

**VALIDASI METODE ANALISIS RHODAMIN-B PADA SAOS TOMAT MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

**VALIDATION OF RHODAMINE-B ANALYSIS METHODS ON TOMATO SAUCE USING
UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY**

Ana Rois Fata Bimala¹⁾, Tika Indrasari²⁾, Vevi Maritha³⁾

Prodi S1 Farmasi, STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun
Email: anaroisfatabimala24@gmail.com¹⁾, tikaindra18@gmail.com²⁾,
vv.maritha@gmail.com³⁾

ABSTRAK

Validasi metode analisis adalah untuk memastikan bahwa metode yang digunakan sudah memenuhi syarat untuk aplikasi analisis dan dapat dipertanggung jawabkan. Validasi perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan telah optimal dan memiliki validitas yang baik sehingga hasil yang diperoleh dapat dipercaya dan dipertanggungjawabkan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum pada Spektrofotometri UV-Vis, metode validasi yang dilakukan kondisi optimasi sudah memenuhi persyaratan, metode validasi dapat digunakan pada sampel serta mengetahui kadar kadar Rhodamin-B pada sampel saos tomat. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun menggunakan 3 sampel saos tomat. Penentuan kondisi optimum dilakukan pada konsentrasi 2 ppm menggunakan 3 pelarut yang berbeda. Persyaratan validasi metode analisis meliputi linearitas, akurasi dan presisi dan penentuan kadar Rhodamin-B pada sampel. Hasil kondisi optimum Spektrofotometri UV-Vis menggunakan pelarut aquadest. Validasi metode linearitas dengan nilai $r = 0,991$, akurasi pada rentang 80-110% dan %RSD presisi 0,63% < 2% yang dinyatakan telah memenuhi persyaratan validasi. Kandungan Rhodamin-B sampel A sebesar 4,90 mg/L, sampel B sebesar 4,71 mg/L dan sampel C sebesar 8,35 mg/L.

Kata Kunci: Rhodamin-B, saos tomat, Spektrofotometri UV-Vis, validasi metode

ABSTRACT

Validation of the analysis method is to ensure that the method used is qualified for the application of analysis and can be accounted for. Validation needs to be carried out to ensure that the method used is optimal and has good validity so that the result obtained can be trusted and accounted for. The purpose of this study was to determine the optimum conditions for UV-Vis spectrophotometry, the validation method carried out under optimization conditions had met the requirements, the validation method could be used on the sample and was to determine the levels of Rhodamine-B in tomato sauce samples. The research is an experimental research conducted at the integrated Chemistry Laboratory of STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun uses 3 samples of tomato sauce circulating in the Sepanjang market. Determination of optimum conditions was carried out at a concentration of 2 ppm using 3 different solvents. Validation requirements include linearity, accuracy and precision and determination of Rhodamine-B levels in the sample. The results on the optimum conditions of UV-Vis Spectrophotometry using aquadest solvent. Validation of the linearity method with a value of $r = 0,991$, accuracy in the range of 80-110% and %RSD precision 0,63% < 2% which is declared to have met the validation requirements. The content of Rhodamine-B contained for sample A 4,90 mg/L, sample B of 4,71 mg/L and sample C of 8,35 mg/L.

Keywords: Rhodamine-B, tomato sauce, UV-Vis Spectrophotometry, method validation.

Ana Rois Fata Bimala., Tika Indrasari., dkk

VALIDASI METODE ANALISIS RHODAMIN-B PADA SAOS TOMAT...

PENDAHULUAN

Makanan adalah hal yang sangat penting dalam kehidupan, maka dari itu makanan yang kita makan harus memenuhi gizi dan memiliki bentuk yang menarik, akan tetapi juga harus aman yang diartikan tidak terdapat mikroorganisme maupun bahan kimia yang bisa mengakibatkan beberapa keracunan penyakit. Industri makanan ataupun minuman kemasan yang ada di Indonesia sekarang berkembang dengan sangatlah pesat. Semakin banyak bahan makanan maka akan semakin banyak cita rasa pada makanan itu sendiri. Salah satu bahan makanan yang masih banyak digemari dan dikonsumsi di kalangan masyarakat adalah saus (Geovani dkk, 2017).

Saus merupakan sediaan berbentuk pasta yang terbuat dari beberapa bahan-bahan yang seperti buah atau sayuran yang memiliki bau dan cita rasa khas. Warna adalah salah satu tolak ukur yang dapat menunjukkan mutu makanan, antara lain warna mampu memberikan indikasi perihal perubahan kimia pada makanan, mempengaruhi rasa, menyebabkan dampak terhadap masyarakat dalam menentukan makanan dan minuman (Giovani dkk, 2017). Saat ini masih banyak dijumpai penggunaan pewarna sintetis yang disalahgunakan sebagai bahan makanan misalnya zat pewarna tekstil untuk mewarnai bahan makanan. Salah satu bahan tambahan makanan nan sangat berbahaya bagi kesehatan adalah Rhodamin-B (Winarti, 2019).

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode pengujian Rhodamin-B yang dapat dilakukan dengan mudah dan murah. Spektrofotometri UV-Vis memiliki keunggulan antara lain dapat digunakan untuk menganalisis zat organik dan anorganik, selektif, mempunyai ketelitian yang tinggi dengan kesalahan relatif sebesar 1% – 3%, dapat dilakukan secara cepat dan tepat, hasil yang diperoleh cukup akurat serta bisa digunakan untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil (Elliawati, 2015). Paramater pengukuran validasi antara lain adalah presisi, akurasi dan linearitas.

Tujuan dari memvalidasi metode untuk memastikan bahwa metode yang digunakan sudah memenuhi syarat untuk aplikasi analisis dan dapat dipertanggung jawabkan (Cicik dkk, 2017). Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui kondisi optimum analisis Rhodamin-B pada saos tomat menggunakan Spektrofotometri UV-Vis, untuk mengetahui kondisi yang optimum analisis Rhodamin-B yang terkandung dalam saos tomat menggunakan Spektrofotometri UV-Vis memenuhi persyaratan validasi (linearitas, akurasi dan presisi), untuk mengetahui apakah metode tervalidasi dapat digunakan pada saos tomat menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan untuk mengetahui kadar Rhodamin-B yang terkandung dalam saos tomat.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan yaitu baku Rhodamin-B, HCl, etanol PA, aquadest, Na-sulfat anhidrat dan sampel saos tomat. Alat yang digunakan spektrofotometri UV-Vis, kuvet, timbangan analitik, labu ukur, beakerglass, corong, mikropipet, gelas ukur, cawan dan batang pengaduk. Lokasi penelitian dilakukan pada Laboratorium Kimia Terpadu di Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bhakti Husada Mulia Madiun.

1. Penentuan Kondisi Optimasi

Kondisi optimasi larutan Rhodamin-B dilakukan pada konsentrasi 2 ppm dengan 3 pelarut yang berbeda yaitu menggunakan pelarut aquadest, etanol PA dan HCl 0,1 N dengan cara mengambil larutan masukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan diperoleh λ maksimum.

2. Pembuatan Larutan Induk 1000 ppm

Ditimbang 10 mg standar Rhodamin-B menggunakan timbangan analitik lalu dilarutkan dengan aquadest. Lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 mL

dan tambahkan aquadest sampai batas tanda.

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan konsentrasi 2 ppm sebanyak 10 mL yang di encerkan dari larutan induk 1000 ppm yang sudah dibuat sebelumnya. Ambil 20 μ L dimasukkan ke labu ukur 10 mL lalu tambahkan aquadest sampai tanda batas. Kemudian masukkan ke dalam kuvet dengan menggunakan blanko aquadest. Rentang panjang gelombang yang digunakan yaitu 400-800 nm. Puncak maksimum yang dihasilkan dari Spektrofotometri UV-Vis merupakan panjang gelombang maksimum dari Rhodamin-B.

4. Pembuatan Kurva Baku

Dibuat larutan baku dari larutan induk 1000 ppm dengan konsentrasi sebesar 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm dan 2,5 ppm dengan dipipet 12,5 μ L, 25 μ L, 37,5 μ L, 50 μ L dan 62,5 μ L kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas. Lalu diukur absorbansinya pada Spektrofotometri UV-Vis dan dibuat persamaan regresi linier $y = bx + a$. Dilakukan replikasi 3 kali.

5. Validasi Metode Analisis

a. Linearitas

Dibuat larutan baku dari larutan induk 1000 ppm dengan konsentrasi sebesar 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm dan 2,5 ppm dengan dipipet 12,5 μ L, 25 μ L, 37,5 μ L, 50 μ L dan 62,5 μ L kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas. Dilakukan replikasi 3 kali. Kurva kalibrasi yang dibuat lalu ditentukan persamaan regresi linier dan koefisien korelasi untuk mendapatkan nilai linieritas yang baik. Linearitas yang baik jika nilai koefisien korelasi mendekati atau samadengan 1.

b. Presisi

Presisi dilakukan dengan cara diambil larutan baku dengan konsentrasi 2 ppm dimasukkan ke dalam kuvet lalu

diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan diulangi sebanyak 6 kali (Riyanto, 2017). Presisi dikatakan memenuhi persyaratan jika nilai %RSD ≤ 2 .

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan

SD : Standar deviasi

RSD : Simpangan Baku Relatif

$\bar{x}$: Rata-rata

c. Akurasi

Akurasi dilakukan dengan cara diambil konsentrasi larutan baku sebesar 1,6 ppm, 2 ppm dan 2,4 ppm dengan dipipet 40 μ L, 50 μ L dan 60 μ L kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL lalu ditambahkan aquadest sampai tanda batas. Lalu diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Pengujian akurasi dilakukan replikasi 3 kali pada setiap konsentrasi untuk menentukan (%recovery). Syarat akurasi yang baik jika nilai (%recovery) pada rentang 80-110%.

$$\%recovery = \frac{kadar\ terukur}{kadar\ sebenarnya} \times 100\%$$

6. Penetapan Kadar Rhodamin-B

Ditimbang 2 gram sampel saus dimasukkan ke cawan lalu ditambahkan 16 tetes HCl 4 M dan 20 mL aquadest kemudian di aduk ad homogen. Larutan disaring dengan menggunakan kertas saring dan pada bagian atasnya ditambahkan natrium sulfat anhidrat. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam labu ukur sampai tanda batas. Larutan di homogenkan lalu diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis lalu dilakukan replikasi 3 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penentuan Kondisi Optimasi

Kondisi optimasi merupakan kondisi tertinggi atau terbaik tanpa merusak unsur yang terdapat dalam larutan. Parameter yang digunakan yaitu kadar pelarut mencari lamda maksimum menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Pada larutan Rhodamin-B menggunakan

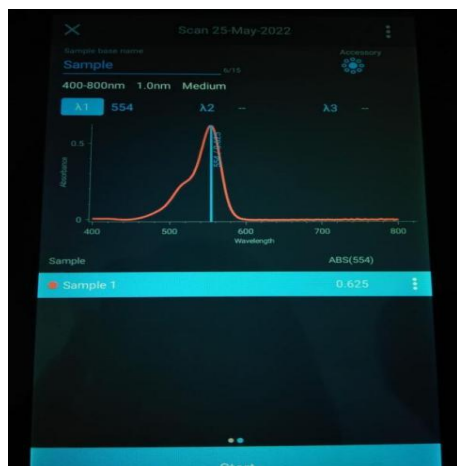
pelarut aquadest, HCl 0,1 N dan etanol PA yang dilakukan pada konsentrasi 2 ppm yang dibuat dari larutan induk 1000 ppm pada panjang gelombang 400-800 nm dan dihasilkan lamda maksimum masing-masing sebagai berikut :

Pelarut	Panjang λ Maks (nm)	Absorbansi
Aquadest	554	0,640
Etanol PA	543	0,569
HCl 0,1 N	557	0,518

Berdasarkan hasil kondisi optimasi pelarut aquadest, etanol PA dan HCl 0,1 N pelarut yang digunakan adalah aquadest karena pada hukum *Lambert Beer* rentang absorbansi yang digunakan pada Spektrofotometri UV-Vis antara 0,2 - 0,8. Hasil dari ke tiga pelarut yang termasuk dalam hukum *Lambert Beer* dan memiliki absorbansi yang paling tertinggi yaitu aquadest sebesar 0,640 maka dari itu aquadest digunakan untuk pelarut dalam penelitian ini.

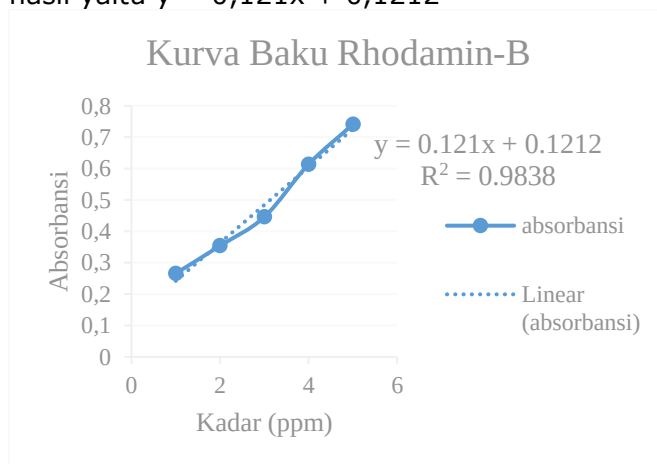
2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Larutan baku 2 ppm diamati menggunakan Spektrofotometri UV-vis lamda maksimal 400-800 nm dengan menggunakan blanko aquadest. Pada larutan tersebut memiliki puncak serapan dengan nilai 554 nm. Maka dari itu, sesuai dengan penelitian Giovani dkk (2017) dan Rahmadhi (2021) bahwa panjang gelombang Rhodamin-B bisa di analisis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm.



3. Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku Rhodamin-B diperoleh dari perbandingan konsentrasi standar Rhodamin-B dan absorbansi pada panjang gelombang maksimum sehingga didapatkan persamaan regresi linear dimana konsentrasi yang digunakan yaitu 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm dan 2,5 ppm dengan menggunakan pelarut aquadest. Persamaan regresi linear dari perbandingan konsentrasi standar Rhodamin-B dan absorbansi diperoleh hasil yaitu $y = 0,121x + 0,1212$



4. Validasi Metode Analisis

a. Linearitas

Tujuan dari uji linearitas adalah untuk mengetahui apakah konsentrasi zat yang akan di analisis menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis mempunyai hubungan yang linear atau tidak secara signifikan (Rohmah dkk, 2021). Berdasarkan hasil kurva baku yang dapat dilihat pada gambar diperoleh nilai koefisien korelasi (r) = 0,99. Linearitas dapat diterima jika nilai (R^2) mendekati 1 (SNI, 2021). Hal ini menunjukkan bahwa analisis Rhodamin-B menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis mempunyai linearitas yang baik karena adanya hubungan antara konsentrasi dan nilai absorbansi.

b. Presisi

Presisi adalah ukuran derajat keterulangan metode analisis yang memberikan hasil sama pada beberapa pengulangan (Dian, 2016). berdasarkan data pada tabel 5.3 diperoleh *Relative Standard Deviation* (RSD) sebesar 0,63%. *Relative Standard*

Deviation (RSD) pada uji presisi ini memenuhi persyaratan karena berdasarkan literatur keterulangan yang baik bila nilai $\%RSD \leq 2\%$. Penyimpangan yang terjadi masih dalam rentang yang diizinkan dan dapat dikatakan bahwa metode yang digunakan memiliki keterulangan yang baik. Semakin kecil nilai $\%RSD$ yang diperoleh maka semakin tepat analisis yang dilakukan dan semakin baik digunakan untuk analisis suatu senyawa (Rohmah dkk, 2021).

Konsentrasi	Pengulangan	Absorbansi	Kadar (ppm)	Rata-rata (Kadar)	SD	%RSD
2 ppm	1	0,660	4,45	4,40	0,028	0,63%
	2	0,657	4,42			
	3	0,655	4,41			
	4	0,656	4,41			
	5	0,652	4,38			
	6	0,651	4,37			

c. Akurasi

Uji akurasi ialah uji kedekatan hasil analisis dengan hasil analit yang sebenarnya (Rohmah dkk, 2021). Berdasarkan tabel dapat dilihat bahwa hasil uji perolehan kembali ($\%recovery$) untuk Rhodamin-B masuk pada rentang 80-110%. Hasil uji perolehan kembali ($\%recovery$) ini memenuhi syarat akurasi yang telah ditetapkan pada rentang 80 - 110% (Rohmah dkk, 2021). Dapat disimpulkan penelitian ini uji perolehan kembali ($\%recovery$) dapat diterima dan memenuhi persyaratan.

Konsentrasi	Kadar Konsentrasi	Absorbansi	Kadar Terukur	Nilai Akurasi	Rata-rata
80%	1,6 ppm	0,475	-	-	98,2%
		0,473	2,90 ppm	99,3%	
		0,469	2,87 ppm	98,2%	
		0,466	2,84 ppm	97,2%	
100%	2 ppm	0,617	-	-	99,3%

120%	2,4 ppm	0,614	4,07 ppm	99,5%	98,2%
		0,611	4,04 ppm	98,7%	
		0,615	4,08 ppm	99,7%	
		0,673	-	-	
120%	2,4 ppm	0,668	4,51 ppm	98,9%	98,2%
		0,664	4,48 ppm	98,2%	
		0,660	4,45 ppm	97,5%	

5. Penetapan Kadar Rhodamin-B

Pada proses penyiapan larutan uji sampel ditambahkan pelarut HCl 4 M yang berfungsi untuk mendestruksi atau menghancurkan senyawa yang terdapat di dalam sampel dan menstabilkan Rhodamin-B agar tidak berubah dari bentuk terionisasi menjadi netral. Penambahan natrium sulfat anhidrat untuk menjernihkan larutan sehingga sumber cahaya dari Spektrofotometri UV-Vis dapat menembus larutan dan dapat diterima oleh detektor (Rahmadhi, 2021). Sampel yang paling tinggi mengandung Rhodamin-B adalah sampel C dengan kadar sebesar 8,35 mg/L. Sampel A mengandung Rhodamin-B dengan kadar sebesar 4,90 mg/L dan kadar Rhodamin-B paling kecil yaitu pada sampel B yaitu sebesar 4,71 mg/L. Dalam hal ini sesuai dengan hasil yang diperoleh dimana sampel C memiliki warna yang merah merona sehingga mempunyai kadar lebih tinggi dan sampel B yang memiliki warna oranye yang mempunyai kadar paling kecil.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan diatas, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Kondisi Optimum Spektrofotometri UV-Vis untuk analisis Rhodamin-B yaitu menggunakan pelarut aquadest.
2. Linearitas dengan nilai korelasi = 0,99 mendekati 1 bahwa memenuhi persyaratan. Presisi dengan nilai $\%RSD$ (*Relative Standard Deviation*) atau simpangan baku relatif sebesar 0,63% telah memenuhi persyaratan

dimana persyaratan kesesuaian sistem memiliki %RSD (*Relative Standard Deviation*) $\leq 2\%$. Akurasi (%*recovery*) masuk pada rentang 80-110% yang artinya telah memenuhi persyaratan dimana persyaratan (%*recovery*) pada rentang 80 - 110%.

3. Validasi metode analisis dapat digunakan pada saus tomat menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.
4. Kandungan Rhodamin-B yang terdapat pada sampel saus tomat untuk sampel A sebesar 4,90 mg/L, sampel B sebesar 4,71 mg/L dan sampel C sebesar 8,35 mg/L dimana sampel C memiliki kadar Rhodamin-B yang paling tinggi dibandingkan dengan sampel A dan B.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan kali ini peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu terwujudnya penelitian ini :

1. Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bhakti Husada Mulia Madiun.

DAFTAR PUSTAKA

- Cicik, Herliana Y., Vika Ayu D., Hanny, Ferry. 2017. Validasi Metode Spektrofotometri untuk Penentuan Kadar Formaldehid pada Pembalut Wanita yang Beredar Di Pasaran. *Journal Ilmiah Pharmacy of Science*. Surabaya: Akademi Farmasi Surabaya, Universitas Airlangga. Vol. 2, No. 1, Hal. 9-16.
- Giovani, M.B Longdong, Jemmy Abidjulu, Novel S. Kojong. 2017. *Analisis Zat Pewarna Rhodamin-B Pada Saos Bakso Tusuk Yang Beredar Di Sekitar Kampus Universitas Sam Ratulangi Manado*. Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT Vol. 6 No. 4 ISSN 2302-2493.
- Hasibuan, Elliawati. 2015. Pengenalan Spektrofotometer pada Mahasiswa yang Melakukan Penelitian di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran USU. *Skripsi*. Medan: Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatra Utara.
- Rahmadhi, Mohamad Afif. 2021. Analisis Rhodamin-B pada Saos yang Beredar di Sekitar STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Spektrofotometri UV-Vis. *Skripsi*. Madiun: STIKES Bhakti Husada Mulia.
- Riyanto. 2017. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*. Jakarta. Deepublish. ISBN 978-Nomor ISBN.
- Rohmah, Siti Awwalul Amanatur. Afidatul Muadifah. Rahma Diyan Martha. 2021. Validasi Metode Penetapan Kadar Pengawet Natrium Benzoat pada Sari Kedelai di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Tulungagung Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Sains Kes 2021 Vol 3 No. 2*
- SNI (Standar Nasional Indonesia). Cara Uji Bahan Pengawet Makanan dan Bahan Tambahan yang Dilarang untuk Makanan, Pusat Standarisasi Industri Departemen Perindustrian, 01-2894-1992.
- Winarti, A. T. 2019. Analisis Kadar Rhodamin-B Pada Saus Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Karya Tulis Ilmiah*. Madiun: Stikes Bhakti Husada Mulia.
- V, Maritha,. Kuncara Nata Wasita. 2017. Pengaruh Metode Analisis Tablet Pracetamol Terhadap Nilai Akurasi.