

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Pada tahun 2011, Yamlean melakukan penelitian tentang identifikasi dan penetapan kadar rhodamin B pada jajanan kue berwarna merah muda yang beredar di kota Manado dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis setelah diekstraksi dan dimurnikan. Hasil penelitian yang diperoleh membuktikan bahwa sampel-sampel kue berwarna merah muda yang beredar di kota Manado ada yang positif menggunakan rhodamin B, yaitu sampel kue bolu kukus yang diambil dari pasar Karombasan, Pasar Bersehati dan Pasar Tuminting (Yamlean, 2011).

Pada tahun 2013, Mamoto dan Citrangingtyas melakukan penelitian tentang penetapan kadar rhodamin B pada lipstik menggunakan KLT, silika GF 524 sebagai fase diam dan sebagai fase geraknya yaitu n-butanol, etil asetat, dan amonia (10:4:5). Hasil pemisahan selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometri UV dengan panjang gelombang 544 nm, dengan pelarut etanol. Hasilnya, pada sembilan sampel yang digunakan tidak terdapat kadar rhodamin B (Mamoto dan Citrangingtyas, 2013). Pada tahun 2014, Hasanah *et al.* melakukan penelitian tentang identifikasi rhodamin B pada produk pangan dan kosmetik dengan metode KCKT dan spektrofotometri UV-Vis. Kondisi kolom KCKT yang digunakan pada tahapan optimasi adalah kolom Acclaim Polar C18, ukuran partikel 5 μm , panjang kolom 250 mm, detektor Vis 546 nm, laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20 μL . Hasil pengukuran larutan rhodamin B dengan konsentrasi 8 ppm memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 544 nm. Hasilnya, terdapat empat sampel kerupuk dan empat sampel terasi yang mengandung rhodamin B, kemudian untuk empat sampel kosmetik tidak terdapat adanya kadar rhodamin B (Hasanah *et al.*, 2014).

Pada tahun 2015, Kumalasari melakukan penelitian tentang penetapan kadar rhodamin B dalam kerupuk yang berwarna merah dengan menggunakan KLT, silika GF 524 sebagai fase diam dan sebagai fase gerak yaitu n-butanol, etil asetat dan amonia (10:4:5). Setelah dianalisis menggunakan KLT, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometri UV dengan panjang gelombang 544 nm. Hasilnya dari enam sampel yang dianalisis terdapat satu sampel yang positif mengandung rhodamin B (Kumalasari, 2015).

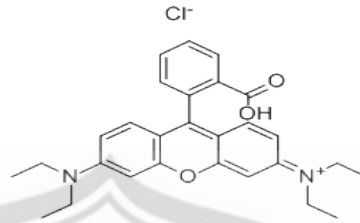
B. Landasan Teori

1. Rhodamin B

Rhodamin B merupakan zat pewarna sintetis berbentuk serbuk kristal berwarna ungu kemerahan, dalam bentuk larutan pada konsentrasi tinggi berwarna merah keunguan dan konsentrasi rendah berwarna merah terang. Rhodamin B termasuk golongan pewarna ksanten basa, dan terbuat dari meta dietil amino fenol dan ftalik anhidrid suatu bahan yang tidak bisa dimakan serta sangat berfluoresensi. Rhodamin B memiliki berbagai nama lain, yaitu: tetra ethyl rhodamin, rheonine B, D & C red No. 19, C.I. basic violet 10, C.I. No 45179, food red 15, ADC rhodamin B, aizan rhodamon dan brilliant pink B. Sedangkan nama kimianya adalah N-[9-(karboksifenil)-6-(dietilamino)-3H-ksanten-3-ylidene]- N-etilleyhanaminium klorida. Rumus molekul dari rhodamin B adalah $C_{28}H_{31}ClNO_3$ dengan berat molekul sebesar 479 g/mol. Sangat larut dalam air dan alkohol yang akan menghasilkan warna merah kebiru-biruan dan berfluorensi kuat (Merck Index, 2006).

Di dalam rhodamin B sendiri terdapat ikatan dengan klorin (Cl) yang dimana senyawa klorin ini merupakan senyawa anorganik yang reaktif dan juga berbahaya. Selain terdapat ikatan rhodamin B dengan klorin terdapat juga ikatan konjugasi. Ikatan konjugasi dari rhodamin B inilah yang menyebabkan rhodamin B berwarna merah. Ditemukannya bahaya yang sama antara rhodamin B dan klorin membuat adanya kesimpulan bahwa atom klorin yang ada pada rhodamin B menyebabkan

terjadinya efek toksik bila masuk ke dalam tubuh manusia. Atom Cl yang ada sendiri adalah termasuk dalam halogen, dan sifat halogen yang berada dalam senyawa organik akan menyebabkan toksik dan karsinogenik (Yamlean, 2011).



Gambar 2.1 Rumus molekul rhodamin B (Merck Index, 2006)

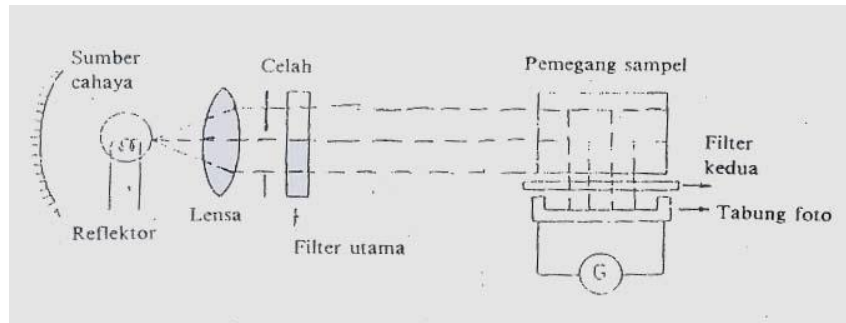
Rhodamin B juga merupakan zat yang larut dalam alkohol, HCl, dan NaOH, selain dalam air. Di dalam laboratorium, zat tersebut digunakan sebagai pereaksi untuk identifikasi Pb, Bi, Co, Au, Mg, dan Th, dan titik leburnya pada suhu 165 °C (Merck Index, 2006).

Di Indonesia, berdasarkan Peraturan Menkes RI No. 003 tahun 2012 menyatakan bahwa rhodamin B tidak termasuk dalam bahan tambahan pangan. Rhodamin B merupakan zat warna yang berbahaya yang disalahgunakan dalam mewarnai berbagai makanan dan minuman. Rhodamin B sendiri terdapat ikatan dengan klorin (Cl). Senyawa klorin ini merupakan senyawa anorganik yang reaktif dan juga berbahaya. Paparan dari rhodamin B dapat menyebabkan iritasi bila terkena mata, iritasi kulit, dan kemerahan bila terkena kulit. Sifat ini hampir mirip dengan sifat dari klorin yang berkaitan di dalam struktur rhodamin B. Efek samping dari penggunaan zat warna rhodamin B adalah toksik kronik terjadi bila penggunaan zat warna rhodamin B pada dosis kecil yang terus menerus sehingga tertimbun dalam tubuh. Rhodamin B tidak dapat dimetabolisme oleh hati sehingga penumpukan rhodamin B dalam hati akan menyebabkan gangguan fungsi hati. Struktur kimia dari rhodamin B mengandung unsur nitronium yang bersifat karsinogenik sehingga memacu pertumbuhan sel-sel kanker dan menyebabkan terjadinya kanker hati dan tumor hati (Winarno, 2004).

2. Spektrofluorometri

Spektrofotometri fluoresensi merupakan suatu metode yang menggunakan pengukuran intensitas cahaya fluoresensi dengan membandingkan intensitas cahaya fluoresensi yang dipancarkan oleh zat uji dan oleh suatu baku pembanding tertentu. Spektrofluorometer adalah instrumen yang memanfaatkan sifat fluoresen dari beberapa senyawa yang berfluoresensi untuk memberikan informasi mengenai konsentrasi dan lingkungan kimia dalam sampel. Panjang gelombang eksitasi tertentu dipilih untuk mendapatkan panjang gelombang emisi. Setelah dapat satu panjang gelombang emisi yang baik maka emisi dapat teramati dengan baik pada panjang gelombang tersebut, sehingga dapat didapatkan intensitas panjang gelombang eksitasi versus emisi yang dapat disebut dengan spektrum emisi (Lakowicz, 2006).

Pada spektrofluorometer, spektrum eksitasi dan spektrum emisi dapat direkam keduanya karena memiliki dua detektor. Spektrum emisi adalah distribusi panjang gelombang dari suatu emisi yang diukur pada panjang gelombang eksitasi konstan tunggal. Sebaliknya, sebuah spektrum eksitasi adalah ketergantungan intensitas emisi, diukur pada panjang gelombang emisi tunggal, setelah dipindai panjang gelombang dari eksitasi. Spektrum semacam itu dapat disajikan pada skala panjang gelombang atau skala wavenumber. Cahaya energi yang diberikan dapat digambarkan dalam istilah panjang gelombangnya (λ), frekuensi (ν), atau wavenumber (Lakowicz, 2006).



Gambar 2.2 Komponen utama spektrofluoro (Mulja dan Suharman,1995)

a. Sumber energi eksitasi

Banyak terdapat sumber radiasi. Lampu merkuri relatif stabil dan memancarkan energi terutama pada panjang gelombang diskret. Lampu tungsten memberikan energi kontinyu di daerah tampak. Lampu pancar xenon bertekanan tinggi seringkali digunakan pada spektrofluorometer karena alat tersebut merupakan sebuah sumber dengan intensitas tinggi yang menghasilkan energi kontinyu dengan intensitas tinggi dari ultraviolet sampai inframerah. Pada filter fluorometer (fluorimeter) digunakan lampu uap raksa sebagai sumber cahaya dan energi eksitasi diseleksi dengan filter. Pada spektrofluorimeter biasanya digunakan lampu Xenon (150 W) yang memancarkan spectrum kontinu dengan panjang gelombang 200-800 nm. Energi eksitasi diseleksi dengan monokromator eksitasi (*grating*) (Mulja dan Suharman,1995).

b. Kuvet untuk sampel

Sel spesimen yang digunakan dalam pengukuran fluoresensi dapat berupa tabung bulat atau sel empat persegi panjang (kuvet), sama seperti yang digunakan pada spektrofotometri resapan, terkecuali keempat sisi vertikalnya dipoles. Ukuran spesimen uji yang sesuai adalah 2 ml sampai 3 ml, tetapi beberapa instrumen dapat disesuaikan dengan sel-sel kecil yang memuat 100 μ l hingga 300 μ l atau dengan pipa kapiler yang hanya memerlukan jumlah spesimen yang kecil. Spektrofotometer harus dioperasikan sesuai dengan petunjuk pabrik pembuat. Bila panjang gelombang

untuk eksitasi di atas 320 nm dapat digunakan kuvet dari gelas, akan tetapi untuk eksitasi pada panjang gelombang yang lebih pendek digunakan kuvet dari silika. Kuvet tidak boleh berfluoresensi dan tidak boleh tergores karena dapat menghamburkan cahaya (Mulja dan Suharman,1995)

c. Detektor

Pada umumnya fluorometer menggunakan tabung-tabung fotomultiplier sebagai detektor, banyak tipe dari jenis tersebut yang tersedia dan masing-masing mempunyai ciri khusus yang berkenaan dengan daerah spektral dengan kepekaan maksimum, menguntungkan, dan derau secara elektrik. Arus foto diperbesar dan dibaca pada sebuah meter atau perekam. Seperti pada spektrofotometri, detektor yang biasa digunakan adalah '*fotomultiplier tube*' atau '*thermocouple*'. Pada umumnya, detektor ditempatkan di atas sebuah poros yang membuat sudut 90° dengan berkas eksitasi. Geometri sudut siku ini memungkinkan radiasi eksitasi menembus spesimen uji tanpa mengkontaminasi sinyal luaran yang diterima oleh detektor fluoresensi, akan tetapi tidak dapat dihindarkan detektor menerima sejumlah radiasi eksitasi sebagai akibat sifat menghamburkan yang ada pada larutan itu sendiri atau jika adanya debu atau padatan lainnya. Untuk menghindari hamburan ini maka digunakan instrument yang bernama filter (Mulja dan Suharman,1995).

d. Sepasang filter atau monokromator untuk menyeleksi panjang gelombang eksitasi dan emisi.

1) Fluorometer

Filter pertama hanya meneruskan cahaya ultraviolet dari sumber cahaya yaitu radiasi dengan panjang gelombang yang cocok untuk eksitasi specimen uji. Filter kedua meloloskan hanya panjang gelombang yang sesuai dengan fluoresensi maksimum dari zat yang diperiksa dan menahan setiap cahaya eksitasi yang

terhambur. Jenis filter kedua ini biasanya yang menahan panjang gelombang pendek. Persoalan yang dihadapi pada pemilihan filter yaitu panjang gelombang yang lebih panjang yang diteruskan oleh filter pertama juga lolos pada daerah panjang gelombang yang lebih pendek dari filter kedua, sehingga menghasilkan blangko yang tinggi. Di samping itu sukar untuk mendapatkan filter dengan panjang gelombang yang cocok dengan radiasi eksitasi karakteristik untuk sampel (Mulja dan Suharman, 1995).

2) Spektrofluorometer

Ini menggunakan sepasang monokromator (*grating*) untuk menyeleksi radiasi eksitasi dan emisi yang lebih akurat (memberikan kepekaan yang tinggi) sehingga kesulitan-kesulitan tersebut dapat diatasi. Monokromator pertama mendispersikan cahaya dari sumber cahaya sehingga menghasilkan radiasi eksitasi yang monokromatis. Sampel yang tereksitasi kemudian berfluoresensi sehingga merupakan sumber cahaya bagi monokromator kedua. Dengan alat ini dapat dibuat spektrum eksitasi maupun emisi (Mulja dan Suharman, 1995).

Pada fluorometer larutan zat disinari dengan sinar yang panjang gelombangnya di sekitar panjang gelombang penyerapan maksimum yang berasal dari lampu raksa atau lampu pijar yang telah disekat dengan filter. Intensitas fluoresensi diukur atau dibandingkan dengan intensitas larutan baku. Sinar fluoresensi dibebaskan dari sinar hamburan dengan melewati sinar melalui filter atau monokromator. Cara pengukuran pada dasarnya sama dengan cara spektrofotometri. Karena zat organik yang berfluoresensi mungkin terurai secara fotokimia, penyinaran harus dilakukan sesingkat mungkin.

Sebagai zat baku dapat digunakan zat yang sama dengan zat dalam keadaan murni atau zat murni lain yang mempunyai pita penyerapan dan fluoresensi yang sama dengan zat uji. Misalnya larutan *quinin* dalam asam sulfat sering digunakan sebagai zat

baku untuk fluoresensi biru dan larutan *natrium fluoroseinat* untuk zat yang berfluoresensi hijau (Mulja dan Suharman, 1995).

Perbedaan fluoresensi dengan spektrofotometri :

- 1) Kepekaan analisis pada spektrofluorimetri dapat dipertinggi dengan menaikkan intensitas sumber cahaya
- 2) Analisis spektrofluorimetri lebih selektif dan lebih sensitif (Mulja dan Suharman, 1995)

3. Validasi Metode

a. 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. Validasi metode menurut United States Pharmacopeia (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan akurat, spesifik, dan reproduksibel serta tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya, yaitu:

1. Keseksamaan (*Precision*)

Keseksamaan atau ketelitian dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analisis yang sama pada kondisi sama dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi atau

analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel yang diduga identik dari batch yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama menggunakan peralatan, pereaksi dan analisis yang berbeda pada kondisi yang normal (Harmita, 2004).

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku relatif atau koefisien variasi. Kriteria keseksamaan diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien varian (KV) 2% atau kurang. Tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Pada kadar 1% atau lebih RSD 2,5% dan satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSD 16% dan pada kadar satu per semiliar (ppm) RSD adalah 32% (Harmita, 2004). Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replikasi sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen (Harmita, 2004).

2. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan atau ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis tergantung pada sebaran galat sistemik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistemik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi menggunakan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, pelaksanaan yang cermat, dan taat atas prosedur (Harmita, 2004).

Kecermatan dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standar addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM (*Certified Reference Material*) atau SRM (*Standard Reference Material*) 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) (Harmita, 2004).

Akurasi untuk bahan obat dengan kadar kecil 90-110%, akurasi untuk kadar obat yang lebih besar 95-105%, akurasi untuk bahan baku 98-102%, sedangkan untuk bioanalisis rentang akurasi 80-120% masih bisa diterima (Harmita, 2004).

3. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linear, digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linear $Y = a + bX$. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variasi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit (Harmita, 2004).

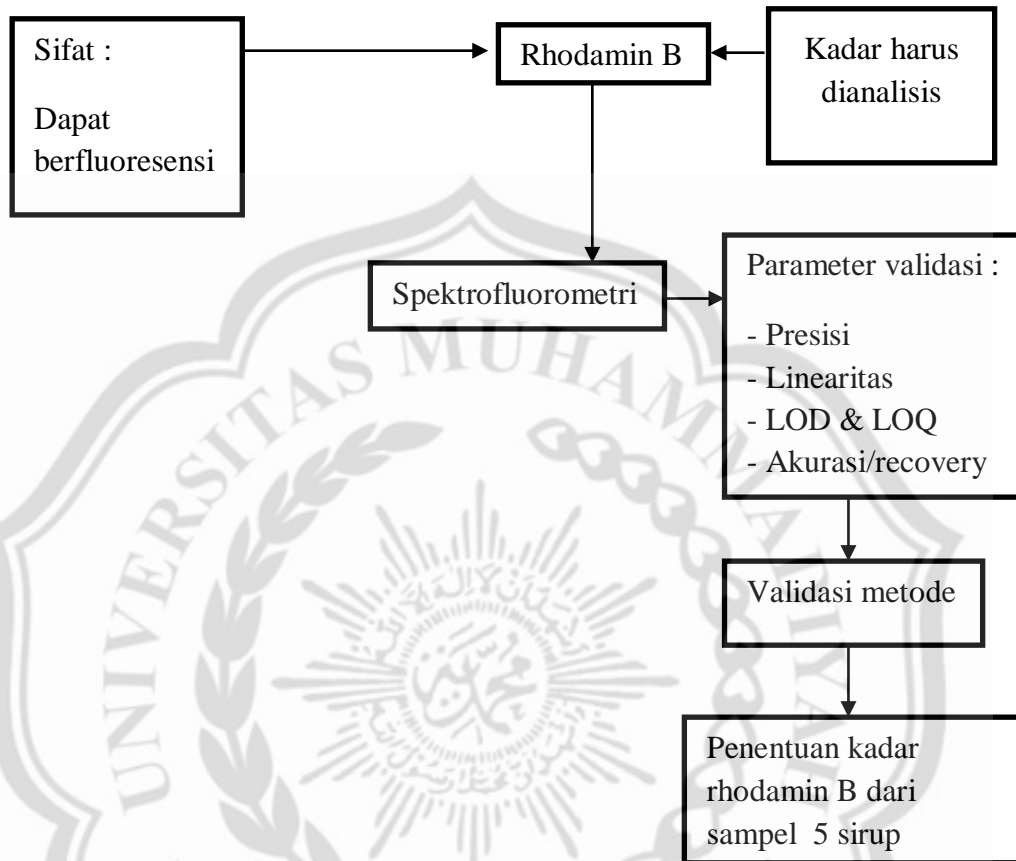
4. Batas Deteksi (*Limit of Detection/LOD*) dan Batas Kuantitasi (*Limit of Quantitation/LOQ*)

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

Batas deteksi dan kuantifikasi dapat dihitung melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b

pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residu (Sy/x) (Harmita, 2004).

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka konsep penelitian

D. Hipotesis

Berdasarkan pada sifat rhodamin B yang dapat berfluoresensi, maka penetapan kadarnya dapat dilakukan dengan spektrofotometri.