

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi Pangan

Pangan adalah kebutuhan dan suatu hak dasar manusia. Penyiapan pangan bukan hanya berkaitan dengan jumlahnya tetapi juga keamanannya. Sudut pandang dari keamanan pangan sangat penting karena berkaitan dengan kesehatan masyarakat. Pangan juga merupakan kebutuhan esensial bagi seluruh manusia untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup mereka (Bagus & Murni, 2020). Pangan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk pertanian, perkebunan, kehutanan, perikanan, peternakan, perairan, dan air, baik yang diolah maupun tidak diolah yang diperuntukan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk Bahan Tambahan Pangan, Bahan Baku Pangan, dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan, dan/ atau pembuatan makanan atau minuman (BPOM, 2019).

Pangan olahan adalah makanan atau minuman hasil proses dengan cara atau metode tertentu dengan atau tanpa bahan tambahan (BPOM, 2019). Pangan olahan tertentu adalah pangan olahan untuk konsumsi bagi kelompok tertentu dalam upaya memelihara dan meningkatkan kualitas kesehatan kelompok. Sistem pangan adalah segala sesuatu yang berhubungan dengan pengaturan, pembinaan, dan/atau pengawasan terhadap kegiatan atau proses produksi pangan dan peredaran pangan sampai dengan siap dikonsumsi manusia. Pangan segar adalah pangan yang belum mengalami pengolahan yang dapat dikonsumsi langsung dan/atau yang dapat menjadi bahan baku pengolahan pangan. Pangan siap saji adalah makanan dan/atau minuman yang sudah diolah dan siap untuk langsung disajikan ditempat usaha atau di luar tempat usaha atas dasar pesanan (Kemenkes RI, 2004).

2.2 Keamanan pangan

Keamanan pangan adalah kondisi dan upaya yang diperlukan untuk kemungkinan terjadinya pencemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia. Persyaratan keamanan pangan adalah standar dan peraturan lain yang harus dipenuhi untuk mencegah pangan menimbulkan kemungkinan bahaya akibat cemaran biologis, kimia, dan lainnya yang dapat mengganggu, merugikan, dan membahayakan kesehatan manusia (Kemenkes RI, 2004). Mengenai upaya perlindungan makanan dan minuman bagi konsumsi manusia, Pasal 109 Ayat 16 Undang-Undang Kesehatan Nomor 36 Tahun 2009 mengatur bahwa makanan dan minuman yang diproduksi dan dijual kepada masyarakat harus memenuhi standar atau standar konsumsi yang aman. Jika tubuh terus mengonsumsi makanan yang tidak aman, maka tubuh akan rentan mengalami gangguan kesehatan. Jika kondisi ini terjadi pada anak-anak, maka dapat mengganggu proses pertumbuhan anak termasuk pertumbuhan sel-sel otak yang dapat memengaruhi tingkat kecerdasan. Pada akhirnya anak tersebut akan sulit bersaing dengan anak-anak sebaya lainnya.

Secara hukum, upaya ketahanan pangan Indonesia telah menarik perhatian pemerintah. Hal ini dibuktikan dengan regulasi terkait keamanan makanan dan minuman (*food*) dalam bentuk hukum, seperti “UU Sanitasi” dan Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan (UU Pangan) dan peraturan pelaksanaannya. Keamanan pangan merupakan salah satu faktor penting dalam pelaksanaan sistem pangan. Dalam Ketentuan Umum Peraturan Pemerintah Nomor 86 tentang Keamanan Pangan Tahun 2019, penerapan keamanan pangan bertujuan agar negara dapat melindungi masyarakat dari mengonsumsi makanan yang aman bagi kesehatan dan keamanan psikologis. Untuk menjamin keamanan konsumsi pangan yang dapat dimakan di masyarakat, maka keamanan pangan harus dilaksanakan mulai dari proses produksi sampai ke tangan konsumen. Pada penyelenggaraan keamanan pangan, semua kegiatan atau proses produksi di dalam negeri maupun yang berasal dari impor untuk menghasilkan pangan

yang aman dikonsumsi harus melalui penerapan persyaratan keamanan pangan (Lestari, 2020).

2.3 Tahu

Di Indonesia tahu merupakan makanan yang sering dikonsumsi masyarakat. Mutu protein suatu bahan pangan dapat dilihat berdasarkan kandungan asam amino penyusunnya. Tahu memiliki kandungan asam amino yang paling lengkap dari semua produk yang terbuat dari kedelai. Selain memiliki sumber protein, tahu mengandung zat gizi lain yang dibutuhkan oleh tubuh seperti lemak, vitamin dan mineral. Tahu mengandung air 80%, protein 8-12%, lemak 4-6%, dan karbohidrat 1-6%. Tahu juga memiliki berbagai mineral seperti kalsium, zat besi, fosfat, kalium, natrium dan juga vitamin yaitu kolin, vitamin B, dan vitamin E. Tahu memiliki kandungan asam amino jenuh yang rendah dan bebas kolesterol (Rosita *et al.*, 2019). Tahu merupakan produk yang terbuat dari kedelai, pada proses pengolahan tahu bahan-bahan digunakan adalah bahan pangan yang memiliki protein tinggi, air dan penggumpal (koagulan) untuk memadatkan bubur kedelai (Linn, 2013).

Tahu merupakan salah satu produk olahan kedelai yang diproses melalui penggumpalan ekstrak protein kedelai. Menurut SNI 01-3142-1998 definisi tahu adalah suatu produk makanan berupa padatan lunak yang dibuat melalui proses pengolahan kedelai (*Glycine Species*) dengan cara pengendapan proteinnya, dengan atau tanpa penambahan bahan lainnya yang diijinkan. Kualitas tahu dapat dipengaruhi oleh proses pengolahan, kultivar dan kualitas dari kacang kedelai serta koagulan yang digunakan. Pembuatan tahu terdiri dari dua langkah utama, yaitu: pembuatan susu kedelai dan koagulasi susu kedelai tersebut untuk membentuk endapan putih (*cruds*) yang kemudian di press untuk memperoleh tahu (Andarwulan *et al.*, 2018).

Tabel 2.1 Standar Kualitas Tahu Berdasarkan SNI 01-3142-1998

No	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan Bau Rasa Warna Penampakan		Normal Normal Putih normal atau kuning normal Normal tidak berlendir dan tidak berjamur
2	Abu	% (b/b)	Maks. 1,0
3	Protein	% (b/b)	Min. 9,0
4	Lemak	% (b/b)	Min. 0,5
5	Serat kasar	% (b/b)	Maks. 0,1
6	Bahan tambahan makanan	% (b/b)	Sesuai SNI 01-0222-195 dan Peraturan MenKes No 722/Men Kes/Per/IX/1988e
7	Cemara logam : Timbal (Pb) Tembaga (Cu) Seng (Zn) Timah (Sn) Raksa (Hg)	Mg/kg Mg/kg Mg/kg Mg/kg Mg/kg	Maks. 2,0 Maks. 30,0 Maks. 40,0 Maks. 40,0/250 Maks. 0,03
8	Cemaran Arsen (As)	Mg/kg	Maks. 1,0
9	Cemaran Mikroba : Escherichia Coli Salmonela	Efu/g /25g	Maks. 10 negatif

2.4 Bahan Tambahan Pangan

2.4.1. Definisi Bahan Tambahan Pangan

Peraturan Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 11 Tahun 2019 tentang Bahan Tambahan Pangan, mendefinisikan bahwa bahan tambahan pangan yang selanjutnya disingkat BTP adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan, tetapi tidak diperuntukan untuk dikonsumsi secara langsung ataupun sebagai bahan pangan. BTP dapat mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi yang sengaja ditambahkan ke dalam pangan untuk tujuan teknologis pada pembuatan, pengolahan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, penyimpanan dan pengangkutan pangan untuk menghasilkan suatu komponen atau mempengaruhi sifat pangan tersebut, baik secara langsung atau tidak langsung. BTP tidak ada cemaran untuk mempertahankan dan meningkatkan nilai gizi.

Golongan BTP (BPOM, 2019) :

1. Antibuih (*antifoaming agent*);
2. Antikempal (*anticaking agent*);
3. Antioksidan (*antioxidant*);
4. Bahan Pengkarbonasi (*carbonating agent*);
5. Garam Pengemulsi (*emulsifying salt*);
6. Gas untuk kemasan (*packaging gas*);
7. Humektan (*humectant*);
8. Pelapis (*glazing agent*);
9. Pemanis (*sweetener*), termasuk Pemanis Alami (*natural sweetener*)
dan Pemanis Buatan (*artificial sweetener*);
10. Pembawa (*carrier*);
11. Pembentuk Gel (*gelling agent*);
12. Pembuih (*foaming agent*);
13. Pengaturan Keasaman (*acidity regulator*);
14. Pengawet (*preservative*);
15. Pengembang (*raising agent*);
16. Pengemulsi (*emulsifier*);
17. Pengental (*thickener*);
18. Pengeras (*firming agent*);
19. Penguat Rasa (*flavour enhancer*);
20. Peningkatan Volume (*bulking agent*);
21. Penstabil (*stabilizer*);
22. Peretensi Warna (*colour retention agent*);
23. Perisa (*flavouring*);
24. Perlakuan Tepung (*flour treatment agent*);
25. Pewarna (*colour*), termasuk Pewarna Alami (*natural food colour*)
dan Pewarna Sintetis (*synthetic food colour*);
26. Propelan (*propellant*); dan
27. Sekuestran (*sequestrant*).

2.4.2. Zat Pewarna

Zat pewarna merupakan zat yang ditambahkan untuk memberi dan memperbaiki warna, dan atau suatu pigmen yang berasal dari sayuran, hewan, mineral atau bahan lain yang bila ditambahkan pada makanan obat dan kosmetik akan menghasilkan warna tertentu. Berdasarkan sumbernya ada dua jenis zat pewarna yaitu zat pewarna alami dan zat pewarna buatan (Karunia, 2013).

2.4.2.1. Zat pewarna alami (*Natural Colour*)

Pewarna Alami (*Natural food colour*) adalah Pewarna yang dibuat dengan melalui proses ekstraksi, isolasi, atau derivatisasi (sintesis parsial) dari tumbuhan, hewan, mineral atau sumber alami lain, termasuk pewarna identik alami (BPOM, 2019).

Tabel 2.2 BTP pewarna alami

No	Nama BTP Pewarna alami (<i>Natural colour</i>)	INS
1	Kurkumin CI No. 75300 (<i>Curcumin</i>)	100(i)
2	Riboflavin (<i>Riboflavins</i>):	
	Riboflavin (sintetik) (<i>Riboflavin, synhetic</i>)	101 (i)
	Riboflavin 5'-natrium fosfat (<i>Riboflavib 5'-phosphate</i>)	101 (ii)
	Riboflavin dan <i>Bacillus subtilis</i> (<i>Riboflavin (Bacillus subtilis)</i>)	101 (iii)
3	Karmin dan ekstrak cochineal CI. No. 75470 (<i>Carmines and act</i>):	
	Karmin CI. NO. 75470 (<i>Carmines</i>)	120
	Ekstrak cochineal No. 75470 (<i>Cochineal extract</i>)	120
4	Klorofil CI. No. 75810	140
5	Klorofil dan klorofilin tembaga kompleks CI. No. 75810 and <i>chlorophyllins, copper complexes</i>)	
	Klorofil tembaga kompleks CI. No. 75810 (<i>Chlorophylls, lexes</i>)	141(i)
	Klorofilin tembaga kompleks CI. No. 75815 (<i>Chlorophyllin exes, sodium and potassium salts</i>)	141(ii)
6	Karamel I (<i>Caramel I- plain</i>)	150a
7	Karamel II kaustik sulfit proses (<i>caramel II caustic sulphite</i>)	150b
8	Karamel III ammonia sulfit proses (<i>Caramel III- ammonia</i>)	150c
9	Karamel IV ammonia sulfit proses (<i>Caramel IV- sulphite cess</i>)	150d
10	Karbon tanaman CI. 77266 (<i>Vegatable carbon</i>)	153
11	Beta-karoten (sayuran) CI. No. 75130 (<i>Carotenes, le</i>)	160a(ii)

12	Ekstrak anato CI. No. 75120 (berbasis bixin) (<i>Annatto based</i>)	160b(i)
13	Keratonoid (Cerenoids): Beta-karoten (sintetik) CI. No. 40800 (<i>beta-Carotenes</i> , 160a(i) Beta-karoten dari <i>Blakeslea trispora</i> (<i>beta-Carotenes isporal</i>)) Ektstrak Likopen dari Tomat (<i>Lycopene Extract from Tomato</i>) 160d(iii) Beta-apo-8'asam kerotenoat CI. No. 40820 (<i>beta-Apo-8'-</i> 160e Etil ester dari beta-apo-8'asam kerotenoat CI. No. 40825 160f <i>Carotenoic acid ethyl ester</i>)	
14	Merah bit (<i>Beet red</i>)	162
15	Antosianin (<i>Anthocyanins</i>)	163
16	Titanium dioksida CI. No. 77891 (<i>Titanium dioxide</i>)	171
17	Besi Oksida Merah (<i>Iron Oxide, Red</i>)	172 (ii)

Sumber : (BPOM, 2019)

2.4.2.2. Zat pewarna sintetis

Pewarna Sintetis (*Synthetic food colour*) adalah Pewarna yang diperoleh secara sintesis kimiawi (BPOM, 2019). Pemakaian pewarna sintetis memang dapat memberikan dampak positif bagi produsen maupun konsumen, namun pewarna sintetis juga dapat memberikan dampak negatif terutama bagi konsumen. Pewarna sintetis lebih memiliki dampak negatif bagi Kesehatan jika dibandingkan dengan pewarna alami. Zat-zat sintetis jika digunakan dalam waktu lama akan mempengaruhi organ yang ada di dalam tubuh. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor: 757/MenKes/Per/IX/12, mengatur tentang bahan tambahan makanan. Dalam peraturan ini terdapat zat warna sintetis yang diizinkan untuk makanan dan minuman dapat dilihat pada tabel 2.3 menurut peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor: 239/Men.Kes/Per/V1/1985 mengatur tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya dapat dilihat pada tabel 2.4.

Tabel 2.3 BTP pewarna sintetis yang di izinkan

No	Nama BTP Pewarna sintetis (<i>Synthetic colour</i>)	INS
1	Tartrazin CI. No. 19140 (<i>tartrazine</i>)	102
2	Kuning kuinolin CI. No. 47005 (<i>Quinoline yellow</i>)	104
3	Juning FCF CI. No. 15985 (<i>Sunset yellow FCF</i>)	110
4	Karmoisin CI. No. 14720 (<i>Carmoisine</i>)	122
5	Ponceau 4R CI. No. 16255 (<i>Ponceau 4R</i>)	124
6	Eritrosin CI. No. 45430 (<i>Erythrosine</i>)	127
7	Merah allura CI. No. 16035 (<i>Allura red</i>)	129
8	Indigotin CI. No. 73015 (<i>Indigoine</i>)	132
9	Biru berlian FCF CI. No. 42090 (<i>Brilliant blue FCF</i>)	133
10	Hijau FCF CI. No. 42053 (<i>Fast green FCF</i>)	143
11	Coklat HT CI. No. 20285 (<i>Brown HT</i>)	155

Sumber (BPOM, 2019)

Tabel 2.4 BTP Pewarna yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya

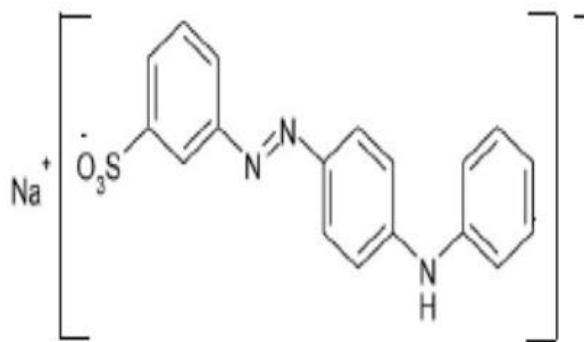
No	Bahan Pewarna	No.Indeks warna
1	Auramine (C.I Basic Yellow 2)	41000
2	Alkanet	75520
3	Butter Yellow (C.I. Solvent Yellow 2)	11020
4	Black 7984 (Food Brown 7)	27755
5	Burn Unber (Pigmen Brown 7)	77491
6	Chrysoidine (C.I. Basic Orange 2)	11270
7	Chrysoine S (C.I Food Yellow 8)	14270
8	Citrus Red No. 2	12156
9	Chocolate Brown FB (Food Brown 2)	-
10	Fast Red E (C. I Food Red 4)	16045
11	Fast Yellow AB (C. I Food Yellow 2)	13015
12	Guinea Green B (C. I Acid Green No. 3)	42085
13	Indanthrene Blue RS (C. I Food Blue 4)	69800
14	Magenta (C. I Basic Violet 14)	42510
15	Metanil Yellow (Ext. D&C Yellow No. 1)	13065
16	Oil Orange SS (C. I Solvent Orange 2)	12100
17	Oil Orange XO (C. I Solvent Orange 7)	12140
18	Oil Orange AB (C. I Solvent Yellow 5)	11380
19	Oil Yellow AB (C. I Solvent Yellow 6)	11390
20	Orange G (C. I Food Orange 4)	16230
21	Orange GGN (C. I Food Orange 2)	15980
22	Orange RN (Food Orange 1)	15970
23	Orchid and Orcein	-
24	Ponceau 3R (Acid Red 1)	16155
25	Ponceau SX (C. I Food Red 1)	14700
26	Ponceau 6R (C. I Food Red 8)	16290
27	Rhodamin B (C. I Food Red 15)	45170
28	Sudan I (C. I Solvent Yellow 14)	12055
29	Scarlet GN (Food Red 2)	14815
30	Violet 6 B	42640

Sumber : (Permenkes RI, 1985)

Dari kedua Peraturan Kementrian Kesehatan tersebut dapat dibedakan mana zat pewarna sintetis yang diperbolehkan dan zat pewarna sintetis yang penggunaannya dilarang. Untuk penggunaan zat pewarna yangizinkan masih harus mengikuti aturan pakai yaitu batas maksimum penggunaan. Kedua Peraturan Kementrian Kesehatan tersebut dapat menjadi patokan penggunaan zat pewarna sehingga dapat terhindar dari penggunaan zat pewarna berbahaya.

2.5 Tinjauan Umum *Methanyl yellow*

2.5.1 *Methanyl yellow*



Gambar 2.1 Struktur *Methanyl yellow*

Rumus Molekul : $(C_{18}H_{14}N_3O_3SNa)$
 Nama Kimia : Natrium 3-[(4-N-phenylamino)phenylazo] benzene sulfonate, garam natrium metanilyazodiphenilamine
 Berat Molekul : 452.37 g/mol
 Titik Lebur : 390°C
 Pemerian : Serbuk berwarna kuning kecoklatan
 Kelarutan : Kelarutan dalam air 5-10 g/100 ml suhu 24°C
 (Bhernama *et al.*, 2017)

Methanyl yellow adalah zat warna sintetik dengan berbentuk serbuk memiliki warna kuning kecoklatan, memiliki sifat larut dalam air dan alkohol, agak larut dalam benzen dan eter, serta sedikit larut dalam aseton. *Methanyl yellow* terbuat dari asam metanilat dan difenilamin yang memiliki sifat toksik (Bhernama *et al.*, 2017). *Methanyl yellow* dan beberapa pewarna sintetik dikategorikan dalam golongan azo. Namun, *Methanyl yellow* termasuk pewarna golongan azo yang penggunaannya telah dilarang pada pangan. Pada umumnya, pewarna sintetik azo memiliki sifat yang lebih stabil dari pada kebanyakan pewarna alami. Pewarna azo yang stabil dalam berbagai rentang pH, stabil pada pemanasan, dan tidak memudar bila terpapar cahaya atau oksigen. Hal tersebut membuat pewarna azo berlaku di hampir semua makanan. Pewarna azo memiliki kekurangan salah satunya adalah sifatnya yang tidak larut dalam minyak atau lemak. Hanya bila pewarna azo digabungkan dengan molekul yang bersifat larut lemak atau bila pewarna azo tersebut didispersikan dalam bentuk partikel halus, maka lemak atau minyak dapat terwarnai (BPOM, 2012).

2.5.2 Penggunaan *Methanyl yellow*

Methanyl yellow adalah salah satu bahan pewarna yang sering sekali disalahgunakan sebagai pewarna makanan (Bhernama *et al.*, 2017). *Methanyl yellow* adalah pewarna sintesis yang digunakan pada industri tekstil, kertas, cat, tinta, plastik dan kulit. Pewarna ini berbentuk serbuk atau padat yang berwarna kuning kecoklatan. *Methanyl yellow* sering disalahgunakan antara lain pada mie, kerupuk dan jajanan lain yang berwarna kuning mencolok. Ciri-ciri fisik makanan yang mengandung pewarna ini ialah memiliki warna kuning mencolok cerah, dan terdapat bintik-bintik putih karena tidak homogen (Priscila *et al.*, 2019)



Gambar 2.2 *Methanyl yellow* yang ada dipasaran
(sumber: BPOM, 2012)



Gambar 2.3 Produk tahu kuning

2.5.3 Bahaya Penggunaan *Methanyl yellow* Bagi Kesehatan

Beberapa pewarna azo dilarang digunakan dalam makanan karena efek toksiknya. Namun, efek toksik tidak disebabkan oleh pewarna itu sendiri, tetapi oleh degradasi pewarna terkait. Di antara molekul zat warna azo, ikatan azo merupakan ikatan yang paling tidak stabil, sehingga mudah terurai oleh azo reduktase pada mamalia (termasuk manusia). Pada mamalia, azoreduktase (dengan berbagai aktivitasnya) dapat ditemukan di berbagai organ, antara lain hati, ginjal, paru-paru, jantung, otak, limpa, dan jaringan otot. Setelah ikatan azo dipecah oleh enzim, bagian amina aromatik diserap oleh usus dan dikeluarkan melalui urin. Karena beberapa produk degradasi zat warna azo diketahui bersifat mutagenik atau karsinogenik, zat warna azo tertentu dilarang digunakan dalam

makanan (BPOM, 2012). *Methanyl yellow* adalah senyawa kimia azo aromatik amin yang dapat menyebabkan tumor dari bermacam jaringan hati, kandung kemih, saluran pencernaan, atau jaringan kulit. Pewarna *Methanyl yellow* berbahaya jika terhirup, mengenai kulit, mengenai mata dan tertelan (Bhernama *et al.*, 2017). Paparan dari *Methanyl yellow* ini dalam jangka waktu lama (kronis) berbahaya karena dapat menyebabkan kanker pada saluran kemih (Priscila *et al.*, 2019).

2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.6.1 Teori kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip absorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen tidak sama sehingga komponen kimia bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya. Kromatografi Faktor Retardasi solute (R_f) diartikan sebagai:

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

Nilai maksimum R_f adalah 1 dan ini dicapai ketika solute mempunyai perbandingan distribusi (D) dan faktor retensi (K) sama dengan 0 yang berarti solute bermigrasi dengan kecepatan yang sama dengan kecepatan fase gerak. Nilai minimum R_f adalah 0 dan ini terlihat jika solut tertahan pada posisi titik awal di permukaan fase diam (tidak bergerak sama sekali dari titik awal penotolan) (Rohman, 2009). Senyawa yang mempunyai nilai R_f lebih besar maka mempunyai kepolaran yang lebih rendah, jika nilai R_f yang dihasilkan lebih kecil maka mempunyai kepolaran yang lebih besar. Hal tersebut dikarenakan fase diam bersifat polar. Pada KLT nilai R_f yang disarankan antara 0,2-0,8. Pengurangan kepolaran pada eluen

diperlukan jika nilai R_f yang dihasilkan terlalu tinggi dan begitu juga jika nilai R_f yang dihasilkan terlalu maka diperlukan penambahan kepolaran eluen (Rubiyanto, 2017).

2.6.2. Fase Diam

Fase diam yang sering digunakan pada KLT adalah silika dan selulosa, mekanisme sorpsi-desorpsi (suatu mekanisme perpindahan solute dari fase diam ke fase gerak ataupun sebaliknya) yang paling utama pada KLT adalah partisi dan adsorpsi. Lapisan tipis yang digunakan sebagai fase diam juga dapat dibuat dari silika yang telah dimodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodeksrin yang digunakan untuk pemisahan kiral (Rohman, 2009). Jenis-jenis adsorben dan penggunaannya yaitu (Rubiyanto, 2017) :

1. Silika gel digunakan pada senyawa asam amino, alkaloid, senyawa asam lemak dan lain-lain.
2. Alumina dapat digunakan pada alkaloid, zat warna, senyawa fenol.
3. Kieselguhr dapat digunakan pada gula, oligosakarida, trigliserida dan lain-lain.
4. Selulosa digunakan pada senyawa asam amino, alkaloid dan lain-lain.

Plat KLT ada beberapa jenis menurut perdagangan yang banyak dijumpai, yaitu (Rubiyanto, 2017) :

1. Silika gel G adalah plat silika yang mengandung 13% CaSO_4 sebagai bahan pelekak.
2. Silika gel H adalah plat silika yang tidak mengandung CaSO_4 .
3. Silika gel PF adalah plat silika yang mengandung bahan fluoresensi.

2.6.3. Fase gerak

Fase gerak dengan sistem paling sederhana adalah dengan menggunakan campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat dengan mudah diatur sedemikian

rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Rohman, 2009). Pemilihan fase gerak merupakan faktor yang paling berpengaruh pada sistem KLT. Pemilihan fase gerak yang cocok dapat dilakukan melalui tahapan optimasi Fase gerak. Optimasi Fase gerak diawali dengan menentukan sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis dan jenis sorben fase diam yang digunakan. Fungsi Fase gerak dalam KLT (Wulandari, 2011) :

1. Untuk melarutkan campuran zat
2. Untuk mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga tidak memiliki R_f dalam rentang yang dipersyaratkan
3. untuk memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan.

Petunjuk dalam memilih fase gerak (Rohman, 2009) :

1. Fase gerak harus mempunyai kemurnian sangat tinggi karena KLT adalah teknik yang sensitif.
2. Daya elusi fase gerak harus di atur sedemikian rupa sehingga harga R_f solute terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
3. Untuk memisahkan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak dapat menentukan kecepatan migrasi solute yang juga dapat menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzene akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.
4. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya seperti campuran air dan methanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau ammonia kan meningkatkan elusi solut-solut yang bersifat asam dan basa.

2.7 Spektrofotometri UV-Vis

2.7.1 Teori Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer adalah alat yang didasarkan pada pengukuran serapan monokromatik lintasan larutan menggunakan monokromator sistem prisma atau kisi difraksi dan detektor fotosel. Spektrofotometer terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer dapat menghasilkan cahaya dengan spektrum panjang gelombang tertentu, dan fotometer adalah alat untuk mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diserap. (Bhernama et al., 2017).

Untuk pengukuran kuantitatif, spektrofotometri ultraviolet-tampak digunakan untuk menentukan konsentrasi larutan, di mana penyerapan cahaya larutan adalah fungsi dari konsentrasi. Dalam kondisi optimal, hubungan linier langsung dapat dibentuk antara penyerapan larutan dan konsentrasi larutan. Persamaan yang menggambarkan hubungan linier tersebut dikenal dengan hukum Lambert-Beer, yaitu (Bhernama *et al.*, 2017):

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan : A = absorban

ϵ = Serapan spesifik ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)

b = lajur larutan (cm)

c = konsentrasi (M)

2.7.2 Sistem Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer juga digunakan untuk mengukur energi secara relative jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi gelombang. Radiasi elektromagnetik UV-Vis mempunyai panjang gelombang dengan kisaran 200-800 nm. Sinar Uv mulai 200-400 nm dan sinar tampak 400-800 nm (Bhernama *et al.*, 2017).

2.7.2.1 Sumber Sinar Tampak

Sumber sinar tampak yang ideal dalam suatu instrumen spektrofotometer UV-Vis adalah mampu mencakup semua kisaran pengukuran di daerah UV-Vis, mempunyai intensitas sinar yang kuat dan stabil pada keseluruhan kisaran panjang gelombang, sehingga penguatan sinyal yang ekstensif dari detektor dapat dihindari, intensitas sumber sinar tidak boleh bervariasi secara signifikan pada panjang gelombang yang 17 berbeda, intensitas sumber sinar tidak berfluktuasi (naik turun) pada kisaran waktu yang lama dan intensitas sumber sinar tidak berfluktuasi (naik turun) pada kisaran waktu yang singkat. Fluktuasi dalam jangka waktu yang singkat ini disebut *flicker* (Gandjar & Rohman, 2018).

Sumber sinar atau lampu pada kenyataan merupakan dua lampu yang terpisah, yang secara bersama-sama mampu menjangkau keseluruhan daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Sinar tampak, digunakan lampu tungsten. Lampu ini terbuat dari logam tungsten. Lampu tungsten mengemisikan sinar pada panjang gelombang 350-2.000 nm, sehingga cocok untuk kolorimetri (Gandjar & Rohman, 2018).

2.7.2.2 Monokromator

Pada kebanyakan pengukuran kuantitatif, sinar harus bersifat monokromatik, yakni sinar dengan satu panjang gelombang tertentu. Monokromator terdiri atas elemen pendispersi, suatu celah masuk (*entrance slit*), dan celah keluar (*exit slit*) (Gandjar & Rohman, 2018).

2.7.2.3 Kuvet

Wadah sampel yang biasanya disebut dengan sela atau kuvet harus mempunyai jendela atau bagian yang transparan di daerah

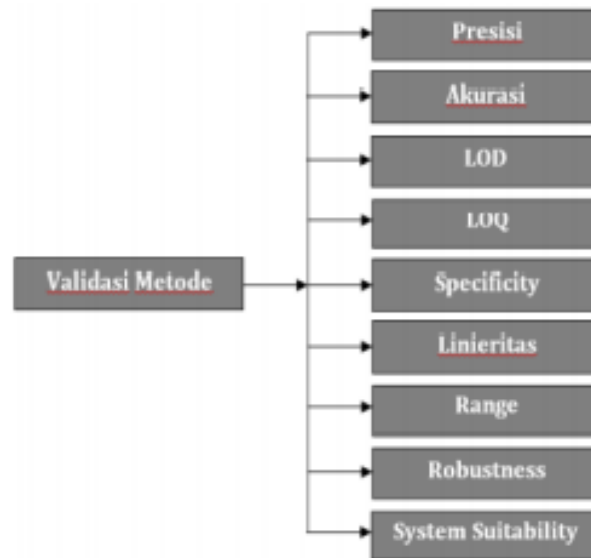
yang dituju. Mutu data spektroskopi tergantung pada bagaimana kuvet digunakan dan dipelihara. Adanya sisa-sisa sampel yang menempel pada bagian kuvet dapat mengubah karakteristik transmisi kuvet. Penggunaan kuvet harus dicuci sebelum dan setelah digunakan. Bagian kuvet yang menghadap sinar, diharapkan tidak dipegang kembali setelah 19 dibersihkan. Kuvet jangan pernah dikeringkan dengan pemanasan, karena hal ini dapat menyebabkan kerusakan fisik atau dapat mengubah ketebalan kuvet (Gandjar & Rohman, 2018).

2.7.2.4 Detektor

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

2.8 Validasi Metode

Validasi metode menjadi persyaratan peraturan dalam beberapa bidang analitik karena merupakan elemen penting dari control kualitas untuk membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran tersebut dapat dipercaya. Validasi adalah proses dimana prosedur dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode dapat menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan (Riyanto 2014). Beberapa parameter yang harus ditentukan dalam validasi metode menurut EUROCHEM pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Parameter Validasi Metode (Riyanto, 2014)

2.8.1 Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan hasil analisis yang diperoleh dari serangkaian pengukuran ulang dari ukuran yang sama. Hal ini membuktikan terjadi kesalahan acak yang terjadi dalam sebuah metode. Presisi biasanya diukur sebagai koefisien variasi atau deviasi standar relative dari hasil analisis yang diperoleh dari independent disiapkan standar control kualitas (Riyanto, 2014). Penentuan presisi dapat dibagi menjadi tiga kategori yaitu :

1. Keterulangan (*repeatability*) adalah ketepatan yang sudah ditentukan pada laboratorium yang sama oleh satu analisis serta menggunakan peralatan dan dilakukan pada hari yang sama.
2. Presisi antara (*intermediate precision*) merupakan ketepatan yang ditentukan pada laboratorium yang sama analisis, peralatan, reagen, dan kolom yang berbeda.
3. Ketertiruan (*reproducibility*) mempresentasikan presisi hasil yang dapat dilakukan pada tempat percobaan yang lain dengan tujuan memverifikasi metode akan menghasilkan hasil yang sama meskipun pada fasilitas tempat yang berbeda.

2.8.2 Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi ditetapkan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi adalah sebuah ketepatan metode analisis antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali dari suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel. Untuk melakukan pengujian suatu senyawa obat, akurasi diperbolehkan dengan cara membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (Gandjar & Rohman, 2018). Ada tiga acara yang dapat digunakan untuk menentukan akurasi suatu metode analisis yaitu :

1. Membandingkan hasil analisis dengan CRM (*certified refrence material*) dari organisasi international.
2. Uji perolehan kembali dengan memasukan analit ke dalam matriks blanko (*spaked placebo*).
3. Penambahan baku pada matriks sampel yang mengandung analit (*standard addition method*).

Perhitungan persen *recovery* dengan rumus (Harmita 2004):

$$\% Recovery = \frac{(CF - CA)}{C^*A} \times 100 \%$$

Dimana:

C_F : konsentrasi sampel yang ditambahkan dengan larutan baku

C_A : konsentrasi sampel

C^*_A : konsentrasi larutan baku

Tabel 4.5 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
$0,1 < A \leq 1$ (%)	95-107
$0,001 < A \leq 0,1$ (%)	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 : (Riyanto, 2014)

keterangan:

ppm = parts per million

ppb = parts per billion

2.8.3 Batas Deteksi dan Batas Kuantitas

Batas deteksi adalah jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi dalam sampel yang masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi adalah parameter uji batas. Batas kuantifikasi adalah parameter dalam mikroanalisis, yang didefinisikan sebagai jumlah minimum analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi standar secara teliti dan menyeluruh. Ada tiga metode untuk menentukan LOD dan LOQ, yaitu penentuan sinyal blanko dan kurva kalibrasi (Riyanto, 2014).

1. Metode rasio signal-to-noise (S/N) adalah mengukur kebisingan puncak (noise) di dekat waktu retensi analit, dan kemudian konsentrasi analit yang menghasilkan sinyal sama dengan perkiraan signal-to- nilai rasio.
2. Bila simpangan baku blanko tidak nol, gunakan penentuan blanko. Nilai sampel blanko ditambah tiga standar dekolourisasi dinyatakan sebagai LOD. Nilai blanko sampel ditambah sepuluh simpangan baku dinyatakan sebagai

3. Kurva kalibrasi, batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku Blangko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x .)

2.8.4 Linieritas

Linieritas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit yang terdapat pada sampel dengan kisaran konsentrasi tertentu. Sedangkan metode pernyataan batas terendah dan tertinggi yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linieritasnya yang dapat diterima. Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya akan diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien kolerasinya (Gandjar & Rohman, 2018). Sebagai parameter hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama pada instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (Sy). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur. Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi (Riyanto, 2014).

2.8.5 Kekuatan (*Rosbustness*)

Kekuatan (*Rosbustness*) adalah metode yang ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot sampel yang homogen dalam lab yang berbeda oleh analis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi

menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama. *Robustness* dapat dilakukan dengan melakukan variasi terhadap komposisi fase gerak (Riyanto, 2014).

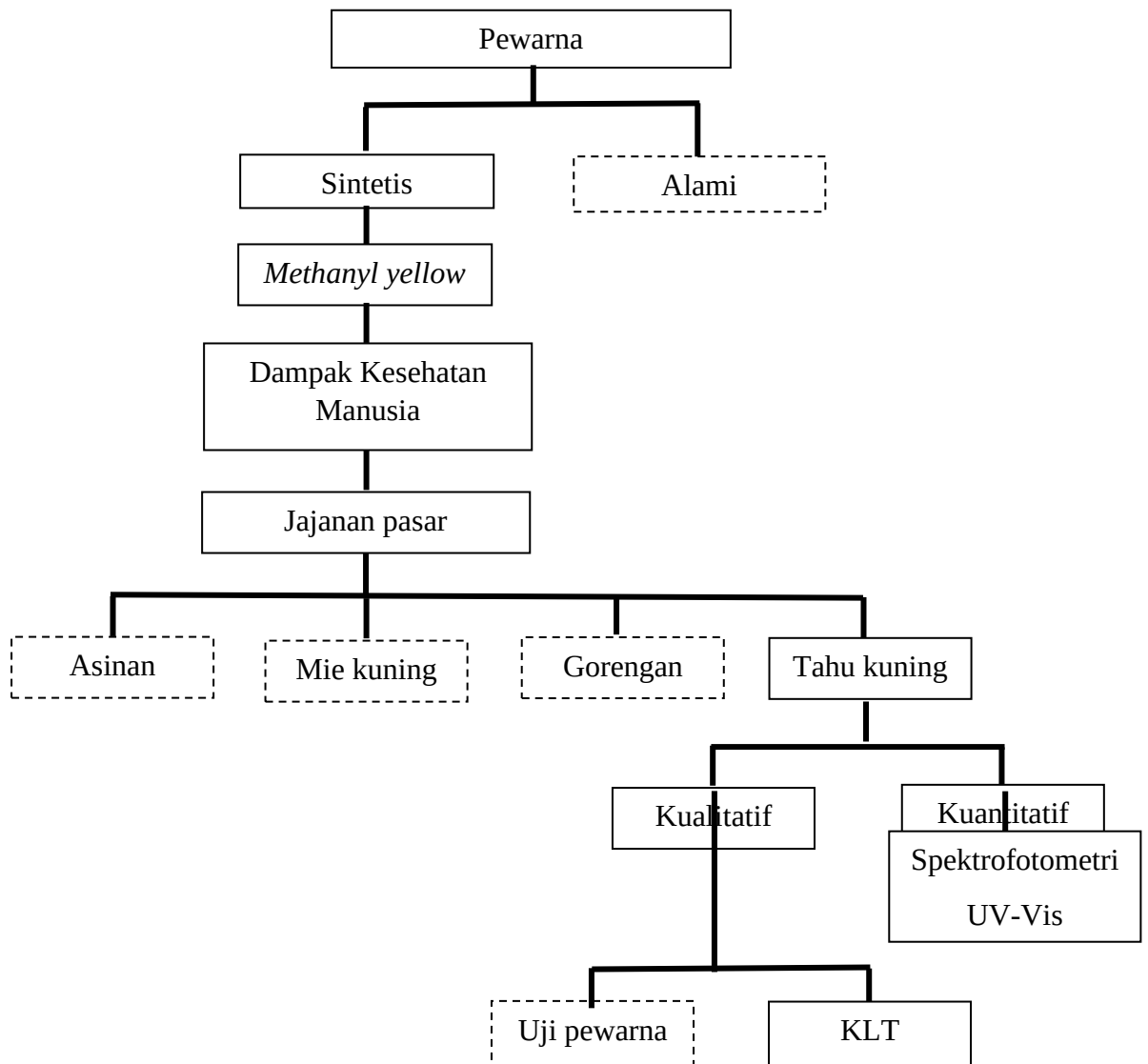
2.8.6 Spesifitas (*Specificity*)

Spesifisitas suatu metode adalah kemampuan suatu metode analisis yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Spesifisitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan, untuk metode kromatografi selektifitas dilihat dari nilai resolusi antara dua peak analit dengan peak lain yang mungkin timbul. Syarat resolusi menurut BPOM 2001 adalah $\geq 1,5$ (Mulyati, Sutanto, and Apriyani 2011).

2.8.7 Rentang (*Range*)

Rentang atau jangkauan merupakan interval di antara konsentrasi analit tertinggi dan terendah dalam 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 misalnya persen, untuk penetapan kadar zat aktif syarat yang ditentukan BPOM adalah 80%-120% (Mulyati *et al.* 2011).

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 kerangka konsep

Keterangan: Tidak diteliti
 Diteliti

