

4. PEMBAHASAN

Kunyit banyak dimanfaatkan sebagai bumbu maupun obat-obatan namun untuk memberikan penampilan yang lebih menarik dan bersih maka dicampur metanil yellow. Apabila kunyit bubuk dicampur dengan metanil yellow akan menyebabkan berkurangnya kandungan kurkumin, bersifat toksik, dan dapat menyebabkan masalah kesehatan (Mandal *et al.*, 2021). Diperlukannya alat deteksi seperti spektroskopi dan kromatografi dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan pemalsu karena instrumen tersebut tergolong sensitif dan akurat jika dibandingkan dengan menggunakan metode fisik (Bansal *et al.*, 2017).

Sampel yang digunakan dalam data penelitian ini berasal dari beberapa negara yaitu India, USA, dan Iran. Sebelum mengukur atau mendeteksi kadar metanil yellow pada kunyit dilakukan preparasi sampel dengan memberi larutan. Selanjutnya bubuk kunyit dan dengan massa yang telah tertentu dicampur, dilanjutkan dengan deteksi menggunakan alat uji berupa spektroskopi dan kromatografi.

Penggunaan massa sampel kunyit kromatografi lebih sedikit dibandingkan spektroskopi yaitu 0,01 sampai 0,5 gram. Penggunaan massa kunyit pada spektroskopi berkisar antara 1 sampai 3 gram. Sampel kunyit bubuk murni dicampur metanil yellow secara langsung maupun dengan menambahkan pelarut pada sampel. Kemudian sampel disiapkan dengan range konsentrasi metanil yellow berbeda.

Instrumen yang digunakan untuk deteksi metanil yellow dalam kurun waktu 5 tahun terakhir (2021-2017) lebih banyak menggunakan jenis NIR Spektroskopi. Jenis spektroskopi lain yang digunakan yaitu FT-MIR Spektroskopi, IR Spektroskopi, gabungan FT-Raman dan Raman *Spectral Imaging* spektroskopi, EIS, UV-vis spektroskopi. Jenis kromatografi yang digunakan untuk deteksi yaitu UHPLC.

4.1. Kemampuan Setiap Instrumen dalam Mendeteksi Konsentrasi Metanil Yellow Paling Rendah

FT-Raman dapat mendeteksi metanil yellow dengan konsentrasi 1% pada *wavenumber* 1406 cm^{-1} (Dhakal *et al.*, 2016). NIR spektroskopi mampu mendeteksi konsentrasi metanil yellow lebih dari 1% dan sampel dengan konsentrasi dibawah 1% tidak dapat dideteksi (Kar *et al.*, 2018). Pada penelitian (Rukundo *et al.*, 2020) mampu mendeteksi konsentrasi terkecil metanil yellow yaitu 1,1%. Apabila ingin mendeteksi konsentrasi metanil yellow dibawah 1,1% disarankan menggunakan metode kalibrasi spektral yang telah dimodifikasi. NIR spektroskopi mampu mendeteksi *limit of detection* 0,3% lebih sensitif jika dibandingkan dengan instrumen FT-IR dan FT-Raman (Kar *et al.*, 2018). Penelitian (Das *et al.*, 2019) EIS mampu mendeteksi konsentrasi terkecil metanil yellow sebesar 5%. Konsentrasi metanil yellow yang rendah menyebabkan penurunan konsentrasi ion dalam larutan. Variasi arus meningkat seiring peningkatan konsentrasi metanil yellow. Kemampuan FT-Raman dalam mendeteksi konsentrasi pemalsu hingga 1% (Dhakal *et al.*, 2016).

Parameter yang digunakan untuk menentukan efektivitas pada setiap instrumen dengan menggunakan akurasi, presisi, *recovery*, *limit of detection*, *limit of quantification*, sensitivitas, selektifitas, dan ketidakpastian (Anwar, 2007). Namun Karena keterbatasan dari setiap jurnal yang telah dikumpulkan maka lebih berfokus pada *recovery*, *limit of detection*, dan *limit of quantification*.

4.2. Kemampuan Spektroskopi dalam Mendeteksi Konsentrasi Metanil Yellow

Deteksi pemalsuan metanil yellow pada kunyit bubuk dengan cara membandingkan spektra antara kunyit bubuk asli dan kunyit bubuk yang dipalsukan. Spektroskopi menghasilkan spektrum yang akan diinterpretasikan menjadi bilangan gelombang untuk mengetahui gugus fungsi dari sampel protein.

NIR Spektroskopi tanpa melalui preparasi sampel maupun penambahan pelarut sehingga dapat mengurangi kerusakan pada sampel yang akan diuji (Cozzolino, 2011). Fungsi dari penambahan air deionisasi yaitu untuk mengurangi mineral

tetapi senyawa organik atau mikroorganisme yang berpotensi sebagai patogen tidak dinetralkan. Penggunaan air distilasi untuk memurnikan sampel dari muatan senyawa organik. Penambahan air deionisasi berfungsi melarutkan sebagian kunyit dan menghasilkan dispersi maksimum ketika dilakukan penambahan, sehingga sangat sedikit ion pada sistem yang berkontribusi pada konduktansi *net system* secara langsung (Das *et al.*, 2019). Ketentuan yang harus diperhatikan untuk pelarut yang digunakan yaitu bersifat inert, tidak berwarna, tidak memiliki ikatan rangkap konjugasi, dan memiliki kemurnian yang tinggi (Suhartati, 2017).

Range panjang gelombang UV-vis untuk mengukur pemalsuan metanil yellow yaitu 250-600 nm. Berdasarkan spektrum serapan UV, 442 nm dan 450 nm dipilih sebagai serapan maksimum yang didapatkan dari mengukur absorbansi larutan metanil yellow. Pemilihan panjang gelombang tepat karena warna kuning-oranye berada pada kisaran 435-490 nm dari wilayah spektrum elektromagnetik (Ashok *et al.*, 2015).

Keuntungan FT-Raman Spektroskopi, FT-IR Spektroskopi, dan Raman *Spectral Imaging* tanpa ada tahap preparasi sampel sehingga tidak merusak sampel yang akan diuji (Bansal *et al.*, 2017). Penambahan KBr (kalium bromida) pada FT-MIR digunakan untuk memperoleh spektrum latar belakang/ referensi (Das *et al.*, 2019).

Puncak vibrasi kunyit yaitu C=O pada bilangan gelombang 1683 cm^{-1} dan 1739 cm^{-1} . Puncak C=O pada bilangan gelombang 1626 cm^{-1} mengindikasikan keberadaan kurkumin (Dhakal *et al.*, 2016). Gugus fungsi yang mengindikasikan terdapat metanil yellow yaitu N=N dan -NH terlihat pada bilangan gelombang 400-2600 cm^{-1} .

Metanil yellow memiliki tiga atom nitrogen yaitu N=N dan -NH dan satu sulfat (SO_3^-), tidak mengandung gugus metilen (CH_2) atau metil (CH_3), dan tidak mengandung oksigen kecuali pada ikatan sulfat. Kurkumin mengandung enam atom oksigen yaitu gugus karbonil (C=O), tidak mengandung dua gugus metil, atom hidrogen atau belerang, dan satu metilen tunggal di pusat molekul antara dua situs karbonil (Dhakal *et al.*, 2016).

Deteksi keberadaan metanil yellow menggunakan IR Spektroskopi, menunjukkan terdapat gugus fungsi N=N dengan getaran tajam tetapi lemah pada bilangan gelombang 1455 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} , dan lengkungan 1412 cm^{-1} . Pada bilangan gelombang 1034 cm^{-1} terdeteksi gugus sulfat yang mengindikasikan terdapat kandungan metanil yellow. IR mampu mendeteksi keberadaan kurkumin pada rengangan C=O (1739 cm^{-1}), konjugasi regangan C=O (1681 cm^{-1}), substitusi rengangan C=C (1628 cm^{-1}), dan regangan C=C (1603 cm^{-1}) (Sett *et al.*, 2002). Pada Tabel 5 dan 6, gugus fungsi yang terdeteksi hanya metanil yellow, sehingga gugus fungsi kurkumin tidak tercantum. FTIR mendeteksi gugus fungsi N=N pada kisaran bilangan gelombang 1597 cm^{-1} , 1145 cm^{-1} (Dhakal *et al.*, 2016).

Penelitian (Dhakal *et al.*, 2016) menggunakan FT-IR untuk mendeteksi pemalsuan metanil yellow terbaik pada bilangan gelombang 1140 cm^{-1} karena menunjukkan intensitas tertinggi, tidak terjadi tumpang tindih dengan sampel, dan dapat mendeteksi konsentrasi metanil yellow sebesar 5%. Puncak intensitas metanil yellow tertinggi yang dapat dideteksi FT-Raman digabung Raman *Spectral Imaging* yaitu 1147 cm^{-1} dan 1433 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1147 cm^{-1} dipilih untuk identifikasi piksel metanil yellow menggunakan Raman *Spectral Imaging*. FT-MIR spektroskopi dapat dengan baik mendeteksi pemalsu pada puncak 1597 cm^{-1} dan 1145 cm^{-1} . Puncak tersebut dianggap paling baik karena dapat mendeteksi keberadaan metanil yellow dengan getaran yang tajam. Vibrasi antara 1740 cm^{-1} dan 1628 cm^{-1} tidak dipilih karena tidak terdapat gugus karbonil terkonjugasi yang mengindikasikan adanya metanil yellow (Das *et al.*, 2019).

Metode FT-Raman spektroskopi dianggap paling efektif sebagai alat deteksi pemalsuan metanil yellow pada kunyit bubuk karena tanpa melalui proses preparasi sampel, sederhana, cepat, dan penggunaan pelarut hanya menggunakan air deionisasi sehingga mengurangi kerusakan pada sampel yang diuji (El-Abassy *et al.*, 2009; Paradkar *et al.*, 2002). FT-Raman spektroskopi dapat mendeteksi spektra penentu pemalsu paling baik pada puncak bilangan gelombang 1406 cm^{-1} . Beberapa alasan yang mendukung yaitu tidak terjadi tumpang tindih dengan bilangan gelombang kurkumin, intensitas tinggi untuk deteksi sampel dengan konsentrasi

metanil yellow yang tinggi, mampu menampilkan hubungan relatif antara konsentrasi metanil yellow pada sampel dan intensitas puncak, mampu mendeteksi konsentrasi metanil yellow sebesar 1% pada sampel. FT-Raman spektroskopi mampu mendeteksi senyawa amida yang mengindikasikan terdapat senyawa protein dalam bentuk rantai samping. Wilayah amida I dan amida II paling banyak digunakan karena lebih mudah dideteksi dibandingkan amida III. Deteksi amida III jarang digunakan karena sinyalnya rendah. Daerah amida II tergolong kuat namun tidak sensitif mendeteksi struktur protein sekunder dan *overlapping* dengan pita asam amino (Cai *et al.*, 2004). FT-Raman spektroskopi tidak menggunakan analisis kemometrik karena pada penelitian tersebut dapat secara langsung mendeteksi pemalsu. Keterbatasan dari instrumen ini yaitu penampang hamburan yang jauh lebih kecil sehubungan dengan hamburan elastis yang menghasilkan waktu akuisisi yang lama dan tingkat emisi latar belakang fluoresensi yang tinggi yang menutupi pita Raman dan sering menunjukkan intensitas yang lebih tinggi daripada yang lemah sinyal Raman (Suzuki *et al.*, 2018). FT-Raman spektroskopi lebih dipilih sebagai metode yang paling efektif daripada inframerah spektroskopi karena memiliki pita yang lebih tajam dan jumlah pita lebih sedikit, sehingga lebih memungkinkan mengukur konsentrasi terendah pemalsuan secara akurat (Nieuwoudt *et al.*, 2016).

Instrumen yang berbasis *infrared* lebih banyak menggunakan analisis kemometrik untuk interpretasi data karena deteksi *infrared* secara langsung sulit (terdapat spektrum serapan dari molekul sampel tumpang tindih) dan kompleks. Agar mempermudah deteksi gugus fungsi yang mengalami tumpang tindih dan identik maka digunakan teknik kemometrik (Gad *et al.*, 2013). Pengertian kemometrik adalah aplikasi untuk mengevaluasi, mengolah, dan menginterpretasikan data dalam jumlah yang banyak. Kemometrik digunakan dalam data kromatogram dan spektrum molekul kimia (Rohman *et al.*, 2020). Pemilihan metode kemometrik yang digunakan tergantung tujuan masing-masing penelitian dan ketersediaan alat.

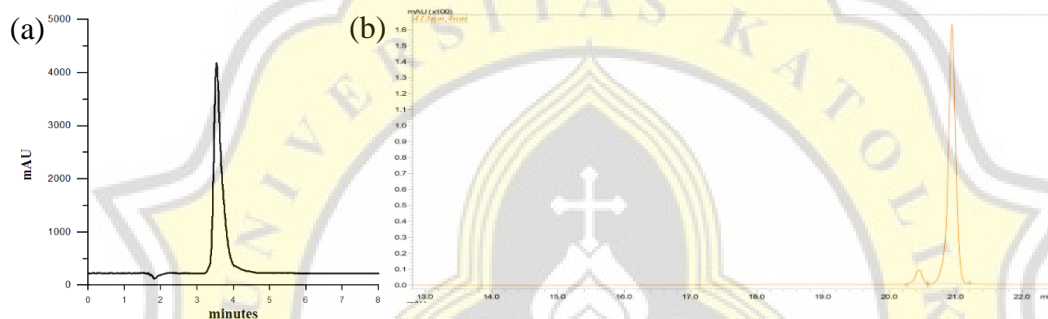
Analisis kemometrik PLSR sering disebut analisis faktor, teknik ini menggunakan dua tahap yaitu kalibrasi dan validasi atau prediksi. Pada fase kalibrasi, model

matematis dibuat dengan membuat korelasi antar matriks spektrum pada spektroskopi dan konsentrasi analitik yang berasal dari respon nilai referensi. Fase prediksi, model kalibrasi yang telah dikembangkan akan dihitung konsentrasi sampel yang tidak diketahui (Rohman *et al.*, 2012). Penelitian Kar *et al.* (2018) dan Rukundo *et al.* (2020) menggunakan *Near Infrared* spektroskopi yang digabungkan dengan analisis PLSR menunjukkan nilai koefisien determinasi (R^2) masing-masing sebesar 0,984 dan 0,99 yang mengindikasikan bahwa instrumen tersebut dapat mendeteksi keberadaan pemalsu dengan sensitivitas tinggi (Rukundo *et al.*, 2020).

PLS-DA digunakan untuk menentukan *Latent Variables* (LV) dengan kovarian tertinggi menggunakan variabel yang mewakili keanggotaan sampel pada kelompok yang berbeda (Bevilacqua, 2013). Penggunaan PLS-DA untuk membedakan antar kelompok pengamatan. Jika dibandingkan dengan SIMCA, PLS-DA mampu membedakan sampel menjadi empat kelompok dan secara langsung dapat mengidentifikasi kelas. *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) terdiri dari kumpulan model PCA dan data independen (Yang *et al.*, 2013). SIMCA mampu mengelompokkan sampel kunyit bubuk yang tercemar maupun murni dengan ketepatan kalibrasi dan validasi sebesar 82% (Khodabakhshian *et al.*, 2021). Analisis data kualitatif menggunakan PCA untuk memvisualisasikan rentang dan penyebaran data yang diuji (Rezzi *et al.*, 2005). PCA mampu mengidentifikasi sampel yang banyak dipalsukan dan mampu membedakan sumber asal dari sampel. *Near Infrared* menggunakan gabungan kemometrik PCA dan SIMCA mampu mendeteksi dan mengklasifikasikan sampel dengan kadar metanil yellow paling rendah (Booker *et al.*, 2014).

4.3. Kemampuan Kromatografi dalam Mendeteksi Konsentrasi Metanil Yellow

Pemilihan *wavelength* untuk mengetahui penyerapan larutan standar metanil yellow maksimum dapat menggunakan UV-vis. Perbedaan yang mendasari antara kromatografi dan spektroskopi yaitu adanya waktu retensi. Waktu retensi yang diukur harus sesuai dengan sampel yang dianalisis dan untuk senyawa identik yang ada pada sampel (Knolhoff *et al.*, 2016). Waktu retensi berguna untuk mengkonfirmasi senyawa yang diidentifikasi. Grafik waktu retensi UHPLC dan HPTLC dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Retention time UHPLC dan HPTLC

(Rao *et al.*, 2021; Ashok *et al.*, 2015)

Recovery digunakan untuk memastikan metode analisis yang digunakan sudah sesuai atau tidak. *Recovery* yang dianggap baik berkisar antara 95 – 105% (Alegantina *et al.*, 2010). Berdasarkan data yang didapatkan, nilai *recovery* HPTLC sudah sesuai tetapi nilai *recovery* UHPLC sebesar 120% yang mengindikasikan bahwa metode yang digunakan tidak memenuhi standar.

MLC banyak menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) sebagai surfaktan. MLC menggunakan fase gerak misel yang mengandung misel hibrida, kebanyakan mengandung alkohol rantai pendek seperti pentanol. Pentingnya memilih pH fase gerak agar resolusi campuran menjadi kompleks (Romero *et al.*, 2005).

Penggunaan fase gerak harus memiliki sifat volatile dan organik. Jumlah sampel yang digunakan tergantung pada metode ionisasi, umumnya digunakan untuk analisis sensitivitas sebesar 1-100 pg per komponen. Fase gerak yang digunakan *Sodium Dodecyl Sulfate*, pentanol, dan methanol tergolong senyawa organik.

Metode MLC dipilih sebagai metode yang efektif untuk deteksi pemalsuan kunyit karena tidak memerlukan pembersihan sampel dari komponen matriks, menggunakan pelarut yang lebih sedikit sehingga mengurangi kerusakan pada sampel, pergerakan *mobile phase* yang stabil memungkinkan prediksi retensi zat terlarut secara akurat menggunakan metode yang agar pemisahan dari campuran dapat optimal (Ashok *et al.*, 2015), memerlukan waktu retensi yang singkat yaitu 3,5 menit, dan dapat mendeteksi pemalsuan metanil yellow dengan kadar LoD dan LoQ berturut-turut yaitu $1 \times 10^{-6} \%$ dan $5 \times 10^{-6} \%$ dengan koefisien determinasi (R^2) yaitu 0,9999. *Retention time* yang singkat disebabkan penambahan pelarut organik pada MLC dapat mengurangi waktu retensi zat terlarut karena fase gerak misel murni (Ruiz *et al.*, 2009). Selain mempertimbangkan LoD dan LoQ, sensitivitas instrumen dan kemurnian pelarut yang digunakan perlu diperhatikan (Saadati *et al.*, 2013). Semakin panjang ukuran kolom yang diikuti dengan ukuran partikel lebih kecil menghasilkan tekanan yang lebih tinggi serta peningkatan kapasitas puncak.

