

2. Apakah terdapat perbedaan fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) pada kacang komak hitam dan putih yang berasal dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. Mengidentifikasi pengaruh proses perebusan kacang komak hitam dan putih dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok terhadap fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol).
2. Mengidentifikasi perbedaan fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) pada kacang komak hitam dan putih yang berasal dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini, yaitu dapat:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh proses perebusan kacang komak hitam dan putih terhadap fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) serta informasi ilmiah mengenai perbedaan fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) pada kedua kacang komak yang berasal dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok.
2. Berdasarkan hasil penelitian ini nantinya akan dapat direkomendasikan kepada masyarakat bahwa kacang komak hitam dan putih dari Desa Sebalong, Sanganom, dan Klampok dapat berperan sebagai sumber fitosterol.

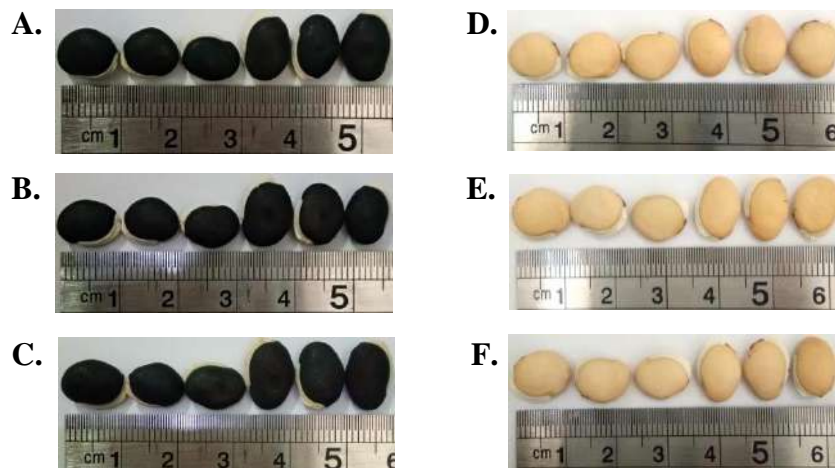
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kacang Komak (*Lablab purpureus* L. Sweet)

Kacang komak pada umumnya memiliki beberapa nama lain, diantaranya *lablab bean*, *bonavist*, *Egyptian bean*, *dolichos bean*, *hyacinth bean*, *Pharao*, *val* (Inggris), kacang bado, dan kacang biduk (Indonesia) (Duke, 1981; Feedipedia, 2016; Subagio, 2006).

2.1.1 Klasifikasi Kacang Komak

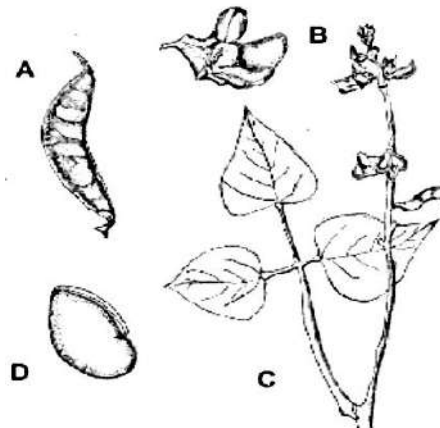


Gambar 2.1 Kacang komak hitam dari Desa Sebalong (A), Sanganom (B), Klampok (C) dan kacang komak putih dari Desa Sebalong (D), Sanganom (E), Klampok (F)

Kingdom : Plantae
 Subkingdom : Tracheobionta
 Superdivisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Subkelas : Rosidae
 Ordo : Fabales

- Famili : Fabaceae / Leguminosae
- Genus : *Lablab*
- Spesies : *Lablab purpureus* (L.) Sweet (USDA, 2018).
- Sinonim : *Dolichos lablab* L., *Dolichos purpureus* L., *Lablab niger* Medik., *Lablab vulgaris* Savi., *Dolichos albus* Lour., *Dolichos cultratus* Thunb., *Dolichos lablab* var *hortensis* Schweinf & Muschler, *Lablab leucocarpos* Davi, *Lablab nankinicus* Savi, *Lablab perennans* DC., *Lablab vulgaris* var *niger* DC. (Duke, 1981).

2.1.2 Morfologi Kacang Komak



Gambar 2.2 Bagian tanaman kacang komak (*Lablab purpureus* L. Sweet) Polong (A), Bunga (B), Tangkai disertai daun dan bunga (C), Biji (D) (Murphy and Colucci, 1999)

Kacang komak merupakan tanaman tahunan, tumbuh melilit, memanjat atau tegak hingga mencapai 3-6 m. Batangnya tegak dan kuat, berdaun besar, bercabang tiga (*trifoliate*), berbentuk oval-belah ketupat dengan panjang 7-15 cm dan lebar 8-14 cm serta mengkerucut di bagian ujungnya. Bagian permukaan atasnya berupa daun halus, sedangkan bagian bawahnya berbulu (Feedipedia, 2016; Murphy and Colucci, 1999). Bunganya berwarna putih, biru atau ungu

berbentuk, seperti kupu-kupu dengan panjang sekitar 1,5 cm. Polongnya memiliki panjang sekitar 4-15 cm dan lebar 1-4 cm, lunak serta mengandung 2-8 biji. Bijinya berbentuk bulat telur dengan berbagai macam warna tergantung pada varietas atau kultivarnya, biasanya putih, coklat tua, dan hitam (Feedipedia, 2016).

2.1.3 Ekologi dan Penyebaran Kacang Komak

Kacang komak merupakan tanaman polong-polongan, dapat tumbuh di daerah tropis maupun subtropis dengan berbagai curah hujan, suhu, dan ketinggian (Murphy and Colucci, 1999; Subagio, 2006). Kacang ini dapat tumbuh pada ketinggian 1.800-2.100 m di atas permukaan laut dengan suhu 18-30°C serta curah hujan sekitar 200-2.500 mm (Murphy and Colucci, 1999). Kacang ini dapat tumbuh subur pada berbagai macam jenis tanah baik berpasir maupun tanah liat dengan pH sekitar 5-7,5 (Feedipedia, 2016; Murphy and Colucci, 1999). Tahan terhadap kekeringan dengan suhu yang relatif tinggi dan tahan terhadap hama, seperti serangga dan berbagai macam penyakit (Murphy and Colucci, 1999). Di Indonesia, produktivitas kacang ini dapat mencapai 1.000-1.200 kg biji kering/hektar (Subagio, 2006).

2.1.4 Kandungan Gizi Kacang Komak

Tabel 2.1 Komposisi kimia kacang komak

Komponen	Biji Kering (setiap 100 g berat bahan)	Kulit (Polong) (setiap 100 g yang dapat dimakan)	Daun (setiap 100 g berat basah)
Kalori (kal)	334	30	31
Protein (g)	21,5	3,1	2,4
Lemak (g)	1,2	0,3	0,4
Karbohidrat (g)	61,4	8,2	6,1
Serat (g)	6,8	1,9	6,7
Abu (g)	3,8	0,9	1,4
Ca (mg)	98	75	120
P (mg)	345	50	57
Fe (mg)	3,9	1,2	17

Sumber: Duke, 1981

Berdasarkan Akpapunam (1996) kacang komak merupakan sumber protein, vitamin, mineral, dan kalori yang baik. Kacang komak dapat berperan sebagai sumber protein fungsional dikarenakan mengandung protein tinggi sekitar 21,5-24,9%, jumlah asam amino seimbang, ketersediaannya tinggi, dan zat anti-nutrisi relatif rendah (Akpapunam, 1996; Subagio, 2006). Kandungan asam amino pada kacang ini dapat menimbulkan efek hipokolesterolemik, sedangkan zat anti-nutrisinya dapat dikurangi dengan berbagai macam metode pengolahan melalui pelepasan lapisan biji, perendaman, dan pemasakan (Chau *et al.*, 1998; Murphy and Colucci, 1999).

2.1.5 Pemanfaatan Kacang Komak

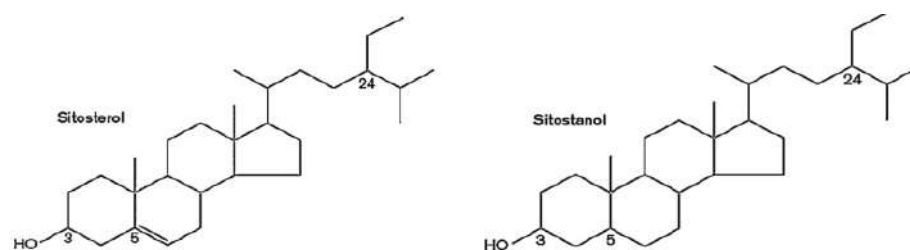
Tanaman kacang komak dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak atau dicampurkan dengan gandum sebagai pakan kuda serta dapat dijadikan sebagai pupuk hijau. Polong mudanya dapat dimasak dan dimakan sebagai sayuran atau dicampur di dalam salad (Akpapunam, 1996; Duke, 1981). Di Mesir, biji keringnya ditumbuk dan dijadikan bahan olahan kue (Duke, 1981). Di India, biji keringnya dapat dikonsumsi sebagai *dhal* atau kacang polong dan biasanya direndam di dalam air, dikeringkan, direbus serta digiling menjadi pasta yang dapat digoreng dengan berbagai macam bumbu (Akpapunam, 1996).

2.2 Fitosterol

Fitosterol merupakan komponen alami, berasal dari *kingdom plantae* dalam jumlah relatif kecil, dan berfungsi sebagai pengatur fluiditas membran sel tumbuhan (Chawla *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Jain and Bathla, 2015). Secara struktur, fitosterol hampir sama dengan kolesterol, namun fitosterol memiliki

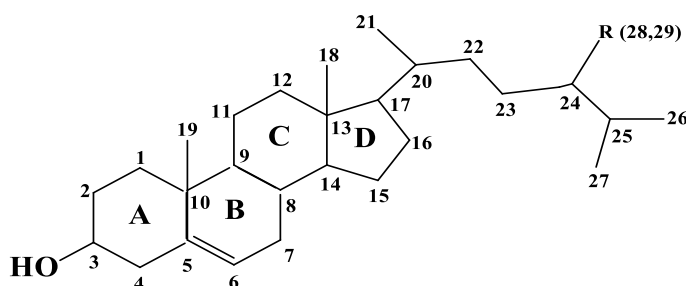
ikatan rangkap atau gugus metil dan etil pada rantai sampingnya (Alhazza *et al.*, 2013; Jain and Bathla, 2015).

Pada umumnya, istilah fitosterol menggambarkan sterol dan stanol tanaman, tergantung pada ada atau tidaknya ikatan rangkap pada posisi atom karbon 5 (Marangoni and Poli, 2010; Spitzer and Maggini, 2013). Dikarenakan jumlahnya relatif sedikit di alam, yaitu sekitar 10% dari fitosterol total dibandingkan dengan sterol, maka keberadaan stanol tidak begitu penting (Jain and Bathla, 2015; Spitzer and Maggini, 2013).



Gambar 2.3 Struktur sitosterol dan sitostanol (Marangoni and Poli, 2010)

2.2.1 Struktur Fitosterol



Gambar 2.4 Struktur kolesterol dan fitosterol (Chaw *et al.*, 2016)

R = H, Kolesterol; R = CH₃, Kampesterol; R = C₂H₅, β-sitosterol; R = C₂H₅, Å₂₂, Stigmasterol

Berdasarkan strukturnya, sterol tanaman terdiri dari 4-desmetilsterol (tidak mengandung gugus metil), 4-monometilsterol (satu gugus metil), dan 4,4-dimetilsterol (dua gugus metil) (Chawla *et al.*, 2016). Kelompok 4-desmetilsterol, seperti β-sitosterol (65%), kampesterol (32%), dan stigmasterol (3%), paling

banyak ditemukan di alam (Chawla *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015; Jain and Bathla, 2015).

2.2.2 Sifat Fisika dan Kimia Fitosterol

Fitosterol terdapat dalam bentuk bebas dan teresterifikasi. Fitosterol tidak larut di dalam air, umumnya digunakan dalam bentuk teresterifikasi sebagai ester asam lemak dan larut di dalam fase lemak (Chawla *et al.*, 2016; Marangoni and Poli, 2010). Titik leleh sterol/stanol bebas 142°C, sedangkan sterol/stanol teresterifikasi 25-43°C. Sifat sterol teresterifikasi tergantung pada molekul asam lemak yang melekat, artinya jika asam lemak tidak jenuh yang melekat, maka titik lelehnya akan lebih rendah dibandingkan dengan asam lemak jenuh yang melekat pada sterol (Chawla *et al.*, 2016).

2.2.3 Stabilitas Fitosterol

Fitosterol dalam bentuk tunggal maupun campuran stabil pada titik leleh 140-170°C, namun proses degradasi akan mengalami peningkatan jika melebihi suhu tersebut. Fitosterol tidak akan mengalami perubahan apabila diolah pada suhu di bawah 100°C, namun jika dipanaskan pada suhu di atas 200°C, maka lebih dari 50% sterol akan mengalami perubahan (Thanh *et al.*, 2006). Berdasarkan Kaloustian *et al.* (2008) fitosterol di dalam minyak sayur stabil terhadap pemanasan pada suhu 100°C selama 1 jam dan mengalami degradasi pada suhu di atas 140°C. Kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol, pada suhu 150°C akan menurun secara signifikan. Penurunan kadar fitosterol akibat pemanasan dapat disebabkan oleh reaktivitas kimia dari gugus fungsi hidroksil (Thanh *et al.*, 2006).

Fitosterol akan membentuk oksi-sterol dan sterol-oksida jika mengalami oksidasi dan auto-oksidasi pada suhu tinggi dan/atau di bawah sinar ultraviolet

(UV) atau matahari (Chawla *et al.*, 2016; Kaloustian *et al.*, 2008). Oksi-sterol atau oksi-fitosterol merupakan sterol dengan satu atau lebih gugus fungsi oksigen dan terbentuk sebagai kolesterol teroksidasi. Oksi-sterol dapat terbentuk melalui proses fisika, seperti pemanasan dan radiasi, proses non-enzimatis dengan melibatkan oksigen reaktif dan radikal bebas atau secara enzimatis oleh Sitokrom P450 Monooksigenase (Lütjohann, 2004). Bahan makanan yang dimasak dengan menggunakan mentega atau lemak akan mengabsorpsi kolesterol teroksidasi, misalnya pada kentang goreng dan makanan goreng lainnya yang dimasak dengan lemak hewan/sayur sekitar 20-24 µg/g. Jumlah kolesterol teroksidasi pada makanan yang digoreng tergantung pada komposisi lemak penggorengan, lamanya waktu penggorengan, dan suhu penggorengan (Savage *et al.*, 2002).

2.2.4 Sumber Fitosterol

Fitosterol pada tanaman dan makanan berbahan dasar tanaman dalam bentuk fraksi lemak terlarut dapat dijumpai umumnya pada minyak sayur, sereal, kacang-kacangan atau biji-bijian serta buah-buahan (Chawa *et al.*, 2016; Marangoni and Poli, 2010). Namun, minyak dan lemak yang mengalami pengolahan menjadi makanan, umumnya sangat rentan mengalami kehilangan fitosterol terutama dalam bentuk bebas, yaitu sekitar 10-70% tergantung pada proses pengolahannya (Jain and Bathla, 2015).

Makanan dengan kandungan fitosterol bebas dan ester asam lemak tertinggi terdapat pada minyak sayur 1-5 g/kg, minyak jagung 7,8-11,1 g/kg, dan minyak kanola 6,8-8,8 g/kg (Chawla *et al.*, 2016; Spitzer and Maggini, 2013). Kacang-kacangan mengandung lebih dari 1%, roti atau sereal (jagung, gandum, dan beras) sekitar 350-1.200 mg/kg, sedangkan buah-buahan dan sayur-sayuran lainnya

mengandung fitosterol yang lebih rendah (Chawla *et al.*, 2016; Jain and Bathla, 2015; Spitzer and Maggini, 2013). Berdasarkan Chawla *et al.* (2016) sterol total pada sayur-sayuran, sekitar 5-37 mg/100 g (bobot segar) dan 25-410 mg/100 g (bobot kering).

2.2.5 Keamanan Fitosterol

Menurut Chawla *et al.* (2016) sterol tanaman bersifat aman, tidak toksik, dan tidak menunjukkan efek samping pada sistem reproduksi. Bahkan, fitosterol sangat baik jika dikonsumsi setiap hari selama beberapa bulan. Hal tersebut telah dibuktikan pada pasien yang mengkonsumsi fitosterol hingga 8,6 g/hari selama 3-4 minggu tidak mengalami efek samping, sedangkan bagi wanita hamil atau menyusui belum terdapat penelitian lebih lanjut terkait uji klinisnya (Spitzer and Maggini, 2013).

Berdasarkan Marangoni and Poli (2010) tingkat konsumsi fitosterol tergantung pada masing-masing individu, diantaranya di Inggris biasanya mengkonsumsi fitosterol sekitar 167 mg/hari, di Jepang 375 mg/hari, sedangkan bagi vegetarian umumnya lebih tinggi, sekitar 50%. Menurut Chen *et al.* (2015) tingkat konsumsi fitosterol yang disarankan adalah 160-400 mg/hari.

2.2.6 Mekanisme Aksi Fitosterol

Mekanisme aksi fitosterol dalam menurunkan absorpsi kolesterol adalah sebagai berikut:

1. Penghambatan absorpsi kolesterol di dalam usus halus

Fitosterol bersaing dengan kolesterol di dalam misel untuk melewati usus halus dan diserap di dalam aliran darah melalui kompetisi pengangkut kolesterol, yaitu enzim pengangkut NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 Like 1*). Dikarenakan

struktur fitosterol dan kolesterol hampir sama, maka fitosterol diangkut menuju enterosit, sehingga terjadi penurunan pengangkutan kolesterol (Chawla *et al.*, 2016; Jain and Bathla, 2015).

2. Ekskresi kolesterol

Sekitar 70-80% kolesterol terangkut akan diesterifikasi dan digabungkan ke dalam silomikron. Kompetisi kolesterol dengan fitosterol menyebabkan sebagian fitosterol mengalami esterifikasi dan kadar kolesterol menurun. Selanjutnya, pengangkut ABC (*Adenosine Triphosphate Binding Cassette*) berperan dalam mengabsorpsi fitosterol dan kolesterol ke dalam sel mukosa. Enzim pengangkut ABCG5 dan ABCG8 bertanggung jawab dalam penyerapan fitosterol dan kolesterol ke dalam usus halus dari enterosit. Di usus halus, fitosterol dan kolesterol diangkut menuju usus besar untuk dihidrolisis kemudian fitosterol akan diserap dan kolesterol akan dikeluarkan bersama feses (Chawla *et al.*, 2016; Jain and Bathla, 2015).

Berdasarkan mekanisme tersebut, terjadinya penghambatan absorpsi kolesterol menyebabkan berkurangnya kolesterol yang berikatan dengan reseptor LDL, sehingga kadar kolesterol menurun di dalam darah.

2.2.7 Manfaat Fitosterol bagi Kesehatan

Fitosterol dikenal bersifat sebagai hipokolesterolemik pertama kali pada tahun 1950 serta dikarenakan kemampuannya dalam menurunkan penyerapan kolesterol di dalam darah, maka fitosterol bermanfaat bagi kesehatan jantung (Chawla *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2015). Menurut Chawla *et al.* (2016) dengan mengkonsumsi sterol dan stanol 2-3 g per hari, tingkat LDL akan menurun sebesar 10%, sedangkan PJK akan menurun 12-20% selama 5 tahun. Selain itu,

mengonsumsi fitosterol disertai Omega-3 dan Omega-6 akan menurunkan trigliserida dan meningkatkan HDL 5,4%, sehingga dapat mengurangi terjadinya resiko PJK (Alhazzaa *et al.*, 2013).

2.3 Cara Pengolahan Makanan

Proses perubahan bentuk asli suatu bahan pangan mendekati bentuk yang dapat segera dikonsumsi disebut sebagai pengolahan bahan pangan. Salah satu prosesnya, yaitu penggunaan panas (Sundari *et al.*, 2015). Menurut Vintilä (2016) proses penggunaan panas merupakan tahap penting dalam meningkatkan cita rasa dan keamanan bahan pangan untuk meyakinkan bahwa dapat dimakan dengan rasa yang lezat dan bernutrisi.

2.3.1 Penggorengan (*Frying*)

Penggorengan adalah salah satu metode pengolahan makanan dengan membentuk aroma, warna, bahkan rasa kriuk yang menggugah selera (Vintilä, 2016). Penggorengan merupakan proses pemasakan dengan menggunakan minyak panas di dalam wajan di atas kompor pada suhu minimal 140°C atau 175-195°C (Fabbri and Cosby, 2016; Sundari *et al.*, 2015; Vintilä, 2016). Proses pemasakan menggunakan media minyak ini berlangsung cepat dalam menghantarkan panas, sekitar 5 menit lebih cepat dibandingkan dengan proses perebusan, namun saat proses penggorengan minyak akan masuk ke dalam makanan, sehingga menyebabkan tingginya kandungan minyak di dalam makanan (9,8-12% atau 20-25%) (Vintilä, 2016). Menurut Berk (2013) beberapa proses penggorengan dapat dibedakan menjadi tiga macam, diantaranya:

1. *Pan-frying*, proses pemasakan yang berlangsung di atas wajan datar dan lebar untuk makanan relatif tipis, seperti *patties*, *fillets*, dan *omelets* dengan penambahan sedikit minyak tanpa pengadukan.
2. *Stir-frying* atau *Sautéing*, proses pemasakan yang berlangsung cepat untuk makanan berukuran kecil hingga sedang dengan penambahan sedikit minyak disertai pengadukan yang konstan.
3. *Deep-frying*, proses pemasakan dengan mencelupkan bahan pangan ke dalam minyak panas, sehingga mengenai seluruh permukaan makanan secara merata.

2.3.2 Perebusan (*Boiling*)

Perebusan merupakan proses pemasakan menggunakan cairan yang mendidih, seperti air, susu, anggur atau saus lainnya di dalam panci di atas kompor pada titik didih tertentu, misalnya titik didih air 100°C (Fabbri and Cosby, 2016; Sundari *et al.*, 2015; Vintilă, 2016). Menurut Kaushik *et al.* (2018) umumnya proses pemasakan bahan pangan, seperti biji-bijian dilakukan dengan melakukan perendaman terlebih dahulu kemudian direbus di dalam air mendidih hingga 15-20 menit atau empuk.

2.3.3 Pengukusan (*Steaming*)

Proses pengolahan bahan pangan di dalam dandang berkeranjang yang ditempatkan di atas cairan mendidih, seperti air dan ditutupi dengan penutupnya disebut sebagai proses pengukusan (Fabbri and Cosby, 2016; Sundari *et al.*, 2015). Menurut Vintilă (2016) proses pengukusan merupakan metode pengolahan makanan yang menyehatkan dikarenakan menggunakan uap panas tanpa adanya penambahan lemak.

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode analisis yang telah lama digunakan dan pertama kali diperkenalkan oleh Egon Stahl pada tahun 1956. Proses kromatografi terjadi pada fase diam, terdiri dari lapisan tipis (ketebalan lapisan 250 μm dengan ukuran partikel 10-15 μm), dapat diaplikasikan pada media padatan, seperti gelas, aluminium foil atau plastik. KLT juga dapat diaplikasikan dalam analisis preparatif, seperti isolasi dan pemurnian, analisis kualitatif maupun kuantitatif. Teknik analisis ini dapat digunakan untuk semua jenis komponen baik bersifat ionik, polar maupun non-polar. Teknik analisis ini relatif cepat, murah, dan sederhana (Indrayanto, 2011).

Umumnya KLT digunakan dalam analisis kualitatif untuk mengkonfirmasi ada atau tidaknya analit tertentu di dalam sampel. Jika analit tertentu terdapat di dalam sampel, maka konsentrasi yang terdeteksi pada teknik analisis ini berada pada batas deteksi dan sebaliknya. Parameter teknik analisis ini adalah faktor retardasi (*retention factor/Rf*), menghasilkan warna noda setelah disemprot dengan penampak noda tertentu. Rf dapat didefinisikan sebagai rasio jarak tempuh noda terhadap jarak tempuh fase gerak (Indrayanto, 2011).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda dari titik awal}}{\text{Jarak akhir eluasi dari titik awal}}$$

Noda analit dapat divisualisasikan menggunakan UV 254/366 nm (jika analit memiliki gugus fungsi penyerap UV) atau menggunakan penampak noda. Jika nilai Rf dan atau warna antara analit dan pembanding berbeda, maka analit tersebut merupakan komponen yang berbeda. Sebaliknya, jika sama, maka belum dapat ditentukan kedua komponen tersebut identik dan mengandung komponen yang sama. Selain itu, satu noda belum tentu mengandung hanya satu komponen,

sehingga tehnik analisis ini hanya dapat digunakan sebagai skrining awal dan dalam pemastian lebih lanjut dapat digunakan tehnik analisis lainnya (Indrayanto, 2011).

2.5 Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared

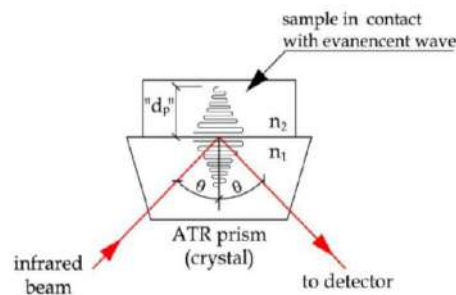
Fourier Transform Infrared (FTIR) seringkali digunakan sebagai alat semi-kuantitatif dalam memprediksi struktur senyawa kimia melalui spektrum vibrasi molekul. *Attenuated Total Reflection* (ATR) merupakan salah satu tehnik pengukuran sampel menyerupai FTIR. Jika FTIR memerlukan pelet Kalium Bromida (KBr) dalam preparasi sampel, ATR tidak memerlukan tahapan tersebut (Beasley *et al.*, 2014; Sulistyani, 2018). Dalam penggunaan ATR, sampel ditempatkan langsung pada pelat *sampling* di atas jendela optik dengan kristal Seng Selenium (ZnSe), kemudian ditahan oleh penjepit kompresi mikrometer yang dapat dikontrol daya tekanannya dengan tujuan untuk memastikan kontak antara sampel dan kristal (Sulistyani, 2018).



Gambar 2.5 *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared* (ATR-FTIR) (Sulistyani, 2018)

ATR didasarkan pada fenomena refleksi internal total dan mengukur perubahan yang terjadi dalam sinar inframerah yang dipantulkan internal dalam interaksi dengan sampel melalui kristal ZnSe atau berlian. Ketika sampel dikontakkan dengan kristal ATR, gelombang inframerah yang dihasilkan

dilemahkan karena sampel menyerap energi. Spektrum vibrasi akan diinterpretasikan sesuai dengan karakteristik spektrum vibrasi masing-masing molekul. ATR-FTIR adalah tehnik analisis yang cepat dalam mengkarakterisasi material dikarenakan beberapa kelebihan, diantaranya persiapan sampel tidak terlalu rumit, variasi spektrum lebih lebar, dan tanpa menggunakan pelet KBr serta pengabaian perbedaan ukuran partikel (Sulistiyani, 2018).



Gambar 2.6 Prinsip kerja ATR-FTIR (Sulistiyani, 2018)

2.6 Kromatografi Gas

Kromatografi gas (KG) merupakan tehnik analisis untuk mengidentifikasi suatu produk terutama yang mudah menguap di bawah kondisi terkontrol (Al-Bukhaiti *et al.*, 2017). Tehnik analisis pada KG adalah tehnik pemisahan, pertama kali diperkenalkan oleh Martin dan Synge pada tahun 1940, sedangkan instrumennya dibuat pertama kali pada tahun 1952 oleh Martin dan James (Snow, 2006). Sejak tahun 1950-an hingga sekarang KG menjadi salah satu metode analisis terpilih baik kualitatif maupun kuantitatif dikarenakan memiliki resolusi yang baik, keterulangan, reproduibilitas, presisi, dan akurasi yang tinggi (Al-Bukhaiti *et al.*, 2017; Snow, 2006).

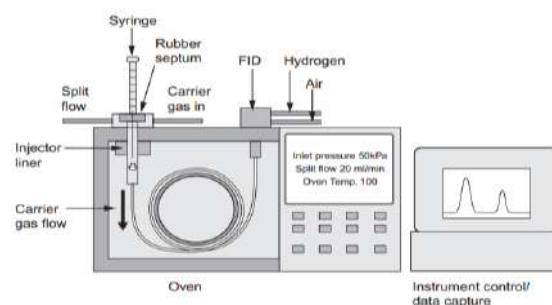
Watson (2012) menunjukkan KG memiliki kelebihan lainnya, yaitu daya pemisahannya lebih baik daripada *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan dapat digunakan untuk menentukan senyawa yang kurang dan/atau

tidak memiliki gugus kromofor. Selain itu, KG menggunakan fase gerak tetap dan tidak memerlukan sistem pembuangan serta menggunakan helium sebagai gas pembawa yang relatif lebih murah. KG memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya hanya dapat menganalisis senyawa-senyawa mudah menguap dan tahan terhadap panas, sampel yang tidak mudah menguap harus diderivatisasi menjadi senyawa mudah menguap terlebih dahulu serta tidak dapat menginjeksikan senyawa yang mengandung larutan air dan garam.

2.6.1 Prinsip Kromatografi Gas

Teknik pemisahan KG terdiri atas dua macam fase yang berbeda, diantaranya fase diam, yaitu padat dan cair serta fase gerak, yaitu gas (Snow, 2006). Fase gerak berupa gas akan mengalir di bawah tekanan tertentu melalui tabung yang telah dipanaskan dan dilapisi oleh fase diam cair atau dikemas dengan fase diam cair yang dilapisi ke dalam bentuk padatan yang sesuai kemudian analit akan masuk ke dalam kolom melalui bagian injeksi yang dipanaskan dan proses penguapan analit akan terjadi. Selanjutnya, analit akan terkondensasi pada suhu yang lebih rendah di dalam kolom. Suhu oven kemudian diatur agar tetap konstan atau dinaikkan secara bertahap. Di kolom, pemisahan suatu senyawa campuran terjadi berdasarkan waktu relatif analit berada di dalam fase diam (Watson, 2012).

2.6.2 Instrumentasi Kromatografi Gas



Gambar 2.7 Diagram skematis kromatografi gas (Watson, 2012)

Menurut Watson (2012) prinsip sistem KG adalah:

1. Injeksi sampel dapat dilakukan secara manual atau otomatis dengan *autosampler* melalui sekat karet yang dapat tertutup kembali;
2. Sampel akan menguap di dalam bagian injeksi yang dipanaskan dan terkondensasi pada kolom (*packed* atau *capillary column*);
3. Fase gerak berupa gas, biasanya nitrogen atau helium, akan membawa sampel melalui kolom;
4. Suhu oven diatur sekitar 400°C; dan
5. Detektor yang umumnya digunakan adalah detektor ionisasi nyala (*flame ionization detector/FID*).

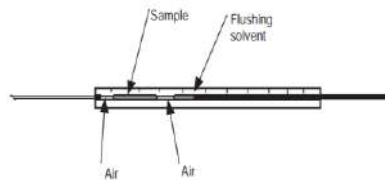
2.6.2.1 Gas Pembawa

Gas pembawa (*carrier gas*) berfungsi membawa analit dalam bentuk fase uap melewati kolom. Kriteria gas pembawa, yaitu *inert* dan tidak berinteraksi dengan sampel, tidak toksik, tidak mahal, memiliki kemurnian tinggi, efisien serta menghasilkan kromatogram yang tidak melebar (McNair and Miller, 2009; Snow, 2006). Nitrogen merupakan gas pembawa yang umumnya digunakan pada *packed column* kemudian helium, sedangkan untuk *capillary column*, helium adalah gas pembawa yang umumnya digunakan kemudian hidrogen dan nitrogen (Snow, 2006). Selain itu, gas pembawa yang digunakan berdasarkan jenis detektor adalah *Thermal Conductivity Detector* (TCD) menggunakan gas pembawa helium, FID menggunakan helium atau nitrogen, sedangkan *Electron Capture Detector* (ECD) menggunakan nitrogen kering (McNair and Miller, 2009).

Aliran gas sebaiknya diatur menggunakan regulator dua tahap yang terdapat pada tabung gas. Regulator harus disertifikasi dan memiliki *stainless-steel*

diaphragm untuk mencegah terjadinya kebocoran, memungkinkan oksigen masuk ke dalam aliran gas pembawa, sehingga menyebabkan kerusakan jangka panjang pada fase diam yang sensitif terhadap oksigen. Pada sistem *packed column*, aliran gas pembawa dikontrol dengan *mass-flow controller* dan katup pengukur dipasang antara regulator tabung gas dan *inlet*. Pada *capillary column*, aliran gas dikontrol dengan kombinasi *mass-flow controller* dan *backpressure regulator*. Sistem *backpressure* bertujuan untuk mempertahankan aliran kolom agar tetap konstan, bahkan ketika aliran dan tekanan instrumen berubah (Snow, 2006).

2.6.2.2 Spuit dan Sistem Injeksi



Gambar 2.8 Spuit sampel 10 μL (Watson, 2012)

Spuit sampel KG terdiri dari piston *stainless steel* yang terpasang di dalam alat suntik, terbuat dari kaca borosilikat dan jarum *stainless steel* yang diepoksi di dalam spuit (McNair and Miller, 2009). Volume sampel biasanya disuntikkan ke dalam KG sekitar 0,5-2 μL , sedangkan volume spuit yang digunakan adalah 5 dan 10 μL . Teknik penyuntikan sampel ke dalam KG, yaitu membilas spuit dengan pelarut sekitar 0,5 μL sebelum mengisinya dengan sampel. Sampel ditarik ke dalam spuit dengan menyisakan sedikit udara pada ujung spuit kemudian jarum dimasukkan ke dalam injektor dan didiamkan beberapa saat untuk dihangatkan sesaat sebelum piston ditekan. Setelah itu, spuit dapat ditarik dari injektor (Watson, 2012).

Menurut Watson (2012) sistem injeksi terdiri atas beberapa macam, diantaranya:

1. Injeksi kolom terkemas (*packed column injections*)

Pada umumnya, injeksi akan terjadi melalui suatu sekat karet yang dapat tertutup kembali. Suhu pada bagian injektor akan dipertahankan sesuai dengan volatilitas sampel biasanya sekitar 150-250°C dan sampel sekitar 0,1-10 µL langsung diinjeksikan ke dalam kolom. Jumlah sampel yang diinjeksikan ke dalam *packed column* sekitar 1-2 µg per komponen. Kelebihan kolom ini, yaitu sampel jarang mengalami permasalahan dibandingkan dengan sampel yang diinjeksikan ke dalam *capillary column*.

2. Injeksi terpisah atau tidak terpisah (*split/splitless injection*)

Split/splitless injection biasanya digunakan bersama dengan *capillary column* dengan diameter internal kolom sekitar 0,2 dan 0,5 mm dan panjang kolom antara 12 dan 50 m. Injeksi akan terjadi di dalam kaca yang dipanaskan atau *liner* kuarsa. Pada mode *split*, sampel dibagi menjadi dua bagian, bagian terkecil akan masuk ke dalam kolom, sedangkan bagian terbesar akan dibuang dengan aliran tinggi dari *split vent*. Teknik ini biasanya digunakan untuk sampel dengan konsentrasi tinggi, rasio *split* antara 10:1 dan 100:1. Pada mode *splitless*, seluruh sampel dimasukkan ke dalam kolom dan katup injektor ditutup selama 0,5-1 menit setelah injeksi.

3. Injeksi pendingin kolom (*cool on-column injection*)

Injeksi dapat dilakukan dengan cara yang sama seperti injeksi ke dalam *packed column* dan teknik ini membutuhkan spuit dengan jarum *fused-silica* yang sangat halus. Keuntungan teknik ini, diantaranya tidak membeda-bedakan antar komponen di dalam campuran, tidak terdapat sampel yang terdegradasi di dalam injektor yang panas serta tidak terjadi *backflash*, sehingga sampel terkuantitasi.

Teknik ini juga memiliki beberapa kekurangan, diantaranya sampel harus bersih (jika tidak bersih, maka residu akan menyumbat kolom), injektor membutuhkan banyak perawatan karena secara mekanis sangat kompleks serta spuit kemungkinan dapat merusak kolom.

4. Alat penguap pengatur suhu (*programmable temperature vapouriser/PTV*)

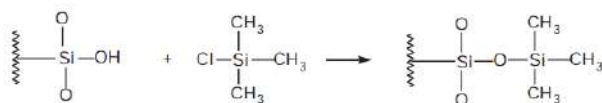
PTV dirancang agar dapat menginjeksikan sampel dalam volume besar ke dalam *capillary column*, yaitu sekitar 5 dan 50 μL pada suhu rendah, misalnya 30°C. Pelarut dilepaskan melalui katup dengan laju alir yang tinggi, misalnya 100 mL/menit selama 1 menit. Komponen sampel yang sedikit mengalami penguapan akan tertahan di dalam bagian injeksi kemudian katup ditutup dan suhu injektor langsung ditingkatkan, misalnya 300°C pada 700°C/menit. Hal ini mungkin terjadi karena *liner* berdiameter 1 mm ini terbuat dari *silicosteel* dan bersifat *inert* serta lebih cepat mengalami pemanasan. Titik didih dari titik didih terendah komponen di dalam sampel sebaiknya 100°C lebih besar daripada pelarut agar injektor dapat bekerja dengan baik. Biasanya injeksi ini digunakan bersama dengan *fast GC* yang menggunakan *capillary column* yang sangat pendek, sehingga pemisahan campuran kompleks dapat dicapai dalam waktu kurang dari semenit.

2.6.2.3 Kolom

1. Kolom terkemas (*packed column*)

Kolom ini terbuat dari kaca disilanisasi untuk menghilangkan gugus polar silanol Si-OH dari permukaannya yang dapat menyebabkan terjadinya *tailing peaks* dari analit bersifat polar. Kolom ini berdiameter internal 2-5 mm dan dikemas dengan partikel padat, dilapisi dengan fase diam cair, yaitu *diatomaceous*

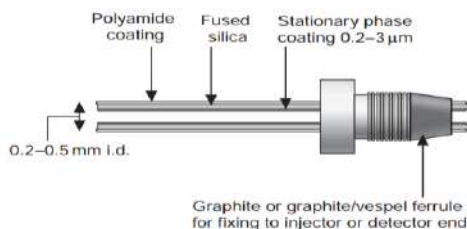
earth atau kalsium silikat. Bahan tersebut biasanya dicuci dengan asam untuk menghilangkan kotoran berupa mineral dan kemudian disilanisasi (Watson, 2012).



Gambar 2.9 Silanisasi gugus silanol bebas (Watson, 2012)

Fase gerak pada kolom ini adalah nitrogen dengan laju alir sekitar 20 mL/menit. Kolom ini memiliki resolusi relatif lebih rendah dibandingkan dengan *capillary column*, 4.000-6.000 *plates* untuk *packed column* sepanjang 2 m dibandingkan dengan > 100.000 *plates* untuk *capillary column* sepanjang 25 m. Selain itu, suhu pada kolom ini sangat terbatas sekitar 280°C. Jika di atas suhu tersebut, maka fase diam cair akan menguap dan akan menimbulkan sinyal yang lebar (Watson, 2012).

2. Kolom kapiler (*capillary column*)



Gambar 2.10 Struktur kolom kapiler KG (Watson, 2012)

Kolom kapiler terbuat dari *fused silica*, dilapisi dengan poliamida pada sisi terluarnya dengan tujuan untuk memberikan fleksibilitas pada kolom. Pelapisan dengan aluminium juga dapat digunakan untuk pengerjaan pada suhu tinggi (lebih dari 400°C). Kolom ini memiliki diameter internal antara 0,15 dan 0,5 mm, dinding kolomnya dilapisi dengan fase diam cair dengan ketebalan sekitar 0,1 dan 5 μm. Kebanyakan tipe pelapis didasarkan pada polimer organo silikon yang secara kimia terikat dengan gugus silanol pada dinding kolom, sedangkan rantai polimernya akan terikat silang. Gas pembawa pada *capillary column* adalah

helium dengan laju alir 0,5-2 mL/menit serta jumlah sampel 100 ng per komponen (Watson, 2012).

2.6.2.4 Oven

Oven KG dilengkapi kipas untuk mendistribusikan panas secara merata ke seluruh bagian oven. Suhu pada oven ini diatur agar konstan dalam kondisi isothermal atau meningkat secara bertahap. Tingkat pengaturan oven dimulai dari 1 hingga 40°C/menit. Pengaturan suhu yang kompleks dapat dilakukan dengan menyelingi antar suhu dengan kondisi isothermal, seperti 60°C (1 menit)/5°C/menit hingga 100°C (5 menit)/10°C/menit hingga 200°C (5 menit). Keuntungan dari pengaturan suhu tersebut, untuk bahan dengan perbedaan volatilitas dapat dipisahkan dalam waktu tertentu serta injeksi sampel dapat dilakukan pada suhu rendah, sehingga menyebabkan analit terperangkap di dalam kolom dan kemudian suhu dapat ditingkatkan hingga sampel terelusi (Watson, 2012).

2.6.2.5 Detektor

1. Detektor konduktifitas termal (*thermal conductivity detector*/TCD)

Detektor konduktifitas termal merupakan detektor yang digunakan dengan *packed* dan *capillary column* (Snow, 2006). Detektor ini menghasilkan sinyal ketika terjadi perubahan sifat termal dari gas pembawa dan merespon efek dingin ketika analit melewati filamen detektor (Snow, 2006; Watson, 2012). Detektor ini bersifat universal karena dapat digunakan untuk menentukan uap air dan juga bersifat non-destruktif, sehingga (jika diperlukan) analit dapat dikumpulkan setelah dideteksi (Watson, 2012). Detektor ini memiliki kesensitifan yang rendah dengan batas deteksi sekitar 10 bpj dan batas linearitas sekitar 10^4 serta relatif tidak peka untuk senyawa-senyawa organik (Snow, 2006; Watson, 2012).

2. Detektor ionisasi nyala (*flame ionization detector/FID*)

Detektor ionisasi nyala merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan dikombinasikan dengan *packed* maupun *capillary column* (McNair and Miller, 2009). Detektor ini memiliki sensitifitas yang baik dalam menganalisis senyawa organik, namun lebih kompleks dari TCD dikarenakan memerlukan bahan bakar dan gas oksidan bersama dengan gas pembawa (Snow, 2006). Berdasarkan Watson (2012) senyawa campuran dibakar di dalam nyala api, sehingga menghasilkan ion kemudian terjadi peningkatan arus antara jet dan kolektor. Detektor ini mendeteksi senyawa campuran berupa karbon atau hidrogen, namun tidak dapat mendeteksi atom karbon terikat dengan oksigen, nitrogen atau klorin. Selain itu, detektor ini memiliki batas deteksi 100 pg-10 ng jika dikombinasikan dengan *capillary column* dan memiliki respon linearitas 10^6 .

3. Detektor tangkap elektron (*electron capture detector/ECD*)

Detektor tangkap elektron merupakan detektor tipe ionisasi untuk mendeteksi penurunan tingkatan ionisasi (McNair and Miller, 2009). Detektor ini sangat selektif dan sensitif untuk senyawa berafinitas tinggi dalam menangkap elektron, khususnya bahan-bahan terhalogenisasi, seperti pestisida, sehingga banyak digunakan dalam menganalisis residu pestisida (McNair and Miller, 2009; Watson, 2012). Selain itu, seringkali digunakan untuk menganalisis obat-obatan di dalam cairan tubuh dan analisis lingkungan. Umumnya senyawa-senyawa terhalogenisasi tersebut dapat dideteksi pada konsentrasi 50 fg-1 pg dengan respon linearitas 10^3 (Watson, 2012).

4. Detektor selektif massa (*mass selective detector*/MSD)

Spektrometer massa (SM) dapat digunakan sebagai detektor KG dan beberapa referensi menyatakan bahwa SM merupakan istilah yang sama dengan detektor selektif massa atau kombinasi dari kedua instrumen analisis, yaitu kromatografi gas-spektrometri massa (McNair and Miller, 2009). Detektor ini berukuran kecil dan sederhana, namun lebih sensitif dan selektif serta dapat mendeteksi keseluruhan massa dengan cepat (Snow, 2006). Informasi data yang disediakan adalah: (a) identifikasi kualitatif dari campuran yang tidak diketahui (struktur, komposisi elemen, dan bobot molekul) dan (b) jumlahnya secara kuantitatif. Detektor ini bekerja dengan mengubah molekul sampel yang telah menguap menjadi ion kemudian ion tersebut akan masuk ke dalam penganalisa massa dan dipisahkan berdasarkan m/z (McNair and Miller, 2009).

Berdasarkan Darmapatni *et al.* (2016) prinsip kerja SM terdiri atas empat proses, diantaranya:

1. Ionisasi

Proses pengionan senyawa-senyawa kimia, terjadi untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan.

2. Percepatan

Molekul yang telah terionisasi akibat penembakan elektron berenergi tinggi tersebut menghasilkan ion dengan muatan positif kemudian ion tersebut akan diarahkan menuju medan magnet berkecepatan tinggi.

3. Pembelokan

Medan magnet atau medan listrik akan membelokkan ion tersebut agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul seluruh fragmen yang dihasilkan.

4. Pendeteksian

Detektor menghitung muatan yang terinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion dilewatkan atau mengenai permukaan, *scanning* massa, dan menghitung ion sebagai *mass to charge ratio* (m/z).

2.6.2.6 Komputer atau Integrator

Komputer atau integrator merupakan piranti pengolah data terbaik dalam mengukur sinyal yang dihasilkan oleh KG dengan cepat. Saat ini komputer berbasis laboratorium kromatografi menyediakan cara yang mudah untuk menangani sistem kromatografi. Piranti ini memiliki fleksibilitas dalam memperoleh data, mereduksi data serta menampilkan dan memindahkan data ke perangkat lainnya. Integrator merupakan piranti kromatografi, menyediakan data berupa persen area, persen tinggi, standar internal, standar eksternal, dan perhitungan normalisasi. Integrator juga menyediakan sistem pemograman dasar, pengatur digital parameter instrumen, dan analisis otomatis mulai dari injeksi hingga pembersihan kolom serta injeksi sampel berikutnya. Piranti ini memiliki harga yang relatif lebih mahal dibandingkan komputer (McNair and Miller, 2009).

2.6.3 Analisis Kromatografi Gas

2.6.3.1 Analisis Kualitatif

Parameter yang digunakan, waktu retensi untuk mengidentifikasi identitas suatu puncak dengan kondisi kolom yang konstan, seperti panjang kolom, fase

diam dan ketebalannya, suhu kolom serta tekanan atau kecepatan alir gas pembawa. Analisis dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara analit standar dengan sampel dan jika kedua waktu retensi sama, maka kemungkinan sampel mengandung analit yang sama dengan standar. Parameter ini tidak cukup untuk memastikan identitas suatu puncak yang belum diketahui, sehingga biasanya dihubungkan dengan detektor spektrometri massa untuk menganalisis identitas setiap analit (McNair and Miller, 2009).

2.6.3.2 Analisis Kuantitatif

1. Normalisasi area

Normalisasi area diperhitungkan sebagai persen area, diasumsikan sama dengan persen berat. Jika X merupakan analit yang tidak diketahui, maka:

$$\% \text{ Area X} = \left[\frac{A_x}{\sum_i (A_i)} \right] \times 100$$

A_x adalah area X dan $\sum_i (A_i)$ adalah jumlah keseluruhan area. Metode ini sederhana dan digunakan jika dilakukan analisis semi-kuantitatif atau jika beberapa analit belum diidentifikasi atau tidak tersedia dalam bentuk murni (McNair and Miller, 2009).

2. Standar internal

Metode ini menggunakan senyawa yang memiliki kemiripan secara kimia dengan analit, tidak bereaksi dengan komponen sampel, harus terpisah dengan baik, dan memiliki kemurnian tinggi. Standar dengan jumlah yang diketahui ditambahkan ke dalam sampel dengan konsentrasi yang sama dengan analit. Analit yang tidak diketahui ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi atau dari data kalibrasi. Metode ini memiliki akurasi yang baik, namun memerlukan tahapan yang panjang (McNair and Miller, 2009).

3. Adisi standar

Adisi standar merupakan standar yang ditambahkan ke dalam sampel, tetapi memiliki sifat fisika kimia yang sama dengan analit. Peningkatan sinyal dihasilkan dari penambahan standar proporsional terhadap jumlah standar yang ditambahkan dan digunakan untuk menentukan konsentrasi analit di dalam sampel (McNair and Miller, 2009).

2.6.4 Aplikasi Kromatografi Gas

Kromatografi gas umumnya digunakan dalam analisis makanan secara kuantitatif dan/atau kualitatif, yaitu menganalisis komposisi makanan, produk alami, zat aditif makanan serta komponen rasa dan aroma (Al-Bukhaiti *et al.*, 2017). Berdasarkan Watson (2012) KG dapat digunakan dalam mengkarakterisasi cemaran di dalam produk obat, menguji residu pelarut dan cemaran menguap lainnya di dalam senyawa obat, mengkarakterisasi beberapa bahan mentah untuk mensintesis molekul obat, mengkarakterisasi minyak yang mudah menguap (digunakan sebagai bahan tambahan di dalam formulasi) serta mengukur kadar obat dan metabolitnya di dalam cairan tubuh.