adalah suhu di mana lempeng zat yang diletakkan dalam cincin horisontal diberi beban bola baja, dipanaskan dalam tangas air atau tangas gliserol, zat akan jatuh dengan jarak 1 inchi (25,4 mm). Peralatan lihat gambar 1 dan 2.

*Persiapan zat uji* Pilih zat uji yang baru dipatahkan dan permukaannya belum teroksidasi. Kerok lapisan permukaan zat segera sebelum digunakan, hindari adanya remah dan debu. Jumlah zat yang dibutuhkan paling kurang dua kali dari jumlah yang dibutuhkan untuk mengisi cincin-cincin, dan tidak mungkin kurang dari 40 g. Segera lelehkan zat di atas lempeng pemanas atau tangas pasir atau tangas minyak untuk mencegah panas tidak merata. Panaskan pada suhu yang cukup untuk menuang lelehan zat pada cincin, guna menghindari masuknya gelembung udara pada zat yang meleleh. Waktu antara mulai pemanasan dan penuangan tidak lebih dari 15 menit. Segera sebelum mengisi cincin panaskan terlebih dahulu pada suhu yang sama, tuang zat sedikit berlebih, dinginkan selama 30 menit, dan potong kelebihan zat pada cincin menggunakan pisau atau spatula yang dihangatkan. Gunakan wadah dan zat baru jika pengujian akan diulang.

*Prosedur* Suhu pelunakkan di atas 80°. Isi labu dengan gliserol setinggi tidak kurang dari 10,2 cm dan tidak lebih dari 10,8 cm, suhu awal tangas gliserol harus 32°. Untuk resin (termasuk rosin) gliserol harus didinginkan tidak kurang dari 45° di bawah titik pelunakkan, tetapi tidak boleh lebih rendah dari 35°. Letakkan batang pengaduk dekat dinding labu, pisau tidak mengenai dinding dan berada 18 mm di atas cincin. Jika tidak menggunakan pengatur titik tengah bola, atur peletakkan bola sedemikian

rupa agar berada di tengah. Untuk bahan yang agak keras hangatkan sedikit bahan uji agar dapat menempel di cincin. Cincin yang mengandung zat, masukkan ke dalam tangas gliserol, sehingga permukaan bawah cincin 25,4 mm di atas lempeng horisontal paling rendah. Tidak kurang dari 13 mm dan tidak lebih dari 18 mm di atas dasar labu atau 25,4 mm di atas dasar labu (lihat gambar 2e). Masukkan bola ke dalam labu yang berisi gliserol tetapi tidak di atas zat. Masukkan termometer (ASTM 16C) ke dalam labu sehingga resevoir raksa setinggi dasar cincin dan berjarak 13 mm dari cincin. Pertahankan suhu tangas gliserol selama 15 menit, gunakan penjepit untuk menempatkan bola di atas permukaan zat pada cincin. Aduk terus menerus pada kecepatan antara 500 dan 700 rpm sampai pengujian selesai. Panaskan sedemikian rupa kenaikan suhu tangas gliserol 5° per menit, kurangi efek aliran udara dengan menggunakan pelindung jika perlu.

[Catatan: Kenaikan suhu harus konstan dan tidak boleh di rata-rata. Tolak semua uji bila kecepatan kenaikan suhu lebih dari  $5 \pm 0,5^\circ$  per menit].

Catat suhu pelunakkan saat zat menyentuh lempeng horisontal atau dasar labu.

Suhu pelunakkan 80° atau lebih rendah. Ikuti prosedur di atas, kecuali termometer (ASTM 15C), gunakan tangas *air bebas karbondioksida P 5°*. Untuk resin (termasuk rosin), gunakan air yang telah didinginkan tidak kurang dari 45° dibawah titik pelunakkan yang diperkirakan, tetapi tidak lebih rendah dari 5°.

#### **Hilangkan persyaratan**

4. *Bilangan Hidroksil* Antara 15 dan 45. Bilangan hidroksil didefinisikan sebagai bilangan dari mg kalium hidroksida yang diperlukan untuk menetralkan pereaksi sulfonil karbamat yang dapat bergabung dengan gugus hidroksil dalam 1 g zat. Gugus hidroksil dalam komponen organik berpengaruh cepat dengan kelebihan *p-toluensulfonil isosianat (p-TSI) P* dalam larutan inert untuk membentuk sulfonil karbamat. Setelah reaksi, kelebihan pereaksi dengan air membentuk *p-toluensulfonamida*, asam sulfonil karbamat dititrasi secara potensiometri atau dapat dilihat dengan *kalium hidroksida metanolat LP*. Lakukan penetapan blangko.

[Perhatian: Karena sifat toksik alami dari isotiosianat, penyiapan pereaksi dan prosedur selanjutnya menggunakan larutan pereaksi harus dilakukan dalam lemari asam. Hindari kontak dengan kulit]

*Prosedur* Timbang saksama lebih kurang 1,0-1,5 g zat, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer kering 250 ml dilengkapi dengan sambungan kaca asah. Pipet 10,0 ml *tetrahidrofur* kering P ke dalam Erlenmeyer untuk melarutkan zat. Pipet 20 ml larutan *p-toluensulfonilisosianat* P ke dalam Erlenmeyer. Tambahkan beberapa butir batu didih, pasang kondensor, refluks selama 10 menit. Selama refluks, tambahkan sejumlah volume air melalui kondensor, seperti tertera pada tabel:

	Blangko	Zat
Titrasi Visual	2	2
Titrasi	1	1
Potensiometri		

Angkat labu dan kondensor dari lempeng pemanas dan dinginkan hingga suhu ruang. Bilas bagian bawah kondensor dengan 5 ml *tetrahidrofur* P. Lepaskan kondensor dan pindahkan isi labu secara kuantitatif ke dalam gelas piala 150-ml dengan bantuan 50 ml *tetrahidrofur* P. Masukkan pengaduk magnetik dan elektrode atau tambahkan 20 tetes indikator. Dititrasi secara visual atau potensiometri dengan kalium hidroksida metanolat. Titran harus diteteskan dekat permukaan jauh dari elektrode. Lakukan penetapan blangko. Hitung bilangan hidroksil dari zat dengan rumus:

$$\frac{(A - B) \times N \times 56,1}{\text{g zat}} - AV$$

A = volume dalam ml kalium hidroksida metanolat yang digunakan untuk zat uji

B = volume dalam ml kalium hidroksida metanolat yang digunakan untuk blangko

N = normalitas kalium hidroksida metanolat

56,1 = mg kalium hidroksida metanolat per miliekivalen

AV = bilangan asam

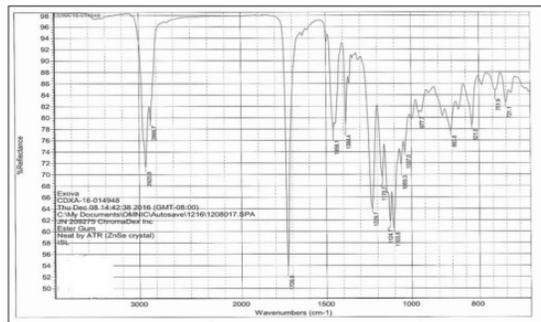
5. *Arsen* <708>Memenuhi syarat. Buat larutan uji sebagai berikut timbang saksama 1 g zat, masukkan ke dalam labu Kjeldahl, biarkan mulut labu terbuka. Hubungkan mulut labu yang terbuka dengan pompa hisap air, tambahkan 5 ml *asam sulfat* P dan 4 ml *hidrogen peroksida* 30%, digesti dengan nyala api kecil. Lanjutkan penambahan peroksida setiap kali

dengan 2 ml, biarkan terjadi reaksi antara 2 penambahan, sampai semua senyawa organik hancur, uap asam sulfat hilang, larutan menjadi jernih. (Jumlah peroksida yang diperlukan sampai digesti selesai bervariasi tetapi tidak lebih dari 200 ml). Dinginkan, tambahkan hati-hati 10 ml air, uapkan lagi dan dinginkan. Pindahkan ke dalam larutan generator arsen, bilas labu Kjeldahl dan masukkan bilasan ke dalam generator, dan encerkan dengan air hingga 35 ml.

6. *Timbal* Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai. Buat larutan uji sebagai berikut Timbang saksama lebih kurang 5 g zat, masukkan ke dalam cawan porselen, panaskan di atas lempeng pemanas sampai mengarang sempurna. Pijarkan dalam tanur pada suhu 480° selama 8 jam, dan dinginkan. Tambahkan 5 ml *asam nitrat P* secara hati-hati, uapkan di atas lempeng pemanas sampai kering. Pijarkan kembali dalam tanur pada suhu 480° selama 15 menit tepat, dan dinginkan. Ekstraksi sisa pijar dua kali tiap kali dengan 10 ml air, saring setiap ekstrak masukkan ke dalam corong pisah. Bilas bagian yang tidak larut pada penyaring dengan 6 ml *ammonium sitrat LP*, 2 ml *hidroksilamin hidroklorida LP*, dan 5 ml air.

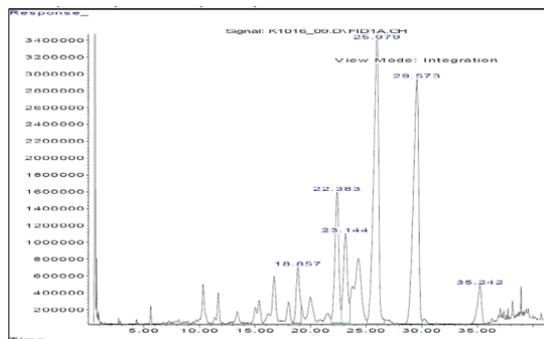
### Spektrum inframerah

Transmitan (%)



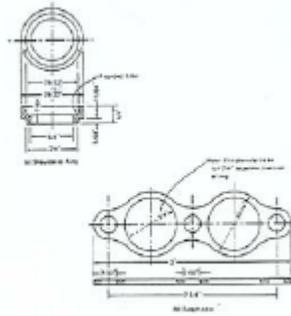
Bilangan gelombang (cm<sup>-1</sup>)

### Kromatogram gas



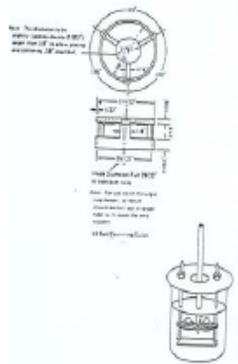
**Gambar 1**

(a)Shouldered Ring



(b)Ring Holder

(c)Bell Centering Guide



(d)Assembly Apparatus with Two Rings

Bola baja dengan diameter 9,53-mm, berat antara 3,45 dan 3,55 g.

*Ball-centering guide* Alat untuk mengatur posisi bola agar tepat berada di tengah, dibuat dari kuningan dan memiliki ukuran seperti yang terlihat pada gambar 1c.

Cincin *brass-shouldered* dengan ukuran seperti dapat dilihat pada gambar 1a. Jika diinginkan, cincin dapat terhubung dengan *brazing* atau cara lain yang sesuai pada kawat *brass* dari sekitar 13 B dan S *gauge* (0,06-inci, atau 1,52-sampai 2,03-mm, dalam diameter) seperti terlihat pada gambar 2a.

*Wadah Bejana* gelas tahan panas 800 ml, dengan diameter tidak kurang dari 8,5 cm, dan tinggi tidak kurang dari 12,7 cm dari dasar.

*Penyangga cincin dan termometer* Alat yang sesuai untuk menyangga cincin dan termometer, dan harus sesuai dengan persyaratan:

1. Penyangga dapat mempertahankan posisi horisontal cincin.
2. Jika digunakan peralatan seperti gambar 1d, maka bagian bawah cincin harus 1,0 inci (25,4 mm) di atas lempengan horisontal di bawahnya, bagian bawah permukaan lempeng horisontal setidaknya 0,5 inci (13 mm) dan tidak lebih dari 0,75 inci (18 mm) di atas bagian bawah wadah, dan kedalaman cairan dalam wadah tidak kurang dari 4,0 inci (10,2 cm).



**DEFINISI** Etil maltol diperoleh melalui sintesa kimia.

**PEMERIAN** Serbuk hablur, putih, manis, bau seperti buah.

**KELARUTAN** Agak sukar larut dalam air, larut dalam etanol dan dalam propilen glikol.

**PENGGUNAAN** Penguat rasa.

**IDENTIFIKASI**

1. *Jarak lebur* <907> Antara 89 ° dan 93°.
2. Spektrum serapan larutan 10 mg/1 zat dalam *asam hidroklorida 0,1 N* menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang lebih kurang 276 nm.

**KEMURNIAN**

1. *Air* <908> *Metode Karl Fischer* Tidak lebih dari 0,5%.
2. *Abu sulfat* Tidak lebih dari 0,2%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu* <707> menggunakan 5 g zat.
3. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom/ICP-AES yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.

**PENETAPAN KADAR**

*Larutan pembanding* Timbang saksama lebih kurang 50 mg Etil maltol pembanding atau setara, masukkan ke dalam labu tentukur 250-ml, larutkan dan encerkan dengan *asam hidroklorida 0,1 N* sampai tanda. Pipet 5 ml larutan tersebut ke dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan *asam hidroklorida 0,1 N* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 250-ml, larutkan dan encerkan dengan *asam hidroklorida 0,1 N* sampai tanda. Pipet 5 ml larutan tersebut masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml, encerkan dengan *asam hidroklorida 0,1 N* sampai tanda.

*Prosedur Ukur serapan Larutan uji dan Larutan pembanding* dalam sel kuarsa dengan tebal 1-cm pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 276 nm, menggunakan *asam hidroklorida 0,1 N* sebagai blangko.

Hitung persentase etil maltol dalam zat dengan rumus:

$$100 \times \frac{A_A \times W_S}{A_S \times W_A}$$

$A_A$  = Serapan *Larutan uji*

$A_S$  = Serapan *Larutan pembanding*

$W_A$  = Bobot zat dalam *Larutan uji* (mg)  
 $W_S$  = Bobot baku pembanding dalam  
*Larutan pembanding* (mg)

## **GLIKOSIDA STEVIOL**

### **PENDAHULUAN**

Glikosida steviol merupakan kandungan kimia dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dan berasa manis. Glikosida steviol memiliki ikatan aglikon steviol yang sama pada jenis dan jumlah unit glikosida berbeda (misalnya glukosa, rhamnosa, xilosa, fruktosa, atau deoksiglukosa). Sampai tahun 2021 sudah teridentifikasi lebih dari empat puluh jenis glikosida steviol seperti tertera pada *Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol <851>*. Glikosida steviol dalam makanan berfungsi sebagai pemanis. Glikosida steviol 100 hingga 300 kali lebih manis dibandingkan sukrosa.

Glikosida mayor yang terdapat dalam ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni adalah steviosida dan rebaudiosida A. Glikosida minor meliputi rebaudiosida M dan rebaudiosida D. Beberapa glikosida minor telah ditentukan memiliki karakteristik sensoris yang lebih baik dari pada glikosida mayor. Hal ini mendorong pengembangan teknologi baru untuk menghasilkan glikosida steviol dengan proporsi glikosida minor yang lebih tinggi untuk memodifikasi profil sensorik dalam perdagangan. Pendekatan berikut ini ditujukan untuk mengatur glikosida steviol yang diproduksi menggunakan empat metode berikut:

1. Glikosida steviol yang diekstraksi dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni.
2. Glikosida steviol dari fermentasi: melalui proses dimana mikroorganisme yang dimodifikasi secara genetik digunakan untuk menghasilkan glikosida steviol spesifik.
3. Glikosida steviol termodifikasi enzim: melalui proses dimana glikosida steviol yang telah diekstraksi dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni mengalami konversi enzimatik dari glikosida steviol mayor menjadi minor.
4. Glikosida steviol dimodifikasi enzim yang terglukosilasi: melalui proses dimana glikosida steviol yang telah diekstraksi dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni direaksikan dengan katalis enzim untuk menambahkan unit glukosa ke glikosida steviol melalui hubungan  $\alpha$ -(1-4).

Penetapan kadar keempat monografi glikosida steviol diatas tercantum pada *Penetapan Kadar Glikosida Steviol <85>*. Informasi kimia terkait CAS, Nama

Kimia, Rumus Molekul, BM seperti tertera pada *Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol <851>*.

## **GLIKOSIDA STEVIOL YANG BERASAL DARI STEVIA REBAUDIANA BERTONI**

*Steviol glycosides from Stevia rebaudiana* Bertoni

**INS** 960a

**CAS, Nama Kimia, Rumus Molekul, BM** seperti tertera pada *Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol <851>*

**DEFINISI** Glikosida steviol terdiri dari campuran senyawa yang mengandung steviol yang terkonjugasi ke sejumlah atau kombinasi dari bagian sakarida (glukosa, ramnosa, xilosa, fruktosa, arabinosa, galaktosa dan deoksiglukosa) di salah satu orientasi yang terjadi di daun *Stevia rebaudiana* Bertoni. Glikosida steviol diperoleh dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni. Daunnya diekstrak dengan air panas dan ekstrak air dilewatkan resin penjerap untuk menjerap dan memekatkan komponen glikosida steviol. Resin dibilas dengan etanol untuk melarutkan glikosida, kemudian direkristalisasi dengan metanol atau etanol air. Dapat digunakan resin penukar ion untuk proses pemurnian. Produk akhir dapat dikeringkan dengan *spray-dried*.

Glikosida steviol mengandung tidak kurang dari 95% dari total glikosida steviol dihitung terhadap zat kering, ditentukan sebagai jumlah campuran senyawa yang mengandung steviol yang terkonjugasi dengan beberapa sakarida (glukosa, ramnosa, fruktosa, deoksiglukosa xilosa, galaktosa, arabinosa, dan xilosa) yang terdapat dalam daun *Stevia rebaudiana* Bertoni.

**PEMERIAN** Serbuk, putih hingga kuning muda, tidak berbau atau bau khas lemah. Kemanisan 200–300 kali dibanding dengan sukrosa.

### **Perubahan**

**KELARUTAN** Sangat sukar larut hingga mudah larut dalam air, sukar larut hingga mudah larut dalam campuran etanol dan air (50:50).

**PENGGUNAAN** Pemanis.

### **IDENTIFIKASI**

1. Kromatogram puncak mayor yang diperoleh dari *Penetapan kadar* sesuai dengan puncak Glikosida steviol.
2. *pH <909>* Antara 4,5 dan 7 (1 dalam 100).

## **KEMURNIAN**

1. *Abu total* Tidak lebih dari 1%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu <707>*.
2. *Susut pengeringan <912>* Tidak lebih dari 6%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.
3. *Sisa pelarut <716> Metode 1* Tidak lebih dari 200 bpj metanol dan tidak lebih dari 5000 bpj etanol.
4. *Arsen <708>* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik serapan atom hidrida yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.
5. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.

### **Tambahan persyaratan**

6. *Uji mikrobiologi <51> Angka lempeng total:* tidak lebih dari 1.000 cfu per g; *Kapang dan khamir:* tidak lebih dari 200 cfu per g; *Salmonella spp:* negatif dalam 25 g; *E.coli:* negatif dalam 1 g.

### **Perubahan**

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan seperti tertera *Penetapan Kadar Glikosida Steviol <85>*.

## **GLIKOSIDA STEVIOL HASIL FERMENTASI**

*Steviol glycosides from fermentation*

**INS -**

**CAS, Nama Kimia, Rumus Molekul, BM** seperti tertera pada *Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol <851>*

**DEFINISI** Glikosida steviol hasil fermentasi berisi campuran senyawa yang mengandung steviol yang terkonjugasi ke berbagai bagian sakarida (glukosa atau sukrosa) tergantung pada organisme dan kondisi fermentasi yang digunakan.

Glikosida steviol hasil fermentasi diperoleh dari fermentasi strain non-patogen non-toksigenik dari *Yarrowia lipolytica* dan *Saccharomyces cerevisiae* yang telah dimodifikasi secara genetik dengan gen heterolog dari banyak organisme donor untuk menghasilkan glikosida steviol secara berlebihan. Setelah penghilangan biomassa dengan pemisahan padat-cair dan perlakuan panas, proses tersebut melibatkan konsentrasi glikosida steviol (misalnya dengan

adsorpsi resin), diikuti dengan pemurnian glikosida steviol yang diinginkan secara kristalisasi dan pengeringan. Dapat digunakan resin penukar ion untuk proses pemurnian. Produk akhir dapat dikeringkan dengan *spray-dried*. Produk dalam perdagangan terutama terdiri dari *Rebaudioside A*, *Rebaudioside M*, atau kombinasi *Rebaudioside M* dan *Rebaudioside D*, glikosida steviol minor lain mungkin ditemukan.

Glikosida steviol hasil fermentasi mengandung tidak kurang dari 95% dari total glikosida steviol dihitung terhadap zat kering.

**PEMERIAN** Serbuk, putih hingga kuning muda, tidak berbau atau bau khas lemah. Kemanisan 200–300 kali dibanding dengan sukrosa.

**KELARUTAN** Sangat sukar larut hingga mudah larut dalam air, sukar larut hingga mudah larut dalam campuran etanol dan air (50:50).

**PENGGUNAAN** Pemanis.

#### **IDENTIFIKASI**

1. Kromatogram puncak mayor yang diperoleh dari *Penetapan kadar* sesuai dengan puncak Glikosida steviol.
2. *pH* <909> Antara 4,5 dan 7 (1 dalam 100).

#### **KEMURNIAN**

1. *Abu total* Tidak lebih dari 1%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu* <707>.
2. *Susut pengeringan* <912> Tidak lebih dari 6%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.
3. *Sisa pelarut* <716> *Metode 1* Tidak lebih dari 200 bpj metanol dan tidak lebih dari 5000 bpj etanol.
4. *Arsen* <708> Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik serapan atomik hidrida yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.
5. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.
6. *Uji mikrobiologi* <51> *Angka lempeng total*: tidak lebih dari 1.000 cfu per g; *Kapang dan khamir*: tidak lebih dari 200 cfu per g; *Salmonella spp*: negatif dalam 25 g; *E.coli*: negatif dalam 1 g.

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan seperti tertera *Penetapan Kadar Glikosida Steviol* <85>.

## **GLIKOSIDA STEVIOL TERMODIFIKASI ENZIM**

*Enzym Modified Steviol Glycosides*

**INS -**

**CAS, Nama Kimia, Rumus Molekul, BM** seperti tertera pada *Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol <851>*

**DEFINISI** Glikosida steviol termodifikasi enzim terdiri dari campuran senyawa yang mengandung steviol yang terkonjugasi ke berbagai bagian sakarida (glukosa, rhamnosa, xilosa, fruktosa, arabinosa, galaktosa dan deoksiglukosa) yang terdapat dalam daun *Stevia rebaudiana* Bertoni. Produk ini diperoleh dari perlakuan enzimatik glikosida steviol murni yang diekstraksi dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni. Ekstrak yang telah dimurnikan diberi perlakuan dengan enzim yang diproduksi oleh strain non-patogen non-toksik dari *Pichia pastoris* dan *Escherichia coli* yang telah dimodifikasi secara genetik dengan gen dari beberapa organisme donor (tercantum di bawah) untuk menghasilkan glukosiltransferase (EC 2.4.1.17) dan sukrosa sintase (EC 2.4.1.13). Bahan yang dihasilkan dipanaskan dan disaring untuk menggumpalkan dan menghilangkan enzim yang berlebih. Kemudian pekatkan menggunakan resin adsorpsi/desorpsi atau penyaringan padat/cair, dilanjutkan dengan purifikasi dan pembuatan produk untuk perdagangan, menggunakan proses yang dapat mencakup dekolorisasi, kristalisasi, dan *spraydrying*.

Teknik pembuatan ini memaksimalkan produksi glikosida steviol spesifik yang secara alami tidak terdapat dalam kadar tinggi pada ekstrak daun, terutama *rebaudiosida M* dan *rebaudiosida D* dengan sejumlah kecil glikosida steviol lainnya.

<b>Organisme penghasil enzim</b>	<b>Sumber gen</b>
<i>Pichia pastoris</i>	<i>Horedum vulgare L</i> <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni <i>Vigna radiate</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Arapidopsis thaliana</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni

Glikosida steviol termodifikasi enzim mengandung tidak kurang dari 95% dari total glikosida steviol dihitung terhadap zat kering.

**PEMERIAN** Serbuk, putih hingga kuning muda, tidak berbau atau bau khas lemah. Kemanisan 200–300 kali dibanding dengan sukrosa.

**KELARUTAN** Sangat sukar larut hingga mudah larut dalam air, sukar larut hingga mudah larut dalam campuran etanol dan air (50:50).

**PENGGUNAAN** Pemanis.

#### **IDENTIFIKASI**

1. Kromatogram puncak mayor yang diperoleh dari *Penetapan kadar* sesuai dengan puncak Glikosida steviol.
2. *pH* <909> Antara 4,5 dan 7 (1 dalam 100).

#### **KEMURNIAN**

1. *Abu total* Tidak lebih dari 1%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu* <707>.
2. *Susut pengeringan* <912> Tidak lebih dari 6%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.
3. *Sisa pelarut* <716> *Metode 1* Tidak lebih dari 200 bpj metanol dan tidak lebih dari 5000 bpj etanol.
4. *Arsen* <708> Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik serapan atom hidrida yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.
5. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.
6. *Uji mikrobiologi* <51> *Angka lempeng total*: tidak lebih dari 1.000 cfu per g; *Kapang dan khamir*: tidak lebih dari 200 cfu per g; *Salmonella spp*: negatif dalam 25 g; *E.coli*: negatif dalam 1 g.

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan seperti tertera *Penetapan Kadar Glikosida Steviol* <85>.

#### **GLIKOSIDA STEVIOL DIMODIFIKASI ENZIM YANG TERGLUKOSILASI**

*Enzyme modified glucosylated Steviol Glycosides*

**INS** -

**CAS, Nama Kimia, Rumus Molekul, BM** seperti tertera pada *Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol* <851>

**DEFINISI** Glikosida steviol dimodifikasi enzim yang terglukosilasi adalah campuran glikosida steviol yang sebagian besar terdiri dari glikosida steviol

terglukosilasi (misalnya, glikosida mono-, di-, dan tri-glikosida terglukosilasi) dengan sejumlah kecil glikosida steviol dari *Stevia rebaudiana* Bertoni. Diperoleh melalui penambahan enzimatis glukosa [subunit 1-20 tambahan melalui ikatan  $\alpha(1-4)$  glukosil] ke glikosida steviol murni yang diperoleh dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Cyclomaltodextrin glucanotransferase* (EC 2.4.1.19) dan  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) dari strain *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, dan *Bacillus subtilis* non-patogen non-toksik digunakan untuk mempermudah transfer glukosa ke glikosida steviol. Bahan yang dihasilkan dipanaskan dan ditambah karbon aktif untuk menghilangkan enzim. Hasil dipekatkan menggunakan resin adsorpsi/desorpsi, dilanjutkan dengan pemurnian dan pembuatan produk untuk perdagangan, menggunakan proses yang dapat mencakup dekolorisasi, kristalisasi, dan *spraydrying*.

Teknik pembuatan ini memaksimalkan produksi glikosida steviol dimodifikasi enzim yang diglukosilasi yang tidak terdapat secara alami dalam ekstrak daun. Glikosida steviol dimodifikasi enzim yang diglukosilasi mengandung tidak kurang dari 95% dari total glikosida steviol dihitung terhadap zat kering, bebas dekstrin, ditentukan sebagai jumlah glikosida steviol terglukosilasi dan glikosida steviol.

**PEMERIAN** Serbuk, putih hingga kuning muda, tidak berbau atau bau khas lemah. Kemanisan 100–167 kali dibanding dengan sukrosa.

**KELARUTAN** Mudah larut dalam air.

**PENGGUNAAN** Pemanis.

#### **IDENTIFIKASI**

1. Kromatogram puncak mayor yang diperoleh dari *Penetapan kadar* sesuai dengan puncak Glikosida steviol.
2. *pH* <909> Antara 4,5 dan 7,0 (1 dalam 100).

#### **KEMURNIAN**

1. *Abu total* Tidak lebih dari 1%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu* <707>.
2. *Susut pengeringan* <912> Tidak lebih dari 6%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.
3. *Sisa pelarut* <716> *Metode 1* Tidak lebih dari 200 bpj metanol dan tidak lebih dari 5000 bpj etanol.
4. *Arsen* <708> Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik serapan atom hidrida yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.

5. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.
6. *Uji mikrobiologi <51> Angka lempeng total*: tidak lebih dari 1.000 cfu per g; *Kapang dan khamir*: tidak lebih dari 200 cfu per g; *Salmonella spp*: negatif dalam 25 g; *E.coli*: negatif dalam 1 g.

**PENETAPAN KADAR** Total glikosida steviol dalam glikosida steviol dimodifikasi enzim yang di glukosilasi diukur sebagai persentase gabungan dari glikosida steviol dan glikosida steviol terglukosilasi pada zat kering bebas dekstrin. Pemisahan fraksi dekstrin dan glikosida steviol dilakukan dengan kolom adsorpsi dan elusi menggunakan air dan etanol. Kedua fraksi dikeringkan dan ditimbang untuk mendapatkan persentase relatif dekstrin dan glikosida steviol total (Tahap 1). Persentase steviol induk yang diglukosilasi dan tidak bereaksi ditentukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi dibawah ini (Tahap 2).

#### Tahap 1: Kolom Adsorpsi

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 4 g zat, masukan gelas ukur dan larutkan dalam 100 ml air. Catat bobot dan volum; kadar larutan uji lebih kurang 4%.

*Prosedur* Masukkan *Larutan uji* ke dalam kolom kaca (diameter dalam 25 mm) yang berisi 200 ml resin Sigma Amberlite XAD 7 HP, atau yang setara, dengan kecepatan lebih kecil 3 ml/menit. Elusi dengan 1000 ml air untuk menghilangkan dekstrin. Selanjutnya, elusi dengan 1000 mL *etanol P 70%* dengan kecepatan 3 ml/menit atau kurang untuk menghilangkan glikosida steviol. Uapkan kedua fraksi yang terelusi tersebut hingga kering, lalu keringkan dalam oven vakum pada suhu 105° selama 2 jam. Timbang dan catat berat kering masing-masing fraksi.

Hitung persentase dekstrin dan Total Glikosida Steviol (TGS):

$$W_{\text{dry-1}} = \frac{(100 - \text{LoD}\%) }{100} \times W_{\text{wet-1}}$$

$$D\% = \frac{W_{\text{fw-dry}}}{W_{\text{dry-1}}} \times 100$$

$$\text{TGS}\% = \frac{W_{\text{fs-dry}}}{W_{\text{dry-1}}} \times 100$$

$W_{\text{dry-1}}$  = bobot kering sampel awal (g)

- LoD% = Susut Pengerinan (%)  
W<sub>wet-1</sub> = bobot bawah sampel awal (g)  
D% = dekstrin (%)  
W<sub>fw-dry</sub> = bobot fraksi air kering (g)  
W<sub>fe-dry</sub> = bobol fraksi air kering (g)

Jika kandungan residu dekstrin lebih dari 4%, TGS yang disesuaikan berdasarkan zat kering bebas dekstrin dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{TGS}_{\text{adj}}\% = \frac{\text{TGS}\% \times W_{\text{dry-1}}}{W_{\text{dry-1}} - W_{\text{D}}}$$

- TGS<sub>adj</sub>% = TGS yang disesuaikan (%)  
W<sub>dry-1</sub> = bobot kering sampel awal (g)  
W<sub>D</sub> = bobot dekstrin (g)

#### Tahap 2: Penetapan Kadar dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

*Kesetimbangan Serbuk* zat uji harus ditimbang tidak kurang 12 jam sebelum penetapan kadar. Taburkan 4-5 g zat uji dalam wadah terbuka hingga membentuk lapisan tipis setebal tidak lebih dari 6 mm. Aduk sesekali untuk memastikan keseragaman penyerapan kelembaban absorpsi yang seragam. Susut pengeringan zat uji yang ditimbang harus ditetapkan bersamaan dengan analisis KCKT.

*Pengencer 50% etanol P* dalam air.

*Campuran larutan penanda* Timbang masing-masing 100 mg rubusosida, dulkosida A, steviosida, rebaudiosida C, rebaudiosida F dan rebaudiosida A masukan dalam wadah dan tambahkan *Pengencer* hingga 1000 ml.

*Larutan pembanding Rebaudioside A* Timbang saksama lebih kurang 125 mg pembanding rebaudioside A, masukkan ke dalam labu tentukur 25-ml. Larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Buat duplo. Kadar masing-masing larutan 5000 mg/l.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 2500 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-ml. Larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Buat duplo. Kadar masing-masing larutan 50.000 mg/l.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV dengan panjang gelombang 210 nm (4 nm bw); reference: 360 nm (100 nm bw), kolom 250 mm x 4,6 mm berisi Zorbax NH2 dengan ukuran partikel 5µm, laju alir lebih kurang 1 ml/menit, pertahankan kolom pada suhu 40°.

Kromatografi diprogram sebagai berikut:

Waktu (menit)	Fase gerak A (%)	Fase gerak B (%)
0	80	20
2	80	20
90	50	50
91	80	20
100	80	20

Analisis Total Parent Steviol Glycosides:

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume yang sama (lebih kurang 12 µl) *Campuran larutan penanda* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase setiap glikosida steviol pada masing-masing kromatogram dengan membandingkannya dengan Gambar 1.

*Kesesuaian sistem* Suntikkan *Larutan pembanding Rebaudioside A* pertama masing-masing 8,0; 10,0 dan 12,0 µl ke dalam kromatograf, catat kromatogram. Buat kurva baku luas area puncak terhadap kadar rebaudiosida A (mg/l) dari respon tiga titik *Larutan pembanding Rebaudioside A* tersebut.

Suntikkan 12 µl *Larutan pembanding Rebaudioside A* kedua, bandingkan respon area puncak dengan kurva baku, nilai perolehan kembali harus berada dalam rentang 98-102%.

Suntikkan masing-masing 12 µl *Larutan uji* pertama dan kedua, rekam kromatogram, ukur rerata respon puncak. Simpangan baku relatif (%) kandungan rebaudioside A dan stevioside pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

Hitung kadar glikosida steviol (GS) dalam *Larutan uji* menggunakan rumus:

$$GS \text{ (mg/l)} = A \times m + b$$

A = luas puncak glikosida steviol

m = kemiringan kurva standar rebaudioside A

b = perpotongan y dari kurva standar rebaudioside A

[*Catatan: Kalikan kadar glikosida steviol lain yang ada dengan faktor koreksi masing-masing untuk mengoreksi perbedaan bobot molekul. Faktor koreksi untuk rubusosida, dulkosida A, steviosida, rebaudiosida C, rebaudiosida F berturut-turut adalah 0,665; 0,815; 0,832; 0,983, dan 0,969 (dibandingkan dengan rebaudiosida A)*]

Hitung persentase setiap glikosida steviol dalam *Larutan uji* menggunakan rumus:

$$\frac{GS}{C_{\text{sampel}}} \times 100$$

GS = kadar glikosida steviol yang telah ditentukan di atas (mg/l)

C<sub>Sampel</sub> = Kadar zat *Larutan uji* (mg/l)

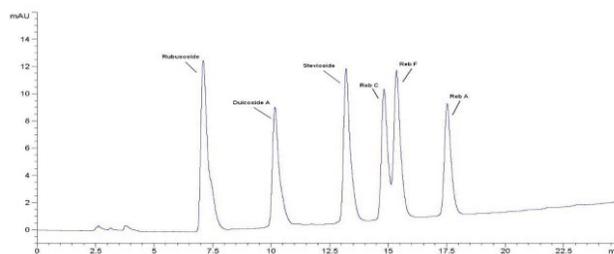
Jumlahkan komponen glikosida steviol untuk menentukan *Total Parent Steviol Glycosides* (TPSG%).

Analisis  $\alpha$ -glikosida steviol terglukosilasi:

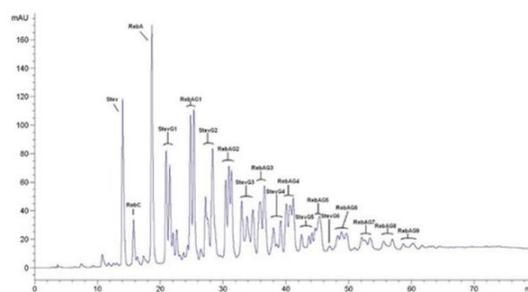
Gunakan data TPSG% yang diperoleh dari uji KCKT dengan rumus berikut untuk menghitung kandungan total  $\alpha$ -glikosida steviol terglukosilasi:

$$\text{Total } \alpha\text{-glikosida steviol terglukosilasi\%} = \text{TGS\%} - \text{TPSG\%}$$

Setiap komponen  $\alpha$ -glikosida steviol terglukosilasi diidentifikasi dengan membandingkannya dengan Gambar 2.



**Gambar 1. Kromatogram Campuran Larutan Pembanding**



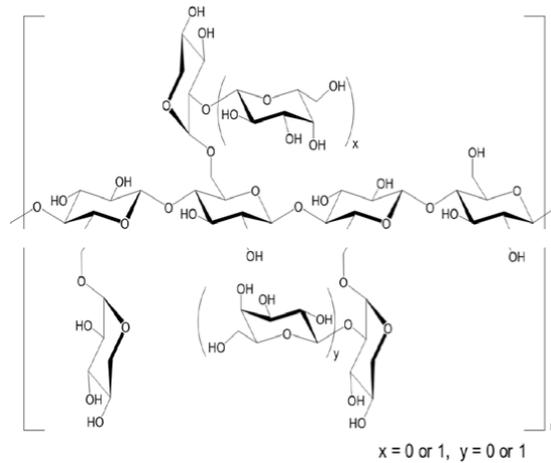
**Gambar 2. Kromatogram Larutan Uji Glikosida Steviol Dimodifikasi Enzim yang Terglukosilasi**

**GOM BIJI ASAM JAWA**

*Tamarind Seed Polysaccharide*

**CAS** [39386-78-2];

**SINONIM** *Tamarind seed gum, Tamarind gum, Tamarind xyloglucan, Tamarind seed xyloglucan, Tamarind galactoxyloglucan*



**DEFINISI** Gom biji asam jawa merupakan polisakarida dengan bobot molekul besar (400 – 6000 kDa), diperoleh dari inti biji asam jawa dengan mengupas dan menghancurkan biji *Tamarindus indica L.* Terdiri dari rantai linier unit D-glukosa yang dihubungkan dengan ikatan  $\beta(1-4)$  glikosidik. Unit-unit D-xilosa tunggal terikat pada lebih kurang 75% unit D-glukosa melalui ikatan  $\alpha(1-6)$ . Unit-unit D-galaktosa tunggal terikat pada beberapa unit D-xilosa melalui ikatan  $\beta(1-2)$ . Rasio molar D-glukosa: D-xilosa: D-galaktosa lebih kurang 4:3:1. Gom biji asam jawa diperoleh dari serbuk biji asam jawa dilarutkan dalam larutan metanol-air, dan ditambah natrium hidroksida dan asam sulfat untuk mencuci dan mengatur pH. Sentrifugasi untuk memisahkan polisakarida dari beningan yang mengandung protein, lemak, dan mineral. Endapan dikeringkan, digerus, diayak dan dicampur dengan bahan pengembang berkualitas pangan untuk menstandarkan. Viskositas gom biji asam jawa tergantung dari pengaturan pH dan perlakuan basa dan/atau pemurnian dengan metanol atau 2-propanol.

Gom biji asam jawa mengandung tidak kurang dari 75% dihitung terhadap zat kering.

**PEMERIAN** Serbuk putih sampai cokelat muda, hampir tidak berbau.

**KELARUTAN** Larut dalam air panas (75°), tidak larut dalam etanol.

**PENGGUNAAN** Pengental, penstabil, pengemulsi dan pembentuk gel.

#### **IDENTIFIKASI**

1. *Pengendapan dan pembentukan warna*

*Larutan natrium hidroksida* Timbang saksama lebih kurang 22 g *Natrium hidroksida P.* Masukkan ke dalam labu tentukur 1000-ml, larutkan dan encerkan dengan air deionisasi sampai tanda. Simpan dalam botol polietilen.

*Larutan jenuh natrium sulfat* Timbang saksama lebih kurang 20 g *Natrium sulfat P*. Masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml. Larutkan dan encerkan dengan air deionisasi sampai tanda. Simpan dalam botol polietilen.

*Larutan uji (20 mg/ml)* Tambahkan secara bertahap 2 g Gom biji asam jawa ke dalam 100 ml *Larutan natrium hidroksida*, kocok kuat.

*Prosedur* Tambahkan 3 ml *Larutan jenuh natrium sulfat* ke dalam 5 ml *Larutan uji*: terbentuk gumpalan putih. Tambahkan beberapa tetes *iodum LP* ke dalam 5 ml *Larutan uji*: terjadi gumpalan hijau biru tua pada permukaan larutan, dan warna menghilang setelah diaduk.

### **KEMURNIAN**

1. *Susut pengeringan* <912> Tidak lebih dari 14%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama lebih kurang 5 jam hingga bobot tetap.
2. *Abu total* Tidak lebih dari 1,0% terhadap zat yang telah dikeringkan. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu* <707>.
3. *Protein* Tidak lebih dari 3%. Timbang saksama lebih kurang 1 g zat. Lakukan penetapan menggunakan *Metode 1 (Metode Kjeldahl)* seperti tertera pada *Penetapan kadar nitrogen* <84>. Persentase nitrogen yang diperoleh dikalikan dengan 6,25 sehingga menghasilkan persentase protein di dalam zat.
4. *Sisa pelarut* <716> Metanol tidak lebih dari 200 bpj; 2-propanol tidak lebih dari 1000 bpj. Lakukan penetapan dengan cara kromatografi gas *headspace* seperti tertera pada *Metode 1* dalam *Sisa pelarut* <716>.  
*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 120 mg zat masukkan ke dalam vial *headspace*. Tambahkan 5 ml air dan 1 ml *Larutan pembanding internal*, untuk memperoleh kadar zat sebesar 2%.
5. *Timbal* Tidak lebih dari 2 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam* <702>.
6. *Uji mikrobiologi* <51> *Angka lempeng total*: tidak lebih dari 5000 cfu per g; *E.coli*: negatif dalam 1 g; *Salmonella spp*: negatif dalam 5 g; *Kapang dan khamir*: tidak lebih dari 500 cfu per g.

### **PENETAPAN KADAR**

*Larutan iodum 0,5% - larutan kalium iodida 1,0%* Timbang saksama lebih kurang 500 mg *iodum P* dan 1,0 g *kalium iodida P*, masukkan ke dalam gelas piala 100 ml, tambahkan 75 ml air deionisasi dan masukkan batang pengaduk magnetik ke dalam gelas piala. Tutup dengan plastik dan aluminium foil untuk

melindungi dari cahaya. Aduk selama 2 jam dengan pengaduk magnetik, lanjutkan pengadukan selama 30 menit dan periksa kelarutan sempurna. Pindahkan ke dalam labu tentukur 100-ml dan encerkan dengan air deionisasi sampai tanda, aduk homogen. Simpan larutan dalam lemari pendingin dan jauhkan dari cahaya. Larutan stabil di lemari pendingin, tanpa cahaya selama beberapa bulan.

*Larutan natrium sulfat 15%* Masukkan 800 ml air deionisasi ke dalam gelas piala 1000 ml, masukkan batang pengaduk magnetik, tambahkan 150 g *natrium sulfat P* sambil diaduk hingga semua natrium sulfat larut. Pindahkan ke dalam labu tentukur 1000-ml dan encerkan dengan air deionisasi sampai tanda, aduk sampai homogen. Simpan larutan pada suhu ruang.

*Pembanding induk gom biji asam jawa* Buat larutan pembanding gom biji asam jawa 0,5% yang telah disaring dan dibasakan. Sentrifugasi untuk menghilangkan cecair. Endapkan dengan menambahkan *2-propanol P*, saring. Bilas endapan dengan *2-propanol P*. Ulangi langkah presipitasi dan filtrasi, keringkan dan haluskan, simpan dalam desikator.

*Larutan uji* Masukkan 170 ml air deionisasi pada suhu kamar ke dalam gelas piala. Timbang saksama lebih kurang 1 g zat (ukur susut pengeringan secara terpisah [%]), masukkan ke dalam gelas piala sambil diaduk pada suhu ruang selama 15 menit. Tambahkan air deionisasi hingga 200 g dan aduk homogen. Timbang saksama lebih kurang 1 g larutan, tambahkan air deionisasi hingga tepat 50 g dan aduk homogen. Dibuat segar.

*Larutan pembanding kerja* Masukkan 170 ml air deionisasi pada suhu ruang ke dalam gelas piala. Timbang saksama lebih kurang 1 g *Pembanding induk gom biji asam jawa*. Masukkan sambil diaduk dengan air deionisasi pada suhu ruang selama 15 menit. Tambahkan air deionisasi hingga tepat 200 g, aduk hingga homogen. Timbang saksama lebih kurang 4 g larutan ini, tambahkan air deionisasi hingga tepat 40 g, aduk hingga homogen.

*Larutan pembanding* Timbang saksama lebih kurang 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 dan 6,0 g larutan, tambahkan air deionisasi hingga tepat 20 g dan aduk hingga homogen. Gunakan larutan dengan kadar 0,005, 0,0075, 0,01, 0,0125 dan 0,015 % (b/b) (setara dengan berturut-turut 50, 75, 100, 125, dan 150 µg/g), dibuat segar. Hitung kadar dari *Pembanding induk gom biji asam jawa* (terhadap zat kering) untuk setiap larutan yang dibuat.

*Prosedur* Masukkan masing-masing 1 ml air deionisasi (blanko), *Larutan uji* atau *Larutan pembanding* ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 2 ml *Larutan natrium sulfat 15%* dan 0,25 ml *Larutan iodum 0,5%* - *larutan kalium iodida 1%*

ke dalam setiap tabung reaksi. Lakukan duplo untuk setiap *Larutan baku*, *Larutan uji*, dan blanko.

Setelah pengadukan kuat selama beberapa detik, sumbat tabung reaksi, segera simpan di dalam lemari pendingin dalam kondisi gelap. Biarkan selama tidak kurang dari 1 jam untuk mengikat iodine, kemudian biarkan selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Atur blanko pada spektrofotometer pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 640 nm hingga absorban nol. Ukur *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 640 nm.

Buat kurva baku serapan terhadap kadar *Larutan pembanding* sehingga diperoleh koefisien korelasi paling kurang 0,99. Jika koefisien korelasi kurang 0,99, ulangi pembuatan *Larutan pembanding*.

Hitung persentase gom biji asam jawa dalam zat dari kurva baku

$$T = \frac{D}{W_T \times \left(\frac{100-L}{100}\right)}$$

T : % gom biji asam jawa dalam zat

D : Kadar gom biji asam jawa dalam *Larutan uji* ( $\mu\text{g/g}$ )

$W_T$  : Bobot zat (g)

L : Persentase susut pengeringan zat

## **PEKTIN**

*Pectins*

**INS** 440

**CAS** [9000-69-5]

**DEFINISI** Pektin sebagian besar terdiri dari ester metil dari asam poligalakturonat dan garam natrium, kalium, kalsium dan amonium, diperoleh dengan ekstraksi dalam medium air dari bagian tanaman yang dapat dimakan, biasanya buah jeruk atau apel; tidak ada pengendap organik yang digunakan selain metanol, etanol dan isopropanol; dalam beberapa jenis tertentu sebagian metil ester dapat diubah menjadi amida primer dengan perlakuan menggunakan amonia dalam suasana basa. Belerang dioksida dapat ditambahkan sebagai pengawet. Dalam perdagangan biasanya dicampur dengan gula untuk keperluan standardisasi. Selain gula, pektin dapat dicampur dengan dapar *food grade* yang diperlukan untuk mengatur pH dan karakteristik yang diinginkan.

**PEMERIAN** Serbuk, putih, kekuningan, abu-abu muda atau coklat muda.

**PENGUNAAN** Pengental, penstabil, pengemulsi, pembentuk gel.

**IDENTIFIKASI**

1. *Pektin* Memenuhi syarat. Basahi 50 mg zat dengan *isopropanol P*. Tambahkan 50 ml air dengan pengaduk magnetik. Atur pH hingga 12 menggunakan *natrium hidoksida 0,5 N* dan biarkan sisa larutan tanpa pengadukan selama 15 menit. Kurangi pH hingga 7,0 dengan *asam hidroklorida 0,5 N*. Tambahkan air sampai 100 ml. Buat larutan dalam kuvet kuarsa 1 cm sebagai berikut:

	Dapar pH 7,0 *)	Larutan Zat	Air	Larutan Enzim **)
Blangko enzim	0,5 ml	1,0 ml	1,0 ml	-
Blangko Zat	0,5 ml	-	1,5 ml	0,5 ml
	0,5 ml	1,0 ml	0,5 ml	0,5 ml

\*) Dapar pH 7,0. Larutkan 6,055 g *tris(hidroksimetil)aminometan P* dan 0,147 g *kalsium klorida dihidrat P* dalam air sampai 1 L. Atur pH sampai 7,0 dengan *asam hidroklorida 1 N*.

\*\*\*) Encerkan liase pektat murni dengan dapar pH 7,0 (1:100).

Kocok larutan, dan ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 235 nm pada 0 dan 10 menit.

Hitung serapan sebagai berikut:

$A_0$  = serapan zat – (serapan blangko enzim + serapan blangko zat)

$A_{10}$  = serapan zat – (serapan blangko enzim + serapan blangko zat)

$A_0$  = serapan pada 0 menit

$A_{10}$  = serapan pada 10 menit

Jumlah zat tidak jenuh yang dihasilkan sebanding dengan perubahan serapan ( $A_{10} - A_0$ ). Nilai ini seharusnya lebih besar dari 0,023. Nilai ini membedakan pektin dari gom lain yang pada umumnya tidak menunjukkan adanya perubahan.

2. *Gugus amida* Memenuhi syarat (hanya pektin teramidasi). Timbang 500 mg zat, tambahkan 2 ml *asam hidroklorida P* dan 50 ml *etanol P 60 %*, aduk selama 20 menit. Pindahkan ke dalam penyaring kaca masir, cuci enam kali tiap kali dengan campuran *asam hidroklorida P-etanol P 60 % (2:50)*. Larutkan dalam 100 ml air suling; jika perlu tambahkan beberapa tetes *natrium hidoksida 0,1 N* untuk melarutkan. Pindahkan 4 ml larutan tersebut ke dalam tabung uji (disarankan ukuran diameter dalam 15,5 mm

dan panjang 146 mm). Tambahkan 1 ml *natrium hidroksida 5 N*, campur. Campuran akan membentuk gel. Isi tabung gelas kecil (disarankan ukuran diameter dalam 7,8 mm dan panjang 79 mm) dengan 2,5 ml *asam borat LP*. Tutup dengan parafilm dan inkubasi satu malam pada suhu 30°. Jika terdapat gugus amida, warna indikator akan berubah dari merah menjadi hijau, akibat pelepasan amonia.

### **KEMURNIAN**

1. *Susut Pengeringan <912>* Tidak lebih dari 12%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.
2. *Belarang dioksida* Tidak lebih dari 50 bpj. Suspensikan 100 g zat dalam 500 ml *metanol P* dalam labu alas bulat 1000 ml yang dilengkapi dengan tabung tempat masuknya gas dengan posisi hampir mencapai bagian bawah labu dan terhubung ke bagian leher kondensor refluks. Siapkan sambungan gelas dari kondensor ke sebuah labu penyerap atau tabung U yang berisi 10 ml larutan *hidrogen peroksida P 3%* yang dinetralkan menggunakan *merah metil LP*. Hubungkan tabung tempat masuknya gas dengan sumber karbon dioksida atau nitrogen bebas oksigen, dan pertahankan aliran gas sehingga terjadi gelembung yang tetap. Segera setelah peralatan dialiri oleh udara bebas, tuang 30 ml larutan *asam hidroklorida P (1:2)* ke dalam kondensor refluks, dan segera hubungkan labu penyerap atau tabung U. Panaskan perlahan-lahan sampai *metanol P* mulai terrefluks, dan refluks perlahan selama 2 jam. Lepaskan alat dan titrasi larutan hidrogen peroksida dengan *natrium hidroksida 0,01 N LV* menggunakan indikator *merah metil LP*.

*Tiap ml 0,01 natrium hidroksida 0,01 N  
setara dengan 0,32 mg SO<sub>2</sub>.*

### **Perubahan**

3. *Sisa pelarut <716>* Tidak lebih dari 1% metanol, etanol, dan isopropanol, tunggal atau dalam kombinasi. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas headspace* seperti tertera pada *Metode 1* dalam *Sisa pelarut <716>*.

*Larutan baku internal* Masukkan 50,0 ml air ke dalam vial 50-ml dan kedapkan. Timbang saksama vial dan suntikkan 15 µl *3-metil-2-pentanon P* melalui septum dan timbang kembali sampai pertambahan bobot tidak lebih dari 0,01 mg.

*Larutan baku* Masukkan 50,0 ml air ke dalam vial 50-ml dan kedapkan. Timbang saksama vial dan suntikkan 15 µl *etanol P* dan timbang sampai pertambahan bobot tidak lebih dari 0,01 mg. Suntikkan 15 µl *isopropanol P* melalui septum dan timbang saksama kembali.

*Larutan blangko* Masukkan 5,0 ml air ke dalam vial *headspace* dan pipet 1,0 ml *Larutan baku internal* ke dalam vial. Kedapkan vial, vortex.

*Larutan kalibrasi* Tambahkan 4,0 ml air ke dalam vial *headspace*. Pipet 1,0 ml masing-masing *Larutan baku internal* dan *Larutan baku*, masukkan ke dalam vial *headspace*. Kedapkan vial, vortex.

*Larutan uji* Pipet 5 ml air dan 1 ml *Larutan baku internal*, masukkan ke dalam vial *headspace*. Timbang saksama lebih kurang 500 mg zat, masukkan zat dengan hati-hati agar tidak menggumpal di dasar vial. Kedapkan vial, vortex. Vial jangan dikocok.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom 0,53 mm (diameter dalam) x 80 cm berisi silika yang dilapisi “DB-wax” dengan ketebalan 1 µm dihubungkan dengan kolom 0,53 mm (diameter dalam) x 30 m, berisi silika yang dilapisi “DB-1” dengan ketebalan 5 µm, fase gerak *helium P* dengan laju alir 5 ml/menit, pertahankan suhu injektor 140°, suhu detektor 300°, dan suhu kolom 35° selama 5 menit kemudian dinaikkan 5° per menit hingga 90° pertahankan selama 6 menit.

*Prosedur* Tempatkan *Larutan uji*, *Larutan blangko* dan *Larutan kalibrasi* dalam “tray” kromatografi “*headspace*” dengan kondisi suhu pemanasan 60° selama 10 menit, suhu injektor 70°, suhu pemindahan 80°. Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama gas (1,0 ml) *Larutan uji*, *Larutan blangko* dan *Larutan kalibrasi* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram, ukur respons puncak utama. Hitung persentase metanol, etanol dan isopropanol dengan rumus:

$$\left(\frac{R_U}{R_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times F \times 100$$

$R_U$  = perbandingan respon puncak zat terhadap baku internal dalam *Larutan uji*

$R_S$  = perbandingan respon puncak pembanding terhadap baku internal dalam *Larutan pembanding*

$C_S$  = kadar *Larutan pembanding* (mg per ml)

$C_U$  = kadar *Larutan uji* (g per ml)

$F$  = faktor konversi dari g ke µg

4. *Abu tidak larut asam* Tidak lebih dari 1%. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Abu <707>*.
5. *Zat tidak larut* Tidak lebih dari 3%. Keringkan 70 mm kertas saring berserat GF/B dalam oven dengan kipas yang diatur pada suhu 105° selama 1 jam. Pindahkan kertas saring ke desikator yang berisi silika gel dan biarkan dingin. Timbang kertas ( $M_1$ ). Timbang lebih kurang 1 g zat (S) masukkan ke dalam gelas piala 250 ml. Tambahkan 5 ml *isopropanol P* untuk melarutkan zat. Tambahkan 100 ml *natrium hidroksida 0,03 N* yang mengandung *natrium etilendiamintetraasetat P 0,1%* yang telah disaring melalui kertas GF/B sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Aduk selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian panaskan sampai mendidih (kurangi panas jika terbentuk busa berlebih). Saring larutan panas melalui kertas saring berserat menggunakan vakum, contoh alat penyaring vakum dengan 3 bagian corong Hartley (70 cm), dengan lempeng tahan panas. Bilas gelas piala lima kali tiap kali dengan 20 ml air hangat (lebih kurang 50°) yang telah disaring melalui kertas GF/B. Keringkan kertas saring dengan residu pada 105° selama 1 jam. Pindahkan ke desikator yang berisi silika gel dan biarkan dingin. Timbang kertas ( $M_2$ ). Hitung persentase total zat tidak larut dengan rumus:

$$\left[ \frac{(M_2 - M_1)}{S} \right] \times 100$$

6. *Nitrogen <84>* Tidak lebih dari 2,5% setelah pencucian dengan asam dan etanol.
7. *Asam galakturonat* Tidak kurang dari 65% dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan dan bebas abu.
8. *Derajat amidasi* Tidak lebih dari 25% dari total gugus karboksil pektin.

*Asam galakturonat dan derajat amidasi*

Timbang saksama lebih kurang 5 g zat, masukkan ke dalam gelas piala yang sesuai. Aduk selama 10 menit dengan campuran 5 ml *asam hidroklorida encer LP* dan 100 ml *etanol P 60%*. Pindahkan ke penyaring kaca masir dengan kapasitas 30 sampai 60 ml, cuci enam kali tiap kali dengan 15 ml campuran *asam hidroklorida encer LP-etanol P 60%* (1:20), lanjutkan dengan *etanol P 60%* sampai diperoleh filtrat bebas klorida. Cuci dengan 20 ml *etanol P*, keringkan pada suhu 105° selama 2,5 jam, dinginkan dan timbang. Pindahkan sepersepuluh dari total bobot bersih zat yang telah dikeringkan (mewakili 0,5 g zat awal yang tidak dicuci) ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml dan basahkan zat dengan 2 ml *etanol LP*.

Tambahkan 100 ml *air bebas karbondioksida P*, tutup dan aduk sesekali sampai terbentuk larutan sempurna. Tambahkan 5 tetes indikator *fenolftalein LP*, titrasi dengan *natrium hidroksida 0,1 N* dan catat sebagai titer awal ( $V_1$ ).

Tambahkan tepat 20 ml *natrium hidroksida 0,5 N*, tutup, kocok kuat dan diamkan selama 15 menit. Tambahkan tepat 20 ml *asam hidroklorida 0,5 N*, tutup, kocok sampai warna merah muda hilang. Titrasi dengan *natrium hidroksida 0,1 N LV* sampai terjadi warna merah muda yang bertahan setelah dikocok kuat; catat nilai tersebut sebagai titer penyabunan ( $V_2$ ). Pindahkan secara kuantitatif isi labu Erlenmeyer ke dalam labu destilasi 500 ml yang dilengkapi dengan *trap* Kjeldahl dan pendingin air dihubungkan dengan pipa yang tercelup pada penampung yang berisi 150 ml *air bebas karbondioksida P* dan 20 ml *asam hidroklorida 0,1 N*. Tambahkan 20 ml larutan *natrium hidroksida P* (1 dalam 10) ke dalam labu destilasi, tutup sambungan, kemudian mulai proses pemanasan secara hati-hati untuk menghindari busa berlebih. Lanjutkan pemanasan sampai diperoleh 80-120 ml destilat. Tambahkan beberapa tetes indikator *merah metil LP* ke dalam labu penampung, titrasi kelebihan asam dengan *natrium hidroksida 0,1 N*, catat volume yang diperlukan (ml) sebagai S. Lakukan penetapan blangko pada 20,0 ml *asam hidroklorida 0,1 N*, dan catat volume yang diperlukan (ml) sebagai B. Titer amida adalah (B-S).

Pindahkan sepersepuluh dari total bobot bersih zat kering (mewakili 0,5 g zat awal yang tidak dicuci) dan basahi dengan lebih kurang 2 ml *etanol P* dalam gelas piala 50 ml. Larutkan pektin dalam 30 ml *natrium hidroksida 0,1 N*. Diamkan larutan selama 1 jam dengan pengocokan pada suhu ruang. Pindahkan secara kuantitatif larutan pektin yang disabunkan ke dalam labu tentukur 50-ml dan encerkan dengan air sampai tanda. Pipet 25,0 ml larutan pektin encer ke alat destilasi dan tambahkan 20 ml larutan Clark, yang dibuat dengan 100 g *magnesium sulfat heptahidrat P* dan 0,8 ml *asam sulfat P* dan air suling sampai total 180 ml. Alat ini terdiri dari generator uap yang dihubungkan ke labu alas bulat dengan pendingin. Generator uap maupun labu alas bulat dilengkapi dengan mantel pemanas.

Mulai penyulingan dengan memanaskan labu alas bulat yang berisi zat. Kumpulkan 15 ml destilat pertama secara terpisah dalam gelas ukur. Kemudian mulai masukan uap dan lanjutkan penyulingan sampai diperoleh 150 ml destilat yang dikumpulkan dalam gelas piala 200 ml.

Tambahkan secara kuantitatif 15 ml destilat pertama dan titrasi dengan *natrium hidroksida 0,05 N LV* sampai pH 8,5 dan catat volume yang diperlukan (ml) sebagai A. Lakukan penetapan blangko menggunakan 25 ml air suling. Catat volume yang diperlukan (ml), sebagai A<sub>0</sub>. Titer ester asetat adalah (A-A<sub>0</sub>).

Hitung derajat amidasi (sebagai % total gugus karboksil) dengan rumus:

$$100 \times \frac{B - S}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

Hitung asam galakturonat (mg) dengan rumus:

$$19,41 \times [V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)]$$

Bobot asam galakturonat (mg) yang diperoleh dengan cara tersebut merupakan kandungan sepersepuluh bobot zat yang dicuci dan dikeringkan. Untuk menghitung % asam galakturonat dari zat bebas uap dan abu, kalikan jumlah mg yang diperoleh dengan 1000/x, x adalah bobot (mg) zat yang telah dicuci dan dikeringkan.

*Catatan:*

1. Jika pektin diketahui dari jenis nonamidasi, hanya V<sub>1</sub> dan V<sub>2</sub> yang perlu ditentukan dan (B-S) dapat dianggap nol.
2. Pektin dari apel atau jeruk (A-A<sub>0</sub>) biasanya tidak signifikan dalam perhitungan asam galakturonat dan derajat amidasi.
3. Jika diinginkan, hitung derajat esterifikasi (sebagai % dari total gugus karboksil) dengan rumus:

$$100 \times \frac{V_2 - (A - A_0)}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

4. Jika diinginkan, hitung derajat ester asetat (sebagai % dari total gugus karboksil asam galakturonat) dengan rumus:

$$100 \times \frac{A - A_0}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

9. Timbal Tidak lebih dari 2 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektroskopi serapan atom yang sesuai seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*.

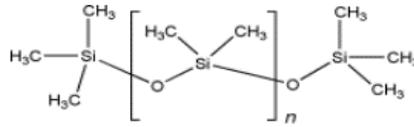
## **POLIDIMETILSILOKSAN**

*Polydimethylsiloxane*

**INS** 900a

**CAS** [9006-65-9]

**SINONIM** *Poly(dimethylsiloxane); dimethylpolysiloxane; dimethylsilicone fluid; dimethylsilicone oil; dimethicone*



n = antara 90 dan 410

*$\alpha$ -(Trimetilsilil)- $\omega$ -metilpoli (oksi(dimetilsililen))*

Polidimetilsiloksan mengandung silikon tidak kurang dari 37,3% dan tidak lebih dari 38,5% dari bobot total.

**DEFINISI** Polidimetilsiloksan terdiri dari polimer siloksan termetilasi linier sempurna mengandung unit rumus  $[(CH_3)_2SiO]$  berulang, diakhiri dengan  $(CH_3)_3SiO-$ . Bahan tambahan pangan ini dihasilkan melalui hidrolis campuran dimetildiklorosilan dan sedikit trimetilklorosilan. Bobot molekul rata-rata dari polimer linier berkisar 6.800 hingga 30.000.

*[Catatan: Dalam perdagangan, polidimetilsiloksan sering digunakan dalam sediaan yang mengandung silika gel. Zat murni diisolasi dari cairan-silika gel dengan cara sentrifugasi pada 20.000 rpm. Sebelum melakukan pengujian untuk Identifikasi, Indeks bias, Bobot jenis, dan Viskositas, hilangkan silika gel dengan sentrifugasi.*

*Monografi ini tidak berlaku untuk formula polidimetilsiloksan dalam air yang mengandung pengemulsi dan pengawet, yang ditambahkan pada silika gel]*

**PEMERIAN** Cairan kental, jernih, tidak berwarna.

**KELARUTAN** Tidak larut dalam air dan dalam etanol, larut dalam sebagian besar pelarut alifatik dan dalam pelarut hidrokarbon aromatik.

**PENGUNAAN** Antibusa, antikempal.

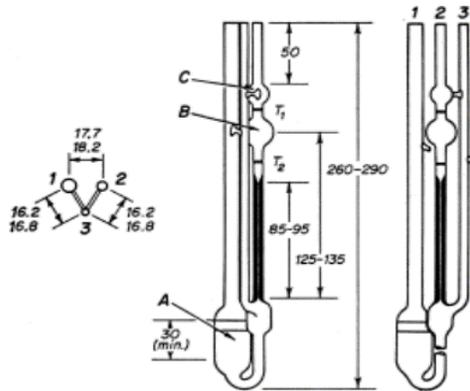
#### **IDENTIFIKASI**

1. *Bobot Jenis <904>* Antara 0,964 dan 0,977
2. *Indeks bias <905>* Antara 1,400 dan 1,405
3. Spektrum serapan inframerah dari cairan film zat diantara dua lempeng *natrium klorida P* menunjukkan bilangan gelombang maksimum yang sama pada *dimetilpolisiloksan BPF1*.

#### **KEMURNIAN**

1. *Susut pengeringan <912>* Tidak lebih dari 0,5%. Lakukan pengeringan pada suhu 150° selama 4 jam.

2. *Viskositas* Antara 100 dan 1.500 *centistokes* pada suhu 25°. Lakukan penetapan menggunakan Viskometer Ubbelohde seperti tertera pada gambar.



(dimensi dalam mm)

Untuk rentang 100 hingga 1.500 *centistokes*, digunakan viskometer No. 3, dengan diameter kapiler 2,00 + 0,04 mm. Viskometer harus dipasang dengan menggunakan penahan yang sesuai dengan dimensi tabung seperti tertera pada gambar, dan yang menahan viskometer vertikal. Garis di *bulb A* menunjukkan volume cairan minimum dan maksimum yang dapat digunakan untuk kesesuaian pengoperasian. Volume *bulb B* lebih kurang 5 ml.

*Kalibrasi viskometer* Lakukan penetapan konstanta viskositas,  $k$ , untuk setiap viskometer menggunakan minyak dengan viskositas yang diketahui. [Catatan: Pilih minyak dengan viskositas yang paling mendekati zat yang akan diuji]. Isi viskometer dengan memiringkan instrumen sekitar 30 derajat, dengan *bulb A* di bawah kapiler, masukkan sejumlah zat ke dalam pipa 1 dan tambahkan zat sampai tanda. Ketinggian tidak boleh di atas garis pengisian atas ketika viskometer dikembalikan ke posisi vertikal dan zat keluar dari pipa 1. Isi viskometer sehingga pipa-U di bagian bawah terisi sempurna tanpa ada gelembung udara terperangkap.

Setelah viskometer berada dalam tangas dengan suhu-konstan yang cukup lama hingga zat mencapai kesetimbangan suhu, tutup pipa 3 dengan jari hingga cairan pipa 2 mencapai bagian tengah *bulb C*. Pindahkan jari dari pipa 3 ke pipa 2 hingga zat turun dari ujung bawah kapiler. Angkat jari dari pipa 2, dan ukur waktu yang dibutuhkan (dengan ketelitian 0,1 detik) untuk perpindahan meniskus dari ( $T_1$ ) ke ( $T_2$ ). Untuk mendapatkan hasil yang akurat, peralatan harus disesuaikan untuk memberikan *elapsed time* dari 80 hingga 100 detik.

Hitung konstanta viskometer (k) menggunakan rumus:

$$k = \frac{v}{t_1}$$

$v$  = viskositas (*centistokes*); dan

$t_1$  = waktu pengeluaran cairan pembanding (detik)

*Penetapan viskositas Polidimetilsiloksan* Isi viskometer dengan zat dan lakukan seperti tertera pada prosedur kalibrasi; tetapkan waktu pengeluaran,  $t_2$ , dan hitung viskositas zat,  $v_s$ , dengan rumus:

$$v_s = kt_2$$

3. *Timbal* Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan menggunakan teknik spektrofotometer serapan atom/ICP-AES seperti tertera pada *Cemaran logam <702>*

### **PENETAPAN KADAR**

*Blangko Natrium peroksida P, asam asetat glasial P, silika P* (dengan kemurnian diketahui sebagai pembanding)

*Prosedur* Lakukan peleburan yang sama untuk zat, *Blangko*, dan pembanding silika. Untuk setiap zat, timbang saksama (W) tidak lebih dari 300 mg zat, masukkan ke dalam cawan lebur tipe-Parr (gunakan kapsul gelatin untuk zat cair). Tambahkan  $15,0 \pm 0,5$  g *natrium peroksida P*.

Rakit cawan lebur tipe-Parr, piala nikel 500 ml, dan tutup nikel atau yg setara (hindari menggunakan alat kaca selama melakukan peleburan dan pelarutan) dan pijarkan. Pasang tutup cawan secara terbalik, isi tutup cawan dengan air dan jaga air tetap penuh selama pemijaran. Panaskan bagian bawah cawan dengan lampu *blast* dengan jarak 100 mm dalam waktu 90 detik hingga cawan membara. Celupkan instrumen ke dalam air es, lepaskan rakitan instrumen. Tempatkan cawan di dalam piala nikel berisi 150 sampai 200 ml air suling. Bilas zat yang menempel pada tutup dengan air suling, masukan air bilasan ke dalam piala nikel, tutup piala nikel. Setelah pelarutan selesai dan larutan sudah dingin, pindahkan cawan dari piala nikel, dan bilas dengan air suling, masukkan air bilasan ke dalam piala nikel. Tambahkan 55,0 ml *asam asetat glasial P* ke dalam piala nikel. Dinginkan sampai suhu ruang, pindahkan ke labu tentukur 500-ml, encerkan dengan air suling sampai tanda. Larutan harus mengandung silikon lebih kurang  $100 \mu\text{g/ml}$  untuk bobot zat lebih kurang 130 mg. Metode ini memberikan hasil terbaik jika kadar larutan akhir silikon adalah 1 sampai  $200 \mu\text{g/ml}$ . Buat seri pembanding menggunakan teknik peleburan yang sama.

Ukur serapan zat, *Blangko* dan pembandingan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang serapan maksimum 251,6 nm. Atur serapan larutan *blangko* pada 0. Ukur serapan zat, *Blangko* dan pembandingan. Hitung persentase total silikon dalam zat menggunakan rumus:

$$0,05 \times \frac{C}{W}$$

C = kadar silikon dalam larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ )

W = bobot zat yang ditimbang (g)

## **SILIKON DIOKSIDA HALUS**

*Silicon dioxide, amorphous*

**INS** 551

**CAS** [7631-86-9]

112945-52-5 silika berasap (silika pirogenik)

112696-00-8 silika hidrat

**SINONIM** *Silica, Silicon dioxide, Synthetic amorphous silica (SAS)*

SiO<sub>2</sub>

**BM** 60,08

### ***Perubahan***

**DEFINISI** Silikon dioksida berbentuk amorf, diproduksi secara sintesis dengan proses termal, menghasilkan silika berasap (silika pirogenik), atau dengan proses basah, menghasilkan silika hidrat, endapan silika, dan silika gel. Silika berasap (silika pirogenik) pada dasarnya dihasilkan dari bentuk anhidrat dimana pada proses basah dihasilkan produk sebagai hidrat atau mengandung air yang terserap di permukaan.

Silika berasap (silika pirogenik) mengandung tidak kurang dari 99,0% dihitung terhadap zat yang telah dipijarkan. Silika hidrat (endapan silika dan silika gel) mengandung SiO<sub>2</sub> tidak kurang dari 94,0% dihitung terhadap zat yang telah dipijarkan.

### ***Perubahan***

**PEMERIAN** Silika berasap (silika pirogenik): serbuk amorf halus atau granul, putih. Silika hidrat: serbuk amorf halus atau granul, putih.

**KELARUTAN** Tidak larut dalam air dan tidak larut dalam etanol.

**PENGGUNAAN** Antikempal.

## **IDENTIFIKASI**

### ***Perubahan***

1. *Silika* Siapkan *Larutan uji* seperti pada *Penetapan Kadar*. Lakukan analisa silikon dalam *Larutan uji* dengan teknik ICP-AES seperti tertera pada *Spektrofotometri <901>*. Gunakan garis analitik untuk Silika (251,611 nm).

#### **Tambahan persyaratan**

2. *pH <909>* Silika berasap (Silika pirogenik): antara 3,0 dan 5,0. Lakukan penetapan menggunakan bubuk zat (1 dalam 20) pada suhu 20°; silika hidrat (endapan silika dan silika gel): antara 4,0 dan 9,0. Lakukan penetapan menggunakan bubuk zat (1 dalam 20) pada suhu 20°.

#### **Perubahan**

##### **KEMURNIAN**

1. *Susut pengeringan <912>* Silika berasap (silika pirogenik): tidak lebih dari 2,5%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam. Silika hidrat (endapan silika dan silika gel): tidak lebih dari 8%. Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.
2. *Sisa pemijaran <913>* Silika berasap (silika pirogenik): tidak lebih dari 2,5% dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Lakukan pemijaran pada suhu 1000° selama 1 jam. Silika hidrat (endapan silika dan silika gel): tidak lebih dari 8,5%. Lakukan pemijaran pada suhu 1000° selama 1 jam.
3. *Cemaran larut asam hidroklorida 0,5 N*
  - Timbal: tidak lebih dari 3 bpj.
  - Arsen: tidak lebih dari 1 bpj.

Ekstraksi sejumlah zat dalam *asam hidroklorida 0,5 N* dengan *closed digestion system* selama 30 menit. Dinginkan larutan, saring menggunakan penyaring membran 0,1 µm. Cuci penyaring dua kali dengan *asam hidroklorida 0,5 N* panas dan tambahkan *asam hidroklorida 0,5 N* sampai volume tertentu.

#### **Perubahan**

**PENETAPAN KADAR** Lakukan penetapan dengan teknik ICP-AES seperti tertera pada *Spektrofotometri <901>*.

*Larutan A* Timbang saksama sejumlah zat (tergantung pada kadar air) setara dengan lebih kurang 500 mg zat kering dalam krus platina atau nikel. Tambahkan 5 g *kalium hidroksida P* dan 2 g *asam borat P*, campur dan lelehkan sempurna menggunakan *torch burner* dan biarkan pada suhu ruang. Masukkan krus yang berisi lelehan zat ke dalam gelas piala PTFE 250 ml yang berisi 150 ml air deionisasi panas. Larutkan residu dengan pengocokan. Bilas krus dengan air deionisasi panas dan angkat. Tambahkan 50 ml *asam*

*hidroklorida P* dan pindahkan larutan ke dalam labu tentukur polipropilen 250-ml. Bilas gelas piala sebanyak tiga kali, tiap kali dengan air deionisasi panas. Masukkan bilasan ke labu tentukur, tambahkan air sampai tanda.

*Larutan uji* Encerkan *Larutan A* dengan *asam hidroklorida P 2%*, sedemikian hingga berada dalam rentang kurva baku.

Gunakan garis analitik untuk Silika (251,611 nm). Rekam dan buat kurva baku dengan kadar 0,1 sampai 5,0 g/mL. Hitung persentase Si dalam zat menggunakan rumus:

$$\frac{2,139 \times C \times 250 \times DF}{(W \times 106)} \times 100$$

**C** : Konsentrasi silika dalam *Larutan uji* (µg/ml)

**DF** : faktor pengenceran (pengenceran *larutan A* pada *larutan uji*)

**W** : Bobot zat pijar (g)

## DAFTAR LAMPIRAN

### <85> PENETAPAN KADAR GLIKOSIDA STEVIOL

Tentukan persentase glikosida steviol mayor (yang memiliki standar analisis, misalnya rebaudiosida A, B, C, D, E, F, M, N, O; dulkosida A; rubusosida; steviosida; dan steviolbiosida) dihitung sebagai zat kering menggunakan metode KCKT-UV dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <903>. Jika jumlah dari seluruh glikosida steviol mayor zat adalah lebih kecil 95%, pilihan pengujian menggunakan teknik KCKT-UV-Spektrofotometri Massa dapat dilakukan untuk mengidentifikasi glikosida steviol minor (lihat Bagian 2) dan memperoleh bobot molekul masing-masing. Kadar glikosida steviol minor ditentukan menggunakan kurva baku pembandingan glikosida steviol minor yang tersedia di perdagangan atau menggunakan bobot molekul masing-masing yang terkoreksi luas puncak UV dan kurva baku rebaudiosida A (diperoleh dari Bagian 1). Hitung jumlah glikosida steviol mayor dan minor (jika memungkinkan) dan tentukan jumlah kadar glikosida terhadap zat kering.

*Fase gerak A Air deionisasi untuk KCKT atau KCKT-Spektrofotometri Massa, disaring menggunakan penyaring 0,2- $\mu$ m, dengan asam format P 0,1% atau asam asetat P 0,1%. [Catatan: Jika hanya menggunakan deteksi UV, dapat digunakan 20 mM dapar natrium fosfat pH 2,6 atau asam trifluoroasetat P 0,01%].*

*Fase gerak B Asetonitril untuk KCKT atau Kromatografi Cair-Spektrofotometri Massa, disaring menggunakan penyaring 0,2- $\mu$ m.*

*Pengencer asetonitril P:air (7:3).*

*Pembandingan Steviosida, rebaudiosida A, rebaudiosida B, rebaudiosida C, rebaudiosida D, rebaudiosida E, rebaudiosida F, rebaudiosida M, rebaudiosida N, rebaudiosida O, dulkosida A, rubusosida dan steviolbiosida.*

*Kesetimbangan Serbuk zat uji harus disetimbangkan tidak kurang 12 jam sebelum penetapan kadar. Taburkan 1-2 g zat uji dalam wadah terbuka hingga membentuk lapisan tipis setebal tidak lebih dari 6 mm. Aduk sesekali untuk memastikan keseragaman penyerapan kelembaban absorpsi. Susut pengeringan zat uji yang disetimbangkan harus ditetapkan seperti pada glikosida steviol yang berasal dari *Stevia rebaudiana* Bertoni, glikosida steviol hasil fermentasi dan glikosida steviol termodifikasi enzim.*

*Larutan pembandingan glikosida steviol* Jika menggunakan pembandingan campuran yang tersedia dalam perdagangan, buat larutan pembandingan

masing-masing atau campuran dengan lima titik kadar dalam rentang 5-500 µg/ml. Jika hanya tersedia dalam perdagangan hanya pembanding rebaudiosida A, buat larutan dengan lima kadar dengan rentang 5-500 µg/ml. Buat semua larutan dengan menggunakan *Pengencer*.

Buat larutan kontrol kualitas dengan kadar yang berada dalam rentang kurva kalibrasi.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 40-50 mg zat yang telah ditimbang, masukkan ke dalam labu tentukur 100-ml. Tambahkan 80 ml *Pengencer*, sonikasi dan kocok sampai larut. Diamkan hingga mencapai suhu ruang dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

**Bagian 1: Penetapan Kadar Glikosida Steviol Mayor menggunakan KCKT-UV**

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV-Vis atau Diode Array dengan panjang gelombang 210 nm, kolom C18 150 mm x 4,6 mm dengan ukuran partikel 2,7 µm misalnya berisi Agilent Poroshell 120 SB-C18 atau yang setara, autosampler pada 10-20°, laju alir lebih kurang 0,5 ml/menit, pertahankan kolom pada suhu 45°.

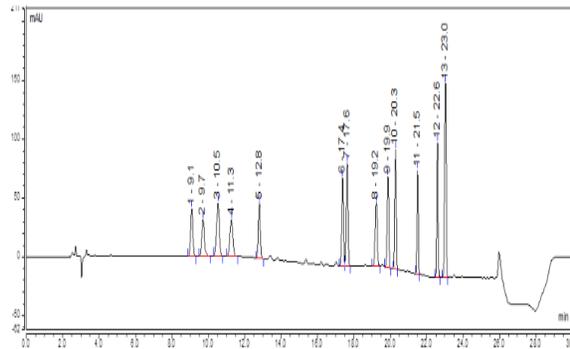
Kromatograf diprogram sebagai berikut:

<b>Waktu (menit)</b>	<b>Fase gerak A (%)</b>	<b>Fase gerak B (%)</b>
0.0	75.0	25.0
8.0	75.0	25.0
13.0	68.0	32.0
16.0	68.0	32.0
19.0	60.0	40.0
23.0	60.0	40.0
23.5	40.0	60.0
25.0	40.0	60.0
25.5	75.0	25.0
35	75.0	25.0

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume yang sama (lebih kurang 5 µl) *Larutan pembanding campuran* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Buat kurva baku untuk setiap glikosida steviol. Jika rebaudiosida A adalah satu-satunya pembanding yang tersedia, buat kurva baku untuk

rebaudiosida A dari *Larutan pembanding*. [Catatan: Direkomendasikan pembobotan 1/x dan tidak memaksakan kurva melalui 0]. Hitung persentase setiap glikosida steviol pada masing-masing kurva baku dan tentukan rerata kadar dalam larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ ). Suntikkan *Larutan pembanding* dan larutan kesesuaian sistem untuk memastikan kinerja sistem dapat diterima.

*Identifikasi Waktu retensi* setiap puncak kromatogram utama pada larutan uji diukur menggunakan pembanding mayor. Contoh kromatogram KCKT-UV glikosida steviol mayor yang diperoleh menggunakan pembanding yang tersedia secara komersil, Gambar 1.



**Gambar 1. Contoh kromatogram dan waktu retensi KCKT-UV Glikosida steviol mayor dengan pembanding kuantitatif dalam perdagangan**

**Keterangan Gambar 1**

<b>Nomor Puncak</b>	<b>Analit</b>	<b>Estimasi Waktu Retensi (menit)</b>
1	Rebaudiosida E	9.1
2	Rebaudiosida O	9.7
3	Rebaudiosida D	10.5
4	Rebaudiosida N	11.3
5	Rebaudiosida M	12.8
6	Rebaudiosida A	17.4
7	Steviosida	17.6
8	Rebaudiosida F	19.2
9	Rebaudiosida C	19.9
10	Dulkosida A	20.3
11	Rubusosida	21.5
12	Rebaudiosida B	22.6
13	Steviolbiosida	23.0

Perhitungan:

1) Menggunakan perbandingan masing-masing glikosida steviol

Hitung persentase glikosida steviol (GS) dalam *Larutan uji* dengan rumus:

$$\frac{C_{GS}}{C_{sampel}} \times 100$$

$C_{GS}$  = rerata kadar glikosida steviol dalam *larutan uji*, yang ditentukan dari kurva baku yang relevan ( $\mu\text{g/ml}$ )

$C_{sampel}$  = kadar larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ )

2) Menggunakan perbandingan rebaudiosida A dan faktor respon relatif

Hitung persentase masing-masing glikosida steviol (GS) dalam *Larutan uji* dengan rumus:

$$\frac{C_x}{C_u} \times F \times 100$$

$C_x$  = rerata kadar glikosida steviol sebagai rebaudiosida A, yang ditentukan dari kurva baku rebaudiosida A ( $\mu\text{g/ml}$ )

$F$  = faktor respon relatif UV untuk glikosida steviol pada 210 nm, dari Tabel 2

$C_u$  = kadar larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Faktor Respon Relatif (FRR) glikosida steviol tertentu (reb X) terhadap rebaudiosida A dapat dihitung menggunakan data ekperimental yang diperoleh pada 210 nm dengan perbandingan.

**Tabel 2. Faktor Respon Relatif (FRR) pada 210 nm**

Senyawa	Faktor Respon Relatif terhadap rebaudiosida A	
	Eksperimental*	Bobot molekul
Rebaudiosida A	---	1
Rebaudiosida B	0.82	0.83
Rebaudiosida C	1.03	0.98
Rebaudiosida D	1.16	1.17
Rebaudiosida E	0.98	1.00
Rebaudiosida F	0.97	0.97
Rebaudiosida M	1.36	1.34
Rebaudiosida N	1.25	1.32
Rebaudiosida O	1.56	1.49

Senyawa	Faktor Respon Relatif terhadap rebaudiosida A	
	Eksperimental*	Bobot molekul
Steviosida	0.80	0.83
Dulkosida A	0.83	0.82
Steviolbiosida	0.76	0.66
Rubusosida	0.65	0.66

\*Seluruh eksperimen Faktor Respon Relatif diperoleh menggunakan *UV/PDA flow cell* sepanjang 10 mm. Faktor Respon Relatif dihitung menggunakan nilai kemurnian yang ditentukan sebagaimana baku pembanding dari pabrik, termasuk koreksi terhadap kelembapan dan pelarut. Konfirmasi Faktor Respon Relatif glikosida utama secara independen dianjurkan saat mengadopsi metode atau saat mengubah parameter operasional.

Hitung persentase glikosida steviol mayor dalam zat dengan menjumlahkan tiap persentase glikosida mayor. Jika jumlah kadar glikosida steviol mayor kurang dari 95%, lanjutkan ke Bagian 2.

### **Bagian 2: Pengukuran Glikosida Steviol minor menggunakan KCKT-UV-MS**

Spektrofotometer massa dihubungkan ke sistem KCKT-UV yang digunakan pada Bagian 1. Sistem digunakan untuk mengidentifikasi puncak minor yang tidak sesuai dengan waktu retensi glikosida steviol mayor yang tidak teridentifikasi pada Bagian 1. Jika pembanding murni tersedia, hitung glikosida minor berdasarkan perbandingan kurva baku untuk glikosida minor (lihat perhitungan 1 pada Bagian 1). Jika pembanding murni glikosida minor tidak tersedia, hitung berdasarkan kurva baku rebaudiosida A dan FRR berdasarkan bobot molekul (lihat perhitungan 2 pada Bagian 1).

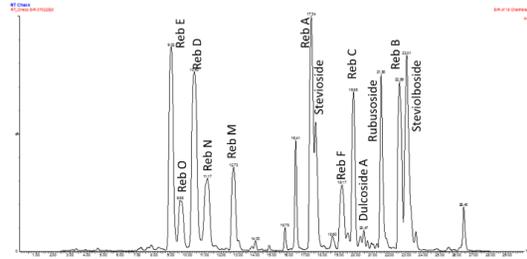
Kondisi pengoperasian KCKT-UV-MS dapat beragam tergantung produsen dan model sistem yang digunakan; kondisi harus diatur mengikuti manual dari produsen. Spektrofotometer massa dapat dioperasikan dalam mode pemindaian penuh atau dalam *selected ion monitoring mode* (SIM) menggunakan nilai *m/z* yang tertera di Tabel 3. [Catatan: Tabel 3 nilai *m/z* mencakup glikosida steviol mayor dan minor yang teridentifikasi dari daun *Stevia rebaudiana* Bertoni. Lihat Tabel informasi kimia glikosida steviol <851>]

**Tabel 3. Contoh Nilai  $m/z$  SIM dan Kemungkinan Identitas jika Puncak Waktu Retensi Berbeda dari Glikosida Steviol Mayor**

<b>Ion Massa Molekul [M-H]<sup>-</sup></b>	<b>Identitas</b>
317	Steviol atau isomernya
479	Steviol +1 glukosida
625	Dulkosida A1
641	Isomer Steviolbiosida atau Rubusosida
774	Steviosida F atau isomernya
787	Isomer Dulkosida A
803	Isomer Rebaudiosida B atau Steviosida
935	Isomer Rebaudiosida F
949	Isomer Rebaudiosida C
965	Isomer Rebaudiosida A
1097	Steviol + 4 Glc + 1 Arabinosa atau isomernya
1111	Steviol + 4 Glc + 1 Rhamnosa atau isomernya
1127	Isomer Rebaudiosida D
1259	Steviol + 5 Glc + Xilosa atau isomernya
1273	Isomer Rebaudiosida N
1289	Isomer Rebaudiosida M
1435	Isomer Rebaudiosida O

\*Daftar diatas tidak mencakup semua kemungkinan Glikosida steviol;  $m/z$  tambahan dapat dipertimbangkan

[Catatan: Lihat Gambar 2].



**Gambar 2. Contoh pemindaian SIM menggunakan nilai m/z yang tertera pada Tabel 3**

Jika pembanding glikosida steviol minor tidak tersedia, untuk tujuan identifikasi, satu atau lebih ion fragmentasi dalam sumber pada Tabel 4 harus digunakan bersama dengan ion molekuler.

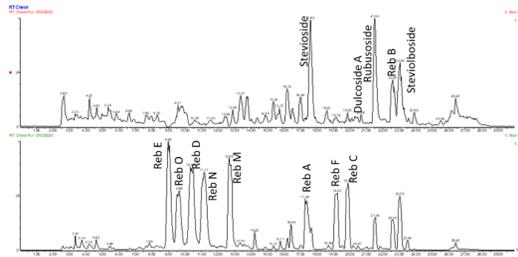
**Tabel 4. Contoh Ion Fragmentasi Diagnostik**

<b>Ion Fragmentasi</b>	<b>Identitas</b>
<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	
317	Steviol
479	Steviol +1 glukosida
625	Steviol +2 glukosida - oksigen [M-16]
641	Steviol +2 glukosida
787	Steviol +2 glukosida +1 Rhamnosida
803	Steviol +3 glukosida
949	(Deoksi)-Steviol +4 glukosida
965	Steviol +4 glukosida

\*Daftar diatas tidak mencakup semua kemungkinan Glikosida steviol; m/z tambahan dapat dievaluasi.

Contoh sistem spektrofotometer massa dilengkapi dengan *ionisasi electrospray* dengan kepolaran negatif, *cone voltage* 35 V (rendah – m/z lebih kecil dari atau sama dengan 900 amu) dan 80V (tinggi – m/z lebih besar dari 900 amu),

resolusi 1 amu, akuisisi data 50 hingga 2000 m/z pemindaian [Catatan: Lihat Gambar 3].



**Gambar 3. Spektogram atas: Pemindaian penuh m/z 50-900 amu;  
Spektogram bawah: Pemindaian penuh m/z 901-2000 amu**

Hitung persentase glikosida steviol minor menggunakan kurva baku rebaudiosida A atau menggunakan rumus:

$$\frac{C_x}{C_u} \times \frac{M_x}{M_A} \times 100$$

$C_x$  = rerata kadar glikosida steviol minor sebagai rebaudiosida A, yang ditetapkan dari kurva baku rebaudiosida A ( $\mu\text{g/ml}$ )

$M_x$  = Bobot molekul glikosida steviol minor yang diperoleh dari spektrofotometer massa

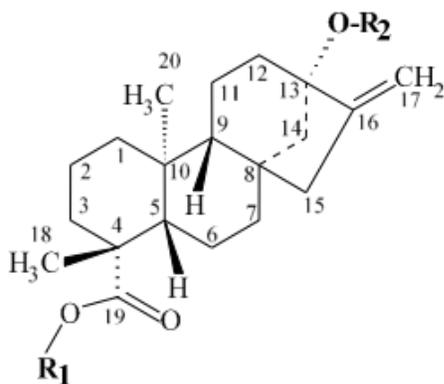
$M_A$  = bobot molekul rebaudiosida A

$C_u$  = kadar larutan uji ( $\mu\text{g/ml}$ )

[Catatan: hitung persentase glikosida stevio minor menggunakan pembandingan glikosida steviol minor yang tersedia dalam perdagangan].

### <851> Tabel Informasi Kimia Glikosida Steviol

#### Rumus dasar glikosida steviol



**Informasi formula dan R-Grup dari Glikosida Steviol yang sudah Teridentifikasi dari Daun Stevia Rebaudiana Bertoni pada tabel berikut**

#	Jenis Glikosida	CAS	Trivial Formula	BM	Steviol Equivalent	R1	R2	Reference
<b>1. Steviol + Glucose (SvGn)</b>								
1.01	Steviolmonosida		SvG1	481	0.66	H	Glcβ1-	Ohta et al. (2010)
1.02	Steviolmonosida A		SvG1	481	0.66	Glcβ1-	H	Gardana et al. (2010)
1.03	Rubusosida	64849-39-4	SvG2	643	0.49	Glcβ1-	Glcβ1-	Ohta et al. (2010)
1.04	Steviolbiosida	41093-60-1	SvG2	643	0.49	H	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Kohda et al. (1976)
1.05	Steviosida	57817-89-7	SvG3	805	0.40	Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Bridel & Lavielle (1931)
1.06	Steviosida A		SvG3	805	0.40	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ1-	Wu et al. (2012)
1.07	Rebaudiosida B	58543-17-2	SvG3	805	0.40	H	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Kohda et al. (1976)
1.08	Rebaudiosida G		SvG3	805	0.40	Glcβ1-	Glcβ(1-3)Glcβ1-	Ohta et al. (2010)
1.09	Steviosida B		SvG3	805	0.40	Glcβ(1-3)Glcβ1-	Glcβ1-	Chaturvedula & Zamora (2014)
1.10	Rebaudiosida E	63279-14-1	SvG4	967	0.33	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Sakamoto et al. (1977a)
1.11	Rebaudiosida A	58543-16-1	SvG4	967	0.33	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Kohda et al. (1976)
1.12	Rebaudiosida A2		SvG4	967	0.33	Glcβ1-	Glcβ(1-6)Glcβ(1-2)Glcβ1-	Chaturvedula & Prakash (2011a)
1.13	Rebaudiosida D	63279-13-0	SvG5	1129	0.28	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Sakamoto et al. (1977a)
1.14	Rebaudiosida I		SvG5	1129	0.28	Glcβ(1-3)Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Ohta et al. (2010)
1.15	Rebaudiosida L		SvG5	1129	0.28	Glcβ1-	Glcβ(1-)	Ohta et al. (2010)

#	Jenis Glikosida	CAS	Trivial Formula	BM	Steviol Equivalent	R1	R2	Reference
							6)Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	
1.16	Rebaudiosida Q2		SvG5	1129	0.28	Glcα(1-2)Glcα(1-4)Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Chaturvedula & Prakash (2011b)
1.17	Rebaudiosida Q		SvG5	1129	0.28	Glcβ1-	Glcα(1-4)Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	-
1.18	Rebaudiosida I2		SvG5	1129	0.28	Glcβ1-	Glcα(1-3)Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Chaturvedula et al. (2011a)
1.19	Rebaudiosida Q3		SvG5	1129	0.28	Glcβ1-	Glcα(1-4)Glcβ(1-3)[Glcβ(1-2)]Glcβ1-	Chaturvedula et al. (2011a)
1.20	Rebaudiosida I3		SvG5	1129	0.28	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-6)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Chaturvedula et al. (2011a)
1.21	Rebaudiosida AM		SvG5	1129	0.28	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Prakash & Ma (2018)
1.22	Rebaudiosida M	122061 6-44-3	SvG6	1291	0.25	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Ohta et al. -2010
1.23	Rebaudiosida 1h		SvG7	1453	0.22	Glcβ(1-3)Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Prakash & Ma (2018)
1.24	Rebaudiosida IX		SvG9	1778	0.18	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-	Glcβ(1-3)]Glcβ	Prakash & Ma (2018)

#	Jenis Glikosida	CAS	Trivial Formula	BM	Steviol Equivalent	R1	R2	Reference
						3)]Glcβ 1-	(1- 3)]Glcβ (1- 2)]Glcα (1- 6)Glcβ( 1- 2)]Glcβ 1-	
<b>2. Steviol + Rhamnose + Glucose (SvR1Gn)</b>								
2.02	Dulcosida B		SvR1G2	789	0.40	H	Rhaα(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Ohta et al. (2010)
2.03	Rebaudiosida C	63550- 99-2	SvR1G3	951	0.33	Glcβ1-	Rhaα(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Sakamoto et al. (1977b)
2.04	Rebaudiosida C2		SvR1G3	951	0.33	Rhaα(1 - 2)Glcβ 1-	Glcβ(1 - 2)Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
2.05	Rebaudiosida S		SvR1G3	951	0.33	Rhaα(1 - 2)Glcβ 1-	Glcα(1 - 2)Glcβ 1-	Ibrahim et al (2016)
2.06	Rebaudiosida H		SvR1G4	1113	0.29	Glcβ1-	Glcβ(1 - 3)Rhaα (1- 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Ohta et al. (2010)
2.07	Rebaudiosida K		SvR1G4	1113	0.29	Glcβ(1 - 2)Glcβ 1-	Rhaα(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Ohta et al. (2010)
2.08	Rebaudiosida K2		SvR1G4	1113	0.29	Glcβ(1 - 6)Glcβ 1-	Rhaα(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
2.09	Rebaudiosida J		SvR1G4	1113	0.29	Rhaα(1 - 2)Glcβ 1-	Glcβ(1- 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Ohta et al. (2010)
2.10	Rebaudiosida N	122061 6-46-5	SvR1G5	1275	0.25	Rhaα(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Glcβ(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Ohta et al. -2010
2.11	Rebaudiosida		SvR1G5	1275	0.25	Glcβ(1-	Rhaα(1	Prakash &

#	Jenis Glikosida	CAS	Trivial Formula	BM	Steviol Equivalent	R1	R2	Reference
	N2					2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	- 2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Ma (2018)
2.12	Rebaudiosida N6		SvR1G5	1275	0.25	Glcβ(1-3)Rhaa(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Prakash & Ma (2018)
2.13	Rebaudiosida O	1220616-48-7	SvR1G6	1437	0.22	Glcβ(1-3)Rhaa(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Ohta et al.-2010
2.14	Rebaudiosida O2		SvR1G6	1437	0.22	Glcβ(1-4)Rhaa(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Purkayastha et al. (2016)
2.16	Rebaudiosida O6		SvR1G7	1600	0.20	Glcβ(1-3)Rhaa(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-6)Glcβ(1-3)[Glcβ(1-2)]Glcβ1-	Prakash & Ma (2018)
2.17	Rebaudiosida O7		SvR2G6	1584	0.20	Glcβ(1-3)Rhaa(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-3)Rhaa(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Prakash & Ma (2018)
<b>3. Steviol + Xylose + Glucose (SvX1Gn)</b>								
3.01	Steviosida F		SvX1G2	775	0.41	Glcβ1-	Xylβ(1-2)Glcβ1-	Chaturvedula & Prakash (2011c)
3.02	Rebaudiosida F	438045-89-7	SvX1G3	937	0.34	Glcβ1-	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Starratt et al. (2002)
3.03	Rebaudiosida F2		SvX1G3	937	0.34	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Xylβ(1-3)]Glcβ1-	Chaturvedula & Prakash (2011c)
3.04	Rebaudiosida F3		SvX1G3	937	0.34	Xylβ(1-6)Glcβ	Glcβ(1-	Chaturvedula et al. (2011b)

#	Jenis Glikosida	CAS	Trivial Formula	BM	Steviol Equivalent	R1	R2	Reference
						1-	2)Glcβ 1-	
3.05	Rebaudiosida R		SvX1G3	937	0.34	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)] Xylβ1-	Ibrahim et al (2016)
3.06	Rebaudiosida U		SvX1G4	1099	0.29	Xylβ(1-2)Glcβ 1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
3.07	Rebaudiosida U2		SvX1G4	1099	0.29	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Glcβ(1-2)Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2016)
3.08	Rebaudiosida U3		SvX1G4	1099	0.29	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-4)]Glcβ 1-	Glcβ(1-2)Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
3.09	Rebaudiosida V		SvX1G5	1261	0.25	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Glcβ(1-2)[Xylβ(1-3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
3.10	Rebaudiosida V2		SvX1G5	1261	0.25	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Prakash & Chaturvedula (2013)
<b>4. Steviol + Arabinose + Glucose (SvA1Gn)</b>								
4.02	Rebaudiosida W2		SvA1G4	1099	0.29	Araα(1-2)Glcβ 1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2016)
4.03	Rebaudiosida W3		SvA1G4	1099	0.29	Araα(1-6)Glcβ 1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
4.04	Rebaudiosida Y		SvA1G5	1261	0.25	Glcβ(1-2)[Araα(1-6)]Glcβ 1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2019)
<b>5. Steviol + Fructose + Glucose (SvF1Gn)</b>								
5.01	Rebaudiosida A3		SvF1G3	967	0.33	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Fruβ(2-3)]Glcβ 1-	Chaturvedula et al. (2011c)
<b>6. Steviol + Galactose + Glucose (SvGa1Gn)</b>								
6.01	Rebaudiosida T		SvGa1G4	1129	0.28	Glcβ(1-2)Glcβ 1-	Galβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ 1-	Purkayastha et al. (2016)
<b>7. Steviol + -de-oxy glucose + Glucose (SvdG1Gn)</b>								

#	Jenis Glikosida	CAS	Trivial Formula	BM	Steviol Equivalent	R1	R2	Reference
							deoxy Glcβ(1 - 2)Glcβ 1-	a & Prakash (2011d)
7.02	Steviosida E		SvdG1G3	951	0.33	Glcβ1-	6- deoxy Glcβ(1 - 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Chaturvedula & Prakash (2011d)
7.03	Steviosida E2		SvdG1G3	951	0.33	6- deoxy Glcβ1-	Glcβ(1- 2)]Glcβ (1- 3)]Glcβ 1-	Chaturvedula et al. (2011d)

**DAFTAR PEREAKSI DAN LARUTAN PEREAKSI**

**N-etildiisopropilamin P**  $C_8H_{19}N$ ; BM 129.25; [7087-68-5]; murni pereaksi.

**Natrium format P**  $CHNaO_2$ ; BM 68.01; [141-53-7]; murni pereaksi

**Natrium vitrida P** [(natrium bis (2-metoksietoksi) aluminium dihidrat];  
 $C_6H_{16}AlNaO_4$ ; BM 202,16; [22722-98-1]; murni pereaksi

**Tris(hidroksimetil)aminometan P**  $C_4H_{11}NO_3$ ; BM 121,13; [77-86-1] murni pereaksi

MENTERI KESEHATAN  
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

BUDI G. SADIKIN

Salinan sesuai dengan aslinya

Kepala Biro Hukum  
Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan,



Indah Febrianti, S.H., M.H.  
NIP 197802122003122003