

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tinjauan Umum Pangan**

Pangan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk perkebunan, perikanan, pertanian, kehutanan, peternakan, perairan, dan air, baik yang diproses maupun tidak diproses yang bertujuan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk bahan tambahan pangan, bahan baku pangan, dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan, atau pembuatan makanan atau minuman. Pangan olahan adalah makanan atau minuman hasil proses dari cara dan metode tertentu dengan atau tanpa bahan tambahan (BPOM, 2019).

Menurut undang – undang pangan UU No. 18 Tahun 2012. Dalam UU pangan tersebut, pangan didefinisikan segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk pertanian, perkebunan, kehutanan, perikanan, peternakan, perairan, dan air, baik yang diproses maupun tidak diproses ditujukan sebagai makanan atau minuman untuk konsumsi manusia, termasuk bahan tambahan pangan, dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyimpanan, pengolahan, atau pembuatan makanan dan minuman.

Salah satu jenis pangan yang sering dikonsumsi adalah makanan jajanan. Makanan jajanan merupakan makanan dan minuman yang disajikan dalam wadah atau sarana penjualan di pinggir jalan, tempat umum atau tempat lainnya. Makanan jajanan dapat berupa makanan dan minuman dengan jenis, rasa, dan warna yang bervariasi dan memikat. Makanan jajanan dengan berbagai jenis, warna dan rasa yang bertujuan untuk memikat konsumen untuk membeli. Makanan jajanan banyak dijumpai di luar maupun dalam sekolah pada hampir setiap jajanan menggunakan saus sebagai bahan pelengkap (Puspitasari, 2014).

### **2.1.1 Saus**

Kata “saus” berasal dari bahasa Perancis (*sauce*) yakni diambil dari bahasa latin *salsus* yang berarti “digarami”. Saus merupakan salah satu olahan pangan yang terkenal. Saus biasa menjadi pelengkap pada makanan mie ayam, mie bakso, mie goreng, nasi goreng, dan berbagai makanan cepat saji. Saus biasa terbuat dari buah atau sayur yang berbentuk pasta memiliki aroma dan rasa yang merangsang. Saus yang beredar dijual di Indonesia adalah saus tomat dan saus cabai, dan ada juga saus papaya, namun papaya hanya digunakan sebagai bahan campuran. Pada saus mengandung asam, gula, dan garam dan seringnya juga ditambahkan bahan pengawet (Hambali *et al*, 2006).

Tingkat keawetan pada saus sambal dipengaruhi oleh proses pengolahan yang dilakukan serta jumlah bahan pengawet yang dipakai. Bahan pengawet yang biasa digunakan dalam saus sambal adalah senyawa benzoat, dengan batas maksimum benzoat yang dapat digunakan adalah 1g/kg bahan persyaratan dari Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2013.

## **2.2 Bahan Tambahan Pangan**

### **2.2.1 Pengertian Bahan Tambahan Pangan**

Bahan tambahan pangan merupakan bahan atau campuran bahan yang secara alami bukan merupakan bagian dari bahan baku pangan, ditambahkan ke pada pangan berguna untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan, diantaranya bahan pewarna, pengawet, penyedap rasa, anti gumpal, pemucat, dan pengental (Fadilah, 2017).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 722/Menkes/Per/IX/88 bahan tambahan pangan merupakan bahan yang umumnya tidak dipergunakan sebagai makanan serta biasanya bukan merupakan bahan khas makanan, memiliki atau tidak memiliki nilai gizi, yang sengaja

ditambahkan ke dalam makanan untuk tujuan teknologi (termasuk organoleptik) pada pembuatan, penyediaan, pewadahan, penyimpanan, pengolahan, perlakuan, pembungkusan, atau pengangkutan makanan bertujuan menghasilkan atau diharapkan menghasilkan (langsung atau tidak langsung) suatu komponen yang mempengaruhi sifat khas makanan.

Tujuan dari penggunaan bahan tambahan pangan adalah:

1. Meningkatkan atau mempertahankan nilai gizi dan kualitas daya simpan
2. Membuat makanan lebih mudah dihidangkan.
3. Membuat makanan tampak lebih berkualitas (Cahyadi, 2008).

Fungsi dari bahan tambahan pangan adalah sebagai:

- a. Berperan sebagai pengawet pangan yang dapat mencegah pertumbuhan dan mikroorganisme perusak pangan (menahan proses biokimia) atau mencegah terjadi reaksi kimia yang dapat menurunkan kualitas pangan
- b. Agar dapat memproduksi makanan secara massal
- c. Membuat pangan lebih baik dan menarik sehingga menambah dan merangsang munculnya nafsu makan
- d. Meningkatkan kualitas dari pangan
- e. Mengurangi biaya (Ratnani, 2009).

Bahan tambahan pangan yang digunakan dalam makanan harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- a. Bahan tambahan pangan tidak bertujuan untuk dikonsumsi secara langsung atau tidak digunakan sebagai bahan baku pangan
- b. Bahan tambahan pangan dapat memiliki atau tidak memiliki nilai gizi, yang sengaja ditambahkan ke dalam pangan untuk tujuan teknologis pada pembuatan, pengolahan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, penyimpanan, dan pengangkutan pangan untuk menghasilkan atau diharapkan menghasilkan suatu komponen atau mempengaruhi sifat pangan tersebut, baik secara langsung maupun tidak langsung

- c. Bahan tambahan pangan tidak termasuk cemaran atau bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk mempertahankan atau meningkatkan nilai gizi (Ditjen BPOM, 2012).

### **2.2.2 Penggolongan Bahan Tambahan Pangan**

Secara umum bahan tambahan pangan terbagi menjadi dua golongan besar yaitu:

- a. Bahan tambahan makanan yang digunakan dengan sengaja ke dalam makanan, dengan mengetahui komposisi bahan dan tujuan penambahan BTP bertujuan untuk mempertahankan kesegaran, cita rasa dan membantu pengolahan seperti: pengawet, pewarna dan pengeras
- b. Bahan tambahan makanan yang ditambahkan secara tidak sengaja, yaitu bahan yang tidak memiliki fungsi dalam makanan tersebut, terkandung secara tidak sengaja, baik dalam jumlah sedikit maupun cukup banyak akibat perlakuan selama proses produksi, pengolahan dan pengemasan. Bahan ini dapat pula merupakan hasil buangan atau kontaminan dari bahan yang sengaja digunakan untuk tujuan produksi bahan mentah atau penanganannya yang masih tersisa ke dalam makanan yang akan dikonsumsi. Contoh: residu pestisida, antibiotik dan pupuk (Fadilah, 2017).

Sumber alamiah bahan tambahan pangan dapat berasal dari alamiah ataupun sintesis, dari alamiah seperti lesitin, asam sitrat dan lainnya. Dari proses sintesis lesitin, asam sitrat dan lainnya juga dapat dibuat dari bahan kimia yang memiliki sifat serupa dengan bahan alamiah aslinya, baik susunan kimia dan sifat metabolismenya misalnya asam askorbat dan beta karoten (Fadilah, 2017).

Menurut Peraturan MENKES RI No. 033 tahun 2012 penggolongan BTP yang diperbolehkan adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1 Jenis penggolongan bahan tambahan pangan yang diizinkan penggunaannya

No	Jenis Bahan Tambahan Pangan
1	Antibuih
2	Antikempal
3	Antioksidan
4	Bahan pengkarbonasi
5	Bahan Pengemulsi
6	Gas Untuk Kemasan
7	Humektan
8	Pelapis
9	Pemanis
10	Pembawa ( <i>Carrier</i> )
11	Pembentukan Gel
12	Pembuih
13	Pengatur Keasaman
14	Pengawet
15	Pengembang
16	Pengemulsi
17	Pengental
18	Pengeras
19	Penguat Rasa
20	Peningkat Volume
21	Penstabil
22	Pretense Warna
23	Perisa Alami
24	Pewarna Alami
25	Pewarna Sintesis
26	Propelan
27	Sekustran

Sumber: Peraturan MENKES RI No. 033 tahun 2012

Bahan tambahan pangan yang tidak diizinkan atau dilarang penggunaannya karena bersifat karsinogenik berdasarkan Permenkes RI Nomor 1168/Menkes/Per/IX/1999 adalah:

Tabel 2.2 Jenis Bahan Tambahan Pangan Yang Dilarang Penggunaannya

No	Bahan Tambahan Pangan Yang Dilarang
1	Asam Salisilat dan garamnya
2	Dulsin
3	Dietilpirokarbonat

---

4	Kloramfenikol
5	Kalium Klorat
6	Minyak nabati yang dibromisasi
7	Nitrofurazone
8	Kalium Bromat

---

Sumber : Permenkes RI Nomor 1168/Menkes/Per/IX/1999

### 2.3 Pengawet

Pengawet (*preservative*) adalah bahan tambahan pangan yang ditambahkan pada produk pangan untuk memperpanjang masa simpannya. Telah sejak lama manusia dihadapkan pada kerusakan dan penurunan mutu produk pangan. Penambahan pengawet pada bahan dalam produk pangan merupakan salah satu upaya untuk mencegah atau mengurangi kerusakan produk pangan tersebut. Penggunaan pengawet perlu dipahami oleh pihak industri pangan atau setiap individu yang terkait dengan produksi pangan (Wijaya *et al*, 2012). Menurut Permenkes BPOM No.36 tahun 2013 pengawet merupakan bahan tambahan pangan yang bertujuan mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman, penguraian, dan perusakan lainnya pada pangan yang disebabkan oleh mikroorganisme.

Kerusakan pangan yang diakibatkan reaksi oksidasi dapat dicegah atau dihambat dengan penambahan antioksidan, namun kerusakan yang diakibatkan oleh mikroba dapat dicegah atau dihambat dengan antimikroba yang dapat dikelompokkan sebagai bahan tambahan pangan pengawet (Wijaya *et al*, 2012).

Menurut Ratnani, 2009 tentang syarat pemakaian bahan pengawet yaitu:

1. Memberikan nilai ekonomis
2. Dipakai apabila cara pengawetan lain tidak tersedia
3. Meningkatkan umur simpan
4. Tidak merubah kualitas
5. Mudah untuk ditambahkan atau dilarutkan
6. Cukup aman dipakai pada dosis pemakaian yang telah ditentukan dengan analisis kimia
7. Aktivasnya tidak menghambat enzim pencernaan.

Pemakaian pengawet diharuskan mengikuti batas maksimal yang dipersyaratkan. Upaya penjual dalam memberikan perlindungan konsumen berkaitan dengan penggunaan bahan pengawet pada makanan adalah dengan memenuhi persyaratan tentang peraturan penggunaan bahan pengawet terhadap produk makanan (Pramitha *et al*, 2020). Pemakaian pengawet yang diizinkan dan takaran yang dipersyaratkan, diperlukan agar dapat memberikan perlindungan terhadap konsumen dan kemungkinan zat berbahaya yang digunakan. Konsumen memiliki hak atas keamanan dan keselamatan terhadap barang yang dikonsumsi harus dihormati oleh produsen. Mengonsumsi pengawet yang terus-menerus memiliki kemungkinan memicu terjadi penyakit akibat terakumulasi zat-zat tertentu di dalam tubuh (Akib, 2014).

Jenis – jenis bahan pengawet, yaitu ada pengawet organik dan pengawet anorganik:

1. Pengawet organik

Zat pengawet organik lebih sering dipakai dibandingkan anorganik karena lebih mudah dibuat. Bentuk asam ataupun garam dari bahan organik dapat digunakan. Asam sorbat, paraben, asam benzoat, dan asam asetat merupakan bahan pengawet dalam minuman yang biasa digunakan .

2. Pengawet anorganik

Sulfit, nitrit, dan nitrat adalah zat pengawet yang sering digunakan. Sulfit digunakan dalam bentuk gas  $\text{SO}_2$ , bisulfat, garam natrium atau kalium sulfit, dan metabisulfat. Bentuk asam sulfit sebagai pengawet yang paling efektif asam sulfit terdisosiasi dan terutama terbentuk pH dibawah 3. Penggunaan Garam nitrat dan nitrit pada proses *curing* daging bertujuan untuk memperoleh warna yang baik dan mencegah pertumbuhan bakteri (Winarno, 1992)

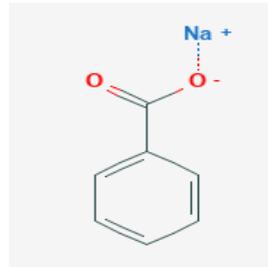
Penggunaan bahan tambahan pangan pengawet yang dilarang penggunaannya apabila dimaksudkan untuk tujuan menurut Permenkes BPOM No. 36 tahun 2013:

- a. Menyembunyikan penggunaan bahan yang tidak memenuhi persyaratan

- b. Menyembunyikan cara kerja yang tidak diperbolehkan dengan cara produksi pangan yang baik untuk pangan
- c. Menyembunyikan kerusakan pangan

## 2.4 Natrium Benzoat

### 2.4.1 Sifat Fisiko Kimia



Gambar 2.1 Struktur kimia senyawa Natrium Benzoat

(Pubchem, 2021)

Rumus molekul	: $C_7H_5NaO_2$
Berat molekul	: 144,11
Kandungan	: Natrium Benzoat mengandung tidak kurang dari 99,0% $C_7H_5NaO_2$ , dihitung terhadap zat anhidrat.
Pemberian	: Butiran atau serbuk hablur; putih; tidak berbau atau hamper tidak berbau
Kelarutan	: Larut dalam 2 bagian air dan dalam 90 bagian etanol (95%) P (Depkes. RI, 1979)

### 2.4.2 Pengertian Natrium Benzoat

Natrium benzoat adalah garam atau ester dari senyawa asam benzoat yang secara komersial dibuat dengan sintesis kimia. Rumus kimia dari natrium benzoat yaitu ( $C_6H_5COONa$ ) memiliki karakter fisik berwarna putih, tanpa bau, bubuk kristal, atau serpihan. Natrium benzoat juga biasa dikenal dengan nama *sodium benzoic*, yaitu lemak

tidak jenuh ganda yang telah disetujui penggunaannya oleh FDA (*food and drug administration*) dalam penggunaannya oleh produsen makanan atau minuman selama kurang lebih 80 tahun untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Mendrofa, 2019).

Natrium benzoat memiliki berat molekul sebesar 144,11. Pemerianya berupa butiran atau serbuk hablur, putih, tidak berbau, atau hampir tidak berbau. Berdasarkan kelarutannya natrium benzoat dapat larut dalam 2 bagian air dan dalam 90 bagian etanol (95%) P. Penyimpanan Natrium benzoat dapat disimpan di dalam wadah yang tertutup rapat dan dapat digunakan sebagai bahan pengawet (Dirjen POM Edisi III, 1979).

Bentuk garam Asam benzoat seperti natrium benzoat, asam parahidro benzoat dan turunannya merupakan serbuk kristal putih yang dapat langsung digunakan ke dalam makanan atau dilarutkan terlebih dahulu di dalam air, sehingga natrium benzoat sebagai bentuk garamnya lebih sering digunakan (Patong, 2013).

Benzoat yang dipakai dalam makanan akan lebih efektif apabila makanannya dalam keadaan asam, sehingga pengawet banyak dipergunakan pada sari buah-buahan, jeli, sirup, dan makanan lain yang memiliki pH rendah (2,5-4,0) (Patong, 2013). Asam benzoat dan garamnya natrium benzoat juga dapat digunakan untuk mengawetkan makanan yang mudah rusak jus dan sirup buah, minuman soda, makanan tepung yang dimasak, saus salad, margarin untuk salad, saus tomat, buah, selai, dan jeli (Delavar, 2012).

Menurut Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 11 Tahun 2019 Tentang Bahan Tambahan Pangan batas maksimum penggunaan natrium benzoat dalam bahan makanan.

Tabel 2.3 Batas maksimum penggunaan natrium benzoat dalam bahan makanan berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 11 Tahun 2019

Nomor Kategori Pangan	Nama Kategori Pangan	Batas Maksimal (mg/kg) dihitung sebagai asam benzoat
01.7	Makanan pencuci mulut berbahan dasar susu (misalnya puding, yogurt berperisa/rasa atau yogurt dengan buah)	200
02.2.2	Lemak oles, lemak oles dari lemak susu dan campurannya	1000
Nomor Kategori Pangan	Nama Kategori Pangan	Batas Maksimal (mg/kg) dihitung sebagai asam benzoat
02.3	Emulsi lemak tipe emulsi minyak dalam air, termasuk produk campuran emulsi lemak dengan atau berperisa	1000
02.4	Makanan pencuci mulut berbasis lemak tidak termasuk makanan pencuci mulut berbasis susu	1000
04.1.2.5	Jem, jeli dan marmalad	200
04.1.2.6	Produk oles berbasis buah (misalnya chutney)	1000
10.1.2.8	Bahan baku berbasis buah, meliputi bubuk buah, puree, topping buah dan santan kelapa	1000
04.1.2.9	Makanan pencuci mulut ( <i>dessert</i> ) berbasis buah termasuk makanan pencuci mulut berbasis air berflavor buah	200
04.1.2.10	Produk buah fermentasi	500
04.1.2.11	Produk buah untuk isi pastri	500
04.1.2.12	Buah yang dimasak	350
04.2.2.5	Puree dan produk oles sayur, kacang dan biji-bijian (misalnya selai kacang)	500
04.2.2.6	Bahan baku dan bubuk ( <i>pulp</i> ) sayur, kacang dan biji-bijian (misalnya makanan pencuci mulut dan saus sayur, sayur bergula)	500
04.2.2.7	Produk fermentasi sayuran (termasuk jamur, akar dan umbi, kacang dan aloe vera) dan rumput laut	500
05.1.3	Olesan berbasis kakao, termasuk isian ( <i>filling</i> )	500
05.1.5	Cokelat imitasi, produk pengganti cokelat	500
05.2	Kembang gula / permen meliputi kembang gula keras dan lunak / permen keras dan lunak, mougat, dan lain-lain	500
05.3	Kembang gula karet / permen karet	500
05.4	Dekorasi (misalnya untuk bakery), topping (non-buah) dan saus manis	500
06.5	Makanan pencuci mulut berbasis sereal dan pati (misalnya puding nasi, puding tapioka)	500
09.2.4.1	Ikan dan produk perikanan kukus atau rebus	500
09.3.2	Ikan dan produk perikanan termasuk moluska, krustase dan ekinodermata yang diolah menjadi pikel dan atau direndam dalam larutan garam	1000

09.4	Ikan dan produk perikanan awet, meliputi ikan dan produk perikanan yang dikalengkan atau difermentasi, termasuk moluska, krustase dan ekinodermata	1000 tidak termasuk yang dikalengkan
10.4	Makanan pencuci mulut berbahan dasar telur (misalnya custard)	500
11.4	Gula dan sirup lainnya (misal xilosa, sirup maple, gula hias). Termasuk semua jenis sirup meja (misal sirup maple), sirup untuk hiasan produk bakeri dan es (sirup karamel, sirup beraroma) dan gula untuk hiasan kue(contohnya kristal gula berwarna untuk kukis)	600
Nomor Kategori Pangan	Nama Kategori Pangan	Batas Maksimal (mg/kg) dihitung sebagai asam benzoat
11.6	Sediaan pemanis, termasuk pemanis buatan ( <i>table top sweeteners</i> , termasuk yang mengandung pemanis dengan intensitas tinggi)	500
12.2.2	Bumbu dan kondimen	600
12.5	Sup dan kaldu	500
12.6	Saus dan produk sejenis	1000
12.7	Produk oles untuk salad (misalnya salad makaroni, salad kentang) dan sandwich, tidak mencakup produk oles berbasis cokelat dan kacang	1000
12.9.1	Pasta kedelai fermentasi	500
12.9.2.1	Saus kedelai fermentasi	1000
12.9.2.2	Saus kedelai non-fermentasi	600
12.9.2.3	Saus kedelai lainnya	1000
13.6	Suplemen pangan	600 kecuali suplemen yang bentuk dan jenisnya sesuai dengan kategori pangan lain
14.1.2.1	Sari buah	600
14.1.2.2	Sari sayur	600
14.1.2.3	Konsentrat sari buah	600 dihitung terhadap produk siap konsumsi
14.1.3.3	Konsentrat nektar buah	1000
14.1.3.4	Konsentrat nektar sayur	600
14.1.4.1	Minuman berbasis air berperisa yang berkarbonat	400
14.1.4.2	Minuman berbasis air berperisa tidak berkarbonat, termasuk punches dan ades	400
14.1.4.3	Konsentrat (cair atau padat) untuk minuman berbasis air berperisa	900 dihitung terhadap produk siap konsumsi
14.1.5	Kopi, kopi substitusi, teh, seduhan herbal, dan minuman biji-bijian dan sereal panas, kecuali cokelat	500 untuk produk cair siap minum
14.2.7	Minuman beralkohol yang diberi aroma misalnya minuman bir, anggur buah,	1000

minuman cooler-Spirit, penyegar rendah alkohol)

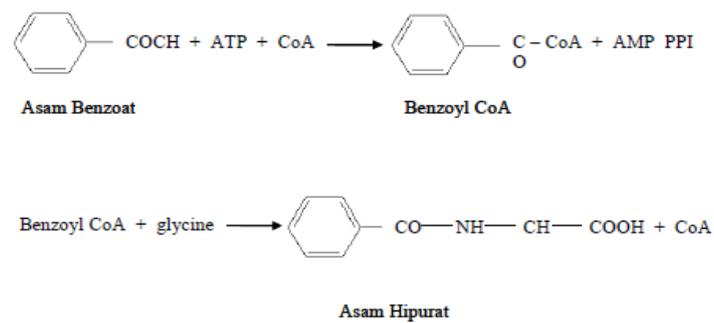
---

Sumber: Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 11 Tahun 2019 Tentang Bahan Tambah Pangan

### 2.4.3 Toksisitas Natrium Benzoat

Natrium benzoat dapat menyebabkan efek samping langsung seperti reaksi alergi atau efek samping tidak langsung yang serius dalam tubuh akibat dari mengkonsumsi secara terus-menerus yang dapat menyebabkan kerusakan sel hati dan ginjal yang ditandai dengan peningkatan *aspartate aminotransferase* (AST), *alanine amino transferase* (ALT) dalam serum dan kreatinin, glutamin, urea dan asam urat dalam urin. Pada penderita asma dan pasien yang menderita urticaria apabila mengkonsumsi natrium benzoat dalam jumlah besar menyebabkan hipersensitifitas (Mendrofa, 2019).

Keram perut, rasa kebas dimulut merupakan efek yang dapat terjadi dengan mengkonsumsi natrium benzoat secara berlebihan. Natrium benzoat yang terkumpul secara terus-menerus dapat menyebabkan penyakit kanker dan dapat merusak system syaraf. Efek dari asam benzoat dan garamnya bagi kesehatan adalah sebagai berikut: terdapat 2 tahap reaksi metabolisme, pertama dikatalisis oleh enzim *syntetase* Dan pada reaksi kedua dikatalisis oleh enzim *acytransferase*. Asam hipurat yang disimpan dalam hati selanjutnya dieksresikan melalui urin. Jadi, di dalam tubuh tidak terjadi penumpukan asam benzoat, sisa asam benzoat yang tidak dieksresikan sebagai asam hipurat, dihilangkan toksisitasnya dengan berkonjugasi pada asam glukoronat dan dieksresi melalui urin. Pada orang yang sangat sensitive terhadap asam benzoat seperti penderita asma dan orang yang menderita urticarial apabila dikonsumsi dalam jumlah besar akan mengiritasi lambung (Maidah, 2015).



Gambar 2.2 Metabolisme asam benzoat dalam tubuh

(Maidah, 2015)

## 2.5 Spektrofotometri Ultra Violet

### 2.5.1 Pengertian Spektrofotometri Ultra Violet

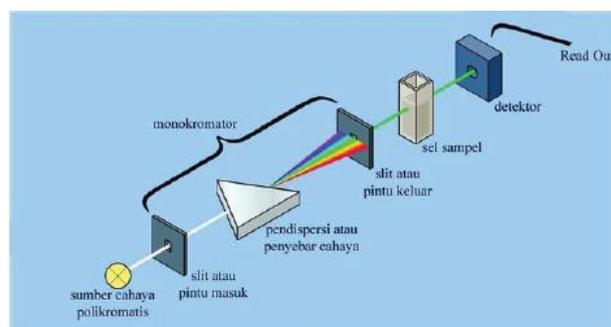
Spektrometer merupakan alat yang bertujuan mengukur transmisi atau absorbansi suatu panjang gelombang, pengukuran pada suatu panjang gelombang tunggal. Alat-alat tersebut dapat dikelompokkan sebagai manual atau perekam, maupun sebagai sinar tunggal atau sinar rangkap. Dalam penggunaannya alat-alat sinar tunggal seringkali digunakan dengan tangan sedangkan alat-alat sinar rangkap seringkali lebih menonjolkan pencatatan spektrum absorb, namun dapat juga dilakukan pencatatan atau spektrum tunggal dengan menggunakan satu alat tunggal (Underwood, A. L, 1990)

Spektrofotometri ultra violet merupakan pengukuran energi cahaya pada panjang gelombang tertentu. Rentang panjang gelombang sinar ultraviolet (UV) pada kisaran panjang gelombang antara 200-400 nm. Spektrofotometri berfungsi untuk mengukur besarnya energi yang diserap atau diteruskan. Pada pengukuran sinar radiasi monokromatik akan melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap sinar radiasi tersebut. Pengukuran dengan alat spektrofotometri UV lebih banyak digunakan untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Penggunaan spektrofotometri dalam analisis kuantitatif bertujuan untuk

melihat konsentrasi dari analit di dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu (Gandjar dan Rohman, 2007)

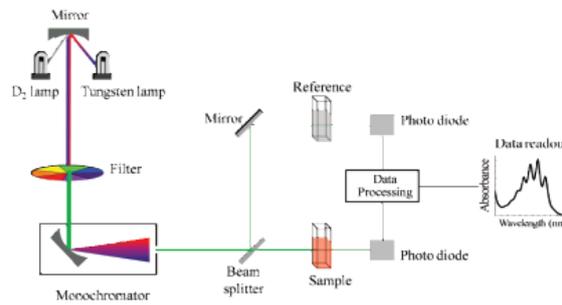
Pada prinsipnya apabila senyawa yang mempunyai ikatan rangkap dapat dilalui oleh radiasi elektromagnetik pada daerah ultraviolet dan sinar tampak, sebagian dari radiasi biasanya dapat diserap oleh senyawa. Panjang gelombang radiasi dan struktur senyawa dapat menentukan banyaknya jumlah radiasi yang dapat terserap. Penyerapan sinar radiasi disebabkan oleh pengurangan energi dari sinar radiasi pada saat elektron-elektron dalam orbital berenergi rendah tereksitasi ke orbital berenergi lebih tinggi (Sastrohamidjojo, 2018).

Spektrofotometer memiliki dua tipe instrument spektrofotometer yaitu *single beam* dan *double beam*. Penggunaan instrument *single beam* untuk kuantitatif dapat mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Beberapa keuntungan dari *Single-beam* instrument adalah sederhana, harganya murah, dan mengurangi biaya. Pada beberapa *single-beam* instrument untuk menghasilkan pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Rentang panjang gelombang paling rendah adalah 190-210 nm dan paling tinggi adalah 800-1000 nm. *Double beam* dapat digunakan pada panjang gelombang 190-750 nm. Dua sinar pada *Double beam* instrument disebut pemecah sinar yang dibentuk dari potongan cermin yang berbentuk V. Sinar pertama melewati larutan blanko dan sinar kedua secara bersamaan melewati sampel (Suhartati, T, 2017).



Gambar 2.3 Diagram Alat Spektrometer UV-Vis (*Single beam*)

(Suhartati, T, 2017)

Gambar 2.4 Skema Spektrofotometer UV-Vis (*Double beam*)

(Suhartati, T, 2017)

Spektrofotometri UV-Vis adalah metode yang dipakai untuk menguji sejumlah cahaya yang diabsorpsi pada setiap panjang gelombang di daerah 23 ultraviolet dan tampak. Pada alat ini suatu sinar cahaya terpecah beberapa cahaya diarahkan melalui sel transparan yang mengandung pelarut. Senyawa dapat diabsorpsi apabila radiasi elektromagnetik dalam daerah UV-Vis melewati suatu senyawa yang terdapat ikatan-ikatan rangkap. Radiasi yang dapat diabsorpsi bergantung pada panjang gelombang dan radiasi dalam struktur senyawa. Pengurangan energi cahaya radiasi ketika elektron dalam orbital dari daerah tereksitasi ke orbital energi tinggi disebut absorbs radiasi (Ida, 2009).

### 2.5.2 Instrumen Spektrofotometri UV-Vis

1. Lampu deuterium, lampu tungsten, dan lampu merkuri merupakan beberapa sumber radiasi pada spektrofotometer. Lampu hydrogen, lampu deuterium (D2), dan lampu 25 xenon biasanya dapat dipakai untuk sumber radiasi ultra lembayung. Lampu deuterium memiliki rentang gelombang yang dapat digunakan adalah 180-370 nm (daerah ultra lembayung dekat). Rentang panjang gelombang lampu tungsten adalah 380-900 nm karena merupakan campuran dari filament tungsten gas iodine (halogen). Lampu merkuri dapat digunakan pada daerah ultra

lembayung yaitu sekitar panjang gelombang 365 nm yang berfungsi mengecek, mengkalibrasi, panjang gelombang, dan juga mengecek resolusi monokromator (Ida, 2009).

2. Monokromator dapat digunakan untuk radiasi monokromatis dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Susunan Monokromator pada spektrofotometer biasanya terdiri dari celah (*slit*) masuk – filter – prisma – kisi (*grating*) – celah keluar
  - a. Celah (*slit*) merupakan bagian pertama dan terakhir dari stem optik monokromator pada spektrofotometer. Celah monokromator berfungsi penting dalam hal terbentuknya radiasi monokromatis dan resolusi panjang gelombang.
  - b. Filter optik cahaya tampak berasal dari cahaya putih campuran 26 cahaya dari berbagai macam panjang gelombang yang memiliki rentang panjang gelombang 380-780. Menyerap warna komplementer sehingga cahaya tampak yang diteruskan merupakan cahaya yang berwarna sesuai dengan warna filter optik yang digunakan merupakan fungsi dari filter optik. Filter optik yang biasa digunakan adalah kaca berwarna. Hasil pita cahaya dari Filter optik sebagai monokromator memiliki hasil sangat sempit sehingga kepekaan analisisnya lebih tinggi.
  - c. Salah satu bagian monokromator yang terpenting adalah Prisma dan kisi (*grating*). Prisma dan kisi pada prinsipnya mendispersikan elektromagnetik sebesar mungkin agar didapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis (Ida, 2009).
3. Kuvet adalah wadah untuk sampel yang akan dianalisis. Kuvet memiliki bentuk tabung empat persegi panjang 1x1 cm, dengan tinggi 5 cm biasanya terbuat dari quartz atau leburan silika. Kuvet berbahan quartz atau leburan silika digunakan untuk pengukuran di daerah ultra lembayung dan untuk kuvet gelas tidak digunakan karena gelas mengabsorpsi sinar ultra lembayung (Ida, 2009).
4. Kualitas spektrofotometer dapat ditentukan oleh detektor yang merupakan salah satu instrumen dalam spektrofotometer. Detektor dapat berfungsi untuk mengubah signal elektronik (Ida, 2009).

5. Amplifier dibutuhkan pada saat sinyal listrik elektronik kurang stabil untuk menguatkan karena penguat dengan resistensi masukan yang tinggi sehingga rangkaian detektor tidak terserap habis yang menyebabkan keluaran yang cukup besar untuk dapat dideteksi oleh suatu alat pengukur. Instrument spektrofotometer sederhana dapat terdiri dari sumber cahaya monokromator sel sampel detektor (Ida, 2009).

## 2.6 Validasi

Validasi merupakan konfirmasi dari bukti-bukti pemeriksaan dan telah sesuai dengan tujuan pengujian. Pada metode non-standar atau metode yang telah dikembangkan perlunya dilakukan validasi. Validasi metode sangat dibutuhkan karena beberapa alasan seperti validasi metode merupakan elemen penting dari control kualitas, validasi dapat membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan. Dalam beberapa bidang, validasi menjadi persyaratan peraturan yang dilakukan (Riyanto, 2014).

Validasi merupakan konfirmasi berdasarkan pemeriksaan dan penyediaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk penggunaan yang dimaksudkan tertentu telah terpenuhi. Metode validasi merupakan proses pembentukan karakteristik kinerja, keterbatasan metode, dan identifikasi pengaruh yang mungkin mengubah karakteristik. Proses verifikasi suatu metode dapat melihat sejauh mana metode yang digunakan sesuai untuk pemecahan masalah pada analisis tertentu. Tujuan validasi metode uji menurut Riyanto, 2014 yaitu

- a. Untuk menerima sampel individu sebagai anggota dari populasi yang diteliti
- b. Untuk mengakui sampel pada proses pengukuran
- c. Untuk meminimalkan pertanyaan tentang keaslian sampel
- d. Untuk memberikan kesempatan bagi resampling bila diperlukan.

### 2.6.1 Presisi

Presisi merupakan suatu ukuran kedekatan hasil analisis yang diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama. Presisi dapat bertujuan menunjukkan kesalahan acak yang terjadi pada sebuah metode. Pengukuran resisi dapat diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). *Precision* dapat menggunakan *repeatability* (keterulangan) atau *reproducibility* (ketertiruan). *Repeatability* dan *reproducibility* dapat diterima jika presisi yang diukur merupakan kondisi berulang dan direproduksi. Koefisien variasi atau standar deviasi biasanya merupakan hasil pengukuran dari presisi yang merupakan hasil analisis diperoleh dari independen disiapkan standar kontrol kualitas. Presisi tergantung konsentrasi dan harus diukur pada konsentrasi yang berbeda dalam rentang kerja, biasanya di bawah, pertengahan dan bagian atas. Syarat keterterimaan presisi adalah konsentrasi yang lebih rendah dari 2%. Berikut merupakan rumus untuk menghitung simpangan baku (SD) dan dari nilai simpangan baku dapat dihitung nilai koefisien variasi dengan rumus (Riyanto, 2014):

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

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

*Repeatability* merupakan keseksamaan metode yang dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam jangka waktu yang pendek. Hasil *Repeatability* dapat dilihat melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel yang mirip terpisah dari batch yang sama, sehingga memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal (Riyanto, 2014).

*Reproducibility* merupakan keseksamaan metode yang dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Pengerjaan analis dilakukan pada laboratorium yang berbeda dan dengan menggunakan perekasi, peralatan, dan analis

yang berbeda. Analisis dilakukan pada sampel-sampel yang diduga mirip yang diambil dari batch yang sama. *Reproducibility* juga dapat dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan pereaksi, peralatan, dan analisis yang berbeda (Riyanto, 2014).

Syarat ketelitian metode jika simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) bernilai  $\leq 2\%$ . Persyaratan dapat bersifat fleksibel tergantung dari analit. Kriteria ini bersifat fleksibel tergantung pada analit yang diperiksa, jumlah sampel, konsentrasi analit yang diperiksa, dan kondisi laboratorium. Menurut penelitian semakin rendah konsentrasi analit maka nilai koefisien variasi akan meningkat. Nilai ketelitian metode dapat ditentukan dengan rumus  $100\% - \%KV$  (Riyanto, 2014).

*Coefficient Variance Horwitz* (CV Horwitz) mengemukakan hubungan terhadap koefisien rata-rata variasi (CV) kekuatan 2 dengan konsentrasi rata-rata yang diukur dan dinyatakan sebagai pangkat 10 (Riyanto, 2014).

RSDR dinyatakan sebagai koefisien variasi dalam kondisi *reproducibility*

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

Dimana C merupakan fraksi konsentrasi dan dinyatakan sebagai pangkat dari 10. Persyaratan dari presisi adalah apabila nilai KV yang didapat dari percobaan lebih rendah dari nilai KV Horwitz (Riyanto, 2014).

### 2.6.2 Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sesungguhnya. Akurasi dinyatakan dalam persen *recovery* analit yang ditambahkan. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standard addition method*) merupakan dua metode yang digunakan untuk pengukuran akurasi. Akurasi merupakan nilai perbedaan antara

keinginan hasil tes dan nilai acuan yang diterima karena metode sistematis dan kesalahan laboratorium. Akurasi dapat dinyatakan dalam nilai persentase. Tujuan dari Akurasi dan presisi adalah menentukan total kesalahan analisis (Riyanto, 2014).

Pada metode simulasi, placebo ditambahkan sejumlah analit bahan murni (semua campuran *reagent* yang digunakan tanpa analit), kemudian campuran tersebut dianalisis dan hasil dari campuran dibandingkan dengan kadar standar yang sebenarnya. Hasil *recovery* juga dapat ditentukan dengan cara membuat sampel placebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit pada konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), hasil *recovery* kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi (Riyanto, 2014).

Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah analit tertentu yang telah diperiksa (pure analit/standar) ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis lagi. Persen *recovery* dihitung dari hasil selisih yang dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan) (Riyanto, 2014).

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

C1 = konsentrasi dari analit dalam campuran contoh + sejumlah tertentu analit

C2 = konsentrasi dari analit dalam contoh

C3 = konsentrasi dari analit yang ditambahkan kedalam contoh

Tabel 2.4 Nilai persen *recovery* berdasarkan nilai konsentrasi sampel

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

Sumber: Harmita (2004)

### 2.6.3 Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Pernyataan batas terendah dan tertinggi analit merupakan rentang metode yang sudah ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Linearitas dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dengan menggunakan persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara analisis terhadap konsentrasi analit merupakan pengujian dari linearitas (Riyanto, 2014).

Nilai  $r$  (koefisien korelasi) merupakan parameter adanya hubungan linier pada analisis regresi linier  $y = bx + a$ . Hubungan linier yang  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Untuk menunjukkan kepekaan analisis terutama pada instrumen yang digunakan dilihat pada nilai  $a$ . Simpangan baku residual ( $S_y$ ) merupakan salah satu parameter yang harus dihitung. Dalam perhitungan matematik yang diukur dapat digunakan kalulator atau perangkat lunak komputer (Riyanto, 2014).

### 2.6.4 Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantisasi (LOQ)

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat terdeteksi untuk memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Parameter uji batas yang dilakukan adalah Batas deteksi. Batas kuantisasi dapat menganalisa kuantitas terkecil analit dalam sampel yang memenuhi kriteria cermat dan seksama. merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Berikut cara menentukan limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) (Riyanto, 2014):

#### 1. *Signal-to-noise*

Dengan menggunakan metode *signal-to-noise*, puncak ke puncak kebisingan di sekitar waktu retensi analit diukur, dan kemudian, konsentrasi analit yang akan menghasilkan sinyal sama dengan nilai

tertentu dari kebisingan untuk sinyal rasio diperkirakan. Pengukuran kebisingan besarnya dapat dilakukan manual pada *printout* kromatogram atau dengan *auto-integrator* dari instrument. Untuk memperkirakan LOD *sinyal-to-noise* ratio (S/N) umumnya tiga diterima dan untuk LOQ sepuluh rasio *signal-to-noise* digunakan. (Riyanto, 2014).

## 2. Penentuan blanko

Apabila hasil dari standar deviasi analisis blanko tidak nol maka diterapkan penentuan. Nilai LOD didapat dari konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan nilai LOQ didapat dari konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti yang ditunjukkan dalam persamaan berikut:

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

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

$x$  = konsentrasi rata-rata blanko

$S_b$  = standar deviasi dari blanko

(Riyanto, 2014).

## 3. Kurva Kalibrasi

Pada kurva kalibrasi linear, dimisalkan bahwa respon instrumen  $y$  berhubungan linier dengan konsentrasi  $x$  standar untuk rentang yang terbatas konsentrasi. Hal ini dapat dinyatakan dalam model seperti  $y = bx + a$ . Model ini digunakan untuk menghitung sensitivitas  $b$ (slope) dan LOD dan LOQ. Oleh karena itu LOD dan LOQ dapat digunakan rumus sebagai berikut:

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

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

$S_a$  = standar deviasi

$b$  = slope

(Riyanto, 2014).

### 2.6.5 Spesifisitas

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

Perbandingan hasil analisis sampel yang mengandung pengotor, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa palsebo dengan hasil analisis sampel tanpa menambahkan bahan-bahan sebelumnya merupakan cara menentukan metode spesifisitas. Hasil penyimpangan merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Jika cecairan dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak diperoleh data, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cecairan atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran spesifitas (Hermita, 2004).

### 2.6.6 Kekuatan

Kekuatan dapat dilakukan untuk melakukan variasi pada komposisi fase gerak. Perlunya dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus serta mengevaluasi respon analitik dan efek presisi serta akurasi untuk memvalidasi kekuatan suatu metode. Sebagai contoh, perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan prosedur HPLC dapat mencakup (tapi tidak dibatasi) perubahan komposisi organik fase gerak (1%), pH fase gerak ( $\pm 0,2$  unit), dan perubahan temperatur kolom ( $\pm 2 - 3^\circ \text{C}$ ). Perubahan lainnya dapat dilakukan apabila sesuai dengan laboratorium (Hermita, 2004).

### 2.6.7 Rentang

Pernyataan batas terendah dan tertinggi analit merupakan rentang metode yang sudah ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Hermita, 2004).

### 2.6.8 Kesesuaian Sistem

Agar data dapat diterima perlu kesesuaian sistem untuk memastikan bahwa sistem dan prosedur yang dilakukan dapat memberikan hasil data sesuai. Kesesuaian sistem merupakan serangkaian uji untuk memastikan bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Pengembangan metode dan validasi metode dilakukan untuk persyaratan kesesuaian sistem (Labib, 2013).

Menurut *United States Pharmacopeia* (USP) menentukan parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter – parameter yang digunakan sebagai berikut : bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas ( $k'$  atau  $\alpha$ ) dan nilai standar deviasi relative (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Biasanya, paling tidak ada 2 kriteria yang sering 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% (Labib, 2013).