

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pewarna Alami

Pewarna alami dapat didefinisikan sebagai zat warna yang dapat diproduksi secara alami oleh tumbuhan. Pewarna alami ini merupakan faktor penting yang dapat menambah daya tarik pada suatu produk, termasuk produk pangan. Sejak zaman dahulu, secara tradisional pewarna alami digunakan sebagai bahan pewarna makanan yang dapat meningkatkan sifat organoleptik bagi produk pangan. Di alam terdapat banyak sekali jenis pigmen alami, dari warna hijau, coklat, orange-kemerahan, kuning hingga merah.

Sumber pigmen alami dapat ditemukan di berbagai jenis tumbuhan yang ada disekitar, seperti pewarna hijau (klorofil) sering ditemukan dari tumbuhan yang berwarna hijau seperti daun katuk, pandan, alpukat dan rumput laut. Warna coklat dapat dihasilkan dari tanin dan kurkumin yang berasal dari buah, biji, daun dan rimpang seperti temulawak dan kayu manis. Warna orange-kemerahan (karotenoid) bersumber dari buah mangga, sayur wortel dan tomat. Warna kuning (kurkumin) bersumber dari jenis rempah seperti kunyit dan temulawak. Dan yang terakhir adalah warna merah (betasanin) yang bersumber dari buah naga dan umbi bit merah.

Cara yang dapat dilakukan untuk memperoleh zat pewarna alami yaitu dengan mengisolasi pigmen alami dari tumbuhan yang dapat dilakukan dengan cara mengekstrak bagian tumbuhan menggunakan pelarut yang sesuai kepolarnya dengan zat yang akan di ekstrak.

2.2. Buah Naga

Menurut penelitian (Kamalasari, 2018) sekitar 16,000 hektar luas pertanian buah naga yang dimiliki oleh Indonesia dan terindikasi semakin meluas di 5 tahun belakang mencapai rata-rata 795,102,83 ton/tahun. Banyuwangi menjadi daerah yang memiliki luas pertanian.

Buah naga merupakan tanaman yang dapat tumbuh subur di daerah tropis dan tahan terhadap hama. Buah naga ini memiliki banyak manfaat, diantaranya sebagai alternatif untuk menunjang kesehatan (Wahyuni, 2011)



Gambar 2.1. Buah Naga

2.2.1. Klasifikasi Tanaman

Hylocereus polyrhizus merupakan nama latin dari buah naga daging merah. Indonesia adalah salah satu negara dengan penghasil buah naga terbanyak. Hal ini karena buah naga menjadi tanaman yang dapat dibudidayakan di daerah tropis dan tahan terhadap hama. Buah naga dihasilkan oleh tanaman sejenis kaktus dengan genus *Hylocereus* dan *Selenicereus* dari famili *Cactaceae* (Lim, 2015). Terdapat sekitar 16 spesies genus buah naga, empat diantaranya memiliki buah yang komersial yaitu berdaging putih (*Hylocereus undatus*), berdaging merah (*Hylocereus polyrhizus*), berdaging super merah (*Hylocereus costaricensis*), dan buah naga kuning berdaging putih (*Selenicereus megalanthus*) (Maisyah, 2011). Secara taksonomi, *Hylocereus polyrhizus* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Klasifikasi

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : *Caryophyllales*

Keluarga : *Cactaceae*

Genus : *Hylocereus*

Spesies : *Hylocereus undatus* (berdaging putih)

Hylocereus polyrhizus (berdaging merah)

Buah naga juga dikenal sebagai tanaman hias karena memiliki bentuk pohon yang unik dan ciri khas, buahnya memiliki bentuk corong menyerupai bunga wijaya kusuma (Kamalasari, 2018).

2.2.2. Karakteristik Fisika

Pada karakteristik buah naga didasarkan pada hasil penelitian Wichienchot dkk., 2011 yang meliputi dimensi buah (panjang dan diameter), berat buah dan warna buah.

Tabel 2.1. Karakteristik Fisika Buah Naga

Karakteristik	Nilai
<i>Dimensi Buah (cm)</i>	
- Panjang	$127 \pm 5,5$
- Diameter	$66 \pm 4,0$
<i>Berat Buah (g)</i>	
- Berat Daging	$215 \pm 35,0$
- Berat Kulit	$75 \pm 25,0$
<i>Warna Buah</i>	
- Daging	Merah
- Biji	Kecil Hitam
- Kulit	Merah

2.2.3. Morfologi

Buah naga salah satu tumbuhan yang membutuhkan tempat sebagai penyangga dan tempat merambatnya batang. Buah naga juga dapat menghasilkan buah selama pertumbuhan hidupnya.

a) Buah

Bentuk buah naga bulat lonjong dan memiliki sirip. Warna kulit bagian luar merah muda dengan sisik seperti naga. Buah naga beratnya sekitar 200–650 gram. Buah naga merupakan buah batu berdaging dan banyak mengandung air. Kulit buah naga cukup, sekitar sekitar 3–4 mm dengan warna merah celah, merah tua dan kuning.

b) Kulit

Sekitar 30-35% berat kulit buah naga. Seringkali menjadi limbah organik yang jarang sekali diolah kembali, kulit buah naga sebenarnya mengandung serat, flavonoid, fenolik dan zat warna betasianin. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa antioksidan yang terkandung dalam kulit buah naga cukup tinggi (Shofinita dkk., 2020). Bagian daging buah naga memiliki serat sangat halus dan terdapat biji-biji hitam bertebaran berukuran kecil. Biji buah naga dapat dimakan tanpa mempengaruhi kesehatan.

2.2.4. Kandungan Buah Naga

Secara umum buah naga bermanfaat bagi kesehatan dan dapat memenuhi kebutuhan nutrisi harian untuk tubuh, manfaat buah naga ini kaya akan polifenol. Hasil analisis laboratorium badan penelitian dan pengembangan industri makanan Taiwan tahun 2017 diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 2.2. Hasil Kandungan Buah Naga

Zat	Kandungan Gizi
Lemak (g)	0,21 – 0,61
Protein (g)	0,159 – 0,229
Air (g)	82,5 – 83
Serat Kasar (g)	0,7 – 0,9
Kalsium (mg)	6,3 – 8,8
Vitamin C (mg)	8 – 9
Karbohidrat (g)	11,5
Fosfor (mg)	30,2 – 36,1

Zat-zat di atas memiliki fungsi yang sesuai. Protein memiliki kemampuan untuk metabolisme tubuh dan menjaga kesehatan jantung. Mineral dalam buah naga dapat membantu meningkatkan menjaga kesehatan gigi dan kepadatan tulang. Serat pada buah naga bermanfaat mencegah kanker usus besar, diabetes, dan baik untuk diet. Vitamin C dalam buah naga berfungsi sebagai antioksidan yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan membantu meredakan batuk serta mengurangi keasaman.

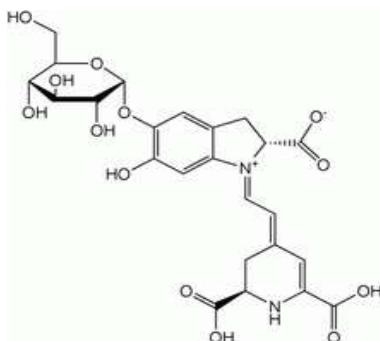
2.2.5. Manfaat Buah Naga

Buah naga memiliki banyak manfaat, sebagian masyarakat Indonesia mengkonsumsi buah naga sebagai alternatif untuk menunjang kesehatan (Wahyuni, 2011). Mengkonsumsi buah naga secara langsung dapat membantu menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh, menjaga kesehatan jantung, mengobati diabetes, meredakan penyakit asma, meningkatkan ketajaman mata, dan meningkatkan aktivitas otot. Selain itu buah naga juga mengandung berbagai zat penting seperti niasin, serat dan protein. Ekstrak dari buah naga dapat memberikan hasil warna merah alami, beberapa aplikasi buah naga sudah ada dalam industri. Senyawa betasianin yang terdapat pada buah naga mulai dikembangkan sebagai alternatif pewarna makanan.

2.3. Betasianin

Betasianin merupakan pigmen berwarna merah-violet yang banyak terkandung pada buah, bunga dan juga jaringan vegetatif. Secara kimia betasianin merupakan turunan betalanin yang memiliki komponen penghasil gugus hidroksil yang memungkinkan terbentuknya glikosida, terutama 5-O-glikosida yang sering ditemukan pada betasianin jenis amarantin. Betasianin ini berasal dari struktural utama yaitu aglycon betanidine dan isobetanidin (C-15 epimers) dan memiliki 4 sub kelas, diantaranya amaranthin, betalanin, gompgrenim dan 2-deskarboksi betanin (Halimfanezi, et al 2020). Selain betasianin, adapun senyawa antosianin yang juga sebagai pewarna alami yang terkandung di dalam tumbuh-tumbuhan dan larut dalam air.

Pigmen betasianin dan juga antosianin memiliki kesamaan warna dalam spektrum sinar tampak (Sari, 2018). Keduanya juga memiliki perbedaan seperti bentuk struktur, dimana pada betasianin terdapat ikatan nitrogen, sedangkan pada antosianin tidak terdapat ikatan nitrogen. Jika suatu tanaman mengandung betasianin, maka tanaman tersebut tidak akan mengandung antosianin. Begitupun sebaliknya.



Gambar 2.2. Struktur kimia senyawa betasianin

Pigmen betasianin ini memiliki sifat yang hidrofilik, sehingga pada proses ekstraksi pelarut organik yang digunakan lebih banyak adalah etanol (Pradita dan Priatni, 2015). Faktor sensitif betasianin dapat mempengaruhi stabilitas diantaranya pH, suhu, cahaya matahari, sinar lampu dan oksidator (Rengku dan Ridhay, 2017). Betasianin sangat menekan pertumbuhan mikroba, berkontribusi pada peningkatan keamanan suatu produk. Karena betasianin ini merupakan komponen alami, maka dapat dilakukan penerapan yang menjadikan pendekatan yang aman menjaga kualitas dan memperpanjang umur simpan buah naga.

Pada suhu tinggi dan waktu pemanasan, penggunaan pelarut air dalam keadaan panas dapat menyebabkan degradasi dan perubahan struktural pigmen betasianin, menyebabkan pemutihan dan menyebabkan kerusakan. Hal ini dikarenakan titik didihnya yang cukup tinggi, sedangkan stabilitas betasianin menurun pada suhu 70 °C dan 100 °C. Sementara itu, kondisi pH untuk betasianin dapat mengurangi tingkat kerusakan. Kerusakan betasianin dapat terjadi penyimpanan. pH betasianin yang stabil secara umum ada pada 4, 5 dan 6 (Rengku dan Ridhay, 2017).

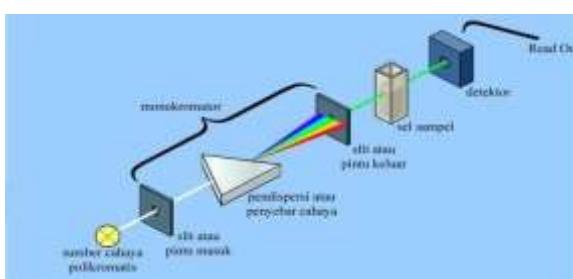
Senyawa betasianin diketahui memiliki banyak keunggulan, sehingga beberapa teknik dapat digunakan dalam mengkarakterisasi dan mengidentifikasi senyawa tersebut. Salah satunya adalah metode spektrofotometri sinar tampak, yang biasa digunakan dalam mengukur konsentrasi suatu zat dalam sampel. Dimana hasil ekstraksi sampel akan disinari oleh cahaya dengan panjang gelombang tertentu (Faridah, 2016).

2.4. Spektrofotometri Sinar Tampak (Visible)

Spektrofotometri sinar tampak digunakan sebagai metode penelitian. Dikarenakan pada metode spektrofotometri lebih banyak digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Prinsip kerjanya adalah cahaya jatuh ke dalam medium homogen, sebagian dari cahaya datang akan dipantulkan dan diserap oleh medium, sementara sisanya akan diteruskan. Kelebihan dari spektrofotometri sinar tampak yaitu diperoleh dari panjang gelombang cahaya berwarna putih yang dapat terseleksi menggunakan pengurai seperti prisma, grating ataupun celah optik (Hasibuan, 2015). Nilai absorbansi maksimum dan nilai transmitan minimum sebagai panjang gelombang optimum yang digunakan.

Sesuai dengan namanya spektrofotometri terdiri dari spektrometer dan fotometer. Dimana pada spektrometer menghasilkan cahaya dari suatu spektrum dengan hasil panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer yaitu alat yang dapat mengukur intensitas cahaya yang diserap. Perbedaan antara ultraviolet dan visible yaitu jika pada ultraviolet didasarkan dengan interaksi sampel dengan sinar ultraviolet yang mempunyai panjang gelombang antara 190–380 nm dan sumber cahaya yang digunakan berasal dari lampu deuterium. Sedangkan visible cahaya yang dihasilkan berasal dari spektrum elektromagnetik yang dapat diterima oleh mata manusia. Panjang gelombang cahaya tampaknya berada di 400-800 nm, sehingga semua sinar dapat dilihat. Sumber cahaya tampak yang biasa digunakan dalam spektrofotometri tampak adalah lampu tungsten (Suarsa, 2015).

Oleh karena itu, dalam spektrofotometri sinar tampak ini adalah instrumen yang digunakan untuk mengukur di daerah ultraviolet dan visible. Berdasarkan serapan cahaya senyawa yang ditunjukkan, sinar yang dapat digunakan adalah sinar monokromatis (Faridah, 2016). Terdapat beberapa alasan mengapa harus digunakan panjang gelombang maksimum, dikarenakan terdapat perubahan dan kepekaan absorbansi pada setiap satuan konsentrasi dengan yang paling besar.



Gambar 2.3. Komponen Spektrofotometri Sinar Tampak

(Sumber : (Suharti, 2017))

Pada komponen spektrofotometri sinar tampak di atas terdiri dari sumber radiasi yang berasal dari lampu, seperti lampu pijar hidrogen, deuterium, xenon dan lampu pijaran tungsten. Wadah sampel (kuvet) biasanya berasal dari kuarsa atau silika dalam penggunaan radiasi ultraviolet yang terbuat dari gelas biasa atau kuarsa radiasi sinar tampak. Pada posisi kuvet instrumen spektrofotometri cahaya tampak harus tegak lurus terhadap radiasi. Detektor pada spektro berfungsi sebagai penangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan diubah menjadi arus listrik. Syarat detektor yaitu memiliki sensitivitas tinggi, sehingga jika terdapat daya radiasi kecil akan terdeteksi dan memiliki waktu respon yang singkat serta stabil.

a) Sumber Cahaya

Lampu tungsten atau wolfram biasa digunakan dalam pengukuran sampel pada daerah tampak. Memiliki panjang gelombang 320–2200 nm dengan spektrum radiasi berbentuk. Panjang gelombang yang dimiliki oleh lampu deuterium berada di rentang 190–380 nm dengan energi radiasi spektrum lurus dan digunakan dalam mengukur sampel yang terletak di daerah ultraviolet.

b) Monokromator

Dapat menyeleksi panjang gelombang dengan mengubah cahaya yang dihasilkan oleh sumber cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Lensa prisma dan filter optik merupakan jenis monokromator, dimana pada penggunaan lensa prisma cahaya yang masuk akan diubah menjadi spektrum cahaya. Sementara pada filter optik menghasilkan lensa warna, sehingga cahaya akan diteruskan sesuai dengan warna lensa yang dikenai. Monokromator terdiri dari prisma yang dapat berfungsi untuk mendispersikan radiasi elektromagnetik untuk mendapatkan resolusi polikromatik yang baik.

c) Tempat Sampel

Kuvet sebagai wadah sampel yang akan dianalisis. Kuvet yang dipakai terbuat dari silika dengan fungsi penyerapan spektrofotometri sinar tampak. Kuvet biasanya memiliki ukuran lebar 1 cm dengan bentuk persegi panjang. Persyaratan yang ada dalam kuvet sebagai berikut: permukaan harus sejajar secara optik, tidak berwarna sehingga cahaya dapat ditransmisikan, tidak mudah bereaksi dengan bahan kimia dan tidak mudah rapuh.

d) Detektor

Sebagai penangkap cahaya yang akan diteruskan dari sampel dan kemudian diubah menjadi arus listrik. Detektor terbagi menjadi beberapa macam yang dapat digunakan, diantaranya:

- Phototube : Panjang gelombang 150 – 1000 nm
- Photomultiplier : Panjang gelombang 150 – 1000 nm

Persyaratan detektor adalah sensitivitas tinggi dengan perbandingan sinyal bising tinggi, waktu respon cepat dan signal minimal tanpa radiasi (Suarsa, 2015).

2.5. Validasi Metode

Validasi metode yang dilakukan di laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode yang akan digunakan dapat memberikan hasil data yang valid dan sesuai dengan tujuannya. Metode ini berfungsi dengan baik di lingkungan lokal. Validasi merupakan seperangkat tes standar laboratorium yang dapat menghasilkan data berkaitan dengan spesifitas, presisi, akurasi dll. Proses harus terdokumentasi sebagai prosedur operasi standar (SOP). Setelah validasi, metode tersebut secara formal harus disetujui untuk digunakan secara berulang (Riyanto, 2014).

Menurut ISO 17025, validasi merupakan pernyataan penyediaan dan pemeriksaan bukti yang objektif sebagai persyaratan untuk penggunaan tertentu sudah terpenuhi. Menurut *Standar Jaminan Kualitas* untuk Laboratorium Tes DNA, validasi merupakan prosedur dimana akan dievaluasi dalam menentukan efektivitas dan keandalan dalam suatu analisis. Suatu metode yang cocok menunjukkan tujuan penggunaan yang dimaksudkan.

a) Spesifitas

Komponen lain yang ada di dalam matriks sampel dilakukan dengan cara pengukuran analit yang ditargetkan secara akurat seperti pengotor, komponen matriks dan produk degradasi. Adanya pemisahan yang baik antara analit dan komponen lainnya menunjukkan teknik kromatografi dan selektivitas. Resolusi analit merupakan persyaratan spesifitas dari komponen yang lebih besar dari 1,5–2,0 untuk mengetahui resolusi dari substansi yang lain.

b) Presisi

Pengukuran kedekatan merupakan hasil dari serangkaian pengukuran yang dilakukan secara berulang dengan ukuran yang sama. Presisi diukur di bawah reproduktifitas dengan dua kelompok kondisi umum, hal ini dapat menunjukkan kesalahan acak pada suatu metode. Biasanya ketika presisi diukur dalam kondisi yang sama, sampel dianalisis di laboratorium dengan instrumen yang sama. Misalnya reagen uji seperti kromatografi gas.

Terdapat tiga kategori presisi yaitu keterulangan atau repeatability merupakan presisi yang ditentukan di laboratorium yang sama dengan analisis dan penggunaan peralatan yang dapat dilakukan dengan hari yang sama. Presisi antara atau intermediate precision merupakan kondisi pada saat pengujian yang sama menggunakan analisis, reagen, kolom berbeda dan peralatan. Sementara ketertiruan atau reproducibility bertujuan untuk memverifikasi bahwa metode yang digunakan akan menghasilkan hasil yang sama pada fasilitas tempat yang berbeda atau dapat diartikan juga sebagai hasil presisi yang dilakukan pada tempat percobaan.

Kriteria seksama dapat diberikan jika pada metode memberikan standar deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) kurang dari 2%. Perhitungan nilai simpangan baku (SD) dapat dilakukan dengan rumus nilai koefisien variasi sebagai berikut:

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

Sementara untuk rumus simpangan baku relatif sebagai berikut :

$$\%KV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan:

SD : Standar Deviasi

X : Nilai Rata-rata

n : Ulangan

RSD : Relatif Standar Deviation

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai $\%RSD \leq 2\%$.

c) Akurasi

Merupakan nilai hasil referensi yang diterima karena metode sistematis dan kesalahan laboratorium dilakukan dengan pengukuran perbedaan antara hasil tes yang diharapkan dengan hasil nilai referensi yang diterima karena metode sistematis dan kesalahan laboratorium. Persentase perolehan kembali (recovery) merupakan akurasi dari analit yang telah ditambahkan. Pada distribusi kesalahan sistematis, semua tahapan analisis berhubungan erat dengan keakuratan hasil analisis.

Hasil nilai konvensional dan nilai referensi merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai yang terukur dan nilai yang dapat diterima. Jumlah analit dapat diperoleh kembali dalam pengukuran dengan melakukan lonjakan sampel merupakan fungsi dari akurasi.

Dengan menguji senyawa obat, akurasi dapat dicapai dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan acuan standar.

$$\text{% Perolehan kembali (recovery)} = \frac{\text{Konsentrasi pengukuran}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

Simulasi dilakukan dengan menambah jumlah analit bahan murni tertentu ke dalam palsebo, kemudian campuran dilakukan analisis dan hasil analit dibandingkan dengan kadar standar yang telah ditambahkan (jumlah sebenarnya). Pada perolehan kembali dapat ditentukan dengan menyiapkan sampel palsebo (eksipien, cairan tubuh), lalu menambahkan analit menggunakan konsentrasi tertentu (biasanya 80 sampai 120% dari perkiraan kandungan analit), kemudian dianalisis dengan metode yang divalidasi. Dalam metode penambahan standar sampel dianalisis, kemudian sejumlah analit yang akan diuji (analit murni/standar) ditambahkan ke dalam sampel dan diaduk rata.

d) Linearitas

Kemampuan menyediakan analisis metode untuk mendapatkan hasil pengujian yang akurat dengan konsentrasi analit yang sudah terdapat di dalam sampel dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Dalam berbagai metode, dimungkinkan untuk secara akurat menentukan pernyataan batas tertinggi dan terendah dari suatu analit.

Hasil linearitas dapat diamati melalui kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara reaksi dan konsentrasi analit dalam berbagai rangkaian seri larutan baku. Pada kurva kalibrasi ini nantinya akan diperoleh regresi linear sebagai persamaan $y = bx + a$, dimana x (konsentrasi) y (reaksi) a (perpotongan y) dan b (kemiringan). Tujuan regresi ini yaitu untuk menentukan estimasi terbaik pada kemiringan dan perpotongan y, untuk mengurangi kesalahan atau selisih antara hasil percobaan dan nilai prediksi persamaan regresi linier yang dihitung (Harvey, 2000). Koefisien korelasi r digunakan sebagai parameter adanya hubungan linier dalam analisis regresi. Apabila nilai b adalah 0 dan r adalah +1 atau -1 maka hubungan linier yang ideal diperoleh tergantung pada arah garis.

e) Batas Deteksi dan Batas Kuantitas

- Batas Deteksi

Konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi serta ditentukan dengan pasti (Pradesh, 2020). Batas deteksi juga dapat didefinisikan sebagai jumlah konsentrasi terkecil dari suatu analit dalam sampel yang terdeteksi, tetapi diukur dari nilai yang sebenarnya. Umumnya, batas deteksi sesuai dengan konsentrasi analit yang menghasilkan sinyal setidaknya tiga kali lebih besar.

$$\text{BD (Batas Deteksi)} = \frac{3SD}{slope}$$

Keterangan

SD : Nilai standar deviasi

Slope : Nilai b yang diperoleh dari persamaan regresi kurva baku

- Batas Kuantitasi

Parameter memungkinkan analisis mikroskopis dan didefinisikan sebagai jumlah minimum analit dalam sampel yang masih memenuhi. Hal ini juga dikenal sebagai batas kuantitasi (LOQ) atau bata pelaporan.

$$\text{BK (Batas Kuantitasi)} = \frac{10SD}{slope}$$

Keterangan

SD : Nilai standar deviasi

Slope : Nilai b yang diperoleh dari persamaan regresi kurva