

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bahan Tambahan Pangan

Bahan Tambahan Pangan disebut Bahan Tambahan Makanan adalah bahan yang ditambahkan ke dalam makanan untuk mempengaruhi sifat ataupun bentuk makanan. Penambahan bahan tambahan pada makanan memiliki dosis tertentu karena bahan tambahan makanan dapat menyebabkan bahaya kesehatan (Yuliarti, 2007).

Bahan tambahan pangan (aditif) ditujukan untuk beberapa fungsi seperti, bahan pengawet yang digunakan untuk meningkatkan waktu penyimpanan produk makanan dan antioksidan yang digunakan untuk melindungi produk makanan terhadap oksidasi yang dapat menyebabkan makanan menjadi tengik. Menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 033 Tahun 2012 tentang bahan tambahan pangan disebutkan bahwa Bahan tambahan makanan yang selanjutnya disingkat BTP adalah bahan yang ditambahkan kedalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan. Termasuk bahan tambahan makanan adalah pengawet, pewarna, penyedap rasa dan aroma, pemantap, antioksidan, pengemulsi, anti gumpal, pemucat dan pengental (Rohman, 2011).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 Tahun 2012 Bagian ketiga Pengaturan Bahan Tambahan Pangan Pasal 73 disebutkan bahwa Bahan tambahan pangan merupakan bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk mempengaruhi sifat dan/atau bentuk pangan. Adapun disebutkan pada BAB II penggolongan bahan tambahan pangan (BTP) Pasal 3 adalah BTP yang digunakan dalam pangan terdiri atas beberapa golongan. Antara

lain antikempal (*anticaking agent*), antioksidan (*anticaking agent*), pengawet (*preservative*) dan pengental (*thickener*).

2.2. Bahan Pengawet

2.2.1. Pengertian Bahan Pengawet

Bahan pengawet umumnya digunakan untuk mengawetkan pangan yang mempunyai sifat mudah rusak. Bahan ini dapat menghambat atau memperlambat proses fermentasi, pengasaman, atau penguraian yang disebabkan oleh mikroba. Namun, banyak Produsen menggunakan bahan pengawet pada pangan yang relatif dengan tujuan untuk memperpanjang masa penyimpanan atau memperbaiki tekstur (Cahyadi, 2008).

Penggunaan pengawet dalam pangan harus tepat, baik jenis maupun dosisnya. Suatu bahan pengawet mungkin efektif untuk mengawetkan pangan tertentu, tetapi tidak efektif untuk mengawetkan pangan lainnya karena pangan mempunyai sifat yang berbeda-beda sehingga mikroba perusak yang akan dihambat pertumbuhannya juga berbeda. Pada saat ini, masih banyak ditemukan penggunaan bahan-bahan pengawet yang dilarang untuk digunakan dalam pangan dan berbahaya bagi kesehatan.

Pemakaian bahan pengawet dari satu sisi menguntungkan karena dengan bahan pengawet, bahan pangan dapat dibebaskan dari kehidupan mikroba, baik yang bersifat patogen yang dapat menyebabkan karacunan atau gangguan kesehatan lainnya maupun mikrobial yang nonpatogen yang dapat menyebabkan kerusakan bahan pangan, misalnya pembusukan. Namun dari sisi lain, bahan pengawet pada dasarnya adalah senyawa kimia yang merupakan bahan asing yang

masuk bersama bahan pangan yang dikonsumsi. Apabila pemakaian bahan pangan dan dosisnya tidak diatur dan diawasi, kemungkinan besar akan menimbulkan kerugian bagi pemakainya, baik ber sifat langsung misalnya keracunan maupun yang bersifat tidak langsung atau kumulatif misalnya apabila bahan pengawet yang digunakan bersifat karsinogenik.

Pengawet yang banyak dijual di pasaran dan digunakan untuk mengawetkan berbagai bahan pangan adalah asam atau garam benzoat, yang umumnya terdapat dalam bentuk natrium benzoate atau kalium benzoat yang bersifat mudah larut. Asam atau garam benzoat sering digunakan untuk mengawetkan berbagai pangan dan minuman, seperti sari buah, minuman ringan, saus tomat, saus sambal, selai, jeli, manisan, kecap, dan lain-lain.

2.2.2. Tujuan Penggunaan Bahan Pengawet

Bahan pengawet merupakan salah satu bahan tambahan pangan yang paling tua penggunaannya. Secara ideal, bahan pengawet akan menghambat atau membunuh mikroba yang penting dan kemudian memecah senyawa berbahaya menjadi tidak berbahaya dan tidak toksik. Bahan pengawet akan memengaruhi dan menyeleksi jenis mikroba yang dapat hidup pada kondisi tersebut. Derajat penghambatan terhadap kerusakan bahan pangan oleh mikroba bervariasi dengan jenis bahan pengawet yang digunakan dan besarnya penghambatan ditentukan oleh konsentrasi bahan pengawet yang digunakan.

Secara umum penambahan bahan pengawet pada pangan bertujuan sebagai berikut.

1. Menghambat pertumbuhan mikroba pembusuk pada pangan, baik yang bersifat patogen maupun yang tidak patogen.
2. Memperpanjang umur simpan pangan
3. Tidak menurunkan kualitas gizi, warna, cita rasa, dan bau bahan pangan yang diawetkan.
4. Tidak untuk menyembunyikan keadaan pangan yang berkualitas rendah.
5. Tidak digunakan untuk menyembunyikan penggunaan bahan yang salah atau yang tidak memenuhi persyaratan.
6. Tidak digunakan untuk menyembunyikan kerusakan bahan pangan.

Keamanan senyawa-senyawa kimia dalam bahan pangan sangat perlu diperhatikan, baik senyawa kimia yang ditambahkan dari luar bahan pangan maupun senyawa kimia yang terdapat secara alami dalam bahan pangan itu sendiri (Cahyadi, 2008).

2.3. Pengaruh Penggunaan Zat Tambahan Kimia Terhadap Nilai Gizi Pangan

Bahan tambahan pangan (BTP) adalah zat yang disengaja ditambahkan ke dalam pangan untuk memberi sifat atau karakter yang dikehendaki seperti warna, aroma, tekstur, stabilitas, atau resistensi terhadap kerusakan. BTP diizinkan untuk digunakan dalam pangan hanya dalam batas *wide margin safety* atau daerah antara konsentrasi normal dan konsentrasi bahaya terjadi. Misalnya *margin of safety* garam = 1/5, artinya 5 kali konsentrasi normal tersebut akan berbahaya.

Zat tambahan kimia pada pangan adalah zat yang tidak termasuk bahan dasar yang ditambahkan ke dalam bahan pangan, baik selama produktif, pengolahan maupun pengemasan. Penambahan zat tambahan kimia digunakan

untuk beberapa tujuan seperti menginaktifkan mikroorganisme patogen, mengurangi kerusakan fisik dan kimia serta untuk memudahkan pengolahan. Zat tambahan yang diberikan pada saat pengolahan dapat berfungsi sebagai anti kerak, pengawet, pengemulsi dan pematap, memperbaiki cita rasa, tekstur atau warna. (Tejasari, 2005)

2.4. Efek Bahan Tambahan Pangan Terhadap Kesehatan

Tujuan utama dari pengujian terhadap bahan tambahan makanan adalah untuk menentukan potensi karsinogenik suatu bahan atau senyawa. Konsentrasi bahan pengawet yang diizinkan oleh peraturan bahan pangan sifatnya adalah penghambatan bukan mematikan organisme-organisme pencemar. Oleh karena itu, sangat penting bahwa populasi mikroorganisme dari bahan tambahan pangan yang akan diawetkan harus dipertahankan minimum dengan cara penanganan dan pengolahan secara higienis.

2.4.1. Bahan Pengawet Organik

Zat pengawet organik lebih banyak dipakai daripada yang anorganik karena bahan ini lebih mudah dibuat. Bahan organik dibuat baik dalam bentuk asam maupun bentuk garamnya. Zat kimia yang sering dipakai untuk bahan pengawet adalah asam sorbat, asam propionat, asam benzoat, asam asetat dan epoksida.

Pada dasarnya bahan pengawet adalah senyawa kimia yang merupakan bahan asing yang masuk bersama bahan pangan yang dikonsumsi. Apabila pemakaian jenis pengawet dan dosisnya tidak diatur maka menimbulkan kerugian misalnya, keracunan atau terakumulasinya pengawet dalam organ tubuh dan bersifat karsinogenik.

Salah satu contoh bahan pengawet organik yaitu metil paraben (metil-p-hidroksi benzoat), memberikan gangguan berupa reaksi yang spesifik. Metil-p-hidroksi-benzoat, pemakaiannya memberikan efek terhadap kesehatan dengan timbulnya reaksi alergi pada mulut dan kulit.

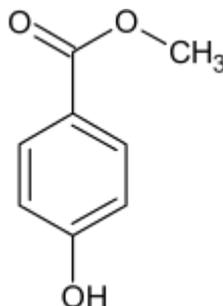
2.4.2. Bahan Pengawet Anorganik

Zat pengawet anorganik yang masih sering dipakai adalah sulfat, nitrat dan nitrit. Sulfat digunakan dalam bentuk gas SO_2 , garam Na atau K sulfat, bisulfat dan metabisulfat. Sebagai contoh, belerang dioksida merupakan bahan pengawet yang sangat luas pemakaiannya, namun pada dosis tertentu dapat menimbulkan gangguan pada kesehatan, tetapi belum ada pengganti belerang dioksida yang sama efektifnya atau cukup memuaskan. Keracunan adanya belerang dioksida dapat menyebabkan luka usus.

2.5. Metil Paraben (Nipagin)

Metil paraben (nipagin) termasuk dalam bahan tambahan pangan (BTP) khususnya anti jamur yang digunakan secara luas sebagai pengawet untuk makanan, obat-obatan dan kosmetika. Bahan pengawet umumnya digunakan untuk mengawetkan pangan yang mempunyai sifat mudah rusak. Senyawa paraben merupakan pengawet yang populer ditambahkan pada sediaan bentuk krim, pasta, produk kecantikan, perekat, makanan lemak dan minyak, karena mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, tidak berwarna, tidak berbau, stabil dan murah. Salah satu senyawa paraben adalah metil paraben (Nipagin) (Cashman, 2005).

Metil Paraben (Nipagin) mempunyai rumus empiris $C_8H_8O_3$ dan berat molekul 152,51 dan struktur kimia metil paraben dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Struktur kimia metil paraben (Effendi, 2015).

Nipagin berbentuk hablur kecil, tidak berwarna atau serbuk hablur, putih, tidak berbau atau berbau khas lemah, mempunyai sedikit rasa terbakar. Kelarutan sukar larut dalam air, benzene dan dalam karbon tetraklorida tetapi mudah larut dalam etanol dan eter. Batas penggunaan metil paraben (nipagin) dalam selai 1000 ml/kg, Penggunaan jangka pendek nipagin tidak akan beraksi apapun namun kalau sudah terakumulasi dalam tubuh akan menyebabkan beberapa penyakit yang berbahaya (Suarti dkk, 2014). Beberapa efek negatif kesehatan dari zat pengawet metil paraben yang digunakan secara berlebihan yaitu penyakit kanker payudara, infertilitas (ketidaksuburan) pada pria, alergi, gangguan pencernaan dan gangguan pernafasan (Wahyuningsih M, 2010).

2.6. Selai

Selai adalah salah satu bahan makanan yang terbuat dari buah-buahan yang dihaluskan dan dimasak dengan gula hingga kental dan padat. Rasanya menyerupai buah aslinya dengan aroma dan cita rasa yang tidak jauh berbeda. Selai buah yang sudah siap konsumsi memang banyak dipasarkan. Akan tetapi,

tujuan utama memilih selai buah adalah agar tetap bisa mempertahankan khasiat kesehatan dari kandungan buah tersebut (Khairunnisa dan Nindyas, 2011).

Buah-buahan selain dapat dikonsumsi dalam keadaan segar, juga dapat diolah menjadi berbagai produk olahan yang dapat disimpan dalam waktu yang relatif lama seperti selai. Selai merupakan produk makanan dengan konsistensi gel atau semi padat yang dibuat dari bubur buah. Konsistensi gel atau semi padat pada selai diperoleh dari senyawa pektin yang berasal dari buah atau pektin yang ditambahkan dari luar, gula sukrosa dan asam. Interaksi ini terjadi pada suhu tinggi dan bersifat menetap setelah suhu diturunkan. Kekerasan gel tergantung pada konsentrasi gula, pektin dan asam pada bubur buah (Mailoa, 2012).



Gambar 2.2 Selai

2.6.1. Definisi Proses Pembuatan Selai

Selai dibuat dengan menggunakan bahan atau sari buah yang dihancurkan kemudian ditambah pemanis dan dimasak sampai mengental. Penambahan pemanis sangat penting untuk memperoleh tekstur, penampakan dan rasa yang baik (Syahrumsyah, 2010). Selai merupakan jenis bahan makanan yang diolah dari sari buah atau buah-buahan yang sudah dihancurkan, ditambah gula dan dimasak sampai mengental. Selai tidak dikonsumsi langsung, melainkan

digunakan sebagai bahan pengisi pada roti manis, kue nastar atau sebagai pemanis pada minuman seperti yogurt dan es krim (Lies, 2001).

Menurut Supartha (2012), selai atau sering disebut juga “Jam” merupakan makanan semi padat yang berbahan dasar bubur buah dicampur dengan 35 – 45 bagian gula dan dipanaskan sampai kandungan gulanya berkisar antara 50 - 65%. Pada dasarnya semua jenis buah-buahan yang matang dapat diolah menjadi selai. Namun secara komersial perlu diperhatikan selera konsumen sebelum mengolah buah menjadi selai untuk tujuan komersial, karena tidak semua buah yang setelah diolah mempunyai rasa yang disukai. Beberapa tahun belakangan banyak kreasi yang dilakukan sebagai daya tarik produk sehingga ada berbagai jenis produk selai di pasaran. Berbagai tingkat konsistensi produk dapat dibuat, dari yang kekentalan rendah (sangat halus dioleskan di atas roti) sampai yang sangat kental. Demikian pula, ada yang menambahkan potongan buah segar ke dalam selai. Warna selai juga bisa beragam sesuai dengan warna buah yang diolah.

2.7. Analisis Pengawet Metil Paraben (Nipagin)

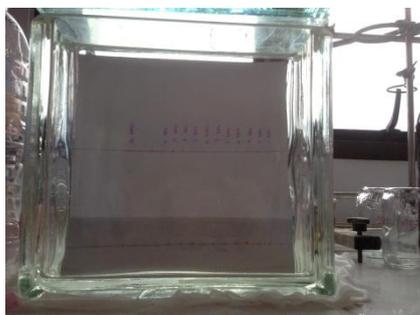
Metil paraben (nipagin) dianalisis secara kualitatif dengan cara sampel diencerkan dengan menggunakan larutan metanol kemudian disaring dengan fase metanol. Setelah itu, dilakukan pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan efektifitas kemurnian kandungan metil paraben pada sampel. Prosedur pemeriksaan kualitatif metil paraben (nipagin) metode kromatografi lapis tipis (KLT) diawali dengan penotolan sampel pada lempeng KLT dengan menggunakan pipet kapiler.

Cuplikan yang ditotolkan dibiarkan mengering terlebih dahulu sebelum dilakukan penotolan selanjutnya, tujuannya agar bercak yang terbentuk tidak terlalu lebar. Jika hasil pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan hasil positif (+) maka dilanjutkan analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometer Uv-Vis.

2.8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Meskipun demikian, kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom.

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu metode yang dapat memisahkan suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan 2 fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah silika gel, sedangkan fase geraknya adalah asam asetat glacial.



Gambar 2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*). Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan. Dalam kromatografi lapis tipis, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan bahwa hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara tepat.

Beberapa keuntungan lain kromatografi lapis tipis adalah :

1. Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis
2. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet
3. Dapat dilakukan elusi secara menaik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi 2 dimensi
4. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

2.8.1.Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Lempeng KLT disiapkan dengan melapiskan penjerap ke permukaan lapisan kaca, gelas, atau aluminium dengan ketebalan 250 μm . Lempeng KLT telah tersedia di pasaran

dengan berbagai ukuran dan telah ditambah dengan reagen fluoresen untuk memfasilitasi deteksi bercak solut. Di samping itu, lempeng KLT yang tersedia di pasaran sudah ditambah dengan agen pengikat, seperti kalsium sulfat.

2.8.2.Fase Gerak Pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak :

1. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
2. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
3. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga 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 metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia masing-masing akan meningkatkan solute-solut yang bersifat basa dan asam.

2.8.3. Aplikasi (Penotolan) sampel

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penotolan sampel secara otomatis lebih dipilih daripada penotolan secara manual terutama jika sampel yang akan ditotolkan lebih dari 15 μ l. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda.

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang telah berisi totolan sampel.

Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin (akan tetapi harus mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang sudah ditentukan). Untuk melakukan penjenuhan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung atas kertas saring, maka dapat dikatakan fase gerak jenuh. Selama proses elusi, bejana kromatografi harus tertutup rapat, misalkan dengan lembar aluminium dan sebagainya.

Ada beberapa teknik untuk melakukan pengembangan dalam kromatografi lapis tipis, yaitu pengembangan menarik (ascending) sebagaimana dalam gambar

14.2. selain dengan cara menarik, dikenal pula pengembangan dengan cara menurun (descending), melingkar dan mendatar. Meskipun demikian, cara pengembangan menarik merupakan cara yang paling populer dibandingkan dengan cara yang lain.

2.8.4. Deteksi Bercak

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara kimia yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radiaktif dan fluoresensi sinar ultra violet. Fluoresensi sinar ultra violet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka bahan penyerapannya akan diberikan indikator yang berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedang latar belakangnya akan kelihatan berfluoresensi. Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak :

1. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solute yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.
2. Mengamati lempeng dibawah lampu ultra violet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 atau 366 untuk menampakkan solut sebagai bercak

yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam. Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluorensen yang tidak larut dimasukkan kedalam fase diam untuk memberikan dasar fluorensi atau dapat pula menyemprot lempeng dengan reagen fluorensi setelah dilakukan pengembangan.

3. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
4. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
5. Melakukan *scanning* pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu Uv atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyinar sinar akan dicatat sebagai puncak (*peak*) dalam pencatat (*recorder*).

2.8.5. Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT digunakan secara luas untuk analisis solut-solut organik terutama dalam bidang biokimia, farmasi, klinis, forensik, baik untuk analisis kualitatif dengan cara membandingkan nilai Rf solut dengan nilai Rf senyawa baku atau untuk analisis kualitatif.

Penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas kemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk

kromatografi kolom, serta untuk memantau kromatografi kolom, melakukan *screening* sampel untuk obat.

1. Analisis Kualitatif

KLT dapat digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai Rf. Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai Rf yang sama jika diukur pada kondisi KLT yang sama. Untuk meyakinkan identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan lebih dari satu fase gerak dan jenis pereaksi semprot. Teknik *spiking* dengan menggunakan senyawa baku yang sudah diketahui sangat dianjurkan untuk lebih memantapkan pengambilan keputusan identifikasi senyawa.

2. Analisis Kuantitatif

Ada dua cara yang digunakan untuk analisis kuantitatif dengan KLT. Pertama, bercak diukur langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometri. Cara kedua adalah dengan mengorek bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak tersebut dengan metode analisis yang lain, misalkan dengan metode spektrofotometri. Pada cara pertama tidak terjadi kesalahan yang disebabkan oleh pemindahan bercak atau kesalahan ekstraksi, sementara pada cara kedua sangat mungkin terjadi kesalahan karena pengambilan atau karena ekstraksi.

Analisis kuantitatif dari suatu senyawa yang telah dipisahkan dengan KLT biasanya dilakukan dengan densitometer langsung pada lempeng KLT

(atau secara *in situ*). Densitometer dapat bekerja secara serapan atau fluoresensi. Kebanyakan densitometer mempunyai sumber cahaya, monokromator untuk memilih panjang gelombang yang cocok, sistem untuk memfokuskan sinar pada lempeng, penggandaan foton, dan rekorder.

Pada sistem serapan dapat dilakukan dengan model pantulan atau transmisi. Pada cara pantulan, yang diukur adalah sinar yang dipantulkan yang dapat menggunakan sinar tampak maupun ultra violet. Sementara itu, cara transmisi dilakukan dengan menyinari bercak dari satu sisi dan mengukur sinar yang diteruskan pada sisi lain. Pada kenyataannya hanya sinar tampak yang dapat digunakan untuk metode ini. Gangguan utama pada sistem serapan adalah fluktuasi latar belakang (*background*) yang dapat dikurangi dengan beberapa cara, misalnya dengan menggunakan alat berkas ganda, sistem transmisi dan pantulan secara bersamaan, atau dengan sistem dua panjang gelombang.

Kurva baku dibuat untuk setiap lempeng dan kadar senyawa dihitung seperti pada metode instrumental yang lain. Persis penetapan termaksud penotolan cuplikan, pengembangan kromatogram, dan pengukuran adalah 2 - 5 %.

Sistem fluoresensi biasanya lebih disenangi jika senyawa itu dapat dibuat berfluoresensi. Batas deteksi sistem ini lebih rendah dan kelinieran respond an selektifitasnya lebih tinggi. Gangguan fluktuasi latar belakang juga lebih rendah.

Bercak yang diukur dengan sistem fluoresensi, serapan ultra violet, atau sinar tampak dapat ditetapkan lebih teliti daripada bercak yang disemprot dengan pereaksi warna. Factor keseragaman pada penyemprotan merupakan hal yang sangat menentukan.

Semua pekerjaan KLT jika ditunjukkan untuk analisis kuantitatif harus dilakukan dengan saksama. Alat yang digunakan untuk mengambil sampel harus terkalibrasi dengan baik. Saat ini tersedia alat penotol sampel kapiler yang berukuran 1 – 100 μ l. Pada saat menotolkan sampel, kapiler harus tegak lurus dengan lempeng dan semua sampel harus dikeluarkan dari kapiler.

3. Analisis Preparative

Analisis preparative ditunjukkan untuk memisahkan analit dalam jumlah yang banyak lalu senyawa yang telah dipisahkan ini dianalisis lebih lanjut, misalkan dengan spektrofotometri atau dengan teknik kromatografi lain.

Pada KLT preparative ini, sampel ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dikembangkan dan dideteksi dengan cara yang nondesktuktif. Bercak yang mengandung analit yang dituju selanjutnya dikerik dan dilakukan analisis lebih lanjut. KLT biasanya merupakan metode pilihan pertama jika seseorang ingin memisahkan suatu campuran. Hal ini disebabkan karena KLT merupakan metode yang sederhana dan cepat (Ibnu, 2008).

2.9. Spektrofotometer

2.9.1. Definisi Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca atau kuarsa yang disebut kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut diserap dan sisanya akan dilewatkan. Alat ini memiliki prinsip kerja hasil penggabungan dari alat spektrofotometer dan fotometer. Spektrofotometer adalah alat yang menghasilkan sinar dari spektrum dan panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorbansikan. Spektrofotometer memiliki alat pengurai seperti prisma yang dapat menyeleksi panjang gelombang dari sinar putih dan pada fotometer terdapat filter dari berbagai warna yang memiliki spesifikasi melewatkan trayek panjang gelombang tertentu (Www.scribe.com).

Spektrofotometer merupakan suatu alat/instrument yang dilengkapi dengan sumber cahaya (gelombang elektromagnetik), baik cahaya UV (ultra-violet) atau pun cahaya Nampak (visible). Spektrofotometer mampu membaca/mengukur kepekatan warna dari sampel tertentu dengan panjang gelombang tertentu pula. Pengukuran menggunakan spektrofotometer, metode yang sering digunakan disebut dengan spektrofotometri. Salah satu metode sederhana untuk menentukan zat organik dan anorganik secara kualitatif dan kuantitatif yaitu dengan metode spektrofotometri Ultra-violet dan Sinar Tampak.



Gambar 2.4 Spektrofotometer

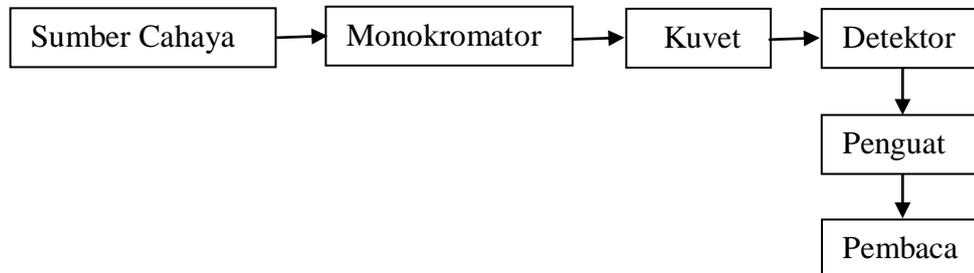
Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Sinar Ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-800 nm. Penyerapan sinar UV dan sinar tampak oleh molekul, melalui tiga proses yaitu penyerapan oleh transisi elektron dari molekul kompleks, dan penyerapan oleh perpindahan muatan.

2.9.2. Prinsip Kerja Spektrofotometer

Prinsip kerja spektrofotometer adalah bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian diserap dalam medium itu dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi karena memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel. Hukum Beer menyatakan absorbansi cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan bahan/modium.

2.9.3. Komponen Spektrofotometer

Komponen spektrofotometer secara umum dapat digambarkan sebagai berikut :



1. Sumber cahaya; sumber cahaya pada spektrofotometer sebaiknya memiliki pancaran radiasi yang stabil dan intensitas yang tinggi. Sumber energi cahaya yang biasa untuk daerah tampak (*visible*), *ultraviolet* dekat, dan inframerah dekat adalah sebuah lampu pijar dengan kawat rambut terbuat dari wolfram (tungsten) dengan daerah panjang gelombang (1) adalah 350 sampai 2200 nanometer (nm).
2. Monokromator; digunakan untuk mendispersikan sinar ke dalam komponen-komponen panjang gelombangnya yang selanjutnya akan dipilih oleh celah (*slit*). Monokromator berputar sedemikian rupa sehingga kisaran panjang gelombang dilewatkan pada sampel sebagai *scan* instrument melewati spectrum.
3. Kuvet; kuvet adalah alat yang digunakan sebagai tempat contoh atau cuplikan yang akan dianalisis. Biasanya terbuat dari kwarsa, plexiglass, kaca atau plastik. Pada pengukuran di daerah *ultraviolet* digunakan kuvet kwarsa atau plexiglass, sedangkan untuk pengukuran di daerah tampak (*visible*) dapat menggunakan semua macam kuvet.

4. Detektor; detektor penerima berperan sebagai pemberi respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang. Detektor mengubah cahaya menjadi sinyal listrik yang selanjutnya ditampilkan pada penampil (*display*) dalam bentuk jarum atau angka digital. Dengan mengukur transmittan larutan sampel, dimungkinkan untuk menentukan konsentrasinya dengan penerapan hukum Lambert-Beer. Spektrofotometer akan mengukur intensitas cahaya melewati sampel (I), dan membandingkan ke intensitas cahaya sebelum melewati sampel (I_0). Transmittan dinyatakan dalam presentase (%T) sehingga didapatkan absorban (A) dengan rumus $A = -\log \%T$ (Www.scribd.com).
5. Pengganda(penguat); berperan untuk membuat isyarat listrik memindai untuk dibaca
6. Piranti baca (pembaca); suatu sistem baca yang menangkap besarnya isyarat listrik yang berasal dari detektor (Underwood,2010).

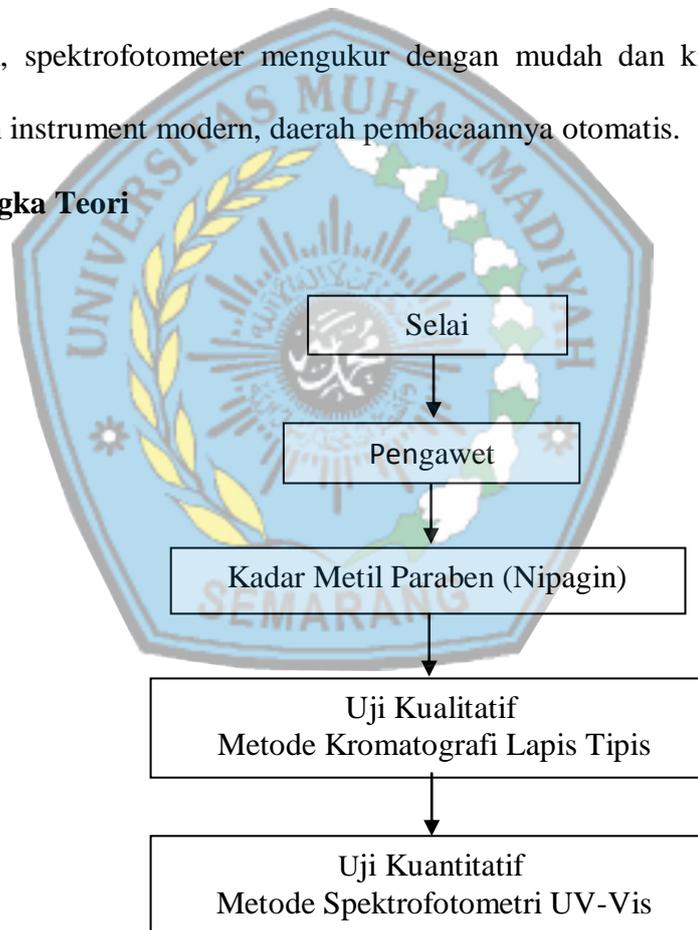
2.9.4.Keuntungan Spektrofotometer

Keuntungan dari spektrofotometer adalah :

1. Penggunaannya luas, dapat digunakan untuk senyawa anorganik, organik dan biokimia yang diabsorbansi di daerah ultra lembayung atau daerah tampak.
2. Sensitivitasnya tinggi, batas deteksi untuk mengabsorbansi pada jarak 10^{-4} sampai 10^{-5} m. jarak ini dapat diperpanjang menjadi 10^{-4} sampai 10^{-7} m dengan prosedur modifikasi yang pasti.

3. Selektivitasnya sedang sampai tinggi, jika panjang gelombang dapat ditemukan dimana analit mengabsorbansi sendiri, persiapan pemisahan menjadi tidak perlu.
4. Ketelitiannya baik, kesalahan relative pada konsentrasi yang ditemui dengan tipe spektrofotometer Uv-Vis ada pada jarak 1% sampai 5%. Kesalahan tersebut dapat diperkecil hingga beberapa puluh persen dengan perlakuan khusus.
5. Mudah, spektrofotometer mengukur dengan mudah dan kinerjanya cepat dengan instrument modern, daerah pembacaannya otomatis.

2.10. Kerangka Teori



Gambar 2.3 Kerangka Teori