

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Deskripsi Mie**

Mie adalah panganan olahan yang dikonsumsi masyarakat mulai dari anak-anak sampai orang dewasa. Mie digunakan pada panganan olahan misalnya soto, bakso, mie rebus, mie goreng, mi ayam, dll. Mie mempunyai kandungan gizi utama yaitu karbohidrat sehingga termasuk bahan makanan pokok atau penghasil energi, bersama dengan nasi. Kalori yang dihasilkan dari 200 gram mie basah atau 50 gram mie kering yang masih mentah sebanyak 175 kalori dan 40 gram karbohidrat. Hal ini setara dengan porsi 100 gram nasi putih (Cahyogi & Lagiono, 2016).

Menurut Lestari (2012) dalam Wardani (2017), mie adalah makanan yang banyak disukai masyarakat pada akhir-akhir ini. Kandungan utama pada mie adalah karbohidrat dalam bentuk pati, tetapi kurang mengandung serat serta zat gizi lain yang diperlukan tubuh. Maka dari itu perlu penambahan zat gizi lain agar zat gizi dapat terpenuhi. Pengkayaan kandungan seperti  $\beta$ -karoten dan serat pada mie dengan menambahkan tepung labu kuning maka diharapkan dapat membantu mengatasi kekurangan vitamin A di Indonesia.

Berdasarkan pada tahap pengolahan dan kadar airnya pada mie dapat dibagi menjadi 5 yaitu:

- a. Mie mentah/segar, merupakan mie produk langsung dari proses pemotongan lembaran adonan dengan kadar air 35 persen.
- b. Mie basah, merupakan mie mentah yang mengalami perebusan dalam air mendidih terlebih dahulu, baru dipasarkan mie basah ini mempunyai kadar air sekitar 52 persen.
- c. Mie kering, merupakan mie mentah yang dikeringkan, mie kering ini mempunyai kadar air sekitar 10 persen.
- d. Mie goreng, merupakan mie mentah yang sebelumnya digoreng terlebih dahulu baru dipasarkan.

- e. Mie instan (mie siap hidang), merupakan mie mentah, yang sudah mengalami pengukusan dan pengeringan sehingga menjadi mie instan goreng (Koswara, 2009).

### **2.1.1 Mie Kuning**

Mie kuning merupakan mie yang terbuat dari tepung terigu berprotein, pengrajin mie menambahkan sedikit pewarna makanan berwarna kuning atau menambahkan sari kunyit agar mie berwarna kuning. Mie kuning adalah mie yang umum ditemukan di pasaran. Di Indonesia mie kuning terdiri dari dua jenis, kemasan kering yang mengharuskan pembeli merebus mie terlebih dahulu sebelum digunakan dan mie basah kuning yang dalam bentuk kiloan, namun mie kuning basah mempunyai umur simpan yang pendek (Indriani & Suwita, 2018).

Menurut Winarno (2002) dalam Indriani & Suwita (2018), mie kuning basah merupakan mie yang identik dengan kadar air yang tinggi maka umur simpan pada mie basah cukup pendek. Umur simpan yang cukup pendek ini dimanfaatkan oleh beberapa pedagang untuk menambahkan bahan kimia seperti boraks dan formalin agar mie terlihat tetap awet, baik, dan terlihat seperti baru diproduksi dan penambahan pewarna sintesis seperti Metanil yellow agar terlihat segar. Metanil yellow sering digunakan oleh pedagang karena selain mudah didapat dan harganya pun relatif lebih murah dibandingkan dengan pewarna alami.

### **2.1.2 Proses Pembuatan Mie**

Tahapan pembuatan mie terdiri dari tahap pencampuran, *roll press* (pembentukan lembaran), pembentukan mie, pengukusan, penggorengan, pendinginan serta pengemasan (Koswara, 2009).

- a. Tahap pencampuran yaitu tahap yang bertujuan agar hidrasi tepung dengan air berlangsung secara merata dan menarik serat-serat gluten. Untuk mendapatkan adonan yang baik harus

diperhatikan jumlah penambahan air (28-38%), waktu pengadukan (15-25 menit), dan suhu adonan (24-40°C).

- b. Proses *roll press* (pembentukan lembaran) yaitu bertujuan untuk menghaluskan serat-serat gluten dan membuat lembaran adonan. Pasta yang dipress sebaiknya tidak bersuhu rendah yaitu kurang dari 25°C, karena pada suhu tersebut menyebabkan lembaran pasta yang pecah-pecah dan kasar. Mutu lembaran pasta yang demikian akan menghasilkan mie yang mudah patah, tebal akhir pasta sekitar 1,2-2 mm. Di akhir proses pembentukan lembaran, lembar adonan yang tipis dipotong memanjang selebar 1-2 mm dengan rool pemotong mie, selanjutnya dipotong melintang pada panjang tertentu, sehingga dalam keadaan kering menghasilkan berat standar.
- c. Pembentukan mie dilakukan proses pengukusan. Proses pengukusan pada proses ini terjadi gelatinisasi pati dan koagulasi gluten sehingga dengan terjadinya dehidrasi air dari gluten akan menyebabkan timbulnya kekenyalan mie. Hal ini disebabkan oleh putusannya ikatan hidrogen, sehingga rantai ikatan kompleks pati dan gluten lebih rapat. Pada waktu sebelum dikukus, ikatan bersifat lunak dan fleksibel, tetapi setelah dikukus menjadi keras dan kuat.
- d. Proses selanjutnya, mie digoreng dengan minyak pada suhu 140-150°C selama 60 sampai 120 detik. Tujuannya agar terjadi dehidrasi lebih sempurna sehingga kadar airnya menjadi 3-5 %. Suhu minyak yang tinggi menyebabkan air menguap dengan cepat dan menghasilkan pori-pori halus pada permukaan mie, sehingga waktu rehidrasi dipersingkat.
- e. Proses pendinginan mie ditiriskan dengan cepat hingga suhu 40°C dengan kipas angin yang kuat. Proses tersebut bertujuan agar minyak memadat dan menempel pada mie. Selain itu juga membuat tekstur mie menjadi keras. Pendinginan dilakukan sempurna, karena jika uap air berkondensasi akan menyebabkan

tumbuhnya jamur. Pengeringan dapat juga dilakukan menggunakan oven bersuhu 60°C sebagai pengganti proses penggorengan,

- f. Mie yang diproduksi dikemas dengan plastik (Koswara, 2009).

## **2.2 Zat Warna**

### **2.2.1 Definisi Zat Pewarna**

Menurut Depkes RI (1985) dalam Karunia (2013), bahan pewarna adalah zat yang digunakan untuk memberi dan memperbaiki warna, atau suatu pigmen yang berasal dari sayuran, hewan, mineral atau sumber lain yang bila ditambahkan atau dicampurkan pada suatu makanan, obat dan kosmetik dapat memberikan warna tertentu.

Menurut Syah (2005) dalam Kustiarini (2016), Ada beberapa alasan penambahan zat pewarna pada makanan, yaitu:

- a. Untuk menutupi perubahan warna karena akibat paparan cahaya, temperatur atau udara yang ekstrim pada poses pengolahan dan penyimpanan.
- b. Untuk memperbaiki variasi alami pada bagian warna. Produk pangan yang salah warna akan diasosiasikan dengan kualitas rendah. Jeruk yang matang di pohon contohnya, biasanya sering disemprot pewarna *Citrus Red* No 2 untuk memperbaiki warnanya yang hijau atau oranye kecoklatan. Tujuan penambahan warna disini untuk menutupi kualitas yang buruk sebenarnya tidak bisa diterima apalagi menggunakan pewarna yang berbahaya.
- c. Untuk membuat identitas atau pengenalan pada produk pangan. Seperti: identitas es krim stroberi berwarna merah.
- d. Untuk menarik minat para konsumen dengan pilihan-pilihan warna yang menyenangkan
- e. Agar menjaga rasa dan vitamin yang mungkin akan berubah karena terpengaruh sinar matahari selama produk dalam penyimpanan.

## 2.2.2 Macam-Macam Zat Pewarna

### a. Zat Pewarna Alami

Pewarna alami adalah warna yang diperoleh dari bahan alami, nabati, hewani ataupun mineral. Secara kuantitas, dibutuhkan zat pewarna alami yang lebih banyak dari pada zat pewarna sintetis untuk menghasilkan tingkat pewarnaan yang sama. Pada kondisi ini, dapat terjadi perubahan yang tidak dapat terduga pada tekstur dan aroma makanan. Zat pewarna alami menghasilkan karakteristik warna yang lebih pudar dan warna yang kurang stabil jika dibandingkan dengan pewarna sintetis. Maka dari itu zat ini tidak dapat digunakan sesering zat pewarna sintetis. Beberapa pewarna alami yang banyak dikenal masyarakat seperti daun suji untuk membuat warna hijau, daun jati untuk warna merah, kunyit untuk warna kuning, dan gula merah untuk warna coklat. Zat pewarna alami inilah yang lebih aman digunakan daripada zat pewarna sintetis (Kustiarini, 2016).

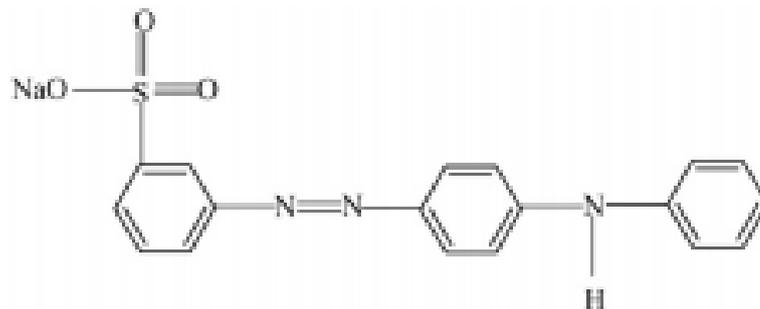
### b. Zat Pewarna Sintetis

Menurut Djalil, *et al.*, (2005) dalam Kustiarini (2016), berkembangnya ilmu pengetahuan, zat pewarna hasil dari rekayasa teknologi semakin berkembang. Maka dari itu bermacam zat warna sintetis diciptakan untuk berbagai jenis keperluan contohnya untuk tekstil, kulit, peralatan rumah tangga dll.

Winarno (2002) dalam Kustiarini (2016), zat pewarna sintetis telah melalui suatu pengujian secara intensif untuk menjamin keamanannya. Karakteristik dari zat pewarna sintetis adalah warnanya lebih cerah, lebih homogen dan memiliki variasi warna yang lebih banyak bila dibandingkan dengan zat pewarna alami. Disamping itu penggunaan zat pewarna sintetis pada makanan bila dihitung berdasarkan harga per unit dan efisiensi produksi akan jauh lebih murah bila dibandingkan dengan zat pewarna alami.

Menurut Belitz & Grosch (1987) dalam Putri, *et al.*, (2012), beberapa produsen lebih memilih memakai zat pewarna sintetis daripada zat pewarna alami alasannya yaitu hasil dari pewarna sintetis lebih cerah dan lebih homogen dibandingkan dengan zat pewarna alami yang menghasilkan warna yang lebih pudar dan tidak homogen, pewarna sintetis ini memiliki banyak keanekaragaman warna, sedangkan pewarna alami memiliki varian yang sedikit, zat pewarna sintetis dari sisi harga lebih murah dibandingkan dengan zat pewarna alami lebih mahal, ketersediaan zat pewarna sintetis tidak terbatas, sedangkan zat pewarna alami terbatas, zat pewarna sintetis bersifat lebih stabil sedangkan pewarna alami kurang stabil.

### 2.3 Metanil yellow



**Gambar 2.1 Struktur Metanil yellow**  
**Sumber: (Mittal, Gupta, Malviya, & Mittal, 2007)**

Metanil yellow adalah zat pewarna sintetis yang digunakan untuk memberi warna kuning pada industri tekstil, kertas, plastik, kulit, tinta dan cat (Susilo, 2014). Metanil yellow sering sekali disalah gunakan untuk mewarnai bermacam jenis makanan seperti mie, kerupuk, tahu, dan makanan jajanan lainnya yang berwarna kuning, seperti gorengan. Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 239/Men.Kes/Per/V/85, Metanil yellow ialah zat warna tambahan yang dilarang penggunaannya pada produk-produk pangan (Susilo, 2014).

Metanil yellow adalah zat pewarna untuk pemberi warna kuning, yang digunakan di industri tekstil dan cat. Bentuknya berupa serbuk, atau berupa padatan. Biasanya digunakan secara ilegal pada industri kerupuk, mie dan beberapa jajanan yang berwarna kuning mencolok (Kustiarini, 2016).

Metanil yellow merupakan pewarna makanan yang banyak digunakan dalam berbagai makanan. Metanil yellow termasuk dalam kategori pewarna makanan yang “tidak diizinkan”. Konsumsi berkelanjutan dari pewarna makanan beracun ini menyebabkan efek merugikan yang mengancam nyawa pada manusia (Ghosh *et al.*, 2017)

Menurut BPOM (2016) dalam Walintukan, *et al.*, (2019), Metanil yellow merupakan zat pewarna sintetik yang berbentuk padat dan berwarna kuning kecoklatan. Paparan kuning metanil dalam jangka waktu yang lama (kronis) sangat berbahaya karena menyebabkan kanker pada bagian saluran kemih dan kandungan kemih. Ciri-ciri fisik makanan yang mengandung pewarna ini adalah berwarna kuning mencolok cerah, dan terdapat biasanya bintik-bintik putih karena tidak homogen.

### **2.3.1 Sifat Kimia Metanil yellow**

Metanil yellow [ $C_{18}H_{14}N_3O_3SNa$ ] adalah pewarna golongan azo, yang dimana strukturnya mempunyai ikatan  $N=N$  dengan nama kimia adalah Natrium 3-[(4-Nphenylamino)phenylazo]benzene sulfonat dan garam natrium dari metanilyazodiphenilamine. Metanil yellow dengan warnanya yang kuning dibuat dari asam metanilat dan difenilamin. Metanil yellow merupakan zat warna sintetik berbentuk serbuk berwarna kuning kecoklatan, yang larut dalam air, namun agak larut dalam aseton (Bhernama, 2015).

### **2.3.2 Bahaya Zat Pewarna Metanil yellow Terhadap Kesehatan**

Metanil yellow menyebabkan iritasi pada bagian mata apabila dikonsumsi dalam jangka panjang. Metanil yellow bertindak sebagai tumor *promoting agent* dan dapat juga menyebabkan kerusakan hati. Metanil yellow merupakan senyawa kimia azo aromatik amin yang dapat menyebabkan tumor dari berbagai jaringan hati, saluran pencernaan, kandung kemih, atau jaringan kulit. Metanil yellow yang dibuat dari asam metanilat dan difenilamin ini bersifat toksik/beracun (Bhernama, 2015). Efek pada sistem saraf saat mengkonsumsi Metanil yellow dalam makanan dapat mempengaruhi sistem saraf kita dan dapat menyebabkan kerusakan otak (Ghosh, *et al.*, 2017).

Menurut Cahyadi (2008) dalam Nasution (2014), beberapa hal dapat memberikan dampak negatif bagi kesehatan karena mengkonsumsi zat pewarna sintetis yaitu:

1. Bahan pewarna sintetis jika dimakan dengan jumlah kecil namun berulang.
2. Bahan pewarna sintetis dimakan dengan jangka waktu yang Panjang/lama.
3. Kelompok masyarakat dengan daya tahan tubuh yang berbeda-beda, karena tergantung pada umur, berat badan, jenis kelamin, kualitas/mutu makanan sehari-hari dan keadaan fisik tubuh.
4. Beberapa masyarakat yang mungkin menggunakan bahan pewarna sintetis secara berlebihan.
5. Pedagang bahan kimia yang menyimpan bahan pewarna sintetis tidak memenuhi persyaratan.

## **2.4 Kromagrafi Lapis Tipis (KLT)**

### **2.4.1 Definisi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi adalah pemisahan antara campuran senyawa dalam suatu sampel berdasarkan interaksi pada suatu sampel dengan fase

diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa padatan ataupun cairan yang ditaruh pada bagian permukaan fase pendukung, sedangkan fase gerak berupa gas atau cairan

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik kromatografi yang didasari dengan prinsip adsorpsi, bedanya kromatografi kolom adalah konfigurasi KLT yang berbentuk planar (*plate*). Fase diam berupa padatan yang diaplikasikan yang bentuknya datar pada permukaan kaca ataupun aluminium untuk penyangganya sedangkan fase gerak berupa zat cair yang biasa digunakan pada kromatografi kolom dan kromatografi kertas (Rubiyanto, 2017).

Analisis kromatografi lapis tipis dengan penentuan harga  $R_f$  (*Retention Factor*) yaitu perbandingan antara jarak yang digerakan oleh senyawa dengan jarak yang digerakan oleh pelarut. Rumus  $R_f$  yaitu:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakan oleh senyawa}}{\text{Jarak yang digerakan pelarut}}$$

Senyawa yang memiliki nilai  $R_f$  lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang lebih rendah, dan apabila nilai  $R_f$  lebih kecil berarti memiliki kepolaran yang lebih besar. Hal ini dikarenakan fase diam bersifat polar. Nilai  $R_f$  pada KLT yang disarankan berkisar antara 0,2-0,8. Diperlukan pengurangan kepolaran eluen jika nilai  $R_f$  terlalu tinggi dan begitu juga diperlukan penambahan kepolaran eluen jika nilai  $R_f$  terlalu rendah (Rubiyanto, 2017).

#### 2.4.2 Fase Diam

Menurut Johnson & Stevenson (1991) dalam Syahmani, *et al.*, (2017), fase diam dapat disebut juga sebagai adsorben. Fase diam biasanya digunakan pada kromatografi lapis tipis (KLT) seperti silika gel, alumina dan Kieselguhr. Silika gel dan alumina digunakan

sebagai fase diam yang serbaguna, namun Kieselguhr untuk senyawa-senyawa yang sangat polar.

Pada dasarnya jenis padatan yang digunakan pada kromatografi kolom dapat digunakan pada KLT.

Adapun beberapa jenis adsorben dan penggunaannya yaitu:

1. Gel silika: asam-asam amino, alkaloid, asam-asam lemak dll
2. Alumina: alkaloid, zat pewarna, fenol-fenol dll
3. Kieselguhr (tanah diatomae): gula, oligosakarida, trigliserida, dll
4. Selulosa: asam-asam amino, alkaloid dll (Rubiyanto, 2017).

Plat KLT yang banyak dijumpai dari gel silika antara lain:

1. Gel silika G: mengandung 13%  $\text{CaSO}_4$  sebagai bahan perekat.
2. Gel silika H: tanpa mengandung  $\text{CaSO}_4$ .
3. Gel silika PF: mengandung bahan fluoresensi (Rubiyanto, 2017).

### **2.4.3 Fase Gerak**

Menurut Stahl (1985) dalam Purwati (2010), fase gerak bergerak di bagian dalam fase diam yaitu pada lapisan berpori, karena ada gaya kapiler. Fase gerak merupakan medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Pelarut yang digunakan hanya pelarut yang bertingkat mutu analitik dan bila diperlukan, sistem pada pelarut multikomponen harus berupa campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum 3 komponen.

## **2.5 Spektrofotometri UV-Vis**

### **2.5.1 Teori Spektrofotometri UV-Vis**

Menurut Harmita (2004) dalam Hanifah (2019), Spektrofotometri Cahaya Tampak (UV-Vis) merupakan pengukuran energi cahaya oleh sistem kimia dengan panjang gelombang tertentu. Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang diantara 200-400 nm, sedangkan sinar tampak memiliki panjang gelombang 400-800 nm. Kegunaan

Spektrofotometri yaitu untuk mengukur besarnya suatu energi yang diabsorpsi ataupun diteruskan. Sinar radiasi monokromatik akan melalui larutan yang berisi zat yang dapat menyerap sinar radiasi.

Spektrofotometri *UV-Visible* dapat digunakan terhadap sampel seperti larutan, gas, atau uap. Suatu sampel umumnya harus diubah terlebih dahulu menjadi suatu larutan yang jernih, adapun persyaratan sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan pelarut yang dipakai meliputi:

1. Sampel harus dilarutkan dengan sempurna.
2. Pelarut yang digunakan tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengabsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel)
3. Tidak ada terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis
4. Kemurniannya harus tinggi (Suhartati, 2017).

**Tabel 2.1 Absorpsi sinar UV pada  $\lambda_{maks}$ , dari beberapa pelarut**

<b>Pelarut</b>	<b><math>\lambda_{maks}</math>, nm</b>	<b>Pelarut</b>	<b><math>\lambda_{maks}</math>, nm</b>
Asetronitril	190	n-heksana	201
Kloroform	240	Metanol	205
Sikloheksana	195	Isooktana	195
1-4 dioksan	215	Air	190
Etanol 95%	205	Aseton	330
Benzena	285	Piridina	305

Sumber: (Suhartati, 2017)

Adapun pelarut yang banyak digunakan yaitu adalah air, metanol, dan n-heksana karena pelarut ini transparan pada bagian daerah UV (Suhartati, 2017).

Menurut Rohman (2007) dalam Hanifah (2019), ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam analisis *UV-Vis* seperti pembentukan molekul yang dapat menyerap suatu sinar *UV-Vis*, dan waktu operasional (*operating time*), serta pemilihan panjang gelombang. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar *UV-Vis* perlu dilakukan apabila suatu senyawa yang dianalisis tidak dapat menyerap

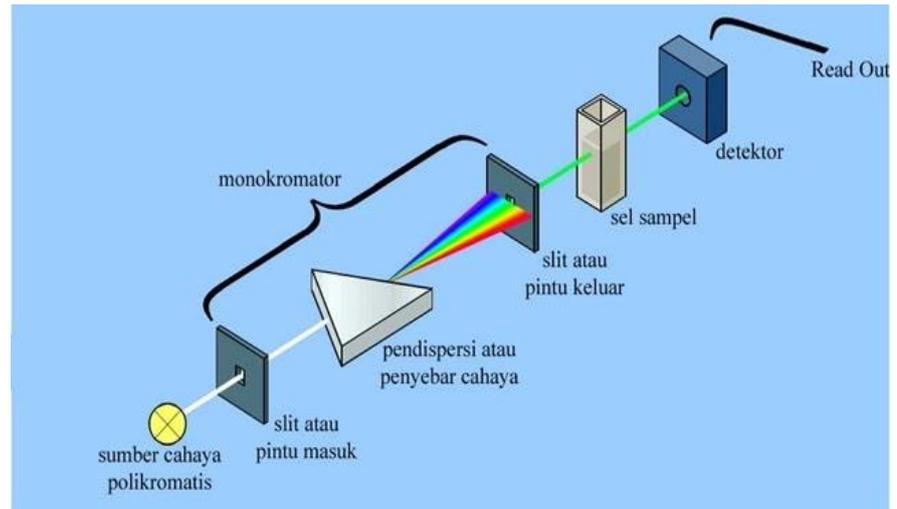
pada daerah tersebut, caranya yaitu dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Waktu operasional (*operating time*) yang bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi ditentukan sebagai waktu operasional. Terakhir pemilihan panjang gelombang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimal. Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan cara membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku dengan konsentrasi tertentu.

Menurut Hasibuan (2015) dalam Hanifah (2019), Spektrofotometri UV-Vis mengacu pada hukum *Lambert-Beer*. Jika cahaya monokromatik jatuh pada suatu medium homogen, maka sebagiannya dari cahaya akan dipantulkan sebagian diserap sedangkan sebagian lagi akan diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan tadi dinyatakan adalah nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel.

### **2.5.2 Tipe -Tipe Spektrofotometri UV-Vis**

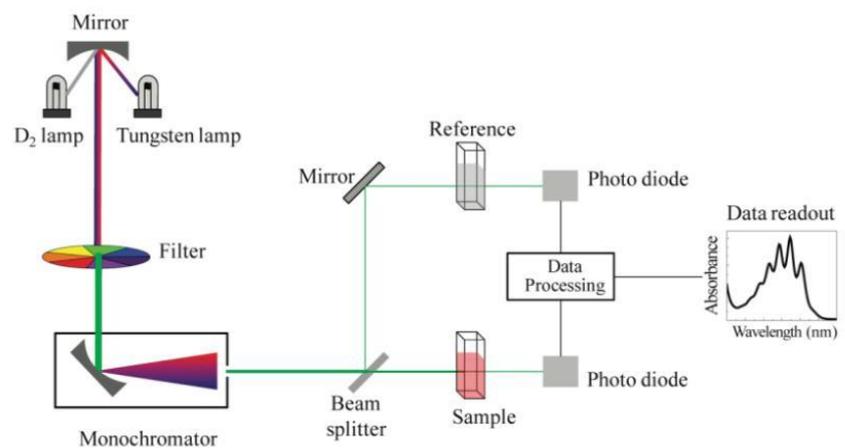
Ada dua tipe instrumen spektrofotometer, yaitu *single-beam* dan *double-beam*:

1. Menurut Skoog, DA (1996) dalam Suhartati (2017), *single-beam* instrument biasanya digunakan untuk kuantitatif untuk mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Keuntungan *single-beam* yaitu sederhana, harganya murah, dan mengurangi biaya yang ada merupakan keuntungan yang nyata. Beberapa instrumen menghasilkan *single-beam* instrument untuk pengukuran pada sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang yang paling rendah yaitu 190 sampai 210 nm dan yang paling tinggi adalah 800 sampai 1000 nm.



**Gambar 2.2** Diagram alat spektrometer UV-Vis (*single beam*)  
**Sumber:** (Suhartati, 2017)

2. *Double-beam* biasanya digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm. *Double-beam* instrument mempunyai dua sinar yang dibentuk dari potongan cermin yang berbentuk V yang disebut dengan pemecah sinar. Sinar pertama melalui larutan blanko dan sinar kedua secara serentak melalui sampel.



**Gambar 2.3** Skema Spektrofotometer UV-Vis (*Double-beam*)  
**Sumber:** (Suhartati, 2017)

### 2.5.3 Bagian-Bagian dari Alat Spektrofotometer UV-Vis

#### 2.5.3.1 Sumber Sinar Tampak

Sumber sinar adalah dua lampu yang terpisah, yang secara bersamaan mampu menjangkau keseluruhan daerah pada spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Pada sinar tampak, digunakan lampu yang dikenal dengan lampu tungsten yaitu lampu yang terbuat dari logam tungsten. Lampu tungsten mengemisikan sinar dengan panjang gelombang 350-2.000 nm, sehingga cocok pada kolorimetri (Gandjar & Rohman, 2018).

Pada senyawa yang menyerap di spektrum daerah ultraviolet digunakan lampu yang dikenal dengan lampu deuterium. Deuterium adalah salah satu isotop hidrogen yang memiliki satu neutron lebih banyak dibandingkan dengan hidrogen biasa dalam inti atomnya. Lampu deuterium mengemisikan sinar panjang gelombang 200-370 nm, dan digunakan untuk semua spektroskopi dalam daerah spektrum ultraviolet (Gandjar & Rohman, 2018)

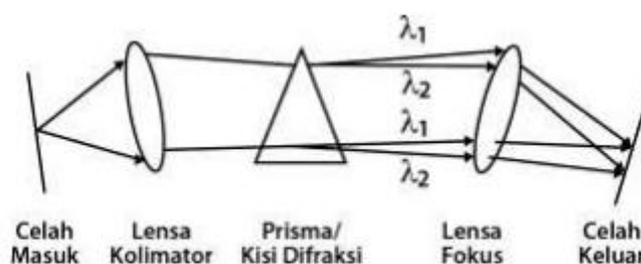
Syarat-syarat sumber sinar yang ideal pada suatu instrumen spektrofotometer UV-Vis yaitu:

1. Mampu mencakup semua kisaran pengukuran pada daerah UV-Vis
2. Memiliki intensitas sinar yang kuat maupun stabil pada keseluruhan kisaran panjang gelombang agar penguatan sinyal yang ekstensif dari detektor dapat dihindari
3. Intensitas sumber sinar tidak boleh bervariasi secara signifikan pada panjang gelombang berbeda
4. Intensitas sumber sinar tidak boleh berfluktuasi atau naik turun pada kisaran waktu yang lama, serta

5. Intensitas sumber sinar tidak boleh berfluktuasi (naik turun) pada kisaran waktu yang pendek atau singkat (Gandjar & Rohman, 2018).

### 2.5.3.2 Monokromator

Monokromator berfungsi untuk penyeleksi pada panjang gelombang yaitu dengan mengubah cahaya dari sumber sinar polikromatis menjadi cahaya monokromatis (Suarsa, 2015).



**Gambar 2.4 Monokromator**  
Sumber: (Zackiyah, 2016)

Pada pengukuran kuantitatif kebanyakan sinar harus bersifat *monokromatik*, yaitu sinar dengan satu panjang gelombang tertentu. Hal ini dapat melewati sinar *polikromatik*, sinar dengan beberapa panjang gelombang yang melalui suatu monokromator. Monokromator ini terdiri atas dua elemen pendispersi yakni, suatu celah masuk (*entrance slit*), dan suatu celah keluar (*exit slit*) yaitu:

a. Prisma

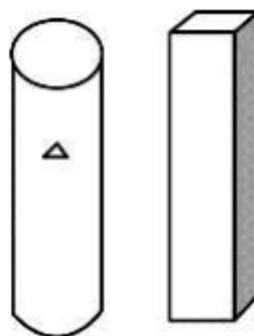
Prisma adalah suatu lempeng kuarsa yang membiaskan atau membelokkan sinar yang melaluinya. Prisma yang paling umum digunakan tersusun dari kuarsa untuk daerah UV, gelas silikat untuk daerah tampak dan daerah inframerah dekat, serta NaCl dan KBr digunakan untuk daerah inframerah tengah. Prisma berbentuk seperti kotak

dengan penampang melintang segitiga (Gandjar & Rohman, 2018).

b. Kisi difraksi (*Diffraction Grating*)

Radiasi UV-Vis dan inframerah dapat didispersikan kisi difraksi. Suatu kisi difraksi merupakan kepingan kecil gelas bercermin yang di dalamnya berisi sejumlah garis dengan jarak sama yang terpotong-potong menjadi beberapa ribu permilimeter kisi, untuk memberikan struktur yang tampak seperti suatu sisir kecil. Jarak antar potongan kurang lebih sama dengan panjang gelombang sinar, sehingga berkas sinar monokromatik akan terpisah ke dalam komponen-komponen panjang gelombang suatu kisi. Selanjutnya kisi diputar untuk memilih panjang gelombang yang diinginkan dalam pengujian (Gandjar & Rohman, 2018).

### 2.5.3.3 Kuvet



**Gambar 2.5 Kuvet**  
Sumber: (Zackiyah, 2016)

Wadah sampel atau yang biasa disebut dengan sel/kuvet harus memiliki jendela yang transparan pada daerah yang dituju. Sel/kuvet yang baik yaitu yang tegak lurus dengan arah berkas sinar. Tebal kuvet yang umum digunakan yaitu 1 cm. Namun,

kuvet yang tebalnya yang lebih kecil atau yang lebih besar dari 1 cm juga ada tersedia di pasaran (Gandjar & Rohman, 2018).

Beberapa syarat kuvet yang baik sebagai berikut:

1. Permukaan kuvet harus sejajar secara optis
2. Tidak berwarna agar semua cahaya dapat di transmisikan
3. Tidak ikut bereaksi pada bahan-bahan kimia
4. Tidak mudah rapuh
5. Bentuknya sederhana (Suarsa, 2015).

Mutu pada data spektroskopi tergantung pada bagaimana cara memelihara kuvet atau menggunakannya. Adanya sisa-sisa sampel pada kuvet dapat merubah karakteristik transmisi kuvet. maka dari itu, kuvet harus dijaga dengan baik kebersihannya dengan cara dicuci sebelum atau sesudah penggunaannya, jendela atau sinar tidak boleh dipegang setelah dibersihkan, Jangan pernah mengeringkan kuvet dengan pemanasan, karena dapat menyebabkan kerusakan fisik kuvet dan dapat mengubah ketebalan pada kuvet (Gandjar & Rohman, 2018).

#### **2.5.3.4 Detektor**

Detektor berfungsi untuk mengukur intensitas radiasi yang mengenainya. Detektor bekerja dengan cara mengubah energi radiasi kedalam energi listrik. Banyaknya energi yang dihasilkan biasanya rendah dan harus diperkuat. Spektrofotometer modern kebanyakan dihubungkan dengan komputer, sehingga dapat menyimpan data (Gandjar & Rohman, 2018).

Pada dasarnya detektor dapat menyerap sinar yang jatuh padanya dan mengubah energi menjadi suatu energi yang dapat diukur. Detektor harus menghasilkan isyarat yang

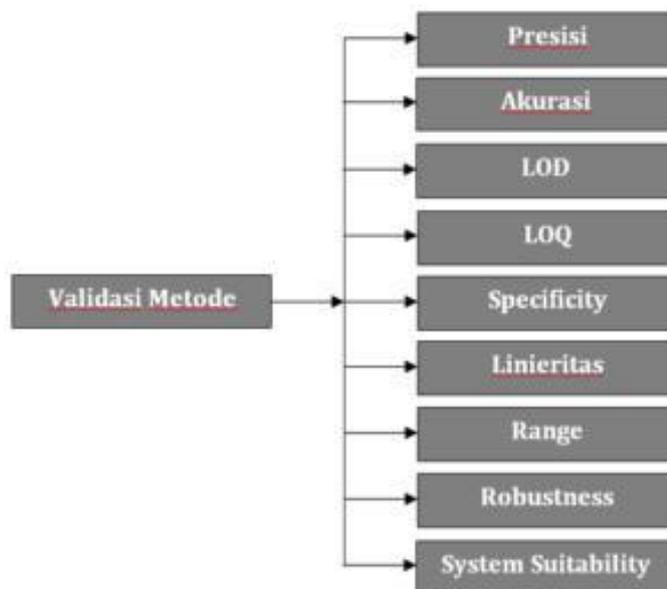
memiliki hubungan kuantitatif dengan intensitas sinar. *Noise* suatu detektor merupakan isyarat latar belakang yang timbul pada detektor bila tidak adanya intensitas sinar sampel yang sampai pada detektor (Zackiyah, 2016).

Persyaratan detektor sebagai berikut:

1. Detektor mampu menangkap atau merespon energi sinar yang kecil.
2. Detektor memiliki kepekaan tinggi dengan *noise* yang kecil sehingga mampu mendeteksi intensitas yang rendah.
3. Waktu respons singkat atau pendek.
4. Stabil dengan jangka waktu yang lama.
5. Detektor memberikan isyarat elektronik yang bisa diperkuat dengan mudah.
6. Detektor menghasilkan isyarat yang berbanding lurus dengan intensitas sinar yang mengenainya (Zackiyah, 2016).

## 2.6 Validasi Metode

Validasi metode adalah suatu persyaratan ataupun peraturan dalam beberapa bidang untuk memastikan atau mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai. Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan yaitu validasi metode adalah elemen penting dari kontrol kualitas, validasi juga membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan (Riyanto, 2014)



**Gambar 2.6** Parameter validasi metode uji menurut EUROCHEM  
 Sumber: (Riyanto, 2014)

### 2.6.1 Ketelitian (Presisi)

Ketelitian atau Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan suatu derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata apabila prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Ketelitian atau Presisi diukur untuk simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) (Riyanto, 2014).

Untuk menghitung nilai simpangan baku (SD) dari nilai simpangan baku tersebut dapat dihitung nilai koefisien variasi dengan rumus (Riyanto, 2014):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

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

Suatu nilai ketelitian (presisi) dinyatakan dalam *Relative Standar Deviation* (% RSD). Besarnya RSD menyatakan tingkat ketelitian suatu analisis, semakin kecil % RSD yang dihasilkan maka semakin tinggi pula tingkat ketelitiannya. Presisi dari metode uji dapat ditentukan dengan rumus:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan:

SD = Standar Deviasi

$\bar{X}$  = Nilai rata-rata

n = Ulangan

RSD = *Relative Standar Deviation*

Kriteria ketelitian metode jika simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) bernilai  $\leq 2\%$ . Kriteria ini bersifat fleksibel tergantung pada analit yang diperiksa, konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi pada laboratorium. Ditemukan pada penelitian nilai koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit (Hermita, 2004)

Menurut Bievre (1998) dalam Riyanto (2014), presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*), ketertiruan (*reproducibility*) dan presisi antara (*intermediate precision*). Parameter presisi tersebut antara lain:

1. Keterulangan (*Repeatability*)

Keterulangan merupakan ketelitian yang diperoleh dari suatu hasil pengulangan dengan menggunakan metode, operator, peralatan, laboratorium, dan dalam interval pemeriksaan waktu yang singkat/pendek. Pemeriksaan keterulangan ini bertujuan untuk mengetahui konsistensi analit, tingkat kesulitan metode dan kesesuaian metode.

## 2. Presisi Antara (*Intermediate Precision*)

Presisi antara (*Intermediate Precision*) adalah bagian dari presisi yang dilakukan dengan cara mengulang pemeriksaan terhadap contoh uji dengan alat, waktu, analisis yang berbeda, tetapi dalam laboratorium yang sama.

## 3. Ketertiruan (*Reproducibility*)

Ketertiruan (*Reproducibility*) yaitu ketelitian yang dihitung dari suatu hasil penetapan ulangan dengan menggunakan metode yang sama, tetapi dilakukan oleh analis, peralatan, laboratorium dan waktu yang berbeda.

*Coefficient Variance Horwitz* (CV Horwitz) menunjukkan bahwa hubungan antara koefisien rata-rata variasi (CV), dinyatakan sebagai kekuatan 2, dengan konsentrasi rata-rata yang diukur, dinyatakan sebagai pangkat 10, independen dari metode yang menentukan:

$$\%RSD \text{ Horwitz} = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Dimana C adalah konsentrasi analit yang dinyatakan sebagai fraksi massa berdimensi (pembilang dan penyebut memiliki satuan yang sama) (Riyanto, 2014).

**Tabel 2.2 Hubungan Konsentrasi dengan RSD**

Konsentrasi Analit	RSD%
10%	2,8%
1%	4,0%
0,1%	5,7%
0,01%	8,0%
1 ppm	16%
1 ppb	45%
0,1 ppb	64%

Sumber: (Riyanto, 2014)

### 2.6.2 Ketepatan (*Accuracy*)

Ketepatan atau akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dapat dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*) (Riyanto, 2014).

Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) adalah metode yang menambahkan sejumlah analit ke dalam plasebo kemudian campuran tersebut akan dianalisis dan dibandingkan dengan kadar standar yang sebenarnya. Sampel plasebo dibuat dengan ekseprien obat atau cairan biologis yang ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu yaitu 80%-120% dari analit yang diperkirakan. Sampel plasebo jika tidak memungkinkan dibuat karena matriksnya tidak diketahui seperti obat paten atau karena analit berupa metabolit sekunder pada kultur kalus, maka metode penambahan baku menjadi pilihan (Riyanto, 2014).

Metode penambahan baku (*standard addition method*) dilakukan dengan menganalisis sampel kemudian larutan standar ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis kembali. Selisih dari kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya. Kelemahan pada metode ini tidak dapat digunakan jika penambahan analit dapat mengganggu pengukuran, seperti analit yang ditambahkan mengubah pH dan dapat menyebabkan kekurangan pereaksi (Riyanto, 2014). Pada kedua metode tersebut, *recovery* dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Biasanya persyaratan untuk *recovery* adalah tidak boleh lebih dari 5% (Riyanto, 2014). Perhitungan *Recovery* dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Riyanto, 2014):

$$\%Recovery = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100\%$$

Keterangan:

C1 = Konsentrasi dari analit dalam campuran contoh + sejumlah tertentu analit (konsentrasi total yang diperoleh)

C2 = Konsentrasi dari analit dalam contoh (konsentrasi sampel sebenarnya)

C3 = Konsentrasi dari analit yang ditambahkan kedalam contoh (konsentrasi analit yang ditambahkan)

**Tabel 2.3 Nilai persen recovery berdasarkan nilai konsentrasi sampel**

<b>Analit pada matrik sampel</b>	<b>Recovery yang diterima (%)</b>
$10 < A \leq 100(\%)$	98-102
$1 < A \leq 10(\%)$	97-103
$0,1 < A \leq 1(\%)$	95-105
$0,001 < A \leq 0,1(\%)$	90-107
$100 \text{ ppb} < A < 1 \text{ ppm}$	80-110
$10 \text{ ppb} < A \leq 100 \text{ ppb}$	60-115
$1 \text{ ppb} < A \leq 10 \text{ ppb}$	40-120

Sumber: (Hermita, 2004)

### 2.6.3 Linearitas

Linearitas merupakan suatu kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam suatu sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Riyanto, 2014).

Parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier yaitu  $y = bx + a$  ( $b$  adalah slope,  $a$  adalah intersep,  $x$  adalah konsentrasi analit dan  $y$  adalah respon instrumen). Hubungan linier yang  $r = +1$  atau  $-1$  tergantung pada arah garis. Tanda positif (+) menunjukkan korelasi positif yang ditandai dengan arah garis yang miring ke kanan, sedangkan tanda negatif (-) menunjukkan korelasi negatif ditandai dengan arah garis yang miring ke kiri. sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama pada

instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual ( $S_y$ ). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, maka semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur (Riyanto, 2014).

Menurut Chan (2004) dalam Riyanto (2014), linieritas metode dapat menggambarkan suatu ketelitian pengerjaan analisis suatu metode yang ditunjukkan oleh nilai koefisien determinasi sebesar  $> 0,997$

#### **2.6.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

Batas deteksi (LOD) merupakan jumlah terkecil analit dalam suatu sampel yang dapat dideteksi yang masih bisa memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter untuk uji batas. Batas kuantitasi (LOQ) merupakan parameter pada analisis renik yang diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam suatu sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama (Riyanto, 2014).

Cara menentukan LOD dan LOQ ada tiga cara, yaitu sebagai berikut:

1. *Signal-to-noise*

Dengan menggunakan suatu metode *signal-to-noise*, puncak ke puncak kebisingan di sekitar waktu retensi analit diukur, dan konsentrasi analit yang akan menghasilkan suatu sinyal yang sama dengan nilai tertentu dari kebisingan untuk sinyal rasio diperkirakan. Kebisingan besarnya dapat diukur manual pada printout kromatogram atau dengan autointegrator dari instrument. Sebuah *signal-to-noise ratio* (S/N) dari tiga umumnya diterima untuk memperkirakan LOD dan rasio *signal-to-noise* dari sepuluh digunakan untuk LOQ. Metode ini biasanya diterapkan untuk metode analisis yang menunjukkan suara dasar (Riyanto, 2014).

2. Penentuan blanko

Penentuan blanko diterapkan ketika analisis blanko memberikan suatu hasil standar deviasi tidak nol. LOD dinyatakan sebagai

konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan LOQ merupakan konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti yang ditunjukkan dalam persamaan berikut:

$$\text{LOD} = \bar{x} + 3S_b$$

$$\text{LOQ} = \bar{x} + 10 S_b$$

Dimana  $\bar{x}$  adalah konsentrasi rata-rata blanko sedangkan  $S_b$  adalah standar deviasi dari blanko (Riyanto, 2014).

### 3. Kurva Kalibrasi

Pada kurva kalibrasi linear, diasumsikan bahwa respon instrumen  $y$  berhubungan linier dengan konsentrasi  $x$  standar untuk rentang yang terbatas konsentrasi. Hal ini dinyatakan dalam model seperti  $y = bx + a$ . Model ini biasanya digunakan untuk menghitung sensitivitas  $b$  dan LOD dan LOQ.

Oleh karena itu LOD dan LOQ dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$\text{LOD} = 3S_a/b$$

$$\text{LOQ} = 10 S_a/b$$

Dimana  $S_a$  adalah standar deviasi sedangkan  $b$  adalah *slope* (Riyanto, 2014).

#### 2.6.5 Kekuatan (*Rosbustness*)

Ketangguhan metode ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot pada sampel yang homogen dalam laboratorium yang berbeda dan oleh analis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama. Untuk memvalidasi kekuatan (*Rosbustness*) suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus, mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. (Riyanto, 2014)

### 2.6.6 Spesifitas (*Specificity*)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode merupakan kemampuannya yang hanya bisa mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Spesifitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa suatu cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Hermita, 2004).

Cara menentukan spesifitas metode yaitu dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Jika terjadi penyimpangan hasil merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Apabila cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh hasilnya, maka spesifitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji kemudian dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut adalah ukuran spesifitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, spesifitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya ( $R_s$ ) (Hermita, 2004).

### 2.6.7 Rentang (*Range*)

Rentang atau range adalah interval di antara konsentrasi analit tertinggi dan terendah dalam suatu sampel yang dapat ditetapkan dengan akurasi, presisi dan linieritas yang dapat diterima menggunakan metode analisis tersebut. Rentang dinyatakan dalam

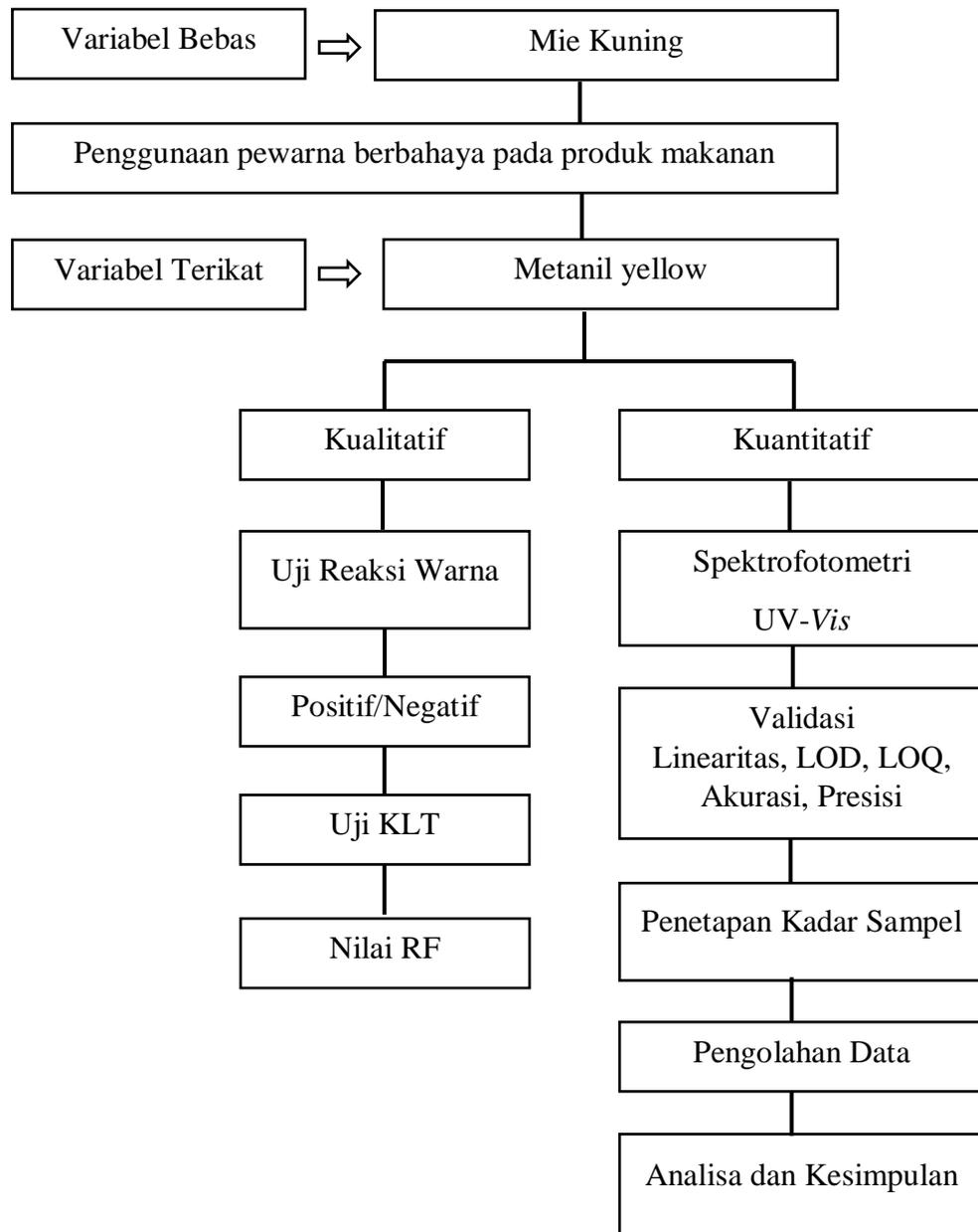
satuan yang sama seperti hasil uji contohnya persen, untuk penetapan kadar zat aktif syarat yang ditentukan BPOM adalah 80%-120% (Mulyati, *et al.*, 2011).

#### **2.6.8 Kesesuaian Sistem (*System Suitability*)**

Kesesuaian sistem merupakan serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Sistem dan prosedur yang digunakan seorang analis untuk pengujian harus dipastikan mampu memberikan data yang dapat diterima. Syarat kesesuaian sistem dilakukan setelah mengembangkan metode dan validasi metode (Labib, 2013).

Menurut Gandjar & Rohman, (2007) dalam Labib (2013), *United States Pharmacopeia* (USP) digunakan untuk menentukan parameter kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan yaitu: bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas ( $k'$  atau  $\alpha$ ) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Pada umumnya, paling tidak ada 2 kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk menunjukkan kesesuaian sistem suatu metode. Nilai RSD tinggi puncak atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai RSD  $\leq 1\%$  untuk 5 kali injeksi. Sementara untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15%

## 2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.7 Kerangka Konsep