

**ISOLASI AGAROSA DARI AGAR DAN
APLIKASINYA SEBAGAI ADSORBEN ZAT WARNA
PADA ANALISIS TARTRAZIN DENGAN METODA
TLC SCANNER**



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS**

PADANG

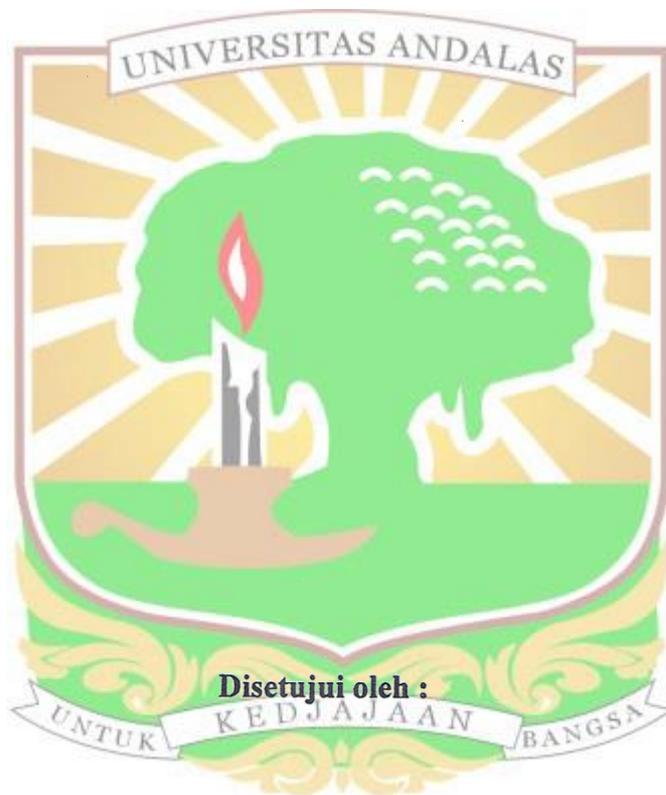
2017

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian

Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi

Universitas Andalas

Padang



Pembimbing I

Pembimbing II

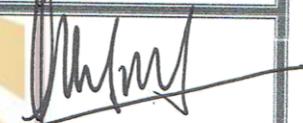
Prof. Dr. Adek Zamrud Adnan, MS, Apt.

Prof. Dr. Marlina, MS, Apt.

Skripsi Ini Telah Dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Farmasi

Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang

Pada Tanggal : 13 Januari 2017

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Prof. Dr. Adek Zamrud Adnan, MS, Apt	Ketua	
2	Prof. Dr. Hj. Marlina, MS, Apt	Anggota	
3	Dr. Yufri Aldi, M.Si, Apt	Anggota	
4	Dr. Elidahanum Husni, M.Si, Apt	Anggota	
5	Lili Fitriani, S.Si, M.Pharm.Sc, Apt	Anggota	





KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Alhamdulillah, puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan ilmu, hidayah, serta rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini yang berjudul **“ISOLASI AGAROSA DARI AGAR DAN APLIKASINYA SEBAGAI ADSORBEN ZAT WARNA PADA ANALISIS TARTRAZIN DENGAN METODA TLC SCANNER “**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi tugas akhir dan merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan Strata Satu pada Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.

Untuk itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua, Ayahanda Akmal dan Ibunda Rini Surlanti serta kedua saudara (Olga Elenska Adrin dan Erens Zeta Anugerah Adrin) atas perhatian, semangat, dan doanya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Adek Zamrud Adnan, MS, Apt. selaku pembimbing I dan Ibu Prof. Dr. Marlina, MS, Apt. selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan pikiran untuk memberikan petunjuk, nasehat, pengarahan, dan bimbingan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Bapak / Ibu dosen staf pengajar Fakultas Farmasi yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang berharga dan bermanfaat kepada penulis selama

mengikuti perkuliahan di Universitas Andalas. Serta Bapak/Ibu karyawan Fakultas Farmasi yang telah membantu kelancaran studi penulis.

4. Teman-teman geng (Rayi Laras Alit, Farendina Suarantika, Amyra Wisman) yang telah menemani selama hari-hari perkuliahan dan diluar perkuliahan. Ayit teman satu penelitian, yang hampir 24 jam selalu bersama menemani selama penelitian dan diluar penelitian. Faren yang selalu membantu menambahkan banyak hal selama perkuliahan dan penelitian.
5. Muhammad Arief Wira Bhakti Azmar, S.H yang telah banyak memberi motivasi untuk cepat menyelesaikan skripsi ini.
6. Teman-teman angkatan 2012 (PLATINUM) dan rekan-rekan mahasiswa Farmasi yang telah menemani hari-hari perkuliahan, membantu dan mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritikan dan saran yang membangun sangat diharapkan. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan serta kepentingan masyarakat.

Padang, 13 Januari 2017

Penulis

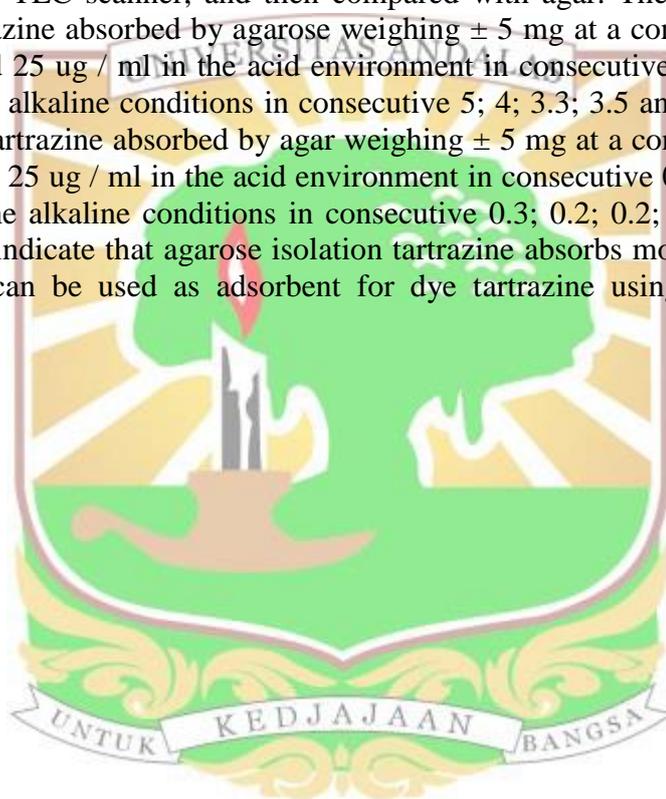
ABSTRAK

Agarosa diisolasi dari agar *Gracilaria gigas*. Agarosa hasil isolasi diperoleh dari agar dengan melarutkan agar dalam etilen glikol dengan konsentrasi 1% b/v larutan agar dengan pengadukan pada suhu 105 °C dan isopropanol ditambahkan untuk mengendapkan agarosa murni dan endapan agarosa murni dipisahkan dan dikeringkan. Kandungan sulfat dan kekuatan gel dari agarosa 1, 2 dan 3 secara berurutan adalah 0,25%, 1545 g/cm²; 0,16%, 1559 g/cm² dan 0,31 %, 1528 g/cm². Pada penelitian ini, agarosa hasil isolasi digunakan sebagai adsorben untuk analisis zat warna tartrazin menggunakan metode TLC Scanner, dan kemudian dibandingkan dengan agar. Hasil penelitian menunjukkan kadar tartrazin yang diserap oleh agarosa dengan berat ± 5 mg pada konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/ml pada suasana asam secara berturut turut 5; 10; 9,1; 9,3; dan 9,6 µg. Pada suasana basa secara berturut turut 5; 4; 3,3; 3,5 dan 2,4 µg. Sedangkan kadar tartrazin yang diserap oleh agar dengan berat ± 5 mg pada konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/ml pada suasana asam secara berturut turut 0,3; 0,5; 0,5; 0,4 dan 1,9 µg, pada suasana basa secara berturut turut 0,3; 0,2; 0,2; 0,2 dan 0,1 µg. Ini menunjukkan bahwa agarosa hasil isolasi menyerap lebih banyak tartrazin dibandingkan agar, sehingga agarosa dapat digunakan sebagai adsorben zat warna tartrazin dengan menggunakan metoda TLC Scanner.



ABSTRACT

Agarose was isolated from *Gracilaria gigas* agar. Isolated agarose was recovered from agar by dissolving the agar in ethylen glikol with concentration 1% w/v agar solution under stirring at 105 °C and isopropanol was added to induce precipitation of purified agarose product and recovering the precipitated agarose product (agarose 1, 2 and 3). The sulfate content and gel strength of agarose 1, 2, and 3 were 0.25%, 1545 g/cm²; 0.16%, 1559 g/cm² and 0.31 %, 1528 g/cm², respectively. In this study, agarose are used as an adsorbent for dye tartrazine analysis using TLC scanner, and then compared with agar. The results showed levels of tartrazine absorbed by agarose weighing ± 5 mg at a concentration of 5, 10, 15, 20 and 25 ug / ml in the acid environment in consecutive 5; 10; 9.1; 9.3; and 9.6 µg. In alkaline conditions in consecutive 5; 4; 3.3; 3.5 and 2.4 µg. While the levels of tartrazine absorbed by agar weighing ± 5 mg at a concentration of 5, 10, 15, 20 and 25 ug / ml in the acid environment in consecutive 0.3; 0.5; 0.5; 0.4 and 1.9 µg, the alkaline conditions in consecutive 0.3; 0.2; 0.2; 0.2 and 0.1 µg. These results indicate that agarose isolation tartrazine absorbs more than agar, so that agarose can be used as adsorbent for dye tartrazine using TLC Scanner method.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
1.1 Agar-agar	4
1.1.1 Sifat fisika dan kimia agar	4
1.2 Agarosa	6
1.2.1 Pengertian agarosa	6
1.2.2 Struktur agarosa	6
1.2.3 Penggunaan agarosa	9
1.2.4 Metoda pemisahan agarosa	9
1.3 Zat pewarna	10
1.3.1 Zat pewarna alami dan sintetik	11
1.4 Tartrazin	16
1.5 Kromatografi lapis tipis	18
1.5.1 Fase diam	19
1.5.2 Fase gerak	20
1.5.3 Pengembangan fase gerak	21

1.5.4 Deteksi	21
1.6 Densitometri	22
1.7 Validasi metode	23
1.7.1 Linearitas	23
1.7.2 Akurasi	24
1.7.3 Presisi	24
1.7.4 Batas deteksi dan kuantitasi	24
III. PELAKSANAAN PENELITIAN	26
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	26
3.2. Alat dan Bahan	26
3.2.1. Alat	26
3.2.2. Bahan	26
3.3 Cara Kerja	27
3.3.1 Isolasi agarosa dari agar	27
3.3.2 Rendemen agarosa	28
3.3.3 Kadar sulfat	28
3.3.4 Pengukuran titik pembentukan gel	28
3.3.5 Pengukuran titik leleh gel	29
3.3.6 Kekuatan gel	29
3.3.7 Penyiapan agarosa sebagai adsorben	30
3.3.8 Penyiapan baku tartrazin	31
3.3.9 Mencari fasa gerak larutan induk tartrazin	31
3.3.10 Pembuatan spectrum visible larutan tartrazin	32
3.3.11 Scanning Larutan tartrazin standar	32
3.3.12 Pengolahan data Konsentrasi dan luas histogram tartrazine	32
3.3.13 Penghitungan LOD dan LOQ	33
3.3.14 Penentuan presisi	33

3.3.15 Perhitungan Kadar Tartrazin Yang Tersisa Setelah Adsorpsi Dengan Menggunakan Agarose dan Agar	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Hasil	34
4.2. Pembahasan	37
V. KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	52



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data hasil penelitian	52
2. Contoh perhitungan data	64
3. Gambar penunjang	68



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan agarosa dari beberapa jenis rumput laut	7
2. Perbedaan Agarosa dengan Agaropektin	8
3. Bahan Pewarna Alami dan Sintetik	13
4. Daftar zat pewarna yang dilarang penggunaannya di Indonesia	14
5. Perbedaan antara zat pewarna sintetik dan alami	15
6. Rendemen agarosa	52
7. Kadar sulfat	52
8. Suhu pembentukan gel dan titik leleh gel	53
9. Kekuatan gel	53
10. Data hasil analisis larutan standar tartrazin dengan metode TLC-Scanner	54
11. Data Perhitungan LOD dan LOQ Dari Larutan Tartrazin Standar dengan Metoda TLC-Scanner	55
12. Data presisi Inter-day tartrazin	56
13. Data presisi Intra-day tartrazin	56
14. Hasil analisis larutan tartrazin dengan metoda TLC Scanner setelah diserap agarose selama 60 menit pada suhu ruangan	57
15. Hasil analisis larutan tartrazin dengan metoda TLC Scanner setelah diserap agar selama 60 menit pada suhu ruangan.	58
16. Hasil penghitungan kadar tartrazin yang diserap dengan metoda TLC Scanner selama 60 menit pada suhu ruangan.	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Agarosa	6
2. Struktur kimia tartrazin	16
3. Spektrum IR agarosa	52
4. Kurva kalibrasi larutan tartrazin dalam pelarut etanol 70% terhadap luas area masing-masing dengan metoda KLT-Densitometri	54
5. Spektrum Visible tartrazin konsentrasi 8 µg/ml dalam pelarut etanol 70% dengan λ max 427 nm dengan serapan 0,301	59
6. Pola KLT optimasi fase gerak dengan metanol : DCM (3:7) + 0,5 ml asam asetat glasial dan fase diam silika gel GF ₂₅₄	60
7. Peak area larutan tartrazin standar dalam ordinat x,y dan z	60
8. Densitogram tartrazin konsentrasi 5 µg/mL	61
9. Densitogram tartrazin konsentrasi 10 µg/mL	61
10. Densitogram tartrazin konsentrasi 15 µg/mL	62
11. Densitogram tartrazin konsentrasi 20 µg/mL	62
12. Densitogram tartrazin konsentrasi 25 µg/mL	63
13. Skema kerja isolasi agarosa	68
14. Skema kerja pengukuran kadar tartrazin	69
15. Agar yang telah larut dalam etilen glikol	70
16. Setelah ditambah isopropil alcohol	70
17. Agarosa hasil isolasi	70
18. Pelet agarosa kering	71
19. Pelet agarosa yang sudah di rendam	71
20. Alat Freeze Drying	72
21. Alat TLC-Scanner	72

I. PENDAHULUAN

Agar merupakan senyawa polisakarida yang dihasilkan dari ekstraksi rumput laut, dengan rantai panjang yang disusun oleh molekul agarosa dan agaropektin. Agarosa merupakan komponen pembentuk gel yang netral dan tidak mengandung sulfat (Furia, 1975), sedangkan agaropektin adalah polisakarida sulfat yang tersusun dari agarosa dengan variasi ester sulfat, D-glukoronat dan sejumlah kecil asam piruvat (Peterson, 1978). Jenis rumput laut yang paling banyak digunakan dalam produksi agar-agar adalah *Gracilaria* sp. Hal ini karena *Gracilaria* sp. mudah diperoleh, murah harganya dan juga lebih mudah dalam pengolahan. *Gracilaria* sp. Memiliki kandungan agarosa dan agaropektin yang cukup baik sehingga dapat menghasilkan agar-agar dengan kekuatan gel yang kuat dan kokoh dibandingkan dengan hasil ekstraksi jenis rumput lain seperti *Gelidium* sp. (Winarno, 1996).

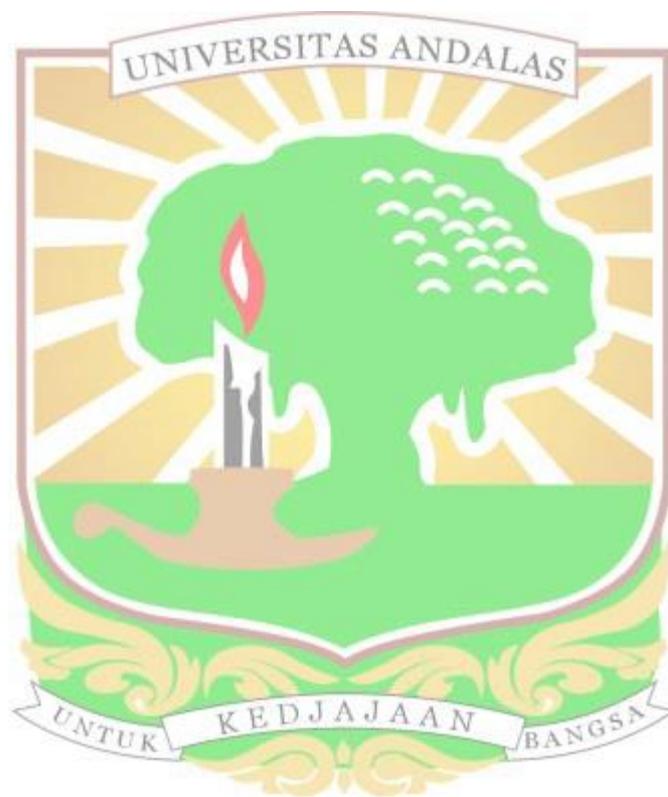
Isolasi agarosa telah dimulai oleh peneliti sebelumnya (Asra. R, 2014). Dengan menggunakan teknik isolasi yang sama, produk agarosa yang dihasilkan digunakan untuk aplikasi yang berbeda. Di Indonesia penelitian tentang pembuatan agarosa masih terbatas dan belum diperoleh metode yang cocok untuk menghasilkan agarosa yang memenuhi persyaratan standar mutu. Selama ini produk agarosa tersebut masih diimpor dengan harga yang relatif mahal. Oleh karena itu merupakan tantangan bagi Indonesia untuk dapat menghasilkan teknologi pengembangan produk jadi dari rumput laut yang memberikan nilai tambah lebih baik. Dalam literatur agarosa telah digunakan sebagai adsorben zat warna methylene blue, oleh karena itu peneliti tertarik untuk menggunakan agarose pada zat warna lain yaitu tartrazine.

Di dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 722/Menkes/Per/IX/ 1988 disebutkan jenis bahan tambahan yang diijinkan dan yang tidak boleh digunakan pada makanan, batas penggunaan bahan tambahan pada masing- masing makanan, ketentuan penandaan bahan tambahan makanan, serta produksi dan impor bahan tambahan makanan. Bahan tambahan makanan boleh dipergunakan bila memenuhi syarat-syarat tentang keamanannya (telah diuji dan dievaluasi), pada kadar yang diperlukan dan tidak membahayakan kesehatan, selalu diadakan evaluasi ulang, memenuhi persyaratan mutu dan kemurnian, penggunaannya dibatasi untuk makanan tertentu dan kadarnya serendah mungkin. Salah satu bahan tambahan pangan yang diatur dalam Permenkes No. 033 Tahun 2012 yaitu tentang penggunaan zat pewarna pada makanan, seperti penggunaan tartrazin. Batas penggunaan tartrazin yang telah ditetapkan dalam Permenkes RI No. 722/Menkes/Per/IX/ 88 pada makanan dan minuman adalah 70 mg/kg (tunggal atau campuran dengan pewarna lain).

Tartrazine merupakan salah satu zat aditif yang paling dikenal dan yang paling umum digunakan. Digunakan di banyak obat-obatan serta dalam makanan. Ini adalah pewarna azo kuning sintetis yang ditambahkan terutama untuk minuman berwarna berkarbonasi, squash, sup, es krim, permen, permen karet, selai, jeli dan pada banyak makanan ringan lainnya. Tartrazin dapat digunakan dengan brilliant blue untuk menghasilkan berbagai warna hijau. Selain itu, tartrazine juga dapat ditemukan dalam cangkang kapsul obat.

Penelitian menunjukkan bahwa tartrazin berhubungan dengan berbagai penyakit antara lain asma, hiperaktif pada anak, migrain. Di Norwegia dan Austria tartrazin sudah tidak digunakan lagi (Li dkk, 2008). Mengingat adanya bahaya

menggunakan tartrazin yang melebihi kadar yang ditetapkan, maka dipandang perlu untuk melakukan analisis kadar tartrazin dalam produk pangan yang beredar. Metoda analisa yang biasa digunakan adalah menggunakan bulu domba sebagai adsorben, akan tetapi peneliti tertarik untuk menggunakan agarosa sebagai alternative lain sebagai adsorben analisis zat warna tartrazin dan untuk pengukuran kadar tartrazin menggunakan metoda TLC-Scanner.



I. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Agar-agar

Agar-agar adalah produk ekstraksi rumput laut merah (agarophyte) (Winarno, 1990). *Agarophyte* yang paling penting adalah jenis *Gelidium* sp., *Gracilaria* sp., *Pterocladia* sp., *Acanthopeltis japonica* dan *Ahnfeltia plicata* (Chapman dan Chapman, 1980). Agar merupakan kompleks polisakarida linear yang mempunyai berat molekul 120.000 dalton, tersusun dari beberapa jenis polisakarida, antara lain: 3,6-anhidro-L-galaktosa, D-galaktopiranosida dan sejumlah kecil metil D-galaktosa (Glicksman 1983). Agar mengandung agarose yang merupakan polisakarida netral (tidak bermuatan) dan agaropektin yang merupakan polisakarida bermuatan sulfat (Araki 1966 dalam Istini S dkk. 2001). Agar-agar sebenarnya adalah karbohidrat dengan berat molekul tinggi yang mengisi dinding sel rumput laut. Ia tergolong kelompok pektin dan merupakan suatu polimer yang tersusun dari monomer galaktosa (Deptan 1991).

2. 1. 1. Sifat Fisika dan Kimia Agar-agar

Agar-agar merupakan senyawa ester asam sulfat dari senyawa galaktan, yang tidak larut dalam air dingin tetapi larut dalam air panas dan membentuk gel (Sri Istini dkk. 1985 dalam Deptan 1991), dengan kemurnian tinggi agar-agar larut dalam air panas, etanol amida dan formida (Winarno, 1990). Agar-agar pada suhu 32-39⁰C berbentuk bekuan (solid) dan tidak mencair pada suhu di bawah 85⁰C (Soegiarto dkk. 1978 dalam Deptan 1991).

Agar-agar merupakan *agen* pembentuk gel terefektif yang pernah diketahui. Gel agar-agar dapat terbentuk dalam larutan yang sangat encer, yaitu fraksi agar-agar sebesar 1%. Gel agar-agar bersifat reversibel terhadap suhu, yaitu pada suhu di atas titik leleh maka fase gel akan berubah menjadi fase sol dan sebaliknya, tetapi fase transisi dari gel ke sol atau sebaliknya tidak berada pada suhu yang sama (Glicksman, 1983). Gel terbentuk karena pada saat dipanaskan di air, molekul agar-agar dan air bergerak bebas. Ketika didinginkan, molekul-molekul agar-agar mulai saling merapat, memadat dan membentuk kisi-kisi yang mengurung molekul-molekul air, sehingga terbentuk sistem koloid padat-cair (Winarno, 1996).

Karakteristik gel agar-agar bersifat rigid, rapuh, mudah dibentuk dan memiliki titik cair tertentu. Keasaman (pH) sangat mempengaruhi kekuatan gel agar-agar, pH semakin menurun kekuatan gel agar-agar semakin lemah sampai dengan pH 2,5. Kandungan gula menghasilkan gel yang lebih keras tetapi menghasilkan tekstur yang kurang kohesif (Glicksman, 1983).

Mekanisme pembentukan gel agar-agar adalah sebagai berikut, tiga buah atom hidrogen pada residu 3,6-anhidro-L-galaktosa memaksa molekul membentuk struktur heliks. Interaksi antar struktur heliks inilah yang menyebabkan pembentukan gel. Penggantian senyawa L-galaktosa sulfat oleh senyawa 3,6-anhidro-L-galaktosa mengakibatkan kekakuan pada struktur heliks, dari sinilah gel mulai terbentuk. Perlakuan alkali dapat mengkonversi grup sulfat yang ada pada posisi C-6 menjadi 3,6-anhidro-L-galaktosa sehingga dapat memberikan kekuatan gel yang lebih tinggi (Glicksman, 1983).

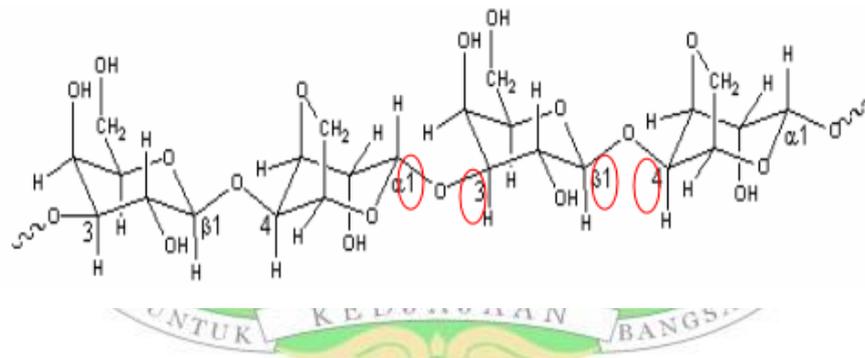
2.2 Agarosa

2.2.1 Pengertian Agarosa

Agarosa menurut Duckworth dan Yaphe (1970) dalam Renn (1986) adalah suatu campuran molekul-molekul agar dengan muatan yang paling rendah, sehingga memiliki kemampuan membentuk gel yang kuat yang difraksionisasi dari seluruh kompleks molekul agar dan dibedakan dengan adanya muatan ion yang menutupinya.

2.2.2 Struktur agarosa

Agarosa adalah polisakarida yang bersifat netral yang mengandung pengulangan bentuk dari ikatan β -1,4-3,6-anhidro-L-galaktosa dan α -1,3-D-galaktosa.



Gambar 1. Struktur Agarosa (Glicksman, 1983)

Agaropektin berbeda dengan agarosa dalam hal unit penyusunnya. Residu D-galaktosa dalam agarosa mungkin digantikan turunan senyawa karboksil dan residu anhidro-L-galaktosanya digantikan oleh grup sulfat-OSO₃- (Glicksman, 1983). Agarosa dalam air dan dipanaskan di atas suhu 90 °C umumnya terlarut dan ketika suhu diturunkan menjadi 35-40 °C akan berbentuk semi-padat.

Spesies yang berbeda akan menghasilkan perbandingan agarosa dan agaropektin berbeda pula. Berikut kandungan agarosa dari beberapa jenis rumput laut (Chapman dan Chapman, 1980).

Tabel 1. Kandungan agarosa dari beberapa jenis rumput laut

Jenis rumput laut	Kandungan agarosa (%)
<i>Gelidium amansii</i>	61
<i>Gelidium subcostatum</i>	89
<i>Gelidium japonicum</i>	69
<i>Pterocladia tenuis</i>	85
<i>Acanthopeltis japonicum</i>	28
<i>Campylaeophora hypnoides</i>	55
<i>Gracilaria verrucosa</i>	61
<i>Geranium bodydenii</i>	82

Perbandingan agarosa terhadap agaropektin pada genus *Gracilaria* sekitar 20:1, jauh lebih besar daripada genus *Gelidium* yang mempunyai perbandingan 5:1. Kandungan agarosa juga ditentukan oleh metode produksi dan kandungan sulfat dari agar-agar yang diekstraksi (Chapman, 1970).

Perbedaan agarosa dan agaropektin dilihat dari sifat fisik, kimia dan kegunaannya:

Tabel 2. Perbedaan Agarosa dengan Agaropektin.

No.	Agarosa	Agaropektin
1	Berat molekul diatas 100.000	Berat molekul dibawah 20.000
2	Kadar sulfat dibawah 0,15%	Kadar sulfat tinggi sekitar 5-8%
3	Memiliki gel strength yang tinggi dan Stabil	Gel strength lebih rendah dari agarosa
4	Tidak bermuatan (galaktan linear netral), komponen utama penyusun agar	Kurang stabil, bermuatan

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, maka pemanfaatan bahan alam, bahan kimia ataupun produk lainnya berkembang pula, demikian pula dengan fikokoloid agar. Agar yang semula sangat populer untuk semua penggunaan dengan ditemukannya agarosa sebagai fraksi yang tidak bermuatan dinilai jauh lebih prospektif dibandingkan dengan agar yang masih bermuatan. Karena sifat-sifatnya yang jauh lebih stabil prospek pemanfaatannya jauh lebih luas terutama untuk pemanfaatan di bidang bioteknologi (Renn, 1990). Karena pemanfaatan agarosa yang prospektif dan menyangkut teknologi tinggi tingkat kemurniannya dituntut senantiasa memenuhi persyaratan. Untuk itu para peneliti harus mencari metode isolasi yang efisien dan efektif.

2.2.3 Penggunaan agarosa

Agarosa dapat digunakan untuk berbagai keperluan, antara lain :

- a) Untuk proses elektroforesis : karena kandungan sulfatnya yang sangat rendah.
- b) Untuk imunologi : karena sifat relatif netral dengan kemurnian yang tinggi dan porositasnya besar untuk menyerap molekul antibodi sehingga agarosa merupakan medium yang baik dalam reaksi-reaksi imunologi.
- c) Untuk medium kultur : karena mempunyai kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan dengan agar-agar.
- d) Untuk kromatografi : untuk memisahkan antigen, antibody, enzim, koenzim, atau substrat lain secara fisika dan kimia oleh partikel agarosa.
- e) Untuk mengimobilisasi insulin yang diproduksi oleh kelenjar pancreas untuk kemudian ditransplantasikan (Renn, 1990).

2.2.4 Metode pemisahan agarosa

Metode pemisahan agarosa yang telah dilakukan adalah:

- a. Pemisahan agarosa oleh Guiseley (1990)
Menggunakan ammonium sulfat untuk mengendapkan agaropektin atau pengendapan dengan polyetilenglykol
- b. Metode Blethen (1966)
Menggunakan benzothonium klorida dan K-karrageenan sebagai pengendap. Metode ini banyak digunakan industri di dunia untuk pemisahan agarosa dari agar yang diekstraksi dari *Gracillaria sp.*

c. Metode Santos dan Doty (1983)

Isolasi langsung dari agarofit menggunakan pengendap benzothonium klorida dan K-karrageenan.

d. Metode pemisahan lainnya

- Asetilasi dalam kloroform untuk melepaskan agarosa asetat terlarut dan endapan agaropektin asetat.
- Pengendapan agaropektin dengan garam ammonium quartener.
- Pengendapan bertingkat agaropektin dengan penambahan kombinasi karagenan dan garam ammonium kuartener.
- Pengendapan agarosa dengan polietilenglikol.
- Penglarutan agaropektin dengan pectinase atau kalsium sequestrans.
- Fraksinasi dengan kromatografi lalu agarose dipisahkan.

2.3 Zat Pewarna

Mutu bahan pangan pada umumnya sangat tergantung pada beberapa faktor, cita rasa, tekstur dan nilai gizinya, juga sifat mikrobiologis. Tetapi, sebelum faktor-faktor lain dipertimbangkan, secara visual faktor warna tampil lebih dahulu dan kadang-kadang sangat menentukan.

Selain sebagai faktor yang ikut menentukan mutu, warna juga dapat digunakan sebagai indikator kesegaran atau kematangan. Baik tidaknya cara pencampuran atau pengolahan dapat ditandai dengan adanya warna yang seragam dan merata.

Zat warna yang sudah sejak lama dikenal dan digunakan, misalnya daun suji atau daun pandan untuk warna hijau dan kunyit untuk warna kuning. Kini dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi telah ditemukan zat warna sintetis, karena penggunaannya lebih praktis dan harganya lebih murah. Ada beberapa hal yang dapat menyebabkan suatu bahan pangan berwarna, antara lain dengan penambahan zat pewarna. Secara garis besar, berdasarkan sumbernya dikenal dua jenis zat pewarna yang termasuk dalam golongan bahan tambahan pangan, yaitu pewarna alami dan pewarna sintetis. (Cahyadi, W. 2008)

1.3.1 Zat Pewarna Alami dan Sintetik

Warna merupakan salah satu aspek penting dalam hal penerimaan konsumen terhadap suatu produk pangan. Warna dalam bahan pangan dapat menjadi ukuran terhadap mutu, warna juga dapat digunakan sebagai indikator kesegaran atau kematangan. Apabila suatu produk pangan memiliki nilai gizi yang baik, enak dan tekstur yang sangat baik akan tetapi jika memiliki warna yang tidak sedap dipandang akan memberi kesan bahwa produk pangan tersebut telah menyimpan (Winarno, 1992).

Menurut *International Food Information Council Foundation* (IFIC), pewarna pangan adalah zat yang digunakan untuk memberikan atau meningkatkan warna suatu produk pangan, sehingga menciptakan *image* tertentu dan membuat produk lebih menarik. Definisi yang diberikan oleh Depkes 1999 lebih sederhana, yaitu Bahan Tambahan Pangan (BTP) dapat memperbaiki atau memberi warna pada pangan (Wijaya dan Mulyono, 2009).

Menurut Elbe dkk., (1996), zat pewarna merupakan suatu bahan kimia baik alami maupun sintetis yang memberikan warna. Berdasarkan sumbernya, zat pewarna untuk makanan dapat diklasifikasikan menjadi pewarna alami dan sintetis (Winarno, 1992). Pewarna alami yaitu zat warna yang diperoleh dari hewan seperti : warna merah muda pada flamingo dan ikan salem sedangkan dari tumbuh-tumbuhan seperti: karamel, coklat dan daun suji. Pewarna buatan sering juga disebut dengan zat warna sintetis. Proses pembuatan zat warna sintetis ini biasanya melalui perlakuan pemberian asam sulfat atau asam nitrat yang seringkali terkontaminasi oleh arsen atau logam berat lain yang bersifat racun (Winarno, 1994).

Menurut Winarno (1992), zat pewarna sintetis harus melalui berbagai prosedur pengujian sebelum dapat digunakan sebagai pewarna makanan. Zat pewarna yang diijinkan penggunaannya dalam makanan dikenal dengan *certified color* atau *permitted color*. Untuk penggunaannya, zat warna tersebut harus menjalani tes prosedur penggunaan yang disebut proses sertifikasi.

Di Indonesia undang-undang penggunaan zat pewarna belum memasyarakat sehingga terdapat kecenderungan penyimpangan pemakaian zat pewarna untuk berbagai bahan pangan oleh produsen, misalnya pemakaian zat pewarna tekstil dan kulit dipakai untuk mewarnai makanan. Hal tersebut jelas berbahaya bagi kesehatan, karena residu logam berat pada zat pewarna tersebut bersifat karsinogenik (Winarno, 1994). Timbulnya penyimpangan penggunaan zat pewarna disebabkan karena tidak adanya penjelasan dalam label yang melarang penggunaan senyawa tersebut untuk bahan pangan. Hal tersebut disebabkan biaya zat pewarna untuk makanan jauh lebih mahal dari zat pewarna non-pangan.

Hingga saat ini aturan penggunaan zat pewarna di Indonesia diatur dalam SK Menteri Kesehatan RI No. 722/MenKes/Per/IX/88, tetapi dalam peraturan ini belum tercantum dosis penggunaannya dan juga tidak adanya sanksi bagi pelanggaran terhadap ketentuan tersebut. Jenis bahan pewarna alami dan sintetik dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Bahan Pewarna Alami dan Sintetik

No	Warna	Nama Kimia	No. Indeks
1	Zat warna alami		
	Merah	Alkanat	75520
	Merah	Karmin	75470
	Kuning	<i>Annato</i>	75120
	Kuning	Karoten	75130
	Merah	Safron	75100
	Merah	Kurmunin	75180
	Hijau	Klorofil	75007
	Biru	Ultramarin	75300
	Coklat	Karamel	-
	Hitam	<i>Carbon Black</i>	77499
	Hitam	Besi Oksida	77266
	Putih	Titanium Dioksida	77891
2	Zat Warna Sintetik		
	Merah	<i>Carmoisinse</i>	14720
	Merah	<i>Erythrosine</i>	16185
	<i>Orange</i>	<i>Sunset Yellow</i>	15985
	Kuning	<i>Tatrazine</i>	19140
	Kuning	<i>Quineline Yellow</i>	47005
	Biru	<i>Brilliant blue</i>	42090
	Biru	<i>Indigocarmine</i>	42090
	Hijau	<i>Fast green FCF</i>	42053
	Ungu	<i>Violet GB</i>	42640

Sumber : (Cahyadi, 2008)

Pada tahun 1972 terdapat 18 macam zat pewarna yang termasuk dalam *Food, Drug and Cosmetic* (FD & C). Menurut Permenkes Nomor 235/menkes/Per/IV/1979, ada 12 macam zat pewarna yang diizinkan untuk makanan. Pada tahun 1988 berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik

Indonesia No. 722/MenKes/Per/IX/88 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya yang dilarang penggunaannya di Indonesia (Tabel 4) (Cahyadi, 2008).

Tabel 4. Daftar zat pewarna yang dilarang penggunaannya di Indonesia.

No	Warna	Nama Kimia	No. Indeks
1	Orange	Auramine	41000
2	Orange	Butter Yellow	11020
3	Orange	Chrycidine	11270
4	Merah	Citrus red	12055
5	Hijau	Guinea Green B	42085
6	Violet	Magenta	42510
7	Orange	Oil Yellow SS	12110
8	Orange	Oil Yellow XO	11380
9	Kuning	Oil Yellow SAB	11390
10	Kuning	Oil Yellow SX	16155
11	Merah	Ponceau 3R	14700
12	Merah	Ponceau SX	12140
13	Merah	Sudan I	12055
14	Merah	Rhodamin B	45170
15	Merah	Methanil Yellow	13065
16	Merah	Amaranth	12740
17	Merah	Crystal Ponceau	12760
18	Merah	Ponceau 6RB	13420
19	Hijau	Night Green 2B	36285
20	Biru	Patent Blue A	41753
21	Kuning	Butter Yellow	76352
22	Kuning	Anillin Yellow	76352
23	Kuning	Light Green SF Yellowish	29647
24	Biru	Soluble Blue	76491
25	Biru	Nigrosine Soluble	41074
26	Orange	Croceine Orange	11726

Sumber : SK Menteri Kesehatan RI No. 722/MenKes/Per/IX/88

Pemakaian bahan pewarna sintetik dalam makanan walaupun mempunyai dampak positif bagi produsen dan konsumen, diantaranya dapat membuat makanan lebih menarik, meratakan warna makanan, dan mengembalikan warna dari bahan dasar yang hilang atau berubah selama pengolahan, ternyata dapat pula menimbulkan hal-hal yang tidak diinginkan dan bahkan mungkin memberi

dampak negatif terhadap kesehatan konsumen seperti kanker kulit, kanker mulut, kerusakan otak (Winarno dan Sulistyowati, 1994).

Menurut (Henry 1996 dalam Lazuardi, 2010), pewarna ditambahkan ke dalam makanan karena beberapa hal, seperti yang dijelaskan berikut ini :

1. Memperkuat warna penampilan warna dari suatu makanan agar konsumen lebih tertarik.
2. Untuk menyeragamkan warna dalam produksi makanan dari setiap proses pengolahan.
3. Untuk memberi warna yang menarik pada produk makanan contohnya dalam produk yang berbahan dasar gula, es krim dan minuman, yang jika tidak diberi warna tidak akan menarik.

Untuk mengetahui perbedaan antara zat pewarna alami dan pewarna sintetik dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbedaan antara zat pewarna sintetik dan alami

Pembeda	Zat pewarna sintesis	Zat pewarna alami
Warna yang dihasilkan	Lebih cerah	Lebih pudar
Homogenitas	Lebih homogen	Tidak homogen
Variasi warna	Banyak	Sedikit
Harga	Lebih murah	Lebih mahal
Ketersediaan	Tidak terbatas	Terbatas
Kestabilan	Stabil	Kurang stabil

2.4 Tartrazine

Tartrazine merupakan jenis pewarna sintetik yang terdaftar atau diizinkan oleh pemerintah digunakan untuk pewarna makanan dan minuman. Selain untuk makanan dan minuman tartrazine juga digunakan untuk kosmetik dan obat-obatan.

Sifat – sifat atau karakteristik dari tartrazine :

➤ Organoleptik

- Bentuk : serbuk atau tepung

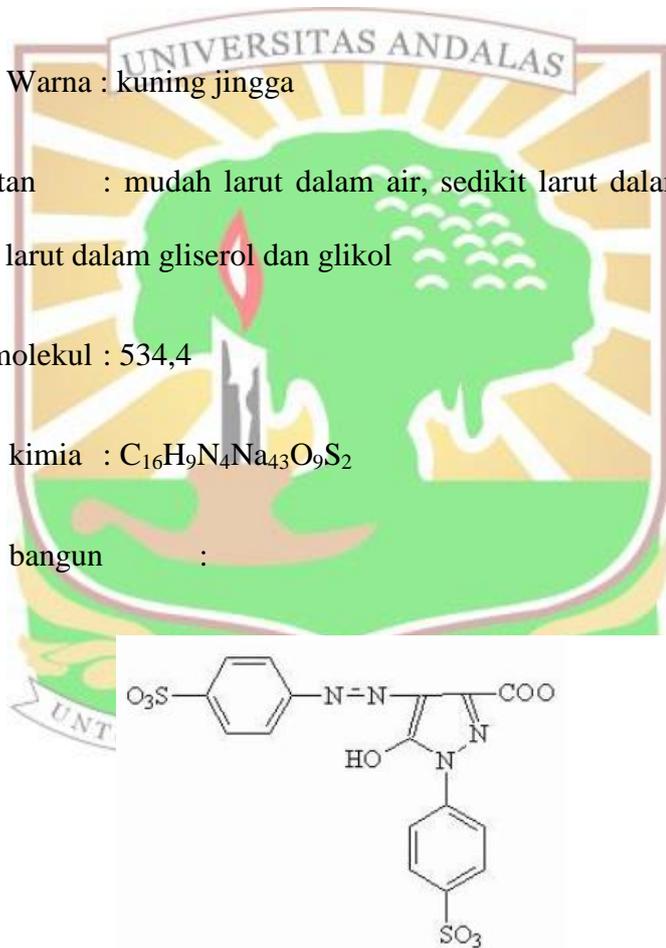
- Warna : kuning jingga

➤ Kelarutan : mudah larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol 95%, mudah larut dalam gliserol dan glikol

➤ Berat molekul : 534,4

➤ Rumus kimia : $C_{16}H_9N_4Na_4O_9S_2$

➤ Rumus bangun :



Gambar 2. Struktur kimia tartrazin (Rowe, 1994)

Tartrazine adalah pewarna makanan kuning yang telah digunakan selama bertahun-tahun, namun telah ditemukan dapat menghasilkan reaksi intoleransi.

dalam beberapa individu. Penggunaan tartrazine pada jangka waktu yang lama dapat memberikan efek yang berbahaya. Reaksi merugikan yang telah dilaporkan termasuk urtikaria (ruam kulit alergi), rhinitis (pilek), asma, purpura (kulit memar keunguan dan anafilaksis sistemik (shock). Reaksi samping ini lebih umum pada penderita asma dan orang – orang yang peka terhadap aspirin (Aguilar, 2009).

Pewarna kuning tartrazine yang digunakan dalam obat obatan dan makanan dapat menyebabkan gejala reaksi alergi (urtikaria, rinitis, atau asma) dapat terjadi setelah paparan bahan kimia yang digunakan untuk warna, bumbu, atau mengawetkan makanan dan obat obatan, tapi Tartrazine (FD & C kuning No 5) adalah warna yang paling sering dicurigai. Intoleransi terhadap tartrazine pertama kali dilaporkan pada tahun 1959, dan bagian dalam induksi dari urtikaria telah diakui sejak tahun 1975. Non-thrombocytopenic purpura juga dilaporkan karena hipersensitivitas terhadap Tartrazine yang menunjukkan kemungkinan bahwa tartrazine dapat bertindak sebagai haptens yang terikat pada sel endotel pembuluh darah kecil (Miller, 1982).

Penyerapan, distribusi, metabolisme dan ekskresi tartrazine telah dipelajari secara ekstensif di hewan dan manusia. Sementara sebagian besar studi selama 40-50 tahun yang lalu dengan teknik dan metode yang digunakan untuk identifikasi senyawa induk dan metabolitnya adalah digunakan untuk menjelaskan dan mengidentifikasi dengan metabolisme sebagian besar dari jalur xenobiotik. Setelah pemberian secara oral dari tartrazine utuh penyerapan pada kisaran dosis yang rendah diabaikan (<5%) dan tartrazine utuh pada saat diekskresikan warnanya tidak berubah dalam urin (Aguilar, 2009)

2.5 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis atau dalam bahasa Inggris disebut *thin layer chromatography* merupakan salah satu contoh kromatografi planar disamping kromatografi kertas. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase geraknya dikemas didalam kolom, maka pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya adalah berupa lapisan seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium atau plat plastik (Gandjar & Abdul, 2007).

Kromatografi lapis tipis digunakan secara luas untuk analisis solut-solut organik terutama dalam bidang biokimia, farmasi, klinik dan forensik, baik untuk analisis kualitatif dengan cara membandingkan nilai R_f solut dengan nilai R_f senyawa baku atau untuk analisis kuantitatif. Pada analisis kuantitatif, kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku.

Prinsip KLT adalah campuran cuplikan yang akan dipisahkan ditotolkan pada permukaan lapisan. Lapisan yang telah ditotolkan dibiarkan sesaat untuk memastikan bahwa pelarut telah hilang dari lapisan. Kemudian, lapisan dikembangkan dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak yang sesuai. Proses pengembangan terjadi hingga fase gerak mencapai batas atas plat KLT (Watson, 1999).

Parameter pada kromatografi lapis tipis yang digunakan untuk identifikasi nilai R_f . Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai R_f yang sama jika diukur pada kondisi kromatografi lapis tipis yang sama. Untuk meyakinkan

identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan lebih dari satu fase gerak dan jenis pereaksi semprot (Gandjar & Abdul, 2007).

Kromatografi lapis tipis telah dikembangkan menjadi teknik canggih untuk menentukan suatu senyawa dan kemurniannya. KLT merupakan bagian sangat penting dalam langkah *quality control*. Faktor yang mempengaruhi teknik ini bergantung pada pemilihan fasa diam, fasa gerak, dan reagent untuk langkah visualisasi kromatogram. Alat ini terdiri atas kaca dan plat plastik yang disalut dengan silika gel kisaran 2-25 μm (Watson, 1999).

2. 5. 1 Fase Diam

Dalam Kromatografi Lapis Tipis, fasa diam merupakan adsorban berupa lapisan tipis (0.25 mm). Adsorban yang umum adalah silika gel, alumina oksida, *kieselgur*, selulosa dan turunannya, poliamida, dan lain-lain. Laju migrasi senyawa pada pelat silika gel tergantung pada polaritasnya. Fasa diam akan mengadsorpsi sejumlah fraksi analit, membuat analit tertahan dalam silika gel dan sisanya akan bergerak naik bersama pelarut (fasa gerak). Pada lama waktu tertentu, senyawa yang teradsorpsi kuat (lebih polar) akan tertahan sehingga jarak tempuhnya lebih pendek, sedangkan senyawa yang teradsorpsi lemah (kurang polar) akan lebih mudah bergerak menaiki pelat sehingga jarak tempuhnya lebih panjang (Watson, 1999).

Berikut merupakan deskripsi adsorban yang biasa digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis, yaitu (Watson 1999) :

- a. Gel silika G: merupakan gel silika dengan rata-rata ukuran partikel 15 μm mengandung lebih kurang 13 % bahan pengikat kalsium sulfat. Digunakan

dalam banyak pengujian farmakope. Dalam praktik, pelat-pelat komersial dapat digunakan yang mengandung jenis pengikat yang berbeda.

- b. Gel silika GF₂₅₄: merupakan gel silika G dengan penambahan bahan berfluoresensi. Jenis penerapan yang sama seperti silika G dengan visualisasi dilakukan di bawah cahaya UV.
- c. Selulosa: merupakan serbuk selulosa yang berukuran partikel kurang dari 30 μm . Selulosa biasa digunakan untuk identifikasi tetrasiklin.
- d. Keiselguhr G: merupakan tanah diatom yang mengandung sulfat pengikat kalsium sulfat. Digunakan sebagai penyangga padat untuk fase diam seperti parafin cair yang digunakan dalam analisis minyak lemak.

2.5.2 Fase Gerak

Fasa gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Ia bergerak dalam fasa diam, karena adanya gaya kapiler. Contoh fasa gerak biner yang sangat sering dipakai pada pemisahan KLT adalah n-heksan, etil asetat, aseton, klorofom, metanol, etanol, diklorometan, asetonitril. Penyusunan sistem pelarut dapat dipilih sesuai dengan kemampuannya membentuk ikatan hidrogen dari hidrofil ke hidrofob. Kombinasi pelarut yang mempunyai sifat yang berbeda memberikan fasa gerak yang cocok (Stahl, 1985).

Kekuatan fasa gerak tergantung pada campuran pelarut khusus yang digunakan. Semakin polar suatu pelarut atau campuran pelarut, semakin jauh pelarut tersebut akan menggerakkan senyawa polar menaiki fasa diam. Jarak yang ditempuh oleh senyawa dari garis awal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut disebut 'nilai R_f' senyawa tersebut. Nilai R_f spesifik untuk setiap

senyawa, sehingga nilai R_f dapat digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi atau menentukan kemurnian suatu senyawa (Watson, 2007).

2.5.3 Pengembangan Fase Gerak

Pengembangan fase gerak biasanya dilakukan dengan cara *ascending*, yang mana ujung lempeng dicelupkan ke dalam pelarut pengembang. Untuk menghasilkan reproduibilitas kromatografi yang baik, wadah fase gerak harus dijenuhkan dengan uap fase gerak (Rohman, 2009). Plat dicelupkan dalam fase gerak yang dipilih kira-kira 0,5 cm. Bejana diusahakan jangan sampai bocor. Untuk meyakinkan bahwa bejana kromatografi telah jenuh, maka dinding dalam bejana dapat dilapisi dengan lembaran kertas saring yang ujungnya direndam dalam fase gerak (Bobbit, *et al.* 1991).

2.5.4 Deteksi

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dilakukan secara kimia maupun fisika. Cara kimia yang biasanya digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak akan tampak secara jelas. Cara fisika yang digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan fluoresensi di bawah sinar ultraviolet, bila senyawa yang dianalisis dapat berfluoresensi, maka akan membuat bercak terlihat lebih jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka fase diam yang akan ditambahkan zat yang dapat berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan gelap karena menyerap

sinar ultraviolet sedangkan latar belakangnya akan terlihat berfluoresensi (Bobbit, *et al.*, 1991).

2.6 Densitometri

Kromatografi lapis tipis telah dikembangkan menjadi suatu teknik yang sangat canggih. Saat ini, KLT tidak hanya digunakan untuk analisa kualitatif, namun dengan kombinasi antara KLT dan alat densitometri seperti *TLC scanner*, KLT dapat digunakan untuk analisa kuantitatif. Prinsip kerja *TLC scanner* adalah mengukur tingkat kepekatan/ kekelaman atau intensitas warna yang terdapat pada suatu permukaan (bidang datar). Sehingga *TLC scanner* dapat digunakan untuk menghitung komponen dalam sampel pada basis fluoresensi atau serapan cahaya UV (Watson, 1999).

Sebuah plat KLT diterangi dengan sinar UV dan disalurkan lewat komputer, akan menghasilkan *multi-spektral scan*, dan kurva kalibrasi. Pada pantulan yang diukur adalah sinar yang dipantulkan, yang dapat menggunakan sinar tampak maupun ultraviolet. Sementara itu, cara transmisi dilakukan dengan menyinari bercak dari satu sisi dan mengukur sinar yang diteruskan pada sisi lain. Kurva baku dibuat untuk setiap lempeng dan kadar senyawa dihitung seperti pada metode instrumental yang lain. Presisi penetapan termasuk penotolan cuplikan, pengembangan kromatogram, dan pengukuran adalah 2-5%. Sistem fluoresensi biasanya lebih disenangi jika senyawa itu dapat dibuat berfluoresensi. Batas deteksi sistem ini lebih rendah dan kelinieran respon dan selektifitasnya lebih tinggi. Gangguan fluktuasi latar belakang juga lebih rendah. Bercak yang diukur dengan sistem fluoresensi, serapan ultraviolet, atau sinar tampak dapat ditetapkan lebih teliti daripada bercak yang disemprot dengan pereaksi warna. Faktor

keseragaman pada penyemprotan merupakan hal yang sangat menentukan (Ganjar & Abdul, 2007).

2.7 Validasi metode

Validasi metode adalah suatu proses yang menunjukkan bahwa prosedur analitik telah sesuai dengan penggunaan yang dikehendaki. Proses validasi metode untuk prosedur analitik dimulai dengan pengumpulan data validasi oleh pelaksana guna mendukung prosedur analitiknya. Validasi merupakan persyaratan mendasar yang diperlukan untuk menjamin kualitas dan reabilitas hasil dari semua aplikasi analitik. Penentuan validasi metode harus memiliki nilai parameter selektif, akurasi, presisi, batas deteksi, dan batas kuantitasi (FDA, 2001).

2.7.1 Linearitas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas dapat ditentukan secara langsung dengan pengukuran analit atau sampel yang di-*spiked* pada konsentrasi sekurang-kurangnya lima titik konsentrasi yang mencakup seluruh rentang konsentrasi kerja. Linieritas dalam prakteknya diperkirakan pertama kali secara visual dari penampilan kurva plot luas area/tinggi puncak dengan konsentrasi (USP, 2007).

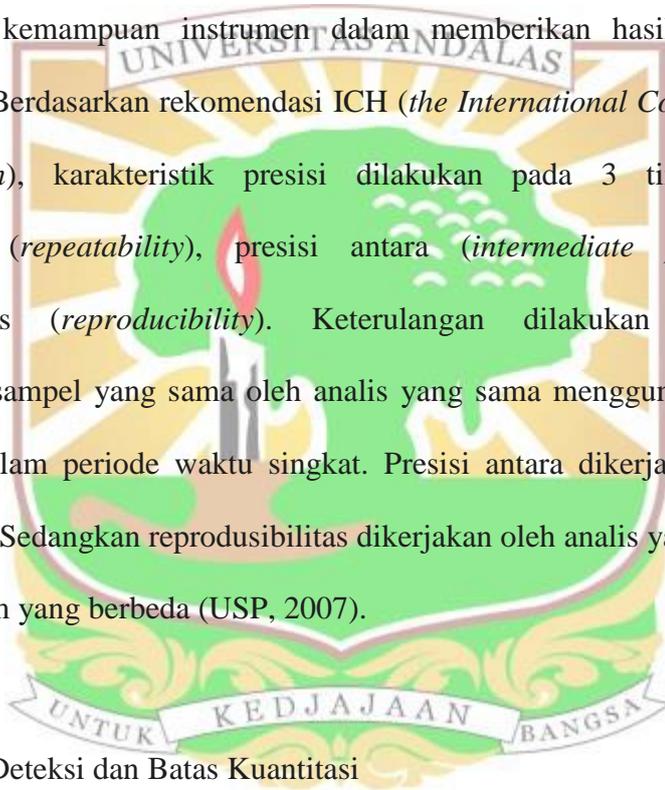
2.7.2 Akurasi

Akurasi/kecermatan adalah kedekatan antara nilai hasil uji yang diperoleh lewat metode analitik dengan nilai sebenarnya. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% *recovery*). Akurasi dilakukan dengan dua cara, yaitu :

- a. Membandingkan hasil metode dengan metode pembandingan
- b. Menambah sejumlah analit bahan murni ke dalam sampel yang dianalisa dan hasilnya dibandingkan dengan kadar senyawa yang ditambahkan (kadar sebenarnya). Syarat % perolehan kembali : 85 - 115 % (Harmita, 2004)

2.7.3 Presisi

Presisi/keseksamaan adalah ukuran keterulangan metode analitik, termasuk di antaranya kemampuan instrumen dalam memberikan hasil analitik yang reproduibel. Berdasarkan rekomendasi ICH (*the International Conference on the Harmonisation*), karakteristik presisi dilakukan pada 3 tingkatan, yakni keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan reproduibilitas (*reproducibility*). Keterulangan dilakukan dengan cara menganalisis sampel yang sama oleh analis yang sama menggunakan instrumen yang sama dalam periode waktu singkat. Presisi antara dikerjakan oleh analis yang berbeda. Sedangkan reproduibilitas dikerjakan oleh analis yang berbeda dan di laboratorium yang berbeda (USP, 2007).



2.7.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sedangkan batas kuantitasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (USP, 2007).

Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat ditentukan dengan 2 metode yakni metode non-instrumental visual dan metode perhitungan. Metode non-instrumental visual digunakan dalam analisis kromatografi lapis tipis dan metode titrimetri. Sementara itu, metode perhitungan banyak digunakan dalam analisis menggunakan instrumental (Rohman & Gandjar, 2007).



II. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan lebih kurang 9 bulan di Laboratorium Penelitian, Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

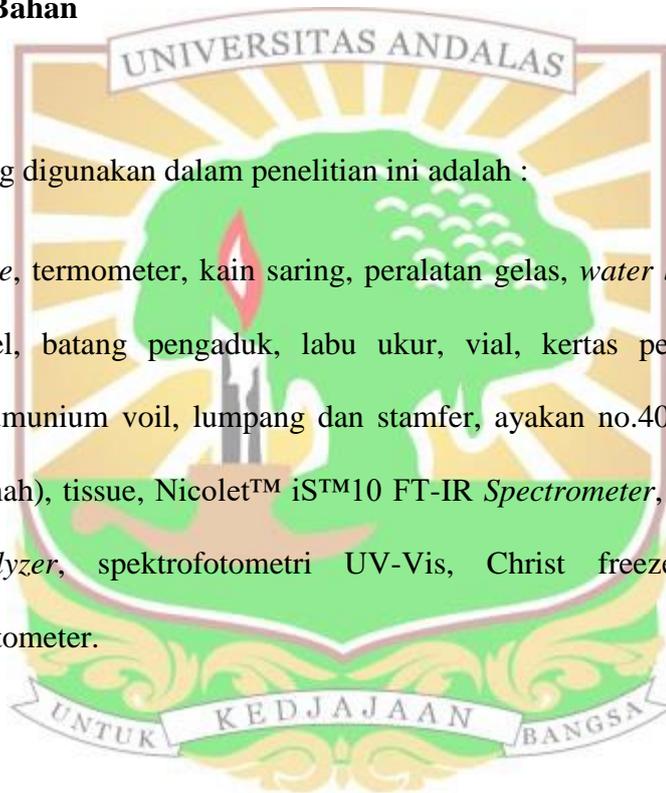
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Hot plate, termometer, kain saring, peralatan gelas, *water bath*, timbangan analitik, spatel, batang pengaduk, labu ukur, vial, kertas perkamen, lemari pendingin, alumunium voil, lumpang dan stamfer, ayakan no.40, tabung reaksi, bola gotri (timah), tissue, Nicolet™ iS™10 FT-IR *Spectrometer*, Brookfield CT3 *Texture Analyzer*, spektrofotometri UV-Vis, Christ freeze dryer ,TLC Scanner/densitometer.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk isolasi agarosa dan evaluasi:

Tepung agar-agar hasil ekstraksi dari *Gracilaria gigas Harvey* produksi PT. Satelit Sriti, *Aquadest*, etilen glikol, isopropanol, etanol, zat warna tartrazine, metanol, dcm dan asam asetat glasial.



3.3 Cara Kerja

3.3.1 Isolasi agarosa dari agar (optimasi dari Provonchee (1991))

Isolasi agarosa dengan variasi konsentrasi agar dalam etilen glikol 1% b/v.

1. Sebanyak 10 gram tepung agar dilarutkan dalam 1000 ml etilenglikol (1% b/v) dalam beker gelas 1 L, diaduk menggunakan batang pengaduk dan dipanaskan pada water bath menggunakan *hot plate* sampai suhu 105 °C, suhu diukur menggunakan termometer raksa dan pertahankan suhu tersebut selama 1 jam sampai semua agar larut.
2. Kemudian Larutan didinginkan sampai suhu 70 °C dan disimpan didalam lemari pendingin pada suhu \pm - 10 °C semalam.
3. Hari berikutnya, larutan dikeluarkan dari lemari pendingin dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 500 ml isopropanol dan diaduk sampai tercampur sempurna. Kemudian larutan disimpan pada lemari pendingin semalam agar terjadi pengendapan sempurna.
4. Endapan dipisahkan dengan melakukan penyaringan menggunakan kain saring/funnel, kemudian endapan dicuci menggunakan isopropanol sebanyak dua kali.
5. Filtratnya diperas dan dicampurkan kembali sampai larut menggunakan isopropanol dengan perbandingan 1:2 dan dibiarkan semalam.
6. Endapan yang terbentuk disaring dan diperas menggunakan kain saring. Hasil saringan kemudian dikeringanginkan sampai isopropanol menguap sempurna ditandai dengan hilangnya bau dari isopropanol.

7. Tepung agarosa yang telah kering diayak menggunakan ayakan no. 40 dan kemudian disimpan pada wadah tertentu untuk dilakukan evaluasi.

3.3.2 Rendemen Agarosa

Rendemen agarosa dihitung berdasarkan perbandingan berat agarosa setelah pengeringan terhadap berat agar-agar.

$$\text{Rendemen agarosa (\%)} = \frac{\text{Berat Agarosa}}{\text{Berat Agar}} \times 100 \%$$

3.3.3 Kadar Sulfat (Rochas, 1986)

1. Agarosa hasil isolasi sebanyak 1 sampai 10 mg dihaluskan secara hati-hati dengan 100 mg KBr dan mencetaknya menjadi cakram tipis atau pellet (metode pellet KBr).
1. diukur menggunakan Nicolet™ iS™10 FT-IR Spectrometer.
2. Kadar sulfat dihitung menggunakan perbandingan serapan pada bilangan gelombang tertentu.

$$\text{Sulfat total} = 1250/2920$$

$$\text{Galaktosa-4-sulfat} = 845/2920$$

$$\text{3,6-anhidrogalktosa-2-sulfat} = 805/2920$$

3.3.4 Pengukuran titik pembentukan gel (Guisseley, 1970)

1. Sebanyak 1,5 gram agarosa ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam beker gelas sehingga konsentrasinya 1,5 %.
2. Larutan dididihkan dalam water bath selama 5 menit.
3. Kemudian dituangkan sekitar 15 ml ke dalam tabung reaksi berdiameter 18 mm dan tingginya 150 mm.

4. Tabung reaksi diletakkan pada rak, kemudian diletakkan ke dalam water bath yang suhunya 60 °C.
5. Air dingin dialirkan ke dalam water bath untuk menurunkan suhu sekitar 0,3-0,5 °C per menit.
6. Selama pendinginan tabung reaksi secara periodik dimiringkan sambil diamati larutan di dalamnya.
7. Jika setelah dimiringkan 45 °C tidak mengalir, dengan cepat termometer disisipkan ke dalam tabung reaksi tersebut. Suhu yang teramati dicatat sebagai titik pembentukan gel.

3.3.5 Pengukuran titik leleh gel (Guisseley, 1970)

1. Tabung reaksi berisi gel hasil pengukuran titik pembentukan gel didiamkan selama 1 jam sampai terbentuk gel dengan sempurna.
2. Pada permukaan gel diletakkan bola timah (gotri).
3. Tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam water bath yang suhunya 20 °C
4. Kemudian water bath dipanaskan dengan laju pemanasan sekitar 1 °C permenit.
5. Pada saat bola tenggelam, suhu water bath dicatat
6. Suhu titik leleh gel didapatkan dari suhu water bath dikurangi 5 °C.

3.3.6 Kekuatan Gel

1. Sebanyak 1,5 gram agarosa dilarutkan dalam 100 ml aquades sehingga konsentrasinya 1,5 % b/v.
2. Larutan diaduk sampai homogen kemudian dipanaskan sampai suhu 60 °C selama 15 menit.

3. Tuang larutan dalam *Standard Bloom Jars* (botol dengan diameter 58-60 mm, tinggi 85 mm), tutup dan diamkan selama 2 menit.
4. Inkubasi pada suhu 10 °C selama 17±2 jam.
5. Selanjutnya diukur menggunakan alat CT3 *Texture Analyzer Brookfield* pada diameter probe 6 mm ($r = 3$ mm), kecepatan probe 0,5 mm/s dengan kedalaman 25 mm dengan kontak area 28,26 mm².
6. Kekuatan gel dinyatakan dalam satuan g/cm².

3.3.7 Penyiapan Agarosa Sebagai Adsorben

1. Agarosa sebanyak 1 g dimasukkan kedalam beaker glass 250 ml berisi aquades sebanyak 50 ml dipanaskan dengan kompor listrik dengan suhu awal 70°C kemudian suhu dinaikan sampai 105°C sampai didapatkan larutan homogen dari agarosa kemudian dituangkan kedalam labu ukur 250 ml dengan bantuan corong, volume dicukupkan dengan menambahkan aquades pada suhu 70°C dan didapatkan larutan agarosa dengan konsentrasi 1%
2. Larutan agarosa dituang kedalam wellplate yang berfungsi sebagai cetakan adsorben agarose. Agarosa didalam cetakan didinginkan sampai membentuk gel, suhu dibiarkan turun sampai mencapai suhu kamar. Kepingan agarosa gel diambil dari cetakan dengan menggunakan sebuah jarum, kemudian masing masing ditimbang. Agarose gel dikeringkan dengan alat freeze drying selama 12 jam sehingga didapatkan adsorben agarosa kering berbentuk silinder, kemudian masing masing ditimbang.

3.3.8 Penyiapan Baku Tartrazine

a. Pembuatan Larutan Stock Tartrazin

Tartrazine standar ditimbang seksama sebanyak 10 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dengan bantuan corong, ditambahkan aquades sebanyak 5ml kemudian dilarutkan dan di tambah aquades hingga garis batas 10 ml. diambil dengan pipet sebanyak 2,5 ml kemudian dimasukkan dalam labu 50 ml, kemudian dilarutkan dengan 25 ml air suling, setelah larut ditambahkan air suling sampai volume 50 ml dan didapatkan larutan induk tartrazine standar dengan kadar 50ug/ml

b. Penyiapan larutan Baku tartrazine

Disiapkan labu ukur 10 ml sebanyak 5 buah, kemudian kedalam masing masing labu ditambahkan berturut turut dengan bantuan pipet sebanyak 1, 2, 3, 4, dan 5 ml larutan induk (50ug/ml), kemudian masing masing labu ukur ditambahkan air suling sampai volume 10 ml. maka akan didapatkan larutan standar dengan kadar berturut turut 5, 10, 15, 20, dan 25 ug/ml.

3.3.9 Mencari Fasa Gerak KLT larutan Induk Tartrazine

Larutan tartrazine standar dengan kadar yg sesuai ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah. Kemudian disiapkan fase gerak campuran etanol butanol dengan bermacam macam perbandingan dan dilakukan pemisahan dengan jarak pengembang 5 cm. kromatogram diamati dengan lampu uv 254, kemudian dilihat fasa gerak yang member nilai Rf lebih kurang 0,2 sampai 0,8.

3.3.10 Pembuatan Spectrum Visible Larutan Tartrazine

Larutan tartrazine dengan kadar yg sesuai dimasukkan kedalam kuvet, kemudian di record spectrum visible nya menggunakan panjang gelombang 400 – 800 nm, maka akan didapatkan lamda maksimum dari tartrazine

3.3.11 Scanning Larutan Tartrazine Standar

Larutan induk tartrazine dengan kadar 5, 10, 15, 20, dan 25 ug/ml , ditotolkan masing masing nya sebanyak 5 μ l pada garis awal dengan jarak dari titik bawah plat sebanyak 1 cm dan jarak totalan 1 cm. kemudian dimasukkan kedalam bejana kromatografi yang berisi fasa gerak yang sesuai dengan ketinggian 0,5 cm. bejaana kromatografi ditutup dan dibiarkan sampai fasa gerak mencapai jarak pengembangan 5 cm, lalu plat dikeluarkan dan dibiarkan kering pada suhu kamar. Bercak kuning tartrazine pada Plat KLT di scan pada panjang gelombang maksimum dari tartrazine maka didapatkan luas histogram dari masing masing konsentrasi tartrazine.

3.3.12 Pengolahan data Konsentrasi dan luas histogram tartrazine standar untuk mendapatkan persamaan regresi, $y = ax + b$ dan koofisien variassi, R

Data konsentrasi tartrazine : x1, x2, x3, x4, dan x5 dan data luas histogram y1, y2, y3, y4, dan y5 diolah dengan program Microsoft excel dan didapatkan persamaan regresi $y = ax + b$, koofesien korelasi, R dan grafik hubungan antar konsentrasi (independent variable dan luas histogram).

3.3.13 Penghitungan LOD dan LOQ

Dilakukan penghitungan standar deviasi dari data $y_1, y_2, y_3, y_4,$ dan y_5 maka di dapatkan standar deviasi dari nilai y . LOD di kalkulasi dari $3 SD_y = ax + b$ Sedangkan nilai LOQ dihitung dari $10 SD_y = ax + b$, maka didapatkan nilai x adalah LOQ.

3.3.14 Penentuan presisi dari metoda analisis

Presisi dinyatakan dengan persen simpangan baku relatif (RSD) atau persen koefisien variasi

$$SD_r = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

3.3.15 Perhitungan Kadar Tartrazin Yang Tersisa Setelah Adsorpsi Dengan Menggunakan Agarose dan Agar

Pelet agarose dan agar dimasukan kedalam larutan tartrazine dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ug/ml, dalam suasana asam pH 5 dan suasana basa dengan menambahkan NaOH 0,1 N sampai pH 9. Dibiarkan selama 60 menit, kemudian hasil sisa adsorpsi di total kan pada plat klt lalu di scan pada panjang gelombang maksimum dari tartrazine maka didapatkan luas histogram dari masing masing konsentrasi tartrazine.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Rendemen agarosa 1, agarosa 2, dan agarosa 3 berturut-turut adalah 71,51% ; 66,98%; 73,40%. (Lampiran 1, Tabel 6)
2. Kadar sulfat total, galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat agarosa 1 berturut-turut adalah 0,25%; 0,43%; 0,21%. Kadar sulfat total, galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat agarosa 2 berturut-turut adalah 0,16%; 0,38%; 0,12%. Kadar sulfat total, galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat agarosa 3 berturut-turut adalah 0,31%; 0,52%; 0,27% (Lampiran 1, Tabel 7).
3. Titik pembentukan dan titik leleh gel agarosa 1 berturut-turut adalah 36,6 °C dan 86,4°C. Titik pembentukan dan titik leleh gel agarosa 2 berturut-turut adalah 36,5 °C dan 85,0°C. Titik pembentukan dan titik leleh gel agarose 3 berturut-turut adalah 36,6 °C dan 87,1°C. (Lampiran 1, Tabel 8)
4. Kekuatan gel agarosa 1, agarosa 2, agarosa 3 berturut-turut adalah 1545 g/cm²; 1559 g/cm²; 1528 g/cm². (Lampiran 1, Tabel 9)
5. Analisis kualitatif zat warna (tartrazin) dilakukan dengan menggunakan plat KLT silika gel GF₂₅₄, tartrazin dilarutkan dengan pelarut etanol 70%. Fase gerak yang terpilih adalah metanol : DCM dengan perbandingan 3:7 dan ditambah asam asetat glasial 5 tetes, jarak lintasan fase gerak 5 cm, volume

tiap total 5 µL dengan panjang gelombang yang 427 nm. Nilai Rf yang diperoleh untuk tartrazin, yaitu 0,48 (Lampiran 2)

6. Identifikasi baku pembanding zat warna kuning tartrazin dengan Spektrofotometri Visible diperoleh λ maksimum, yaitu 427 nm (Lampiran 1, Gambar 5).

7. Metode KLT-Densitometri dinyatakan tangguh terlihat dari hasil validasi metode berdasarkan parameter-parameter berikut :

a. Uji Linearitas

Pembuatan kurva kalibrasi tartrazin dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/ml diperoleh persamaan regresi linear $y = 37,654x + 255,91$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9987$ (Lampiran 1, Tabel 10, Gambar 4). Persamaan regresi ini dapat digunakan jika faktor korelasinya $0,98 \leq r < 1$.

b. Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Nilai LOD dan LOQ untuk tartrazin adalah 0,9847 µg/ml dan 3,2823 µg/ml (Lampiran 1, Tabel 11).

c. Uji Presisi

Penentuan presisi *inter day* tartrazin dilakukan pada konsentrasi 10, 15, dan 20 µg/ml dengan nilai %RSD berturut-turut 4,60 % ; 2,74 % ; dan 1,17 % dan penentuan presisi *intra-day* dengan konsentrasi 10 µg/ml nilai %RSD

yaitu 0,97 %, untuk konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$, yaitu 10,88 %, dan untuk konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$, yaitu 9,54 % (Lampiran 1, Tabel 12 & 13).

8. Berat pelet agarosa sebelum di freeze drying 0,37 g, setelah di freeze drying 0,0034 g.
9. Sisa hasil adsorpsi dari agarose dalam larutan tartrazin pada keadaan asam dan basa, dalam suasana asam pada konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ secara berturut turut mulai konsentrasi 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ adalah 0,0590 mg; 0,1064 mg; 0,1537 mg. Pada suasana basa secara berturut turut mulai konsentrasi 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ 0,0597 mg; 0,1163 mg; 0,1644 mg; 0,2260 mg. (lampiran 1, tabel 14)
10. Sisa hasil adsorpsi dari agar dalam larutan tartrazin pada keadaan asam dan basa, dalam suasana asam pada konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ secara berturut turut 0,0462 mg; 0,0945 mg; 0,1446 mg; 0,1954 mg; 0,2305 mg. Pada suasana basa secara berturut turut 0,0469 mg; 0,0975 mg; 0,1477 mg; 0,1972 mg; 0,2482 mg. (lampiran 1, tabel 15)

4.2 Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan isolasi agarosa dari agar *Gracilaria gigas* yang diperoleh dengan membelinya dari PT. Satelit Sriti Agar-agar Powder. Agarosa dikenal sebagai fraksi pembentuk gel dari agar karena sifat yang dihasilkannya mendekati sifat-sifat gel ideal yaitu mengandung kadar sulfat yang rendah (<0,7%) serta memiliki kekuatan gel yang tinggi pada konsentrasi rendah (Provonchee, 1991). Agarosa sebagai fraksi yang tidak bermuatan dinilai jauh lebih prospektif dibandingkan dengan agar yang masih bermuatan. Karena sifat-sifatnya yang jauh lebih stabil, netral dengan kemurnian dan kekuatan gel yang tinggi serta memiliki suhu pembentukan gel dan kandungan sulfat yang rendah, prospek pemanfaatannya jauh lebih luas. (Selby dan Whyne, 1973).

Prinsip isolasi agarosa pada penelitian ini adalah dengan pemisahan agarosa dan agaropektin berdasarkan kelarutannya menggunakan pelarut organik yaitu etilen glikol dan isopropanol untuk mengendapkan agarosa pada suhu tertentu. Etilen glikol akan melarutkan agar dan pada suhu 105 °C sehingga ikatan agarosa dan agaropektin akan terputus dan agaropektin akan berinteraksi dengan etilen glikol. Kemudian dengan menggunakan isopropanol yang merupakan pelarut yang tidak dapat melarutkan agarosa mampu mengendapkan agarosa sehingga dapat dipisahkan dengan melakukan penyaringan.

Isolasi agarosa dari tepung agar dibuat dengan melarutkan agar dalam etilen glikol dengan konsentrasi 1% b/v sebanyak 3 buah. Pada proses isolasi, untuk meningkatkan efisiensi isolasi dapat dilakukan pada konsentrasi sekitar 1-10 % b/v (Provonchee, 1991). Namun menurut penelitian sebelumnya, konsentrasi 1 % lah yang mendapat nilai angka sulfat yang paling baik, maka dilakukan isolasi agarosa dengan konsentrasi 1% b/v.

Agarosa diperoleh dari agar dengan melarutkannya dalam etilen glikol pada suhu tinggi. Pelarut glikol yang dipilih setidaknya mengandung sedikit air (kurang dari 15%) dan lebih baik lagi jika pada rentang 0,5-10%. Sedangkan jika proses isolasi agarosa dari agar (bebas air), pelarut yang baik digunakan adalah etilen glikol atau trimetilen glikol. Penggunaan etilen glikol tidak memerlukan air dalam melarutkan agar, karena etilen glikol cenderung lebih polar dan lebih encer dari propilen glikol sehingga dapat dengan mudah melarutkan agar. Disolusi agar dalam etilen glikol sebaiknya dilakukan pada suhu 80-110 °C. (Provonchee, 1991).

Setelah larutnya agar, dilakukan proses pendinginan pada temperatur dibawah 30 °C. Proses pendinginan ini dilakukan untuk memaksimalkan pemisahan agarosa dari etilen glikol, karena dengan semakin menurunnya suhu akan menurunkan ikatan agarosa dengan etilen glikol. Pada penelitian ini digunakan isopropanol untuk mengendapkan agarosa karena penggunaan isopropanol dapat meningkatkan rendemen daripada pelarut organik lain seperti metanol atau etanol (Provonchee, 1991). Penggunaan pelarut organik isopropanol adalah karena isopropanol dapat bercampur dengan etilen glikol dan bukan pelarut untuk agarosa. Sehingga etilen glikol yang mengikat agaropektin akan bercampur dengan isopropanol dan agarosa yang tidak larut dengan isopropanol dapat mengendap dan terpisah. Endapan dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kain saring karena endapan yang terbentuk seperti bubur putih yang menyulitkan pemisahan menggunakan penyaring biasa. Kemudian endapan ini dicuci sebanyak dua kali menggunakan isopropanol untuk menarik etilen glikol yang masih terdapat pada agarosa sampai diperoleh endapan partikel agarosa berupa serbuk. Kemudian endapan agarosa dikeringkan pada suhu kamar untuk menguapkan isopropanol. Proses pengeringan dilakukan sampai bau isopropanol hilang dari agarosa yang dikeringkan.

Pada penelitian ini diperoleh agarosa (1% b/v agar dalam etilen glikol) berupa bubuk putih kekuningan, halus dan tidak berbau. Rendemen agarosa yang diperoleh dari penelitian ini sangat bagus. Rendemen agarosa 1, agarosa 2, dan agarosa 3 secara berturut-turut adalah 71,51% ; 66,98%; 73,40%. (Lampiran 1, Tabel 6). Semakin kecil rendemen maka agarosa yang dihasilkan akan semakin murni (provonchee, 1991). Nilai rendemen terkecil terdapat pada agarosa 2, yang mengindikasikan bahwa agarosa yang dihasilkan lebih murni daripada agarosa 1 dan agarosa 3.

Mutu agarosa ditentukan dengan mengukur kadar sulfat, kekuatan gel, titik leleh gel, dan titik pembentukan gel. Salah satu indikator agarosa adalah kandungan sulfat yang rendah. Menurut Chapman (1980) menyatakan bahwa kadar sulfat didalam agarosa berkisar antara 0,03-0,04%, sedangkan menurut Guisley (1993) kadar sulfat sampai 0,7% masih dapat diterima. Jadi dalam pemisahan agarosa diupayakan untuk menekan kadar sulfat serendah mungkin. Dari hasil penelitian diperoleh nilai kadar sulfat total, galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat agarosa 1 berturut-turut adalah 0,25%; 0,43%; 0,21%. Kadar sulfat total, galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat agarosa 2 berturut-turut adalah 0,16%; 0,38%; 0,12%. Kadar sulfat total, galaktosa-4-sulfat, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat agarosa 3 berturut-turut adalah 0,31%; 0,52%; 0,27% (Lampiran 1, Tabel 7).

Kadar sulfat ditentukan dengan melihat spectrum IR nya menggunakan *Nicolet™ iS™10 FT-IR Spectrometer* dan dihitung kadar sulfatnya dengan perbandingan serapan (Absorban) pada bilangan gelombang tertentu, yaitu: Sulfat 'total pada 1250/2920, Galaktosa-4-sulfat pada 845/2920, dan 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat pada 805/2920, nilai absorban dari spektrum IR dihitung menggunakan metode *Base Line* (Lampiran 4). Absorban pada bilangan

gelombang 2920 cm^{-1} terkait dengan C-H yang digunakan sebagai indeks total kandungan gula karena grup C-H tetap konstan terlepas dari perubahan rasio galaktosa terhadap 3,6-anhidrogalaktosa dan kandungan sulfat dari galaktan. Absorban pada bilangan gelombang 845 cm^{-1} terkait dengan 3,6-anhidrogalaktosa yang juga terkait dengan kandungan galaktosa-4-sulfat pada agar. Kemudian pada bilangan gelombang 1250 cm^{-1} adalah sulfat. Sehingga dapat digunakan dalam perbandingan dengan absorban C-H pada 2920 cm^{-1} sebagai indeks terkait sulfat total terhadap kandungan gula. Bilangan gelombang 805 cm^{-1} adalah 3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat (Rochas, 1986). Metode untuk menentukan kadar sulfat dengan melihat spectrum IR nya ini cepat, tidak merusak sampel dan hanya membutuhkan jumlah sampel yang sangat sedikit.

Dari hasil penelitian kandungan sulfat dari agarosa hasil isolasi memenuhi standar dan agarosa hasil isolasi baik agarosa 1, agarosa 2, Agarosa 3 masih memenuhi kriteria yang ditetapkan yaitu kecil dari 0,7%.

Kekuatan gel merupakan suatu beban maksimum yang dibutuhkan untuk memecah matrik polimer pada daerah yang dibebani (Purwanto, 2002). Dari hasil penelitian kekuatan gel diukur menggunakan *Brookfield CT3 Texture Analyzer*. Kekuatan gel agarosa 1, agarosa 2, agarosa 3 berturut-turut adalah 1545 g/cm^2 ; 1559 g/cm^2 ; 1528 g/cm^2 . (Lampiran 1, Tabel 9).

Adanya hubungan terbalik antara kadar sulfat dan kekuatan gel yaitu dengan menurunnya kadar sulfat akan menyebabkan peningkatan kekuatan gel. Hal ini dapat dijelaskan bahwa kekuatan gel agarosa B lebih tinggi dibandingkan dengan agarosa A dan agarosa C. Karakteristik pembentukan gel agarosa disebabkan oleh tiga buah atom H pada 3,6-anhidro-L-galaktosa yang memaksa molekul-molekul untuk membentuk struktur heliks. Interaksi dari heliks-heliks ini akan menyebabkan terbentuknya gel. Struktur heliks ini tidak akan terjadi bila

semua galaktosa di dalam agarosa terdapat dalam bentuk galaktosa-6-sulfat. Sulfat adalah ion bermuatan dan memerlukan ruang yang besar dalam molekul. Diduga dengan adanya ion sulfat terjadi tolak menolak diantara molekul yang bermuatan, hal ini menyebabkan jarak antara molekul menjadi jauh sehingga molekul menjadi tidak kompak dan kekuatan gel menjadi rendah.

Titik pembentukan gel diukur dengan mencatat suhu menggunakan termometer pada saat terbentuknya gel yang ditandai dengan gel tidak bergerak saat dimiringkan 45°. Dari hasil penelitian diperoleh titik pembentukan gel pada agarosa 1, agarosa 2, agarosa 3 secara berturut-turut adalah 36,6 °C; 36,5°C; 36,6 °C (Lampiran 1, Tabel 8).

Bila dihubungkan dengan penurunan kadar sulfat, hal ini memberikan gambaran bahwa titik pembentukan gel agarosa yang rendah menunjukkan kemurnian agarosa. Dari data hasil penelitian menunjukkan titik pembentukan gel pada agarosa 2 lebih rendah dari pada agarosa 1 dan agarosa 3. Hal ini menunjukkan bahwa kadar sulfat mempengaruhi titik pembentukan gel.

Titik leleh gel merupakan suhu pada saat gel agarosa mulai mencair. Pada saat ini terjadi peruraian daerah simpulan (*junction zone*) menjadi struktur pilinan ganda (*double helix*) dan selanjutnya berubah menjadi gulungan acak (*random coil*). Titik leleh gel diukur dengan mencatat suhu menggunakan termometer saat bola timah mulai tenggelam dalam agarosa yang meleleh. Dari hasil penelitian menunjukkan titik leleh gel agarosa 1, agarosa 2, Agarosa 3 secara berturut-turut adalah 86,4°C; 85,0 °C; 87,1°C (Lampiran 1, Tabel 8).

Titik leleh gel dipengaruhi oleh bobot molekul, semakin besar bobot molekul akan menghasilkan titik leleh gel yang tinggi (Glicksman, 1982). Pemisahan agarosa dari agar mengakibatkan terjadinya penurunan bobot molekul.

Agarosa merupakan molekul yang lebih sederhana daripada agar-agar yang memiliki bobot molekul yang lebih kompleks. Dengan demikian semakin murni agarosa semakin rendah titik leleh gel nya.

Agarose yang telah didapat, dibuat menjadi gel dengan konsentrasi 1% (1 g agarosa dalam 100 ml air), dicetak ke dalam well plate. Setelah menjadi gel, ditimbang berat gel dan rata-rata berat tiap satu gel adalah 0,3537 g. Gel agarose selanjutnya di keringkan dengan freeze drying, yang kemudian berubah menjadi pelet agarose dengan berat rata rata 0,0034. Agarosa yang telah berupa pelet digunakan sebagai adsorben zat warna tartrazin dalam 2 suasana berbeda asam (pH 5) dan basa (pH 9).

Pada penelitian ini menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri untuk analisis kuantitatif dari zat pewarna tartrazin. Hal ini disebabkan karena beberapa keuntungan dari metode ini dibandingkan dengan metode lain, yaitu KLT-Densitometri dalam pengerjaannya yang sederhana, dari segi biaya lebih murah, dan pelarut yang digunakan sedikit serta dalam satu kali analisis sejumlah senyawa dapat dianalisis secara serentak dengan cepat (Rohman, 2009).

Tahapan penelitian yang dilakukan selanjutnya adalah optimasi kondisi analisis, identifikasi baku standar zat pewarna tartrazin, kemudian dilanjutkan dengan validasi metode analisis, serta penentuan kadar zat pewarna tartrazin.

Penentuan kondisi analisis meliputi penentuan pelarut yang sesuai, penentuan fase gerak, penentuan panjang gelombang maksimum untuk analisis dan konsentrasi uji. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Penggunaan pelarut ini merupakan pelarut standar yang digunakan untuk mengekstraksi sampel kering.

Dalam pemilihan fase gerak, fase gerak yang memberikan hasil Rf yang memenuhi standar antara 0,2 – 0,8 adalah metanol : dcm (3 ml : 7 ml) dan ditambah asam asetat glasial 5 tetes. Nilai Rf yang dihasilkan untuk tartrazin adalah 0,36 yang sesuai dengan ketentuan Rf yang baik, yaitu antara 0,2-0,8 (Rohman 2009).

Penetapan kadar tartrazin dengan menggunakan persamaan linearitas. Persamaan linearitas didapat dengan memplot berbagai konsentrasi bertingkat larutan standar tartrazin dalam etanol 70% terhadap masing-masing luas area, sehingga didapatkan persamaan $y = 37,654x + 255,91$ dengan nilai koefisien korelasi r sebesar 0,9987 (lampiran 1, gambar 4). Koefisien korelasi ini menunjukkan bahwa persamaan linearitas $y = 37,654x + 255,91$ memberikan hubungan yang linear ($0,98 \leq r \leq 1$) pada kisaran konsentrasi yang diberikan (Rohman, 2009), sehingga persamaan linearitas ini dapat digunakan untuk menentukan kadar tartrazin dengan konsentrasi analit pada kisaran konsentrasi yang diberikan.

Penentuan *Limit of detection* (LOD) dan *limit of quantitation* (LOQ) merupakan salah satu uji yang dilakukan dalam proses validasi metode. LOD ditentukan untuk mengetahui konsentrasi analit terkecil yang dapat diukur. Sedangkan LOQ ditentukan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat ditentukan oleh suatu metode pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik (Harmita, 2004). Nilai LOD dan LOQ dapat dihitung dari persamaan linear yang dihasilkan oleh kurva kalibrasi tartrazin. Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh pada percobaan ini adalah 0,9847 $\mu\text{g/ml}$ dan 3,2823 $\mu\text{g/ml}$ (Lampiran 1, tabel 11). Angka ini menunjukkan bahwa konsentrasi tartrazin terendah dalam sampel yang

dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan adalah 3,2823 $\mu\text{g/ml}$.

Presisi merupakan ukuran kedekatan antar serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali hasil pengukuran pada sampel homogen yang sama. Presisi ditunjukkan dengan standar deviasi (SD) atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data (Rohman, 2009). Uji presisi dilakukan dengan dua langkah, yaitu presisi *inter-day* dan presisi *intra-day*. Presisi *inter-day* merupakan pengukuran berulang selama tiga hari berturut-turut, sedangkan presisi *intra-day* adalah melakukan pengukuran selama satu hari dengan pengukuran sebanyak tiga kali pada waktu yang berbeda. Penentuan presisi *inter day tartrazin* dilakukan pada konsentrasi 10, 15, dan 20 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai %RSD berturut-turut 0,58 % ; 1,88 % ; dan 0,21 % dan penentuan presisi *intra-day* dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ nilai %RSD yaitu 0,75 % , untuk konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$, yaitu 0,27 % , dan untuk konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$, yaitu 0,67 % (Lampiran 1, Tabel 12 & 13).

Nilai RSD antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sangat kecil, nilai RSD berkisar antara 5-15% (Rohman, 2009). Kadar analit pada penelitian ini sangat kecil karena menggunakan satuan ppm ($\mu\text{g/ml}$), maka kriteria penerimaan nilai RSD pada penelitian ini berkisar antara 5-15%. Dengan nilai RSD yang dihasilkan, baik presisi *inter-day* maupun presisi *intra-day*, diperoleh nilai RSD yang kurang dari 15%, maka dapat dikatakan bahwa metode ini mempunyai nilai keterulangan yang baik.

Penetapan kadar tartrazin dengan pelet agarose sebagai adsorben, diukur dari larutan sisa adsorpsi. Adsorpsi pada variasi konsentrasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi tartrazin dalam larutan terhadap daya adsorpsi pada adsorben pelet agarose. Adsorpsi dilakukan dengan waktu kontak 60 menit dengan massa adsorben 0,0520 mg, larutan tartrazin pada konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm dalam kondisi asam dan basa (Lampiran 1, Tabel 14 & 15).

Pengaruh konsentrasi awal tartrazin terhadap daya adsorpsi ditunjukkan pada (lampiran 4, tabel 14) menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi tartrazin maka daya adsorpsinya semakin besar. Andriani (2013) melaporkan hal ini terjadi karena permukaan adsorben yang bersifat heterogen sehingga terdapat beberapa situs atau gugus adsorpsi yang memiliki afinitas tinggi dan terdapat situs-situs dengan afinitas rendah. Sehingga pada konsentrasi awal larutan akan mengisi situs adsorben dengan afinitas tinggi terlebih dahulu. Kemudian pada konsentrasi tinggi tampak, daya adsorpsinya cenderung konstan hal ini karena situs aktif yang ada mulai penuh. Vincent Liem (2015) juga menyatakan bahwa pada proses adsorpsi perbedaan konsentrasi antara adsorbat pada fasa larutan dan pada permukaan adsorben akan terus berlangsung hingga permukaan adsorben jenuh dan tidak ada lagi adsorbat yang dapat terikat pada adsorben.

Adsorpsi tartrazin oleh pelet agarose dalam larutan bergantung juga dengan pH larutan tersebut, dimana pH akan mempengaruhi muatan permukaan adsorben, derajat ionisasi dan spesi apa saja yang dapat terserap dalam adsorpsi tersebut. Dari hasil penelitian diketahui bahwa konsentrasi zat warna tartrazin yang terserap pada pH 5 (asam) lebih besar dibandingkan pada pH 9 (basa) (lampiran 4, tabel 15). Hal ini menunjukkan keterkaitan antara nilai pH dengan senyawa yang

diadsorpsi yaitu tartrazin. Hal ini dapat dikarenakan pada pH yang lebih rendah permukaan adsorben mengalami protonisasi dan terdeprotonisasi pada pH tinggi (Jaslin et al, 2005). Tartrazin mempunyai 2 gugus amin, dimana masing masing atom nitrogen memiliki pasangan elektron bebas (merupakan nukleofil) yang mudah mengikat ion H^+ .



IV. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan :

1. Semakin tinggi konsentrasi zat warna tartrazin, maka semakin tinggi daya adsorpsi pelet agarosa, serta dalam suasana asam daya adsorpsi pelet agarosa juga lebih besar dibandingkan dalam suasana basa. Sehingga dari hasil penelitian dapat dikatakan bahwa agarosa dapat digunakan sebagai adsorben zat warna tartrazin.
2. Gel agarosa yang dikeringkan dengan freeze drying yang mengandung ± 5 mg agarose, dicelupkan ke dalam 10 ml larutan tartrazin dengan kadar 5, 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$, selama 60 menit, dan larutan sisa di analisis kadarnya dengan metoda TLC-Scanner ternyata memberikan kadar mulai konsentrasi 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ secara berturut turut 0,0590 mg; 0,1064 mg; 0,1537 mg dalam suasana asam. Pada suasana basa memberikan kadar mulai konsentrasi 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$ secara berturut turut 0,0597 mg; 0,1163 mg; 0,1644 mg; 0,2260 mg. Dengan demikian, metoda TLC Scanner dapat digunakan untuk mengukur kadar zat warna tartrazin.

5.2 SARAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka penulis memberikan saran sebagai berikut:

- Disarankan pada penelitian selanjutnya agar dilakukan validasi metode analisis zat pewarna sintetis pada sampel dengan menggunakan metoda lain sebagai perbandingan metoda.



DAFTAR PUSTAKA

- Andriani A., Nurlisa H., Risfidian M., Aldes L. 2013. *Studi Adsorpsi desorpsi Kation Besi (II) dengan Selulosa Hasil Pemisahan Dari Serbuk Kayu*. Majalah Ilmiah Sriwijaya, Vol. XXIV, No. 17, ISSN : 0126-4680.
- Aguilar, F., Charrondiere,U.R., *et al.* 2009. *Scientific Opinion on the re-evaluation Tartrazine (E102) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Source added to Food (ANS)*. EFSA Journal 7(11) : 1331.
- Asra, Ridho. 2015. *Isolasi Agarosa Dari Agar dan Penggunaannya Sebagai Fase Diam Metode Elektroforesis Gel Untuk Identifikasi DNA HPV (Human Papillomavirus)*. [tesis]. Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Padang.
- Bobbit, J.M., Gritter, R.J., & Scharwaring, A.E. 1991. *Introduction to Chromatography (Pengantar Kromatografi)*. (Edisi kedua). Penerjemah: Kokasih Padmawinata, Bandung : ITB.
- Cahyadi, W. 2008. *Analisa dan Aspek Kesehatan Bahan Tambah Pangan*. Edisi ke-5. Jakarta: Bumi Aksara
- Chapman V.J. & Chapman D.J. 1980. *Seaweeds and Their Uses*. London. New York.
- Departemen Pertanian. 11-12 Maret 1991. Prosiding Temu Karya Ilmiah, Teknologi Pasca Panen, Rumput Laut. Subbalai Penelitian dan Perikanan Laut Slipi. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Duckworth, M., Yaphe, W. 1970. *The Structure of Agar, Fractionation of a Complex Mixture of Polysaccharides*. *Carbohydrate Research*. 16:189–197.
- Elbe, J., H., Vondan, S., dan Teven J. C. 1996 di dalam Fennema, O. R. 1995. *Food Chemistry*. Marcell Dekker. New York
- Furia, T. 1975. *Handbook of Food Technology*. Florida: CRC Press.
- Gandjar, I.G & Abdul R 2007, 'Kimia Analisis Farmasi', Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Glicksman, M. 1983. *Food Hydrocolloid Vol II*. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida.
- Istini , S., Abraham S., dan Zatnika, A. 2001. *Proses Pemurnian Agar dari Gracilaria sp*. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 3(9) : 89-93.

- Kusmiyati, Puspita Adi Lystanto, Kunti Pratiwi. 2012. Pemanfaatan Karbon Aktif Arang Batubara (KAAB) untuk Menurunkan Kadar Ion Logam Berat Cu²⁺ dan Ag⁺ Pada Limbah Cair Industri. *Reaktor*, Vol. 14, No. 1.
- Lazuardi, R. N. M. 2010, *Mempelajari Ekstraksi Pigmen Antosianin Dari Kulit Manggis (Garcinia mangostana L.) dengan berbagi jenis pelarut*. Fakultas Teknik Universitas Pasundan. Bandung.
- Li, R., Jiang, Z., and Liu, Y.H. 2008. Direct Solid-phase Spectrophotometric Determination of Tartrazine in Soft Drinks Using β -Cyclodextrin Polymer as Support. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 16, No. 5, Pages 91-96.
- Manurung, E. 2010. Analisa Kadar Tartrazine dan Sunset Yellow dalam Serbuk Minuman Nutrisari dengan Metode Spektrofotometri. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Miller. 1982. Sensitivity To Tartrazine. *British Medical Journal*, Vol 285, 1597.
- Peterson, M. S. 1978. *Encyclopedia of Food Science*. Wesport: The AVI Publishing Company Inc.
- Provonchee, R. B. 1991. *Agarose Purification Method Using Glycol*. United States Patent No. 4.9990.611. Philadelphia: FMC Corporation.
- Rasmiah Almufarij. 2013. Removal of Crystal Violet dye from aqueous solutions onto date palm leaf without the sharo spines: Adsorption and kinetic studies. *Journal of American Science* 2013; 9(3):311-351(ISSN: 1545-1003).
- Renn, D. W. 1986. *Uses of Marine Algae in Biotechnology and Industry*. In Workshop on Marine Algae Biotechnology. National Academy Press. Washington DC.
- Renn, D. W. 1990. *Seaweed and Biotechnology Inseperable Companions*. London: Kluwer Academic Publishers.
- Rochas, C., Lahaye, M., Yaphe, W. 1986. Sulfate Content of Carrageenan and Agar Determined by Infrared Spectroscopy. *Botanica Marina*. 29: 335-340.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta, Graha Ilmu.
- Rowe, c., Raymond, Tauny. 1994. Handbook of Pharmaceutical Excipient. 4th edition. London. The Paraceutical Press.
- Sharon, C., dan Komarow, W. 1999. *Gelidium*. www.mbari.org. [3 Agustus 2016].
- Stahl, E. 1985. *Analisa Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. ITB Press, Bandung

- United States Pharmacopoeia Convention. 2007. *'The United States Pharmacopoeia- National Formulary 30th Edition'*. Unite States of America. The United States Pharmacopoeial Convention.
- Vincent Liem, Aditya Putranto & Arenst Andreas.(2015). Sintesis Karbon Aktif dari Kulit Salak Aktivasi Kimia-Senyawa KOH sebagai Adsorben Proses Adsorpsi Zat Warna Metilen Biru. Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia. ISSN 1693-4396.
- Wijaya, C.H., Mulyono dan Noryawati. 2009. *Bahan Tambahan Pangan : Pewarna; Spesifikasi, Regulasi, dan Aplikasi Praktis*. Bogor : IPB Press.
- Watson, D.G. 1999. *'Pharmaceutical Analysis A text Book For Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists'*. Churchill Livingstone.
- Watson, D.G. 2007. *'Analisis Farmasi Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi'*. Penerjemah : Winny R, Edisi 2. EGC Penerbit Buku Kedokteran : Jakarta.
- Winarno, F.G. 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT.Gramedia Pustaka Utama
- Winarno, F.G. 1996. *Teknologi Pengolahan Rumput Laut*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Winarno, F.G., dan Sulistyowati, R. T., 1994. *Bahan Tambahan Untuk Makanan dan Kontaminan*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.



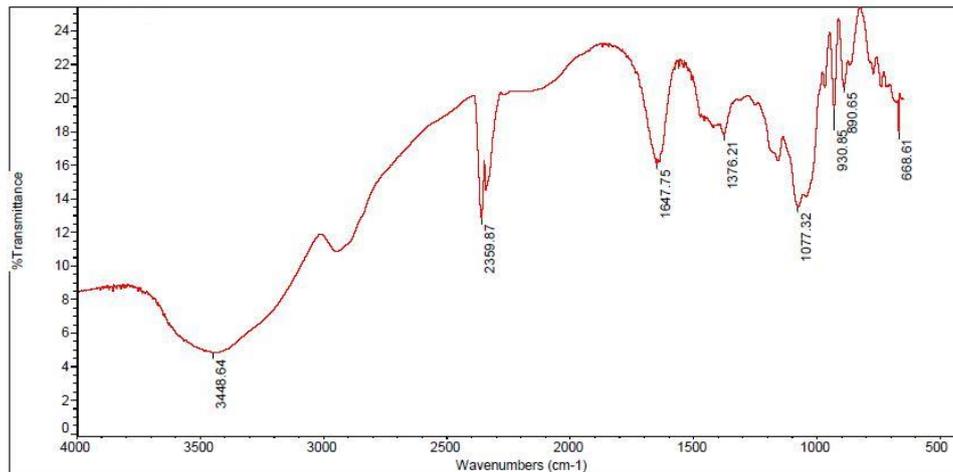
LAMPIRAN 1. Data Hasil Penelitian

Tabel 6. Rendemen agarosa

	Agar yang ditimbang (gram)	Agarosa (gram)	% Rendemen	Total % Rendemen
I	9,954	7,119	71,51	
II	9,850	6,598	66,98	70,63
III	9,877	7,250	73,40	

Tabel 7. Kadar sulfat

No	Parameter	Standar	Agar	Agarose 1	Agarose 2	Agarose 3
1	Sulfat total	0,10	6,98	0,25	0,16	0,31
2	Galaktosa-4-sulfat	0,12	2,00	0,43	0,38	0,52
3	3,6-anhidrogalaktosa-2-sulfat	0,11	4,18	0,21	0,12	0,27



Gambar 3. Spektrum IR agarosa 2 (1% b/v agar dalam etilen glikol)

LAMPIRAN 1. Lanjutan

Tabel 8. Suhu pembentukan gel dan titik leleh gel

Agarose	Titik pembentukan gel (°C)	Titik leleh (°C)
1	36,6	86,4
2	36,5	85,0
3	36,6	87,1
Rata-rata	36,56	86,16

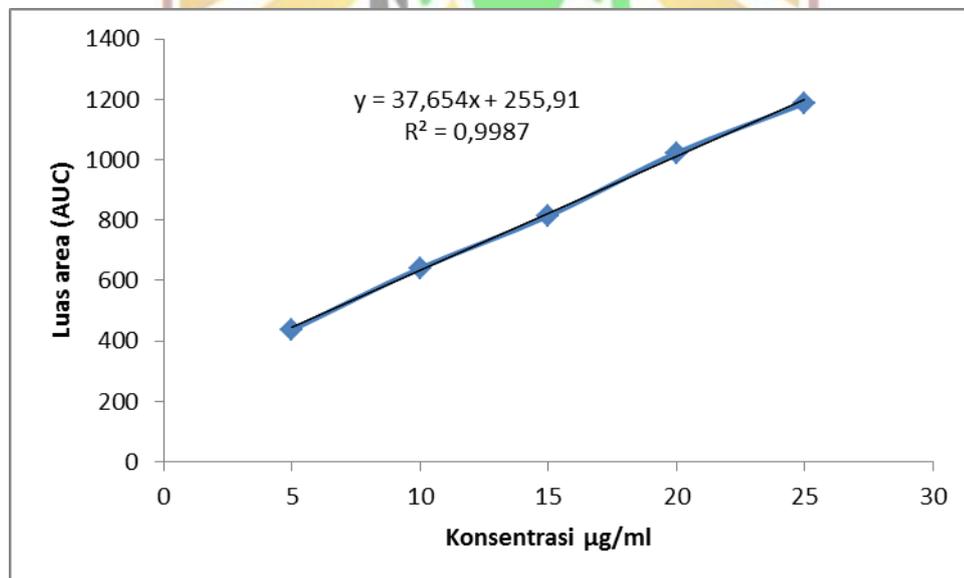
Tabel 9. Kekuatan gel

Agarosa		Kekuatan gel (g/cm ²)	Rata-Rata (g/cm ²)
Standar	I	1643	1646
	II	1598	
	III	1698	
1	I	1549	1545
	II	1564	
	III	1522	
2	I	1555	1559
	II	1572	
	III	1550	
3	I	1498	1528
	II	1540	
	III	1546	

LAMPIRAN 1. Lanjutan

Tabel 10. Data hasil analisis larutan standar tartrazin dengan metode TLC-Scanner

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Luas Area (AUC)
1	5	437,3
2	10	641,1
3	15	814,4
4	20	1023,2
5	25	1187,6



Gambar 4. Kurva kalibrasi larutan tartrazin dalam pelarut etanol 70% terhadap luas area masing-masing dengan metoda KLT-Densitometri

LAMPIRAN 1. Lanjutan

Tabel 11. Data Perhitungan LOD dan LOQ Dari Larutan Tartrazin Standar dengan Metoda TLC-Scanner

No	Konsentrasi (µg/ml)	Luas area (y)	(yi)	(yi-y) ²
1	5	437.3	444.1	46.24
2	10	641.1	632.4	75.69
3	15	814.4	820.7	39.69
4	20	1023.2	1008.9	204.49
5	25	1187.6	1197.2	92.16
Total				458.27
n				5
SDr				12.3594
LOD				0.9847
LOQ				3.2823



LAMPIRAN 1. Lanjutan

Tabel 12. Data presisi *Inter-day* tartrazin

Konsentrasi (µg/ml)	Pengulangan	Luas Area	Kadar (y)	Kadar rata-rata (yi)	(y-yi) ²	SD	RSD (%)
10	1	711.2	12,0914	11.6107	0,2310	0,5348	4,6060
	2	671.4	11,0344		0.3321		
	3	696.7	11,7063		0.0091		
15	1	921,9	17,6870	18.2624	0.3310	0,5016	2,7466
	2	956.6	18,6086		0,1198		
	3	952,2	18,4917		0,0525		
20	1	1030,1	20,5606	20,6694	0,0118	0,2432	1,1766
	2	1027,8	20,4995		0,0288		
	3	1044,7	20,9483		0,0777		

Tabel 13. Data presisi *Intra-day* tartrazin

Konsentrasi (µg/ml)	Hari ke-	Luas Area	Konsentrasi (µg/ml)	Rata-rata Konsentrasi	SD	RSD (%)
10	1	649,0	10,4395	10,3239	0,1009	0,9773
	2	641,9	10,2509			
	3	643,3	10,2815			
15	1	856,4	15,9475	18,2403	1,9861	10,8885
	2	987,7	19,4345			
	3	984,1	19,3389			
20	1	1130,2	23,2190	20,9164	1,9972	9,5484
	2	1004,4	19,8781			
	3	995,9	19,6523			

LAMPIRAN 1. Lanjutan

Tabel 14. Hasil analisis larutan tartrazin dengan metoda TLC Scanner setelah diserap agarose selama 60 menit pada suhu ruangan.

Konsentrasi (µg/ml)	Pengulangan	Suasana asam			Suasana basa		
		Luas area	Luas area rata-rata	Kadar (µg/ml)	Luas area	Luas area rata-rata	Kadar (µg/ml)
5	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
10	1	-	-	-	460,2	480,8	5,9725
	2	-	-	-	487,2		
	3	-	-	-	495,1		
15	1	474,4	478,3	5,9061	693,3	693,9	11,6319
	2	481,3			718,5		
	3	479,3			669,9		
20	1	655,2	656,8	10,6466	870,1	875,1	16,4450
	2	658,0			892,6		
	3	647,4			862,7		
25	1	835,8	834,7	15,3719	1146,6	1106,9	22,6002
	2	835,2			1098,8		
	3	833,1			1075,3		

Ket : (-) : Tidak terdeteksi pada TLC Scanner

LAMPIRAN 1. Lanjutan

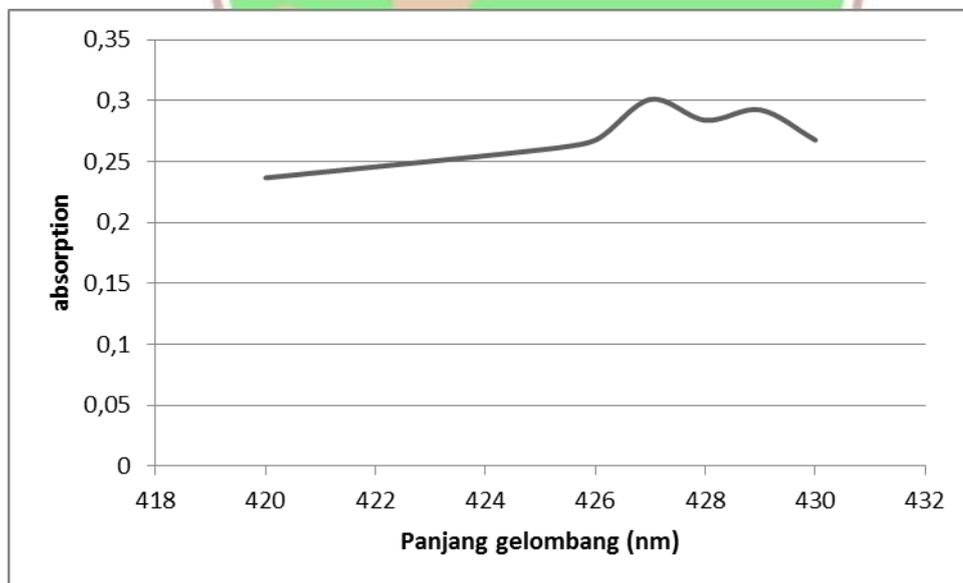
Tabel 15. Hasil analisis larutan tartrazin dengan metoda TLC Scanner setelah diserap agar selama 60 menit pada suhu ruangan.

Konsentrasi (µg/ml)	Pengulangan	Suasana asam			Suasana basa		
		Luas area	Luas area rata-rata	Kadar (µg/ml)	Luas area	Luas area rata-rata	Kadar (µg/ml)
5	1	433,2	430,0	4,6234	439,4	432,7	4,6951
	2	421,9			431,2		
	3	435,1			427,5		
10	1	602,5	611,8	9,4515	629,3	623,4	9,7596
	2	628,1			616,9		
	3	604,8			624,0		
15	1	793,2	800,6	14,4656	812,1	812,4	14,7790
	2	810,7			818,3		
	3	798,0			806,8		
20	1	985,6	991,7	19,5408	997,1	998,5	19,7214
	2	991,3			995,9		
	3	998,4			1002,5		
25	1	1101,4	1123,9	23,0517	1188,6	1190,6	24,8231
	2	1126,6			1194,1		
	3	1143,9			1189,3		

LAMPIRAN 1. Lanjutan

Tabel 16. Hasil penghitungan kadar tartrazin yang diserap dengan metoda TLC Scanner selama 60 menit pada suhu ruangan.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Kadar tartrazine (mg) yang terserap dalam agarose \pm 5 mg		Kadar tartrazine (mg) yang terserap dalam agar \pm 5 mg	
	Suasana asam	Suasana basa	Suasana asam	Suasana basa
5	0,0500	0,0500	0,0038	0,0031
10	0,1000	0,0403	0,0055	0,0025
15	0,0910	0,0337	0,0054	0,0023
20	0,0936	0,0356	0,0046	0,0028
25	0,0963	0,0240	0,0195	0,0018

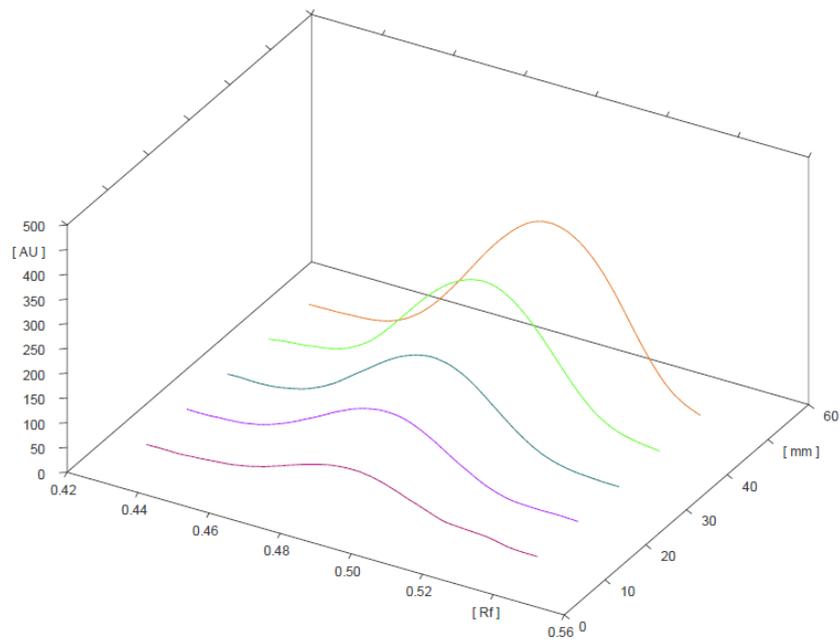


Gambar 5. Spektrum Visible tartrazin konsentrasi 8 $\mu\text{g/ml}$ dalam pelarut etanol 70% dengan λ max 427 nm dengan serapan 0,301

LAMPIRAN 1. Lanjutan

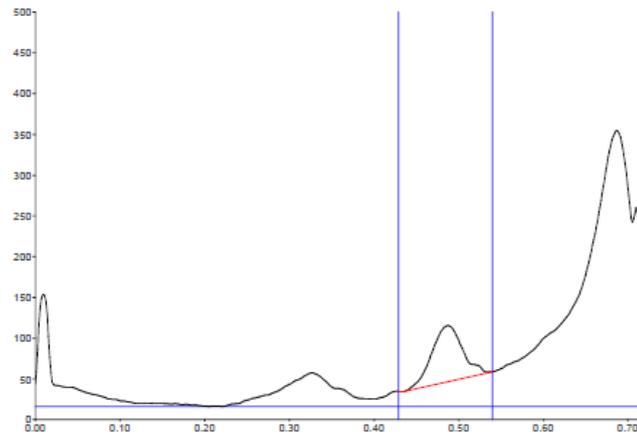


Gambar 6. Pola KLT optimasi fase gerak dengan metanol : DCM (3:7) + 0,5 ml asam asetat glasial dan fase diam silika gel GF₂₅₄

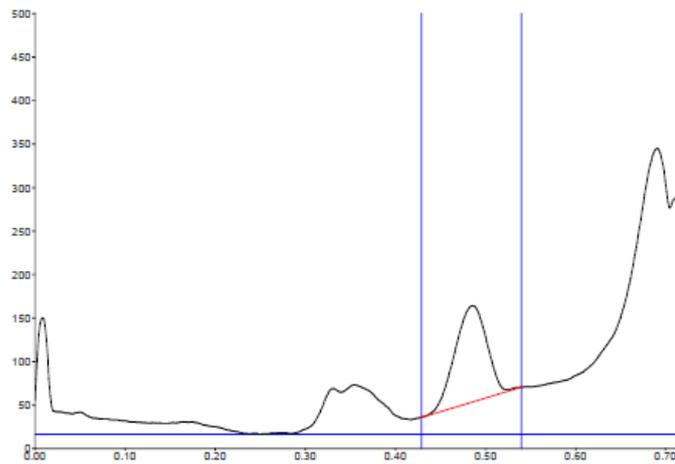


Gambar 7. Peak area larutan tartrazin standar dalam ordinat x,y dan z

LAMPIRAN 1. Lanjutan

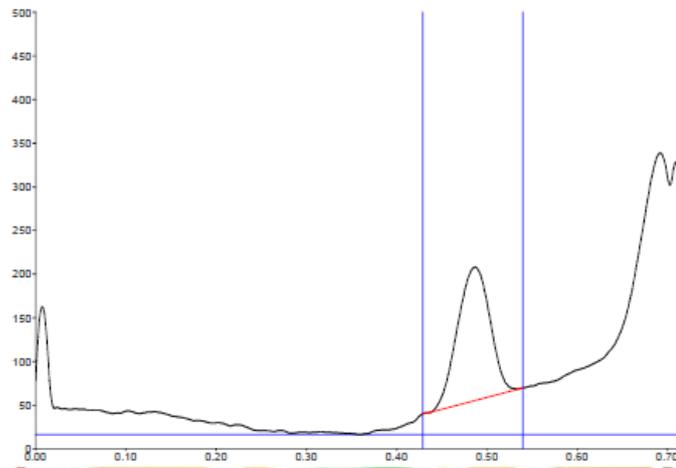


Gambar 8. Densitogram tartrazin konsentrasi 5 µg/ml dalam etanol 70%

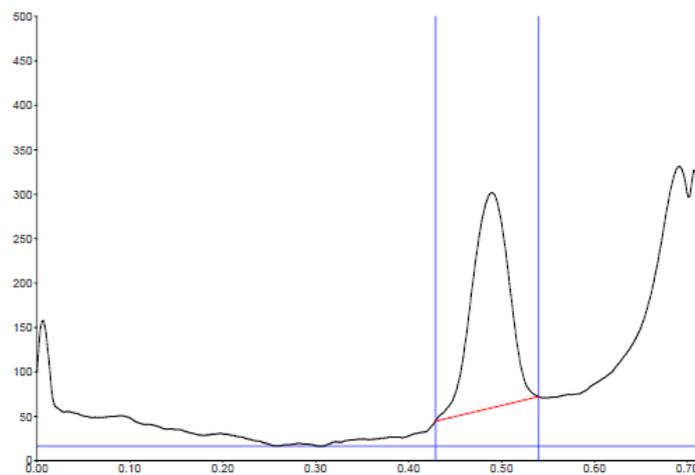
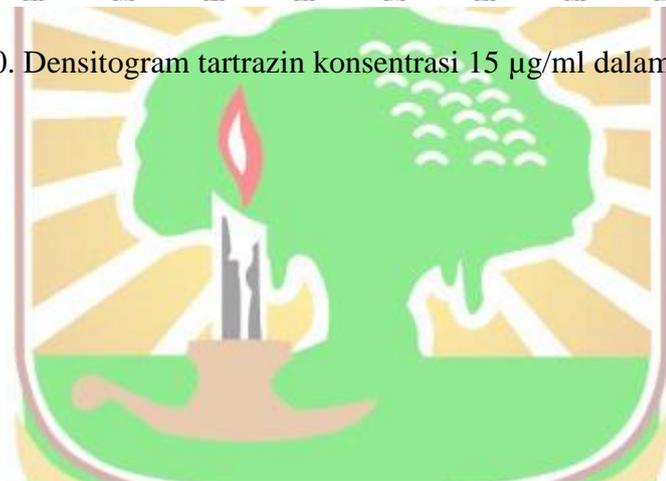


Gambar 9. Densitogram tartrazin konsentrasi 10 µg/ml dalam etanol 70%

LAMPIRAN 1. Lanjutan

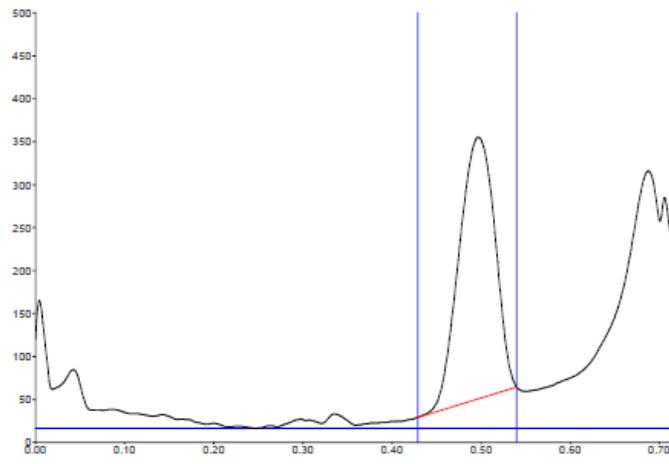


Gambar 10. Densitogram tartrazin konsentrasi 15 µg/ml dalam etanol 70%



Gambar 11. Densitogram tartrazin konsentrasi 20 µg/ml dalam etanol 70%

LAMPIRAN 1. Lanjutan



Gambar 12. Densitogram tartrazin konsentrasi 25 µg/ml dalam etanol 70%



LAMPIRAN 2. Contoh Perhitungan Data

1. Perhitungan rendeman agarosa

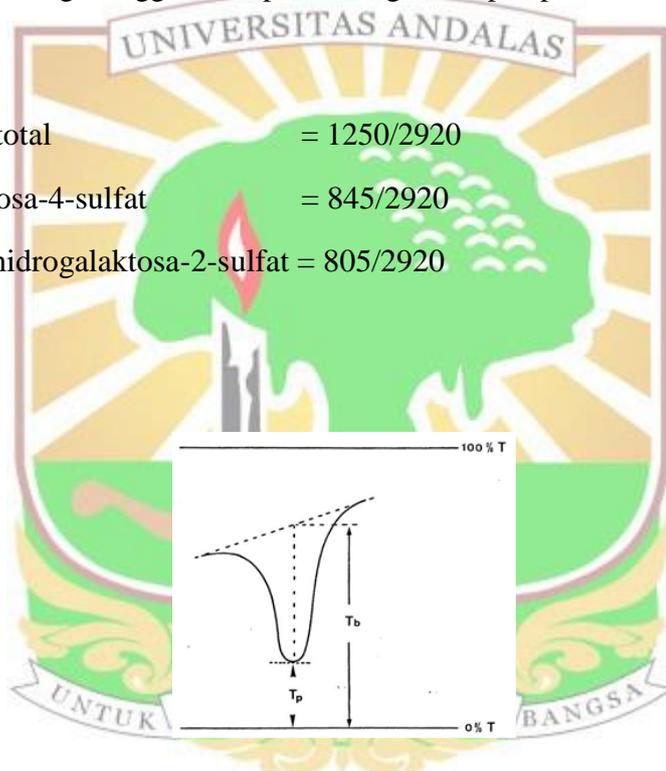
$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat yang diperoleh (gram)}}{\text{Berat awal (gram)}} \times 100\%$$

$$\% \text{Rendemen} = \frac{6,598}{9,850} \times 100\% = 66,98 \%$$

2. Perhitungan kadar sulfat

Kadar sulfat dihitung menggunakan perbandingan serapan pada bilangan gelombang tertentu.

- a. Sulfat total = 1250/2920
- b. Galaktosa-4-sulfat = 845/2920
- c. 3,6-anhidrogallaktosa-2-sulfat = 805/2920



Gambar 12. Pengukuran kadar sulfat (Rochas et al, 1986)

$$A (\text{Absorban}) = \text{Log } T_b/T_p$$

- $A_{2920} = \log T_b/T_p$
 $= \log 10,1/8,52$
 $= \log 1,185$
 $= 0,074$

LAMPIRAN 2. Lanjutan

- $A_{1250} = \log T_b/T_p$

$$= \log 11/10,7$$

$$= \log 1,028$$

$$= 0,012$$

- $A_{845} = \log T_b/T_p$

$$= \log 12/11,25$$

$$= \log 1,067$$

$$= 0,028$$

- $A_{805} = \log T_b/T_p$

$$= \log 12,25/12$$

$$= \log 1,02$$

$$= 0,00895$$

a. Sulfat total = A_{1250}/A_{2920}

$$= 0,012/0,074$$

$$= 0,162$$

b. Galaktosa-4-sulfat = A_{845}/A_{2920}

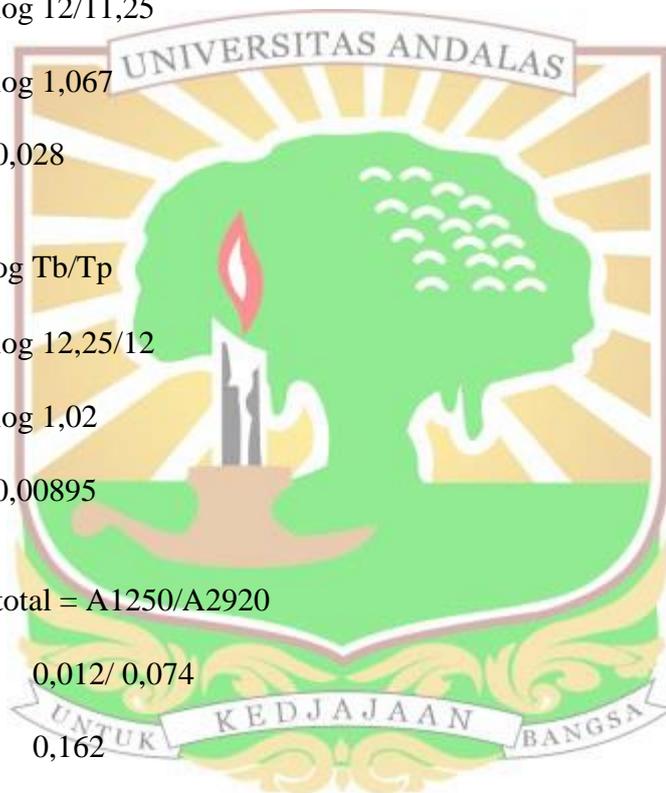
$$= 0,028/0,074$$

$$= 0,38$$

c. 3,6-anhidrogalktosa-2-sulfat = A_{805}/A_{2920}

$$= 0,0089/0,074$$

$$= 0,12$$



LAMPIRAN 2. Lanjutan

3. Perhitungan kekuatan gel

Kekuatan gel diukur menggunakan alat *CT3 Texture Analyzer Brookfield*, dengan diameter probe 6 mm (jari-jari 3 mm). luas permukaan kontak 28,26 mm². Peak load yang terbaca pada alat:

I. 439,4 g

Luas permukaan kontak = 3,14 x 3 mm x 3 mm = 28,26 mm²

Kekuatan gel = peak load (g)/luas permukaan kontak (mm²)

$$\begin{aligned} &= 439,4 \text{ g}/28,26 \text{ mm}^2 \\ &= 15,55 \text{ g}/\text{mm}^2 \text{ (} 1 \text{ mm}^2 = 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{)} \\ &= 1555 \text{ g}/\text{cm}^2 \end{aligned}$$

II. 444,24 g

Luas permukaan kontak = 3,14 x 3 mm x 3 mm = 28,26 mm²

Kekuatan gel = peak load (g)/luas permukaan kontak (mm²)

$$\begin{aligned} &= 444,24 \text{ g}/28,26 \text{ mm}^2 \\ &= 15,72 \text{ g}/\text{mm}^2 \text{ (} 1 \text{ mm}^2 = 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{)} \\ &= 1572 \text{ g}/\text{cm}^2 \end{aligned}$$

III. 438,03 g

Luas permukaan kontak = 3,14 x 3 mm x 3 mm = 28,26 mm²

Kekuatan gel = peak load (g)/luas permukaan kontak (mm²)

$$\begin{aligned} &= 438,03 \text{ g}/28,26 \text{ mm}^2 \\ &= 15,50 \text{ g}/\text{mm}^2 \text{ (} 1 \text{ mm}^2 = 10^{-2} \text{ cm}^2 \text{)} \\ &= 1550 \text{ g}/\text{cm}^2 \end{aligned}$$

LAMPIRAN 2. Lanjutan

4. Perhitungan nilai Rf

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh analit}}{\text{Jarak Pengembangan}}$$

$$Rf = \frac{2,4 \text{ cm}}{5 \text{ cm}} = 0,48$$

5. Perhitungan LOD dan LOQ

- Standar Deviasi Residual (SDr)

$$SDr = \sqrt{\frac{\Sigma(y - y_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{458,27}{3}} = 12,3594$$

- Limit Of Detection (LOD)

$$LOD = \frac{3 \times SDr}{\text{slope (b)}} = \frac{3 \times 12,3594}{37,654} = 0,9847 \mu\text{g/ml}$$

- Limit Of Quantitation (LOQ)

$$LOQ = \frac{10 \times 12,3594}{37,654} = 3,2823 \mu\text{g/ml}$$

6. Perhitungan kadar tartrazin yang terserap agarosa

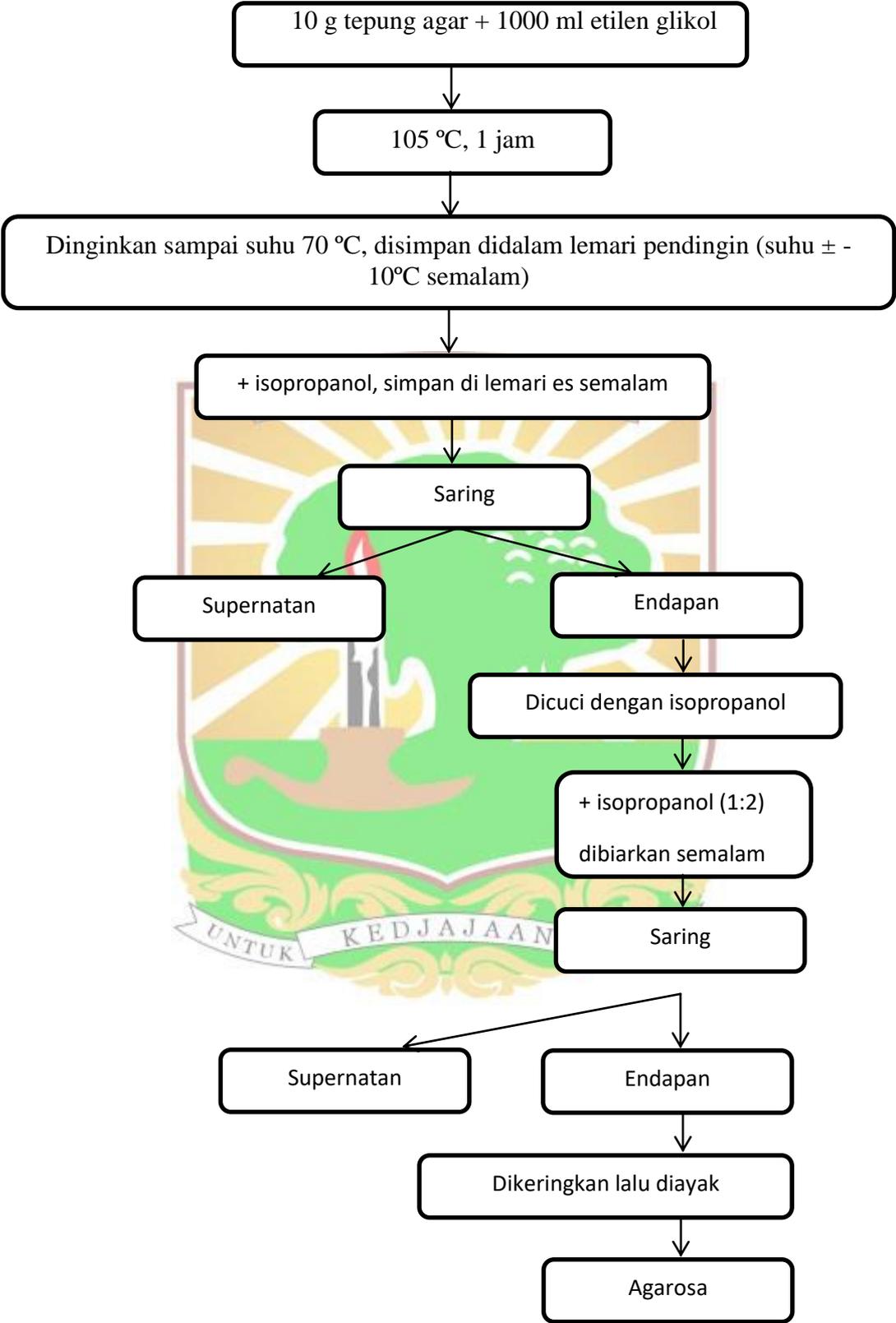
$$\text{Jumlah tartrazine} = (\text{konsentrasi awal } (\mu\text{g/ml}) - \text{kadar tartrazin}) \times 10 \text{ ml (dalam 10 ml)}$$

$$= (15 (\mu\text{g/ml}) - 5,9061 (\mu\text{g/ml})) \times 10 \text{ ml}$$

$$= 91,039 (\mu\text{g/ml})$$

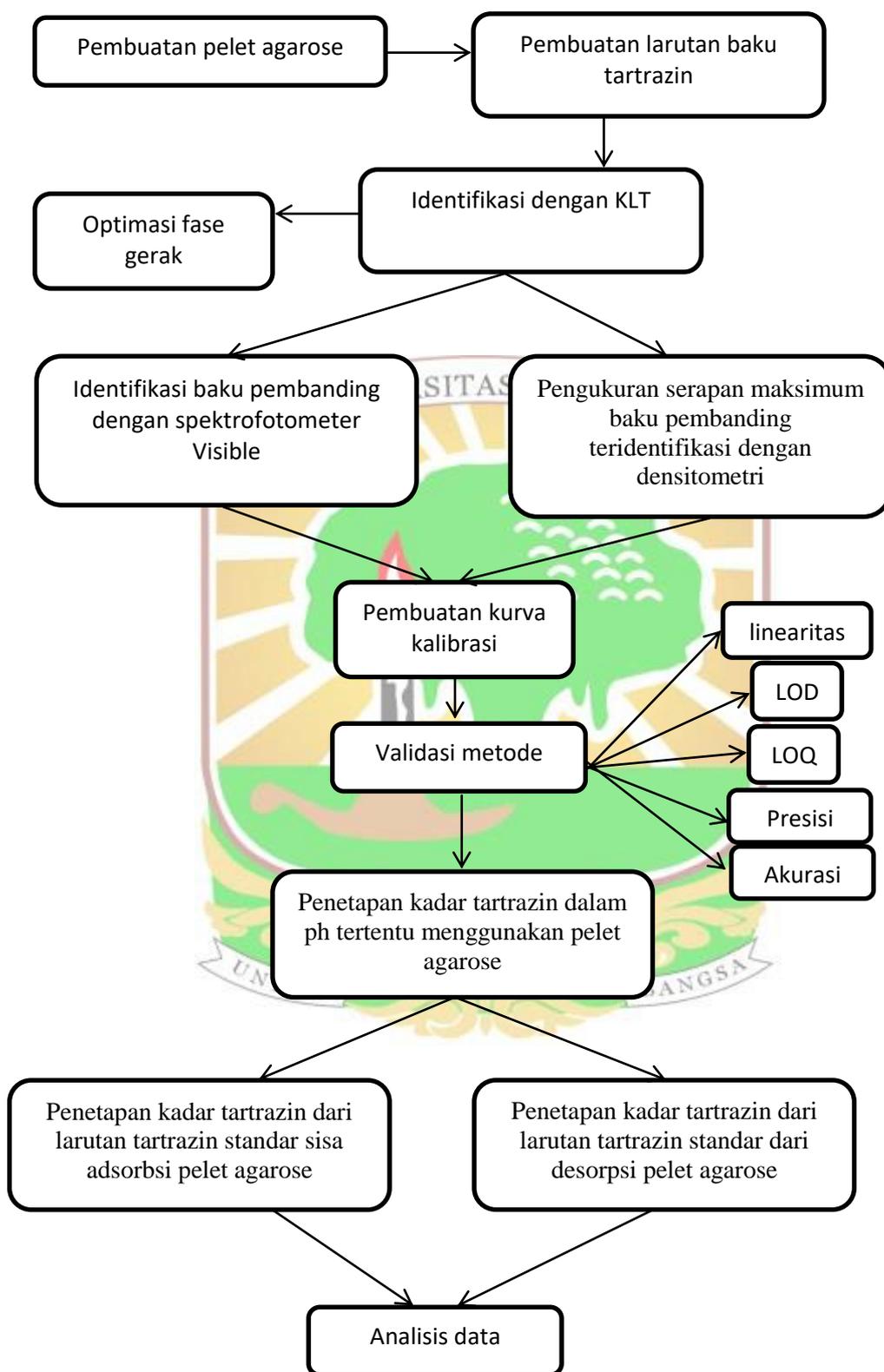
$$= 0,0910 \text{ mg}$$

LAMPIRAN 3. Gambar Penunjang



Gambar 13. Skema kerja isolasi agarosa

LAMPIRAN 3. Lanjutan



Gambar 14. Skema kerja pengukuran kadar tartrazin

LAMPIRAN 3. Lanjutan



Gambar 15. Agar yang telah larut dalam etilen glikol



Gambar 16. Setelah ditambah isopropil alkohol



Gambar 17. Agarosa hasil isolasi

LAMPIRAN 3. Lanjutan

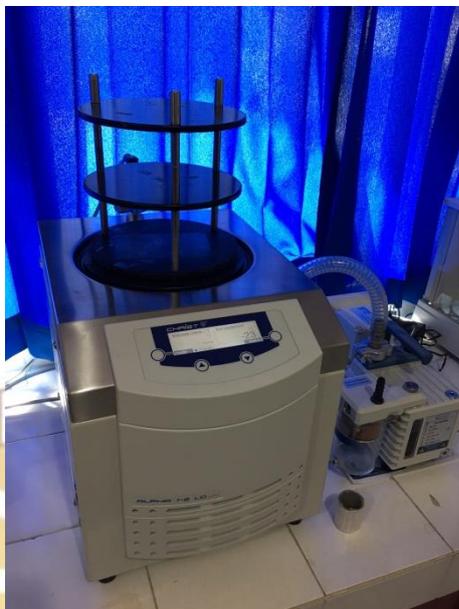


Gambar 18. Pelet agarosa kering



Gambar 19. Pelet agarosa yang sudah di rendam

LAMPIRAN 3. Lanjutan



Gambar 20. Alat Freeze Drying



Gambar 19. Alat TLC Scanner

Gambar 21. Alat TLC Scanner