

**Analisis Kadar Nitrit pada Tanaman Kale (*Brassica oleracea* var *achepala*)
dengan metode Spektrofotometri Sinar Tampak menggunakan Pereaksi
Griess**

Laporan Tugas Akhir

**Nur Rizki Amelia Pratama
11171065**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2021**

ABSTRAK**Analisis Kadar Nitrit pada Tanaman Kale (*Brassica oleracea var acehala*) dengan metode Spektrofotometri sinar tampak menggunakan Pereaksi Griess.**

Oleh :
Nur Rizki Amelia Pratama
11171065

Kale merupakan sayuran yang kaya akan nutrisi yang bermanfaat bagi tubuh, mengandung fitonutrien dan disebut sebagai superfood. Selain memiliki nutrisi sayuran kale mengandung senyawa yang dapat membahayakan tubuh salah satunya nitrit yang dapat menyebabkan methemoglobinemia. Nitrit yang masuk ke dalam tubuh dapat ditolerir dengan batasan *Acceptable Daily Intake* (ADI) sebesar 0,07mg/kg BB. Maka sebab itu tujuan dari penelitian ini adalah kandungan nitrit yang terdapat pada kale keriting dan nero kale dengan metode spektrofotometri sinar tampak menggunakan pereaksi Griess. Metode yang dilakukan dimulai dengan validasi metode. Hasil penelitian menunjukkan panjang gelombang serapan maksimum yang diperoleh 548nm. Validasi metode meliputi parameter linearitas dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,993$ dengan nilai $y = 0,6056x + 0,1563$, Limit Deteksi = 0,0952 $\mu\text{g/mL}$, Limit Kuantisasi = 0,3175 $\mu\text{g/mL}$, presisi interday secara berturut-turut adalah 0,63%; 1,40% dan 0,67%, nilai perolehan Kembali berada pada rentang 80,36-105,68%. Kadar nitrit pada kale keriting diperoleh rata-rata sebesar 0,865mg/50gram sedangkan nero kale sebesar 1,285mg/50gram. Berdasarkan hasil penelitian kadar nitrit dari nero kale lebih tinggi dibandingkan dengan kadar nitrit kale keriting. Pengkonsumsian kale sebanyak 50gram masih aman untuk dikonsumsi dan kale tidak menjadi sumber penyumbang nitrit paling banyak yang dikonsumsi oleh tubuh sesuai dengan nilai *Acceptable Daily Intake* (ADI).

Kata Kunci: kale keriting, nero kale, nitrit, pereaksi Griess, spektrofotometri sinar tampak

ABSTRACT**Analysis of Nitrite Levels in Kale (*Brassica oleracea* var *acephala*) using visible spectrophotometry method using Griess reagent.**

By:

Nur Rizki Amelia Pratama
11171065

Kale is a vegetable that is rich in nutrients that are beneficial to the body, contains phytonutrients, and is referred to as a superfood. Apart from having vegetable nutrients, kale contains compounds that can harm the body, one of which is nitrite which can cause methemoglobinemia. Nitrite that enters the body can be tolerated with a limit of 0.07 mg/kg BW of Acceptable Daily Intake (ADI). Therefore, the purpose of this study was to determine the nitrite content in curly kale and Nero kale using visible light spectrophotometry using Griess reagent. The method carried out begins with method validation. The results showed that the maximum absorption wavelength obtained was 548nm. Method validation includes linearity parameter with correlation coefficient value $r = 0,993$ with $y = 0,6056x + 0,1563$, LOD = 0,0952 g/mL, LOQ = 0,3175 g/mL, interday precision is 0,63%; 1.40% and 0.67%, the recovery value is in the range of 80.36-105.68%. Nitrite levels in curly kale obtained an average of 0.865mg/50gram while Nero kale was 1.285mg/50gram. Based on the research results, the nitrite content of Nero kale is higher than that of curly kale. Consuming 50 grams of kale is still safe to consume and kale is not the largest contributor to nitrite consumed by the body according to the Acceptable Daily Intake (ADI) value

Keywords: curly kale, griess reagent, nero kale, nitrite, visible spectrophotometry

LEMBAR PENGESAHAN

**Analisis Kadar Nitrit pada Tanaman Kale (*Brassica oleracea var acepala*)
dengan metode Spektrofotometri Sinar Tampak menggunakan Pereaksi
Griess.**

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

**Nur Rizki Amelia Pratama
11171065**

Bandung, 17 Juli 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(Emma Emawati, ST., M.Si)
NIDN.0416037005



(apt. Winasih Rachmawati, M.Si.)
NIDN. 0412097702

KATA PENGANTAR

Puji syukur serta syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Kadar Nitrit pada Tanaman Kale (*Brassica oleracea var acephala*) dengan metode Spektrofotometri Sinar Tampak menggunakan Pereaksi Griess”. Adapun maksud serta tujuan dari penyusunan skripsi ini merupakan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana Bandung.

Sepanjang proses penyelesaian skripsi ini, penulis mendapat banyak dorongan serta dukungan dari berbagai pihak, sehingga pada kesempatan kali ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih sedalam dalamnya kepada:

1. Ayah Abdurrochim serta Mamah Eti Rohaeti, dan adik penulis yang telah memberikan dukungan, dorongan dan doa dalam menuntaskan skripsi serta selama menempuh Pendidikan program S-1 Farmasi di Universitas Farmasi
2. Bapak Dr. Entris Sutrisno, S.Farm.,MH.Kes.,Apt. selaku rector Universitas Bhakti Kencana yang telah memeberikan kesempatan untuk menyelesaikan program Pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Bhakti Kencana.
3. Ibu Emma Emawati M.Si, selaku pembimbing utaman dan Ibu Winasih Rachmawati M.Si.appt selaku pembimbing serta yang telah memberikan arahan dan masukan serta bimbingan selama penyelesaian skripsi ini.
4. Para sahabat Vanny, Nandita, Amalia, Najmi, Farah, Inggik dan Fitri yang senantiasa memberikan bantuan, dukungan dan semangat serta doa
5. Teman teman Angkatan 2017 yang telah senantiasa bersama selama ini terutama teman teman dari Kurfa 2 yang senantiasa Bersama selama masa Pendidikan S-1Farmasi.
6. Teman teman grup mahasiswa kober yaitu Meylan dan Santi yang senantiasa menyemangati dan mengingatkan pengerjaan tugas akhir.
7. Rekan rekan seperbimbingan yang telah memberikan bantuan dan dukungan selama penyusunan Tugas Akhir.
8. Serta semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberikan bantuan dalam penyelesain skripsi ini

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan kelemahan dan jauh dari kata sempurna, untuk itu penulis memohon maaf sebesar besarnya. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Bandung, 23 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian	2
1.4. Hipotesis Penelitian	2
1.5. Tempat dan Waktu Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Tanaman Kale	3
2.2. Kandungan Gizi Tanaman Kale	4
2.3. Jenis Jenis Tanaman Kale	5
2.4. Nitrit	6
2.1.1. Sumber Nitrit	7
2.1.2. Nitrit Pada Sayuran	7
2.1.3. Efek Nitrit	8
2.5. Spektrofotometri	8
2.6. Analisis Nitrit	11
2.7. Uji Validasi	12
2.7.1. Selektifitas	13
2.7.2. Linearitas	13
2.7.3. Sensitifitas	14
2.7.4. Akurasi	15
2.7.5. Presisi	15
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	18
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	19
4.1. Alat	19

4.2.	Bahan	19
4.3.	Prosedur	19
4.3.1.	Pembuatan Pereaksi	19
4.3.2.	Pembuaatan Baku Nitrit	19
4.3.3.	Pembuatan seri konsentrasi baku nitrit	20
4.3.4.	Penentuan Panjang gelombang	20
4.3.5.	Pembuatan Kurva Baku Nitrit	20
4.4.	Uji Validasi	20
4.4.1.	Selektifitas	20
4.4.2.	Uji Linearitas	21
4.4.3.	Uji Sensitifitas	21
4.4.4.	Akurasi	21
4.4.5.	Presisi	21
4.5.	Analisis Kadar Nitrit	21
4.5.1.	Preparasi sampel	21
4.5.2.	Penentuan Kadar Nitrit pada Kale	21
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN		23
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN		29
6.1.	Kesimpulan	29
6.2.	Saran	29
DAFTAR PUSTAKA		30
LAMPIRAN		32

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar 2. 1 Tanaman Kale Keriting.....	3
Gambar 2. 2 Kale Keriting	5
Gambar 2. 3 Nero Kale.....	5
Gambar 2. 4 Kale Rusia Merah	6
Gambar 2. 5 Redbor Kale	6
Gambar 5. 1 Spektrum Panjang Gelombang Maksimum nitrit (NO_2^-) dengan pereaksi Griess 24	
Gambar 5. 2 Kurva Kalibrasi Nitrit (NO_2^-)	25

DAFTAR TABEL

Tabel II. 1 Nilai Gizi Kale per 100 g	4
Tabel II. 2 Hubungan antara warna dengan Panjang gelombang sinar tampak	10
Tabel V. 1 Data Kurva Kalibrasi Nitrit (NO_2^-)	25
Tabel V. 2 Parameter linearitas nitrit (NO_2^-)	26
Tabel V. 3 Data Hasil Akurasi	26
Tabel V. 4 Data Hasil Presisi	27
Tabel V. 5 Data Hasil Presisi Ekstraday Nitrit (NO_2^-)	27
Tabel V. 6 Kadar Nitrit (NO_2^-) Kale keriting dan Nero Kale	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Hasil Determinasi	32
Lampiran 2 Data Kurva Kalibrasi Nitrit.....	33
Lampiran 3 Hasil Kurva Kalibrasi Nitrit.....	33
Lampiran 4 Perhitungan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantifikasi (BK)	33
Lampiran 5 Perhitungan Presisi.....	34
Lampiran 6 Pehitungan Akurasi.....	36
Lampiran 7 Pehtiungan Kadar Nitrit	37
Lampiran 8 Dokumentasi	38
Lampiran 9: Format Surat Pernyataan Bebas Plagiasi	40
Lampiran 10: Format Surat Persetujuan untuk dipublikasikan di media on line	41

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	NAMA
ADI	Acceptable Daily Intake
COVID-19	Corona Virus Diasese
ICH	Internasional Conference on Harmanization
UV-Vis	Ultra Violet – Visible

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sayuran banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Sayuran menjadi populer dikarenakan sadarnya masyarakat Indonesia akan hidup sehat dan mulai mengatur pola makan dengan memilih makan sehat untuk dikonsumsi salah satunya sayuran hijau (Agustin and Fauzi, 2019). Jenis sayuran yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia adalah sayuran hijau salah satunya adalah Kale. Kale menjadi produk sayuran yang banyak dikonsumsi sekitar 41.15% diikuti oleh jenis sayuran lokal lainnya di masa pandemi COVID-19. Hal ini dikarenakan kale diyakini dapat meningkatkan imunitas dimasa COVID-19 (Noviara, 2020).

Kale banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia dikarenakan kale termasuk kedalam sayuran yang kaya akan nutrisi. Oleh karena itu kale disebut sebagai super food karena manfaatnya yang besar terhadap Kesehatan (Agustin and Fauzi, 2019).

Meskipun kale kaya akan nutrisi tetapi pengonsumsi kale yang berlebihan akan memberikan efek yang kurang baik bagi Kesehatan. Hal ini dikarenakan pada beberapa sayuran hijau mengandung nitrit yang tinggi (Romsiah and Meidalena, 2017).

Nitrit merupakan senyawa yang dapat ditemukan secara alami di lingkungan dan sering dicerna oleh manusia melalui sayuran, daging, dan air minum. Nitrit dapat menimbulkan efek karsiogenik, efek karsiogenik ini dapat menyebabkan beberapa penyakit seperti methemoglobinemia (Keshavarz, 2015).

Kadar nitrit dalam makanan terdapat kekurangan database yang berlaku dan komprehensif, maka beberapa penelitian dilakukan oleh beberapa negara mengenai kandungan nitrat dan nitrit yang terkandung didalam makanan terutama sayuran. Menurut FAO/WHO yang telah melakukan evaluasi dari risiko terkait dengan konsumsi nitrit, telah menetapkan Acceptable Daily Intake (ADI) yaitu untuk nitrit 0 -0,07 mg/kg berat badan (Ding et al., 2018).

Terdapat banyak metode untuk penentuan kandungan nitrit dalam sayuran. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kandungan nitrit dalam suatu sampel adalah spektrofotometri sinar tampak dilakukan dengan menggunakan pereaksi Griess. Prinsip pereaksi Griess tersebut berdasarkan reaksi diazotasi, dimana reaksi diazotasi ini prinsipnya yaitu amina aromatik dan nitrit dalam suasana asam, kemudian dilanjutkan dengan reaksi kopling untuk menghasilkan senyawa azo merah-ungu.

Absorbansi senyawa azo ini akan diukur pada panjang gelombang 500-600 nm agar dapat diketahui kandungan nitritnya (Habibah et al., 2018).

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian untuk mengetahui kandungan nitrit dalam tanaman kale keriting dan nero kale menggunakan metode spektrofotometri sinar tampak dengan pereaksi Griess.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas maka didapatkan rumusan masalah yaitu:

1. Berapa kadar nitrat dan nitrit yang terdapat pada tanaman kale keriting dan nero kale?
2. Apakah kandungan nitrit pada tanaman kale keriting dan nero kale masih memenuhi Batasan yang aman untuk dikonsumsi?

1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.1.1. Tujuan

1. Untuk mengetahui jumlah kadar nitrit pada Kale keriting dan Nero kale
2. Untuk mengetahui batasan pengonsumsi kale keriting dan nero kale yang aman sesuai dengan nilai ADI

1.1.2. Manfaat

Dapat memberikan informasi berapa kadar kale pada tanaman kale, yang masih aman untuk di konsumsi.

1.4. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan antara kale keriting dan nero kale.

1.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga bulan Juni 2021 di Laboratorium Farmasi Universitas Bhakti Kencana.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Kale

Kale merupakan tanaman yang berasal dari negeri Cina dan merupakan jenis sayuran baru di Indonesia. Kale tersebar di beberapa negara seperti negara-negara di Asia Tenggara, Afrika Barat dan Timur, India Barat dan terdapat juga di beberapa negara yang memiliki iklim tropis (Mulyono, 2011). Kale merupakan keturunan dari tanaman liar seperti tanaman kubis, tanaman ini diduga berasal dari Asia dan dibawa ke Eropa sekitar 600 SM oleh kelompok pengembara Celtic (Mateljan, 2007).

Kale (*Brassica oleracea* var *Acephala*) adalah sayuran dengan ciri memiliki daun di sepanjang batang. Bentuk tanaman dari kale ini berbentuk seperti sayuran sawi atau kembang kol, Panjang daun dari sayuran kale ini melebar seperti tanaman caisim dan warna daun dan batangnya mirip seperti kembang kol (Mulyono, 2011).

Beberapa tahun terakhir kale mendapat popularitas dengan sebutan sebagai Superfood, dikarenakan dalam sayuran kale terdaftar dalam banyak daftar sayuran paling sehat (Mulyono, 2011).



Gambar 2. 1 Tanaman Kale Keriting
Taksonomi dari tanaman kale adalah

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Family	: Cruciferales

Genus : Brassica

Spesies : Brassica oleraceae Var Acephala

2.2. Kandungan Gizi Tanaman Kale

Tanaman kailan atau yang biasa disebut juga tanaman kale merupakan salah satu family Cruciferales, tanaman kale ini memiliki sumber vitamin dan mineral yang dibutuhkan oleh tubuh manusia (Mulyono, 2011).

Studi ilmiah menunjukkan bahwa sayuran kale merupakan salah satu sayuran yang mengandung fitonutrien yang dapat meningkatkan kemampuan hati untuk menghasilkan enzim yang dapat menentralkan zat yang berpotensi racun. Selain itu kale juga kaya akan antioksidan fitonutrien lutein dan zeaxanthin, dan kartenoid (Mateljan, 2007).

Kale memiliki keunggulan yaitu kale mengandung vitamin C yang tinggi hingga 109.43/100g. Kandungan karbohidrat dari kale ini dikatakan dapat digunakan sebagai makanan sehat yang mengenyangkan dikarekan adanya prebiotik dan serat makanan yang terdapat pada kale dan dikatakan dapat mengurangi risiko penyakit seperti penyakit jantung, diabetes, kanker dan obesitas (Ichniarsyah, 2018).

Kale merupakan sumber oksalat yang terkonsentrasi dan mungkin menjadi perhatian pada individu tertentu (Mateljan, 2007). Kale kaya akan nutrisi tetapi pengkomsumsi kale yang berlebihan akan memberikan efek yang kurang baik bagi Kesehatan. Hal ini dikarenakan pada beberapa sayuran hijau mengandung nitrit yang tinggi (Romsiah and Meidalena, 2017)

Tabel II. 1 Nilai Gizi Kale per 100 g

Komponen Gizi	Kale
Energi	43 kcal
Karbohidrat	4,42 g
Air	89,6 g
Lemak	1,49 g
Protein	3,4 g
Vitamin A	241 µg
Vitamin C	93,4 mg
Vitamin K	390 µg
Kalsium	254 mg
Besi	1,6 mg

(FDC, 2019)

2.3. Jenis Jenis Tanaman Kale

1. Kale Keriting



Gambar 2. 2 Kale Keriting

Kale keriting merupakan salah satu sayuran kale yang paling dikenal dan di banyak du jual di toko bahan makanan. Kale keriting biasanya berwarna hijau terang atau gelap atau ungu dan memiliki batang berserat yang sulit di potong (Pedrana, 2014).

2. Nero Kale (Lacinanto Kale)



Gambar 2. 3 Nero Kale

Nero kale atau yang di kenal sebagai dinosaurus merupakan jenis kale yang memiliki daun berwarna biru – hijau tua dengan tekstur daun yang sedikit berkerut dan lurus (Pedrana, 2014).

3. Kale Rusia Merah



Gambar 2. 4 Kale Rusia Merah

Kale rusia merah merupakan jenis kale yang memiliki daun pipih menjumbai yang menyerupai daun kubis. Jenis kale ini memiliki daun semburat merah dan semburat ungu kemerahan pada batangnya (Pedrana, 2014).

4. Redbor Kale



Gambar 2. 5 Redbor Kale

Redbor kale merupakan jenis kale yang berwarna merah tua yang dapat terlihat seperti ungu tua, dan sedikit menyerupai warna chard pelangi yang melengkung rapat di dekat bagian atas daunnya (Pedrana, 2014).

2.4. Nitrit

Nitrogen memiliki peranan penting dalam kehidupan di bumi dan memiliki hubungan dengan rantai makanan dan sifat-sifat produk makanan (Iammarino et al., 2013). Fiksasi nitrogen merupakan cara utama untuk menambahkan nitrat ke dalam tanah dan tanaman. Nitrit dapat anorganik terdapat dalam makanan sebagai senyawa alami atau sebagai bahan tambahan pada makanan olahan (Ranasinghe, 2018)

Nitrit adalah senyawa kimia alami yang dapat ditemukan di tanah, air tumbuhan dan tubuh manusia. Nitrit juga dapat berasal dari faktor pekerjaan terutama pekerja di bidang industri bahan peledak dan pupuk dan petani dapat mengalami eksposur saat menangani pupuk (Matthew et al., 2019)

Nitrit dapat dioksidasi menjadi nitrat dengan cara oksidasi kimia atau dengan cara proses nitrifikasi oleh bakteri atau direduksi menjadi nitrogen oksida dengan melalui beberapa jalur enzimatik dan non enzimatik dan menghasilkan energi. Karena ketersediaan hayati dari nitrit yang tinggi maka nitrit dapat memainkan peran yang kontraadiktif sebagai bahan tambahan makanan, kontaminan alami dan kontaminan yang ditambahkan ke dalam makanan (Merino, 2017).

Nitrit dapat menumpuk di dalam sayuran dan buah buahan dikarenakan penggunaan pupuk nitrogen dan pupuk organik yang berlebihan (Matthew et al., 2019). Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kandungan nitrit pada tumbuhan seperti waktu panen, suhu, penambahan pupuk nitrogen, iradiasi, jenis tumbuh, lama periode pertumbuhan, cahaya dan sifat pedologis tanah (Ranasinghe, 2018).

2.1.1. Sumber Nitrit

Sumber nitrit didalam tubuh manusia terdapat dua sumber yaitu sumber eksogen atau eksternal dan endogen atau internal. Paparan nitrit pada endogen dapat melalui metabolisme nitrat, sedangkan untuk sumber eksogen dapat berasal dari makanan, sayuran, produk daging dan air minum (Merino, 2017).

2.1.2. Nitrit Pada Sayuran

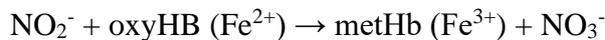
Sayuran merupakan salah satu makanan yang sangat penting bagi Kesehatan tubuh manusia dikarenakan sayuran merupakan sumber vitamin, mineral dan zat aktif biologis. WHO merekomendasikan mengkonsumsi sayuran minimal 400 gram atau setara dengan 5 porsi perhari untuk mencegah terjadinya penyakit kronis. Selain memiliki manfaat yang baik bagi tubuh sayuran juga memiliki kandungan nitrit yang tidak boleh di abaikan (Centre for Food Safety, 2010). Jumlah nitrat dan nitrit pada sayuran tergantung pada beberapa faktor seperti lingkungan

varibael seperti musim, cahaya, suhu, dan faktor praktik pertanian (Merino, 2017).

Dalam sayuran peningkatan nitrit dapat disebabkan oleh pelepasan nitrat dari vakuola. Kandungan nitrit dalam sayuran dapat meningkat secara signifikan. Kandungan lain pada sayuran seperti vitamin C dapat mempengaruhi perubahan kadar nitrit (Silalahi et al., 2016). Asupan Harian yang dapat diterima (ADI) nitrit diatur oleh WHO 0-0.07 mg/ kg berat badan (Ding et al., 2018)

2.1.3. Efek Nitrit

Pengkonsumsi nitrit yang berlebihan dapat menyebabkan masalah Kesehatan yaitu methaemoglobinaemia atau baby blue syndrome. Methaemoglobinemia adalah senyawa nitrit yang mengoksidasi besi (Fe^{2+}) dalam hemoglobin menjadi ion ferri (Fe^{3+}) dan mengubah hemoglobin dalam darah menjadi methemoglobinemia (Emawati et al., 2019). Pada kondisi tubuh yang mengalami methaemoglobinemia, hemoglobin tidak dapat menjalankan fungsinya yaitu mengikat oksigen. Jika methemoglobinemia melebihi 15 % hemoglobin total dapat menyebabkan total hemoglobin maka akan menyebabkan sianosis. Sianosis ini memanifestasikan dengan gejala seperti sesak nafas, mual, muntah, shock dan tubuh berwarna biru (Sungkawa and Sugito, 2019). Reaksi nitrit bereaksi dengan hemoglobin dan membentuk methemoglobin dan nitrat:



Methaemoglobinemia jauh lebih rentan terjadi pada anak-anak dan orang dewasa dibandingkan dengan bayi yang berumur kurang dari tiga bulan, hal ini dikarenakan induksi reduktase methaemoglobinemia pada periode fisiologis pasca penyapihan. Hal ini dapat terjadi dikarenakan tingkat oxyHb pada Janin jauh lebih tinggi masih ada di dalam darah dan lebih mudah teroksidasi menjadi metHb daripada oxyHb non fetal (Santamaria, 2006).

2.5. Spektrofotometri

Metode Spektrofotometri banyak digunakan dalam penetapan kadar nitrit pada suatu sampel (Habibah et al., 2018).

Spektrofotometer ultraviolet-visibel (UV-Vis) merupakan instrumen yang digunakan untuk menghitung panjang gelombang dan intensitas cahaya ultra violet (UV) dan sinar tampak (Vis) yang diserap oleh sampel. Ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk membawa electron terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektroskopi sinar ultraviolet dan cahaya tampak umumnya digunakan untuk molekul dan ion anorganik atau kompleks dalam larutan (Dachriyanus, 2004).

Spektrofotometer untuk mengukur pada daerah sinar tampak dan sinar ultra violet terdiri atas sistem optik yang mampu menghasilkan cahaya monokromatik dengan Panjang gelombang 200-800 nm. Spektrofotometer UV-Vis memiliki komponen komponen sebagai berikut:

1. Sumber lampu

Panjang gelombang cahaya ultraviolet (UV) adalah 200 hingga 400 nm dan panjang gelombang cahaya tampak (Visibel) adalah 400 hingga 800 nm. Panjang gelombang adalah jarak antara lembah dan puncak (Dachriyanus, 2004). Sumber cahaya pada spektrofotometer menggunakan lampu deuterium untuk Panjang gelombang ultra violet (UV) 190 hingga 350 nm, dan lampu halogen untuk daerah sinar tampak dengan panjang gelombang 350 hingga 900 nm (Gadjar and Rohman, 2007)

2. Monokromator

Monokromator digunakan untuk sumber cahaya monokromatik. Alat ini dapat berupa prisma atau mata jaring. Monokromator terdiri dari beberapa bagian yaitu Celah, Filter Optik dan Gating (Prisma dan kisi). Celah berperan dalam terbentuknya radiasi monokromator dan resolusi panjang gelombang, filter optic digunakan untuk menembus warna komplementer sehingga cahaya tampak yang diteruskan adalah cahaya yang cocok dengan warna filter optik yang digunakan. Prisma dan kisi adalah bagian terpenting dari monokromator karena prisma ini mendispersikan radiasi elektromagnetik agar didapatkan revolusi yang baik dari radiasi polikromatis (ALWI, 2017).

3. Kuvet

Kuvet merupakan tempat sampel yang digunakan untuk senyawa yang akan di analisis. Ada dua jenis kuvet yaitu leburan silika dan kuvet kaca (Helwandi, 2016) . Kuvet yang biasa digunakan tebalnya 10mm dan yang biasa digunakan berbentuk pesergi c

4. Detektor

Detektor memiliki fungsi dimana akan mengubah sinyal radiasi yang diterima oleh detektor menjadi sinyal elektronik. Detektor merespon cahaya dengan berbagai panjang gelombang yang berbeda (ALWI, 2017).

Panjang gelombang untuk cahaya ultraviolet adalah 200 hingga 400 nm dan panjang gelombang cahaya tampak adalah 400 hingga 750 nm. Warna cahaya tampak dapat dikaitkan dengan panjang gelombang ini. Cahaya putih mengandung radiasi dari semua panjang gelombang di daerah cahaya tampak. Cahaya monokromatik dapat dipilih dari cahaya putih contohnya dengan menggunakan alat prisma. Warna yang sesuai ditunjukkan terdapat pada tabel II.2.

Tabel II. 2 Hubungan antara warna dengan Panjang gelombang sinar tampak

Panjang Gelombang (nm)	Warna yang Diserap	Warna yang Diamati
400-435	Ungu	Hijau Kekuningan
450-480	Biru	Kuning
480-490	Biru Kehijauan	Orange
490-500	Hijau Kebiruan	Merah
500-560	Hijau	Merah Anggur
560-580	Hijau Kekuningan	Ungu
580-595	Kuning	Biru
595-610	Oranye	Biru Kehijauan
610-750	Merah	Hijau Kebiruan

Penentuan spektrofotometri konsentrasi analit yang akan dianalisis dapat ditentukan dengan menggunakan Hukum Lambert-Beer dengan mengukur absorbansi analit yang akan dianalisis pada panjang gelombang

tertentu. Hukum Lambert-Beer adalah hubungan linear antara adsorben dan objek yang akan dianalisis. Menurut hukum Lambert-Beer, intensitas yang ditransmisikan oleh larutan adsorben sebanding dengan ketebalan kuvet dan konsentrasi larutan (Gadjar and Rohman, 2007). Semakin tinggi konsentrasi maka semakin banyak sampel organik yang diserap oleh cahaya pada panjang gelombang tertentu yang dinyatakan dalam hukum Labert Beer: (Dachriyanus, 2004)

$$A = abc = \log I_0/I$$

Keterangan:

A = Absorban

a = Absorptivitas

b = tebal Kuvet (cm)

c = Konsentrasi

I_0 = Intensitas Sinar sebelum melalui sampel

I = Intensitas Sinar setelah melalui sampel

2.6. Analisis Nitrit

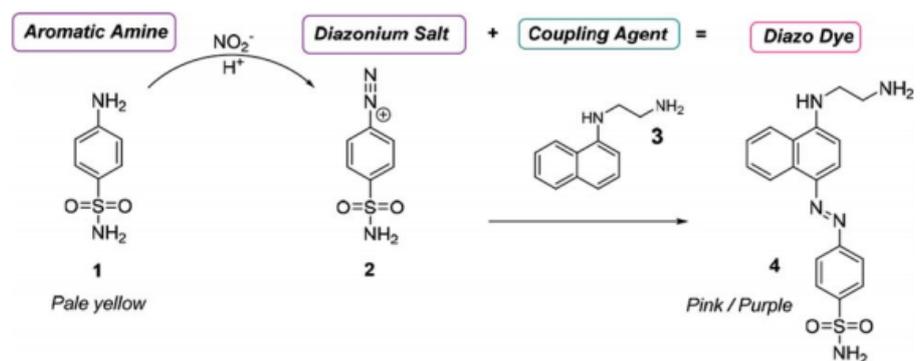
Metode pengukuran nitrit yang umum digunakan adalah pereaksi Griess. Pada reaksi Griess, nitrit akan bereaksi dengan senyawa amina aromatik primer seperti asam sulfanilat dalam suasana asam dan akan membentuk suatu senyawa garam diazonium dan bereaksi dengan naftilamina membentuk senyawa azo berwarna merah-ungu (Tsikas, 2007). Dalam hal ini ion nitrit yang akan di analisis dalam keadaan asam, dan menyebabkan diazotasi. Reaksi diazotasi ini dikarenakan amina di diazotasi dan di tambahkan dengan N-(1naphtyl)ethylenediamide, yang kemudian akan membentuk warna (Heidelberger and Treffers, 1942).

Reaksi antara amina aromatik primer dengan nitrit dalam suasana asam sehingga membentuk senyawa garam diazonium disebut sebagai reaksi diazotasi. Senyawa amin aromatik primer digunakan pada reagen Griess ini antara lain p-nitro anilin, anilin dan asam sulfanilat. Senyawa garam diazonium yang dihasilkan ini akan bereaksi dengan senyawa pengkumpling atau senyawa yang memiliki gugus fenil terbuka dari reaksi ini akan menghasilkan senyawa azo. Kombinasi dari garam diazonium dan

senyawa pengkopling ini akan menghasilkan senyawa azo yang karakteristiknya berbeda misalnya senyawa yang mereaksikan senyawa pengkopling β -naftol dengan garam diazonium 3-nitroanilin dapat membentuk senyawa azo dengan karakteristik senyawa azo yang berwarna merah, kemudian contoh lain senyawa pengkopling N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride yang direaksikan dengan garam diazonium dari asam sulfanilat akan membentuk senyawa azo yang memiliki karakteristik berwarna merah-ungu (Wiwin Diarti et al., 2015)

Senyawa naftilamin pertama kali digunakan oleh Peter Griess yang digunakan sebagai senyawa pengkopling dengan sumber garam diazonium dari asam sulfanilat yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan nitrit dalam suatu larutan atau campuran (Wiwin Diarti et al., 2015).

Mekanisme dari reaksi Griess adalah amina aromatik primer contohnya asam sulfanilat bereaksi dengan nitrit (NO_2^-) dalam suasana asam dan membentuk garam diazonium. Garam diazonium yang terbentuk ini di reaksikan dengan senyawa kopling contohnya NED, dan menghasilkan senyawa azo berwarna merah muda atau ungu (Váradi et al., 2019).



Gambar 2. 6 Mekanisme Reaksi Griess (Váradi et al., 2019)

2.7. Uji Validasi

Validasi metode analitik merupakan langkah untuk mengevaluasi parameter tertentu berdasarkan eksperimen yang dilakukan laboratorium dan untuk menunjukkan parameter yang akan dilakukan telah memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita, 2004). USP atau United State Pharmacopoeia

mengatakan validasi metode dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan telah akurat, spesifik, reproduisibel (Gadjar and Rohman, 2007).

2.7.1. Selektifitas

Selektifitas adalah ukuran kemampuan metode untuk secara akurat dan spesifik mengukur suatu zat tertentu dengan adanya komponen lain yang mungkin ada didalam specimen. Selektifitas dapat dinyatakan dalam derajat kesalahan dalam metode yang dilakukan pada sampel yang mengandung cemaran, produk degradasi, senyawa arsenik yang bebas dari senyawa tersebut dan zat tambahan berupa zat yang di gunakan dalam analisis pengujian (Harmita, 2004).

Internasional Conference on Harmonization (ICH), membagi selektifitas menjadi dua kategory: pengujian identitas dan pengujian atau pengukuran kemurnian. Untuk uji identifikasi, selektifitas dinyatakan sebagai kemampuan metode analitik untuk membedakan senyawa yang serupa secara structural, sedangkan untuk pengujian atau pengukuran kemurnian tujuannya dinyatakan sebagai kemampuan dua senyawa yang berdekatan untuk berpisah. Senyawa umumnya merupakan komponen utama atau senyawa yang mengandung bahan aktif atau pengotor (Gadjar and Rohman, 2007).

2.7.2. Linearitas

Linearitas ialah parameter analisis yang memberikan hasil pengujian yang berkaitan pada konsentrasi senyawa yang telah diteliti. Linearitas ialah yang mengukur kurva kalibrasi yang menunjukkan korelasi antara nilai absorbansi (y) terhadap nilai konsentrasi (x). Linearitas bisa dihitung dengan mengerjakan pengukuran tunggal menggunakan konsentrasi sampel yang berbeda. Dari data yang diperoleh, digunakan metode kuadrat terkecil untuk menentukan kemiringan, intersep dan koefisien hubungan. Linearitas merupakan parameter yang menentukan bagaimana kurva kalibrasi mengkorelasi respon (y) dengan konsentrasi (x) (Gadjar and Rohman, 2007).

Linearitas umumnya dinyatakan sebagai varians di sekitar garis regresi, dihitung berlandaskan rumus matematika untuk data yang

diperoleh dari hasil uji analisis pada sampel dengan konsentrasi analisis yang berbeda beda. $Y = bx + a$ sebagai parameter yang berhubungan linier dengan koefisien korelasi r dari analisis regresi linear. Dengan memperoleh nilai $b = 0$ dan nilai $r = + 1$ atau -1 maka nilai linearitas tersebut dapat dikatakan nilai linear yang ideal dan tergantung dari hasil garis yang dihasilkan dari kueva kalibrasi tersebut. Nilai a untuk regresi linear menunjukkan sensitivitas analisis terutama pada instrument yang akan digunakan. Parameter lain yang perlu dihitung adalah simpangan baku residual (s_y) (Harmita, 2004)

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum |Y - Y'|^2}{n-2}}$$

Dimana $\hat{Y}_i = a + bx$

$$S_{x_0} = \frac{s_y}{b}$$

S_{x_0} = standar deviasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}^2}{x}$$

V_{x_0} = Koefisien variasi dari fungsi.

2.7.3. Sensitifitas

Batas Deteksi ialah konsentrasi sampel terendah yang masih dapat di deteksi. Batas deteksi merupakan parameter pemeriksaan batas. Uji batas deteksi ini menunjukkan apakah konsentrasi sampel yang akan di uji berada di atas atau di bawah nilai tertentu. Batas deteksi dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Batas Deteksi (LOD)} = \frac{3 \times S_b}{s_l}$$

Keterangan:

S_b = Simpangan Baku

s_l = slope

Batas kuantifikasi adalah konsentrasi minimum obeej senyawa di dalam sampel yang dapat diukur secara akurasi dan presisi di bawah kondisi percobaan yang sama. Batas Kuantifikasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Batas Kuantifikasi (LOQ)} = \frac{10 \times S_b}{s_l}$$

Keterangan:

Sb = Simpangan Baku

Sl = Slope

2.7.4. Akurasi

Akurasi adalah ketepatan metode analitik yang menunjukkan seberapa dekat nilai yang diukur dengan nilai sebenarnya. Akurasi diukur dengan jumlah bahan uji yang dapat diperoleh kembali dari pengukuran dengan menambah sampel. Akurasi di capai dengan membandingkan hasil pengukuran dengan hasil standar (Gandjar & Rohman, 2007).

Akurasi ditentukan dengan dua cara, yaitu cara spiked-placebo recovery atau simulasi dan cara standart addition atau cara penambahan standar. Pada cara simulasi analit murni ditambahkan dalam campuran placebo atau sediaan farmasi kemudian di analisis, hasil dari analisis di bandingkan dengan konsnetrasi analit yang sebenarnya, sedangkan dalam cara penambahan standar, setelah menganalisis sampel, sejumlah analit di tambahkan ke sampel kemdian diaduk dan di uji ulang. Selisih antara kedua hasuk tersebut dibandikan dengan jumlah kadar yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai perbandungan hasil yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Persen perolehan ditentukan dengan menenmpatkan sampel plasebo dan menambahkan serta menganalisis konsentrasi tertentu dari analit (Harmita, 2004).

Akurasi didapatkan dengan mengumpulkan data dari Sembilan perlakuan dengan menggunakan tiga konsentrasi yang berbeda, misalnya dengan menggunakan tiga konsentrasi dengan tiga kali perlakuan dan data akurasi yang dihasilkan dinyatakan persen perolehan kembali (Gadjar and Rohman, 2007).

2.7.5. Presisi

Presisi adalah parameter reproduktifias metode analitis dan dinyatakan dalam standar deviasi relatif dari sejumlah sampel yang signifikan secara statistik (Gadjar and Rohman, 2007).

ICH menentukan bahwa presisi harus dicapai pada tiga tingkatan yang berbeda yaitu:

1. Keterulangan reproduktifitas adalah pengukuran berulang dari kondisi eksperimental yang sama, termasuk orang, peralatan, tempat dan waktu.
2. Presisi antara merupakan presisi dalam kondisi dimana experiment yang berbeda mencakup orang, peralatan, tempat dan waktunya.
3. Reproduksibilitas adalah hasil yang diperoleh dari laboratorium lain (Gadjar and Rohman, 2007).

Presisi diukur dalam standar deviasi (SD) dan dinyatakan sebagai ketertiruan (Reproducibility) atau keterulangan (repeatability). Keterulangan adalah keseksamaan dari suatu metode ketika dianalisis melakukan metode tersebut berulang kali dalam kondisi yang sama pada interval waktu yang pendek (Harmita, 2004).

Presisi biasanya dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) atau standar deviasi relatif (RSD). Untuk menghitung SD dan RSD dirumuskan sebagai berikut:

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

$$RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{X}}$$

Keterangan:

SD = Standar Deviasi

X = Kadar kandungan zat dalam sampel

\bar{X} = Kadar kandungan zat rata rata sampel

n = jumlah pengulangan

RSD = Standar Deviasi Relative

Data uji presisi biasanya dikumpulkan sebagai studi terkait lainnya seperti linearitas dan akurasi. Untuk sampel tunggal dilakukan 6 hingga 15 ulangan biasanya dilakukan untuk setiap konsentrasi. Untuk senyawa aktif yang memiliki jumlah bayak nilai RSD yang dipersyaratkan yaitu 1 hingga 2% dan untuk senyawa yang memiliki kadar yang sedikit atau sekelumit nilai

RSD yang dipersyaratkan sekitar 5 hingga 15% (Gadjar and Rohman, 2007).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode penelitian experimental. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis kadar nitrit dalam tanaman kale dengan penambahan pereaksi Griess dan menggunakan metode spektrofotometri sinar tampak. Pada penelitian ini diawali dengan pengumpulan sampel, preparasi sampel, pembuatan larutan standar, validasi metode dan penentuan kadar nitrit dalam tanaman kale menggunakan metode kolorimetri. Pada tahapan pengembangan metode nitrit dilakukan penentuan panjang gelombang serapan maksimum pada nitrit dengan spektrofotometer UV-Vis, serta validasi metode meliputi uji linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi, presisi dan akurasi. Tahapan selanjutnya dilakukan pengukuran kadar nitrit pada sampel. Sampel yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah kale keriting dan nero kale. Penelitian dilakukan dengan mempersiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan pada penelitian, sebelum dilakukan penelitian dilakukan preparasi sampel terlebih dahulu dengan cara menggerus 2gram sampel kemudian di didihkan dengan NaOH 0,1 N selama 30 menit dan di saring dengan kertas saring. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Universitas Bhakti Kencana.