

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Zat Pewarna

Zat pewarna makanan adalah zat yang sering digunakan untuk memberikan efek warna pada makanan sehingga makanan terlihat lebih menarik sehingga menimbulkan selera orang untuk mencicipinya. Menurut Winarno (2005), yang dimaksud dengan zat pewarna adalah bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki warna makanan yang berubah atau menjadi pucat selama proses pengolahan atau untuk memberi warna pada makanan yang tidak berwarna agar kelihatan lebih menarik. Menurut PERMENKES RI No.722/Menkes/Per/IX/1988, zat pewarna adalah bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki atau member warna pada makanan. Warna pada makanan merupakan indikator kesegaran atau kematangan. Zat pewarna makanan dapat diperoleh dari bahan alam atau dari bahan buatan.

2. Rhodamin B

Rhodamin B merupakan zat warna golongan *Xhantenes dyes*. Rhodamin B adalah bahan kimia yang digunakan sebagai pewarna merah pada industri tekstil dan plastik. Rhodamin B adalah zat warna sintesis berbentuk Kristal warna ungu kemerahan, tidak berbau dan dalam larutan berwarna merah terang berfluoresens. Rhodamin B mempunyai titik lebur 165oC larut dalam air, alkohol, eter, benzene, sedikit larut dalam asam klorida dan natrium hidroksida, tidak larut dalam pelarut organik. Rumus molekul dari rhodamin B adalah C₂₈H₃₁N₂O₃C₁, dengan bobot molekul 479.06 Dalton. Rhodamin B digunakan sebagai zat warna untuk kertas, tekstil, wool, sutra, dan sebagai reagensia untuk analisis antimony, kobalt, bismuth, dan lain-lain. (Anonim, 2008)

3. Verifikasi Metode

Verifikasi metode analisis adalah sebuah konfirmasi ulang untuk memastikan bahwa metode atau prosedur analisis yang digunakan telah memenuhi persyaratan dan membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dan menghasilkan data yang valid. Selain itu, hasil dari verifikasi metode analisis juga dapat digunakan untuk menilai kualitas, reliabilitas dan konsistensi hasil analisis (Riyanto, 2019).

Verifikasi dilakukan ketika metode analisis yang digunakan berasal dari metode baku seperti metode yang berasal dari Farmakope Indonesia (FI), British Pharmacopeia (BP), United States Pharmacopeia (USP) dan kompendial lain dengan catatan metode tersebut tidak mengalami perubahan atau modifikasi (Riyanto, 2019). Sedangkan jika metode yang akan diterapkan adalah metode yang telah mengalami perubahan atau metode yang baru dikembangkan, maka yang perlu dilakukan adalah validasi metode analisis (Ravisankar *et al*, 2015).

Pada dasarnya tahapan kerja yang dilakukan pada verifikasi dan validasi sama, hanya saja parameter yang wajib dilakukan tidak selengkap ketika melakukan validasi (Riyanto, 2019). Pada verifikasi metode analisis parameter minimal yang wajib diuji adalah presisi dan akurasi. Kemudian parameter lain yang dapat diuji pada verifikasi metode analisis adalah linearitas, *Limit Of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ), spesifisitas dan *robustness* (ICH, 2007).

a. Linearitas

Pengujian linearitas adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan metode analisis dalam memberikan respon proporsional atau linier terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Alegre *et al*, 2012). Pengujian linearitas dilakukan dengan menggunakan minimal lima konsentrasi larutan standar. Hasil respon dari masing-masing konsentrasi kemudian diplotkan dalam kurva kalibrasi dengan sumbu X merupakan konsentrasi standar dan

sumbu Y merupakan respon dari instrument pengujian. Setelah terbentuk kurva, maka dilakukan penentuan nilai koefisien korelasi (r). Nilai koefisien korelasi yang mendekati satu dianggap menjadi bukti bahwa metode memiliki nilai linearitas yang baik (Beg *et al*, 2012)

b. Akurasi

Pengujian akurasi adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui apakah metode analisis yang digunakan mampu menghasilkan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang baik. Nilai perolehan kembali yang didapatkan akan menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Ravisankar *et al*, 2015; ICH, 2005). Karena itu, akurasi merupakan parameter paling penting yang harus dipenuhi oleh suatu metode analisis (Araujo, 2009).

Terdapat tiga metode yang dapat dilakukan dalam penentuan akurasi, diantaranya adalah dengan metode perbandingan, metode simulasi, dan metode penambahan baku (Ravisankar *et al*, 2015). Metode perbandingan dilakukan dengan mengukur kadar analit dalam sampel dan kemudian membandingkan hasil perolehannya dengan standar pembanding yang telah diketahui kadarnya secara pasti. Pembanding yang digunakan haruslah memiliki karakteristik yang sama dengan sampel (Araujo, 2009).

Metode simulasi disebut juga dengan metode *spiked placebo recovery*. Metode ini dilakukan dengan mengukur kadar analit dalam larutan placebo yang sebelumnya telah ditambahkan larutan standar dengan konsentrasi tertentu, kemudian hasil analisis tersebut dibandingkan dengan konsentrasi standar sebenarnya (Umapathi *et al*, 2012).

Metode yang terakhir adalah metode penambahan baku atau *standard addition method*. Metode ini dilakukan dengan menambahkan sejumlah larutan standar ke dalam sampel, lalu selisih dari konsentrasi sampel sesudah dan sebelum ditambahkan larutan standar dibandingkan dengan kadar sebenarnya. Metode ini seringkali dipilih terutama ketika placebo dari sampel tidak diketahui (Araujo, 2009).

c. Presisi

Presisi suatu metode analisis, menunjukkan kedekatan hasil serangkaian pengukuran yang diperoleh dari pengujian berulang pada kondisi tertentu (ICH, 2005). Presisi dinyatakan dalam nilai simpangan baku relatif (SBR) dengan syarat penerimaannya adalah $SBR < 2\%$ (ICH, 2005). Pengujian presisi metode analisis dapat dibagi menjadi tiga kategori, yaitu keterulangan (*repeatability*), ketertiruan (*reproducibility*) dan presisi antara (*intermediate precision*) (ICH, 2005).

Keterulangan menunjukkan nilai presisi suatu metode jika pengujian dilakukan berulang oleh satu analis pada kondisi yang sama dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dapat juga disebut sebagai presisi intra-assay. Nilai keterulangan dapat memperhitungkan pengaruh dari penimbangan, pencampuran dan bentuk penanganan sampel lain terhadap hasil analisis (Betz *et al*, 2011). Pengujian keterulangan dapat dilakukan dengan menggunakan minimal tiga konsentrasi sampel yang masing-masing diukur sebanyak tiga kali, atau dengan menggunakan satu konsentrasi (pada konsentrasi 100%) dengan enam kali replikasi (ICH, 2005). Presisi antara menunjukkan nilai presisi dari metode analisis ketika dilakukan pada kondisi atau lingkungan yang berbeda (Kondratova, 2017). Pengujian dilakukan dengan minimal terdapat dua perbedaan baik dengan menggunakan analisis yang berbeda, peralatan berbeda ataupun pada hari yang berbeda (Betz *et al*, 2011). Ketertiruan merupakan nilai presisi yang didapatkan dengan membandingkan hasil analisis yang didapatkan dari antar laboratorium yang berbeda (ICH, 2005).

4. Metode Identifikasi Rhodamin B

a. Tes Warna (*Colour Test*)

Tes warna digunakan oleh ahli toksikologi dan analisis obat-obatan sebagai salah satu cara pertama untuk identifikasi obat-obatan dan racun. Tes warna ini paling banyak digunakan untuk obat-obatan dan residu, serta cairan biologis seperti isi perut, dan urin. Tes ini digunakan untuk menempatkan senyawa yang tidak diketahui ke dalam kelas senyawa tertentu. Tes warna ini tetap populer

karena berbagai alasan, mudah dilakukan, penggunaan reagen minimal, murah dan memberi hasil yang bisa dilihat dengan mata telanjang (tidak memerlukan alat khusus). Pereaksi diaplikasikan dengan cara menyemprot atau menyelupkan (Rahayu dan Solihat, 2018).

b. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) atau *thin layer chromatography* (TLC) adalah teknik yang banyak digunakan untuk pemisahan dan identifikasi obat. Hal ini berlaku juga untuk obat-obatan dalam keadaan murni, yang diekstraksi dari formulasi farmasi, bahan-bahan yang diproduksi secara tidak resmi, dan sampel biologis. Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu contoh kromatografi planar disamping kromatografi kertas. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya dikemas dalam kolom, maka pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya adalah berupa lapisan seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik (Rahayu dan Solihat, 2018)

Fase gerak atau pelarut pengembang akan bergerak naik sepanjang fase diam karena adanya gaya kapilaritas pada sistem pengembangan menaik (*ascending*). Pemilihan fase gerak baik untuk TLC maupun HPTLC didasarkan pada keterpisahan senyawa-senyawa dalam analit yang didasarkan pada nilai R_f atau hR_f ($100R_f$). Pemisahan senyawa terjadi berdasarkan kompetisi pengikatan solut dan solven pada fase diam. Nilai R_f diperoleh dari membagi jarak pusat kromatogram dari titik awal dengan jarak pergerakan pelarut dari titik awal (Rahayu dan Solihat, 2018)

c. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau lazim disebut HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sangat sesuai untuk analisis senyawa hidrofilik, termolabil dan atau bobot molekul (massa relative=MR) tinggi. Dalam analisis obat-obatan dan racun lainnya, HPLC memiliki kelebihan praktis fleksibilitas, umumnya biaya operasional rendah, kisaran detektor

selektif, yang biasanya dapat dihubungkan secara seri, dan kemudahan otomasi. Sifat ini sering dapat dimanfaatkan untuk memudahkan analisis beberapa senyawa (misalnya obat dan metabolit) sekaligus. penggunaan utama HPLC meliputi studi farmakokinetik dan metabolik, pengukuran konsentrasi obat-obatan dalam serum yang diberikan dalam terapi (*therapy drugs monitoring*=TDM), dan pemantauan paparan bahan toksik (Rahayu dan Solihat, 2018)

d. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah salah satu dari sekian banyak instrumen yang biasa digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Spektrofotometer umum digunakan karena kemampuannya dalam menganalisa begitu banyak senyawa kimia serta kepraktisannya dalam hal preparasi sampel apabila dibandingkan dengan beberapa metode analisa.

Sebagai salah satu contoh, metode spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menganalisis pemeriksaan Rhodamin B karena senyawa Rhodamin B memiliki gugus kromofor yaitu gugus dalam senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak seperti gugus karboksil, senyawa aromatik dan juga memiliki gugus auxokrom yaitu gugus yang memiliki pasangan elektron bebas seperti NR₂.

Metode Spektrofotometri mempunyai prinsip yaitu hukum lambert beer. Hukum lambert beer menyatakan konsentrasi suatu zat berbanding lurus dengan jumlah cahaya yang di adsorbs, atau pengukuran spektrofotometri dapat dihitung konsentrasi sampel yang dianalisis.

Kelebihan dari instrumen Spektrofotometer UV-Vis yaitu dapat digunakan untuk menganalisis banyak zat organik dan anorganik, selektif, mempunyai ketelitian yang tinggi dengan kesalahan relatif sebesar 1%-3%, analisis dapat dilakukan dengan cepat dan tepat, serta dapat digunakan untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil (Elliawati, 2015). Selain itu, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh

detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan (Yahya, 2013)

5. Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittansi atau adsorpsi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer merupakan gabungan dari alat optik dan elektrik serta sifat-sifat kimia fisiknya. Spektrofotometer sesuai dengan namanya merupakan alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diadsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi cahaya secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Suatu spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum sinar tampak yang sinambung dan monokromatis. Sel pengabsorpsi untuk mengukur perbedaan adsorpsi antara cuplikan dengan blanko ataupun pembandingan (Anonim, 2015)

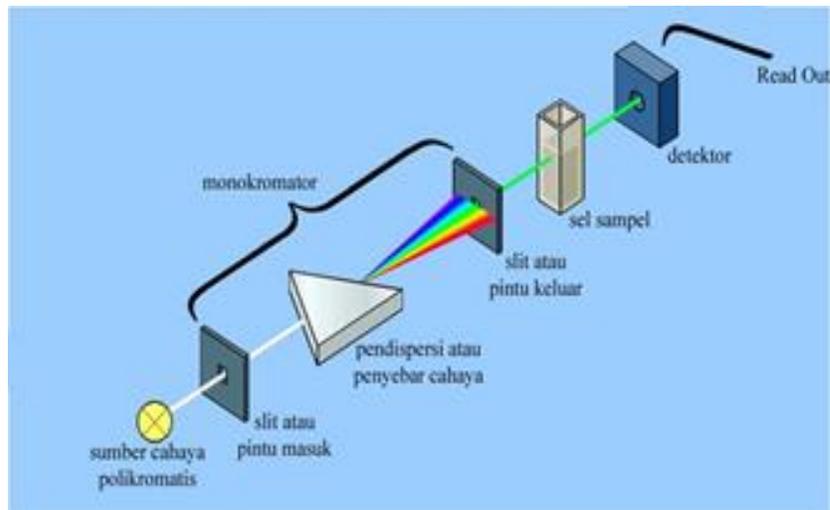
Spektrofotometer UV-Vis merupakan spektrofotometer yang digunakan untuk pengukuran di daerah ultra violet dan di daerah tampak. Semua metode spektrofotometri berdasarkan pada serapan sinar oleh senyawa yang ditentukan, sinar yang digunakan adalah sinar yang semonokromatis mungkin. Spektrofotometer UV-Vis adalah salah satu dari sekian banyak instrumen yang biasa digunakan dalam menganalisa suatu senyawa kimia. Spektrofotometer umum digunakan karena kemampuannya dalam menganalisa begitu banyak senyawa kimia serta kepraktisannya dalam hal preparasi sampel apabila dibandingkan dengan beberapa metode analisa. Spektrofotometer UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar saat analisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibanding kualitatif. Spektrofotometer UV-Vis adalah pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200-300 nm) dan sinar tampak (350-800 nm) oleh suatu senyawa. Serapan cahaya uv atau cahaya tampak mengakibatkan transisi

elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Dimana detektor dapat mengukur intensitas cahaya yang dipancarkan secara tidak langsung cahaya yang diadsorpsi. Tiap media akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu tergantung pada senyawa atau warna yang terbentuk (Anonim, 2015)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan gabungan antara spektrofotometri Uv dan Visible. Alat ini menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda, yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya Visible. Larutan yang dianalisis diukur serapan sinar ultra violet atau sinar tampaknya. Konsentrasi larutan yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan tersebut (Anonim, 2015)

a) Tipe-tipe Spektrofotometri UV-Vis

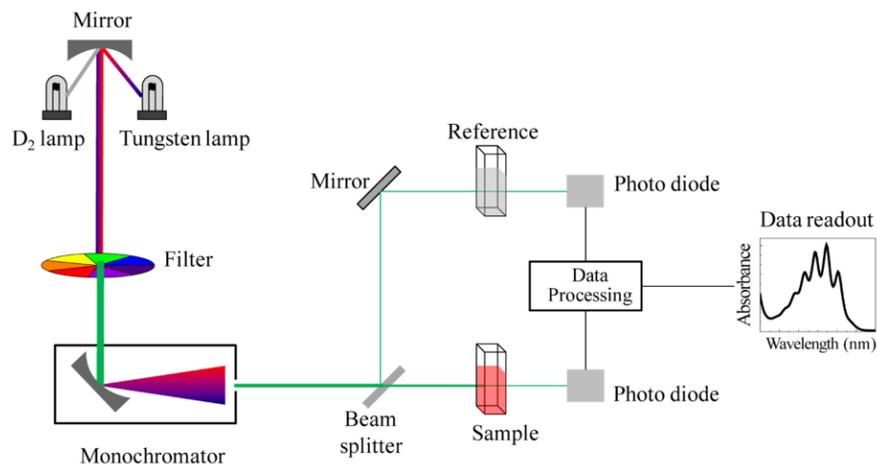
Pada umumnya terdapat dua tipe instrument spektrofotometer, yaitu single-beam dan double-beam. Single-beam instrument dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur adsorbansi pada panjang gelombang tunggal. Single-beam instrument mempunyai beberapa keuntungan yaitu sederhana, harganya murah dan mengurangi biaya yang ada merupakan keuntungan yang nyata. Beberapa instrument menghasilkan single-beam instrument untuk pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang paling rendah adalah 190 sampai 210 nm dan paling tinggi adalah 800 sampai 1000 nm (Suhartati, 2017)



Sumber: (Suhartati, 2017)

Gambar 2.1 Diagram alat spektrofotometer UV-Vis (single beam)

Double beam dibuat untuk digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm. Double beam instrument mempunyai dua sinar yang dibentuk oleh potongan cermin yang berbentuk V yang disebut pemecah sinar. Sinar pertama melewati larutan blanko dan sinar kedua serentak melewati sampel (Suhartati, 2017)



Sumber: (Suhartati, 2017)

Gambar 2.2 Diagram alat spektrofotometer UV-Vis (double beam)

Sumber sinar polikromatis, untuk sinar UV adalah lampu deuterium, sedangkan sinar Visibel atau sinar tampak adalah lampu wolfram. Monokromator pada spektrometer UV-Vis digunakan lensa prisma dan

filter optic. Sel sampel berupa kuvet yang terbuat dari kuarsa atau gelas dengan lebar yang bervariasi. Detektor berupa detektor panas atau detektor diode foto, berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik (Suhartati, 2017)

b) Syarat Pengukuran

Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas atau uap. Pada umumnya sampel harus diubah menjadi suatu larutan yang jernih untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan beberapa persyaratan pelarut yang dipakai antara lain:

- 1) Harus melarutkan sampel dengan sempurna
- 2) Pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengadsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel)
- 3) Tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis
- 4) Kemurniannya harus tinggi

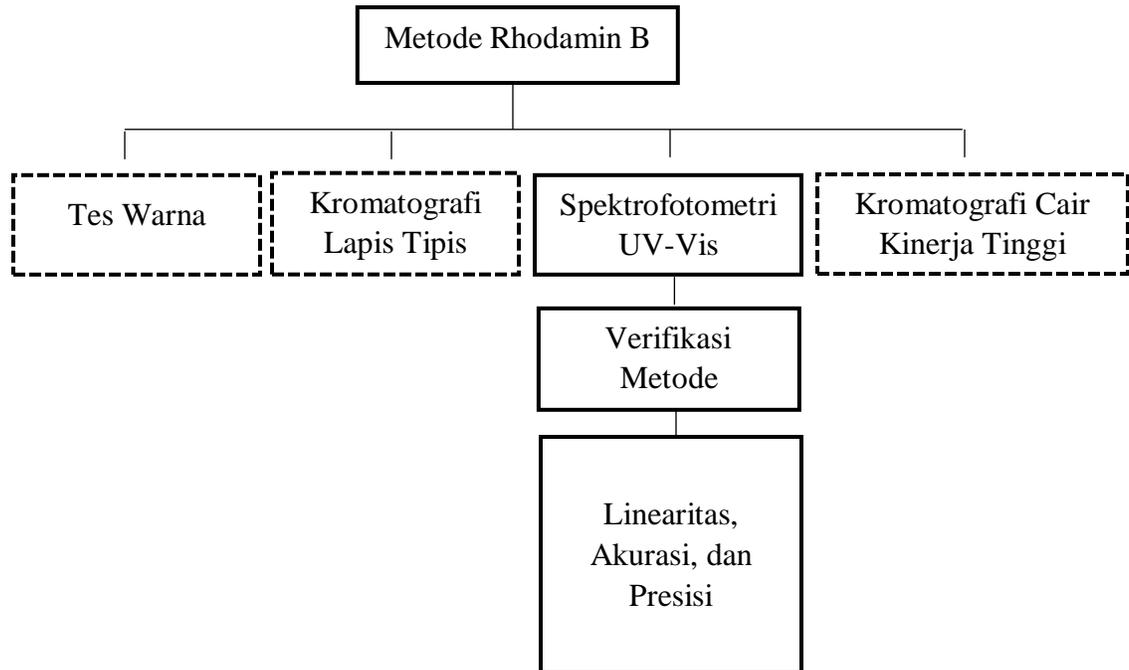
6. Lipstik

Kaum wanita di era modern ini lebih mengutamakan penampilan, salah satu pendukungnya adalah penggunaan kosmetik. Kosmetik sendiri memang tidak akan pernah dapat dihilangkan dalam budaya dan kebudayaan manusia, terutama dikalangan wanita. Keberadaan alat untuk memoles wajah dan mempercantik wajah ini diyakini oleh banyak pihak sebagai kebutuhan utama kaum wanita yang akan selalu ada (Suryawan, 2006). Kosmetik yang kini digemari wanita adalah lipstik. Produsen kosmetik bersaing memberikan berbagai motivasi mulai dari warna konsistensi hingga ketahanan lipstik saat digunakan. Lipstik adalah sediaan kosmetik yang digunakan untuk mewarnai bibir sehingga dapat meningkatkan estetika dalam tata rias wajah dan memberikan ekspresi wajah yang menarik. Lipstik termasuk produk kosmetik wajah yang sudah menjadi identitas bagi wanita pada zaman modern ini, tanpa

polesan pewarna bibir ini banyak diantara wanita merasa kurang tampil percaya diri di depan umum. (Mulyawan dan Suriana, 2013).

Lipstik sendiri selain berfungsi untuk memberi warna pada bibir. Lipstik juga bisa digunakan untuk kegunaan lain sebagai pengganti *blush on*, *eye shadow*, hingga pengganti produk *contouring* wajah (Rahmi, 2017). Pewarna bibir merupakan sediaan kosmetika yang digunakan untuk mewarnai bibir dengan sentuhan artistik sehingga dapat meningkatkan estetika dalam tata rias wajah. Pewarna bibir terdapat dalam berbagai bentuk, seperti cairan, krayon dan krim. Pewarna bibir dalam bentuk cairan dan krim pada umumnya memberikan selaput yang tidak tahan lama dan mudah terhapus dari bibir sehingga tidak begitu digemari orang, terutama jika dibandingkan dengan pewarna bibir dalam bentuk krayon. Pewarna bibir dalam bentuk krayon lebih dikenal dengan nama lipstik (Sampebarra, 2016)

B. Kerangka Teori



Keterangan :



: Dilakukan Penelitian



: Tidak Dilakukan Penelitian

C. Kerangka Konsep

