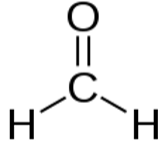


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 FORMALIN



Gambar 2.1 Rumus Struktur Formalin

Bahan kontaminasi kimia yang sering digunakan secara bebas oleh pedagang atau produsen pangan yang tidak bertanggung jawab untuk bahan pengawet adalah formalin. Sifat fisik formaldehida berbentuk cairan jernih, tidak berwarna atau hampir tidak berwarna, bau menusuk, uap merangsang selaput lendir hidung dan tenggorokan, serta jika disimpan ditempat yang dingin dapat berubah menjadi keruh. Formaldehida biasanya disimpan didalam wadah tertutup sehingga terlindung dari cahaya dengan suhu tempat penyimpanan di atas 20°C. Formaldehida dalam udara bebas berbentuk gas, namun dapat larut didalam air. Larutan formaldehida yang beredar di pasaran menggunakan merek dagang formalin atau formol. Di dalam air, formaldehida mengalami polimerisasi (sangat sedikit yang berada dalam bentuk monomer CH₂O). Formaldehida umumnya memiliki sifat kimia yang sama dengan aldehida lainnya. Formaldehida merupakan elektrofil sehingga dapat digunakan dalam reaksi substitusi aromatik elektrofilik dan alkena. Keadaan katalis bisa menyebabkan formaldehida menghasilkan asam formal dan metanol (Tangdionga et al., 2015).

Pada hakikatnya formaldehida digunakan untuk membasmi sebagian besar bakteri, sehingga sering digunakan sebagai desinfektan dan juga sebagai bahan pengawet. Sebagai desinfektan, formaldehida dimanfaatkan untuk membersihkan lantai, kapal, gudang, dan pakaian. Formaldehida dipakai untuk pengawet dan vaksinasi. Di dalam bidang medis, larutan formaldehida digunakan untuk mengeringkan kulit, misalnya mengangkat kutil. Larutan dari formaldehida sering digunakan dalam membalsem untuk

membunuh bakteri dan mengawetkan bangkai (Tangdiongga et al., 2015). Pada konsentrasi rendah (<1%) formaldehida dapat digunakan sebagai pengawet bahan non pangan seperti cairan pencuci piring, pelembut, shampo mobil, lilin, dan pembersih karpet (Humairo et al., 2023). Akan tetapi di dalam kehidupan sehari-hari, produsen sering menggunakan formalin untuk mengawetkan makanan yang mudah rusak atau makanan yang disukai sebagai media tumbuhnya bakteri dan jamur seperti tahu, pentol, ikan asin, mie, lontong, dan bihun. Penggunaan formalin sebagai bahan pengawet makanan sangat berbahaya bagi konsumen. Dampak buruk yang diakibatkan formalin apabila masuk melalui kulit akan menyebabkan iritasi dan rasa terbakar pada mukosa mulut serta saluran atas bagian pernafasan apabila masuk secara inhalasi. Pada konsentrasi yang lebih tinggi mampu mencapai alveoli dan bronkiolus lalu menginduksi edema paru dan pneumonia. Sedangkan jika tertelan dalam konsentrasi yang tinggi menimbulkan beberapa gejala akut berupa iritasi pada mulut, kerongkongan, nyeri dada dan perut, mual, muntah diare, gagal ginjal, bahkan mengakibatkan kematian. Menurut *American Conference of Governmental and Industrial Hygienist* (ACGIH), ambang batas formalin sebesar 0,4 ppm. Sedangkan menurut *International Programme on Chemical Safety* (IPCS), ambang batas formalin sebesar 1 mg/L atau 0,2 mg/hari dalam air minum dan 1,5 mg-14 mg/hari dalam makanan (Rahman et al., 2019).

Penggunaan formalin sudah sangat jelas dilarang untuk digunakan dalam makanan, hal ini sesuai dengan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 1168/MENKES/PER/X/1999 perubahan dari Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/1988 Tentang Bahan Tambahan Pangan. Walaupun kebanyakan orang terutama produsen makanan telah mengetahui bahwa formalin sangat berbahaya bagi kesehatan jika dipergunakan sebagai pengawet, namun penggunaannya semakin meningkat dikarenakan harga formalin yang sangat murah dibandingkan dengan jenis pengawet lain dan formalin sangat efektif digunakan sebagai pengawet walaupun dalam jumlah yang relatif kecil (Jayadi et al., 2023).

2.2 BAKSO

Bakso merupakan salah satu makanan khas Indonesia yang banyak digemari. Bakso daging menurut SNI 01-3818-1995 adalah produk makanan berbentuk bulatan atau bentuk lain yang berasal dari campuran daging ternak (kadar daging tidak kurang dari 50%) dan pati atau serelia dengan atau tanpa Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang diizinkan. Bahan baku utama dalam proses pembuatan bakso adalah daging dan bahan tambahan lainnya seperti tepung tapioka, garam, es batu, Bahan Tambahan Pangan (BTP), serta bumbu-bumbu penyedap. Selain garam dan tepung, pada proses pembuatan bakso digunakan pula bawang merah, bawang putih, dan merica. Prinsip pembuatan bakso terdiri atas empat tahap yaitu: penghancuran daging, pembuatan adonan, pencetakan bakso, dan proses pemasakan. Adonan bakso merupakan sistem emulsi minyak dalam air. Emulsi merupakan suspensi cairan dalam cairan yang lain dan molekul-molekul kedua cairan tersebut tidak saling berbau, akan tetapi saling antagonistic. Bagian yang berbentuk butiran, memiliki konsentrasi lebih kecil dibandingkan bagian yang lain disebut sebagai fase terdispersi, sedangkan media tempat fase terdispersi memiliki konsentrasi lebih besar disebut dengan fase pendispersi. Selain fase terdispersi dan fase pendispersi, bagian penting dalam sistem emulsi yaitu pengemulsi (*emulsifer*). Pengemulsi berfungsi menjaga agar fase terdispersi tetap tersuspensi di dalam fase pendispersi. Emulsifer yang biasa digunakan dalam produk olahan daging yaitu protein (Aulawi & Ninsix, 2009).

Dalam proses pembuatan bakso produsen terkadang juga menambahkan bahan pengisi dan pengenyal. Fungsi dari penambahan bahan pengisi dan pengenyal yaitu memperbaiki stabilitas emulsi, mengurangi penyusutan pada proses pemasakan, memperbaiki sifat irisan, meningkatkan cita rasa, dan mengurangi biaya produksi. Bahan pengisi dapat mengabsorpsi air dua hingga tiga kali lipat dari berat semula, sehingga adonan bakso akan menjadi besar. Untuk bahan pengenyal yang sering digunakan untuk pembuatan bakso bukan tepung berprotein, melainkan tepung dengan karbohidrat yang tinggi, misalnya tepung pati singkong dan sagu. Menurut SNI 01-3818-1995 penggunaan bahan pengisi maksimal 50% dari masa

daging. Penggunaan bahan pengisi yang optimum sebaiknya ditambahkan sebanyak 25% (Aulawi & Ninsix, 2009).

Cara paling mudah untuk menilai mutu bakso dengan kualitas yang baik yaitu dengan menilai mutu sensori atau mutu organoleptiknya. Paling tidak, 5 parameter sensori utama yang dapat dinilai, yaitu kenampakan, warna, bau, rasa, dan tekstur (Freshily, 2017). Kriteria mutu sensori bakso tercantum pada tabel 2.1 dibawah ini:

Tabel 2.1 Kriteria Mutu Sensori Bakso

Parameter	Bakso
Kenampakan	Bentuk bulat kasar atau halus, berukuran seragam, berisi, tidak kusam, tidak berjamur, dan tidak berlendir
Warna	Coklat muda cerah atau sedikit kemerahan atau coklat muda hingga coklat muda agak keputihan atau abu-abu. Warna yang merata
Bau	Bau khas daging segar rebus dominan, tidak bau tengik, asam, basi atau busuk. Bau bumbu yang digunakan cukup tajam
Rasa	Rasa enak, lezat, rasa daging dominan dan rasa bumbu cukup menonjol tetapi tidak berlebihan. Tidak terdapat rasa asing yang mengganggu
Tekstur	Tekstur elastis, kompak, kenyal tetapi tidak liat atau membal, tidak lembek, tidak berair, dan tidak rapuh

Syarat mutu bakso daging mengacu pada SNI 01-3818-1995 yang tercantum pada tabel 2.2 dibawah ini:

Tabel 2.2 SNI 01-3818-1995 Tentang Syarat Mutu Bakso:

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1.	Keadaan 1.1 Bau 1.2 Rasa 1.3 Warna 1.4 Tekstur	- - - -	Normal khas daging Gurih Normal Kenyal
2.	Air	%b/b	Maks 70,0
3.	Abu	%b/b	Maks 3,0
4.	Protein	%b/b	Min 9,0
5.	Lemak	%b/b	Maks 2,0
6.	Boraks	%b/b	Tidak boleh ada
7.	Bahan tambahan makanan	Sesuai SNI 01-0222-1997 dan revisinya	
8.	Cemaran logam 8.1 Timbal 8.2 Tembaga 8.3 Seng	mg/kg mg/kg mg/kg	Maks 2,0 Maks 20,0 Maks 40,0

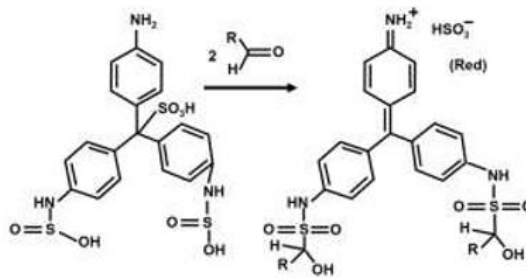
	8.4 Timah	mg/kg	Maks 40,0
	8.5 Raksa	mg/kg	Maks 0,03
9.	Cemaran Arsen	mg/kg	Maks 1,0
10.	Cemaran mikrobial		
	10.1 Angka lempeng total	Koloni/g	Maks 1×10^5
	10.2 Bakteri bentuk e.coli	APM/g	Maks 10
	10.3 <i>Esherichia coli</i>	APM/g	<3
	10.4 <i>Enterococi</i>	Koloni/g	Maks 1×10^3
	10.5 <i>Clostridium perfringens</i>	Koloni/g	Maks 1×10^2
	10.6 <i>Salmonella</i>	-	Negative
	10.7 <i>Staphylococcus aureus</i>	Koloni/g	Maks 1×10^2

2.3 METODE ANALISIS FORMALIN SECARA KUALITATIF

Untuk mengetahui kandungan formalin di dalam bahan pangan, bisa dilakukan dengan menggunakan analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui ada dan tidaknya kandungan formalin di dalam pangan. Sedangkan analisis kuantitatif merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui kadar formalin yang terkandung di dalam pangan. Mengingat formalin merupakan Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang telah dilarang penggunaannya maka analisis yang dilakukan bisa hanya menggunakan analisis kualitatif saja. Analisis kualitatif formalin dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi-pereaksi kimia yang kemudian dilakukan pengamatan kompleks warna khas yang terbentuk saat sampel positif mengandung formalin. Berikut beberapa pereaksi kimia yang biasa digunakan untuk menguji kandungan formalin beserta reaksi yang terjadi didalamnya:

1. Pereaksi *Schiff's*

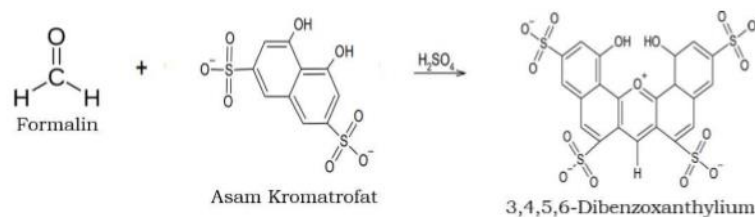
Pereaksi *Schiff's* merupakan reagen yang dapat digunakan untuk mengetahui adanya gugus aldehid dalam suatu senyawa. Salah satu senyawa yang memiliki gugus aldehid yaitu formaldehida atau formalin. Apabila senyawa yang diuji mengandung formalin maka pada saat diberikan pereaksi *Schiff's* akan terjadi pembentukan warna menjadi merah keunguan atau merah magenta yang menandakan adanya gugus aldehid pada senyawa yang diuji. Reaksi antara pereaksi *Schiff's* dengan formalalin dapat dilihat pada gambar 2.2 dibawah ini:



Gambar 2.2 Reaksi Antara Pereaksi Schiff's dengan Formalin (Wati et al., 2021)

2. Pereaksi Asam Kromatofat

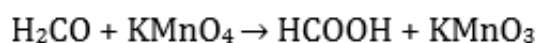
Formalin dengan adanya pereaksi asam kromatofat kemudian dipanaskan dengan asam sulfat, maka dalam beberapa menit akan terjadi perubahan warna menjadi ungu (lembayung). Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada gambar 2.3. Formalin memiliki sifat sangat reaktif apabila direaksikan dengan asam kromatofat dalam suasana asam yang akan menghasilkan senyawa 3,4,5,6-dibenzoxanthylum.



Gambar 2.3 Reaksi Antara Pereaksi Asam Kromatofat dengan Formalin (Haikal et al., 2022)

3. Pereaksi KMnO₄

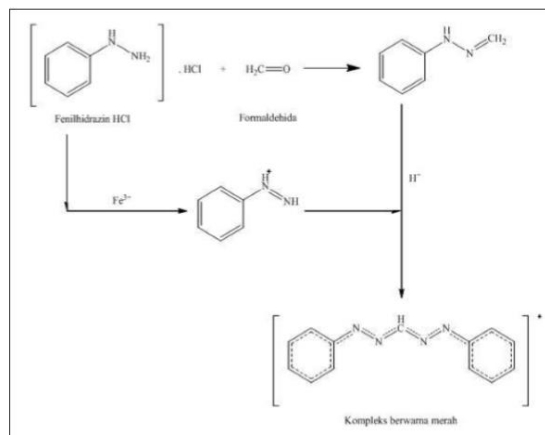
Penambahan pereaksi KMnO₄ pada sampel menunjukkan hasil sampel positif mengandung formalin jika terbentuk warna coklat muda atau hampir tidak berwarna. Hal tersebut disebabkan aldehyd telah mereduksi KMnO₄. Reaksi antara KMnO₄ dengan formalin dapat dilihat pada gambar 2.4 dibawah ini:



Gambar 2.4 Reaksi Antara Pereaksi KMnO₄ dengan Formalin (Sari et al., 2021)

4. Pereaksi *Schryver*

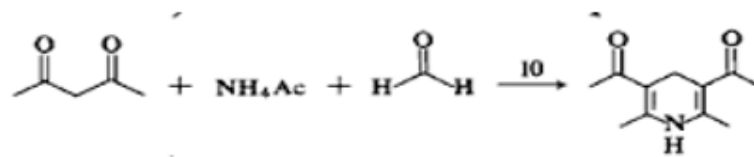
Pereaksi *Schryver* jika direaksikan dengan sampel yang mengandung formalin maka akan membentuk kompleks warna merah pada larutannya. Reaksi yang terjadi yaitu kondensasi antara formaldehida dengan fenilhidrazin, yang pada suatu reaksi oksidasi maka akan membentuk basa lemah. Kemudian, dengan adanya kelebihan asam kuat maka akan menghasilkan garam dan pada akhirnya akan mengalami disosiasi hidrolitik pada pengenceran. Penggantian dari ferri klorida dengan kalium ferrisianida yang ditambahkan secara berlebih sebagai agen pengoksidasi tidak akan menyebabkan kerusakan warna. Perubahan warna terjadi dikarenakan penambahan konsentrasi asam hidroklorida sebagai pengganti asam sulfat untuk memberikan warna pada garamnya. Reaksi antara pereaksi *Schryver* dengan formalin dapat dilihat pada gambar 2.5 dibawah ini:



**Gambar 2.5 Reaksi Antara Pereaksi *Schryver* dengan Formalin
(Suryadi et al., 2010)**

5. Pereaksi Nash

Penambahan pereaksi nash pada sampel dikatakan positif mengandung formalin jika terdapat perubahan warna dari yang semulanya jernih tidak berwarna menjadi berwarna kuning. Hal tersebut terjadi disebabkan adanya reaksi formalin dengan asam asetil aseton dan ammonia membentuk diecetyl-dihidro-lutidine (DDL) yang membentuk warna kuning stabil. Reaksi antara pereaksi nash dengan formalin dapat dilihat pada gambar 2.6 dibawah ini:



**Gambar 2.6 Reaksi Antara Pereaksi Nash dengan Formalin
(Fatimah et al., 2017)**

2.4 UBI JALAR UNGU

Tanaman ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L. Poir*) merupakan tanaman yang berasal dari benua Amerika. Ubi jalar ungu merupakan tumbuhan merambat yang dapat hidup disegala cuaca, baik pegunungan maupun pantai. Komoditas ubi jalar ungu sudah banyak ditemukan di Indonesia, khususnya di pulau jawa sehingga mudah untuk didapatkan, harga yang relatif murah, tidak memberikan efek negatif bagi kesehatan, dan memiliki kulit serta daging berwarna ungu sehingga kaya akan pigmen antosianin (Winarti et al., 2008). Menurut (Fatimatusahro et al., 2019) tanaman ubi jalar ungu dapat diklasifikasikan dalam sistem taksonomi yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super divisi	: <i>Spermatophyte</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub kelas	: <i>Asteride</i>
Ordo	: <i>Solanales</i>
Famili	: <i>Convolvulaceae</i>
Genus	: <i>Ipomea</i>
Spesies	: <i>Ipomea batatas Poir.</i>



**Gambar 2.7 Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. Poir*)
(Fatimatuzahro et al., 2019)**

Warna ungu yang dimiliki oleh ubi jalar ungu menjadi penarik perhatian bagi masyarakat untuk menggunakannya sebagai pewarna alami dalam beberapa produk olahan makanan. Bahan pewarna alami dipilih karena aman jika digunakan dalam jangka waktu yang panjang. Pigmen antosianin merupakan metabolit sekunder dari golongan flavonoid yang menjadi pewarna pada sebagian besar tanaman seperti buah-buahan, sayur-sayuran, dan bunga. Antosianin merupakan pigmen yang dapat larut didalam air serta bertanggung jawab untuk warna biru, ungu, violet, magenta, merah, dan orange pada tanaman (Armanzah & Hendrawati, 2016). Jenis antosianin yang terdapat didalam ubi jalar ungu adalah sianidin dan peonidin. Total kandungan antosianin dalam ubi jalar ungu sebesar 519 mg/100 gram dari berat basah (Kunnaryo & Wikandari, 2021), 61,85 mg/100 g (138,15 mg/100 g basis kering), dan 3,51 mg/100 g (9,89 mg/100 g basis kering) pada ubi jalar ungu muda. Kandungan antosianin ubi jalar ungu tua 17 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kadar antosianin ubi jalar ungu yang masih muda. Kandungan antosianin ubi jalar ungu tergantung pada intensitas warna umbinya. Semakin tinggi intensitas warna ungu umbinya maka dikatakan bahwa kandungan antosianin akan semakin tinggi (Husna et al., 2013).

2.5 EKSTRAKSI ANTOSIANIN

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan zat yang lain.

Secara garis besar, proses pemisahan dengan cara ekstraksi terdiri dari tiga langkah dasar yaitu (E. Pratiwi, 2021):

- a. Penambahan sejumlah pelarut untuk dikontakkan dengan sampel, biasanya melalui proses difusi.
- b. Zat terlarut akan terpisah dari sampel dan larut oleh pelarut membentuk ekstrak.
- c. Pemisahan fase ekstrak dengan sampel yang digunakan.

Proses ekstraksi antosianin dapat dilakukan menggunakan berbagai pelarut, seperti aquades, metanol, dan etanol. Antosianin dapat terekstrak dengan baik menggunakan larutan metanol yang diasamkan dengan larutan HCl. Hal tersebut berdasarkan kestabilan antosianin yang lebih stabil pada pH yang cenderung asam serta larutan HCl menunjukkan jenis pengasaman paling efektif karena dapat mendenaturasi membran sel tanaman dan melarutkan senyawa antosianin keluar dari sel. Namun, penggunaan pelarut metanol yang sangat berbahaya dan dapat mengakibatkan toksik dalam sistem pangan maka pelarut yang sering digunakan untuk mengekstrak antosianin yaitu aquades atau etanol yang diasamkan dengan larutan HCl. Pelarut memiliki peranan penting dalam proses ekstraksi. Pemilihan cairan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. Selektivitas
2. Kemudahan bekerja dan proses dengan pelarut yang digunakan
3. Ekonomis
4. Ramah terhadap lingkungan
5. Keamanan

Setelah jenis pelarut yang sesuai telah diketahui untuk digunakan pada proses ekstraksi, selanjutnya yaitu pemilihan metode ekstraksi yang tepat agar senyawa yang terekstrak tidak rusak. Ekstraksi secara umum dapat digolongkan menjadi dua yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Pada proses ekstraksi cair-cair, senyawa yang akan dipisahkan terdapat didalam campuran yang berupa cairan. Sedangkan ekstraksi padat-cair yaitu suatu metode pemisahan senyawa dari campuran yang berupa padatan.

2.5.1 Ekstraksi Padat Cair

Ekstraksi padat-cair merupakan metode pemisahan satu atau beberapa komponen (*solute*) dari campurannya di dalam padatan yang tidak larut (*inert*) menggunakan pelarut (*solvent*) berupa cairan. Proses ekstraksi padat cair secara umum terdiri dari lima tahapan yaitu sebagai berikut (E. Pratiwi, 2021):

1. Pelarut akan berpindah dari bulk solution ke seluruh permukaan padatan. Proses perpindahan pelarut dari bulk solution menuju permukaan padatan berlangsung seketika saat pelarut dikontakkan dengan padatan.
2. Pelarut berdifusi ke dalam padatan dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi antara solute yang berada di pelarut dengan solute di padatan.
3. Solute yang berada di dalam padatan akan larut ke dalam pelarut yang digunakan. Hal tersebut dapat terjadi diakibatkan adanya gaya dipol-dipol, sehingga senyawa yang bersifat polar-polar atau nonpolar-nonpolar akan saling berikatan.
4. Solute berdifusi dari padatan menuju ke permukaan padatan disebabkan konsentrasi solute dalam pelarut yang berada di dalam pori-pori padatan lebih besar daripada permukaan padatan.
5. Solute berpindah dari permukaan padatan menuju bulk solution.

Metode ekstraksi berdasarkan ada atau tidaknya pemanasan dapat dibagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi dingin dan ekstraksi panas.

1. Ekstraksi dengan cara dingin.

Pada metode ini tidak dilakukan proses pemanasan selama ekstraksi berlangsung agar senyawa yang diinginkan tidak rusak. Berikut beberapa jenis metode ekstraksi dengan cara dingin, yaitu sebagai berikut (Mukhriani, 2014):

- a. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi komponen organik dengan cara dingin yang memiliki mekanisme pelarut menembus dinding sel dan masuk ke dalam sitoplasma yang

mengandung zat aktif sel (Suryadnyani et al., 2021). Zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan akan berdifusi ke luar sel. Proses tersebut akan berulang secara terus menerus hingga terjadi kesetimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel (Pratiwi & Priyani, 2019). Pada umumnya perendaman dilakukan selama 24 jam, kemudian pelarut diganti dengan pelarut yang baru. Beberapa kelemahan metode ini yaitu waktu ekstraksi yang lama, membutuhkan pelarut yang banyak, dan terdapat kemungkinan bahwa senyawa tertentu tidak dapat diekstrak karena kelarutannya rendah pada suhu ruang.

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi menggunakan bahan yang disusun secara unggun menggunakan pelarut yang selalu baru. Pelarut dialirkan secara terus menerus hingga warna pelarut tidak berwarna yang menunjukkan sudah tidak ada lagi senyawa yang larut. Kelemahan metode ini yaitu jumlah pelarut yang banyak, waktu ekstraksi yang lama, dan tidak meratanya kontak padatan dengan pelarut.

2. Ekstraksi dengan cara panas.

Metode ekstraksi ini melibatkan pemanasan dengan tujuan untuk mempercepat proses ekstraksi dibandingkan dengan ekstraksi dengan cara dingin. Beberapa jenis metode ekstraksi cara panas, yaitu sebagai berikut (Mukhriani, 2014):

a. Ekstraksi refluks

Ekstraksi refluks yaitu metode ekstraksi yang dilakukan pada titik didih pelarut tersebut, selama kurun waktu tertentu dan sejumlah pelarut dengan adanya pendingin balik (kondensor). Proses ekstraksi tersebut pada umumnya dilakukan tiga sampai lima kali pengulangan.

b. Ekstraksi dengan soxhlet

Pada metode ekstraksi dengan soxhlet, serbuk sampel dibungkus dengan kertas saring kemudian disimpan didalam alat soxhlet dan dipanaskan, sedangkan yang dipanaskan yaitu pelarutnya saja. Pelarut yang menguap kemudian didinginkan dalam kondensor sehingga dapat mengekstraksi sampel. Kelebihan metode soxhlet yaitu proses ekstraksi yang berlangsung secara kontinu, memerlukan waktu ekstraksi yang sebentar, dan membutuhkan pelarut yang lebih sedikit. Kelemahan dari metode ini yaitu menyebabkan rusaknya komponen lain yang tidak tahan terhadap panas.

c. Digesti

Digesti merupakan maserasi kinetik atau maserasi dengan pengadukan secara kontinu pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruang, umumnya dilakukan pada suhu sekitar 40-50°C.

d. Infusa

Infusa yaitu ekstraksi dengan pelarut aquades pada suhu penangas aquades (bejana infus tercelup ke dalam penangas air mendidih), suhu terukur yang digunakan yaitu 96-98°C dalam kurun waktu sekitar 15-20 menit.

e. Dekok

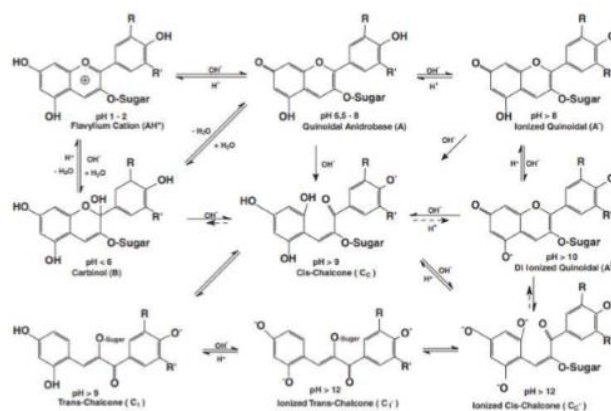
Dekok yaitu infus pada waktu yang lebih lama dengan suhu yang digunakan hingga titik didih aquades, yaitu pada suhu 90-100°C selama 30 menit.

2.5.2 Penggunaan Ekstrak Antosianin Untuk Mendeteksi Formalin

Penggunaan pereaksi kimia dapat membahayakan penggunaannya apabila tidak memahami sifat dari pereaksi yang digunakan. Oleh sebab itu, penggunaan pereaksi dari bahan alam untuk mendeteksi formalin dalam makanan dapat dilakukan secara kualitatif dengan memanfaatkan kandungan antosianin pada beberapa jenis tanaman, yaitu bunga kupu-kupu, ubi jalar ungu, anggur, buah naga, serta bayam merah (Kunnaryo & Wikandari, 2021).

Secara kimia antosianin merupakan turunan struktur aromatik tunggal, yaitu sianidin dan semuanya terbentuk dari pigmen sianidin dengan

penambahan atau pengurangan gugus hidroksil, metilasi, dan glikosilasi. Antosianin merupakan senyawa yang memiliki sifat amfoter, yaitu memiliki kemampuan untuk dapat bereaksi baik dengan asam maupun basa. Di dalam media asam antosianin akan berwarna merah, sedangkan pada media basa akan berubah menjadi biru. Antosianin termasuk senyawa golongan flavonoid yang secara luas terbagi dalam polifenol tumbuhan. Flavonol, flavan-3-ol, flavon, flavanon, dan flavanonol adalah kelas dari flavonoid yang berbeda dalam oksidasi antosianin (Samber et al., 2006). Larutan pada senyawa flavonoid adalah tidak berwarna atau kuning pucat. Antosianin merupakan pigmen yang larut dalam air, bertanggung jawab terhadap warna ungu, biru, violet, magenta, merah, dan orange (Armanzah & Hendrawati, 2016). Faktor-faktor yang mempengaruhi kestabilan dari antosianin adalah transformasi struktur dan pH, suhu, cahaya, oksigen, serta kopigmentasi (Armanzah & Hendrawati, 2016). Perubahan pH lingkungan menyebabkan transformasi struktur antosianin yang pada umumnya penambahan hidroksi akan menurunkan stabilitas, sedangkan penambahan metilasi akan meningkatkan stabilitas. Faktor pH tidak hanya mempengaruhi warna antosianin tetapi juga mempengaruhi kestabilannya. Antosianin akan lebih stabil di dalam larutan bersifat asam dibandingkan di dalam larutan alkali (basa). Dalam media cair kemungkinan antosianin berada dalam empat bentuk struktur yang bergantung pada pH. Struktur tersebut yaitu basa quinoidol (A), kation flavilium (AH^+), basa karbinol yang tidak berwarna (B), dan khalkon tidak berwarna (C) (Armanzah & Hendrawati, 2016).



Gambar 2.8 Perubahan Struktur Antosianin (Kunnaryo & Wikandari, 2021)

Kestabilan antosianin juga dipengaruhi oleh temperatur atau suhu. Suhu optimum yang digunakan untuk menjaga struktur antosianin yaitu 30°C. Peningkatan suhu dapat mengakibatkan antosianin mengalami 2 mekanisme degradasi yaitu hidrolisis ikatan 3-glikosida menjadi monomer aglikon dan cincin pyrilum akan membuka untuk membentuk kalkan yang kemudian membentuk senyawa polifenol yang berwarna coklat (Kunnaryo & Wikandari, 2021). Cahaya memiliki dua pengaruh yang bertolak belakang dengan antosianin, yaitu berperan dalam proses pembentukan antosianin dan berperan dalam laju degradasi warna antosianin. Oleh sebab itu, antosianin harus disimpan ditempat yang gelap dan suhu rendah (dingin). Faktor selanjutnya yang dapat mempengaruhi kestabilan antosianin yaitu oksigen. Oksidatif dapat mengakibatkan oksigen molekuler pada antosianin. Oksigen dan suhu nampaknya mempercepat kerusakan dari antosianin. Hal tersebut dapat diamati dari stabilitas warna antosianin selama pemrosesan jus buah yang menjadi rusak diakibatkan oleh oksigen (Samber et al., 2006). Faktor terakhir yang mempengaruhi kestabilan antosianin yaitu kopigmentasi (penggabungan antosianin dengan antosianin atau komponen organik yang lain). Kopigmen dapat mempercepat atau memperlambat degradasi, tergantung dari kondisi lingkungannya. Kompleks ini cenderung menstabilkan selama proses dan penyimpanan antosianin. Seperti halnya warna stabil dari minuman wine dipercaya hasil dari senyawa antosianin sendiri (Armanzah & Hendrawati, 2016).

2.5.3 Penetapan Kadar Antosianin

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengetahui besarnya kadar antosianin pada tanaman. Berikut akan disajikan beberapa jurnal yang menetapkan kadar antosianin:

Tabel 2.3 Jurnal Penetapan Kadar Antosianin

No.	Judul Jurnal	Pelarut Ekstraksi	Metode Penetapan Kadar Antosianin	Hasil Kadar Antosianin
1.	Pengaruh Pelarut dalam Berbagai pH pada Penentuan Kadar Total Antosianin dari Ubi	Pelarut etanol-HCl 1% dan aquades-HCl 1%	pH Diferensial Spektrofotometri	<ul style="list-style-type: none"> Pelarut etanol-HCl 1%: <ul style="list-style-type: none"> pH 1: 2,4491 mg/L pH 1,5: 5,9558 mg/L pH 2: 4,2303 mg/L

	Jalar Ungu dengan Metode pH Diferensial Spektrofotometri (S. W. Pratiwi & Priyani, 2019)			<p>pH 2,5: 3,2840 mg/L</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pelarut aquades-HCl 1% pH 1: 1,1132 mg/L pH 1,5: 2,0594 mg/L pH 2: 0,6679 mg/L pH 2,5: 0,3895 mg/L
2.	Optimasi Pelarut Ekstraksi Antosianin dari Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L. Poir</i>) Untuk Deteksi Boraks dalam Makanan (Rismiarti, 2022)	Etanol: asam asetat glasial: aquades (25:1:5) dan HCl 1,5M dalam etanol	Spektrofotometri (mg/L) dan metode antosianin monomerik	<ul style="list-style-type: none"> • Ubi jalar ungu yang diekstraksi dengan pelarut etanol: asam asetat glasial: aquades (25:1:5) memiliki kadar total antosianin 11,910 mg/L • Ubi jalar ungu yang diekstraksi dengan pelarut HCl 1,5M dalam etanol memiliki kadar total antosianin 16,343 mg/L
3.	Pengaruh Pelarut, Suhu, dan pH Terhadap Pigmen Antosianin dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (<i>Hylocereus Polyrhizus</i>) (Almajid et al., 2021)	Aquades, aquades:asam asetat 10% (1:6), dan aquades:asam sitrat 10% (1:6)	pH Diferensial dan Spektrofotometer UV-Vis	<ul style="list-style-type: none"> • Kulit buah naga yang diekstraksi dengan pelarut aquades menghasilkan kadar total antosianin 17,366 mg/200 mg • Kulit buah naga yang diekstraksi dengan pelarut aquades:asam asetat 10% (1:6) menghasilkan kadar total antosianin 12,69 mg/200 mg • Kulit buah naga yang diekstraksi dengan pelarut aquades:asam sitrat 10% (1:6) menghasilkan kadar total antosianin 18,034 mg/200 mg
4.	Penetapan Kadar Antosianin Total Beras Merah (<i>Oryza nivara</i>) (Anggraeni et al., 2018)	Metanol dan Metanol-HCl 1%	pH diferensial dan Spektrofotometer UV-Vis	<ul style="list-style-type: none"> • Beras merah halus yang diekstraksi dengan metanol diperoleh total antosianin yaitu 0,0591 (mg/100 g) • Beras merah utuh

				<p>yang diekstraksi dengan metanol diperoleh total antosianin yaitu 0,0551 (mg/100 g)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beras merah halus yang diekstraksi dengan metanol-HCl 1% diperoleh total antosianin yaitu 0,1503 (mg/100 g) • Beras merah utuh yang diekstraksi dengan metanol-HCl 1% diperoleh total antosianin yaitu 0,1212 (mg/100 g)
5.	<p>Pengaruh Konsentrasi Pelarut pada Proses Ekstraksi Antosianin dari Bunga Kembang Sepatu (Agustin & Ismiyati, 2015)</p>	<p>Etanol dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, dan 96%</p>	<p>Spektrofotometer UV-Visible</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Kelopak bunga kembang sepatu yang diekstraksi dengan etanol 60% didapatkan kadar antosianin sebesar 42,440 (mg/25 g bahan baku) • Kelopak bunga kembang sepatu yang diekstraksi dengan etanol 70% didapatkan kadar antosianin sebesar 45,788 (mg/25 g bahan baku) • Kelopak bunga kembang sepatu yang diekstraksi dengan etanol 80% didapatkan kadar antosianin sebesar 46,345 (mg/25 g bahan baku) • Kelopak bunga kembang sepatu yang diekstraksi dengan etanol 90% didapatkan kadar antosianin sebesar 47,981 (mg/25 g bahan baku) • Kelopak bunga kembang sepatu yang diekstraksi

				dengan etanol 96% didapatkan kadar antosianin sebesar 48,260 (mg/25 g bahan baku)
6.	Pengaruh Pelarut, Suhu, dan pH Terhadap Pigmen Antosianin dari Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (<i>Hylocereus Polyrhizus</i>) (Almajid et al., 2021)	aquades:asam sitrat 10% (1:1)	Spektrofotometer UV-Vis	<ul style="list-style-type: none"> • Waktu maserasi 1 hari didapatkan kadar antosianin sebesar 2,61 mg/L • Waktu maserasi 2 hari didapatkan kadar antosianin sebesar 3,10 mg/L • Waktu maserasi 3 hari didapatkan kadar antosianin sebesar 5,47 mg/L • Waktu maserasi 4 hari didapatkan kadar antosianin sebesar 2,68 mg/L • Waktu maserasi 5 hari didapatkan kadar antosianin sebesar 2,88 mg/L

2.6 TES KIT

Tes kit yaitu alat atau bahan yang telah diolah sedemikian rupa untuk mendeteksi secara cepat, tepat, dan akurat kandungan berbahaya didalam suatu sampel, baik sampel makanan atau sampel minuman. Penggunaan tes kit untuk uji kualitatif telah banyak digunakan, salah satunya untuk pengujian keamanan pangan. Tes kit dalam keamanan pangan biasanya digunakan untuk mendeteksi kandungan boraks, formalin, dan pestisida.

Penggunaan tes kit memiliki kelebihan yaitu mudah digunakan (sederhana), dapat memberikan hasil yang cepat dengan akurasi tinggi, praktis untuk pengujian yang dilakukan di lapangan, dan tidak memerlukan keahlian khusus. Tes kit sudah banyak dijual bebas di pasaran, namun harganya masih relatif mahal. Selain itu, tes kita yang banyak diperjual belikan masih berbentuk reagen kimia. Hal itulah yang menyebabkan biaya mahal apabila dipergunakan untuk uji tes yang dilakukan secara rutin.

Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi mahalnya reagen kimia yaitu dengan menggunakan reagen berbahan alami. Tes kit

berbahan dasar bahan alami memiliki kelebihan yaitu ramah lingkungan dikarenakan limbah yang dihasilkan lebih aman dibandingkan dengan reagen kimia, lebih aman digunakan jika terkena tubuh dibandingkan dengan tes kit berbahan dasar reagen kimia, sumber daya yang digunakan mudah ditemukan dan tersedia dalam jumlah yang cukup banyak, dapat meningkatkan nilai manfaat sumber daya alam yang digunakan, dan meningkatkan nilai jual atau nilai ekonomi dari sumber daya alam tersebut.

2.7 VALIDASI METODE

Validasi merupakan konfirmasi yang dilakukan melalui pengujian dan pengadaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk maksud khusus telah terpenuhi, dimana bukti objektif berupa data pendukung atau kebenaran sesuatu. Persyaratan yaitu harapan yang dinyatakan secara umum untuk dilakukan dan menjadi suatu keharusan. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa validasi metode merupakan proses pembuktian bahwa metode tersebut telah sesuai untuk maksud tertentu (Sa'adah & Winata, 2010). Menurut ISO 17025 Laboratorium pengujian harus melakukan validasi metode uji jika menggunakan metode yang tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan oleh laboratorium, metode baku yang digunakan di luar ruang lingkup yang dimaksudkan, metode baku yang dimodifikasi, serta metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode tersebut telah sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan. Validasi harus seluas yang diperlukan untuk memenuhi kebutuhan penerapan yang ditetapkan atau bidang penerapan. Laboratorium harus mencatat setiap hasil yang diperoleh, prosedur yang digunakan untuk proses validasi, dan pernyataan bahwa metode tersebut sesuai untuk penggunaan yang dimaksud.

Parameter utama yang harus divalidasi dari suatu metode uji meliputi kecermatan (*accuracy*), kesaksamaan (*precision*), selektivitas (spesifisitas), linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (*ruggedness*), serta kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2004).

Kecermatan (*accuracy*) didefinisikan sebagai ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil pengujian metode dengan nilai yang sebenarnya atau nilai yang dinyatakan benar, kecermatan dinyatakan sebagai

persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kesaksamaan (*precision*) menunjukkan tingkat kesesuaian antara hasil analisis individual jika prosedur dilakukan berulang kali terhadap beberapa sampel ganda atau beberapa sampel yang homogen. Selektivitas (spesifisitas) suatu metode adalah kemampuan suatu metode untuk mengetahui adanya analit di dalam campuran, tanpa adanya pengaruh dari zat lain seperti impurities, hasil urai, dan komponen matriks. Linearitas suatu metode yaitu kemampuan memberikan hasil uji secara langsung atau setelah diolah, yang proporsional dengan konsentrasi komponen uji dalam rentang tertentu. Batas deteksi merupakan konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi, tetapi tidak perlu untuk ditetapkan secara kuantitatif dalam kondisi percobaan yang telah dinyatakan. Batas deteksi ditentukan dengan menggunakan perhitungan secara statistik melalui persamaan regresi linear dari kurva standar. Perhitungan tersebut berdasarkan pada nilai simpangan baku (SD) respon dan kemiringan (*slope, S*) kurva baku pada level yang mendekati LoD sesuai dengan rumus, $LoD = 3,3 (SD/ S)$ (Rohman, 2022). Batas kuantitasi merupakan konsentrasi terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang diterima dalam kondisi percobaan yang ditetapkan. Ketangguhan metode (*rugged-ness*) yaitu derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normalitas, seperti laboratorium, instrument, analisis, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dan yang lainnya. Kekuatan (*robustness*), untuk memvalidasi kekuatan dari suatu metode perlu dilakukan perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus untuk mengevaluasi respon analit serta efek presisi dan akurasi (Harmita, 2004).

Validasi metode untuk pengujian secara kualitatif dan kuantitatif berbeda. Pada pengujian secara kuantitatif parameter metode validasi yang harus dipenuhi seperti akurasi (kecermatan), presisi (kesaksamaan), selektivitas, linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode, (*rugged-ness*), serta kekuatan (*robustness*). Sedangkan untuk pengujian secara kualitatif menurut USP (*United States Pharmacopeial*) parameter validasi yang harus dipenuhi yaitu selektivitas. Selektivitas metode

ditentukan dengan cara membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung kontaminan, produk degradasi, senyawa sejenis, zat asing lainnya, atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan zat tersebut.

2.8 SPEKTROFOTOMETER UV-VIS

Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu objek kaca atau kuasa yang disebut dengan kuvet. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Besarnya nilai absorbansi dari cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet (Saputra, 2019).

Spektrofotometer UV-Vis merupakan pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200-400 nm) dan sinar tampak (400-800 nm) oleh suatu senyawa. Serapan cahaya UV atau Vis mengakibatkan proses transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih rendah.

Interaksi antara senyawa organik dengan sinar ultraviolet dan sinar tampak, dapat digunakan untuk menentukan struktur molekul senyawa organik. Bagian molekul yang paling cepat bereaksi dengan sinar tersebut adalah elektron-elektron ikatan dan elektron-elektron non ikatan (elektron bebas). Sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan energi, yang apabila mengenai elektron-elektron tersebut maka elektron akan tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat yang lebih tinggi, eksitasi elektron-elektron ini direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang dan absorbansi, sesuai dengan jenis elektron-elektron yang terdapat dalam molekul yang dianalisis. Semakin mudah elektron-elektron bereksitasi maka semakin besar panjang gelombang yang diabsorpsi, semakin banyak elektron yang bereksitasi maka semakin tinggi absorben yang dihasilkan. Pada spektrofotometri UV-Vis ada beberapa istilah yang digunakan terkait dengan molekul, yaitu kromofor dan ausokrom. Kromofor adalah molekul atau bagian molekul yang mengabsorpsi sinar dengan kuat di daerah UV-Vis, misalnya heksana, aseton, asetilen, benzene, karbonil, karbondioksida, karbon

monoksida, dan gas nitrogen. Ausokrom adalah gugus fungsi yang mengandung pasangan elektron bebas berikatan kovalen tunggal, yang terikat pada kromofor yang mengintensifkan absorpsi sinar UV-Vis pada kromofor tersebut, misalnya gugus hidroksi, amina, halida, dan alkoksi (Suhartati, 2017).

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya akan diserap (I), sebagian dipantulkan (Ir), dan sebagian lagi dipancarkan (It). Aplikasi rumus tersebut dalam pengukuran kuantitatif dilaksanakan secara komparatif menggunakan kurva kalibrasi dari hubungan konsentrasi deret larutan untuk analisis suatu unsur yang berkadar rendah baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Penentuan secara kualitatif berdasarkan puncak-puncak yang dihasilkan spektrum dari suatu unsur tertentu pada panjang gelombang tertentu. Sedangkan penentuan secara kuantitatif berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan dari spektrum dengan adanya senyawa pengompleks sesuai dengan unsur yang dianalisisnya. Adapun yang melandasi pengukuran spektrofotometer ini dalam penggunaannya adalah hukum Lambert-Beer, yaitu bila suatu senyawa monokromatis dilewatkan melalui suatu media yang transparan, maka intensitas cahaya yang ditransmisikan sebanding dengan tebal dan kepekaan media larutan yang digunakan, berdasarkan persamaan berikut (Yanlinastuti & Fatimah, 2016):

$$A = \log I/I_0 \text{ atau } A = a.b.c (I)$$

Dimana:

A = absorbansi

a = koefisien serapan molar

b = tebal media cuplikan yang dilewati sinar

c = konsentrasi unsur dalam larutan cuplikan

I_0 = intensitas sinar mula-mula

I = intensitas sinar yang diteruskan

$$Y = bx - a$$

Dimana:

Y = absorbansi

a = intersep

x = konsentrasi

b = kemiringan atau slope

Sumber cahaya yang datang dari spektrofotometer UV-Vis merupakan sinar polikromatik yang dilewatkan melalui monokromator sehingga menjadi sinar monokromatis yang kemudian diteruskan melalui sel berisi sampel. Sebagian sinar akan diserap oleh sel dan sebagian lagi akan diteruskan ke fotosel yang berfungsi untuk mengubah energi cahaya menjadi energi listrik. Energi listrik akan memberikan sinyal pada detektor yang kemudian akan diubah menjadi nilai serapan (absorbansi) dari zat yang dianalisis (Miarti & Legasari, 2022).