

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Beras

Menurut Soejeti Tarwotjo (2008) “beras” adalah bulir padi atau gabah yang sudah dipisahkan dari sekamnya. Secara anatomi, sekam terdiri dari dua bagian, yaitu 'palea' bagian yang tertutupi dan 'lemma' bagian yang menutupi. Dalam proses pengolahan padi setelah panen, gabah ditumbuk dengan lesung atau digiling sehingga kulit luar atau sekam terlepas dari bulirnya. Bagian dalam yang berwarna putih, merah, ungu, atau hitam ini kemudian disebut beras (Dini *et al.*, 2014).

Dalam proses penggilingan gabah, kulit atau sekam terpisah, menghasilkan butiran beras yang dikenal sebagai beras pecah kulit. Beras ini umumnya tidak langsung digunakan untuk konsumsi, karena perlu melalui penyosohan terlebih dahulu. Pada tahap penyosohan, lapisan kulit ari dan lembaga terlepas, yang mengakibatkan hilangnya sebagian besar protein, lemak, vitamin, dan mineral yang terkandung di bagian luar. Berbagai faktor mempengaruhi mutu dan hasil dari proses penyosohan ini, seperti ukuran dan bentuk butir beras, ketebalan pelindung kariopsis, daya tahan terhadap retakan, elastisitas, serta komposisi dan distribusi unsur-unsur beras (Haryadi, 2006).

Beras adalah sumber karbohidrat utama di dunia, dengan karbohidrat sebagai komponen terbesar dalam serealia. Beras mengandung berbagai jenis karbohidrat, termasuk amilum sebagai komponen utama, serta pentosan, selulosa, hemiselulosa, dan gula bebas. Beras pecah kulit mengandung sekitar 85-95% pati, 2-2,5% pentosan, dan 0,6-1,1% gula. Di Indonesia, beras berkontribusi pada 60-80% kebutuhan kalori penduduk. Bagian kariopsis dari gabah yang dapat dimakan mengandung sekitar 75% karbohidrat dan 14% air. Setelah penggilingan, bagian yang disebut endosperm atau beras giling terdiri atas 78% karbohidrat dan 7% protein. Kandungan seperti senyawa non-pati lebih banyak terpusat pada bagian luar biji, seperti lapisan aleuron dan lembaga (Haryadi, 2006). Berikut adalah kandungan gizi yang terdapat pada beberapa jenis beras:

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Beras /100 gram

Komposisi	Beras Putih	Beras Merah	Beras Hitam
Energi	359 Kkal	370 Kkal	370 Kkal
Nitrogen	1,11 g	1,37 g	1,21 g
Protein	6,94 g	8,56 g	7,57 g
Lemak	1,3 g	3,44 g	3,44 g
Abu	0,35 g	1,33 g	1,34 g
Air	11,6 g	10,5 g	10,5 g
Karbohidrat	79,8 g	76,2 g	77,2 g
Serat	0,5 g	4,2 g	4,2 g
Kalsium	6 mg	9 mg	14 mg
Besi	0,22 mg	1,2 mg	1,12 mg
Magnesium	22,9 mg	126 mg	113 mg
Fosfor	94 mg	314 mg	307 mg
Kalium	75 mg	245 mg	256 mg
Natrium	5 mg	<16 mg	<2,5 mg
Seng	1,19 mg	2,56 mg	1,72 mg
Tembaga	0,209 mg	0,269 mg	0,21 mg
Mangan	0,892 mg	2,63 mg	3,91 mg
Selenium	5,3 µg	-	-
Molibdenum	45,5 µg	-	-
Thiamin	0,09 mg	0,339 mg	0,319 mg
Riboflavin	0 mg	-	-
Niacin	1,25 mg	6,68 mg	8,28 mg
Vitamin B-6	0,052 mg	0,137 mg	0,202
Asam Folat	16 µg	-	-
Biotin	-	4,79 µg	4,88 µg

Sumber: USDA food data central (2018)

Beras di Indonesia memiliki beberapa jenis warna, termasuk beras putih (*Oryza sativa L.*), beras hitam (*Oryza sativa L. indica*) dan beras merah (*Oryza nivara*) (Widyaningrum *et al.*, 2024).

1) Beras Putih

Merupakan makanan pokok bagi sebagian besar masyarakat Indonesia. Beras ini memiliki kandungan aleuron yang lebih rendah dan amilosa sekitar 20%. Umumnya, beras putih diolah menjadi nasi, yang menjadi makanan pokok penting bagi banyak orang di seluruh dunia (Cintya *et al.*, 2022). Beras putih biasanya digunakan sebagai bahan makanan pokok yang sangat penting, terutama dalam bentuk nasi. Dalam setiap 100 gram beras putih, terkandung sekitar 360 kkal energi, 6,6 gram protein, 0,58 gram lemak, dan 79,34 gram

karbohidrat (Hernawan & Meylani, 2016). Selain itu beras putih mengandung thiamine (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), niacin (vitamin B3), asam pantotenat (vitamin B5), vitamin B6, gluten, selulosa, dan gamma oryzanol (Widyaningrum *et al.*, 2024).

2) Beras Hitam

Beras hitam terkenal dengan konsentrasi bioaktifnya yang tinggi terutama flavonoid dan asam fenolik, flavonoid utama yang ditemukan dalam butiran beras hitam adalah antosianin, sekelompok flavonoid kemerahan hingga ungu yang dominan terletak di lapisan aleuron (Cañizares *et al.*, 2024). Beras hitam mengandung kadar protein, vitamin dan mineral yang lebih tinggi daripada beras putih biasa. beras hitam mengandung amino esensial asam seperti lisin, triptofan; vitamin seperti seperti vitamin B1, vitamin B2, asam folat; dan itu merupakan sumber mineral yang baik termasuk zat besi, seng, kalsium, fosfor dan selenium. Beras Hitam merupakan sumber protein nabati yang baik, Satu porsi beras hitam (1/4 cangkir atau 50g) mengandung sekitar 160 kalori. Setiap porsi beras jenis ini mengandung 5g protein dan 2g serat dan 1g zat besi (Thanuja & Parimalavalli, 2018).

3) Beras Merah

Merupakan salah satu makanan pokok di Indonesia yang dikenal memiliki nilai gizi yang tinggi. Tekstur beras merah cenderung tidak lembut, tidak kasar, dan tidak terlalu lunak. Rasanya tidak seenak beras putih, sedikit hambar, dan aromanya tidak harum, melainkan agak langu (Marshall, 2006). Selain mengandung karbohidrat, lemak, protein, serat, dan mineral, beras merah juga kaya akan antosianin. Antosianin adalah pigmen merah yang terdapat pada kulit ari dan tegmen (lapisan luar) beras, serta di setiap bagian bulir padi (Cintya *et al.*, 2022). Sebagian besar karbohidrat dalam beras terdiri dari pati, sementara hanya sedikit yang berupa pentosan, selulosa, hemiselulosa, dan gula. Sekitar 85% hingga 90% dari berat kering beras terdiri dari pati. Kandungan pentosan berkisar antara 2,0-2,5% dan gula antara 0,6-1,4% dari berat beras yang telah dikupas. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa

sifat fisikokimia beras terutama dipengaruhi oleh karakteristik patinya, yang merupakan komponen utama (Apriyanto, 2022).

Berdasarkan perkembangan sejarah, manusia telah mengembangkan tiga cara utama untuk mengolah makanan pokok. Masyarakat Eropa Utara umumnya mengolah biji-bijian seperti gandum dan rye menjadi roti. Di Asia, termasuk Indonesia, nasi yang berasal dari beras merupakan makanan pokok utama yang dimasak dengan cara ditanak. Selain itu, banyak kelompok masyarakat di dunia membuat pasta atau bubur dengan mencampurkan tepung dari berbagai sumber pati ke dalam air mendidih (Haryadi, 2006).

2.2 Metode Pengolahan Beras

Memasak nasi merupakan proses mengolah beras menjadi nasi melalui beberapa tahap pemasakan dengan menggunakan berbagai metode memasak (Sailendra *et al.*, 2024). Masyarakat di Indonesia umumnya melakukan penanakan beras untuk membuat nasi menggunakan beberapa metode, antara lain: metode tradisional dan metode modern *rice cooker* (modern).

1) Metode Tradisional

1) Metode kukus

Metode kukus merupakan cara tradisional memasak nasi. Beras yang sudah dicuci diletakkan dalam kukusan, kemudian kukusan tersebut dipasang di atas dandang berisi air dan ditempatkan di atas api. Panas dari api membuat air dalam dandang mendidih, dan uap panas naik melalui lubang-lubang kukusan dan masuk ke dalamnya. Uap tersebut secara perlahan-lahan melunakkan beras dengan menyerap air. Jika beras tidak lagi mampu menyerap air, air mendidih dituangkan ke atasnya untuk membantu proses memasak. Air yang tersisa meresap ke dalam beras, sementara sisanya mengalir kembali ke dalam dandang. Setelah beberapa saat, beras menjadi matang, siap dipindahkan ke wadah, dan sisa air dalam dandang dibuang.

2) Metode Aron-Kukus

Pengolahan beras menjadi nasi secara tradisional adalah dengan merebus (meng aron) 100 gram beras yang telah dicuci dalam 164 mL air selama 10

menit atau sampai airnya meresap, kemudian beras aron dikukus selama 25 menit (Purbowati & Kumalasari, 2023).

2) Metode Modern (*Rice Cooker*)

Rice cooker adalah salah satu peralatan modern untuk memasak nasi yang banyak dipakai saat ini (Faizah *et al.*, 2024). Prinsip kerja *rice cooker* pada saat menanak nasi, listrik akan mengalir ke pemanas utama. Pemanas ini akan memanaskan air dan beras hingga mendidih. Ketika nasi sudah matang dan suhu di dalam *rice cooker* mencapai sekitar 130°C, pemanas utama akan mati secara otomatis. Kemudian, *rice cooker* akan beralih ke mode menghangatkan. Mode ini menggunakan pemanas yang berbeda dengan daya yang lebih rendah untuk menjaga nasi tetap hangat (Simanjuntak *et al.*, 2020).

2.3 Nasi

Haryadi (2008) menjelaskan bahwa kualitas nasi yang kita makan sangat dipengaruhi oleh sifat-sifat alami beras. Bukan hanya kandungan amilosa, amilopektin, protein, dan lemak yang berperan, tetapi juga bagaimana beras bereaksi terhadap panas dan air selama proses memasak. Faktor-faktor seperti suhu saat pati beras mulai larut, seberapa banyak nasi mengembang, jumlah air yang diserap beras, kekentalan bubur nasi, dan kekenyalan nasi setelah dingin juga sangat menentukan kualitas nasi yang dihasilkan. Dengan kata lain, sifat fisik dan kimiawi beras secara keseluruhan akan mempengaruhi tekstur, rasa, dan aroma nasi yang kita nikmati.

Kandungan amilosa dan amilopektin dalam beras sangat berpengaruh terhadap tekstur nasi yang dihasilkan. Semakin tinggi kadar amilosanya, nasi cenderung lebih pera dan keras, serta kurang lengket dan pulen. Sebaliknya, beras dengan kadar amilopektin yang tinggi akan menghasilkan nasi yang lebih pulen, lembut, dan lengket (Haryadi, 2008). Nasi mengandung karbohidrat yang cukup tinggi dan menjadi sumber pangan utama dalam pola makan sehari-hari bagi sebagian besar penduduk Indonesia (Widhyasari *et al.*, 2017). Karbohidrat berfungsi sebagai sumber energi, dimana karbohidrat utama dalam nasi setelah dicerna adalah glukosa (Ishmah *et al.*, 2020).

2.3.1 Karbohidrat

Karbohidrat adalah nutrisi penting bagi manusia yang berfungsi sebagai sumber energi. Meskipun struktur molekulnya bervariasi, semua karbohidrat memiliki kesamaan dalam komposisi kimia dan fungsinya. Karbohidrat ini terbentuk dari unsur karbon (C), hidrogen (H), dan oksigen (O) (Siregar, 2014). Karbohidrat adalah sumber energi utama bagi tubuh manusia, dengan setiap gramnya menghasilkan 4 kalori. Zat ini termasuk dalam kelompok polihidroksi aldehida dan polihidroksi keton (Ratmana, 2017).

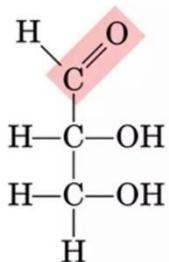
Karbohidrat dibagi menjadi dua kelompok utama: karbohidrat sederhana dan kompleks. Karbohidrat sederhana meliputi monosakarida (unit dasar karbohidrat), disakarida (gabungan dua monosakarida), dan oligosakarida, yaitu gula berantai pendek yang terdiri dari galaktosa, glukosa, dan fruktosa. Sementara itu, karbohidrat kompleks mencakup polisakarida, yang memiliki lebih dari dua ikatan monosakarida, dan serat yang dikenal juga sebagai polisakarida non-pati (Siregar, 2014).

1) Monosakarida

Monosakarida adalah bentuk karbohidrat yang paling dasar, dengan rumus kimia umum (CH_2O), dan dikenal sebagai gula sederhana. Istilah "mono" berarti satu, sedangkan "sakarida" berarti gula (Yunianto *et al.*, 2021). Monosakarida dapat dibedakan menjadi dua jenis: aldosa, yang memiliki gugus aldehid, dan ketosa, yang memiliki gugus keton. Akhiran "-osa" dalam penamaan karbohidrat menunjukkan bahwa gula tersebut bersifat pereduksi, yaitu gula yang mengandung gugus aldehid atau α -hidroksi keton. Contoh dari aldoheksosa adalah glukosa dan galaktosa, sedangkan contoh dari ketoheksosa adalah fruktosa (Ratmana, 2017). Berikut adalah gambar struktur contoh dari aldoheksosa dan ketoheksosa:

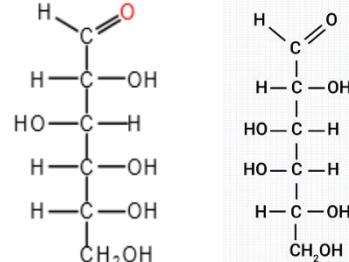
Monosakarida

Aldosa;

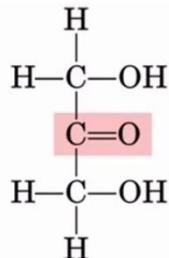


Contoh

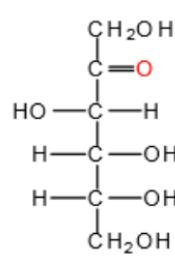
Glukosa & Galaktosa



Ketosa;



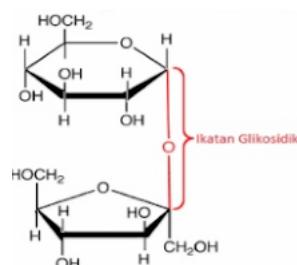
Fruktosa



Gambar 2.1 Struktur Aldosa ; Glukosa dan Ketosa ; Fruktosa (Ratmana, 2017)

2) Disakarida

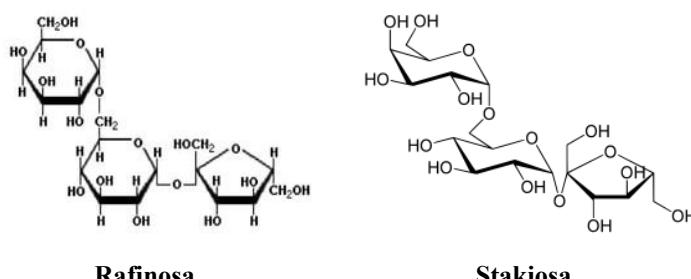
Disakarida terdiri dari dua unit monosakarida yang terhubung melalui ikatan glikosidik. Ikatan ini terbentuk melalui reaksi kondensasi antara kedua monosakarida, yang mengakibatkan hilangnya satu atom hidrogen dari salah satu monosakarida dan gugus hidroksil dari yang lainnya (Yunianto *et al.*, 2021). Berikut adalah gambar ikatan glikosidik yang menghubungkan dua unit monosakarida:



Gambar 2.2 Ikatan Glikosidik (Ratmana, 2017)

3) Oligosakarida

Oligosakarida adalah jenis karbohidrat yang terdiri dari 3 hingga 10 unit monosakarida yang terhubung melalui ikatan kovalen. Contoh oligosakarida meliputi rafinosa dan stakiosa (Ratmana , 2017). Berikut adalah gambar struktur rafinosa dan stakiosa:



Gambar 2.3 Struktur rafinosa dan stakiosa (Ratmana, 2017)

4) Polisakarida

Polisakarida merupakan karbohidrat yang terdiri dari 10 atau lebih unit monosakarida yang dihasilkan melalui hidrolisis. Polisakarida terbagi menjadi 2 yaitu homopolisakarida yang mengandung satu senyawa dan heteropolisakarida yang mengandung berbagai senyawa lain, contoh senyawa polisakarida adalah pati, glikogen, dekstrin, selulosa, heparin dan kitin (Ratmana, 2017).

2.3.2 Hidrolisis Karbohidrat

Hidrolisis merupakan proses penguraian suatu senyawa menjadi bentuk yang lebih sederhana dengan bantuan molekul air, di mana pemutusan ikatan dalam senyawa tersebut terjadi karena reaksi dengan air (Perwitasari & Cahyo, 2009). Proses hidrolisis pati menggunakan asam akan memecah molekul pati secara acak dan menghasilkan produk utama berupa gula pereduksi (Nasrulloh *et al.*, 2013).

Beberapa faktor yang memengaruhi reaksi hidrolisis antara lain suhu, katalisator, dan waktu. Suhu memiliki peran penting dalam menentukan laju reaksi; hidrolisis pati berlangsung mengikuti reaksi orde satu, di mana kecepatannya berbeda tergantung pada jenis pati yang digunakan. Dalam kisaran suhu 90–100°C,

laju reaksi dapat meningkat dua kali lipat untuk setiap kenaikan suhu sebesar 5°C. Secara umum, peningkatan suhu sebesar 10°C akan menggandakan kecepatan reaksi hidrolisis. Penggunaan suhu yang tinggi dapat mempercepat jalannya reaksi sehingga durasi reaksi dapat diperpendek. Selain itu, suhu tinggi juga dapat menurunkan kebutuhan akan katalisator, yang pada akhirnya dapat menekan biaya operasional (Perwitasari & Cahyo, 2009).

Penggunaan katalisator dalam reaksi hidrolisis pertama kali dilakukan oleh Braconnot pada tahun 1819, ketika ia berhasil menghidrolisis linen (selulosa) menjadi gula fermentasi menggunakan asam sulfat pekat. Penemuan ini menunjukkan bahwa asam dapat berperan sebagai katalisator untuk mempercepat reaksi hidrolisis (Perwitasari & Cahyo, 2009). Katalisator yang sering digunakan berupa asam, seperti asam klorida, asam sulfat, asam sulfit, atau asam nitrat. Semakin banyak jumlah asam yang digunakan, semakin cepat reaksi hidrolisis berlangsung. Namun, larutan katalisator dengan konsentrasi rendah (encer) lebih banyak digunakan karena mempermudah pencampuran, sehingga reaksi dapat berjalan lebih merata dan efisien. Konsentrasi katalisator yang rendah dapat memperlambat kecepatan reaksi, tetapi hal ini dapat diimbangi dengan peningkatan suhu reaksi. Selain itu, waktu reaksi juga mempengaruhi tingkat konversi. Semakin lama waktu reaksi, semakin tinggi konversi yang dihasilkan. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya peluang tumbukan antar reaktan, sehingga reaksi dapat berlangsung lebih optimal.

2.3.3 Gula Pereduksi

Karbohidrat mengandung dua jenis gula, yaitu gula pereduksi dan gula non-pereduksi. Gula pereduksi memiliki gugus aldehid atau keton bebas yang memungkinkan gula tersebut mereduksi ion logam seperti tembaga (Cu) dan perak (Ag) dalam kondisi basa (Perwitasari & Cahyo, 2009). Semua monosakarida (glukosa, fruktosa, galaktosa) dan disakarida (laktosa, maltosa) kecuali sukrosa dan pati (polisakarida) termasuk sebagai gula pereduksi. Senyawa organik yang terkandung dalam gula pereduksi yaitu unsur karbon, hidrogen, dan oksigen dengan perbandingan 1 atom C, 2 atom H, dan 1 atom O. (Afriza & Nilda, 2019). Gula

pereduksi menjadi salah satu parameter kualitas gula. Kadar gula pereduksi mempengaruhi warna pada gula. Semakin rendah kadar gula pereduksi, maka semakin terang warna gula, sebaliknya jika kadar gula pereduksi tinggi, maka semakin gelap warna gula (Kalengkongan *et al.*, 2013).

2.4 Identifikasi Karbohidrat

Adapun beberapa metode identifikasi karbohidrat menurut (Idar, 2024) adalah sebagai berikut:

1. Uji Molisch

Semua jenis karbohidrat memberikan hasil positif pada uji ini. Indikasi hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya cincin berwarna merah-ungu di antara dua lapisan. Prinsip uji ini didasarkan pada reaksi alfa-naftol dengan furfural atau turunannya, yang terbentuk akibat proses dehidrasi gula oleh asam sulfat pekat.

2. Uji Iodin

Uji keberadaan pati. Hasil positif: Menghasilkan warna biru tua. Prinsip: Warna biru berasal dari kompleks antara iodin dengan pati.

3. Uji Fehling

Uji gula pereduksi. Hasil positif: Terbentuknya warna kuning atau endapan merah kecoklatan menunjukkan hasil positif. Prinsip uji ini adalah gula pereduksi dalam sampel akan mereduksi tembaga hidroksida yang berwarna biru pada larutan Fehling dalam suasana basa, menghasilkan endapan kupri oksida yang berwarna kuning atau merah.

4. Uji Benedict

Uji gula pereduksi. Hasil positif: Terbentuknya endapan berwarna merah, kuning, atau hijau menunjukkan hasil positif. Prinsip uji ini adalah gugus aldehid atau keton bebas dalam sampel mereduksi kupri hidroksida dalam larutan basa, menghasilkan oksida tembaga dengan warna merah, kuning, atau hijau, bergantung pada konsentrasi gula pereduksi yang ada.

5. Uji Barfoed

Uji barfoed digunakan untuk membedakan monosakarida dan disakarida, hasil positif: Terbentuknya endapan berwarna merah bata menunjukkan hasil positif. Prinsip uji ini adalah reagen Barfoed, yang bersifat asam lemah, hanya dapat direduksi oleh monosakarida.

2.5 Metode Analisis Karbohidrat

Analisis kadar karbohidrat bertujuan untuk mengukur jumlah karbohidrat dalam makanan dan menentukan komposisi bahan pangan. Dalam ilmu gizi, analisis ini diperlukan untuk menghitung kebutuhan energi, mendukung pencegahan penyakit seperti diabetes, dan menghitung kandungan serat kasar serta faktor lainnya (Sudarmadji *et al.*, 1984). Berikut adalah beberapa metode analisis kadar karbohidrat:

1) Metode Luff Schoorl

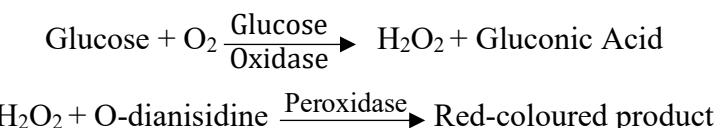
Metode analisis Luff-Schoorl adalah prosedur yang ditetapkan oleh Badan Standarisasi Nasional (BSN) untuk menentukan kadar karbohidrat secara kuantitatif. Metode ini dapat digunakan pada produk pangan yang mengandung gula dengan berat molekul rendah, serta pati alami atau modifikasi. Dalam metode ini, gula reduksi seperti glukosa, fruktosa, maltosa, dan laktosa akan bereaksi dengan larutan Luff-Schoorl membentuk CuO². Namun, kelemahan dari metode ini adalah hasil yang diperoleh seringkali tidak konsisten, sehingga tingkat kepercayaannya tergolong rendah. Selain itu, metode ini memerlukan waktu yang cukup lama dan prosedur yang cukup rumit.

2) Metode Anthrone Sulfat

Penentuan karbohidrat total dengan metode Antron. Secara kuantitatif kandungan karbohidrat total dapat dihitung menggunakan metode antron. Prinsip metode tersebut adalah karbohidrat dihidrolisis menjadi gula-gula sederhana dengan asam klorida encer, yang kemudian terdehidrasi menjadi senyawa hidroksi metil furfural. Senyawa tersebut selanjutnya bereaksi dengan reagen antron membentuk senyawa berwarna hijau dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 630 nm (Idar, 2024).

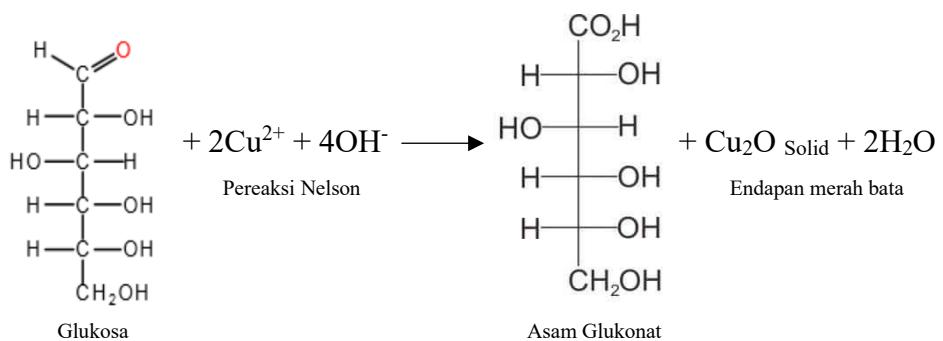
3) Metode Glukosa Oksidase

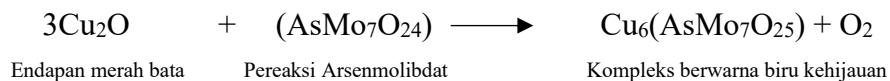
Pengujian kadar glukosa menggunakan metode glukosa oksidase memberikan hasil yang akurat karena hanya glukosa yang terukur, sedangkan gula pereduksi lainnya tidak terdeteksi. Prinsip dari metode ini adalah enzim glukosa oksidase mengkatalisis oksidasi α -D-glukosa menjadi D-glukono-1,5-lakton (asam glukonat), yang menghasilkan hidrogen peroksida. Dengan bantuan katalis peroksidase, hidrogen peroksida terurai melepaskan oksigen, yang kemudian bereaksi dengan O-dianisidin dan mengoksidasinya, menghasilkan produk kromofor berwarna merah.



4) Metode Somogyi-Nelson

Uji Somogyi-Nelson merupakan metode yang digunakan untuk mengukur kadar gula pereduksi. Prinsip metode ini didasarkan pada reaksi di mana gula pereduksi mereduksi ion Cu^{2+} menjadi ion Cu^+ , ion Cu^+ yang terbentuk kemudian akan mereduksi senyawa arsenumolibdat dan menghasilkan kompleks berwarna biru kehijauan sehingga dapat diukur menggunakan spektrofotometer sinar tampak (Al-kayyis & Susanti, 2016). Tingkat intensitas warna yang dihasilkan menunjukkan jumlah gula pereduksi dalam sampel. Hal ini disebabkan karena konsentrasi arsenumolibdat yang tereduksi berbanding lurus dengan konsentrasi Cu_2O , yang juga berbanding lurus dengan konsentrasi gula pereduksi (Sari & Razali, 2021). Berikut adalah reaksi Somogyi-Nelson terhadap gula pereduksi:





2.6 Spektrofotometri Uv-Vis

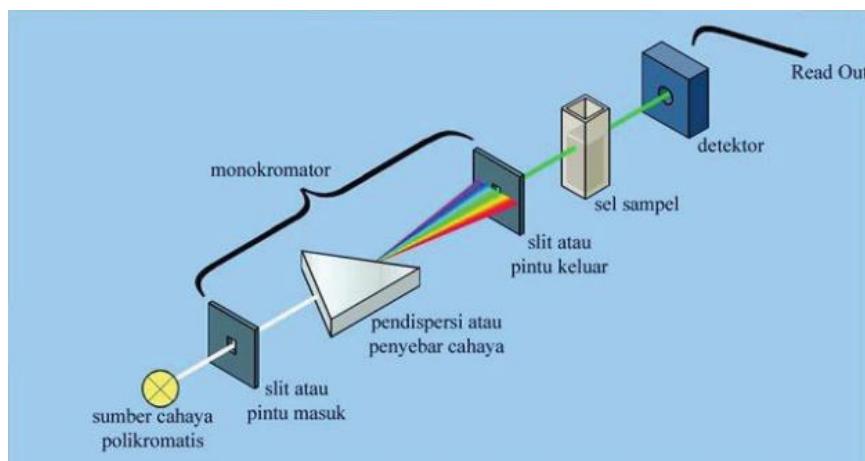
Spektroskopi UV-vis mengukur jumlah cahaya yang diserap pada setiap panjang gelombang di daerah UV dan daerah tampak pada spektrum elektromagnetik. Spektroskopi serapan ini menggunakan radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang 200 hingga 800 nm, yang dibagi menjadi daerah ultraviolet (UV) 200–400 nm dan daerah tampak (Visible) 400–800 nm (Rina *et al.*, 2021).

Prinsip spektroskopi UV-visibel didasarkan pada penyerapan sinar ultraviolet atau cahaya tampak oleh suatu sampel atau bahan kimia, sehingga menghasilkan spektrum yang berbeda-beda. Ketika suatu molekul menyerap sinar ultraviolet, elektron-elektron di dalam molekul tersebut tereksitasi, yang menyebabkan transisi dari tingkat energi elektronik yang lebih rendah ke tingkat energi elektronik yang lebih tinggi, sehingga menghasilkan jenis transisi yang berlawanan dalam spektrum ultraviolet. Pelarut yang paling umum digunakan dalam spektroskopi UV adalah air, metanol, etanol, eter, kloroform, karbon tetraklorida, sikloheksana, dan dikloroetana. Aplikasi spektroskopi UV adalah deteksi gugus fungsi, deteksi konjugasi, deteksi isomerometri, dan deteksi pengotor (Rina *et al.*, 2021).

Dalam spektrofotometri UV-Vis, terdapat beberapa istilah yang terkait dengan molekul, seperti kromofor, auksokrom, efek batokromik (efek pergeseran merah), efek hipokromik (efek pergeseran biru). Kromofor merupakan molekul atau bagian molekul yang memiliki kemampuan menyerap sinar secara intens di wilayah UV-Vis, contohnya heksana, aseton, asetilen, benzena, karbonil, karbondioksida, karbon monoksida, serta gas nitrogen. Auksokrom adalah kelompok fungsional yang memiliki elektron bebas berikatan kovalen tunggal, yang terikat pada kromofor dan meningkatkan absorpsi sinar UV-Vis pada kromofor tersebut, seperti panjang gelombang dan intensitas, contohnya adalah hidroksi, amina, halida, alkoksi (Suhartati, 2017).

Untuk mendapatkan spektrum UV-Vis yang baik perlu diperhatikan pula konsentrasi sampel. Hubungan antara absorbansi terhadap konsentrasi akan linier ($A \approx C$) apabila nilai absorbansi larutan antara 0,2-0,8 ($0,2 \leq A < 0,8$) atau sering disebut sebagai daerah berlakunya hukum Lambert-Beer (Suhartati, 2017). Menurut hukum Lambert-Beer, absorbansi suatu larutan berbanding lurus dengan konsentrasinya. Artinya bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan, semakin besar nilai absorbansi yang dihasilkan. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi larutan, semakin rendah pula absorbansinya (Lesnussa *et al.*, 2019).

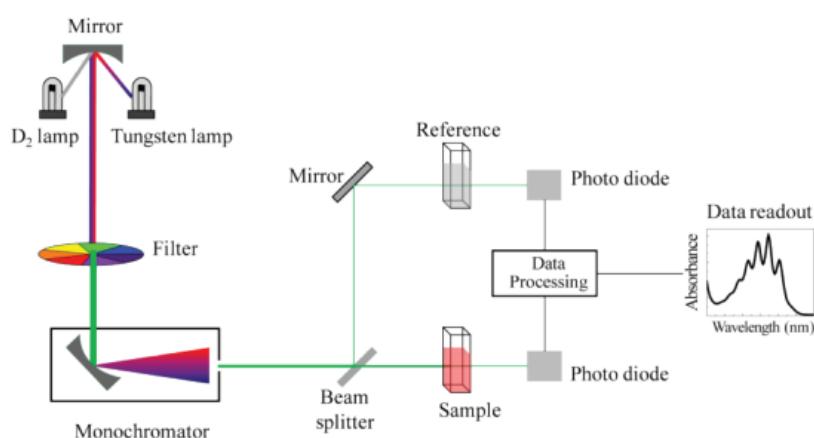
Secara umum, spektrofotometer terbagi menjadi dua jenis utama, yaitu *single-beam* dan *double-beam*. Instrumen *single-beam* digunakan untuk analisis kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada satu panjang gelombang tertentu. Alat ini memiliki beberapa keunggulan, seperti desain yang sederhana, biaya yang lebih rendah, serta efisiensi ekonomis. Spektrofotometer *single-beam* dirancang untuk pengukuran sinar ultraviolet dan sinar tampak, dengan rentang panjang gelombang minimum 190–210 nm dan maksimum 800–1000 nm (Suhartati, 2017). Berikut adalah gambar skema alat Spektrofotometer UV-Vis *single beam*:



Gambar 2.4 Skema alat spektrometer UV-Vis *single beam* (Suhartati, 2017)

Spektrofotometer double-beam memiliki dua berkas cahaya yang dihasilkan oleh cermin berbentuk V yang disebut pemecah sinar. Salah satu berkas cahaya melewati larutan blanko, sementara berkas lainnya secara bersamaan melewati sampel. Sumber cahaya polikromatik yang digunakan berupa lampu deuterium

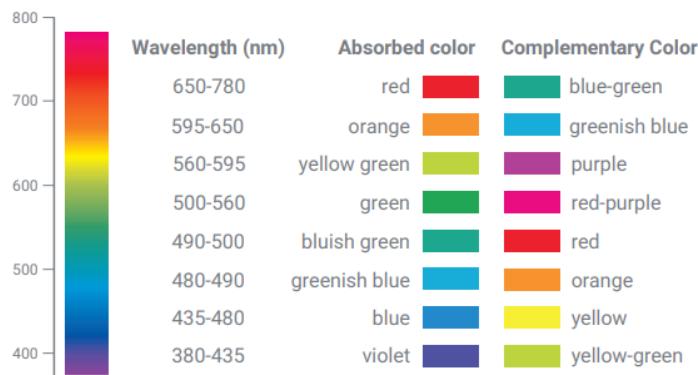
untuk sinar UV dan lampu wolfram untuk sinar tampak (Vis). Monokromator pada spektrofotometer UV-Vis menggunakan prisma, lensa, dan filter optik untuk memilih panjang gelombang tertentu. Sel sampel berupa kuvet yang terbuat dari kuarsa atau kaca dengan ukuran lebar yang bervariasi. Detektor, seperti detektor foto, detektor panas, atau detektor dioda foto, digunakan untuk menangkap cahaya yang melewati sampel dan mengubahnya menjadi sinyal listrik (Suhartati, 2017). Berikut adalah gambar skema alat Spektrofotometer UV-Vis *double beam*:



Gambar 2.5 Skema alat spektrometer UV-Vis *double beam* (Suhartati, 2017)

2.6.1 Sinar Tampak

Sinar tampak merupakan bentuk radiasi elektromagnetik yang didefinisikan sebagai bagian dari spektrum gelombang elektromagnetik yang dapat dikenali oleh penglihatan manusia yang mencakup semua panjang gelombang yang dapat dideteksi oleh mata. Mata manusia normal dapat mendeteksi panjang gelombang dalam rentang 400-700 nm, meskipun ada beberapa individu yang mampu menerima panjang gelombang dari 380-780 nm. Cahaya yang tampak, atau cahaya yang kita lihat dalam kehidupan sehari-hari disebut sebagai warna komplementer. Misalnya, suatu zat akan tampak berwarna orange jika menyerap warna biru dari spektrum cahaya tampak, sementara zat tersebut akan tampak hitam jika menyerap semua warna yang ada dalam spektrum tersebut (Yudono, 2017). Berikut adalah warna komplementer dan panjang gelombang pada daerah sinar tampak:



Gambar 2.6 Spektrum tampak dan warna komplementer (Agilent, 2021)

2.6.2 Instrumen Spektrofotometer Uv-Vis

Instrumen spektrofotometer terdiri dari empat komponen utama: sumber cahaya, monokromator, kuvet, dan detektor. Cahaya putih dari sumber akan diarahkan melalui monokromator, yang memisahkan cahaya sehingga menghasilkan sinar dengan panjang gelombang tertentu. Radiasi yang dihasilkan kemudian difokuskan ke detektor, yang mengonversi radiasi tersebut menjadi sinyal listrik (Skoog *et al.*, 2007).

1. Sumber Radiasi

Sumber radiasi yang paling umum digunakan meliputi lampu tungsten, lampu deuterium dan lampu xenon.

1) Lampu Tungsten

Merupakan campuran dari filamen tungsten dan gas iodin (halogen), sehingga dikenal sebagai sumber radiasi “tungsten-iodine”. Sumber ini digunakan dalam rentang pengukuran 350-2000 nm, karena dalam rentang tersebut, sumber radiasi “tungsten-iodine” memancarkan energi radiasi berbentuk kurva yang sesuai untuk aplikasi kolorimetri (Gandjar & Rohman, 2012).

2) Lampu Deuterium

Lampu deuterium digunakan dalam rentang panjang gelombang 190 nm - 380 nm daerah ultraviolet, karena dalam rentang tersebut sumber radiasi

deuterium menghasilkan spektrum energi radiasi yang linear (Gandjar & Rohman, 2012).

3) Lampu Xenon

Lampu xenon digunakan dalam rentang 200 hingga 1000 nm, dengan kepekaan optimal pada 500 nm (Skoog *et al.*, 2007).

2. Monokromator

Monokromator berfungsi untuk memilih panjang gelombang dengan mengubah cahaya dari sumber polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Komponen-komponen yang membentuk monokromator meliputi prisma, celah optis, kisi difraksi, dan filter (Schiewe *et al.*, 1966).

3. Detektor

Detektor berfungsi untuk merespon cahaya dari berbagai panjang gelombang, detektor tersebut akan menyerap sinar yang diteruskan oleh sampel untuk mengubah sinyal radiasi yang diterimanya menjadi sinyal elektronik yang dapat diukur (Mulja & Suharman, 1995).

4. Kuvet

Kuvet adalah wadah yang berfungsi untuk menampung sampel yang akan dianalisis. Ukuran kuvet disesuaikan dengan kebutuhan, misalnya berdiameter 1 cm untuk sinar tampak dan ultraviolet, serta 0,005 hingga 1 mm untuk sinar inframerah. Bahan kuvet harus transparan terhadap jenis sinar yang digunakan, biasanya terbuat dari kuarsa untuk sinar UV dan dari kaca atau plastik untuk sinar tampak. Sel yang digunakan untuk pengukuran blanko dan sampel harus serupa (matched), artinya memiliki sifat optik yang identik (Zackiyah, 2017).

2.7 Validasi Metode

Validasi metoda analisis adalah persyaratan dasar untuk memastikan kualitas dan keandalan terhadap parameter tertentu, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan sesuai tujuannya (Rachmawati, 2024). Validasi merujuk pada proses evaluasi keabsahan atau upaya untuk membuktikan efektivitas. Dalam konteks ini, validasi metode merupakan proses penetapan untuk

memastikan bahwa produk atau peralatan mampu memenuhi kebutuhan analisis yang diharapkan (Lavanya *et al.*, 2013).

Menurut United States Pharmacopeia (USP) validasi metode bertujuan untuk memastikan bahwa metode analisis yang digunakan bersifat spesifik, akurat, dan stabil terhadap analit yang akan dianalisis. Sebelum digunakan, metode analisis harus divalidasi dengan melakukan verifikasi bahwa parameter kerjanya mampu memenuhi harapan dalam analisis. Terdapat delapan parameter yang harus dievaluasi, sebagaimana ditentukan oleh United States Pharmacopeia (USP), yaitu presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, sensitivitas, linieritas, dan rentang (Rachmawati, 2024).

2.7.1 Akurasi

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. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi kemudian dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis kemudian sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (Riyanto, 2014). Perhitungan perolehan kembali dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_t}{C_s} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

C_t = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_s = konsentrasi sampel sebenarnya

Tabel 2.2 Persyaratan persen akurasi (Harmita, 2004)

Analit pada matriks sampel	Recovery yang dihasilkan (%)
$10 < A \leq 100$ (%)	98-102
$1 < A \leq 10$ (%)	97-103
$0,1 < A \leq 1$ (%)	95-105
$0,001 < A \leq 1$ (%)	90-107
$100 \text{ ppb} < A \leq 1 \text{ ppm}$ (%)	80-110
$10 \text{ ppb} < A \leq 100 \text{ ppb}$ (%)	60-115
$1 \text{ ppb} < A \leq 10 \text{ ppb}$ (%)	40-120

2.7.2 Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan antara serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama (Rachmawati, 2024). Presisi dapat diukur menggunakan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV), presisi ini dapat dibedakan menjadi *repeatability* (keterulangan) dan *reproducibility* (ketertiruan). Keterulangan menunjukkan kesamaan hasil metode jika dilakukan berkali-kali oleh analis yang sama, dalam kondisi yang sama dan dalam jangka waktu singkat. Sementara itu, ketertiruan mengukur kesesuaian hasil ketika metode yang sama diterapkan dalam kondisi berbeda, misalnya di laboratorium yang berbeda dengan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda (Harmita, 2004). Persyaratan uji ini dikatakan valid dan memenuhi persyaratan uji validasi apabila memiliki nilai RSD lebih kecil dari < 2% (Gandjar dan Rohman, 2007). Perhitungan keseksamaan dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$RSD = \frac{\text{Standar Deviasi (SD)}}{\text{Rata-rata } (\bar{x})} \times 100\% \quad (2)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})}{n-1}} \quad (3)$$

2.7.3 Selektivitas/Spesifisitas

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode untuk mengukur analit yang diinginkan secara akurat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel dalam kondisi pengujian yang ditentukan. Selektif mengacu pada metode

yang memberikan respons terhadap sejumlah bahan kimia entitas yang mungkin atau mungkin tidak dapat dibedakan satu sama lain. Selektivitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) dari metode yang digunakan pada sampel yang mengandung bahan tambahan, seperti kontaminan, hasil penguraian, senyawa sejenis, atau senyawa asing lainnya (Rachmawati, 2024).

2.7.4 Linieritas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon (y) yang proporsional dengan konsentrasi (x) analit pada rentang yang diberikan. Linieritas dibuat dengan mengencerkan larutan baku induk kemudian dilakukan pengenceran hingga diperoleh rentang kadar yang diinginkan (Rachmawati, 2024). Rentang metode merujuk pada batas terendah dan tertinggi dari analit yang dapat diukur dengan tepat dan akurat. Untuk mengevaluasi hubungan linear, kita menggunakan koefisien korelasi (*r*) dalam analisis regresi linier, yang dinyatakan dalam persamaan $y = a + bx$. Jika *r* bernilai +1 atau -1, itu menunjukkan arah garis. Sementara itu, nilai *a* mencerminkan sensitivitas dari analisis, khususnya yang terkait dengan instrumen yang digunakan. Selain itu, simpangan baku residual (*Sy*) juga merupakan parameter penting yang perlu dihitung yang digunakan untuk perhitungan nilai koefisien variasi fungsi (*Vx0*) (Harmita, 2004).

Nilai *Vx0* diperoleh dari perhitungan simpangan baku residual (*Sy*) dengan menggunakan rumus berikut:

$$Sy/x = \sqrt{\frac{\sum (y-y_i)^2}{n-2}} \quad (4)$$

$$Sx0 = \frac{Sy}{b} \quad (5)$$

$$Vx0 = \frac{Sx0}{x} \times 100\% \quad (6)$$

Dimana,

$$y = bx + a$$

n = jumlah sampel

b = slope

2.7.5 Batas Deteksi (Limit Of Detection LOD)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam suatu sampel yang masih dapat terdeteksi dan memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blangko (Rachmawati, 2024). Sebagai parameter pengujian, batas deteksi (LOD) dapat dihitung berdasarkan garis regresi dan deviasi standar dari kurva standar yang diperoleh menggunakan rumus:

$$BD = \frac{3 \times Sy/x}{b} \quad (7)$$

2.7.6 Batas Kuantitasi (Limit Of Quantification LOQ)

Batas kuantitasi adalah parameter dalam analisis renik yang didefinisikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria akurasi dan ketelitian (Rachmawati, 2024). Batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik menggunakan garis regresi linear dari kurva kalibrasi dengan menggunakan rumus:

$$BK = \frac{10 \times Sy/x}{b} \quad (8)$$