

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Minuman Serbuk Instan

Produk pangan instan didefinisikan sebagai produk dalam bentuk konsentrat atau terpekatkan dengan penghilangan air sehingga mudah ditambah air (dingin atau panas) dan mudah larut. Minuman serbuk instan merupakan salah satu produk pangan berbentuk butiran. Proses konsumsi minuman serbuk instan harus didahului dengan penyeduhan air panas atau air dingin. Keunggulan minuman instan ini lebih praktis, baik dari segi kemasan maupun penyajiannya serta dapat memperlambat umur simpan karena dalam bentuk serbuk. Produk minuman serbuk dipilih karena sesuai dengan pola hidup masyarakat yang cenderung memilih produk instan dan siap saji (Shofian dkk, 2011).

Minuman serbuk (pangan instan) dapat diproduksi dengan biaya lebih rendah daripada minuman cair, minuman instan juga didefinisikan sebagai produk yang tidak atau sedikit sekali mengandung air dengan berat dan volume yang rendah. Serbuk instan yang diperoleh harus memenuhi syarat, yaitu mudah untuk dituang tanpa tersumbat, tidak higroskopis, tidak menggumpal, mudah dibasahi, dan cepat larut. Pembuatan serbuk instan dilakukan dengan penambahan komponen lain atau bahan tambahan pangan, seperti gula. Penambahan gula ini bertujuan untuk bahan pengawet, pemanis, serta penambahan energi (Tamara, 2017)

Industri minuman lebih menyukai menggunakan pemanis sintetis karena selain harganya yang relatif murah, tingkat kemanisan pemanis sintetis jauh lebih tinggi dari pemanis alami (Cahyadi, 2008). Namun dalam penerapannya masih

banyak produsen minuman yang belum menerapkan praktek penggunaan pemanis yang tepat, misalnya dengan penambahan pemanis yang melebihi batas maksimumnya dan penggunaan pemanis buatan namun tidak dicantumkan pada label kemasan sehingga dapat menyesatkan konsumen. Hal ini disebabkan karena teknologi yang digunakan dalam proses dan kemasan lebih khas. Minuman yang aman dikonsumsi adalah minuman yang bebas dari bahan kimia (Nasution, 2018).

2.2 Bahan Tambahan Pangan

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/Menkes/PER/IX/88, Bahan Tambahan Pangan (BTP) merupakan substansi yang tidak umum dikonsumsi sebagai makanan dan tidak umum dipakai sebagai suatu kandungan tertentu dari makanan maupun minuman. Bahan tambahan pangan adalah bahan yang ditambahkan ke dalam makanan untuk mempengaruhi sifat ataupun bentuk makanan. Bahan tambahan pangan itu bisa memiliki nilai gizi, atau tidak memiliki nilai gizi. Menurut ketentuan yang ditetapkan, ada beberapa kategori BTP. Pertama, bahan tambahan pangan yang bersifat aman, dengan dosis yang tidak dibatasi, misalnya pati. Kedua, bahan tambahan pangan yang digunakan dengan dosis tertentu, dan dengan demikian dosis maksimum penggunaannya juga telah ditetapkan. Ketiga, bahan tambahan pangan yang aman dan dalam dosis yang tepat, serta telah mendapatkan izin beredar dari instansi yang berwenang (Hartono, 2014).

Produsen pangan perlu mengetahui sifat-sifat dan keamanan dalam menggunakan BTP, serta mengetahui peraturan-peraturan yang telah dikeluarkan oleh pemerintah mengenai penggunaan BTP. Secara khusus tujuan penggunaan BTP di dalam pangan adalah untuk:

- a. Mengawetkan makanan dengan mencegah pertumbuhan mikroba perusak pangan atau mencegah terjadinya reaksi kimia yang dapat menurunkan mutu pangan
- b. Membentuk makanan menjadi lebih baik, renyah dan lebih enak di mulut
- c. Memberikan warna dan aroma yang lebih menarik sehingga menambah selera
- d. Meningkatkan kualitas pangan serta menghemat biaya (Susanti, 2013).

Berdasarkan tujuan penggunaannya dalam pangan, pengelompokan bahan tambahan pangan yang diijinkan untuk digunakan dalam makanan dan minuman menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 33 (2012) adalah:

- a. Pemanis buatan merupakan bahan tambahan makanan yang dapat menyebabkan rasa manis pada makanan, yang tidak atau hampir tidak mempunyai nilai gizi.
- b. Pemutih dan pematang tepung adalah bahan tambahan makanan yang dapat mempercepat proses pemutihan dan atau pematang tepung sehingga dapat memperbaiki mutu pemanggangan.
- c. Pengemulsi, pemantap, dan pengental adalah bahan tambahan makanan yang dapat membantu terbentuknya atau memantapkan sistem dispersi yang homogen pada makanan.
- d. Pengawet adalah bahan tambahan makanan yang mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman atau peruraian lain terhadap makanan yang disebabkan oleh mikroorganisme.
- e. Pengeras adalah bahan tambahan makanan yang dapat memperkeras atau mencegah melunaknya makanan

- f. Pewarna adalah bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada makanan.
- g. Penyedap dan penguat rasa aroma adalah bahan tambahan makanan yang dapat memberikan, menambah atau mempertegas rasa dan aroma.
- h. Sekuatren adalah bahan tambahan makanan yang dapat mengikat ion logam yang ada dalam makanan.
- i. Antikempal, yaitu bahan tambahan pangan yang dapat mencegah penggumpalan makanan serbuk, tepung dan bubuk (Hartono, 2014).

2.3 Zat Pemanis

Pemanis merupakan senyawa kimia yang sering ditambahkan dan digunakan untuk keperluan produk olahan pangan, industri, serta minuman dan makanan kesehatan (Hartono, 2010)

2.3.1 Jenis-jenis pemanis:

Berdasarkan proses produksi bahan pemanis dapat dibagi menjadi 2 golongan, yaitu pemanis alami dan pemanis sintetis (buatan).

a. Pemanis alami

Pemanis alami biasanya berasal dari tanaman. Tanaman penghasil pemanis yang utama adalah tebu (*Saccharum officinarum L.*) dan bit (*Beta vulgaris L.*). Bahan pemanis yang dihasilkan oleh kedua tanaman tersebut dikenal sebagai gula alam atau sukrosa. Pemanis alami adalah pemanis yang berasal dari ekstrak suatu produk alami tanpa suatu perubahan kimia selama proses produksi atau ekstraksi. Beberapa contoh pemanis alami yang sering dikonsumsi antara lain: gula pasir (gula tebu), gula kelapa, madu dan lain-lain (Nurbayani, 2014). Zat pemanis alami

berfungsi juga sebagai sumber energi. Jika kita mengonsumsi pemanis alami secara berlebihan, kita akan mengalami resiko kegemukan (Hartono, 2014).

b. Pemanis sintetis

Pemanis sintetis (buatan) adalah zat tambahan dalam makanan yang dapat menimbulkan rasa manis pada pangan atau dapat membantu mempertajam rasa manis yang tidak atau hampir tidak mempunyai nilai gizi, sedangkan kalori yang dihasilkan jauh lebih rendah dari pada gula. Pemanis buatan tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia sehingga tidak berfungsi sebagai sumber energi. Oleh karena itu, orang-orang yang memiliki penyakit kencing manis (diabetes mellitus) biasanya mengonsumsi pemanis buatan sebagai pengganti pemanis alami.

Pemanis buatan memiliki tingkat kemanisan yang lebih tinggi dibandingkan pemanis alami. Penggunaan pemanis sintetis perlu diwaspadai karena dalam takaran yang berlebihan dapat menimbulkan efek samping yang merugikan kesehatan manusia. Beberapa pemanis sintetis yang telah dikenal dan banyak digunakan adalah natrium sakarin, natrium siklamat dan aspartam (Nasution, 2018).

2.3.2 Tujuan penggunaan pemanis sintetis

Pemanis ditambahkan kedalam bahan pangan mempunyai beberapa tujuan diantaranya sebagai berikut:

- a. Sebagai pangan bagi penderita diabetes mellitus karena tidak menimbulkan kelebihan gula darah. Pada penderita diabetes mellitus disarankan menggunakan pemanis sintetis untuk menghindari bahaya gula.
- b. Memenuhi kebutuhan kalori rendah untuk penderita kegemukan. Kegemukan merupakan salah satu faktor penyakit jantung yang merupakan penyebab utama

kematian. Untuk orang yang kurang aktif secara fisik disarankan untuk mengurangi masukan kalori per harinya. Pemanis sintetis merupakan salah satu bahan pangan yang mengurangi masukan kalori.

c. Meningkatkan cita rasa dan aroma, memperbaiki sifat-sifat fisik, sebagai pengawet, memperbaiki sifat-sifat kimia sekaligus merupakan sumber kalori bagi tubuh, mengembangkan jenis minuman dan makanan dengan jumlah kalori terkontrol, dan sebagai bahan substitusi pemanis utama (Hartono, 2010)

d. Menghindari kerusakan gigi. Pada pangan seperti permen biasanya sering ditambahkan pemanis sintetis karena bahan permen ini mempunyai rasa manis yang lebih tinggi dari pada gula, pemakaian dalam jumlah sedikit saja sudah menimbulkan rasa manis yang diperlukan sehingga tidak merusak gigi.

e. Pada industri pangan, minuman termasuk industri rokok, pemanis sintetis dipergunakan dengan tujuan untuk menekan biaya produksi, karena pemanis sintetis ini selain mempunyai tingkat rasa manis yang lebih tinggi juga harganya lebih murah dibandingkan dengan gula yang diproduksi di alam (Hartono, 2014).

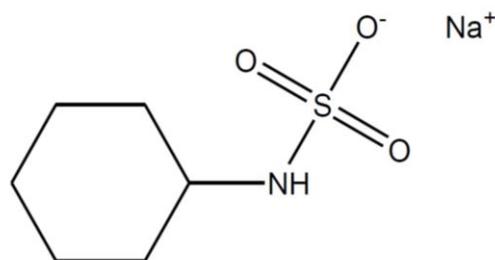
2.4 Natrium siklamat

Perkembangan industri pangan makanan dan minuman akan kebutuhan pemanis dari tahun ketahun semakin meningkat. Industri pangan dan minuman lebih menyukai menggunakan pemanis sintetis karena selain harganya relatif murah, tingkat kemanisan pemanis sintetis jauh lebih tinggi dari pemanis alami. Hal tersebut mengakibatkan terus meningkatnya penggunaan pemanis sintetis terutama siklamat.

2.4.1 Pengertian dan karakteristik siklamat

Natrium siklamat pertama kali ditemukan oleh seorang ilmuwan dari University of Illinois pada tahun 1937, penemuan tersebut sebenarnya merupakan suatu ketidaksengajaan karena salah meletakkan rokok pada tumpukan kristal. Setelah rokok dihisapnya kembali, ada sesuatu yang terasa sangat manis pada bibirnya hal ini ternyata disebabkan oleh derivat (turunan) dari *cyclohexylsulfamic acid* yang terasa sangat manis dan lezat. Dari kejadian tersebut lahirlah senyawa baru pemanis sintetis natrium siklamat yang mempunyai intensitas kemanisan 30 kali dari tingkat kemanisan gula tebu murni (Nasution, 2018).

Natrium siklamat berbentuk kristal putih, tidak berbau, tidak berwarna, dan mudah larut dalam air dan etanol, serta mempunyai rasa manis. Kombinasi penggunaannya dengan natrium sakarin atau asesulfam-K bersifat sinergis, dan kompatibel dengan pencita rasa dan bahan pengawet. Natrium siklamat berfungsi sebagai penegas cita rasa (flavor enhancer) terutama cita rasa buah. Siklamat biasanya tersedia dalam bentuk garam natrium dari asam siklamat dengan rumus molekul $C_6H_{11}NHSO_3H$ (Cahyadi, 2008). Struktur siklamat dalam bentuk Natrium siklamat dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur natrium siklamat (Lestari, 2011).

Adapun karakteristik dari siklamat yaitu:

1. Siklamat yang berbentuk garam. Natrium siklamat merupakan serbuk kristal putih dan tidak berbau.
2. Garam siklamat (Natrium siklamat) akan mengering pada suhu 105°C.
3. Natrium siklamat tidak larut dalam alkohol, benzena, kloroform maupun ether tetapi larut dalam air dan bersifat netral (Cahyadi, 2008).

2.4.2 Pemenuhan batas maksimum penggunaan siklamat

Peraturan yang terbaru telah ditetapkan yaitu Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI Nomor 4 Tahun 2014 tentang maksimum penggunaan bahan tambahan pangan pemanis (BPOM 2014). Natrium siklamat memiliki nilai kalori 0 kkal/g dan ADI (*Acceptable Daily Intake*) 11 mg/kg berat badan. JECFA menyatakan siklamat merupakan bahan tambahan pangan yang aman untuk dikonsumsi manusia dengan ADI sebanyak 3 g/kg makanan dan minuman (Nasution, 2018).

Adapun batas maksimum penggunaan siklamat menurut Permenkes No 722/Menkes/Per/IX/1988 Tentang Bahan Tambahan Makanan dan Minuman karakteristik dari siklamat dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Batas Maksimum Penggunaan Siklamat

No.	Jenis/Bahan Makanan	Batas Maksimum Penggunaan Siklamat
1	Permen Karet	500 mg/kg dihitung sebagai asam siklamat
2	Permen	1 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
3	Saus	3 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
4	Es krim dan sejenisnya	2 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
5	Es lilin	3 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
6	Jely	2 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
7	Minuman Ringan	3 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
8	Minuman Yoghurt	3 g/kg dihitung sebagai asam siklamat
9	Minuman Fermentasi	500 mg/kg dihitung sebagai asam siklamat

Sumber: (Nasution, 2018)

Walaupun penggunaannya diperbolehkan dan telah dibatasi, pemakaian siklamat dilaporkan sering disalahgunakan dan penggunaannya melebihi batas yang diizinkan. Penggunaan pemanis buatan siklamat hingga saat ini masih banyak menimbulkan kontroversi karena aspek keamanan jangka panjangnya yang berpotensi karsinogenik jika terkonversi menjadi cyclohexylamine di dalam saluran pencernaan (Nasution, 2018).

2.4.3 Efek penggunaan siklamat

Penggunaan pemanis buatan seperti siklamat yang melampaui batas maksimum penggunaan dapat menimbulkan efek negatif bagi kesehatan manusia. Efek negatif tidak langsung terjadi pada manusia tetapi membutuhkan waktu lama karena terus berakumulasi di dalam tubuh manusia. Efek penggunaan pemanis buatan bagi kesehatan dalam kadar yang melebihi batas yaitu siklamat memunculkan banyak gangguan bagi kesehatan, di antaranya tremor (penyakit syaraf), migrain dan sakit kepala, kehilangan daya ingat, bingung, insomnia,

iritasi, asma, hipertensi, diare, sakit perut, alergi, gangguan seksual, kebutakan, dan kanker otak.

Hasil metabolisme siklamat yaitu sikloheksilamin yang bersifat karsinogenik. Oleh karena itu, ekskresi siklamat dalam urine dapat merangsang tumor dan mampu menyebabkan atrofi yaitu pengecilan testikular dan kerusakan kromosom. Pengkonsumsian siklamat dalam dosis yang lebih akan mengakibatkan kanker kandung kemih. Selain itu akan menyebabkan tumor paru, hati, dan limfa. Senyawa sikloheksilamin yang merupakan senyawa hasil metabolisme siklamat dalam tubuh tidak bisa dicerna oleh tubuh. Senyawa ini dalam tubuh juga akan mengendap dan memicu berbagai kerusakan dalam tubuh.

Masih banyak pemanis sintetis yang beredar dan digunakan sebagai pemanis dalam berbagai produk makanan dan minuman termasuk yang digunakan dalam berbagai produk minuman berenergi, merupakan contoh kasus penggunaan bahan kimia yang belum diawasi secara penuh (Hartono, 2014). Melihat begitu berbahayanya efek siklamat, pengkonsumsian makanan dan minuman harus dicermati. Terlebih pada minuman ringan seperti minuman serbuk instan (Lestari, 2011).

2.5 Metode Analisis

Secara umum analisis bahan pemanis sintetis jenis siklamat yang terdapat dalam minuman secara kuantitatif dapat dilakukan dengan:

2.5.1 Titrasi Alkalimetri

Titrasi asam basa melibatkan reaksi antara asam dengan basa, sehingga akan terjadi perubahan pH larutan yang dititrasi. Tujuan titrasi ini adalah untuk mencapai keseimbangan antara larutan standar dengan larutan yang dititrasi atau

mencapai titik ekuivalen. Titrasi asam-basa dibagi menjadi alkalimetri dan asidimetri. Alkalimetri merupakan titrasi yang menggunakan basa sebagai larutan standar, sedangkan asidimetri menggunakan asam sebagai larutan standar. Proses asidimetri dan alkalimetri merupakan salah satu proses netralisasi.

Siklamat merupakan senyawa yang bersifat asam setelah ditambahkan dengan HCl, sehingga kadar siklamat dapat ditentukan dengan alkalimetri. Reaksi antara asam dan basa bisa berupa asam kuat atau lemah dengan basa kuat atau lemah. Setiap reaksi tersebut memiliki pH titik ekuivalen, dari pH titik ekuivalen tersebut dapat dipilih indikator untuk titrasi asam-basa yang mempunyai kisaran pH tertentu.

Kelebihan penetapan kadar secara titrasi yaitu alat yang digunakan sederhana, cepat, serta tidak memerlukan pekerjaan yang menjemukan seperti pengeringan dan penimbangan berulang-ulang serta teliti sampai 1 bagian dalam 1000. Adapun hal-hal yang harus diperhatikan dalam analisis secara titrasi yaitu:

- a. Alat pengukur volume seperti buret, pipet volume, dan labu takar yang ditera secara teliti (telah dikalibrasi)
- b. Senyawa yang digunakan sebagai larutan baku atau untuk pembakuan harus senyawa dengan kemurnian yang tinggi.
- c. Indikator yang digunakan untuk analisis (Gandjar & Rohman, 2012).

2.5.2 Titrasi Nitrimetri

Titrasi nitrimetri sangat sederhana dan sangat berguna untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa antibiotik sulfonamide dan juga senyawa-senyawa anestetika lokal golongan asam amino benzoat. Metode titrasi nitrimetri disebut juga dengan titrasi diazotasi yaitu metode penetapan kadar secara kuantitatif

dengan menggunakan larutan baku natrium nitrit. Metode ini didasarkan pada reaksi diazotasi yaitu reaksi antara amina aromatik primer dengan asam nitrit dalam suasana asam membentuk garam diazonium (Gandjar & Rohman, 2012).

Dalam nitrimetri, berat ekuivalen suatu senyawa sama dengan berat molekulnya karena 1 mol senyawa bereaksi dengan 1 mol asam nitrit dan menghasilkan 1 mol garam diazonium. Dengan alasan ini pula untuk nitrimetri, konsentrasi larutan baku sering dinyatakan dengan molaritas (M) karena molaritasnya sama dengan normalitasnya. Pada titrasi diazotasi, penentuan titik akhir titrasi dapat menggunakan indikator luar, indikator dalam, dan secara potensiometri (Gandjar & Rohman, 2012).

a. Indikator luar

Indikator luar yang digunakan adalah pasta kanji iodida atau dapat pula menggunakan kertas kanji-iodida. Ketika larutan digoreskan pada kertas dan pasta, adanya kelebihan asam nitrit akan mengoksidasi iodida menjadi iodium dan dengan adanya kanji atau amilum akan menghasilkan warna biru segera. Indikator kanji-iodida ini peka terhadap kelebihan 0,05-0,10 mL natrium nitrit dalam 200 mL larutan (Gandjar & Rohman, 2012).

Titik akhir titrasi tercapai apabila pada penggoresan larutan yang dititrasi pada pasta kanji-iodida atau kertas kanji-iodida akan terbentuk warna biru segera sebab warna biru juga terbentuk beberapa saat setelah dibiarkan di udara. Hal ini disebabkan karena oksidasi iodida oleh udara (O_2). Untuk meyakinkan apakah benar-benar sudah terjadi titik akhir titrasi, maka pengujian seperti di atas dilakukan lagi setelah dua menit (Gandjar & Rohman, 2012).

b. Indikator dalam

Indikator dalam terdiri atas campuran tropaeolin OO dan metilen biru. Tropeolin OO merupakan indicator asam-basa yang berwarna merah dalam suasana asam dan berwarna kuning bila dioksidasi oleh adanya kelebihan asam nitrit, sedangkan metilen biru sebagai pengkontras warna sehingga pada titik akhir titrasi akan terjadi perubahan dari ungu menjadi biru sampai hijau tergantung senyawa yang dititrasi. Pemakaian kedua indikator ini ternyata memiliki kekurangan. Pada indikator luar harus diketahui dulu perkiraan jumlah titran yang diperlukan, sebab kalau tidak tahu perkiraan jumlah titran yang dibutuhkan, maka akan sering melakukan pengujian apakah sudah tercapai titik akhir titrasi atau belum. Disamping itu, jika sering melakukan pengujian, dikhawatirkan akan banyak larutan yang dititrasi (sampel) yang hilang pada saat pengujian titik akhir. Sementara itu pada pemakaian indikator dalam walaupun pelaksanaannya mudah tetapi seringkali untuk senyawa yang berbeda akan memberikan warna yang berbeda (Gandjar & Rohman, 2012).

Hal-hal yang perlu diperhatikan pada reaksi diazotasi:

a. Suhu

Pada saat melakukan titrasi, suhu harus dijaga antara 5-15°C karena asam nitrit yang terbentuk dari reaksi natrium nitrit dengan asam tidak stabil dan mudah terurai, dan garam diazonium yang terbentuk pada hasil titrasi juga tidak stabil.

b. Kecepatan reaksi

Reaksi titrasi amin aromatis pada reaksi diazotasi berjalan agak lambat, titrasi sebaiknya dilakukan secara perlahan-lahan, dan reaksi diazotasi dapat dikatalisa dengan penambahan natrium dan kalium bromida sebagai katalisator.

Frekuensi tetesan pada awal titrasi kira-kira 1 mL/menit, lalu menjelang titik akhir titrasi menjadi 2 tetes/menit.

c. Keasaman

Titrasi ini berlangsung pada pH \pm untuk mengubah NaNO_2 menjadi HNO_2 dan pembentukan garam diazonium. Indikator universal dapat digunakan untuk mengecek pH titrat sebelum dimulai titrasi (Oktaviasari, 2014).

2.5.3 Spektrofotometri UV-Vis

a. Metode Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spectrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Kelebihan spektrofotometer dengan fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih dideteksi dan cara ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating atau celah optis. Pada fotometer filter dari berbagai warna yang mempunyai spesifikasi melewati trayek pada panjang gelombang tertentu (Gandjar & Rohman, 2012).

Pada spektrofotometri ini yang digunakan sebagai sumber sinar atau energi adalah cahaya tampak (*visible*). Cahaya *visible* termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 sampai 750 nm. Sehingga semua sinar yang dapat dilihat oleh mata, maka sinar tersebut termasuk ke dalam sinar tampak (*visible*). Alat spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Alat Spektrofotometer *Ultra Violet-Visible* (Sawyer, 2019).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan. Dalam hukum Lambert-Beer tersebut terdapat beberapa pembatasan yaitu:

1. Sinar yang digunakan dianggap monokromatis
2. Penyerapan terjadi dalam suatu volume yang mempunyai penampang luas yang sama
3. Senyawa yang menyerap dalam larutan tersebut tidak tergantung terhadap yang lain dalam larutan tersebut
4. Tidak terjadi peristiwa fluoresensi atau fosforisensi
5. Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan

Analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis dapat digolongkan atas tiga macam pelaksanaan pekerjaan, yaitu: (1) analisis zat tunggal atau analisis satu komponen; (2) analisis kuantitatif campuran dua macam zat atau analisis dua komponen; dan (3) analisis kuantitatif campuran tiga macam zat atau lebih (analisis multi komponen) (Gandjar & Rohman, 2012).

b. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Penyerapan UV-Vis

Menurut Gandjar & Rohman (2012), terdapat berbagai faktor yang mengatur pengukuran serapan (absorbansi) UV-Vis yakni: (1) adanya gugus-gugus penyerap (kromofor); (2) pengaruh pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel; (3) pengaruh suhu; (4) ion-ion anorganik; serta (5) pengaruh pH.

c. Hal-Hal Yang Harus Diperhatikan

Terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri UV-Vis terutama untuk senyawa yang semula tidak berwarna dan akan dianalisis dengan spektrofotometri visible karena senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa yang berwarna. Berikut merupakan tahapan-tahapan yang harus diperhatikan, yaitu:

1. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu:

- a. Reaksinya selektif dan sensitif
- b. Reaksinya cepat, kuantitatif, dan reproduibel
- c. Hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama

Keselektifan dapat ditingkatkan dengan mengatur pH, pemakaian *masking agent*, atau penggunaan teknik ekstraksi.

2. Waktu operasional (*operating time*)

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan. Pada saat awal reaksi, absorbansi senyawa yang berwarna ini meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama waktu pengukuran, maka ada kemungkinan senyawa yang berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warnanya turun akibatnya absorbansinya juga turun, sehingga untuk pengukuran senyawa berwarna (hasil suatu reaksi harus dilakukan pada saat waktu operasional).

3. Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu. Terdapat beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal, yaitu:

- a. Pada panjang gelombang maksimal, kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar.
- b. Disekitar panjang gelombang maksimal, bentuk kurva absorbansi datar, dan pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi.

- c. Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali, ketika digunakan panjang gelombang maksimal.

Kadang dijumpai keadaan yang mana pemakaian panjang gelombang maksimal kurang baik. Hal ini karena semisalnya, selain zat yang akan dianalisis, juga terdapat zat lain yang mempunyai absorbansi pada panjang gelombang tersebut. Ada beberapa variabel yang mempengaruhi absorbansi yaitu: jenis pelarut, pH larutan, suhu, konsentrasi tinggi dan zat-zat yang mengganggu.

4. Pembuatan kurva baku

Dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). bila hukum Lambert-Beer terpenuhi, maka kurva baku akan berupa garis lurus. Kemiringan atau *slope* adalah a (absorptivitas) atau (absorptivitas molar). Kurva baku sebaiknya sering diperiksa ulang. Penyimpangan dari garis lurus biasanya dapat disebabkan oleh: kekuatan ion yang tinggi, perubahan suhu, reaksi lain yang terjadi.

5. Pembacaan absorbansi sampel atau cuplikan

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmitans. Anjuran ini berdasarkan anggapan bahwa kesalahan dalam pembacaan T adalah 0,005 atau 0,5% (kesalahan fotometrik).

2.6 Parameter Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis yaitu: (Harmita, 2004)

2.6.1 Akurasi

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur.

Cara penentuan kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan).

Dalam kedua metode tersebut, persen peroleh kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Harmita, 2004).

2.6.2 Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan hasil analisis diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama. Hal ini mencerminkan kesalahan acak yang terjadi dalam sebuah metode. Kondisi pengulangan terjadi ketika analisis yang sama analisis sampel pada yang sama, hari dan instrumen yang sama (misalnya kromatografi gas) atau bahan (uji misalnya tempat reagen) di laboratorium yang sama. Setiap variasi dari kondisi ini (misalnya berbeda analisis, hari yang berbeda, instrumen yang berbeda, laboratorium yang berbeda) merupakan reproduksibilitas.

Presisi biasanya diukur sebagai koefisien variasi atau deviasi standar relatif dari hasil analisis yang 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. Presisi diterima pada konsentrasi yang lebih rendah adalah 20% (Riyanto, 2014).

2.6.3 Linearitas

Linearitas dan jangkauan kerja, metode yang digambarkan sebagai linear ketika ada berbanding lurus hubungan antara respon metode dan konsentrasi analit dalam matriks selama rentang konsentrasi analit (jangkauan kerja). Jangkauan kerja yang telah ditetapkan oleh tujuan metode dan mungkin mencerminkan hanya bagian dari rentang linier penuh. Sebuah koefisien korelasi yang tinggi (R^2) dari 0,99 sering digunakan sebagai kriteria linearitas. Namun, ini tidak cukup untuk membuktikan bahwa hubungan linear ada, dan metode dengan koefisien

determinasi kurang dari 0.99 mungkin masih cocok untuk tujuan. Parameter ini tidak berlaku untuk metode kualitatif kecuali ada ambang batas konsentrasi untuk pelaporan hasil (Riyanto, 2014).

2.6.4 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Cara penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula. 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 blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) (Harmita, 2004).