

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Bahan Tambahan Pangan**

##### **2.1.1 Pengertian**

Bahan Tambahan Pangan (BTP) atau sering dikenal dengan istilah zat aditif pangan merupakan bahan yang ditambahkan ke dalam pangan dengan tujuan untuk mempengaruhi bentuk ataupun sifat pangan itu sendiri (Permenkes RI, 2012).

Menurut Peraturan MenKes RI No. 033 tahun 2012, Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang digunakan dalam pangan harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

1. BTP tidak diperlakukan sebagai bahan baku pangan dan tidak ditujukan untuk dikonsumsi langsung.
2. BTP tidak memiliki nilai gizi, ditambahkan dengan sengaja ke dalam pangan untuk tujuan teknologi dalam pengolahan, pembuatan, pengemasan, penyimpanan dan/atau pengangkutan pangan untuk menghasilkan suatu komponen atau mempengaruhi sifat pangan, baik secara langsung maupun tidak langsung.
3. BTP tidak termasuk cemaran dan tidak ditujukan untuk mempertahankan atau meningkatkan nilai gizi pangan.

Bahan Tambahan Pangan (BTP) terbagi dalam 2 jenis yaitu (Amaliyah, 2017):

1. GRAS (*Generally Recognized as Safe*); aman dan tidak menimbulkan efek toksik, contohnya adalah glukosa.
2. ADI (*Acceptable Daily Intake*); BTP jenis ini telah ditetapkan batas penggunaan hariannya untuk menjaga atau melindungi kesehatan konsumen.

### **2.1.2 Fungsi bahan tambahan pangan**

Fungsi bahan tambahan pangan (BTP) antara lain adalah (Ratnani, 2009):

- a. Untuk meningkatkan kualitas pangan.
- b. Untuk membuat tampilan makanan lebih menarik dan membuat rasanya lebih enak sehingga menambah dan merangsang munculnya nafsu makan.
- c. Untuk mengawetkan makanan dengan mencegah pertumbuhan dan aktivitas mikroba perusak makanan.
- d. Untuk membuat makanan dapat diproduksi secara massal.
- e. Untuk menghemat biaya.

### **2.1.3 Penggolongan bahan tambahan pangan**

#### **2.1.3.1 Bahan tambahan pangan yang diizinkan**

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 033 tahun 2012 penggolongan BTP yang diperbolehkan adalah sebagai berikut: (**Tabel 2.1**)

**Tabel 2. 1 Jenis penggolongan bahan tambahan pangan yang diizinkan penggunaannya**

No	Jenis BTP	SNI
1	Antibuih ( <i>Antifoaming agent</i> )	404-471
2	Antikempal ( <i>Anticaking agent</i> )	170-553
3	Antioksidan ( <i>Antioxidant</i> )	300-321
4	Bahan Pengkarbonasi ( <i>Carbonating agent</i> )	290
5	Garam pengemulsi ( <i>Emulsifying agent</i> )	331-576
6	Gas untuk kemasan ( <i>Packaging agent</i> )	290-941
7	Humektan ( <i>Humectant</i> )	325-1518
8	Pelapis ( <i>Glazing agent</i> )	901-905
9	Pemanis ( <i>Sweetener</i> ):	
	Alami	420-968
	Buatan	950-961
10	Pembawa ( <i>Carrier</i> )	444-1521
11	Pembentuk gel ( <i>Gelling agent</i> )	400-440
12	Pembuih ( <i>Foaming agent</i> )	415-465
13	pengatur keasaman ( <i>Acidity regulator</i> )	170-578
14	Pengawet ( <i>Preservative</i> )	200-1105
15	Pengembang ( <i>Raising agent</i> )	500-1420
16	Pengemulsi ( <i>Emulsifier</i> )	170-1451
17	Pengental ( <i>Thickener</i> )	263-1451
18	Pengeras ( <i>Firming agent</i> )	327-578
19	Penguat Rasa ( <i>Flavour enhancer</i> )	620-635
20	Peningkat volume ( <i>Bulking agent</i> )	325-1442
21	Penstabil ( <i>Stabilizer</i> )	170-1451
22	Peretensi warna ( <i>Colour retention agent</i> )	504-528
23	Perisa ( <i>Flavouring</i> )	-
24	Perlakuan tepung ( <i>Flour treatment agent</i> )	328-1101
25	Pewarna ( <i>Colour</i> ):	
	Alami	100-171
	Sintesis	102-155
26	Propelan ( <i>Propellant</i> )	941-944
27	Sekuestran ( <i>Sequestrant</i> )	385-577

Sumber tabel: Permenkes RI, 2012

#### 2.1.3.2 Bahan tambahan pangan yang tidak diizinkan

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 033 tahun 2012, BTP yang dilarang digunakan dalam pangan adalah sebagai berikut: (**Tabel 2.2**)

**Tabel 2. 2 Bahan tambahan pangan yang tidak diizinkan penggunaannya dalam pangan**

No	Nama bahan
1	Asam borat dan senyawanya ( <i>Boric acid</i> )
2	Asam salisilat dan garamnya ( <i>Salicylic acid and its salt</i> )
3	Dietilpirokarbonat ( <i>Diethylpyrocarbonate, DEPC</i> )
4	Dulsin ( <i>Dulcin</i> )
5	Formalin ( <i>Formaldehyde</i> )
6	Kalium bromat ( <i>Potassium bromate</i> )
7	Kalium klorat ( <i>Potassium chlorate</i> )
8	Kloramfenikol ( <i>Chloramphenicol</i> )
9	Minyak nabati yang dibrominasi ( <i>Brominated vegetable oils</i> )
10	Nitrofurazon ( <i>Nitrofurazone</i> )
11	Dulkamara ( <i>Dulcamara</i> )
12	Kokain ( <i>Cocaine</i> )
13	Nitrobenzen ( <i>Nitrobenzene</i> )
14	Sinamil antranilat ( <i>Cinnamyl anthranilate</i> )
15	Dihidrosafrol ( <i>Dihydrosafrole</i> )
16	Biji tonka ( <i>Tonka bean</i> )
17	Minyak kalamus ( <i>Calamus oil</i> )
18	Minyak tansi ( <i>Tansi oil</i> )
19	Minyak sasafra ( <i>sassafras oil</i> )

Sumber tabel: Permenkes RI, 2012

## 2.2 Tinjauan Umum Pengawet

### 2.2.1 Pengertian pengawet

Pengawet adalah zat yang digunakan untuk mencegah pertumbuhan bakteri pembusuk. Secara umum, pengawet digunakan untuk mengawetkan makanan yang memiliki sifat mudah rusak. Pengawet mampu melindungi bahan pangan dari pembusukan, menghambat dan memperlambat proses fermentasi, proses pengasaman, serta bentuk kerusakan lainnya yang disebabkan oleh mikroba (Cahyadi, 2009).

### 2.2.2 Jenis-jenis pengawet

Menurut Cahyadi (2009) pengawet digolongkan menjadi dua jenis, yaitu zat pengawet yang berasal dari senyawa organik dan anorganik.

#### 2.2.2.1 Zat pengawet organik

Beberapa contoh zat pengawet organik diantaranya adalah asam sorbat, asam propionat, asam asetat, asam benzoat, dan epoksida.

### 2.2.2.2 Zat pengawet anorganik

Beberapa zat pengawet anorganik yang sering dipakai adalah sulfit, hidrogen peroksida, nitrat, dan nitrit.

## 2.3 Tinjauan Formalin

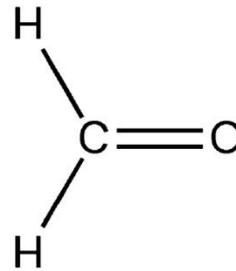
### 2.3.1 Pengertian formaldehid

Formaldehid ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) merupakan senyawa kimia berwujud gas atau larutan. Pada dunia perdagangan dikenal formalin yang merupakan larutan formaldehid 37% dalam air. Formalin merupakan larutan bening atau tidak berwarna, sedikit asam, memiliki bau yang sangat menyengat, bersifat korosif, akan terurai jika dipanaskan dan melepaskan asam formiat (Badan POM RI, 2008).

### 2.3.2 Sifat fisikokimia formaldehid (IARC, 1995)

Rumus molekul	:	$\text{CH}_2\text{O}$
Nama kimia	:	Formaldehid
Nama IUPAC	:	Methanal
Nama lain	:	<i>Formaldehyde, gas; formic aldehyde; methaldehyde; methyl aldehyde; methyl oxide; methylene oxide; oxomethane; oxymethylene</i>
Deskripsi	:	Gas tidak berwarna dengan bau menyengat
Massa molar	:	30,03 g/mol
Titik leleh	:	$-92^\circ\text{C}$
Titik didih	:	$-21^\circ\text{C}$
Kelarutan	:	Sangat larut dalam air, etanol, dan dietil eter

Rumus struktur :



**Gambar 2. 1 Struktur kimia formaldehid**  
Sumber gambar: Darvell, 2018

### 2.3.3 Penggunaan formaldehid

#### 2.3.3.1 Penggunaan yang benar

1. Pada dunia kedokteran biasanya digunakan sebagai pengawet spesimen biologi seperti hewan-hewan untuk penelitian dan cairan pembalsam (pengawet mayat).
2. Dikenal luas sebagai desinfektan untuk membersihkan lantai, kapal, gudang, bangsal rumah sakit dan sebagainya.
3. Pada dunia industri digunakan untuk bahan baku pembuatan lem *plywood*, tekstil dan resin.
4. Pada konsentrasi 2-8% digunakan sebagai germisida.
5. Pada dunia fotografi biasanya digunakan sebagai pengeras kertas dan lapisan gelatin.
6. Pada dunia kosmetik, formaldehid digunakan sebagai agen antimikroba (Badan POM RI, 2008).

#### 2.3.3.2 Penggunaan yang salah

Formalin kerap kali digunakan sebagai pengawet pada makanan maupun bahan makanan walaupun senyawa ini dilarang digunakan dalam pangan (mengingat bahayanya). Beberapa contoh produk pangan atau bahan pangan yang sering ditambahkan formalin oleh produsen maupun pedagang nakal adalah mie basah, ayam potong, ikan asin,

ikan segar dan tahu yang beredar di pasaran (Badan POM RI, 2008).

#### **2.3.4 Toksisitas**

Formaldehid telah diklasifikasikan oleh IARC sebagai kelompok senyawa yang termasuk dalam kelas 1, yaitu senyawa yang berisiko menyebabkan kanker. Status terbaru yang diberikan oleh IARC menunjukkan bahwa ada data epidemiologi yang membuktikan bahwa formaldehid positif dapat menyebabkan kanker pernapasan pada manusia (Uzairu et al., 2009).

#### **2.3.5 Dampak terpapar formalin**

##### **2.3.5.1 Bahaya paparan jangka pendek (akut)**

Apabila terhirup dapat menyebabkan kesukaran bernafas dan asma. Jika terkena kulit dapat menyebabkan rasa sakit, menimbulkan bercak putih dan sensitisasi dermatitis yang ditandai dengan eksim serta reaksi vesikular. Jika tertelan dapat menyebabkan rasa terbakar pada mulut, tenggorokan dan lambung, mual, muntah, diare, sakit perut hebat, sakit kepala, stupor, vertigo, sesak nafas bahkan sampai kejang (Badan POM RI, 2008).

##### **2.3.5.2 Bahaya paparan jangka panjang (kronis)**

Paparan berulang formalin dapat menyebabkan formalin terakumulasi didalam tubuh. Jika seseorang terpapar formalin baik pada saluran pernafasan maupun pencernaan secara terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan pada hati, ginjal, limpa, pankreas, otak dan bahkan menimbulkan kanker, terutama kanker hidung dan tenggorokan (Budianto, 2011).

## 2.4 Tinjauan tentang Tahu

### 2.4.1 Pengertian tahu

Tahu adalah bahan pangan yang terbuat dari bahan dasar kacang kedelai, yang kemudian diekstraksi dan diproses melalui fermentasi. Tahu adalah sari kedelai yang dibuat menjadi kental yang kemudian dicetak dan dipres (Rahmawati, 2013).

Tahu diproduksi dengan memanfaatkan sifat-sifat protein. Protein akan menggumpal bila bereaksi dengan asam (cuka). Gumpalan protein itulah yang kemudian disebut sebagai tahu (Widaningrum, 2015).



**Gambar 2. 2 Tahu putih**  
Sumber gambar: dokumentasi pribadi

### 2.4.2 Kandungan gizi tahu

Tahu memiliki kandungan nutrisi yang lebih baik dari susu kedelai karena dibuat dari sari kedelai dengan kadar air yang lebih rendah. Kandungan energi, lemak, protein, dan fosfor pada tahu memiliki nilai 2 kali lebih besar dari susu kedelai, sedangkan kadar kalsiumnya mencapai 9 kali lebih besar. Tahu mengandung protein dengan kadar 8-12%, dengan mutu protein sebesar 65 NPU. Kandungan protein dari berbagai bahan pangan yaitu kacang tanah (43), daging ayam (65), beras merah (70), susu (82) dan telur (94). Dengan demikian bisa dilihat perbandingan kandungan protein tahu

dengan bahan pangan lainnya, dimana nilai protein tahu lebih tinggi dari protein pada kacang tanah dan setara dengan protein daging ayam (Astawan, 2009).

Pada proses pembuatannya, sebagian besar serat dan karbohidrat yang terkandung dalam tahu ikut terbuang sehingga tahu memiliki daya cerna yang sangat tinggi. Tahu memiliki daya cerna sekitar 95% menjadikan tahu aman dapat dikonsumsi oleh semua golongan usia termasuk orang yang mengalami gangguan pada gastrointestinal (Astawan, 2009).

**Tabel 2. 3 Komposisi zat gizi tahu dan susu kedelai per 100 g bahan**

Zat gizi	Susu kedelai	Tahu
Energi (kkal)	42	72
Air (g)	90,8	84,9
Protein (g)	3,6	7,8
Lemak (g)	2,0	4,3
Gula (g)	2,9	2,3
Serat (g)	0,02	0
Abu (g)	0,5	0,7
Kalsium (mg)	15	146
Natrium (mg)	2	6
Fosfor (mg)	49	105
Besi (mg)	1,2	1,7
Vitamin B <sub>1</sub> (mg)	0,03	0,02
Vitamin B <sub>2</sub> (mg)	0,02	0,02
Vitamin B <sub>3</sub> (mg)	0,50	0,50

Sumber tabel: Astawan, 2009

#### 2.4.3 Manfaat tahu bagi kesehatan

Konsumsi kedelai dapat menurunkan penyakit kronis tertentu seperti kanker, penyakit kardiovaskuler, dan osteoporosis. Protein kedelai bersifat rendah kolesterol dan kandungan isoflavon nya memiliki khasiat sebagai anti-aterogenik. Selain itu, asupan protein kedelai secara efektif dapat mengurangi konsentrasi serum kolesterol total, kolesterol LDL dan trigliserida dibandingkan dengan protein hewani. Isoflavon, aglikon, dan protein yang terdapat dalam tahu memiliki sifat antioksidan yang berfungsi untuk melindungi dari oksidasi lipid (Prasad *et al.*, 2017).

#### 2.4.4 Proses pembuatan tahu

Prosedur pembuatan tahu adalah sebagai berikut (Purwaningsih, 2007).

1. Penyortiran kedelai, yaitu proses pemilihan kedelai. Kedelai dengan kualitas baik dipilih dan dibersihkan dari kotoran maupun dari kedelai yang rusak.
2. Kedelai direndam dalam air bersih selama 8-12 jam. Tujuan perendaman adalah untuk mempermudah proses pengupasan kulit kedelai dan melunakkan struktur kedelai sehingga mudah untuk digiling. Namun perlu diingat bahwa perendaman yang terlalu lama dapat mengurangi total padatan.
3. Setelah direndam kemudian kedelai digiling dengan penambahan air antara 8-10 kali berat kedelai.
4. Setelah digiling didapatkan bubur kedelai. Kemudian bubur kedelai disaring dan filtratnya dimasak. Proses pemasakan dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi bau yang tidak sedap, menonaktifkan antitripsin, meningkatkan daya cerna, mempermudah ekstraksi, penggumpalan protein, serta meningkatkan umur simpan produk tahu.
5. Selanjutnya dilakukan penambahan batu tahu atau biang untuk membantu proses penggumpalan.
6. Gumpalan (*curd*) protein kedelai yang sudah terbentuk kemudian dicetak, dipres dan dipotong.
7. Tahu yang sudah jadi didiamkan selama satu malam, kemudian direbus kembali sebelum dipasarkan.

#### 2.4.5 Syarat mutu tahu

Menurut Badan Standar Nasional Indonesia (1998), syarat mutu tahu adalah sebagai berikut, dapat dilihat pada **Tabel 2.4**.

**Tabel 2. 4 Standar mutu tahu menurut SNI 01-3142-1998**

No	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan:		
	1.1 Bau		Normal
	1.2 Rasa		Normal
	1.3 Warna		Putih normal atau kuning normal
	1.4 Penampakan		Normal, tidak berlendir, dan tidak berjamur
2	Abu	%b/b	Maksimal 1,0
3	Protein (N x 6,25)	%b/b	Maksimal 9,0
4	Lemak	%b/b	Maksimal 0,5
5	Serat kasar	%b/b	Maksimal 0,1
6	Bahan tambahan makanan	%b/b	Sesuai SNI 01-0222-M dan Peraturan MenKes No.722/Men.Kes/Per/IX/1998
7	Cemaran logam:		
	7.1 Timbal (Pb)	mg/kg	Maksimal 2,0
	7.2 Tembaga (Cu)	mg/kg	Maksimal 30,0
	7.3 Seng (Zn)	mg/kg	Maksimal 40,0
	7.4 Timah (Sn)	mg/kg	Maksimal 40,0/250,0
	7.5 Arsen (As)	mg/kg	Maksimal 1,0
8	Cemaran mikroba:		
	8.1 Angka Lempeng Total	Koloni/g	Maks. 10 <sup>6</sup>
	8.2 <i>E. coli</i>		
	8.3 <i>Salmonella</i>		Maksimal 10 APM/g Negatif/ 25 g

Sumber tabel: Badan Standarisasi Nasional, 1998

#### 2.4.6 Tahu yang mengandung formalin

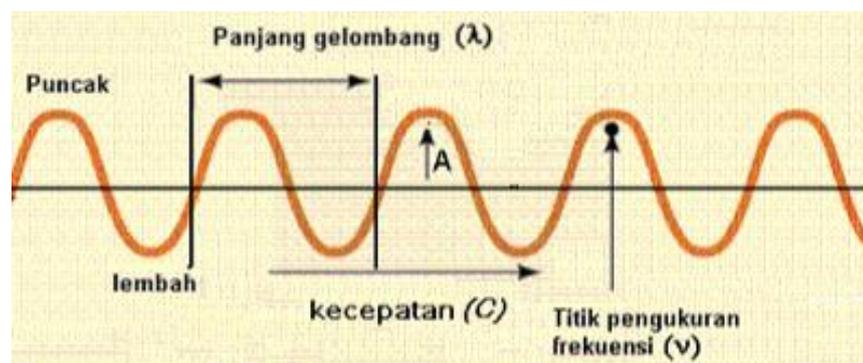
Ciri-ciri organoleptis tahu yang mengandung formalin yaitu dari segi baunya tercium seperti bau obat atau bahan kimia yang menyengat, sedangkan tahu yang tidak mengandung formalin memiliki bau yang khas, yaitu bau kedelai dan agak asam. Kemudian dari segi teksturnya, tahu yang berformalin jika ditekan akan terasa kenyal atau membal, sedangkan tahu yang tidak berformalin ketika ditekan akan mudah hancur. Tahu yang tidak mengandung formalin hanya tahan selama 24 jam dan yang mengandung formalin bisa tahan sampai 3 hari pada suhu kamar (Redaksi AgroMedia, 2007).

## 2.5 Spektrofotometri UV-Vis

### 2.5.1 Pengertian spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diserap oleh sampel. Spektrofotometer UV-Vis melibatkan sejumlah besar energi elektromagnetik dalam molekul yang akan dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis banyak digunakan untuk analisis kuantitatif. Konsentrasi analit dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang tertentu berdasarkan hukum Lambert-Beer. (Dachriyanus, 2004).

Panjang gelombang adalah jarak antara lembah dan puncak. Sinar UV memiliki panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan sinar tampak memiliki panjang gelombang pada kisaran 400-800 nm. (Dachriyanus, 2004).



**Gambar 2. 3 Gelombang**  
**Sumber gambar: Dachriyanus, 2004**

Beberapa istilah yang sering digunakan terkait dengan molekul pada spektrofotometri UV-Vis adalah kromofor, ausokrom, pergeseran batokromik, pergeseran hipsokromik, efek hiperkromik, dan efek hipokromik (Dachriyanus, 2004).

- a. Kromofor; gugus tak jenuh (pada ikatan kovalen). Gugus kromofor merupakan gugus yang bertanggung jawab untuk

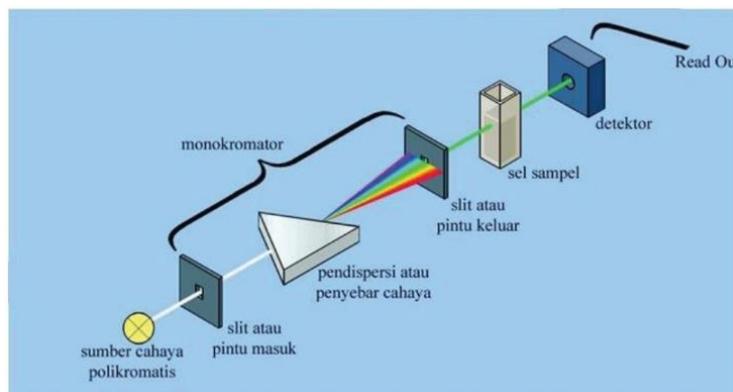
menyerap radiasi dan menghasilkan absorbansi pada daerah UV-Vis (misalnya C=C, C=O, dan NO<sub>2</sub>).

- b. Ausokrom; gugus jenuh dengan elektron bebas (tidak terikat). Ausokrom merupakan gugus yang tidak dapat menghasilkan serapan, tetapi jika gugus ini bergabung dengan kromofor maka akan mempengaruhi panjang gelombang dan intensitas absorbansi (misalnya -OH).
- c. Pergeseran batokromik; pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih panjang karena adanya substitusi atau efek pelarut.
- d. Pergeseran hipsokromik; pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih pendek karena adanya substitusi atau efek pelarut.
- e. Efek hiperkromik; peningkatan intensitas absorban.
- f. Efek hipokromik; penurunan intensitas absorban.

## **2.5.2 Tipe-tipe spektrofotometri UV-Vis**

### *2.5.2.1 Single-beam instrument*

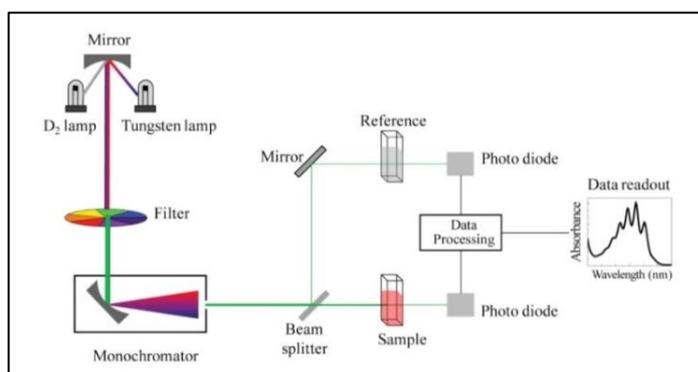
*Single-beam instrument* atau spektrofotometer dengan sinar tunggal digunakan untuk analisis kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Keuntungan dari penggunaan *Single-beam instrument* adalah lebih sederhana, murah, dan lebih ekonomis (Suhartati, 2017).



**Gambar 2. 4 Diagram alat spektrofotometer UV-Vis single-beam**  
 Sumber gambar: Suhartati, 2017

#### 2.5.2.2 Double-beam instrument

*Double-beam instrument* memiliki dua sinar yang dibentuk oleh pemecah sinar. Sinar pertama melewati larutan blangko dan sinar kedua secara bersamaan melewati sampel (Suhartati, 2017).



**Gambar 2. 5 Skema spektrofotometer UV-Vis double beam**  
 Sumber gambar: Suhartati, 2017

#### 2.5.3 Syarat pengukuran

Beberapa persyaratan pelarut yang digunakan pada spektrofotometri UV-Vis adalah sebagai berikut (Suhartati, 2017):

1. Sampel harus dilarutkan dengan sempurna.
2. Pelarut tidak berwarna dan tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi dalam struktur molekulnya (tidak dapat menyerap cahaya yang digunakan oleh sampel).

3. Tidak ada interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis.
4. Memiliki tingkat kemurnian tinggi.

#### 2.5.4 Hukum Lambert-Beer

Hukum Lambert-Beer adalah hubungan linieritas antara penyerapan dan konsentrasi larutan analit. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa jumlah radiasi ultraviolet, cahaya tampak dan cahaya lain yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan adalah fungsi eksponensial dari konsentrasi zat dan ketebalan larutan. Hukum ini secara sederhana dapat dinyatakan dalam rumus berikut.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t}$$

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

(Skoog *et al.*, 2007)

Keterangan:

- A : Absorban / serapan
- T : Transmisi
- $I_0$  : Intensitas radiasi yang datang
- $I_t$  : Intensitas radiasi yang diteruskan
- $\varepsilon$  : Absorbansi molar ( $M \text{ cm}^{-1}$ )
- b : Tebal kuvet (cm)
- c : Konsentrasi (M)

Hubungan antara absorbansi terhadap konsentrasi akan linear ( $A \approx C$ ) jika nilai absorbansi larutan antara 0,2-0,8 ( $0,2 = A < 0,8$ ) dimana pada rentang itulah hukum Lambert-Beer berlaku (Suhartati, 2017).

#### 2.5.5 Hal-hal yang perlu diperhatikan

Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada analisis menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis adalah sebagai berikut (Gandjar & Rohman, 2007):

#### 2.5.5.1 Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini dapat terjadi apabila senyawa yang dianalisis tidak dapat menyerap di daerah tersebut. Cara mengatasinya bisa dilakukan dengan mengubah senyawa atau mereaksikan dengan pereaksi tertentu. Persyaratan pereaksi yang digunakan meliputi reaksi yang dihasilkan selektif dan sensitif; kuantitatif dan reproduibel; rekasinya cepat; dan reaksi stabil dalam waktu yang lama.

#### 2.5.5.2 Waktu operasional

Waktu operasional digunakan untuk mengukur hasil reaksi atau pembentukan warna. Awal reaksi terjadi absorbansi senyawa berwarna meningkat sampai waktu tertentu hingga menjadi absorbansi yang stabil. Apabila waktu pengukuran semakin lama, maka akan ada kemungkinan senyawa berwarna menjadi rusak. Oleh karena itu, pengukuran senyawa berwarna disarankan untuk dilakukan pada saat waktu operasional.

#### 2.5.5.3 Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang maksimal digunakan dalam analisis kuantitatif. Alasan digunakannya panjang gelombang maksimal adalah sebagai berikut:

1. Kepekaan maksimal;
2. hukum Lambert-Beer terpenuhi karena disekitar panjang gelombang maksimal bentuk kurva absorbansi datar;
3. jika dilakukan pengukuran ulang, kekeliruan oleh pemasangan ulang panjang gelombang minim.

#### 2.5.5.4 Pembuatan kurva baku

Senyawa yang akan dianalisis dibuat menjadi seri larutan baku dengan beberapa konsentrasi berbeda. Absorbansi masing-masing larutan diukur dan dibuat kurva hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). Apabila kurva

yang terbentuk berupa garis lurus maka hukum Lambert-Beer sudah terpenuhi.

#### 2.5.5.5 Pembacaan absorbansi sampel dan cuplikan

Absorban yang terbaca sebagai transmittan (T) hendaknya berada di angka antara 0,2-0,8 atau 15-70%. Saran ini dianggap kesalahan pembacaan T adalah 0,005 atau 0,5%.

## 2.6 Validasi Metode

### 2.6.1 Pengertian validasi metode

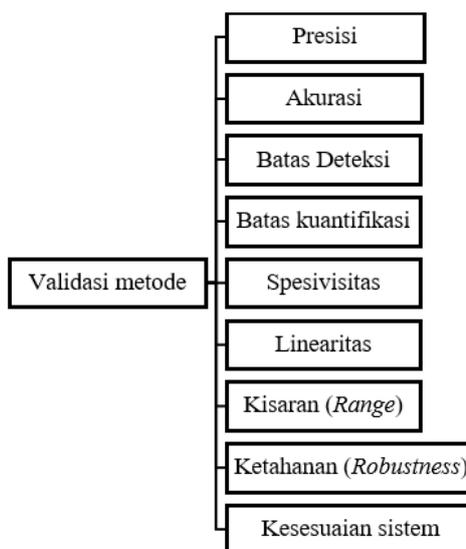
Validasi adalah proses dimana suatu prosedur dievaluasi dengan tujuan untuk menentukan kemanjuran dan keandalan suatu metode untuk analisis, serta menunjukkan bahwa metode tersebut layak digunakan untuk tujuan yang dimaksudkan (Riyanto, 2014).

Beberapa sebab metode uji perlu divalidasi, yaitu (Riyanto, 2014):

1. Apabila suatu metode baru dikembangkan untuk masalah tertentu.
2. Jika metode rutin direvisi untuk pengembangan atau diperluas untuk memecahkan masalah analisis baru.
3. Jika hasil QC menunjukkan bahwa metode rutin tersebut berubah dari waktu ke waktu.
4. Jika metode rutin digunakan di laboratorium yang berbeda, atau dilakukan oleh analis berbeda, atau dilakukan dengan menggunakan alat yang berbeda.

### 2.6.2 Parameter validasi metode

Menurut ICH, dalam validasi metode uji ada beberapa parameter yang harus ditentukan, yaitu (Rohman, 2014): (**Gambar 2.6**)



**Gambar 2. 6 Parameter validasi metode uji menurut ICH (1996)**  
**Sumber gambar: Rohman, 2014**

#### 2.6.2.1 Ketelitian (Akurasi)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan tingkat kedekatan hasil analisis dengan kandungan analit sebenarnya yang terkandung dalam larutan atau sampel. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan.

Penentuan akurasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku standar (*standard addition method*).

Pada metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo, lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar sebenarnya dari standar yang ditambahkan. *Recovery* dapat ditentukan dengan membuat sampel plasebo (eksipien obat, cairan biologis) kemudian ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu, kemudian dianalisis dengan metode yang akan di validasi. Jika tidak memungkinkan untuk membuat sampel plasebo, metode adisi dapat digunakan.

Pada metode adisi (penambahan baku), sampel dianalisis, kemudian sejumlah analit yang akan diperiksa (*pure* analit/standar) ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan kemudian dianalisis kembali. Selisih antara kedua hasil tersebut dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan).

Nilai perolehan kembali dapat dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_f - C_u}{C_a} \times 100\%$$

(Riyanto, 2014)

Keterangan:

$C_f$  = Konsentrasi analit dengan penambahan standar

$C_2$  = Konsentrasi analit tanpa penambahan standar

$C_3$  = Konsentrasi analit standar yang ditambahkan

**Tabel 2. 5 Nilai persen *recovery* berdasarkan nilai konsentrasi sampel**

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

Sumber tabel: Riyanto, 2014

#### 2.6.2.2 Ketepatan (Presisi)

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan kedekatan nilai hasil pengukuran dari sampel yang homogen pada kondisi normal (sampel yang sama diuji secara berurutan menggunakan alat yang sama). Uji presisi dilakukan untuk

mengetahui kedekatan atau kesesuaian antara hasil uji yang satu dengan yang lainnya pada serangkaian pengujian.

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai presisi adalah kesalahan acak seperti tingkat kestabilan instrumen, suhu atau pereaksi yang digunakan, keragaman teknik dan perbedaan analis (operator).

Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). *Repeatability* adalah kesamaan metode jika dilakukan oleh analis yang sama secara berulang kali pada keadaan yang sama dan dalam interval waktu yang berdekatan. Sedangkan *reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dilakukan oleh analis berbeda pada keadaan yang berbeda, menggunakan peralatan dan bahan yang berbeda serta dilakukan di laboratorium yang berbeda pula.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV)  $\leq 2\%$ . Semakin kecil % RSD yang dihasilkan maka semakin tinggi tingkat ketelitian suatu instrumen.

Presisi metode uji dapat ditentukan dengan rumus:

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

(Riyanto, 2014)

Keterangan:

SD = Standar Deviasi

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

N = Ulangan

RSD = *Relative Standart Deviation*

### 2.6.2.3 Linearitas dan daerah kerja atau rentang (*Range*)

Linearitas adalah kemampuan untuk memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dengan suatu metode analisis. Data yang diperoleh dari hasil pengujian analit pada sampel dengan berbagai konsentrasi analit dihitung berdasarkan persamaan matematis dari data yang diperoleh dari hasil pengujian analit pada sampel dengan berbagai konsentrasi analit.

Sebagai parameter adanya hubungan linear, digunakan koefisien korelasi ( $r$ ) pada analisis regresi linear  $y = bx + a$  ( $b$  adalah *slope*,  $a$  adalah *intersep*,  $x$  adalah konsentrasi analit dan  $y$  adalah respon instrumen). Syarat keberterimaan hasil uji nilai linearitas adalah  $>0,9970$ . Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual ( $S_y$ ) (Riyanto, 2014).

### 2.6.2.4 Batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ)

Batas deteksi (LoD) adalah konsentrasi analit terendah yang dapat dideteksi dan diidentifikasi dengan mempertimbangkan tingkat kepastiannya. Batas deteksi dapat dipengaruhi oleh perubahan kecil dalam sistem analit (misalnya kemurnian reagen, kondisi, suhu, suhu dan efek matriks). Sedangkan batas kuantifikasi (LoQ) didefinisikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan teliti. Nilai LoD dan LoQ dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut.

$$Q = \frac{k \times S_b}{S_l}$$

(Riyanto, 2014)

Keterangan:

Q = LoD atau LoQ

K = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantifikasi

S<sub>b</sub> = Simpangan baku respon analitik dari blangko atau simpangan baku residual (S<sub>y/x</sub>)

S<sub>1</sub> = Arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = *slope* (b pada persamaan garis  $y = bx + a$ )