

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rhodamin B merupakan zat warna xantin yang biasanya digunakan di industri kertas, cat, tekstil, kulit dan porselen.¹ Zat warna ini dapat memberikan warna yang lebih terang, seragam, stabil, penggunaannya lebih praktis dan harga yang lebih murah.² Rhodamin B masih terdapat dalam makanan karena keunggulan rhodamin B dibandingkan pewarna makanan. Pewarna makanan membutuhkan lebih banyak zat warna untuk memberikan warna yang menarik serta cenderung tidak stabil atau berubah warna seiring pengolahan makanan.²

Sebagai salah satu pewarna sintetis Rhodamin B atau C.I. Food Red 15 dapat menyebabkan reaksi alergi dan asma, kerusakan DNA, gangguan pernapasan, tumor tiroid, kerusakan kromosom, dan sakit perut.³ Permenkes RI No.239/Menkes/Per/V/85 tentang Zat Warna Tertentu yang dinyatakan Sebagai Bahan Berbahaya telah melarang penggunaan rhodamin B dalam makanan, obat, dan kosmetika.⁴

Hasil pemeriksaan oleh Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) terhadap 21 makanan jenis kerupuk, ditemukan 4 diantaranya mengandung rhodamin B. Pemeriksaan ini dilakukan pada bulan Mei 2021 di Pasar Tradisional Kabupaten Blora.⁵ Pada waktu yang bersamaan, BPOM Samarinda juga menemukan 2 jajanan takjil mengandung Rhodamin B dari total 81 sampel yang diperiksa.⁶ Pemeriksaan oleh BPOM di lapangan umumnya menggunakan

penyinaran cahaya UV-VIS dan *test-kit* Rhodamin B yang bersifat kualitatif.^{5,6} Metode analisis test kit Rhodamin B memiliki nilai batas minimal deteksi atau *Limit of Detection* (LoD) yaitu 50 mg/kg.⁶ Sehingga test-kit tidak dapat digunakan untuk kadar Rhodamin B di bawah LOD tersebut.

Permatasari, dkk. (2014) menemukan Rhodamin B dalam makanan sebanyak 2,18–3,90 mg/kg menggunakan spektrofotometer UV-VIS-Vis.⁷ Jumlah lebih kecil, 0,00546 mg/kg dalam bubuk cabai dan 0,0043 mg/kg dalam merica ditemukan oleh Bakheet, A., dkk. (2017).⁸ Bakheet, A., dkk. (2017) menggunakan metode spektrofotometer fluoresensi yang disertai dengan teknik praanalisis *Solid-Phase Extraction* (SPE).⁸ Penelitian tersebut menunjukkan masih terdapat rhodamin B dalam jumlah sangat kecil pada makanan sehingga diperlukan teknik analisis yang tepat untuk dapat menganalisis *trace element* tersebut.

Teknik praanalisis diketahui mampu meningkatkan *recovery* (perolehan kembali) senyawa rhodamin B dalam sampel sehingga dimungkinkan untuk dapat menganalisis *trace element* dengan lebih akurat.³ Oleh karena itu, kami bermaksud untuk mengetahui berbagai metode analisis yang disertai praanalisis serta bagaimana validasi metode analisisnya. Sehingga, informasi yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis rhodamin B dalam jumlah kelumit pada makanan. Artikel yang ditelaah yaitu artikel ilmiah internasional tentang metode analisis rhodamin B pada makanan yang disertai dengan teknik praanalisis. Serta terdapat pengukuran validasi metode analisis seperti akurasi dan sensitivitas untuk menunjukkan kemampuan praanalisis dan instrumen yang digunakan. Data yang digunakan adalah artikel yang diterbitkan dalam rentang waktu 2016 hingga 2021.

1.2 Permasalahan Penelitian

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah dijelaskan di atas, maka perumusan masalah dalam *narrative review* ini adalah:

- 1) Bagaimana metode analisis rhodamin B pada makanan menggunakan kromatografi dan spektrofotometer yang disertai dengan teknik praanalisis?
- 2) Bagaimana validasi metode analisis rhodamin B pada makanan menggunakan kromatografi dan spektrofotometer yang disertai dengan teknik praanalisis?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan tersebut, tujuan penelitian ini yaitu.

- 1) Untuk mengetahui metode analisis rhodamin B pada makanan menggunakan kromatografi dan spektrofotometer yang disertai dengan teknik praanalisis.
- 2) Untuk mengetahui validasi metode analisis rhodamin B pada makanan menggunakan kromatografi dan spektrofotometer yang disertai dengan teknik praanalisis.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari *narrative review* ini yaitu menambah informasi ilmiah dan pengetahuan tentang metode analisis yang disertai dengan teknik praanalisis rhodamin B dalam makanan sebagai upaya analisis rhodamin B dalam jumlah kelumit. Serta menyajikan ringkasan yang dapat bermanfaat bagi peneliti atau lembaga pengawas obat dan makanan (BPOM) sebagai bahan pertimbangan untuk pengembangan metode analisis rhodamin B.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel I.1 Penelitian-penelitian sebelum terkait penelitian saat ini

Nama Penulis	Metode Penelitian	Hasil Penelitian
Rebane, R., dkk. A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrixes. <i>J Chromatogr A</i> . 2010, Vol. 1217. ⁹	<i>Narrative review</i>	metode penentuan pewarna Sudan I-IV lebih banyak menggunakan LC-UV-VIS-vis dan LC-MS.
Kanu, A. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: <i>A critical review</i> , <i>J Chromatogr A</i> . 2021, Vol. 1654. ¹⁰	<i>Narrative review</i>	Persiapan sampel yang digabungkan dengan HPLC yaitu SPE, LLE, kromatografi permeasi gel /GPC, Fast Easy Cheap Effective Coarse, Safe (QuEChERS), SPME, ultrasonic-assisted solvent extraction (UASE), dan microwave-assisted solvent extraction (MWASE) dalam penerapan terapi biologis, proteomik, lipidomik, metabolomik, kebersihan lingkungan/ industri, forensik, dll.
Guerra, E., dkk., Analysis of Dyes in Cosmetics: Challenges and Recent Developments. 2018. ¹¹	<i>Narrative review</i>	Berbagai metode analisis untuk menentukan pewarna sintesis dalam kosmetik merujuk pada jurnal internasional selama 10 tahun terakhir (2008–2018). Metode analisis yang banyak digunakan yaitu <i>miniaturized extraction method</i> dan instrumen kromatografi cair.

Penelitian yang akan dilakukan berbeda dengan penelitian diatas. Perbedaan tersebut adalah:

- 1) Matriks yang dipilih adalah makanan.
- 2) Menelaah metode analisis rhodamin B menggunakan kromatografi dan spektrofotometer yang disertai dengan teknik praanalisis.
- 3) Adanya pembaharuan metode analisis yang disertai praanalisis karena menggunakan artikel publikasi Januari 2016 hingga Desember 2021.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Makanan

Makanan atau pangan menurut UU RI No. 18 tahun 2012 adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk pertanian, perkebunan, kehutanan, perikanan, peternakan, dan perairan, baik yang diolah maupun tidak diolah yang diperuntukkan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk bahan tambahan pangan, bahan baku pangan, bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan, dan/atau pembuatan makanan atau minuman.¹² Makanan merupakan kebutuhan pokok manusia yang diperlukan setiap saat dan memerlukan pengolahan yang baik dan benar agar bermanfaat bagi tubuh.¹³

Jenis pangan dikelompokkan menjadi 3 berdasarkan cara memperolehnya, yaitu¹³. (1) Pangan segar yang belum mengalami pengolahan dan dapat dikonsumsi langsung ataupun tidak langsung, yakni dijadikan bahan baku pangan seperti sayur dan buah segar.¹³ (2) Pangan olahan yang merupakan hasil proses pengolahan dengan metode tertentu, dengan atau tanpa bahan tambahan. Bahan olahan dibagi atas dua macam, yaitu pangan olahan siap saji dan pangan olahan kemasan yang masih memerlukan tahapan pengolahan lanjutan untuk dapat dimakan.¹³ (3) Pangan olahan tertentu yang diperuntukkan untuk kelompok tertentu dalam upaya memelihara atau meningkatkan kualitas kesehatan.¹³ Contoh ekstrak tanaman mahkota dewa untuk diabetes melitus, susu rendah lemak untuk orang yang menjalankan diet rendah lemak, dan sebagainya.¹³

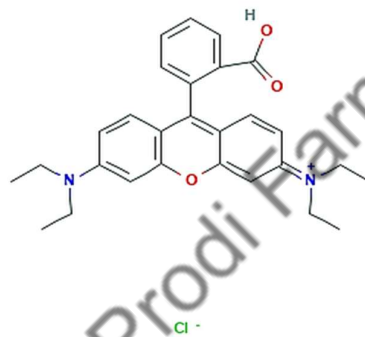
2.2 Rhodamin B

Rhodamin B merupakan zat warna sintetis berbentuk serbuk kristal dan berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, bila dilarutkan dalam air akan berwarna merah kebiruan. Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ dan berat molekul 479,06 gr/mol. Titik lebur rhodamin B adalah $165^{\circ}C$ dan sangat larut dalam air dan alkohol, serta dapat larut dalam benzena dan eter. Rhodamin B adalah zat warna dari golongan pewarna kationik (*cationic dyes*).¹⁴

Rhodamin B biasanya digunakan sebagai pewarna untuk tekstil, kertas, sutra dan reagen dalam analisis antimon, bismuth, kobalt dan lainnya. Nama lain Rhodamin B adalah *basic violet 10*, *acid brilliant pink B*, *calcozine red bx*, C.I. 45170 dan *diethyl-m-amino-phenolphthalein hydrochloride*. Rhodamin B stabil pada temperatur dan tekanan normal, dan pada pemanasan akan menghasilkan zat berbahaya berupa oksida-oksida nitrogen, senyawa karbon, dan senyawa terhalogenasi.¹⁴

Peraturan Pemerintah RI No.28, Tahun 2004 menyatakan Rhodamin B sebagai zat warna tambahan yang dilarang penggunaannya dalam produk-produk pangan.¹⁵ Permenkes RI No.239/Menkes/Per/V/85 tentang Zat Warna Tertentu yang dinyatakan Sebagai Bahan Berbahaya telah melarang penggunaan rhodamin B dalam makanan, obat, dan kosmetika.⁴ Rhodamin B bersifat racun bagi tubuh manusia yang dapat masuk ke dalam tubuh ketika bercampur dengan makanan. Rhodamin B termasuk dalam zat xenobiotik yang dimetabolisme oleh sitokrom P450 di dalam tubuh dan akan memproduksi radikal bebas seperti ROS (*reactive oxygen species*).¹⁶ Sehingga rhodamin B dapat menyebabkan stres oksidatif, cedera

sel, dan meningkatkan apoptosis pada jaringan otak kecil dan batang otak yang berakibat timbulnya kelainan fungsional seperti gangguan koordinasi dan belajar, gangguan siklus tidur, dan kontrol pernapasan/kardiovaskular.¹⁶ Penggunaan Rhodamin B dalam makanan untuk waktu yang lama menyebabkan disfungsi hati atau kanker, dan jika terpapar dalam jumlah besar dalam waktu singkat, dapat menyebabkan keracunan akut.¹⁶



Gambar 1. Rumus bangun Rhodamin B¹⁷

Struktur dasar molekul rhodamin B terdiri dari tiga cincin kromofor xanten yang dimodifikasi dengan dua amina dan bagian benzena karboksilat yang berorientasi kira-kira tegak lurus terhadap bidang xanten seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Rhodamin B memiliki gugus karboksil (-COOH) pada benzena karboksilat. Dan pada cincin kromofor xanten terdapat hidrogen untuk membentuk metil (-CH₃). Serta gugus etil untuk membentuk gugus dietilamino (-N-(C₂H₅)₂).¹⁸ Serapan maksimum rhodamin B berada pada panjang gelombang 554 nm dan emisi maksimum pada 581 nm. Kromofor pada rhodamin B memiliki pengaruh terhadap absorpsi rhodamin karena kemampuannya mendonor pada kromofor xanten tiga cincin atau menarik elektron pada cincin benzena.¹⁸

Rhodamin B dapat menyebabkan efek karsinogenik sehingga dalam penggunaan jangka panjang bisa memicu penyakit kanker. Beberapa peneliti telah menguji toksisitas rhodamin B yang dilakukan terhadap mencit dan tikus dengan injeksi subkutan dan melalui oral. Hasilnya rhodamin B menimbulkan karsinogenik pada tikus ketika diinjeksi subkutan, yaitu munculnya sarkoma lokal. Sedangkan melalui intra vena didapatkan nilai *Letal Doses* (LD) 5089,5 mg/kg yang ditandai dengan gejala pembengkakan hati, ginjal dan limfa yang diikuti dengan perubahan anatomi berupa pembesaran organ. Percobaan melalui oral pada hewan juga mempunyai efek karsinogenik.²⁰

2.3 Metode Analisis

Proses-proses yang terjadi selama analisis hendaklah diperhatikan agar analisis bisa mendapatkan data yang valid. Proses analisis dimulai dari pengambilan sampel (*sampling*), penyimpanan dan pengawetan sampel, penyiapan atau praanalisis sampel, analisis hingga pengolahan data.¹⁹

2.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel atau *sampling* adalah proses pengurangan massa untuk memperoleh sejumlah tertentu sampel yang mewakili populasi untuk menghasilkan sampel yang siap diperlakukan, biasanya disebut dengan sampel analitik.¹⁹

2.3.2 Penyiapan Sampel

Penyiapan sampel atau praanalisis merupakan perlakuan terhadap sampel analitik untuk menjadi sesuatu yang siap untuk dianalisis dengan teknik analisis tertentu, seperti teknik spektrofotometer atau kromatografi.¹⁹ Pengaruh matriks

merupakan masalah utama dalam proses ekstraksi analit. Hal ini didefinisikan sebagai pengaruh suatu sifat sampel terhadap efisiensi perolehan kembali atau *recovery*. Sebagai contoh, analit (komponen aktif obat) dapat terjebak dalam komponen lain yakni matriks, sehingga konsentrasi obat-obat bebas menjadi lebih rendah dan sukar dideteksi.¹⁹

Praanalisis sampel dapat dicapai dengan menggunakan berbagai macam teknik. Tujuan utama setiap teknik umumnya sama, yaitu (1) menghilangkan zat pengganggu (*interference*) yang potensial, (2) meningkatkan konsentrasi analit atau *enrichment concentration* (praanalisis), dan (3) untuk mengubah analit menjadi bentuk yang sesuai (jika diperlukan) sehingga dapat dianalisis dengan metode tertentu.¹⁹ Ada beberapa teknik yang sering digunakan dalam penyiapan sampel, yaitu ekstraksi langsung, ekstraksi padat-cair, ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat atau *Solid-Phase Extraction* (SPE) dan ekstraksi mikro fase padat atau *Solid-Phase Microextraction* (SPME).¹⁹

2.3.2.1 Solid Phase Extraction (SPE)

SPE adalah teknik ekstraksi berdasarkan transfer spesies kimia dari fase air (sampel) ke situs aktif fase padat (adsorben) yang terkandung dalam kolom, kartrid atau disk.²⁰ SPE memiliki keunggulan di antara teknik ekstraksi konvensional karena efisien dalam menghilangkan zat pengganggu dan praanalisis analit yang tinggi.²⁰ Selain itu, SPE menawarkan banyak keuntungan lain dalam studi spesiasi seperti manipulasi sampel yang lebih sedikit, mudahnya aplikasi di lapangan, mampu diaplikasikan ke sampel yang berbeda dan otomatisasi yang mudah. SPE merupakan metode yang paling banyak digunakan

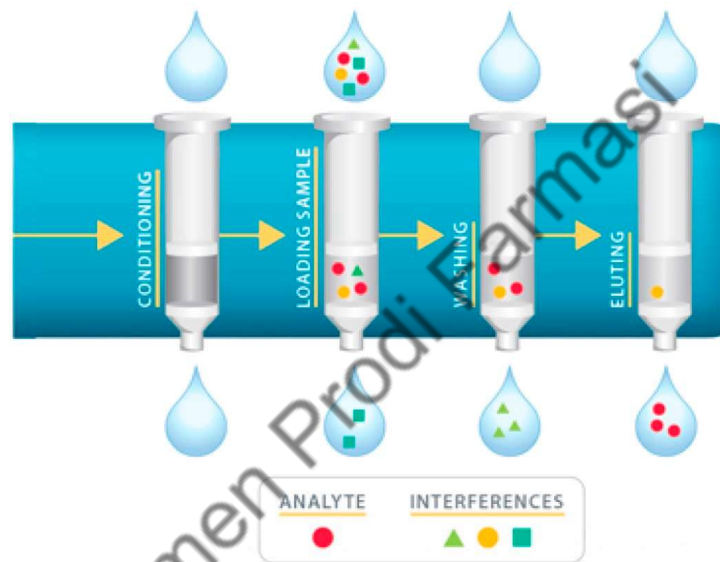
untuk teknik praanalisis dalam memberikan ekstrak bersih dan hasil yang reproduksibel.²⁰

SPE dikelompokkan berdasarkan material yang digunakan sebagai adsorben. Pemilihan sorben yang tepat mampu mengekstrak berbagai analit dalam matriks kompleks merupakan keberhasilan suatu metode. Saat ini, berbagai material telah dikembangkan yaitu (1) *molecularly imprinted polymer* (MIP); (2) cairan ionik atau *ionic liquid* (IL); (3) imunosorben (IS), (4) bahan berbasis karbon, (5) magnetik, (6) *covalent organic framework* (COF), dan lain-lain.²¹ Prosedur dasar SPE terdiri dari pemuatan larutan sampel ke adsorben yang mampu menahan analit target, mencuci komponen yang tidak diinginkan, dan mengelusi analit yang diinginkan dengan pelarut lain ke dalam tabung pengumpul. Prosedur SPE dapat ditunjukkan pada Gambar 2.²¹

1) *Molecularly Imprinted Polymer*

Molecularly imprinted polymer (MIP) adalah struktur makromolekul tiga dimensi buatan yang meniru sistem kerja antibodi dan reseptor biologis. Keuntungan dari MIP dalam prosedur SPE adalah selektivitas dan akurasi yang tinggi, sehingga memberikan LOD yang rendah.²¹ MIP disintesis melalui proses polimerisasi yang menggunakan molekul template dan monomer fungsional. Kopolimerisasi dibantu dengan adanya zat pengikat silang dan inisiator dalam pelarut porogenik. Setelah proses polimerisasi, template dihilangkan, dan akan menyisakan situs pengikatan dengan gugus fungsi yang diposisikan secara strategis. Situs pengikatan ini berpotensi untuk berikatan kembali dengan molekul template atau molekul lain, dengan

struktur molekul yang mirip dengan molekul template, dengan cara yang kuat dan selektif.²² MIP stabil secara kimia, mekanik dan suhu yang tinggi. Selektivitas yang diciptakan telah menjadikan MIP diaplikasikan dalam ekstraksi, praanalisis, dan pemisahan banyak senyawa berbeda dalam berbagai pendekatan kimia analitik.²²

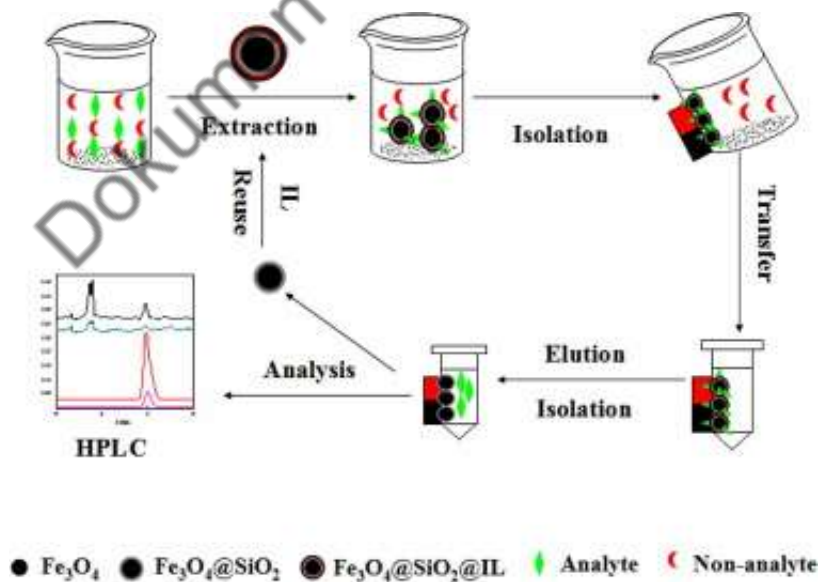


Gambar 2. Prosedur SPE²¹

2) *Magnetic Solid-Phase Extraction (MSPE)*

Magnetic Solid Phase Extraction (MSPE) merupakan teknologi preparasi sampel SPE yang berbasis interaksi nanopartikel magnetik (MNP), dan hanya membutuhkan satu adsorben magnetik atau magnetisable tanpa penambahan kolom ekstraksi.²³ Prosedur ini didasarkan pada penggunaan adsorben magnetis yang dicampurkan langsung ke dalam larutan atau suspensi yang mengandung analit. Kemudian medan magnet eksternal

ditempelkan di luar bejana ekstraksi untuk pemisahan sorben dari analit yang teradsorpsi.²¹ MNP yang digunakan adalah magnetite (Fe_3O_4) dan maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) dengan luas permukaan yang tinggi dan sifat superparamagnetisme yang kuat sehingga memberikan kemampuan adsorpsi yang tinggi. Fe_3O_4 merupakan salah satu oksida besi yang paling banyak ditemukan dan memiliki sifat magnetisme yang paling kuat dibandingkan oksida besi lainnya. Beberapa kelemahan dari SPE terkait dengan pengepakan adsorben, seperti penyumbatan dan tekanan tinggi, dapat dihindari dalam proses MSPE ini. Selain itu, sebagian besar adsorben magnetik dapat didaur ulang dengan mudah dan digunakan kembali, yang berarti sangat menghemat biaya dan melindungi lingkungan dari tambahan pelarut berbahaya.²³



Gambar 3. Prosedur MSPE²⁴

MNP Fe₃O₄ memiliki gugus fungsi yang dapat berperan sebagai situs modifikasi melalui polimerisasi langsung, modifikasi gugus fungsi, dan/atau fungsionalisasi. Berbagai polimer telah digunakan untuk memodifikasi Fe₃O₄ sebagai sorben untuk analisis rhodamin B dalam sampel makanan.⁸ Gambar 3 merupakan salah satu teknik MSPE menggunakan MNP Fe₃O₄@SiO₂ untuk ekstraksi sampel bubuk cabai dan *chinese prickly ash* yang selanjutnya akan dideteksi menggunakan HPLC.²⁴

3) *Dispersive Solid-Phase Extraction (DSPE)*

Ekstraksi fase padat dispersi atau *Dispersive Solid Phase Extraction (DSPE)* adalah modifikasi dari SPE.²⁵ Secara teknik DSPE dilakukan dengan memberikan kontak langsung antara sampel cair dan adsorben SPE melalui proses dispersi sehingga tercapai kesetimbangan, kemudian dilakukan pemisahan fisik (dengan penuangan atau penyaringan) dari fase padat dan cair, dan analit target akan terkumpul dalam supernatan.^{25,26} Dalam teknik ini, adsorben ditambahkan langsung ke larutan sampel tanpa proses manipulasi sampel seperti *conditioning*, sehingga prosedur ekstraksi hanya mengandalkan pengocokan dan sentrifugasi yang memungkinkan waktu ekstraksi yang singkat dan penggunaan pelarut yang minimal.^{26,27}

Mikroekstraksi fase-padat dispersi magnetik atau *Magnetic Dispersive micro solid-phase extraction (MD- μ -SPE)* merupakan miniaturisasi DPSE berdasarkan bahan mikro-sorben magnetik.²⁵ Teknik MD- μ -SPE yaitu dispersi sorben dalam larutan sampel, ekstraksi dengan adsorpsi, pemisahan sorben dari larutan menggunakan medan magnet eksternal, dan desorpsi

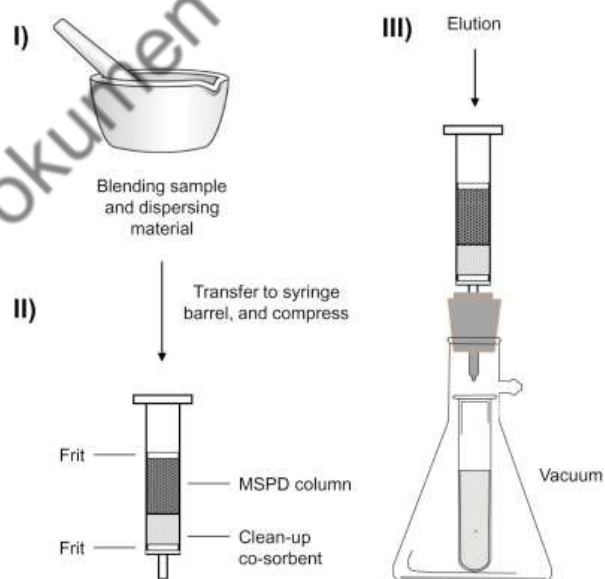
berikutnya menggunakan pelarut yang sesuai.²⁵ MD- μ -SPE sangat menyederhanakan prosedur SPE dan meningkatkan efisiensi ekstraksi, karena kontak langsung sorben dengan analit memungkinkan adsorpsi yang selektif pada permukaan.²⁸ Selain itu terdapat teknik ekstraksi *ultrasound-assisted dispersive solid-phase microextraction* (dSPME) menggunakan *ionic liquid-coated multiwalled carbon nanotube* (IL-MWCNT) atau UAD- μ -SPE sebagai miniaturisasi DSPE yang menggunakan bantuan ultrasound.²⁷

4) ***Layered Nanofiber Solid-Phase Extraction (LFSPE)***

LFSPE merupakan pengembangan dari SPE serat padat atau *packed-fiber* SPE (PFSPE) yang memberikan *recovery* lebih tinggi dan penggunaan pelarut yang sedikit. Penerapan nanofiber sebagai sorben SPE dalam praanalisis sampel dapat memisahkan analit dari matriks secara efektif dan mengkonsentrasikan analit. LFSPE dapat mengatasi masalah heterogenitas dalam kerapatan pengepakan radial PFSPE yang menyebabkan sampel lengket sehingga migrasi sampel dalam sorben menjadi terhambat, dan dapat menyebabkan matriks menyumbat kolom. Prinsip LFSPE yaitu membagi lapisan sorben menjadi struktur multi-lapisan untuk memberikan pengepakan radial dan aksial yang seragam, dan memisahkan aliran fase gerak dengan lapisan yang terisolasi untuk meningkatkan kecepatan larutan sampel melalui lapisan sorben.²⁹ Bahan *nanofiber* memiliki luas permukaan spesifik yang tinggi sehingga tersedia situs aktif yang banyak untuk efisiensi ekstraksi.³⁰

5) *Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD)*

Berbeda dari kebanyakan metode preparasi sampel, pada MSPD, proses ekstraksi tidak terjadi pada media cair, dan perpindahan massa analit dilakukan dengan cara menggiling sampel dengan sorben dispersan dalam mortar.³¹ Keunggulan MSPD yaitu sederhana (tidak memerlukan instrumentasi atau peralatan khusus) dan *ruggedness* yang lebih besar (yaitu, sedikit perubahan nilai *recovery* ketika perubahan signifikan diterapkan, misalnya, jumlah C18, waktu interaksi yang berbeda setelah fortifikasi, pelarut elusi yang berbeda dan sorben yang berbeda) dan efek matriks yang lebih sedikit (kekasaran) dibandingkan dengan metode preparasi sampel lainnya.³²



Gambar 4. Prosedur MSPD³²

Prosedur dasar dan prinsip fisik MSPD adalah I) sampel dicampur dengan bahan pendispersi dalam mortar dengan alu; II) bubuk yang dihomogenisasi dipindahkan ke dalam kartrid SPE, dan dikompresi; III) elusi dengan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai dibantu dengan pompa vakum (Gambar 4).³² Tidak seperti SPE, di mana sampel dipertahankan dalam beberapa milimeter pertama pada sorben, pada MSPD, sampel tersebar secara homogen di seluruh kolom ekstraksi dan mekanisme retensi berdasarkan sifat partisi, adsorpsi, dan kromatografi pasangan ion.³²

2.3.2.2 Liquid Phase Extraction (LPE)

Ekstraksi fase cair atau *liquid-phase extraction* (LPE) merupakan teknik penyiapan sampel klasik yang digunakan sebagai cara untuk 1) mengekstraksi analit 2) *clean-up* atau membersihkan matriks, 3) mengubah pelarut sehingga pelarut yang dituju kompatibel dengan teknik analisis yang digunakan.¹⁹ Berikut penerapan ekstraksi cair-cair untuk praanalisis rhodamin B pada makanan.

1) *Deep Eutectic Solvent* (DES)

DES merupakan teknik yang menjanjikan karena persiapan yang mudah, biaya rendah, tekanan uap yang dapat diabaikan, non-toksitas, dan biodegradabilitas. DES terdiri dari dua atau tiga komponen pelarut yang murah dan aman bagi lingkungan serta memiliki titik leleh yang rendah dibandingkan dengan komponen penyusunnya. DES saat ini adalah jenis pelarut polar dan larut dalam air yang potensial untuk mengekstrak analit dari sampel ber-fase minyak.³³ DES biasanya disintesis dengan mencampurkan akseptor ikatan hidrogen dan donor ikatan hidrogen yang kemudian diikuti

dengan pemanasan selama 30-90 menit. Hal ini memberikan sifat fisikokimia yang mirip dengan IL seperti stabilitas kimia dan termal, tidak mudah terbakar, dan toksisitas rendah. Namin lebih unggul daripada IL berdasarkan karakteristik sintetis sederhana, lebih murah, lebih biodegradable dan kurang beracun bagi manusia dan lingkungan.³³

2) VASM-DLPME

Prinsip teknik *Vortex-assisted supramolecular-based dispersive liquid phase microextraction* atau VASM-DLPME adalah berdasarkan pada partisi analit antara pelarut (berstruktur nano berbasis alkil) dan sampel.³⁴ Supramolekul menyediakan berbagai jenis interaksi (seperti interaksi hidrofobik, ionik, dan ikatan hidrogen) dengan senyawa organik dan kompleks hidrofobik logam dengan ligan. Interaksi ini penting untuk mengekstraksi rhodamin B dari fase air ke fase pelarut supramolekul untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi. *Vortex* mendorong konversi pelarut menjadi droplet kecil yang terdispersi sehingga mempercepat ekstraksi dan pengayaan analit.³⁴

Langkah pertama adalah mencampurkan ekstrak dan pelarut pendispersi dengan komposisi yang tepat ke dalam sampel. Pelarut ekstraksi didispersikan sebagai droplet ke dalam sampel, maka analit target akan terkonsentrasikan. Langkah kedua terdiri dari sentrifugasi larutan keruh yang terbentuk, setelah itu analit mengendap dan dapat dikumpulkan untuk deteksi selanjutnya. Beberapa pertimbangan yang perlu diperhatikan mengenai DLPME adalah pendispersi harus benar-benar dapat bercampur dengan fase

air; ekstraktn harus memiliki potensi untuk mengekstraksi analit, larut dalam pelarut pendispersi dan kurang larut dalam air; dan, untuk memungkinkan pemisahan fase, densitas pelarut ekstraksi harus berbeda dengan air.³⁵

3) CI-SHS

Teknik *Effervescent CO₂-tablet induce switchable hydrophilicity solvent* (CI-SHS) dilakukan berdasarkan pelarut SHS yang *reversible* atau dapat berubah kelarutan, dari memiliki daya kelarutan yang buruk dengan air menjadi memiliki daya larut yang sangat baik terhadap air. SHS (basa amina *N, N-Dimethyl cyclohexylamine*) didispersikan ke dalam larutan berdasarkan reaksi tablet CO₂ (natrium karbonat dan asam sitrat) untuk meningkatkan area kontak antara dua media, yang mana dapat meningkatkan kapasitas ekstraksi analit dari larutan ke *switchable solvent*.³⁶ Agen reaksi effervescent tablet CO₂ berperan utama dalam pendekatan praanalisis CI-SHS dengan mengubah sifat polaritas dari tidak larut menjadi larut dalam larutan berair. Natrium karbonat dan asam sitrat digunakan untuk membuat prekursor effervescent tablet CO₂. Campuran natrium karbonat dan asam sitrat dimungkinkan digunakan sebagai media buih yang stabil untuk menurunkan nilai pH dan mengasamkan larutan sampel untuk ekstraksi rhodamin B.³⁶ Agen effervescent (Na₂CO₃ dan C₆H₈O₇) sebagai tablet CO₂ dimasukkan ke dalam sampel maka akan terbentuk larutan gelembung keruh akibat reaksi tablet effervescent CO₂. Hasilnya, pelarut SHS yang awalnya tidak larut menjadi *switched on* atau terdispersi dikarenakan reaksi CO₂ dengan pelarut SHS. Selama proses ini, rhodamin B akan terperangkap dalam ekstraktn SHS.

Kemudian larutan akan kembali *switched off* ke bentuk hidrofobik (tidak larut/tidak terdispersi) melalui pemanasan untuk menghilangkan CO₂. Maka fase yang kaya rhodamin B akan berada dilapisan atas dan siap untuk dianalisis pada tahap berikutnya.³⁶

2.3.3 Analisis

Proses analisis dilakukan dengan memilih metode analisis yang sesuai. Saat ini berbagai jenis metode analisis telah banyak dikembangkan dengan karakteristik yang berbeda-beda, seperti kromatografi dan spektrofotometer.¹⁹

2.3.3.1 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang didasarkan pada perbedaan migrasi/distribusi masing-masing senyawa yang terpisah pada fase diam (*stationary-phase*) akibat pengaruh fase gerak (*mobile-phase*). Fase gerak dapat berupa gas atau zat cair dan fasa diam dapat berupa zat cair atau zat padat.³⁷ Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu pada suatu sampel di sejumlah bidang, antara lain: farmasi, lingkungan, bioteknologi, serta polimer dan industri-industri makanan.³⁸

Kegunaan umum HPLC adalah untuk isolasi sejumlah senyawa organik, anorganik maupun senyawa biologis; analisis ketidakmurnian (*impurities*); analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (*non-volatile*); penentuan molekul-molekul netral, ionik maupun zwitter ion; pemisahan senyawa-senyawa dalam *trace elements*, dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri.³⁸

HPLC sering digunakan karena memiliki banyak keunggulan. Metode ini unggul karena kemampuan pemisahan sehingga menghasilkan ketepatan analisis dan kepekaan yang tinggi serta cocok untuk memisahkan senyawa-senyawa nonvolatil yang tidak tahan pada pemanasan. Kecepatan dan efisiensi pemisahannya dipengaruhi oleh performa kolom, yaitu menggunakan kolom dengan ukuran dimensi dan partikel yang jauh lebih kecil dari kolom yang dipakai pada kromatografi kolom konvensional, sehingga agar fase gerak dapat mengalir pada kolom, fase gerak dipompa dengan tekanan tinggi. Selain itu juga terdapat sistem deteksi dengan kepekaan tinggi yang diintegrasikan dengan sistem kromatografi.³⁷ Zat terlarut dalam campuran dapat dipisahkan dengan HPLC karena kemampuan fase diam dan fase gerak tempat migrasi senyawa. Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik (*reverse phase*) tergantung polaritas relatif fase diam dan fase gerak.³⁸

Kromatogram HPLC merupakan hubungan antara waktu sebagai absis dan tanggap detektor sebagai ordinat pada sistem koordinat Cartesian, dimana titik nol dinyatakan sebagai saat dimulainya injeksi sampel. Molekul-molekul sampel yang diinjeksikan menuju kolom analisis tidak akan berkumpul pada suatu titik secara serempak dalam waktu yang sama. Demikian pula tiap-tiap molekul analit akan mengalami hambatan fase diam di dalam kolom dengan waktu yang berbeda. Oleh karena itu semua molekul analit tidak serempak keluar dari kolom.³⁷

2.3.3.2 Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah instrumen yang digunakan untuk mengukur transmisi optik atau karakteristik refleksi sampel pada rentang panjang gelombang tertentu. Teknik ini banyak digunakan untuk tujuan analisis pada semua cabang kimia dan merupakan fisika dasar dari semua pengukuran warna. Pengukuran transmisi, biasanya dilakukan pada sampel cairan.³⁹

Spektrofotometer mengandung empat unsur, 1) Sumber radiasi; 2) Sistem optik, atau monokromator, untuk mengisolasi pita panjang gelombang yang sempit dari seluruh spektrum yang dipancarkan dari sumber; 3) Sampel (dan selnya jika berbentuk cair atau gas); dan 4) Detektor radiasi dan peralatan bantunya.³⁹

Spektrofotometer UV-VIS dan visible secara teoritis menggunakan cahaya yang melewati monokromator kemudian menuju sampel. berbeda dengan spektrofotometer inframerah yang terjadi adalah cahaya melewati sampel terlebih dahulu untuk kemudian dilewatkan pada monokromator.³⁹

a. Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer UV-VIS/VIS mengukur intensitas cahaya yang melewati larutan sampel dalam kUV-Viset, dan membandingkannya dengan intensitas cahaya sebelum melewati sampel. Komponen utama spektrofotometer UV-VIS/VIS adalah sumber cahaya, tempat sampel, alat pendispersi untuk memisahkan panjang gelombang cahaya yang berbeda (misalnya monokromator), dan detektor yang sesuai.⁴⁰

Prinsip spektrofotometer UV-VIS adalah interaksi terjadi antara energi yang berupa sinar monokromatis dari sumber sinar dengan materi yang berupa molekul. Prinsip kerja spektrofotometer UV-VIS berdasarkan hukum Lambert Beer, bila cahaya/sinar monokromatis melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi dipancarkan.³⁷ Penyerapan radiasi UV-VIS terjadi melalui eksitasi elektron dalam suatu molekul ke level energi yang lebih tinggi. Transisi ini terjadi dari keadaan vibrasional bawah dalam keadaan elektronik dasar suatu molekul ke salah satu level vibrasional apapun dalam keadaan elektronik tereksitasi. Transisi dari energi keadaan dasar tunggal ke salah satu dari sejumlah keadaan tereksitasi memberikan spektrum UV yang lebar.¹⁹

Spektrum UV adalah suatu gambaran yang menyatakan hubungan antara panjang gelombang atau frekuensi serapan terhadap intensitas serapan (transmitansi atau adsorbansi).³⁷ Pengukuran spektrum UV/VIS dilakukan untuk⁴⁰:

- 1) Identifikasi komponen yang ada dalam larutan sampel. Misalnya, senyawa organik dapat diidentifikasi dengan spektrumnya, atau kemurnian pelarut dapat dengan mudah diperiksa dengan spektroskopi UV/VIS.⁴⁰
- 2) Puncak serapan dapat digunakan untuk mengukur sampel yang diselidiki. Misalnya, konsentrasi sampel dapat dihitung dari nilai absorbansi puncak: Berdasarkan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi sampel, spektroskopi UV/VIS diterapkan sebagai teknik

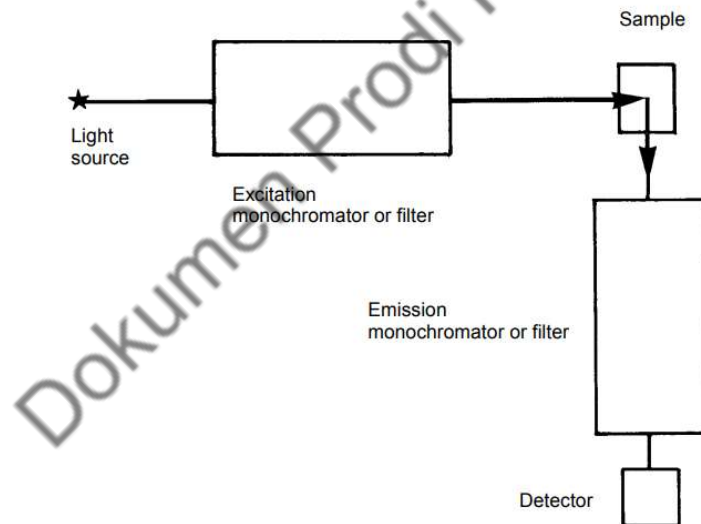
analisis kuantitatif seperti pengujian air, makanan dan minuman, industri farmasi, kimia dan bioteknologi.⁴⁰

- 3) Posisi puncak dalam spektrum mengungkapkan informasi tentang struktur molekul sampel. Misalnya, gugus fungsi spesifik dari struktur molekul, seperti karbon-oksigen, C=O, atau ikatan rangkap karbon karbon, C=C, menyerap pada panjang gelombang tertentu.⁴⁰
- 4) Posisi dan profil puncak dalam spektrum dapat memberikan informasi tentang lingkungan mikroskopis dari molekul sampel. Sebagai contoh, adanya pengotor atau pelarut lain dalam larutan sampel berpengaruh pada posisi dan profil puncak. Dengan kata lain, puncak mungkin lebih luas atau telah bergeser karena pengotor.⁴⁰

b. Spektrofotometri Fluoresensi

Pada suhu kamar, sebagian besar molekul menempati tingkat vibrasi terendah dari keadaan elektronik dasar, dan pada penyerapan cahaya akan dinaikkan untuk berada dalam keadaan tereksitasi. Eksitasi dapat mengakibatkan molekul mencapai salah satu sub-level vibrasi yang berhubungan dengan setiap keadaan elektronik. Karena energi diserap sebagai kuantum diskrit maka akan menghasilkan serangkaian pita serapan yang berbeda. Setelah menyerap energi dan mencapai salah satu tingkat vibrasi yang lebih tinggi, molekul dengan cepat kehilangan kelebihan energi vibrasinya melalui tumbukan dan jatuh ke tingkat vibrasi terendah dari keadaan tereksitasi. Selain itu, hampir semua molekul yang menempati keadaan elektronik lebih tinggi mengalami konversi internal dan berpindah

dari tingkat vibrasi terendah dari keadaan atas ke tingkat vibrasi yang lebih tinggi dari keadaan tereksitasi yang lebih rendah yang memiliki energi yang sama. Dari sana molekul kembali kehilangan energi sampai tingkat vibrasi terendah dari keadaan tereksitasi pertama tercapai. Dari tingkat ini, molekul dapat kembali ke tingkat vibrasi manapun dari keadaan dasar, memancarkan energinya dalam bentuk fluoresensi. Fluoresensi adalah proses pemancaran radiasi cahaya oleh suatu materi setelah tereksitasi oleh berkas cahaya berenergi tinggi. Emisi cahaya terjadi karena proses absorpsi cahaya oleh atom yang mengakibatkan keadaan atom tereksitasi.⁴¹



Gambar 5. Komponen spektrofotometer fluoresensi⁴¹

Instrumen fluoresensi mengandung tiga item dasar: sumber cahaya, pemegang sampel dan detektor. Selain itu, dibutuhkan detektor dalam memilih panjang gelombang radiasi datang untuk melakukan manipulasi dan penyajian yang tepat (Gambar 5). Spektrofotometer fluoresens memiliki

monokromator atau filter interferensi variabel kontinu digunakan untuk menganalisis distribusi spektral cahaya yang dipancarkan dari sampel dan spektrum emisi fluoresensi. Dalam instrumen yang lebih canggih, monokromator disediakan untuk pemilihan cahaya yang menarik dan analisis emisi sampel. Instrumen tersebut juga mampu mengukur variasi intensitas emisi dengan panjang gelombang yang menarik, spektrum eksitasi fluoresensi.⁴¹

2.3.4 Pengolahan data analisis dan hasil analisis

Pengolahan data analisis melibatkan ilmu statistika yang dilakukan untuk memperoleh hasil analisis. Hasil analisis yang diperoleh perlu untuk dilakukan penjaminan mutu agar data sesuai dengan tujuannya (*fit to purpose*). Penjaminan mutu yang dilakukan dikenal dengan istilah validasi metode analisis.¹⁹

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis harus dilakukan untuk verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis.¹⁹ Sebelum melanjutkan ke penerapan metode analisis yang baru dikembangkan, metode tersebut harus divalidasi untuk memastikan bahwa metode benar dan mampu menganalisis analit target secara akurat baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Di sini, beberapa parameter perlu diperiksa untuk memastikan stabilitas puncak analit, bentuk puncak, rentang linier, akurasi melalui pemulihan sampel, presisi melalui studi pengulangan, LoD dan LoQ, di mana setiap parameter dipelajari secara individual.⁴²

Suatu metode analisis harus divalidasi ketika : 1) Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu; 2) Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu masalah yang mengarah pada perevisian metode baku; 3) Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu; 4) Metode baku digunakan di laboratorium berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat berbeda; 5) Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antara dua metode.¹⁹ Menurut USP ada delapan parameter yang dievaluasi untuk melakukan validasi metode analisis.

1. Akurasi. Akurasi merupakan kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya yang diterima. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel yang disebut dengan persen *recovery*.¹⁹
2. Presisi. Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation*, RSD).¹⁹
3. Spesifisitas. Spesifisitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik walaupun terdapat komponen lain dalam sampel.¹⁹
4. LoD dan LoQ. LoD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi meskipun tidak dapat dikuantifikasikan. Batas kuantifikasi atau *limit of quantification* (LoQ) didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan

presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan.¹⁹

5. Linieritas. Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva baku kalibrasi yang menghubungkan respons (y) dengan konsentrasi (x).¹⁹
6. Kisaran (*Range*). Kisaran suatu metode analisis didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi, yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linieritas yang mencukupi.¹⁹
7. Kekerasan (*Ruggedness*). Kekerasan merupakan tingkat reproduibilitas hasil yang diperoleh dengan berbagai kondisi yang berbeda, diekspresikan sebagai persen simpangan baku relatif (%RSD).¹⁹
8. Ketahanan (*Robustness*)

Ketahanan merupakan kapasitas metode yang tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Suatu cara yang baik untuk mengevaluasi ketahanan suatu metode adalah dengan memvariasikan parameter-parameter penting dalam suatu metode secara sistematis, lalu mengukur pengaruhnya pada pemisahan.¹⁹