

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tepung Mocaf

Mocaf (*modiefid cassava flour*) adalah produk olahan dari tepung singkong yang dibuat dengan memodifikasi sel singkong melalui proses fermentasi, dalam proses pembuatannya singkong mengalami fermentasi oleh bakteri asam laktat yang menjadi dominan selama fermentasi berlangsung yang menghasilkan karakteristik yang unik. Menurut Wahyuningsih dan Hayati (2011) pembuatan tepung mocaf dapat melalui fermentasi alami (tanpa penggunaan enzim tambahan) membutuhkan waktu fermentasi selama tiga hari sementara itu, pembuatan tepung mocaf dengan penambahan enzim hanya membutuhkan waktu fermentasi selama 24 jam. Hal ini terjadi karena enzim tambahan mempercepat proses pemecahan pati dalam singkong menjadi gula sederhana, sehingga mikroorganisme dapat bekerja lebih cepat dan efisien dalam proses fermentasi.

Tepung mocaf juga bisa digunakan sebagai bahan baku yang memiliki spektrum yang hampir sama dengan tepung beras dan tepung terigu (Subagio dkk., 2008). Tepung mocaf bisa menjadi alternatif pengganti tepung terigu dalam pembuatan mie instan, biscuit, dan bakery. Namun, kekurangan dari tepung mocaf adalah perlu dicampur dengan tepung biasa karena teksturnya belum sempurna seperti tepung tapioka pada umumnya (Amri, 2014). Tepung mocaf memiliki viskositas lebih rendah dibandingkan tepung tapioka namun saat difermentasi lebih dari 72 jam, viskositas yang dihasilkan tepung mocaf hampir sama dengan tepung tapioka. Hal ini menunjukkan bahwa proses fermentasi yang lebih lama akan merusak lebih banyak sel, sehingga jumlah pati yang terlepas menjadi lebih banyak (Subagio dkk., 2008).

Badan Standarisasi Nasional (BSN) telah menetapkan Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk tepung mocaf (Tabel 2.1), yang tercantum dalam SNI

7622:2011. Standar ini bertujuan untuk meningkatkan kualitas produk agar layak dikonsumsi.

Tabel 2.1 Syarat Mutu Tepung Mocaf (Sumber: (SNI, 2011) 7622-2011)

Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
Keadaan		
Bentuk	-	Serbuk halus
Bau	-	Normal
Warna	-	Putih
Benda-benda asing	-	Tidak ada
Serangga dalam semua bentuk dan potongan yang tampak	-	Tidak ada
Kehalusan		
1. Lolos ayakan 100 mesh (b/b)	%	Min. 90
2. Lolos ayakan 80 mesh (b/b)	%	100
Kadar air (b/b)	%	Maks.13
Abu (b/b)	%	Maks. 1,5
Serat kasar (b/b)	-	Maks.2,0
Derajat putih ((Mg) = 100)	-	Min. 87
Belarang dioksida (SO ₂)	ug/g	Negatif
Derajat asam	mL Naoh 1N/100g	Maks. 4,0
HCN	mg/kg	Maks. 10
Cemaran logam		
1. Cadmium (Cd)	mg/kg	Maks. 0,2
2. Rimbak (Pb)	mg/kg	Maks. 0,3
3. Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40,0
4. Merkuri (Hg)	mg/kg	Maks. 0,05
Cemaran arsen (As)	mg/kg	Maks. 0,5
Cemaran mikroba	mg/kg	
1. Angka lempeng total (35°C, 48%)	Koloni/g	Maks. 1 x 10 ⁶
2. Escheria coli	APM/g	Maks. 10
3. Bacillus cereus	Koloni/g	<1 x 10 ⁴
4. Kapang	Koloni/g	Maks. 1 x 10 ⁴

2.2 Singkong (*Manihot esculenta crantz*)

Singkong (*manihot utilisima* atau *manihot esculenta crantz*) merupakan makanan pokok bagi lebih 500 juta orang di negara-negara berkembang. Tanaman ini sangat tangguh, mampu bertahan di kondisi kering dan kemarau, serta dapat tumbuh di tanah kurang subur atau tanah marginal.

Tanaman singkong memiliki kemampuan adaptasi yang luas, inilah yang memungkinkan singkong dapat ditanam di berbagai tempat kapan saja sepanjang tahun dengan risiko kegagalan yang rendah.

Indonesia memproduksi sekitar 21,8 juta ton singkong per tahun, dengan pati singkong yang terdiri dari amilosa sekitar 15% hingga 30% amilopektin yang tersusun atas monomer (Airlangga et al., 2019). Seiring perkembangannya, singkong tidak hanya digunakan sebagai bahan utama bagi berbagai industri olahan berbasis singkong. Singkong dapat dibedakan menjadi dua jenis : singkong manis yang bisa langsung dikonsumsi dan singkong pahit yang memerlukan pengolahan terlebih dahulu (Qudus et al., 2023).

Singkong juga dikenal dengan nama lain yaitu ubi kayu, ketela pohon, tela kaspo, atau kasape. Singkong adalah umbi atau akar pohon yang berbentuk Panjang, dengan diameter rata-rata sekitar 2-3 cm dan Panjang antara 50-80 cm (gambar 2.1), tergantung apa jenis singkong yang ditanam. Tanaman ini termasuk tanaman perdu dengan ranting yang lunak atau rapuh (mudah patah), memiliki batang bulat dan bergerigi yang terbentuk dari bekas tangkai.



Gambar 2.1 Akar Singkong

Akar singkong mengandung energi yang tinggi, menghasilkan hingga 250.000 kalori perhari lebih banyak dibandingkan dengan beras, gandum, dan jagung. Singkong mengandung sedikit sukrosa, maltosa, glukosa, dan fruktosa. Sekitar 50% dari kandungan asam amino bebas terdiri dari asam glutamat dan aspartat. Selain protein, singkong juga mengandung senyawa

lain seperti nitrat, nitrit, dan senyawa sianogenik (Bayata, 2019). Pada akar singkong memiliki nilai gizi yang penting karena salah satu bagian utama dari tanaman singkong.

Klasifikasi Tanaman singkong sebagai berikut :

kingdom : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Subkelas : Rosidae
 Ordo : Euphorbiales
 Famili : Euphorbiaceae
 Genus : *Manihot* mill
 Spesies : *Manihot esculenta* crantz

(U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2022).

2.2.1. Pati

Pati singkong adalah pati yang berasal dari umbi akar singkong, yang mengandung sekitar 90% pati. Kandung pati pada singkong ini lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan pati pada berbagai jenis umbi-umbian (Rachmayani, 2015). Pati atau amilum merupakan polisakarida sebagai bahan nutrisi. Terdiri dari dua polisakarida dimana amilosa dan amilopektin, perbandingan amilosa dan amilopektin dapat mempengaruhi sifat kelarutan dan derajat gelatinisasi. Semakin besar kandungan amilosa, maka pati makin bersifat kering dan kurang lengket.

Pati ini terdiri dari beberapa komponen yang dapat dipindahkan menggunakan air panas, komponen yang larut adalah amilosa, sementara yang tidak larut adalah amilopektin. Kandungan amilosa dalam pati lebih rendah dibandingkan dengan amilopektin. Perbandingan amilosa dan amilopektin ini berpengaruh terhadap proses gelatinisasi (Nisah, 2018). Modifikasi pati dapat meningkatkann sifat yang diperoleh, dan disidat dari tepung ini sangat menentukan dalam produk makanan, dimana akan memperbaiki kualitas produk tersebut.

2.3 Gula

Gula (karbohidrat) merupakan sumber energi utama bagi tubuh, dengan setiap gram karbohidrat menyediakan 4 kalori (Ratmana H, 2017). Karbohidrat adalah senyawa polihidroksi aldehida dan polihidroksi keton dengan rumus empiris umum (CH_2O). Jika oksigen karbonil pada karbohidrat berikatan pada atom karbon diujung rantai, maka karbohidrat tersebut termasuk aldehyd (CHO). Sebaliknya, jika oksigen karbonil berikatan dengan atom karbon ditengah rantai, maka karbohidrat termasuk golongan keton (C=O). umumnya karbohidrat berwarna putih, larut dalam air (kecuali beberapa jenis sakarida), namun sulit larut dalam pelarut organik.

Karbohidrat juga dikenal sebagai sakarida (dari bahasa latin *saccharum* yang berarti gula). Karbohidrat terbagi menjadi 2 jenis, yaitu gula sederhana dan gula kompleks. Gula sederhana terdiri dari satu atau dua molekul sakarida dan lebih mudah dicerna oleh tubuh, sebagian beredar dalam darah sebagai glukosa, sementara sisanya disimpan glikogen di hati dan otot atau diubah menjadi lemak sebagai cadangan energi. Contoh gula sederhana meliputi monosakarida, disakarida dan oligosakarida (Madhatilah, 2017).

Glukosa adalah jenis karbohidrat paling penting bagi tubuh karena menjadi sumber energi utama. Selain itu, glukosa juga digunakan untuk membuat zat penting lain seperti glikogen (cadangan energi), galaktosa, ribose, dan deoksiribosa (komponen DNA dan RNA). Sebagian besar karbohidrat yang kita makan diubah menjadi glukosa didalam tubuh. Monosakarida lain seperti fruktosa dan galaktosa juga akan diubah menjadi glukosa oleh hati. Karena itu, glukosa menjadi gula yang paling banyak ditemukan dalam tubuh (Wulandari & Kurnianingsih, 2018).

Kadar glukosa darah dipengaruhi oleh makanan, indeks glikemik (IG) adalah ukuran yang digunakan untuk mengklasifikasikan makanan berdasarkan dampaknya. Indeks glikemik menjadi alat yang membantu memahami seberapa cepat makanan dapat meningkatkan kadar glukosa. IG makanan mengklasifikasikan menjadi tiga kategori: IG rendah (<55), IG

sedang (55-70), dan IG tinggi (>70). Perbedaan nilai IG pada makanan dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya proses pengolahan, kandungan pati (amilosa dan amilopektin), jumlah serat pangan, kadar lemak, protein, serta keberadaan zat antigizi (Kadita et al., 2016). Tepung Mocaf memiliki indeks glikemik 46, yang berarti masuk dalam klasifikasi IG rendah, makanan dengan IG rendah cenderung memberikan kenaikan gula darah yang lambat dan stabil, sehingga baik untuk dikonsumsi oleh orang yang memiliki risiko diabetes atau orang yang ingin menjaga energi lebih lama.

2.4 Kukis

Kukis adalah salah satu jenis camilan yang populer di kalangan Masyarakat, dinikmati berbagai usia, mulai dari anak-anak, remaja, hingga orang dewasa, baik dipedesaan maupun diperkotaan. Kukis dibuat dengan bahan utama tepung, biasanya tepung terigu, ditambah gula halus, telur ayam, vanilli, margarin. Tepung maizena, baking powder, dan susu bubuk instan. Kukis memiliki tekstur yang renyah dan kokoh, sehingga tidak mudah hancur seperti kebanyakan kue kering lainnya.

Kukis yang dihasilkan harus memenuhi standar mutu yang ditetapkan agar aman untuk dikonsumsi oleh Masyarakat, menurut SNI 01-2973-1992 Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk kukis. Standar ini bertujuan untuk meningkatkan kualitas produk sehingga layak dikonsumsi

Tabel 2.2 Syarat Mutu kukis (Sumber: (SNI, 1992) 01-2973-1992)

Parameter	Nilai
Air (% b/b)	Maksimum 5
Protein (%b/b)	Minimum 9
Lemak (%b/b)	Minimum 9,5
Karbohidrat (%b/b)	Minimum 70
Abu (%b/b)	Maksimum 1,5
Logam berbahaya	Negatif
Serat kasar (%b/b)	Maksimum 0,5
Kalori (kal/100g)	Minimum 400
Jenis tepung	Terigu
Bau dan rasa	Normal, tidak tengik
Warna	Normal

2.5 Analisa Proksimat

Analisis proksimat adalah metode analisis kimia yang digunakan untuk menentukan kandungan zat gizi dalam bahan pakan atau pangan (Andryani & Hidayati 2017). Analisis proksimat meliputi pemeriksaan beberapa komponen yaitu kadar air, kadar abu, protein, lemak, karbohidrat, dan serat kasar (Verteriner, 2016). Dilakukan analisis proksimat Upaya dalam pengembangan pangan dengan bahan pangan yang berkualitas, penentuan kualitas pangan yang berkaitan dengan kebutuhan objektif, teknologi pengolahan, dan nilai gizi dapat dilakukan melalui analisis kadar makronutrien menggunakan metode analisis proksimat.

2.5.1 Kadar Air

Pengujian kadar air pada pangan bertujuan untuk memastikan kualitas, keamanan, serta daya tahan produk. Kandungan air dalam makanan sangat berpengaruh terhadap stabilitasnya, karena air dapat menjadi media untuk mikroorganisme seperti bakteri dan jamur, yang akan mempercepat kerusakan pada produk. Dengan mengetahui kadar air juga dapat mengontrol masa simpan produk dan aman untuk dikonsumsi.

Penentuan kadar air dalam bahan pangan dapat ditentukan dengan dua metode, yaitu metode langsung dan tidak langsung. Analisis kadar air cara langsung dibedakan kedalam beberapa metode yaitu dengan metode pengeringan, desikasi, termogravimetri, destilasi, dan metode Karl Fischer (Nadia, 2010). Penelitian ini menggunakan metode termogravimetri, yaitu salah satu teknik untuk menentukan kadar air dalam produk pangan. Prinsip kerja metode ini melibatkan penguapan air bebas dan air yang terikat lemah dalam bahan melalui pemanasan di oven pada suhu 105° C. Setelah pemanasan, bahan ditimbang hingga mencapai berat yang konstan yang berarti semua air telah diuapkan (Jasmine, 2014). Perhitungan kadar air menggunakan rumus:

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{W_s - (W_1 - W_0)}{W_s} \times 100 \%$$

keterangan:

W0 = berat krus kosong (g)

W1 = berat krus + sampel kering (g)

Ws = berat sampel

2.5.2 Kadar abu

Kadar abu total adalah bagian dari analisis proksimat yang digunakan untuk mengukur nilai gizi suatu bahan pangan. Analisis ini juga menunjukkan total kandungan mineral dalam bahan tersebut, termasuk mineral yang berpotensi bersifat toksik. Tujuan dilakukan kadar abu untuk mengetahui kandungan mineral, menilai kemurnian bahan, memastikan kualitas produk, hal ini penting untuk menilai jumlah dan jenis mineral yang bermanfaat bagi Kesehatan, seperti kalsium atau magnesium, sekaligus mendeteksi kontaminan seperti debu atau logam berat. Dan juga memastikan produk memenuhi standar keamanan dan regulasi

Metode gravimetri adalah Teknik analisis kuantitatif yang didasarkan pada pengukuran berat suatu unsur atau senyawa tertentu. Dalam pangan gravimetri sering digunakan untuk menentukan yotal mineral (abu) dalam bahan. Keunggulan metode ini adalah tidak memerlukan zat pembanding atau alat canggih, cukup dengan neraca analitik yang terkalibrasi (Darma & Marpaung 2020). Kadar abu dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W - W_1} \times 100$$

Keterangan

W = bobot cawan kosong dan sampel (g)

W1 = bobot cawan kosong (g)

W2 = bobot cawan kosong + abu (g)

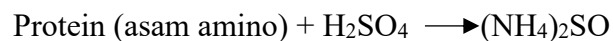
2.5.3 Kadar Protein

Protein merupakan salah satu makronutrien yang dibutuhkan oleh tubuh, dan dapat diperoleh melalui makanan atau minuman. Protein merupakan polimer yang terdiri dari monomer-monomer asam amino. Protein juga berperan sebagai enzim atau katalis biologis yang membantu tubuh melaksanakan berbagai reaksi penting. Enzim memiliki fungsi

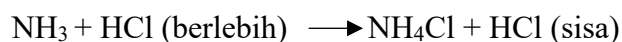
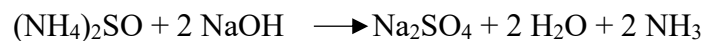
utama dalam mempercepat reaksi kimia di dalam tubuh, sehingga proses tersebut berlangsung efisien. Protein juga bisa menjadi sumber energi bagi tubuh. Ini terjadi ketika tubuh mengubah materi non-karbohidrat menjadi glukosa, yang kemudian digunakan sebagai sumber energi. Proses ini terjadi dalam kondisi tertentu, seperti saat berpuasa, melakukan aktivitas fisik berat atau dalam keadaan medis tertentu (Rachmawati et al., 2024).

Metode kjeldahl adalah teknik yang relative sederhana untuk mengukur kadar protein dalam makanan. Kadar protein ini dihitung berdasarkan kandungan nitrogen dalam sampel, karena nitrogen yang ada pada protein sekitar 16% dari berat molekul protein.

Prinsip metode kjeldahl melibatkan pemecahan senyawa organik menjadi senyawa nitrogen amonium. Proses ini dilakukan dengan memecah molekul besar dalam sampel menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) pekat sambil dipanaskan, sehingga dihasilkan ammonia. Reaksi yang terjadi selama proses destruksi:



Reaksi yang terjadi selama proses destilasi:



Reaksi yang terjadi selama proses titrasi:



Jumlah amonia yang terbentuk kemudian diukur sebagai jumlah nitrogen dalam sampel (Rachmawati et al., 2024).

$$N (\%) = \frac{(V \text{ NaOH Blanko} - V \text{ Naoh sampel}) - N \text{ NaOH} \times BE \text{ Nitrogen}}{W \text{ sampel}} \times 100$$

Keterangan :

% N	= Persen Nitrogen
V NaOH blanko	= Volume NaOH titrasi blanko
V NaOH sampel	= Volume NaOH titrasi sampel
N NaOH	= Normalitas NaOH hasil standarisasi
Bobot sampel	= Berat Sampel
BM atom nitrogen	= 14,008

2.5.4 Lemak

Lemak dan minyak merupakan bagian dari kelompok lipida, yaitu senyawa organik memiliki sifat tidak larut air, tetapi dapat larut dalam pelarut organik seperti eter, benzena, kloroform, dan sejenisnya. Lemak dan minyak ditemukan pada hampir semua jenis bahan pangan, analisis kadar lemak dalam bahan pangan sangat penting untuk memastikan perhitungan kebutuhan kalori suatu makanan dapat dilakukan secara akurat (Pargiyanti, 2019). Lemak dan minyak adalah sumber energi yang paling efisien dibandingkan dengan protein dan karbohidrat. Setiap gram lemak menghasilkan 9 kkal, sedangkan protein dan karbohidrat masing-masing hanya menghasilkan sekitar 4 kkal per gram.

Analisis kadar lemak secara umum dibagi menjadi dua metode utama, yaitu metode kering dan metode basah. Salah satu cara analisis lemak menggunakan metode kering adalah dengan metode Soxhlet. Penentuan kadar lemak menggunakan metode Soxhlet membutuhkan waktu ekstraksi sekitar 4 hingga 6 jam untuk mencapai 5-6 sirkulasi. Metode Soxhlet merupakan Teknik analisis lemak yang bekerja dengan prinsipnya, pada proses soxhletasi, pelarut pengekstrak dalam labu Soxhlet dipanaskan hingga mencapai titik didihnya, menghasilkan uap. Uap ini naik melalui pipa kondensasi, kemudian mengembun dan menetes pada bahan yang akan diekstraksi (Melwita et al., 2014).

Pelarut tersebut merendam bahan, dan Ketika ketinggian pelarut melebihi pipa pengalir, larutan ekstrak mengalir Kembali ke Soxhlet. Dalam labu, ekstrak dipanaskan ulang sehingga pelarut menguap lagi, meninggalkan lemak dalam labu. Proses ini terus berulang, memungkinkan setiap siklus menggunakan pelarut segar untuk mengekstraksi bahan secara efisien (Melwita et al., 2014). Perhitungan kadar lemak dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100$$

Keterangan:

W1 = bobot sampel (g)

W2 = bobot labu sebelum ekstraksi (g)

W3 = bobot labu setelah ekstraksi (g)

2.5.5 Kadar Serat Kasar

Serat pangan adalah kelompok polisakarida dan polimer lain yang tidak dapat dicerna oleh sistem pengenceran bagian atas tubuh manusia. Serat kasar merujuk pada bagian dari pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh bahan kimia yang digunakan dalam penentuan kadar serat kasar. Sementara itu, serat pangan secara umum mengacu pada bagian bahan pangan yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan. Karena itu, kadar serat kasar cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kadar serat pangan. Hal ini disebabkan oleh kemampuan bahan kimia seperti asam kuat dan basa kuat untuk menghidrolisis komponen pangan lebih efektif dibandingkan dengan enzim pencernaan (Fitria & Yusuf, 2020).

Pengujian kadar serat pada suatu bahan pangan memerlukan langkah awal penghilangan lemak (*Defatting*) sebelum analisis dilakukan. Prinsip metode pengujian kadar serat berdasarkan SNI 01-2891-1992 adalah penggunaan asam dan basa untuk memisahkan serat kasar dari komponen lainnya dalam sampel. Sementara itu, prinsip metode refluks melibatkan penguapan pelarut pada suhu tinggi, di mana uap tersebut didinginkan menggunakan kondensor hingga kembali mengembun. Kondensat ini kemudian turun kembali ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut tetap tersedia sepanjang proses aksi berlangsung. Kadar serat kasar pada sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar serat kasar (\%)} = \frac{W - W_1}{W_2} \times 100$$

Keterangan:

W = bobot sampel (g)

W1 = bobot abu (g)

W2 = bobot endapan pada kertas saring (g)

2.5.6 Karbohidrat

Karbohidrat adalah nutrisi yang terdiri dari senyawa organik dengan atom karbon, hidrogen, dan oksigen, yang berfungsi sebagai sumber energi. Karbohidrat adalah zat makanan yang paling cepat menyediakan energi bagi tubuh, terutama saat lapar. Setelah dikonsumsi, karbohidrat segera dioksidasi untuk memenuhi kebutuhan energi tubuh (Ndumuye et al., 2022). Karbohidrat dapat dibedakan menjadi tiga kelompok utama berdasarkan struktur kimianya, yaitu monosakarida (gula sederhana), disakarida dan polisakarida (seperti pati dan serat pangan). dalam produk pangan, kandungan karbohidrat total umumnya menggunakan metode by difference, yaitu dengan mengurangi jumlah kadar protein total, lemak total, dan abu total dari 100% total sampel. Rumus umum yang digunakan adalah:

$$\text{Karbohidrat (\%)} = 100\% - (\text{protein} + \text{lemak} + \text{abu} + \text{air})$$

Metode ini digunakan karena karbohidrat merupakan sisa setelah seluruh komponen utama lainnya dihitung meskipun metode ini bersifat tidak langsung, namun telah banyak digunakan dalam analisis proksimat untuk menentukan komposisi zat gizi makanan secara praktis dan efisien.

2.6 Metode Analisis Kadar Gula

Analisis kadar gula total bertujuan untuk mengetahui jumlah gula yang terdapat dalam makanan serta menentukan komposisi bahan pangan. Dalam bidang ilmu gizi, analisis ini penting untuk menghitung kebutuhan energi, mendukung pencegahan penyakit seperti diabetes, serta menilai kandungan serat kasar dan faktor-faktor lain. Berikut ini adalah beberapa metode yang digunakan untuk menganalisis kadar gula total:

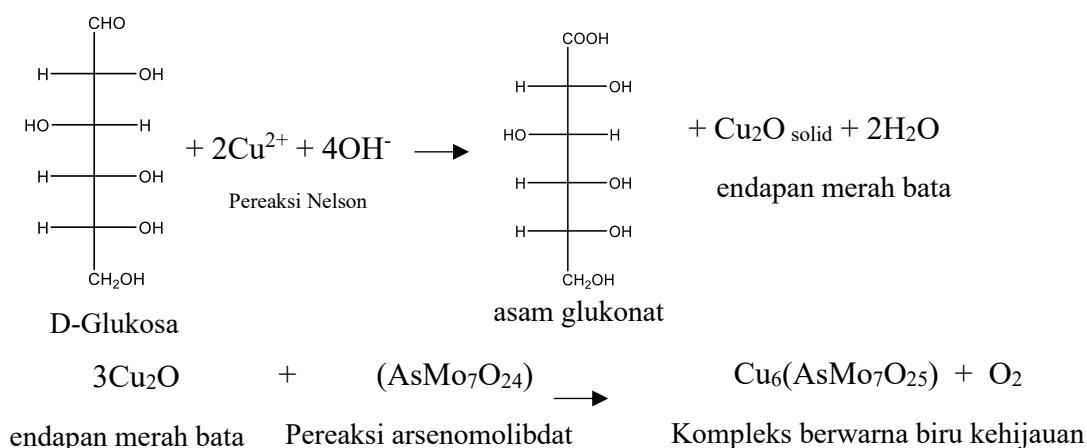
2.6.1. Metode glukosa oksidase

Pengujian kadar glukosa dengan metode glukosa oksidase memberikan hasil yang akurat karena hanya glukosa yang diukur, sementara gula reduksi lainnya tidak terdeteksi. Prinsip kerja metode ini adalah enzim glukosa oksidase mengkatalis oksidasi α -D-glukosa menjadi D-glukono-1,5-lakton (asam glukonat), yang menghasilkan hydrogen peroksida. Hydrogen

peroksida kemudian diuraikan oleh katalis peroksidase, melepaskan oksigen yang selanjutnya bereaksi dengan O-dianisidin. Reaksi ini mengoksidasi O-dianisidin dan menghasilkan produk kromofor merah

2.6.2. Somogyi – Nelson

Metode Somogyi-Nelson digunakan untuk menentukan kadar gula pereduksi berdasarkan prinsip reaksi gula pereduksi. Dalam proses ini, ion Cu^{2+} direduksi menjadi ion Cu^+ , yang kemudian mereduksi senyawa arsenomolibdat dan membentuk kompleks berwarna biru kehijauan. Metode ini sangat cocok digunakan untuk mengukur kadar gula pereduksi pada sampel yang mengandung campuran gula. Reaksi terjadi Ketika reagen Cu alkalis (Cu^{2+}) tertentu direduksi menjadi Cu^+ oleh gula, menghasilkan endapan merah bata. Setelah reagen arsenomolibdat ditambahkan, endapan tersebut larut dan membentuk kompleks biru kehijauan (Cu^+ Kembali diubah menjadi Cu^{2+}). Keunggulan metode ini adalah reaksi yang terjadi tidak dipengaruhi oleh gula lain yang bukan gula pereduksi. Intensitas warna biru kehijauan yang terbentuk menunjukkan jumlah gula pereduksi dalam sampel. Dalam analisis spektrofotometri, metode ini hanya dapat mengukur kadar gula pereduksi dari sejumlah monosakarida dan disakarida yang ada dalam sampel (Al-kayyis & Susanti, 2016). Reaksi Somogyi-Nelson terhadap gula pereduksi yang terjadi sebagai berikut:



a. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-Vis) adalah alat analisis

instrumental yang berfungsi untuk mengukur Panjang gelombang serta intensitas Cahaya ultraviolet (UV) dan Cahaya tampak (Vis) yang diserap oleh suatu sampel. Umumnya digunakan untuk analisis molekul, ion anorganik, atau senyawa kompleks (Dachriyanus, 2004). Interaksi antara sinar ultraviolet dan senyawa organik dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi struktur molekul senyawa tersebut. Electron dari ikatan kimia dan electron bebas merupakan bagian molekul yang paling responsif terhadap sinar ultraviolet. Interaksi ini tercatat dalam spektrum yang dinyatakan sebagai Panjang gelombang atau absorbansi (Suharti, 2017).

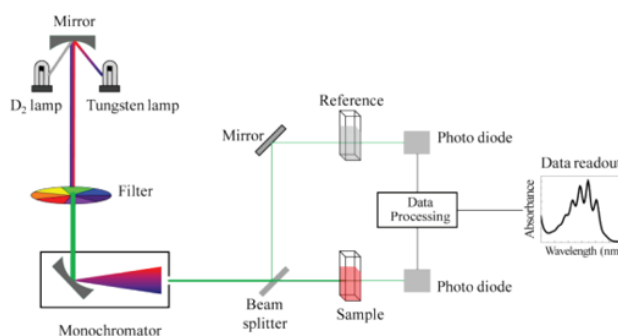
Dalam spektrofotometri UV-Vis, istilah penting meliputi kromofor, ausokrom, efek batokromik, efek hiperkromik, hipokromik dan hipsokromik. Kromofor adalah gugus kimia yang menyerap Cahaya, pada daerah ultraviolet atau tampak, memengaruhi Panjang gelombang Cahaya yang di absorpsi. Auksokrom adalah gugus fungsi dengan pasangan elektron bebas yang berikatan dengan kromofor, dan dapat meningkatkan absorbsi UV-Vis pada Panjang gelombang tertentu (Suharti, 2017).

Spektrum UV-Vis sering digunakan dalam pengukuran kuantitatif konsentrasi analit yang terkandung dalam larutan. Spektrum ini mencakup sinar ultraviolet dengan Panjang gelombang antara 200-400 nm dan sinar tampak dalam rentang 400-800 nm. Untuk mengetahui konsentrasi analit, Hukum Lambert-Beer diterapkan, yang menyatakan bahwa absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi larutan, serta koefisien absorpsi pada Panjang gelombang tertentu. Dengan mengukur absorbansi pada Panjang gelombang tertentu, kita dapat menentukan konsentrasi analit dalam larutan (Dachriyanus, 2004).

Pada umumnya ada dua jenis instrumen spektrofotometer, yaitu *single-beam* dan *double-beam*. Instrumen *single-beam* digunakan untuk mengukur absorbansi pada Panjang gelombang tunggal, cocok untuk analisis kuantitatif. Keuntungannya mencakup kesederhanaan, biaya yang terjangkau, dan rendahnya biaya operasional. Instrumen ini mengukur sinar ultraviolet (190-210 nm) dan sinar tampak (sampai 1000 nm),

memungkinkan analisis yang efektif dalam beragam aplikasi kimia (Suharti, 2017).

Sedangkan instrumen *double-beam* merupakan alat yang memanfaatkan dua sinar Cahaya untuk analisis. Sinar pertama melalui larutan blanko, sementara sinar kedua melewati sampel. Sumber cahaya untuk sinar ultraviolet adalah lampu deuterium, sedangkan lampu wolfram digunakan untuk sinar tampak. Monokromaator dalam spektrofotometri UV-Vis memanfaatkan lensa prisma dan filter optik untuk memisahkan panjang gelombang. Sel sampel terdiri dari kuvet yang terbuat dari kuarsa atau gelas detektor dioda foto, menerima cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Instrumen ini memberikan kemampuan analisis yang lebih presisi dan konsisten dibandingkan instrument *single beam* (Suharti, 2017). Berikut merupakan beberapa komponen spektrofotometri UV-Vis



Gambar 2. 2 Diagram Alat spektrofotometer UV-Vis (double-beam) (Suharti, 2017).

1. Sumber Cahaya

a. Lampu Deuterium

Lampu deuterium digunakan untuk mengukur sampel di daerah ultraviolet dengan Panjang gelombang 190 -380 nm. Spektrum energi radiasinya berbentuk lurus (G.Schiewe, 1966)

b. Lampu Wolfram (Tungsten)

Lampu wolfram digunakan untuk mengukur sampel di daerah sinar

tampak dengan Panjang gelombang 350-2200 nm. Spektrum radiasinya berbentuk garis lengkung.

2. Monokromator

Monokromator berfungsi untuk memilih Panjang gelombang dengan mengubah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Komponen monokromator meliputi prisma, celah optis kisi difraksi, dan filter

3. Kuvet

Kuvet adalah wadah untuk sampel yang akan dianalisis. Kuvet kuarsa yang terbuat dari silika memiliki kualitas yang lebih unggul. Kuvet ini memiliki lebar 1 cm dan berbentuk persegi Panjang. Beberapa persyaratan untuk kuvet adalah permukannya harus sejajar, tidak rapuh, tidak berwarna agar semua Cahaya dapat masuk, dan tidak bereaksi terhadap bahan kimia.

4. Detektor

Detektor adalah komponen yang berfungsi untuk menangkap Cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus Listrik. Terdapat dua jenis detector, yaitu detector phototube dan detector photomultiplier. Detector harus memenuhi beberapa kriteria, termasuk Tingkat kepekaan yang tinggi, rasio sinyal terhadap konsentrasi yang tinggi, serta respons yang baik dan cepat berbagai Panjang gelombang.

2.7 Validasi Metode

Validasi metode menurut United States Pharmacopeia (USP) bertujuan untuk memastikan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki spesifikasi yang jelas, akurat, dan tahan terhadap kondisi analisis pada analit yang akan diuji. United States Pharmacopeia (USP) menetapkan delapan parameter yang harus diuji dalam validasi metode terdiri dari presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, sensitivitas, linieritas, dan rentang. Penilaian terhadap setiap parameter dilakukan melalui

percobaan laboratorium untuk memastikan bahwa parameter tersebut memenuhi kriteria yang diperlukan untuk penggunaannya (Harmita, 2004a).

2.7.1. Spesifisitas/Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode untuk mengukur analit dengan akurat meskipun terdapat komponen lain dalam sampel. Hal ini menunjukkan sejauh mana metode dapat membedakan analit dari zat lain seperti kontaminan, produk degradasi, atau senyawa yang serupa. Sedangkan spesifisitas mengacu pada kemampuan metode untuk merespons secara khusus terhadap satu analit, bahkan jika terdapat senyawa lain dengan struktur molekul yang mirip.

Pengujian spesifisitas dapat dilakukan dengan memisahkan senyawa target dari senyawa lain (dengan nilai resolusi > 2) atau dengan menggunakan detector selektif, seperti UV, Fluorensi, atau elektrokimia. Pada metode spektrofotometri UV, rentang ditentukan dari nilai absorptivitas (Rachmawati et al., 2024).

2.7.2. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan sejauh mana hasil analisis mendekati nilai analit yang sebenarnya, dinyatakan dalam persen perolehan kemabli (*recovery*). Kecermatan dipengaruhi oleh galat sistemik. Keermatan dapat ditentukan melalui dua pendekatan, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standard addition method*). Pada metode simulasi sejumlah analit dari bahan murni seperti senyawa pembanding kimia, ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa (plasebo) dari sediaan farmasi. Campuran tersebut kemudian dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang telah ditambahkan untuk memverifikasi kecermatan analisis terhadap kadar sebenarnya (Harmita, 2004a).

Rumus untuk menghitung perolehan Kembali (*recovery*) adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

Cs = konsentrasi kadar analit yang sebenarnya

Ct = konsentrasi kadar analit yang terdeteksi

2.7.3. Presisi

Presisi (keseksamaan) diukur melalui simpangan baku atau simpangan baku relative (koefisien variasi) untuk menggambarkan Tingkat konsistensi hasil analisis. Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan merujuk pada presisi hasil analisis Ketika metode yang sama dilakukan berulang kali oleh analisis yang sama, menggunakan kondisi yang identik, dan dalam rentang waktu yang singkat. Sedangkan ketertiruan juga dapat diuji dalam laboratorium yang sama, tetapi menggunakan peralatan, pereaksi, dan analisis yang berbeda. Suatu metode dianggap memenuhi kriteria seksama jika menghasilkan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi sebesar 2% atau kurang. Namun, kriteria ini bersifat fleksibel dan dapat disesuaikan berdasarkan faktor seperti konsentrasi analit yang diuji, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004a).

Perhitungan keseksamaan, yang diukur sebagai simpangan baku relatif (RSD), dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Mencari standar deviasi (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

2.7.4. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk menghasilkan respons (y) yang proporsional terhadap konsentrasi (x) analit dalam rentang tertentu. Linieritas diuji dengan mengencerkan larutan baku induk hingga mencapai rentang konsentrasi yang diinginkan. Dalam pengujian ini, biasanya dibuat setidaknya lima seri konsentrasi yang berbeda (Rachmawati et al., 2024). Pengujian linieritas dilakukan dengan metode kuadrat kecil untuk menemukan hubungan antara hasil analisis dan

konsentrasi analit. Biasanya, data perlu diolah terlebih dahulu dengan transformasi matematik sebelum dilakukan analisis regresi untuk mendapatkan hubungan yang proporsional antara hasil pengukuran dan konsentrasi analit (Harmita, 2004a).

Koefisien kolerasi (r) digunakan sebagai parameter untuk menentukan adanya hubungan linier dalam analisis regresi linier $Y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal tercapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 , tergantung pada arah garis. Nilai a menunjukkan kepekaan analisis, terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang perlu dihitung adalah simpangan baku residual (S_y). Semua perhitungan matematik ini dapat dilakukan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer (Harmita, 2004a).

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

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b}$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{x} \times 100\%$$

Dimana,

$$y = a + bx$$

$$n = \text{jumlah sampel}$$

$$b = \text{slope}$$

2.7.5. Batas Deteksi

Batas deteksi atau *Limit of Detection* (LoD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter penting dalam uji batas. Penentuan batas deteksi suatu metode bervariasi tergantung pada apakah metode analisis menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis dengan menggunakan instrumen, batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blangko beberapa kali dan menghitung simpangan baku respon blangko. Dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$BD = \frac{3 \times \frac{S_y}{x}}{b}$$

2.7.6. Batas Kuantisasi

Batas kuantisasi atau *Limit of Quantification* (LoQ) adalah parameter pada analisis renik yang menunjukkan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria akurasi dan presisi. Kedua batas ini, batas deteksi dan batas kuantisasi dapat dihitung secara statistik menggunakan garis regresi linier dari kurva kalibrasi har. Menurut ICH, menggunakan metode *non fragmental visual* dan metode perhitungan. Metode perhitungan didasarkan pada respon standar deviasi (SD) dan kemiringan (S, Slope) pada kurva baku, yang dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$BK = \frac{10 \times \frac{Sy}{x}}{b}$$