

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Hasil Penelitian Terdahulu

Pada tahun 2018, Laksmi *et al.*, melakukan penelitian tentang Identifikasi rhodamin B dalam saus sambal yang beredar di pasar tradisional dan modern Kota Denpasar. Metode yang digunakan yaitu deskriptif kualitatif dengan menggunakan benang wol. Hasil positif ditandai dengan warna merah yang tidak dapat dicuci oleh air. Berdasarkan hasil uji kualitatif, bahwa dari 5 sampel yang diambil di pasar tradisional, 2 sampel mengandung rhodamin B sedangkan semua sampel di pasar modern dinyatakan aman dari zat pewarna sintesis rhodamin B (Laksmi *et al.*, 2018).

Pada tahun 2017, Longdong *et al.*, melakukan penelitian tentang analisis zat pewarna rhodamin B pada saos bakso tusuk yang beredar di sekitar kampus Universitas Sam Ratulangi Manado dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 557 nm, dengan pelarut HCl. Hasil penelitian yang diperoleh yaitu dari semua sampel yang diperoleh dari 6 penjual yang berbeda, semuanya positif mengandung rhodamin B (Longdong *et al.*, 2017).

Alesso *et al.*, pada tahun 2012 melakukan penelitian tentang *micelles mediated separation fluorimetric methodology for rhodamin B determination in condiments, snacks, and candies*. Metode yang digunakan adalah HPLC dengan menggunakan kolom C18 dengan panjang kolom 250 nm x 4,0 nm. Detektor yang digunakan adalah *Beckman System Gold 168 diode array*, dengan fase gerak yang digunakan adalah asetonitril dan sodium perklorat dalam air, disesuaikan dengan pH 4.0 dengan asam perklorat. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa 7 dari 9 sampel yang dianalisis terdapat rhodamin B. Metode ini telah divalidasi dengan kondisi analisis yaitu menggunakan detektor UV-Vis dengan  $\lambda=555$  nm dan waktu retensi = 9,15 menit menggunakan metode penambahan standar (Alesso *et al.*, 2012).

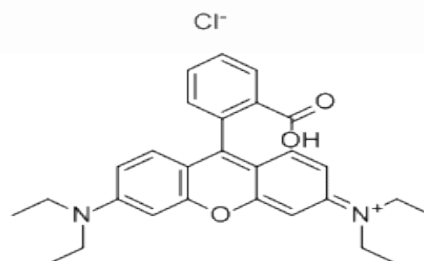
Wijaksono pada tahun 2018 melakukan penelitian tentang Validasi metode analisis rhodamin B dalam sirup menggunakan metode

spektrofluorometri. Panjang gelombang emisi yang digunakan yaitu 570 nm dan panjang gelombang eksitasi 550 nm. Optimasi pelarut dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol, metanol, dan akuades, dan etanol memiliki intensitas yang paling tinggi sehingga digunakan sebagai pelarut dalam penelitian ini. Hasil dari validasi yaitu metode spektrofluorometri memenuhi semua persyaratan validasi metode sehingga dapat dikatakan metode spektrofluorometri memiliki validitas yang baik dan metode spektrofluorometri dapat digunakan untuk menentukan kadar rhodamin B dalam sirup. Hasil analisis sirup dengan metode spektrofluorometri menunjukkan bahwa, tidak ada satupun sampel sirup yang dianalisis mengandung rhodamin B (Wijaksono, 2018).

## B. Landasan Teori

### 1. Rhodamin B

Rhodamin B adalah pewarna sintetis berbentuk serbuk kristal berwarna ungu kemerahan. Pada bentuk larutan konsentrasi tinggi, rhodamin B berwarna merah keunguan, dan konsentrasi rendah berwarna merah terang. Rhodamin B merupakan pewarna golongan ksanten basa dan terbuat dari meta dietil amino fenol dan ftalik anhidrida yaitu suatu bahan yang tidak bisa dimakan serta sangat berfluoresensi. Rhodamin B memiliki berbagai nama lain, yaitu: *tetraethyl 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. Nama kimianya adalah N-[9-(karboksifenil)-6-(dietilamino)-3H-ksanten-3-ylidene]-N-ethylethyhanaminium klorida



Gambar 2.1 Struktur kimia rhodamin B (Merck Index, 2006)

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

Rumus molekul dari rhodamin B yaitu  $C_{28}H_{31}ClNO_3$  dan berat molekulnya sebesar 479 g/mol (Gambar 2.1). Sangat larut dalam air dan alkohol, dan menghasilkan warna merah kebiruan dan fluoresensi yang kuat (Merck Index, 2006).

Rhodamin B dilarang digunakan pada makanan karena dapat mengakibatkan bahaya bagi kesehatan. Mengonsumsi makanan yang mengandung rhodamin B secara terus-menerus dapat mengakibatkan efek buruk dan bahkan kerusakan organ tubuh seperti substansi karsinogenik, mutagenik, tumorigen (Gresshma dan Reject, 2012).

Rhodamin B memiliki ikatan dengan klorin (Cl), senyawa klorin merupakan senyawa anorganik yang reaktif dan berbahaya. Selain terdapat ikatan rhodamin B dengan klorin, ada juga ikatan konjugasi. Ikatan konjugasi dari rhodamin B inilah yang dapat menyebabkan rhodamin B berwarna merah. Terdapat bahaya yang sama antara rhodamin B dan klorin, sehingga membuat adanya kesimpulan bahwa atom klorin yang ada pada rhodamin B dapat mengakibatkan 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 mengakibatkan toksik dan karsinogenik (Yamlean, 2011).

## 2. Spektrofluorometri

Spektrofotometri fluoresensi merupakan suatu metode analisis yang berdasarkan pada penyerapan molekul energi cahaya dalam satuan panjang gelombang dan emisi. Senyawa fluoresen memiliki dua spektrum yaitu spektrum eksitasi (panjang gelombang dan jumlah cahaya yang diserap) dan spektrum emisi (panjang gelombang dan jumlah cahaya yang dipancarkan). Spektrum ini sering disebut sebagai tanda fluoresensi senyawa majemuk atau sidik jari karena tidak ada dua senyawa yang

memiliki tanda fluoresensi yang sama. Prinsip ini yang menjadikan fluorometri sebagai metode analisis yang sangat spesifik (Naresh, 2014).

Fluorometri merupakan pengukuran fluoresensi. Alat yang digunakan untuk mengukur fluoresensi yaitu fluorometer atau fluorimeter. Fluorometer menghasilkan panjang gelombang cahaya yang diperlukan untuk membangkitkan analit, secara selektif mentransmisikan panjang gelombang cahaya yang dipancarkan, dan kemudian mengukur intensitas cahaya yang dipancarkan. Cahaya yang dipancarkan sebanding dengan konsentrasi analit yang diukur. Fluorometer menggunakan monokromator (spektrofluorometer), filter optik (filter fluorometer), atau sumber cahaya pita sempit (seperti LED atau laser) untuk memilih panjang gelombang eksitasi dan emisi (Naresh, 2014).

Prinsip spektrofotometri fluoresensi didasarkan pada fluoresensi dan fosforesensi, yaitu suatu proses emisi foton yang terjadi pada saat relaksasi molekuler dari keadaan elektron yang tereksitasi. Proses fotonik ini melibatkan transisi antara keadaan elektron dan vibrasi molekul fluoresen poliatomik (fluorofor). Fluorofor mempunyai peran penting dalam spektrofotometri fluoresensi. Fluorofor merupakan komponen dalam molekul yang dapat mengakibatkan suatu molekul dapat berfluoresensi. Terutama molekul yang mengandung cincin aromatik seperti tirosin, triptopan, fluoresein, dan lain-lain (Naresh, 2014).

Intensitas fluoresensi dapat diukur dengan suatu fluorometer filter sederhana. Berbagai macam instrumen dari yang paling sederhana (filter fluorometer) hingga yang paling kompleks yaitu spektrofotometer dapat digunakan. Komponen utama dari masing-masing instrument ini adalah:

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. Pada spektrofluorimeter biasanya digunakan lampu Xenon (150 W) yang memancarkan spektrum kontinyu dengan panjang gelombang 200-800 nm. Pada filter fluorometer (fluorimeter) digunakan lampu uap raksa

sebagai sumber cahaya dan energi eksitasi diseleksi dengan filter. Energi eksitasi diseleksi dengan monokromator eksitasi (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  $\mu$ l hingga 300  $\mu$ 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

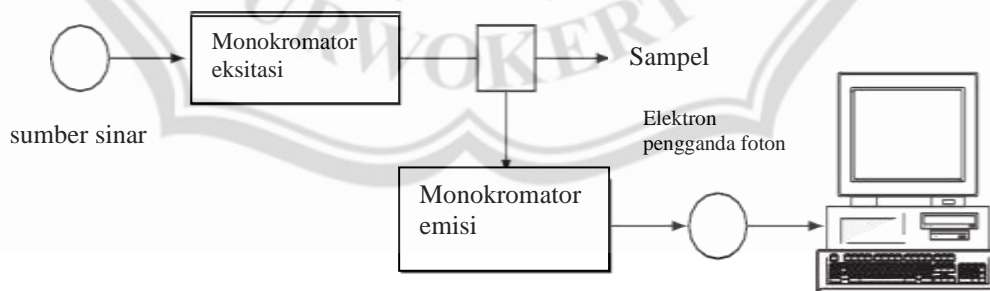
Pada umumnya fluorometer menggunakan tabung-tabung fotomultiplier sebagai detektor, banyak tipe dari jenis tersebut yang tersedia dan masing-masing mempunyai ciri khusus yang berkenaan dengan daerah spektral dengan kepekaan maksimum, menguntungkan dan derau secara elektrik. Arus foto diperbesar dan dibaca pada sebuah meter atau perekam. Seperti pada spektrofotometri, detektor yang biasa digunakan adalah fotomultiplier tube. Pada umumnya, detektor ditempatkan di atas sebuah poros yang membuat sudut  $90^\circ$  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. Filter

Pada spektrofлуorometri terdapat dua filter yaitu untuk menyeleksi panjang gelombang dari eksitasi dan menyeleksi panjang gelombang dari emisi. Fluorometer filter pertama hanya meneruskan cahaya ultraviolet dari sumber cahaya yaitu radiasi dengan panjang gelombang yang cocok untuk eksitasi spesimen 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 (Mulja dan Suharman, 1995). Spektrofлуorimeter menggunakan sepasang monokromator (*grating*) untuk menyeleksi radiasi eksitasi dan emisi yang lebih akurat (memberikan kepekaan yang tinggi) sehingga permasalahan tersebut dapat diatasi (Mulja dan Suharman, 1995).

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).



**Gambar 2.2** Komponen spektrofлуorometer (Kealey dan Haines 2002)

Menurut Gandjar dan Rohman (2007), Ada beberapa variabel yang berpengaruh pada fluoresensi dan fosforesensi, yaitu:

1. Hasil kuantum (efisiensi kuantum/*quantum yield*)

Efisiensi kuantum merupakan bilangan yang menyatakan perbandingan antara jumlah molekul yang berfluoresensi terhadap jumlah total molekul yang tereksitasi. Besarnya efisiensi kuantum ( $\Phi$ ) adalah:

$$0 \leq \Phi \leq 1.$$

Nilai  $\Phi$  yang diharapkan adalah mendekati 1, yang berarti efisiensi fluoresensi sangat tinggi.

#### 2. Pengaruh kekakuan struktur

Fluoresensi dapat terjadi dengan baik jika molekul-molekul memiliki struktur yang kaku (*rigid*).

#### 3. Pengaruh suhu

Bila suhu makin tinggi maka efisiensi kuantum fluoresensi makin berkurang. Hal ini disebabkan pada suhu yang lebih tinggi, tabrakan-tabrakan antar molekul atau tabrakan molekul dengan pelarut menjadi lebih sering; yang mana pada peristiwa tabrakan, kelebihan energi molekul yang tereksitasi dilepaskan ke molekul pelarut. Jadi semakin tinggi suhu maka terjadinya konversi ke luar besar, akibatnya efisiensi kuantum fluoresensi ( $\Phi$ ) berkurang.

#### 4. Pengaruh pelarut

★ Ada 2 hal yang perlu diperhatikan terkait dengan pengaruh pelarut pada fluoresensi, yaitu:

- 1) Jika pelarut makin polar maka intensitas fluoresensi makin besar. Alasannya, semakin polar pelarut maka akan menurunkan energi proses transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  sehingga energi transisi ini lebih kecil dibanding energi  $n \rightarrow \pi^*$ , akibatnya intensitas fluoresensi semakin besar.
- 2) Jika pelarut mengandung atom-atom yang berat (Br, I, atau senyawa yang lain) maka interaksi antara gerakan spin dengan gerakan orbital elektron-elektron ikatan lebih banyak terjadi; dan hal tersebut akan memperbesar laju lintasan antar sistem atau mempermudah pembentukan triplet sehingga kebolehjadian fluoresensi lebih kecil, sedangkan kebolehjadian fosforesensi menjadi lebih besar.

### 5. Pengaruh pH

pH berpengaruh pada letak keseimbangan antara bentuk terionisasi dan bentuk tak terionisasi. Sifat fluoresensi dari kedua bentuk itu berbeda.

### 6. Pengaruh oksigen terlarut

Adanya gas oksigen akan memperkecil intensitas fluoresensi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya oksidasi senyawa karena pengaruh cahaya (*fotokemikali induced oxidation*). Pengurangan intensitas fluoresensi disebut pemadaman sendiri atau *quenching*. Molekul oksigen bersifat paramagnetik, dan molekul yang bersifat seperti ini dapat mempengaruhi dan mempermudah lintasan antar sistem sehingga memperkecil kemungkinan fluoresensi, sebaliknya memperbesar kebolehterjadi fosforesensi.

### 7. Pemadaman sendiri (*self quenching*) dan penyerapan sendiri

Pemadaman sendiri disebabkan oleh tabrakan-tabrakan antar molekul zat itu sendiri. Tabrakan-tabrakan itu menyebabkan energi yang tadinya akan dilepaskan sebagai sinar fluoresensi, ditransfer ke molekul lain, akibatnya intensitas berkurang.

## 3. Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya, antara lain:

### a. Kecermatan (akurasi)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Akurasi dikatakan baik jika hasil analisis memberikan nilai perolehan kembali 90-110% (untuk bahan obat kadar

kecil), 95-105% (untuk kadar obat yang lebih besar), dan 80-120% (untuk bioanalisis) (Harmita, 2004). Kecermatan suatu metode analisis dapat ditentukan oleh salah satu cara berikut:

- 1) Menganalisis sampel dengan konsentrasi yang telah diketahui dan membandingkan nilai yang terukur dengan nilai sebenarnya.
- 2) *Spiked – placebo* (produk matrix) metode *recovery*. Dalam metode ini, jumlah yang diketahui konstituen aktif murni ditambahkan ke formulasi kosong (sampel yang berisi semua bahan lainnya kecuali zat aktif) campuran yang dihasilkan diuji, dan hasil yang diperoleh dibandingkan dengan hasil yang diharapkan.
- 3) Metode standar tambahan. Dalam metode ini, sampel diuji, jumlah yang diketahui ditambahkan dengan konstituen aktif yang murni, dan sampel diuji lagi. Perbedaan antara hasil dua tes dibandingkan dengan jawaban yang diharapkan (Ravichandran *et al.*, 2010).

#### **b. Keseksamaan (presisi)**

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual (Harmita, 2004). Keseksamaan mencerminkan kedekatan kesepakatan dari serangkaian pengukuran antara pengukuran seri yang diperoleh dari beberapa sampel, dari sampel yang sama, di bawah kondisi yang sama, di waktu yang sama (Daksh *et al.*, 2015). Nilai RSD yang baik adalah kurang dari 2,5%, sedangkan untuk konsentrasi satu per seribu adalah kurang dari 5%, untuk konsentrasi per sejuta adalah 16% dan untuk konsentrasi satu per semiliar adalah 32% (Harmita, 2004).

#### **c. 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. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan,

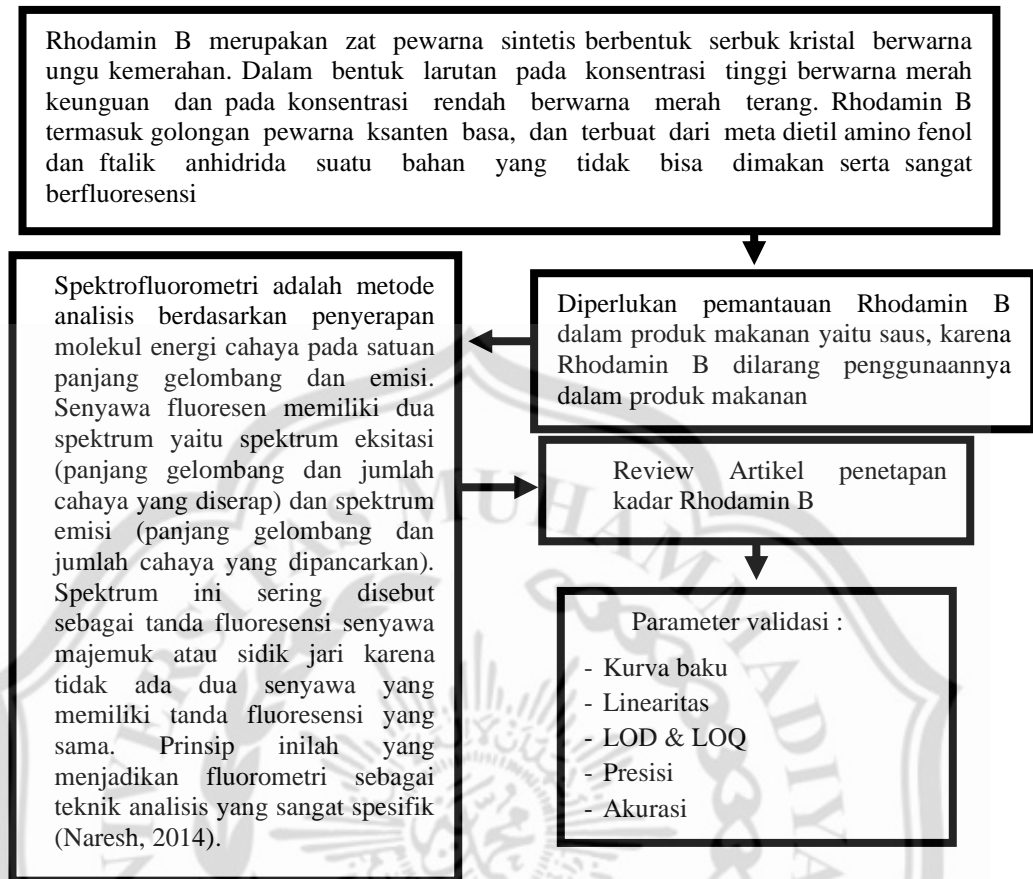
keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Harmita, 2004). Pedoman internasional conference on harmonization (ICH) menyarankan mengevaluasi minimal lima konsentrasi untuk menilai linearitas dan jangkauan yang lebih luas dari konsentrasi dan pendekatan lain harus dibenarkan (Daksh *et al.*, 2015). Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $r = -1$  tergantung dari arah garis (Harmita, 2004).

**d. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)**

Batas deteksi dalam prosedur analisis dilakukan untuk mengetahui jumlah analit paling rendah dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak perlu kuantitatif (Ravichandran *et al.*, 2010). Batas kuantitas adalah parameter kuantitatif yang diuji untuk tingkat rendah komponen dalam sampel seperti kotoran dalam obat jumlah besar dan produk degradasi dalam obat-obatan (Ravichandran *et al.*, 2010).

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear 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 residu ( $Sy/x$ ) (Harmita, 2004).

### C. Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka Konsep.

### D. Hipotesis

Metode Spektrofluorometri dapat digunakan untuk penetapan kadar rhodamin B pada saus sambal dan saus tomat karena sifat rhodamin B yang dapat berfluorosensi.