

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kecap

Kecap merupakan jenis makanan fermentasi yang paling banyak dikonsumsi di seluruh dunia. Kecap adalah produk cair berwarna coklat atau hitam gelap yang mempunyai rasa asin atau manis dan digolongkan dalam makanan yang mempunyai *flavor* yang menyerupai ekstrak daging.

Menurut Cahyadi (2008) kecap merupakan ekstrak dari hasil fermentasi kedelai yang dicampurkan dengan bahan-bahan lain seperti gula, garam, dan bumbu dengan tujuan untuk meningkatkan cita rasa makanan. Pada dasarnya ada dua jenis kecap, yaitu kecap Cina dan Jepang. Kecap Cina warnanya lebih gelap dan lebih manis karena adanya penambahan gula tebu, kecap cina mempunyai berat jenis, kekentalan, dan kandungan nitrogen yang lebih tinggi dari kecap jepang. Kecap jepang memiliki kandungan asam amino terutama asam amino glutamat yang lebih tinggi. Secara umum kecap di Indonesia dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu kecap asin dan kecap manis (Cahyadi, 2008).

Berdasarkan rasa dan kekentalannya, kecap dibagi menjadi dua macam, yaitu kecap asin agak encer dan kecap manis yang lebih kental. Proses pembuatan kecap asin dan manis hampir sama, perbedaannya adalah pada akhir proses produksi yaitu terdapat penambahan gula dan bumbu-bumbu (rempah-rempah) pada pembuatan kecap manis, sedangkan pada kecap asin tidak ada penambahan gula.

2.2. Bahan Tambahan Makanan

Bahan tambahan makanan adalah bahan yang ditambahkan dan dicampurkan sewaktu pengolahan makanan untuk meningkatkan mutu. Termasuk ke dalam tambahan makanan adalah pengawet, pewarna, penyedap rasa dan aroma, pemantap, antioksidan, pengemulsi, antigumpal, pemucat, dan pengental (Susila, 2008). Bahan tambahan pangan digunakan untuk berbagai tujuan mulai dari perbaikan cita rasa dan pewarnaan hingga pengawetan dan fortifikasi gizi (Kartini, 2014).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor. 033 (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. Penggolongan bahan tambahan pangan (BTP) Pasal 3 Bab II adalah BTP yang digunakan dalam pangan terdiri atas beberapa golongan antara lain : antibuih (*Antifoaming agent*), antikempal (*Anticaking agent*), antioksidan (*Anticaking agent*), bahan pengkarbonasi (*Carbonating agent*), garam pengemulsi (*Emulsifying salt*), gas untuk kemasan (*Packaging gas*), pelapis (*Glazing agent*), pemanis (*Sweetener*), pembentuk gel (*Gelling agent*), pembuih (*Foaming agent*), pengatur keasaman (*Acidity regulator*), dan pengawet (*Preservative*).

2.3. Bahan Pengawet

Bahan pengawet merupakan salah satu jenis tambahan salah satu jenis bahan tambahan makanan yang sering ada. Bahan tambahan makanan (aditif) ditujukan untuk beberapa fungsi seperti bahan pengawet yang digunakan untuk

meningkatkan waktu guna produk makanan dan antioksidan yang digunakan untuk meningkatkan waktu guna produk makanan terhadap oksidasi yang dapat menyebabkan makanan menjadi tengik (Rohman, 2011).

Pengawet adalah salah satu bahan tambahan pangan yang diijinkan penggunaannya dalam pangan berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI No 033 (2012). Penambahan bahan pengawet dalam bahan pangan dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu pencampuran, pencelupan, penyemprotan, pengasapan dan pelapisan pada pembungkusan pangan (Cahyadi, 2008).

2.4. Tujuan Penggunaan Bahan Pengawet

Pangan mempunyai peranan yang sangat penting dalam kesehatan masyarakat. Sebagian besar dari masyarakat masih mempunyai pendapatan dan tingkat pendidikan yang relatif rendah. Di sisi lain, kesadaran dan kemampuan masyarakat sebagai konsumen masih sangat kurang dalam memilih pangan, kebanyakan mereka mengabaikan kualitas demi memperoleh harga yang relatif murah.

Menurut Cahyadi (2008), tujuan penambahan bahan pengawet pada pangan secara umum adalah:

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 pangan yang diawetkan.
4. Tidak menyembunyikan keadaan pangan yang berkualitas rendah.

5. Tidak digunakan untuk menyembunyikan penggunaan bahan yang salah atau tidak memenuhi persyaratan.
6. Tidak digunakan untuk menyembunyikan kerusakan bahan pangan.

2.5. Jenis – Jenis Bahan Pengawet

Menurut Cahyadi (2008) zat pengawet terdiri dari senyawa organik dan anorganik dalam bentuk asam atau garamnya. Aktifitas-aktifitas bahan pengawet tidaklah sama, misalnya ada yang efektif terhadap bakteri, khamir atau kapang.

a. 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, metyl paraben (nipagin), asam asetat dan epoksida.

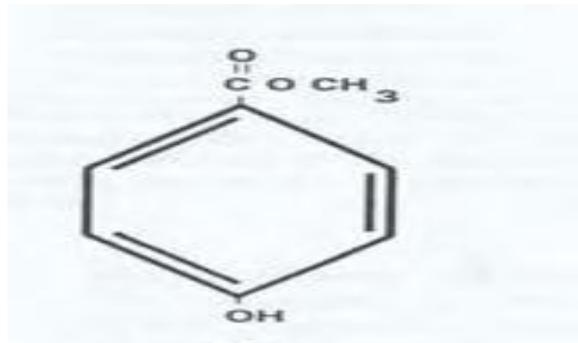
b. Pengawet Anorganik

Zat pengawet anorganik yang masih sering dipakai adalah sulfit, nitrat dan nitrit. Bentuk efektif sulfit sebagai pengawet adalah asam sulfit yang terdisosiasi dan terutama terbentuk pH di bawah 3. Garam nitrit dan nitrat umumnya digunakan pada proses *curing* daging untuk memperoleh warna yang baik dan mencegah pertumbuhan mikroba. Di dalam daging nitrit akan membentuk nitrooksida yang dengan pigmen daging akan membentuk nitrosomio globulin yang berwarna merah cerah.

2.6. Metil Paraben

Salah satu senyawa paraben adalah metil paraben (Cashman,2005). Metil paraben termasuk dalam bahan pengawet yang diizinkan penggunaannya dan termasuk jenis bahan pengawet organik berupa serbuk hablur putih, berbau khas lemah, mempunyai sedikit rasa terbakar, sukar larut dalam air namun mudah larut dalam etanol dan eter. Dalam air pada suhu 25°C larut sebesar 2,5 gr/L dengan bentuk yang aktif sebagai pengawet adalah 87,4% pada range pH 8,5. Garam natriumnya mudah larut dalam air pada suhu 25°C dengan bentuk yang aktif sebagai pengawet adalah 87,4% pada range pH 8,5 (Prasetyo, 2016).

Metil paraben 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. Metil paraben termasuk dalam golongan bahan tambahan pangan (BTP) yaitu pengawet jenis Metil paraben (Methyl para-hydroxybenzoate) yang memiliki batas maksimum penggunaan 600 mg/kg (BPOM, 2012). Metil paraben mempunyai rumus empiris $C_8H_8O_3$ dan berat molekul 152,15 dan struktur kimia metil paraben seperti pada Gambar 1. (Effendi, 2015).



Gambar 2.1. Struktur Kimia Metil Paraben

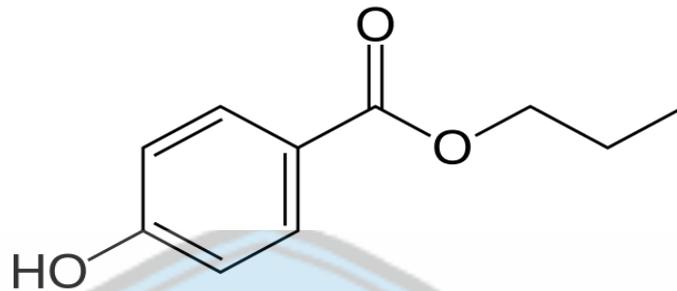
2.7. Propil Paraben

Propil paraben termasuk dalam bahan pengawet yang diizinkan penggunaannya dan termasuk jenis bahan pengawet organik berupa hablur kecil atau serbuk putih dan tidak berwarna. Sangat sukar larut dalam air. Mudah larut dalam etanol dan dalam eter dan sukar larut dalam air mendidih. Dalam air pada suhu 25°C larut sebesar 2,5 gr/L dengan bentuk yang aktif sebagai pengawet adalah 89,1% pada range pH 8,5. Garam natriumnya mudah larut dalam air pada suhu 25°C dengan bentuk yang aktif sebagai pengawet adalah 89,1% pada range pH 8,5 (Cahyadi, 2006).

Propil paraben yang paling umum digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri karena spektrum anti mikrobanya yang luas dengan stabilitas yang baik dan tidak volatilitas juga sangat efektif untuk mengendalikan jamur dan pertumbuhan ragi (ISSN: 0973-4945, 2011).

propil paraben termasuk dalam golongan bahan tambahan pangan (BTP) yaitu pengawet jenis propil paraben (Propil para-hydroxybenzoate) yang memiliki batas maksimum penggunaan 600 mg/kg (BPOM, 2012). Propil

paraben mempunyai rumus empiris $C_{10}H_{12}O_3$ dan berat molekul 180,20 dan struktur kimia propil paraben seperti pada Gambar 2. (Cahyadi, 2006).



Gambar 2.2. Struktur Kimia Propil Paraben

2.8. Toksisitas Bahan Pengawet

Pengawet metil paraben memiliki toksisitas sangat rendah terhadap hewan maupun manusia. Hal ini karena manusia mempunyai mekanisme detoksifikasi metil paraben yang efisien. Penggunaan metil paraben yang melebihi batas maksimum 600 mg/kg (BPOM, 2012). Mempunyai efek teratogenik (menyebabkan cacat bawaan) dan karsinogenik (Winarno, 2004). Sedangkan efek yang diberikan pada kesehatan karena penggunaan propil paraben terutama penderita asma, urticaria dan yang sensitif terhadap aspirin akan memberikan reaksi alergi pada kulit dan mulut (Cahyadi, 2006).

2.9. 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.

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.

2.9.1. Fase Diam 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.

2.9.2. Fase Gerak pada 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.

2.9.3. 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 melalukan 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.

2.9.4. 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 menampakan 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 fluorezen 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*).

2.9.5. Penggunaan 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 R_f solut dengan nilai R_f 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 R_f . Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai R_f yang sama jika diukur maka 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 densitometry. 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 respon dan 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 terkaliberasi 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 ditotolakan 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).

2.10. Spektrofotometer

2.10.1. 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 (Luhur, 2013).

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 2.3. 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.

2.10.2. 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.

2.10.3. Metode Spektrofotometer

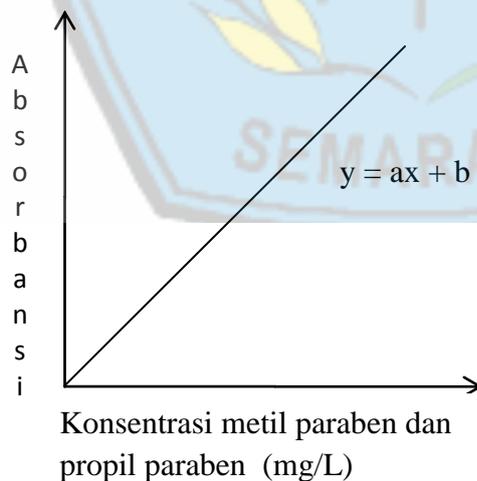
1. Metode Standart Tunggal

Metode ini sangat praktis digunakan karena hanya menggunakan satu larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya, kemudian absorbansi larutan standar dan sampel diukur dengan spektrofotometri. Rumus perhitungan kadar sampel :

$$\frac{\text{Absorbansi sampel} \times C \text{ standar} \times P \text{ sampel}}{\text{Abs baku}} = \dots\dots \text{mg/L (ppm)}$$

2. Metode kurva kalibrasi

Metode ini dibuat suatu buku seri larutan standar dengan berbagai konsentrasi, kemudian absorbansi masing – masing larutan di baca pada spektrofotometer. Selanjutnya dibuat grafik antar konsentrasi dengan absorbansi yang merupakan garis lurus melewati suatu titik.



Y : Absorbansi a : Konstanta

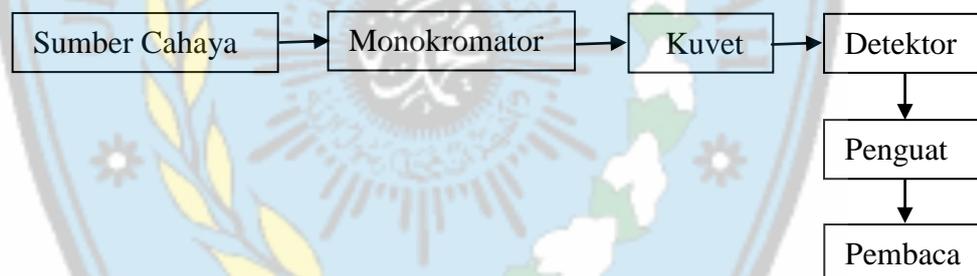
X : Konsentrasi b : Koefisien

3. Metode Adisi Standar

Metode ini dapat dipakai secara luas karena hanya terjadi sedikit kesalahan yang disebabkan oleh perbedaan kondisi lingkaran (matriks) sampel dan standar . Pada metode adisi standar ini dua atau lebih sejumlah volume tertentu dari sampel dipindahkan ke labu takar. Satu larutan diencerkan sampai volume tertentu, selanjutnya diukur absorbansinya tanpa ditambah dengan zat standar, sedangkan larutan yang lain sebelum diukur absorbansinya ditambahkan terlebih dahulu dengan sejumlah tertentu larutan standar, kemudian diencerkan seperti pada larutan yang pertama (Rosyalina, 2014).

2.10.4. Komponen Spektrofotometer

Komponen spektrofotometer secara umum dapat digambarkan sebagai berikut :



1. 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 (λ) 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.

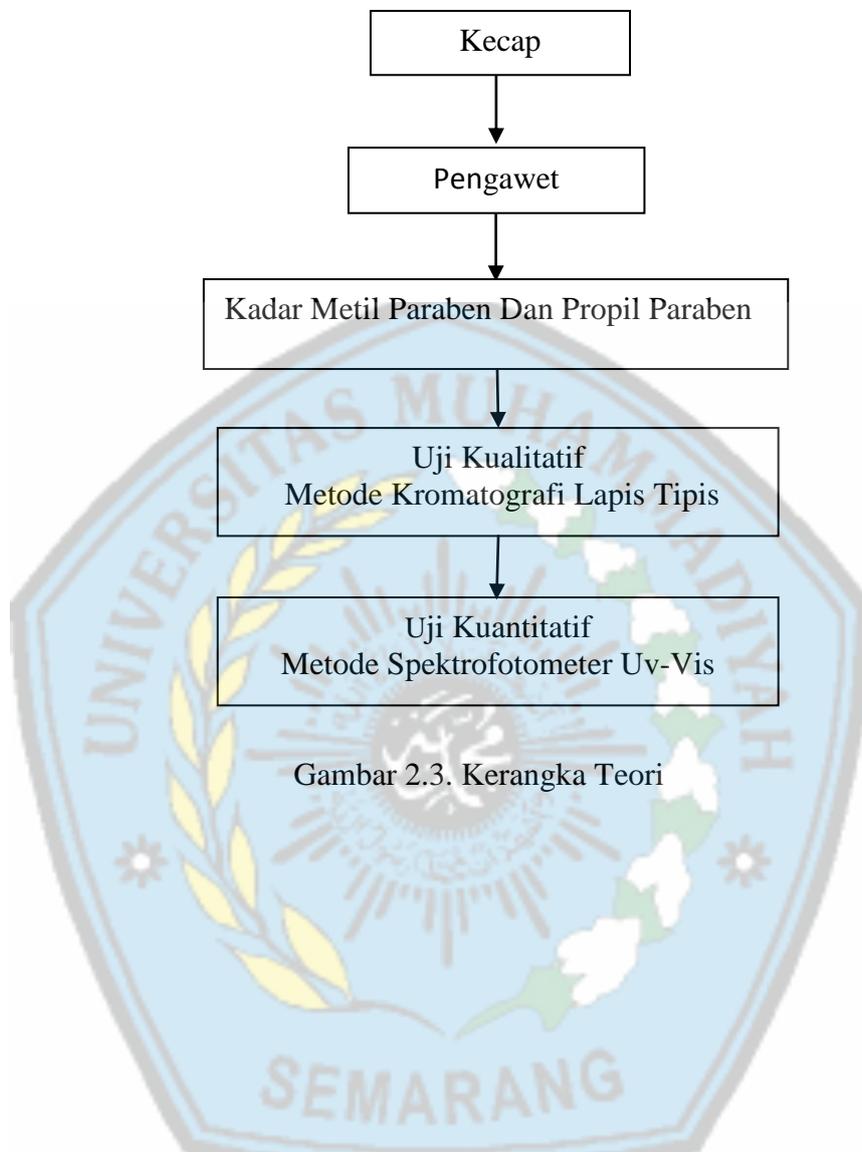
3. Kuvet adalah alat yang digunakan sebagai tempat contoh atau cuplikan yang akan dianalisis. Biasanya terbuat dari kwarsa, plexiglass, kaca atau plastik. Pada pengukuran di daerah *ultraviolet* digunakan kuvet kwarsa atau plexiglass, sedangkan untuk pengukuran di daerah tampak (*visible*) dapat menggunakan semua macam kuvet.
4. Detektor 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 $A = -\log \%T$
5. Penguat (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).

2.10.5. 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.

2.11. Kerangka Teori



Gambar 2.3. Kerangka Teori