

BAB II Tinjauan Pustaka

II.1 Lada

Nama lain dari lada adalah pedes (Sunda) dan merica (Jawa). Lada (*Piper nigrum L.*), famili Piperaceae sudah dikenal sebagai penyedap makanan, mengatasi bau badan, serta pengawet daging (Septiatin, 2008).

Ada dua macam lada yang dikenal masyarakat Indonesia yaitu lada hitam dan lada putih. Lada hitam diperoleh dengan memetik buah yang masih hijau, mengupasnya, difermentasi untuk menambah rasa lada, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari, dan rasanya lebih pedas. Sedangkan lada putih diperoleh dengan memetik biji masak merah, diremas perlahan-lahan dan direndam dalam air, kulit

dan daging buah dibuang sebelum dikeringkan di sinar matahari (Septiatin, 2008).

Klasifikasi tanaman lada adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Ordo	: Piperales
Familia	: Piperaceae
Genus	: Piper
Species	: Piper nigrum L

(Tjitrosoepomo, 2007)

Deskripsi tanaman lada adalah batang pokok berkayu, beruas-ruas dan tumbuh merambat dengan menggunakan akar pelekat pada tiang panjat atau menjalar 6 di atas permukaan tanah. Tanaman lada merupakan akar tunggang dan memiliki daun tunggal, berseling dan tersebar. Daun berbentuk bulat telur sampai memanjang dengan ujung meruncing (Rismunandar, 2007). Buah lada berbentuk bulat, berbiji keras dan berkulit buah yang lunak. Kulit buah yang masih muda berwarna hijau, sedangkan yang tua berwarna kuning. Buah yang sudah masak berwarna merah, berlendir dengan rasa manis. Sesudah dikeringkan lada berwarna hitam. buah lada merupakan buah duduk, yang melekat pada malai. Besar kulit dan bijinya 4-6 mm, sedangkan besarnya biji 3-4 mm. Berat 100 biji kurang lebih 38 gram atau rata-rata 4,5 gram. Kulit buah atau pericarp terdiri dari 3 bagian, yaitu epicarp (kulit luar), mesocarp (kulit tengah), endocarp

(kulit dalam) (Rismunandar, 2007). Kulit ini terdapat biji-biji yang merupakan produk dari lada, biji-biji ini juga mempunyai lapisan kulit yang keras (Sutarno dan Agus Andoko, 2005).

II.2 Kandungan Kimia dan Manfaat dari Tanaman Lada

Piper nigrum Linn. dalam ekstrak aqueous, ekstrak metanol dan ekstrak etanol positif mengandung karbohidrat, protein, tannin, fenol, kumarin, alkaloid dan antrakuinon. Kandungan alkaloid *Piper nigrum* Linn. sebanyak 5-9% mengandung senyawa utama piperin, piperidin, piperetin, dan piperenin (Kadam et al, 2013). Penelitian mengenai alkaloid mendapat perhatian khusus karena memberikan aktivitas yang menjanjikan seperti antiinflamasi, antibakteri, anti-asma, dll. (Khusbhu et al, 2011).

II.3 Adulteran

Menurut Food Safety and Standards Authority of India (2012), adulteran adalah tindakan secara sengaja menurunkan kualitas makanan yang ditawarkan baik oleh campuran atau substitusi zat inferior atau dengan menghilangkan beberapa bahan berharga.

Tabel II.1 Jenis Adulteran (Food Safety and Standards Authority of India, 2012)

Tipe	Zat yang ditambahkan
Pemalsuan yang disengaja	Pasir, pecahan marmer, batu, lumpur, kotoran lainnya, bedak bubuk kapur, air, minyak mineral, dan warna berbahaya.

Adulteran incidental	Residu pestisida, kotoran tikus, larva dalam makanan.
Kontaminasi Logam	Arsen dari peptisida, timbal dari air limbah dari industri kimia.

Dalam pembuatan lada instan terdapat pencampuran dengan bahan tambahan seperti jagung, pati singkong, dan semen putih.

II.3.1 Jagung

Tanaman jagung termasuk dalam keluarga rumput-rumputan dengan spesies *Zea Mays L.* Secara umum klasifikasi dan sistematika tanaman jagung adalah sebagai berikut .:

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisi	: Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: Angiospermae (berbiji tertutup)
Kelas	: Monocotyledone (berkeping satu)
Ordo	: Graminae (rumput-rumputan)
Famili	: Graminaceae
Genus	: Zea
Species	: <i>Zea Mays L.</i>

(Purwono, 2005)

Tanaman jagung (*Zea mays L.*) merupakan tanaman rumput-rumputan dan berbiji tunggal (monokotil) (BPK, 2004). Menurut Bellfield dan Brown (2008), Morfologi tanaman jagung adalah sebagai berikut:

- a. Biji Biji jagung dikenal sebagai kernel dimana terdiri dari tiga bagian utama yaitu dinding sel, endosperm dan embrio.
- b. Daun Daun terbentuk dari pelepah daun dan menutupi hampir semua batang jagung.
- c. Batang Batang beruas-ruas dengan jumlah 10-40 ruas.
- d. Akar Sistem perakaran tanaman jagung terdiri atas akar-akar seminal, koronal dan akar udara.
- e. Bunga Terdiri dari bunga jantan dan betina, dengan letak terpisah. Bunga jantan terletak pada malai bunga (di ujung tanaman) sedangkan bunga betina terdapat pada tongkol jagung.

II. 4 Metode Ekstraksi

- a. Cara dingin

Proses ekstraksi secara dingin pada prinsipnya tidak memerlukan pemanasan. Hal ini diperuntukkan untuk bahan alam yang mengandung komponen kimia yang tidak tahan pemanasan dan bahan alam yang mempunyai tekstur yang lunak.

Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara dingin. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel. Sampel biasanya direndam selama 3-5 hari sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarutan analit. Ekstraksi biasanya dilakukan berulang kali sehingga analit terekstraksi secara sempurna. Indikasi bahwa semua analit telah terekstraksi secara sempurna adalah pelarut yang digunakan tidak warna. Kelebihan ekstraksi ini adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan

maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Kelemahannya adalah menggunakan banyak pelarut (Maria, 2017).

b. Cara Panas

Ekstraksi secara panas dilakukan untuk mengekstraksi komponen kimia yang tahan terhadap pemanasan seperti glikosida, saponin dan minyak-minyak menguap yang mempunyai titik didih yang tinggi, selain itu pemanasan juga diperuntukkan untuk membuka pori-pori sel simplisia sehingga pelarut organik mudah masuk ke dalam sel untuk melarutkan komponen kimia. Metode ekstraksi yang termasuk cara panas yaitu Refluks dan Destilasi Uap Air (Tobo, 2001).

Pelarut yang dipilih untuk melakukan ekstraksi dilihat berdasarkan kemampuan menarik metabolit sekunder dari tanaman tersebut. Sebagai cairan untuk melakukan ekstraksi digunakan air, eter atau campuran etanol dan air (Farmakope Indonesia III, 1979).

II.5 Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam (stationary phase) dan fase gerak (mobile phase). Fase diam dapat berupa bahan padat atau parus dalam bentuk molekul kecil, atau dalam bentuk cairan yang dilapiskan pada pendukung padat atau dilapiskan pada dinding kolom. Fase gerak dapat berupa gas atau cairan. Saat ini kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling umum dan paling sering digunakan dalam bidang kimia analisis dan dapat dimanfaatkan untuk melakukan analisis, baik analisis kualitatif, kuantitatif, atau preparatif dalam

bidang farmasi, lingkungan industri, dan sebagainya (Gandjar & Rohman, 2012).

II.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat alumunium, atau pelat plastik. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*). Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah, serta peralatan yang digunakan lebih sederhana (Gandjar & Rohman, 2012).

Fase Diam

Fase diam yang sering digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Penjerap yang sering digunakan adalah silika dan alumunium oksida. Fase diam terdiri dari lapisan kering dengan ukuran yang seragam dan membentuk ikatan yang baik dengan penyangga. Panjang dari lapisan adalah 20 cm dan lebar 20 cm atau 10 cm. Biasanya untuk analisis ketebalannya adalah 0,1-0,3 mm. (Stahl, 1985 dan Srivasta, 2011).

Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal.

Penotolan Sampel

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Penotolan yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Untuk memperoleh reproduktibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μ l. Jika volume sampel yang akan ditotolkan lebih besar dari 2-10 μ l maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan (Gandjar dan Rohman, 2012).

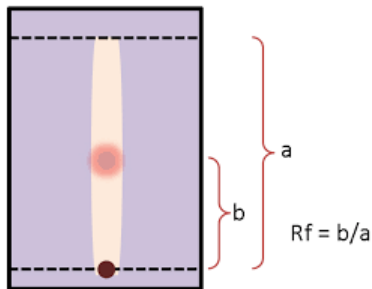
Pengembangan

Pengembangan adalah proses pemisahan campuran cuplikan akibat pelarut pengembang merambat naik dalam lapisan. Jarak pengembang normal yaitu jarak antara garis awal dan garis depan. Jarak pengembang senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan nilai R_f (Sewell, dkk., 1991).

$$R_f = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal (b)}}{\text{Jarak garis depan dari titik awal (a)}}$$

Jarak garis depan titik awal

(a)



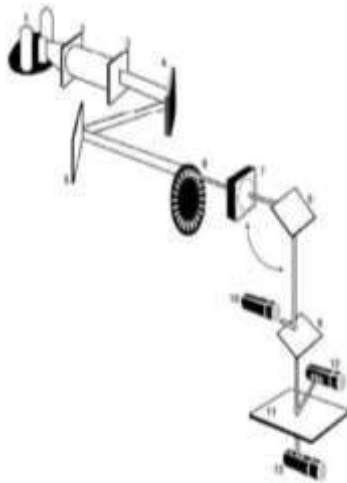
Gambar II.2 Ilustrasi kromatogram untuk mengukur Rf
(diakses pada 10 November 2018)

Detektor

Untuk deteksi senyawa tanpa warna pada kromatogram dapat dilakukan dengan cara kimia, fisika maupun biologi. Cara kimia dilakukan dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi dengan cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika dilakukan dengan pencacahan radio aktif dan fluoresensi sinar UV (Mulya, 1995). Untuk pemeriksaan dengan lampu UV untuk eksitasi fluoresensi biasanya ditempatkan pada suatu ruang atau kotak kecil yang ditutup tirai hitam yang kira-kira berukuran 30x35x45 yang didalamnya ditempatkan lampu UV yang sesuai. Pada deteksi warna dengan pereaksi semprot, pereaksi warna yang digunakan harus mencapai plat KLT dalam bentuk tetesan halus, oleh karena itu biasanya digunakan semprotan yang serba kaca dengan dilengkapi wadah tekana aerosol (Stahl, 1985).

II.7 KLT Densitometri

Densitometri merupakan metode penetapan kadar suatu senyawa pada plat KLT yang menggunakan instrument TLC scanner. Pengukuran ini dilakukan dengan cara mengukur serapan analit dimana cahaya yang diukur dapat berupa cahaya yang dipantulkan atau yang diteruskan. Alat ini dilengkapi dengan spektrofotometer yang panjang gelombangnya dapat diatur dari 200-700 nm. Susunan optik densitometri ini tidak banyak berdeda dengan spektrofotometri tetapi pada densitometri digunakan alat khusus yaitu reflection photo multiplier, sebagai pengganti photo multiplier pada spektrofotometri yang dapat memperbesar tenaga beda potensial listrik sehingga mampu menggerakkan integrator (Poole, 2000).



Gambar II.3 Instrumentasi TLC scanner 4 CAMAG (Poole, 2000).

Keterangan :

1. Lamp selector
2. Entrance lens system
3. Monochromator entry slit
4. Monochromator grating
5. Mirror
6. Slit aperture disc
7. Lens system
8. Mirror
9. Beam splitter
10. Reference photomultiplier
11. Scanning object
12. Measuring photomultiplier
13. Photodiode (transmission)

II.7.1 Software untuk Menganalisis Bercak

Ada beberapa pilihan perangkat lunak untuk analisis gambar, diantaranya adalah TLC Analyzer, ImageJ, Just-TLC, dan Sorbfil TLC (Sherma dan Popovic, 2014).

1. TLC Analyzer

TLC Analyzer adalah sebuah program komputer yang menganalisis gambar digital dari plat KLT yang dapat digunakan untuk membuat scan multispectral, densitogram, dan kurva kalibrasi. Untuk mengetahui hasil analisis dari TLC Analyzer harus mempertimbangkan apa yang terjadi pada plat KLT yang dikenai sinar UV. Lampu UV memancarkan cahaya 254 nm yang dapat menekan silika gel di plat atau sampel pada permukaanya. Silika gel

akan berpendar cahaya hijau, sedangkan sampel umumnya akan menyerap cahaya dan memblokir cahaya yang mencapai silika gel. Supaya sampel dapat menyerap sinar UV dan memblokirnya dari silika gel, sampel harus memiliki koefisien pemadaman yang tinggi (jumlah cahaya yang diserap dan tersebar) mendekati 254 nm. Beberapa sampel kimia akan berpendar pada plat silika gel, tetapi pada panjang gelombang yang berbeda. Jumlah sampel yang terdapat pada plat akan menentukan berapa banyak silika gel tersebut menyerap sinar UV. Jika konsentrasi sampel di plat relatif tinggi, bercak senyawa kimia itu akan gelap di bawah sinar UV. Dengan demikian, jika konsentrasi sampel relatif rendah, maka bercak yang akan muncul berwarna abu-abu kehijauan di bawah sinar UV (Hess, 2007).

2. ImageJ

ImageJ adalah suatu program yang dikembangkan oleh Nasional Institutes of health (NIH) Departemen Kesehatan dan Layanan Kemanusiaan di Amerika Serikat yang terbukti paling sederhana, mudah dan serbaguna meskipun jenis software lainnya dapat juga dimanfaatkan. Software ImageJ memakai format gambar dalam bentuk JPEG ataupun TIFF. Gambar dapat dioptimalkan dengan pemilihan warna domain terbalik (merah, hijau, atau biru). Sebagai contoh gambar dari plat KLT yang melibatkan fluoresensi quenching dengan analit atau deteksi oleh warna. Reaksi warna biasanya akan memerlukan pemilihan domain warna yang tepat dan diperlukan gambar terbalik sehingga piksel analit memiliki nilai-nilai positif terhadap piksel background, yang idealnya memiliki nilai yang kecil.

ImageJ dapat mengkompensasi secara otomatis untuk setiap perbedaan luas area (Kurniawan, dkk., 2011).

3. JustTLC

JustTLC adalah generasi terbaru perangkat lunak untuk analisis KLT yang dapat memberikan hasil percobaan kimia hanya dengan menggunakan plat KLT. JustTLC dapat mengukur akurasi yang tepat untuk pengamatan analisis dan hasil yang dapat diandalkan hanya dalam hitungan waktu beberapa menit.

Adapun beberapa kelebihan dari JustTLC adalah sebagai berikut:

Melakukan analisis kuantitatif plat KLT dalam hitungan menit.

Secara otomatis dapat mendeteksi dan membandingkan kromatogram dalam tiga dimensi.

Membandingkan data dan bercak yang terdapat pada KLT

Data dapat diekspor ke Microsoft Excel atau perangkat lunak lain untuk keperluan analisis lebih lanjut.

Dapat membuat grafik berdasarkan plat dan lembar data.

JustTLC meliputi algoritma deteksi bercak dan kuantifikasi yang sangat handal dan akurat. Dalam beberapa klik saja bercak KLT dapat diukur dan mudah dibandingkan (Johnson, dkk., 2007).

4. Sorbfil TLC

Sorbfil merupakan perangkat lunak yang secara komersial tersedia dari JSC Sorb polimer. Melihat bercak yang ada dengan cara membuka file gambar plat. Kini digunakan menu lintasan drop untuk mengatur titik terang disuatu tempat. Garis horizontal berwarna merah dan biru akan muncul, menggunakan alat tersebut untuk

menentukan area bercak yang dimaksud. Pilih lintasan berkala dari lintasan menu menurun, menentukan jumlah area bercak pada plat dengan cara menyesuaikan posisi area bercak yang ada pada plat. Gunakan tombol evaluasi track, akan menunjukkan hasil, kemudian mencetak hasilnya pada excel sheet (Pattanawasin, dkk., 2012).

II.8 KLT Video Densitometri

Prinsip kerja dari video densitometri ini adalah pemindaian optik yang berlangsung secara elektronik menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator dan optik yang tepat untuk menerangi plat serta fokus gambar ke *charge-coupled device (CCD)* kamera video. Metode ini memiliki keuntungan yaitu dapat menghasilkan akuisisi data yang cepat dan simultan, desain instrumen sederhana, terjadi peningkatan sensitivitas, akuisisi lebih lama dan kompatibilitas dengan analisis data. Akan tetapi metode ini memiliki kekurangan yaitu terjadinya masalah pada pencahayaan lapisan selama akuisisi gambar, tetapi dapat diatasi dengan pencahayaan yang tepat sehingga dapat meningkatkan kontras gambar dan resolusi (Srivastava, 2011).

II.9 Perangkat Lunak Untuk Menganalisis Bercak dengan ImageJ

ImageJ adalah suatu program yang dikembangkan oleh Nasional Institute of health (NIH) Departemen Kesehatan dan Layanan Kemanusiaan di Amerika Serikat yang terbukti paling sederhana, mudah dan serbaguna meskipun jenis software lainnya dapat juga dimanfaatkan. *Software* ImageJ memakai format gambar dalam

bentuk JPEG atau TIFF. Gambar dapat dioptimalkan dengan pemilihan warna domain terbalik (merah, hijau, atau biru). Sebagai contoh gambar dari plat KLT yang melibatkan fluoresensi quenching dengan analit atau deteksi oleh warna. Reaksi warna biasanya akan memerlukan pemilihan domain warna yang tepat dan diperlukan gambar terbalik sehingga piksel analit memiliki nilai-nilai positif terhadap piksel background, yang idealnya memiliki nilai yang kecil. ImageJ dapat mengkompensasi secara otomatis untuk setiap perbedaan luas area (Kurniawan, dkk., 2011).

II.10 Analisis Data

Setelah dilakukan pemilihan metode untuk analisis sampel maka selanjutnya adalah menentukan tehnik data analisis untuk memperoleh informasi data yang relevan dari percobaan yang dilakukan.

Kemometrik merupakan suatu disiplin ilmu kimia yang menggunakan metoda matematika dan statistika yang digunakan untuk memilih desain analisis atau untuk memilih prosedur dan hasil eksperimen yang paling baik serta untuk memberikan informasi yang relafan. Untuk memudahkan dalam interpretasi data dengan kemometrik menggunakan software komputer sehingga didapat hasil analisis yang tepat, mudah dan cepat (Otto, 2007). Metoda kemometrik yang digunakan pada analisis ini adalah PCA (Principal Component Analisis).

Validasi metode yang digunakan dalam analisis kemometrik ini adalah *Principal Component Analysis* (PCA) sebuah teknik statistik yang digunakan untuk periksa keterkaitan antara seperangkat

variabel secara berurutan untuk mengidentifikasi struktur dasar dari variabel-variabel tersebut juga disebut analisis faktor. Pada PCA ada dua komponen yaitu statistik dan matriks algebra (eigen value dan eigen faktor adalah matriks dasar dari PCA).

A. Statistik meliputi data sebagai berikut :

1. Standar Deviasi (SD)
2. Varians yaitu ukuran lain dari penyebaran data dalam kumpulan data. Sebenarnya hampir identik dengan standar deviasi.
3. Kovarian adalah ukuran, kovariansi selalu diukur antara 2 dimensi.
4. Kovarian matriks

B. Matriks Algebra

Bagian ini berfungsi untuk memberikan latar belakang aljabar matriks yang dibutuhkan di PCA (eigen value dan eigen faktor). Eigen faktor adalah komponen utama (dari komponen PCA-komponen principal) mencerminkan varians umum dan varians yang unik dan dapat dilihat sebagai pendekatan yang berfokus pada varian yang berusaha mereproduksi varians variabel total dengan semua komponen dan untuk mereproduksi korelas. PCA jauh lebih umum dari pada PFA, dan biasanya menggunakan "faktor" secara bergantian dengan "komponen". Komponen utama adalah kombinasi linier dari variabel asli yang dibobot oleh kontribusinya untuk menjelaskan varians dalam dimensi ortogonal tertentu. Eigen value disebut juga ciri khas akar, nilai eigen untuk faktor tertentu mengukur varians dalam semua variabel yang diketahui oleh faktor tersebut. Rasio nilai eigen adalah rasio faktor jelas terhadap faktor-

faktor yang berkenaan dengan variabel. Jika sebuah faktor memiliki nilai rendah, maka sedikit kontribusi terhadap varians varians dan dapat diabaikan sebagai faktor yang lebih penting. Nilai eigen mengukur jumlah variasi dalam total sampel yang dicatat oleh masing-masing faktor. Nilai dasar eigen faktor dihitung sebagai jumlah pemuatan faktor kuadrat untuk semua variabel. Perhatikan bahwa nilai eigen yang terkait dengan solusi yang tidak dilepas dan diputar akan berbeda, meskipun jumlahnya akan sama (Smith. 2002).

Eigen faktor dan Eigen value

Misalkan C adalah matriks $n \times n$ (n adalah sampel) dengan I sebagai matriks identitasnya. Nilai eigen dari C didefinisikan sebagai akar dari persamaan :

$$\text{Determinan } (C - \alpha I) = | (C - \alpha I) | = 0$$

Persamaan diatas disebut persamaan polinomial karakteristik C dan memiliki n akar.

Terkait dengan masing-masing nilai eigen adalah seperangkat koordinat yang menentukan arah sumbu utama yang terkait. Ini disebut sebagai vektor eigen (x) dan dihitung sebagai:

$$Cx = \alpha x$$

Jadi, besaran nilai eigen menggambarkan panjang dan vektor eigen menggambarkan arah sumbu utama (Gupta, dkk., 2013). Jika terdapat suatu matriks A berukuran $n \times n$ dan vector tak nol x berukuran, $x \in R^n$, maka dapat dituliskan :

$$Ax \in \alpha x \in$$

Keterangan :

Ax : faktor berukuran $n \times n$

α : skalar riil yang memenuhi persamaan, disebut nilai eigen (karakteristik).

X : faktor eigen