



**ANALISIS 5-HYDROXYMETHIL-2-FURFURAL PADA MADU
MENGUNAKAN METODE *MULTI-COMUTATION FLOW
INJECTION ANALYSIS* DENGAN SPEKTROFOTOMETER
UV-VIS**

SKRIPSI

Oleh

**Faradillah Anjani Rohim
151810301064**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2022**



**ANALISIS 5-HYDROXYMETHIL-2-FURFURAL PADA MADU
MENGUNAKAN METODE *MULTI-COMUTATION FLOW
INJECTION ANALYSIS* DENGAN SPEKTROFOTOMETER
UV-VIS**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Faradillah Anjani Rohim
151810301064**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2022**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Orang tua saya Abdul Rohim, S.Pd.I dan Ulfi Thoyibah, S.Pd.I yang sangat saya cintai, terimakasih yang tiada tara atas semua dukungan moril, materia, motivasi, dan tak lupa do'a yang selalu dipanjatkan setiap sujudnya.
2. Adik saya Tsania Aprilia Tahta Alfina, terimakasih atas do'a dan dukungannya.
3. Suami saya Ahmad Hendika, A.Md dan putri saya Nilna Warda Fatma Sabrina yang selau menemaniku, mendukungku, dan menyemangatiku di setiap langkah hidupku. Semoga kita selalu dapat hidup bersama dengan RidlaNya baik didunia maupun di akhirat.
4. Almamater tercinta Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, Bapak dan Ibu guru MIMA 35 Nurul Ulum, MTs Unggulan Nuris Jember, MA Unggulan Nuris Jember, serta dosen-dosen di jurusan Kimia FMIPA UNEJ yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan.
5. Tim kimia analitik Fellatiana, Mbak Desy Bro, dan teman seperjuangan yang telah membantu dan meberikan do'a terbaik untuk saya.
6. Semua pihak yang berkontribusi dalam penyelesaian skripsi ini, namun tidak dapat disebutkan satu persatu.

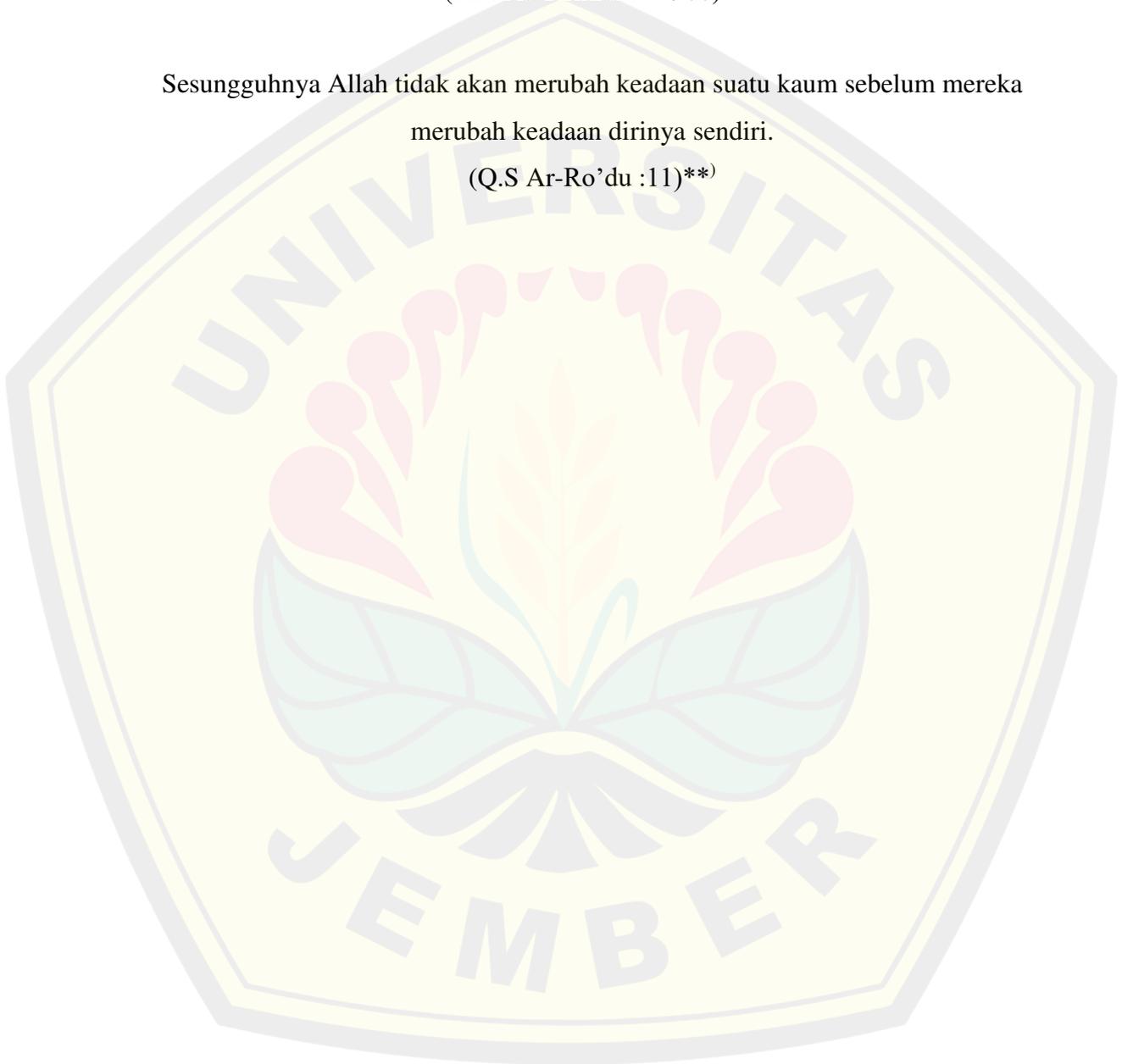
MOTTO

”Ridho Allah tergantung pada ridho orang tua, dan murka Allah tergantung pada murka kedua orang tua”

(HR. At-Tirmidzi : 1900)*)

Sesungguhnya Allah tidak akan merubah keadaan suatu kaum sebelum mereka merubah keadaan dirinya sendiri.

(Q.S Ar-Ro’du :11)**)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Faradillah Anjani Rohim

NIM : 151810301064

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis *5-Hydroxymethyl-2-Furfural* Pada Madu Menggunakan Metode *Multi-Comutation Flow Injection Analysis* Dengan Spektrofotometer Uv-Vis” adalah benar-benar hasil karya sendiri kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 5 Juli 2022

Yang Menyatakan

Faradillah Anjani Rohim

NIM : 151810301064

SKRIPSI

**ANALISIS 5-HYDROXYMETHIL-2-FURFURAL PADA MADU
MENGUNAKAN METODE *MULTI-COMUTATION FLOW
INJECTION ANALYSIS* DENGAN SPEKTROFOTOMETER
UV-VIS**

SKRIPSI

Oleh

**Faradillah Anjani Rohim
NIM 151810301064**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Tri Mulyono, S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Asnawati, S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul Analisis “Analisis *5-Hydroxymethyl-2-Furfural* Pada Madu Menggunakan Metode *Multi-Comutation Flow Injection Analysis* Dengan Spektrofotometer Uv-Vis” Dengan Spektrofotometer Uv-Vis” berjumlah 61 halaman karya Faradillah Anjani Rohim; Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam telah diuji dan disahkan pada :

Hari,tanggal : Rabu, 27 Juli 2022

Tempat : Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu

Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota I,

Trimulyono, S.Si., M.Si
NIP. 196810021998021001

Asnawati, S.Si., M.Si
NIP. 196808141999032001

Anggota II,

Anggota III,

Drs. Siswoyo, M.Sc., Ph.D
NIP. 196605291993031003

drh. Wuryanti Handayani,
M.Si NIP.
196008221985032002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Drs. Achmad Sjaifullah. M.Sc., P.h.D
NIP. 19591009198602100

RINGKASAN

Analisis 5-Hydroxymethyl-2-Furfural Pada Madu Menggunakan Metode Multi-Comutation Flow Injection Analysis Dengan Spektrofotometer Uv-Vis; Faradillah Anjani Rohim; 151810301064; 61 Halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Madu merupakan cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis. Rasa manis tersebut dihasilkan oleh sari bunga tanaman atau hasil ekskresi dari serangga. Madu banyak dikonsumsi oleh masyarakat karena kandungannya yang banyak dan baik untuk kesehatan tubuh. Namun, sering kali madu dipalsukan oleh kalangan masyarakat yang tidak bertanggung jawab. Madu juga mengandung beberapa vitamin, enzim, air, polifenol, dan *Hydroxy methylfurfural* (HMF). *Hydroxy methylfurfural* salah satu kandungan yang dapat digunakan dalam penentuan kualitas madu.

HMF merupakan senyawa yang terbentuk akibat dehidrasi glukosa atau fruktosa. Kandungan HMF dalam madu semakin banyak maka kualitas madu akan semakin berkurang. Kadar HMF juga dapat bertambah semakin tinggi akibat pengaruh pemanasan dan waktu penyimpanan yang terlalu lama. Madu dikatakan masih baik dan aman dikonsumsi apabila tidak melebihi 50 mg/kg. Analisis kadar HMF dalam madu sudah banyak dilakukan, diantaranya dengan metode *white*, metode HPLC, dan metode *winkler*. Metode *white* tidak digunakan karena tidak bisa digunakan untuk pengukuran dengan konsentrasi yang rendah. Metode HPLC tidak digunakan karena menggunakan pelarut methanol yang mempunyai sifat toksisitas tinggi, sehingga metode *winkler* digunakan dalam penelitian.

Metode *Flow Injection Analysis* (FIA) sudah banyak dilakukan dalam analisis. Kekurangan metode FIA yakni penggunaan reagen yang terlalu banyak sehingga limbah yang dihasilkan juga semakin banyak. Kekurangan metode FIA dapat di atasi dengan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* (MCFIA). Kelebihan metode MCFIA diantaranya fleksibilitas sistim aliran

meningkat, pencampuran larutan meningkat, dapat dilakukan secara otomatis, larutan yang digunakan lebih sedikit, dan limbah yang dihasilkan juga sedikit.

MCFIA merupakan metode pengembangan dari FIA (*Flow Injection Analysis*). Komponen utama dalam teknis analisis menggunakan metode MCFIA yakni *thre-way selenoid valve*, *reaction coil*, pompa peristaltik, dan detektor. Detektor yang digunakan dalam penelitian adalah spektro UV-Vis. Komponen pendukung dari metode MCFIA adalah komputer (*Labview 2012*), Arduino Uno yang berfungsi sebagai mikrokontroler, *relly*, *power supply*, dan *webcam* yang berfungsi untuk merekam data yang dihasilkan oleh detektor.

Cara kerja metode MCFIA yakni saat katup selenoid mati maka pompa peristaltik akan menarik *carier* (HCl) menuju detektor sehingga membentuk *baseline*. *Thre-way selenoid valve* secara bergantian akan diaktifkan secara otomatis oleh Arduino Uno, dimana katup V_1 akan menarik reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat), kemudian V_2 akan menarik larutan standar HMF/sampel madu. Larutan kemudian menuju *mixing coil* untuk pencampuran, kemudian menuju detektor spektrofotometer UV-Vis untuk diukur absorbansinya. Nilai absorbansi akan ditangkap oleh *webcam* dan diolah menggunakan teknik OCR (*Optical Character Recognition*) untuk mengubah data absorbansi dalam bentuk gambar menjadi data numerik (*Digital teks*) yang dapat terlihat pada komputer.

Volume optimum reagen yang digunakan dalam penelitian yakni 600 μL dengan panjang gelombang maksimum adalah 440 nm, laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$, dan diameter pipa sebesar 0,8 mm. Kualitas kinerja sistim alir MCFIA dilihat dilihat dari linieritas, sensitivitas, limit deteksi, repeatabilitas, dan *% recovery*. Persamaan yang diperoleh $y = 0,036x + 0,0562$, koefisien korelasi $R^2 = 0,9965$, sensitivitas sebesar 0,036, limit deteksi sebesar 0,2 ppm, repeatabilitas $< 2\%$, dan uji perolehan kembali (*% recovery*) untuk sampel madu A 104% sedangkan sampel madu murni 113%. Kadar HMF pada sampel madu merk A 23,1 ppm sedangkan pada madu murni sebesar 18,6 ppm. Kadar HMF pada sampel madu murni 10,6 mg/kg sedangkan madu merk A sebesar 13,5 mg/kg menurut BSN sampel madu yang digunakan masih baik kualitasnya

PRAKATA

Alhamdulillah puji syukur kehadiran Allah SWT. Atas segala rahmat dan karunia-Nyasehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis *5-Hydroxymethyl-2-Furfural* Pada Madu Menggunakan Metode *Multi-Comutation Flow Injection Analysis* Dengan Spektrofotometer Uv-Vis” skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata 1 (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusun skripsi tidak lepas dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
2. Dr. Anak Agung Istri Ratna Dewi, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
3. Kepala Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
4. Trimulyono, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam penulisan skripsi ini.
5. Asnawati, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dan membimbing penulisan skripsi dengan penuh kesabaran
6. Drs. Siswoyo, M.Sc., P.hD., selaku dosen penguji I dan drh. Wuryanti Handayani, M.Si selaku dosen penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji, mengkritik serta memberikan saran demi terbentuknya skripsi yang baik.
7. Bapak Ibu Dosen FMIPA UNEJ terutama bapak dan ibu dosen jurusan kimia yang telah mendidik dan memberikan ilmu pengetahuan.

8. Teknisi-teknisi laboratorium Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
9. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan ilmu yang bermanfaat bagi pembaca.

Jember, 5 Juli 2022

Penulis



DAFTAR ISI

JUDUL SKRIPSI	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LABEL	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINAJUAN PUSTAKA	5
2.1 Madu	5
2.2.1 Komposisi Madu.....	5
2.2 HMF (HMF)	6
2.3.1 Instrumentasi <i>Multi-commutation</i> FIA (MCFIA).....	10
2.3.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi Analisis Sistem Alir.....	14
2.4 Spektrofotometri	17
2.4.1 Instrumen Spektrofotometer	18
2.4.2 Hukum Dasar Lambert Beer	19
2.5 Software LabVIEW	20
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2 Alat dan Bahan	21

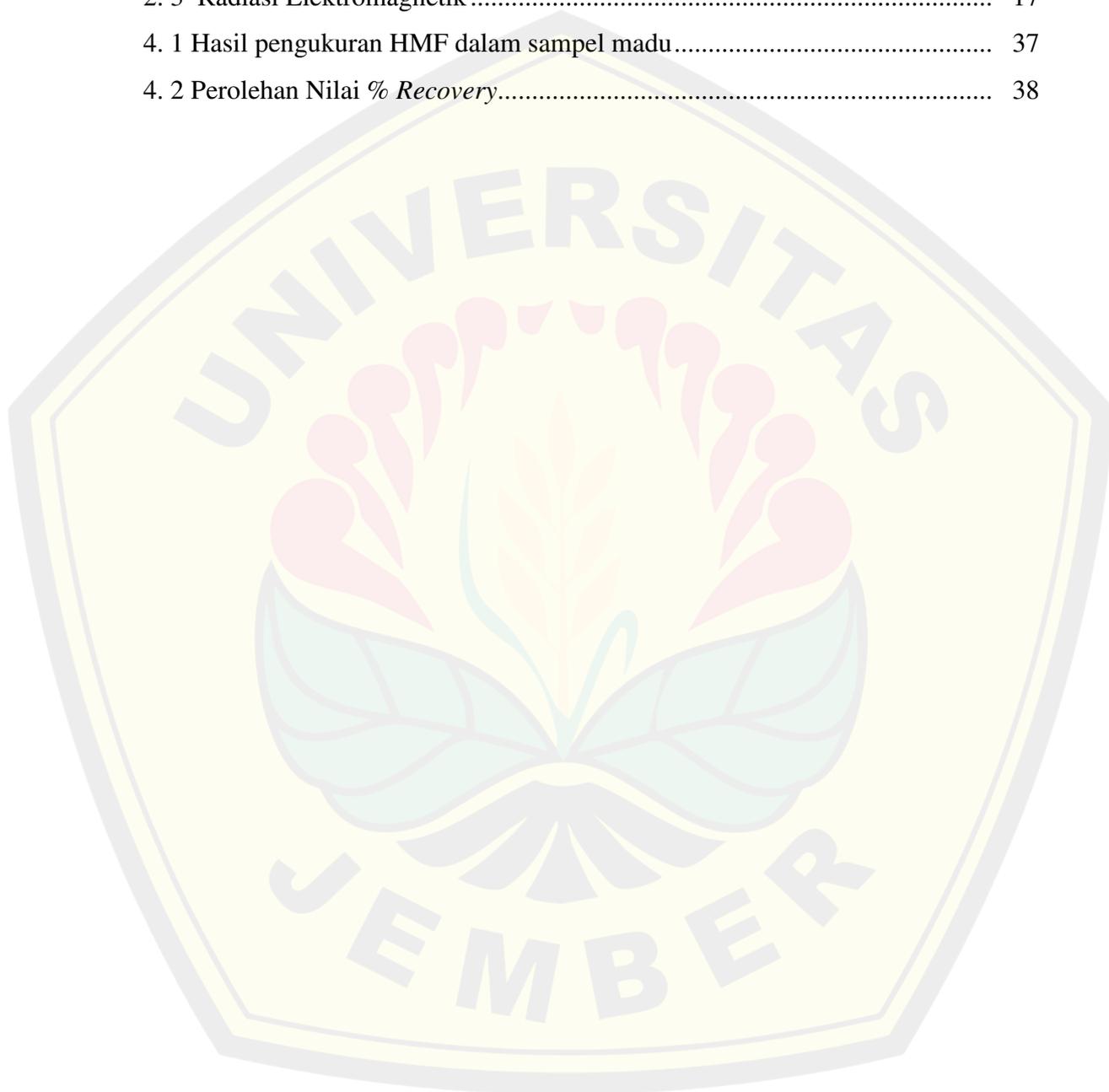
3.2.1	Alat	21
3.2.2	Bahan	21
3.3	Diagram Alir	22
3.4	Prosedur Penelitian	23
3.4.1	Pembuatan Larutan	23
3.4.2	Skema Alat	24
3.4.3	Prosedur MCFIA	24
3.4.4	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	25
3.4.5	Penentuan Volume Maksimum Reagen	25
3.4.6	Karakteristik Data	25
3.4.7	Preparasi Sampel	27
3.4.8	Pengukuran Sampel	28
3.4.9	% Recovery	28
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Optimasi Volume Injeksi Reagen Asam Barbiturat dan Asam p-aminobenzoat	31
4.2	Kurva Kalibrasi	33
a.	Linieritas	34
b.	Sensitivitas	35
c.	Limit Deteksi	35
d.	Repeatabilitas	35
4.3	Analisis Sampel	36
4.4	Uji Perolehan Kembali (<i>Recovery</i>)	37
BAB 5.	PENUTUP	39
5.1	Kesimpulan	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	44

DAFTAR GAMBAR

2. 1 Struktur Kimia <i>Hydroxymethyl Furfural</i>	6
2. 2 Monosakarida (Heksosa) dalam Suasana Asam	6
2. 3 Sistem <i>Multi-commutation</i>	8
2. 4 Pembentukan aliran pada <i>reaction coil</i> . S_1 dan S_2 : larutan; V : <i>three way</i>	9
2. 5 <i>Multi-Commutation</i> Bentuk Model Aliran Sampel dan Reagen.	9
2. 6 Pompa Peristaltik	10
2. 7 Sistem Kerja <i>Three-Way Solenoid Valve</i>	12
2. 8 Modul Mikrokontroler <i>Arduino Uno</i>	14
2. 9 Pengaruh Diameter Tube Terhadap Proses Dispersi.....	15
2. 10 Pengaruh Panjang Reaktor Terhadap Proses Dispersi	15
2. 11 Pengaruh Injeksi Volume Terhadap Proses Dispersi	16
2. 12 Pengaruh Laju Alir Terhadap Proses Dispersi	16
2. 14 Model Aliran <i>Multi Commutation Flow Injection Analysis (MCFIA)</i>	24
3. 1 Diagram Analisis Madu Dengan Metode MCFIA	22
3. 2 Desain Instrumen MCFIA	24
4. 1 Struktur Senyawa <i>Hydroxy Methilfurfural</i>	29
4. 2 Reaksi HMF dengan Reagen	29
4. 3 Panjang Gelombang Maksimum senyawa kompleks antara HMF 15 ppm ..	30
4. 4 Hasil Optimasi Volume Reagen (Asam Barbiturat Dan Asam P-	32
4. 5 Kurva Pengaruh Volume Injeksi Reagen (Asam Barbiturat dan P-.....	31
4. 6 Profil Puncak Absorbansi Larutan Standar HMF Menggunakan Metode	33
4. 7 Profil Puncak Absorbansi Larutan Standar HMF Menggunakan Metode	34
4. 8 Konsistensi Nilai Pengukuran HMF Pada Masing-Masing Konsentrasi	36

DAFTAR TABEL

2. 1 Komposisi Madu	6
2. 2 Persyaratan Mutu Madu	7
2. 3 Radiasi Elektromagnetik	17
4. 1 Hasil pengukuran HMF dalam sampel madu.....	37
4. 2 Perolehan Nilai % <i>Recovery</i>	38



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara agraris sehingga berbagai jenis tanaman dapat tumbuh, hal ini akan menjadikan Indonesia mempunyai potensi untuk menghasilkan madu yang bermacam-macam (Nanda dkk, 2015). Madu adalah cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis. Rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar) atau bagian lain dari tanaman (ekstra floral nektar) atau hasil ekskresi dari serangga (BSN, 2004). Madu sangat baik dikonsumsi karena mempunyai kandungan mineral, seperti natrium, kalium, kalsium, fosfor, magnesium, besi, dan aluminium. Madu juga mengandung beberapa vitamin diantaranya vitamin K, thiamin (B1), asam folat, riboflavin (B2), biotin, asam askorbat (C), asam pantotemat, piridokasin (B6), dan niasin. Enzim terpenting dalam kandungan madu diantaranya enzim diastase, lipase, invertase, glukosa oksidase, dan peroksidase (Suranto, 2004).

Hidroksimetilfurfural (HMF) merupakan salah satu kandungan yang ada pada madu. Menurut Iglesias dkk (1997) HMF adalah produk reaksi dari transformasi heksosa dalam media asam atau produk dari pemecahan gula akibat pemanasan dan juga faktor penyimpanan (Salinas dkk, 1991). Konsentrasi HMF akan meningkat akibat pengaruh suhu, waktu pemanasan, pH, serta lama penyimpanan (Astoldi dkk, 2016). Kadar HMF juga menjadi salah satu faktor kerusakan madu karena adanya pemanasan yang berlebihan ataupun pemalsuan dengan gula *invert*. Gula *invert* merupakan suatu campuran dengan perbandingan yang sama dari glukosa dan fruktosa yang dihasilkan dari hidrolisis sukrosa (Harjo dkk, 2015). Madu yang baik menurut BSN (2004) yakni madu yang mempunyai kadar HMF maksimal 50 mg/kg.

Metode analisis dalam penentuan HMF sudah banyak dikembangkan. Diantaranya, menggunakan metode *winkler* (Salinas dkk, 1990), metode *white* (Koesprimadisari dkk, 2016), dan HPLC (Ajlouni dkk, 2010). Menurut Bogdanov dkk (2009) metode yang direkomendasikan yakni HPLC dan dua teknik

spektroskopi yakni metode winkler dan metode *white*. Kekurangan dari metode HPLC yakni dalam penggunaan pelarut. Pelarut yang digunakan dalam metode HPLC adalah metanol yang merupakan suatu senyawa dengan sifat toksisitas yang tinggi sehingga berpotensi bahaya bagi lingkungan dan kesehatan manusia.

Teknik spektroskopi dengan menggunakan metode *white* tidak dapat memberikan pengukuran yang akurat untuk konsentrasi yang rendah (Wunderlin dkk, 1998). Menurut Bogdanov dkk (2009) metode winkler juga tidak boleh digunakan apabila metode HPLC dan spektroskopi dengan metode *white* masih tersedia. Hal ini dikarenakan dalam metode winkler reagen yang digunakan adalah *p-toluidine* (Bogdanov dkk, 2009). *P-toluidine* merupakan senyawa beracun yang berpotensi karsinogenik (Castoldi dkk, 2016), oleh karena itu reagen *p-aminobenzena* digunakan sebagai pengganti dari *p-toluidine*. *P-aminobenzena* menurut Castoldi dkk (2016) merupakan senyawa yang mempunyai toksisitas yang rendah dan juga dapat bereaksi dengan HMF membentuk warna kompleks kuning. Sehingga, metode winkler dengan reagen *p-aminobenzena* digunakan dalam penelitian.

Metode analisis menggunakan *flow injection* sudah banyak digunakan mengingat penggunaannya dapat meningkatkan kecepatan dan jumlah analisis (Rocha dkk, 2001). Metode *Flow Injection Analysis* konvensional mempunyai keterbatasan yakni dalam penggunaan reagen yang relatif besar sehingga limbah yang dihasilkan juga semakin banyak. Selain itu, cara analisisnya dilakukan secara manual sehingga kurang efisien apabila digunakan untuk analisa sampel dengan jumlah yang banyak. Beberapa keterbatasan dari FIA ini dapat di atasi dengan menggunakan konsep *multi-commutation*. Sistem aliran injeksi dengan menggunakan konsep ini mempunyai banyak keuntungan diantaranya dapat meningkatkan fleksibilitas sistem alir, dapat meningkatkan pencampuran, dapat dijalankan dengan otomatis, dan juga dapat mengurangi penggunaan reagen sehingga jumlah limbah yang dihasilkan akan berkurang.

Multi-commutated Flow Injection Analysis (MCFIA) adalah salah satu modifikasi dari *Flow Injection Analysis* (FIA) yakni metode analisis dengan cara menyuntikkan sejumlah sampel pada aliran *carrier*, kemudian akan terjadi reaksi

yang dapat dideteksi oleh detektor. Adapaun faktor yang dapat mempengaruhi analisis menggunakan metode ini diantaranya panjang reaktor, diameter pipa, laju alir, dan volume injeksi. Keuntungan utama dalam penggunaan MCFIA yakni pemanfaatan suntikan sampel dapat dilakukan dengan berturut-turut dan penggunaan volume dapat mudah diatur. Teknik ini menggunakan katup selenoid tiga arah yang dikendalikan melalui mikroprosesor (Trojanowicz, 2008). Metode MCFIA sudah banyak dikembangkan diantaranya untuk penentuan kandungan amonium dan nitrat dalam air (Hikmah, 2019) dan penentuan kadar klorin bebas dalam beras (Ulfa, 2018).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini difokuskan menggunakan metode MCFIA dengan detektor spektrofotometer Uv-Vis untuk analisis penentuan kadar HMF dalam madu. Reagen yang digunakan dalam penelitian adalah p-aminobenzena dan asam barbiturat. Diharapkan metode ini mendapatkan respon yang baik dan cepat.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang ditulis dapat dirumuskan permasalahannya sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh volume injeksi reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) terhadap respon deteksi HMF menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* dengan detektor spektrofotometer UV-Vis?
2. Bagaimana karakteristik pengukuran (linieritas, sensitivitas, limit deteksi, repeatabilitas, dan *% recovery*) dalam analisis HMF menggunakan *Multi Commutation Flow Injection Analysis* (MCFIA) menggunakan spektrofotometer UV-Vis?
3. Berapa kadar HMF dalam madu menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* dengan deteksi spektrofotometer Uv-Vis?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh volume injeksi reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) terhadap respon deteksi HMF menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* dengan detektor spektrofotometer UV-Vis?
2. Mengetahui karakteristik pengukuran (linieritas, sensitivitas, limit deteksi, repeatabilitas, dan % *recovery*) dalam analisis HMF menggunakan *Multi Commutation Flow Injection Analysis* (MCFIA) menggunakan spektrofotometer UV-Vis?
3. Mengetahui kadar HMF dalam madu menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* dengan deteksi spektrofotometer Uv-Vis?

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini meliputi :

1. Sampel madu yang digunakan dalam penelitian yakni madu murni dari Desa Seputih Mayang Jember dan Merk A
2. Laju alir dalam penelitian ini yakni 25 μL /detik
3. Diameter *tube* yang digunakan 0,8 mm

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian yang dilakukan dapat memberikan informasi mengenai analisis menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* (MCFIA) dengan detektor spektrofotometer UV-Vis dan salah satu metode yang dapat digunakan dalam analisis kandungan HMF pada madu.

BAB 2 TINAJUAN PUSTAKA

2.1 Madu

Madu merupakan pemanis yang pertama kali dikenal oleh manusia sebelum gula. Madu merupakan cairan alami yang dihasilkan oleh lebah madu yang berasal dari nektar bunga (Evahelda dkk, 2017). Menurut Standart Nasional Indonesia (SNI) madu merupakan cairan alami yang berasal dari tubuh lebah kemudian disimpan pada madu sampai mengalami proses pematangan (BSN, 2004).

Madu dapat dikonsumsi secara langsung oleh manusia tanpa melalui proses pengolahan. Nektar atau sari bunga akan diolah dalam kelenjar lebah menjadi madu, sehingga madu yang dihasilkan dari nektar (sari bunga) yang berbeda akan memiliki rasa, warna, aroma, dan manfaat yang berbeda-beda (Suranto, 2004). Madu yang berasal dari pohon yang sama akan mempunyai komposisi yang beragam. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya perbedaan iklim, topografi, sumber nektar, dan jenis lebah. Komposisi utama di dalam madu yakni air, fruktosa, glukosa, sukrosa, protein, dan garam mineral (Antary dkk, 2013).

Komposisi madu salah satunya adalah mineral, mineral yang terkandung pada madu adalah 18 unsur mineral esensial dan 19 unsur non esensial. Mineral yang terkandung antara lain kalium (K), natrium (Na), magnesium (Mg), besi (Fe), klor (Cl), fosfor (P), belerang (S), dan idium (I), dan garam radium. Madu tiruan biasanya terdiri dari sirup dengan fruktosa yang tinggi, kemudian juga mempunyai perbandingan kadar natrium dan kalium sebesar 0,05:1 sampai 0,1:1 (Antary dkk, 2013).

2.2.1 Komposisi Madu

Madu merupakan produk alami dengan komposisi yang bervariasi pada masing-masing madu. Komposisi yang terkandung pada umumnya ditunjukkan pada Tabel 2.1

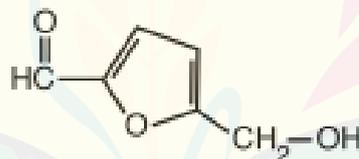
Tabel 2. 1 Komposisi Madu

Kandungan	Rata-rata	Kisaran	Deviasi Standart
Fruktosa/Glukosa	1,23	0,76 - 1,86	0,126
Fruktosa, %	38,38	30,91 - 44,26	1,77
Glukosa, %	30,31	22,89 - 44,26	3,04
Maltosa,% (sakarida tereduksi)	7,3	2,7 - 16,0	2,1
Sukrosa, %	1,31	0,25 - 7,57	0,87
Gula, %	83,72		
Mineral (abu), %	0,169	0,020 - 1,028	0,15
Asam bebas (asam glukonat)	0,43	0,13 - 0,92	0,16
Nitrogen	0,041	0,000 - 0,133	0,026
Air, %	17,2	13,4 - 22,9	1,5
PH	3,91	3,42 - 6,01	-
Total keasaman, meq/kg	29,12	8,68 - 59,49	10,33
Protein,mg/100g	168,6	57,7 - 56,7	70,9

(BSN, 2004).

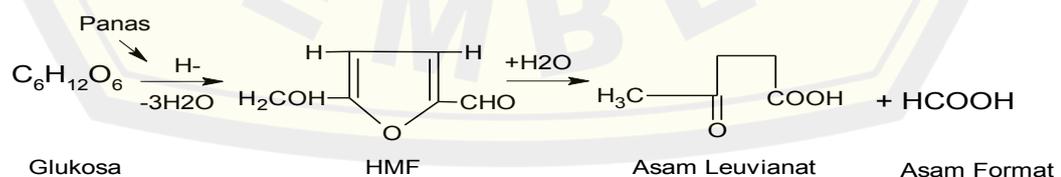
2.2 HMF (HMF)

HMF yang terdapat pada madu merupakan suatu senyawa kimia yang terbentuk dari pecahan monosakarida dalam madu baik pecahan dari glukosa maupun fruktosa. Struktur dari HMF ditunjukkan pada Gambar 2.1



Gambar 2. 1 Struktur Kimia *Hydroxymethyl Furfural*
(Sumber: Keppy dkk, 2000)

HMF dapat terbentuk dalam keadaan asam dan juga dengan bantuan panas. Reaksi ini selanjutnya akan menghasilkan asam format dan asam leuvinat. Adapun reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2. 2 :



Gambar 2. 2 Monosakarida (Heksosa) dalam Suasana Asam
(sumber : Siregar, 2002).

Kadar HMF juga menjadi salah satu faktor kerusakan madu karena adanya pemanasan yang berlebihan ataupun pemalsuan dengan gula *invert*. Gula *invert* adalah suatu campuran dengan perbandingan yang sama dari glukosa dan fruktosa yang dihasilkan dari hidrolisis sukrosa (Harjo dkk, 2015). HMF merupakan senyawa yang terbentuk akibat dehidrasi glukosa atau fruktosa. Kandungan maksimal *hidroxymethylfurfural* yang terdapat pada madu yakni 50 mg/kg (BSN, 2004). Apabila kandungan pada sebuah madu melebihi dari batas maksimal maka dapat dipastikan madu tersebut merupakan madu palsu (Koesprimadisari dkk, 2016). Codex Alimentarius menetapkan kadar maksimal HMF pada madu yakni 40 mg/kg, penetapan ini ditujukan hanya pada madu yang berasal dari daerah beriklim tropis (Bogdanov dkk, 2004). Tabel persyaratan mutu madu yang dikemukakan oleh Badan Standart Nasional ditunjukkan pada Tabel 2. 2.

Tabel 2. 2 Persyaratan Mutu Madu

No.	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
1	Aktivitas enzim diatase, min.	DN	3
2	HMF (HMF), maks.	mg/kg	50
3	Air, maks.	%b/b	22
4	Gula pereduksi (dihitung sebagai glukosa) minimal	%b/b	65
5	Sukrosa, maks.	%b/b	5
6	Keasaman, maks.	ml NaOH 1N/kg	50
7	Padatan yang tidak larut air, maks.	%b/b	0,5
8	Abu, maks.	%b/b	0,5
9	Cemaran logam		
	Timbal (Pb), maks.	mg/kg	1,0
	Tembaga (Cu), maks.	mg/kg	0,5
10	Cemaran arsen (As), maks.	mg/kg	0,5

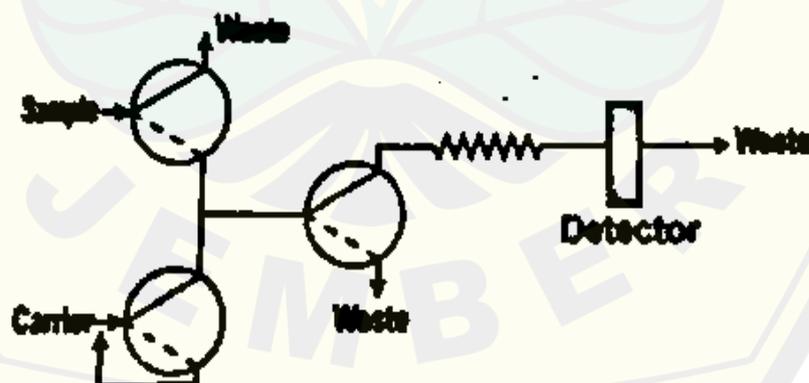
Keterangan : DN = *Denatase Number*
(Sumber : BSN, 2004).

2.3 Flow Injection Analysis

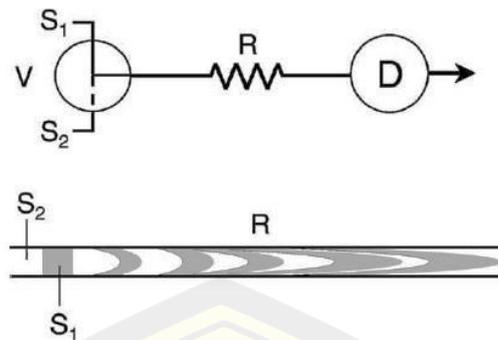
Flow injection analysis adalah suatu metode teknik aliran yang berjalan secara langsung dan sangat sesuai untuk menganalisa secara otomatis. Metode ini digunakan pertama kali oleh Ruzicka dan Hansen pada tahun 1975 untuk menganalisa air (Skoog and Leary, 1992). Prinsip kerja dari *Flow Injection Analysis* (FIA) didasarkan pada volume sampel yang dimasukkan dalam aliran *carrier*.

Aliran ini kemudian akan mengalir menuju *loop* yang berfungsi sebagai energi untuk reagen dalam proses reaksi kimia antara sampel dan reagen, kemudian apabila dibutuhkan *buffer* maka dapat dialirkan menggunakan pompa peristaltik. Sampel dan reagen kemudian akan dialirkan menggunakan pompa yang akan mengalir menuju detektor dan terakhir akan masuk pada pembuangan (Kennedy, 1990).

Multi-commutation in Flow Injection Analysis (MCFIA) adalah modifikasi dari sistem alir *Flow Injection Analysis* (FIA) yang dikendalikan oleh komputer sehingga sistem alir pada setiap langkah akan berjalan secara otomatis. *Multi Commutation Flow Injection Analysis* (MCFIA) menggunakan perangkat katup *solenoid*, perangkat ini dapat diatur secara manual atau juga bisa diatur secara otomatis menggunakan komputer yang dibantu dengan software. Kelebihan dari metode MCFIA diantaranya fleksibilitas sistem meningkat, mengurangi penggunaan analit dan reagen, rekasi pencampuran semakin meningkat, dan dapat dilakukan dengan otomatis. Keuntungan utama dari metode tersebut adalah injeksi sampel dapat dilakukan berturut-turut serta volume pada masing-masing bagian dapat lebih mudah dikontrol Rocha dkk, (2002). Prinsip metode *Multi-commutation* disarkan pada waktu injeksi, dimana suatu sampel akan diinjeksi dengan volume tertentu kemudian akan dialirkan melalui selenoid seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3



Gambar 2. 3 Sistem *Multi-commutation*
(Sumber: Pramauro dkk., 1996)



Gambar 2. 4 Pembentukan aliran pada *reaction coil*. S₁ dan S₂: larutan; V: *three way solenoid valve*; R: *reaction coil*; D: detektor
(Sumber: Rocha dkk, 2002)



Gambar 2. 5 *Multi-Commutation* Bentuk Model Aliran Sampel dan Reagen. Cs: Larutan Carrier; R: Larutan Reagen; S: Larutan Sampel. Simbol Lingkaran Hitam Menunjukkan Bahwa Sampel dan Reagen Mengalami Pencampuran
(Sumber : Lavorante dkk, 2007)

Sampel dan reagen yang dialirkan ke dalam media alir akan membentuk model aliran seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3. Sampel bergerak melalui zona pencampuran dan terjadi reaksi, lebar aliran akan meningkat karena sampel menyebar ke dalam cairan pembawa seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.4. Hasil dispersi berasal dari dua proses, yaitu proses konveksi karena aliran dari cairan pembawa dan difusi karena gradien konsentrasi antara sampel dan cairan pembawa. Parameter fisik yang mempengaruhi tinggi puncak dan waktu kembali mencakup volume sampel yang disuntikkan, laju aliran, panjang, diameter dan geometri pencampuran dan zona reaksi. Kinetika reaksi kimia antara sampel dan reagen dalam cairan pembawa juga mempengaruhi tinggi puncak dan waktu kembali (Harvey, 2016).

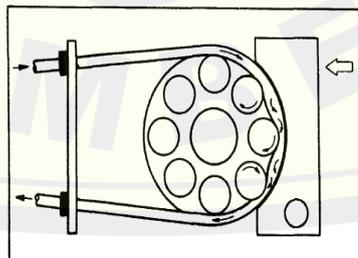
Pencampuran sampel dengan reagen dalam aliran terjadi terutama disebabkan oleh proses difusi terkontrol dan terjadi reaksi kimia. Detektor secara kontinu merekam parameter absorban, potensial elektroda atau parameter-parameter fisik lainnya sebagai hasil yang diterima dari perubahan sampel setelah aliran terjadi (Christian, 1989).

2.3.1 Instrumentasi *Multi-commutation* FIA (MCFIA)

Sistem alir *Multi-commutation* FIA (MCFIA) paling sedikit terdiri dari empat komponen utama, yaitu: pompa, *insertion unit injection*, *transport* dan *reaction unit/ mixing reaction*, dan *detection*. Sedangkan komponen pendukung yang digunakan misalnya komputer yang mengatur jalannya sampel, *Arduino Uno*, *ADC (analog to digital converter)*, perekaman data dari detektor dan perhitungan hasil analisis.

a. Unit penggerak

Suatu unit yang berfungsi menggerakkan cairan ke unit-unit yang lain dalam suatu FIA dengan kecepatan (*flow rate*) yang konstan dan bebas dari denyut atau gangguan selama aliran berlangsung (*pulse-free*). Unit ini dapat berupa pompa peristaltik, pompa syringe, dan botol bertekanan tinggi atau diletakkan dengan ketinggian tertentu. Pompa peristaltik memiliki prinsip kerja berdasarkan tekanan dan perpindahan. Pompa peristaltik harus didukung suatu pipa elastis untuk menggerakkan cairan. Pipa-pipa ini ditekan oleh beberapa pemutar yang berputar dan menekan secara bergantian, dengan cara ini cairan yang berada dalam pipa dapat digerakkan (Karlberg dan Gil, 1989)



Gambar 2. 6 Pompa Peristaltik
(Sumber: Karlberg dan Gil, 1989)

b. Unit transportasi

Unit ini memiliki beberapa fungsi, diantaranya adalah :

- 1) Tempat terjadinya pencampuran dan reaksi yang diinginkan
- 2) Sebagai tempat mengalirnya sampel, larutan pembawa dan reagen
- 3) Menghubungkan bagian satu dengan bagian lainnya dalam FIA.

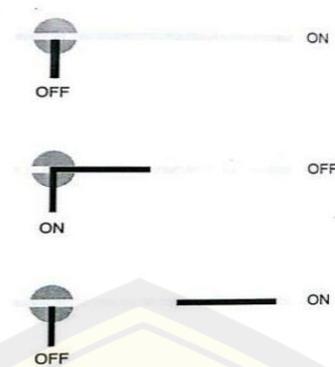
Pipa yang digunakan dalam unit ini memiliki ukuran internal diameter (i.d) dalam range 0,1–2 mm, namun yang sering digunakan adalah 0,3; 0,5 dan 0,7 mm yang masing-masing digunakan untuk menghasilkan dispersi yang rendah, sedang dan tinggi. Material pipa ini dapat berupa PVC, silicon atau plastik lainnya. Selain pipa juga terdapat konektor dalam transport unit ini yang berfungsi menghubungkan pipa yang satu dengan yang lainnya. Komponen penting dalam transport unit yang lain adalah reaktor. Reaktor dalam FIA dapat dikategorikan sebagai *open tube*, *coil and packed reactor*, *single bed string rector* (sbsr) dan *mixing chamber*.

c. Unit Penyisipan

Unit ini bertugas untuk memasukkan sampel dengan volume tertentu ke dalam aliran carier dengan ketentuan :

- 1) Sampel yang dimasukkan dalam volume yang akurat dan *reproduisibel*
- 2) Sampel harus masuk dalam aliran carier sedemikian rupa sehingga tidak mengganggu jalannya aliran tersebut
- 3) Operasi injeksi harus cepat dan kalau mungkin dapat dikontrol secara elektronik

Unit penyisipan yang digunakan dalam sistem *Multi-commutation* yakni *three-way solenoid valve* atau sering disebut katup solenoid 3 saluran yang memiliki 1 lubang inlet, 1 lubang outlet dan 1 lubang pembuangan. Namun penggunaan katup solenoid 3 saluran dalam sistem *Multi-commutation* dapat pula menjadi 2 lubang inlet dan 1 lubang outlet atau sebaliknya. Untuk sistem kerja *three-way solenoid valve* dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2. 7 Sistem Kerja *Three-Way Solenoid Valve*
(Sumber: Pramauro dkk. 1996)

d. Detektor

Detektor yang digunakan dalam FIA idealnya memiliki keistimewaan diantaranya: kecilnya volume *flow-cell*, *noise* rendah, *flow rate independent* signal, respon yang cepat dan linear dalam daerah konsentrasi yang lebar dan sensitivitasnya tinggi. Kriteria utama detektor FIA adalah cepat tanggap karena lebar puncak dari FIA hanya beberapa detik saja, maka detektor dan perangkat elektroniknya harus mempunyai waktu tanggap kurang dari satu detik. Beberapa detektor dalam sistem FIA yaitu amperometer, penyerap atom, luminisensi kimia, fluorometer, potensiometer, pH meter, elektroda membran ion selektif, dan spektrofotometer (Sukarti, 1998).

e. *Arduino Uno*

Arduino Uno berfungsi sebagai pengontrol *three-way solenoid valve* dengan pemrograman menggunakan komputer. *Arduino Uno* adalah salah satu produk berlabel arduino yang sebenarnya adalah suatu papan elektronik yang mengandung mikrokontroler ATmega328 (sebuah keping yang secara fungsional bertindak seperti sebuah komputer). Mikrokontroler adalah sebuah keping yang mengandung prosesor atau yang memproses dan sekaligus memori yang berguna untuk menyimpan data (Kadir, 2016).

Hardware arduino uno memiliki spesifikasi sebagai berikut:

1. 14 pin IO Digital (pin 0–13) Sejumlah pin digital dengan nomor 0–13 yang dapat dijadikan input atau output yang diatur dengan cara membuat program IDE.

2. 6 pin Input Analog (pin 0–5) Sejumlah pin analog bernomor 0–5 yang dapat digunakan untuk membaca nilai input yang memiliki nilai analog dan mengubahnya ke dalam angka antara 0 dan 1023.
3. 6 pin Output Analog (pin 3, 5, 6, 9, 10 dan 11) Sejumlah pin yang sebenarnya merupakan pin digital tetapi sejumlah pin tersebut dapat diprogram kembali menjadi pin output analog dengan cara membuat programnya pada IDE.

Papan Arduino Uno dapat mengambil daya dari USB port pada komputer dengan menggunakan USB charger atau dapat pula mengambil daya dengan menggunakan suatu AC adapter dengan tegangan 9 volt. Jika tidak terdapat power supply yang melalui AC adapter, maka papan Arduino akan mengambil daya dari USB port. Tetapi apabila diberikan daya melalui AC adapter secara bersamaan dengan USB port maka papan Arduino akan mengambil daya melalui AC adapter secara otomatis (B. Gustomo, 2015).

Software arduino yang digunakan adalah driver dan IDE, walaupun masih ada beberapa software lain yang sangat berguna selama pengembangan arduino. Integrated Development Environment (IDE), suatu program khusus untuk suatu komputer agar dapat membuat suatu rancangan atau sketsa program untuk papan Arduino. IDE arduino merupakan software yang sangat canggih ditulis dengan menggunakan java. IDE arduino terdiri dari :

1. Editor Program Sebuah window yang memungkinkan pengguna menulis dan mengedit program dalam bahasa processing.
2. Compiler Berfungsi untuk kompilasi sketch tanpa unggah ke board bisa dipakai untuk pengecekan kesalahan kode sintaks sketch. Sebuah modul yang mengubah kode program menjadi kode biner bagaimanapun sebuah mikrokontroler tidak akan bisa memahami bahasa processing.
3. Uploader Berfungsi untuk mengunggah hasil kompilasi sketch ke board target. Pesan error akan terlihat jika board belum terpasang atau alamat port COM belum terkonfigurasi dengan benar. Sebuah modul yang memuat kode biner dari komputer ke dalam memory di dalam papan arduino (B. Gustomo, 2015). Adapun bentuk fisik dari Arduino Uno ditunjukkan pada Gambar 2.8

Gambar 2. 8 Modul Mikrokontroler *Arduino Uno*

Sumber: (Ardian, 2013)

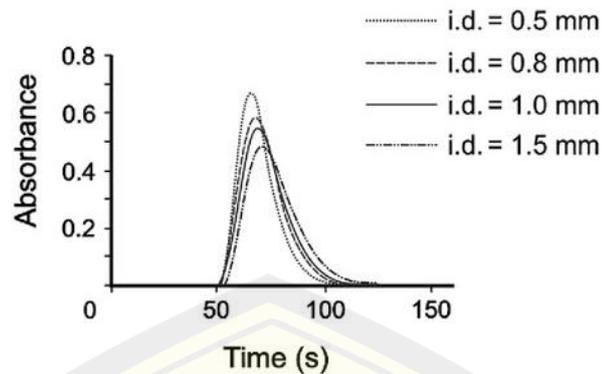
f. *ADC (analog to digital converter)*

Analog To Digital Converter (ADC) adalah pengubah input analog menjadi kode-kode digital. ADC banyak digunakan sebagai pengatur proses industri, komunikasi digital dan rangkaian pengukuran/pengujian. Umumnya ADC digunakan sebagai perantara antara sensor yang kebanyakan analog dengan sistem komputer seperti sensor suhu, cahaya, tekanan/berat, aliran dan sebagainya kemudian diukur dengan menggunakan sistem digital (komputer). ADC (Analog to Digital Converter) memiliki 2 karakter prinsip, yaitu kecepatan sampling dan resolusi. Kecepatan sampling suatu ADC menyatakan seberapa sering sinyal analog dikonversikan ke bentuk sinyal digital pada selang waktu tertentu. Kecepatan sampling biasanya dinyatakan dalam sample per second (SPS). Prinsip kerja ADC adalah mengkonversi sinyal analog ke dalam bentuk besaran yang merupakan rasio perbandingan sinyal input dan tegangan referensi (Gregory dkk., 2010).

2.3.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi Analisis Sistem Alir

a) Diameter pipa

Penurunan dispersi disebabkan oleh waktu TR yang rendah untuk *tube* dengan diameter kecil. Nilai kontribusi dapat diamati pada Gambar 2.9, bahwa semakin besar nilai kontribusi difusi maka terjadi peningkatan pada nilai TR. Gambar 2.9 menunjukkan bahwa lebar dan tinggi puncak merupakan fungsi dari jari-jari *tube*, lebar puncak meningkat dengan bertambahnya jari-jari dan tinggi puncak menurun dengan bertambahnya jari-jari.

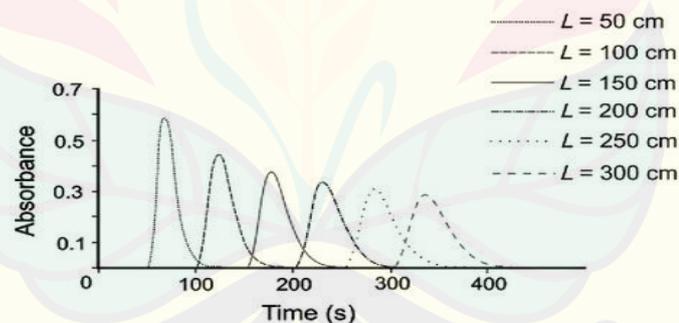


Gambar 2. 9 Pengaruh Diameter Tube Terhadap Proses Dispersi
(Sumber: Cerda dkk., 2014)

Gambar 2.9 menunjukkan bahwa semakin besar diameter *tube* maka proses dispersi semakin meningkat sehingga puncak yang dihasilkan semakin lebar dan rendah, apabila diameter *tube* semakin kecil maka proses dispersi semakin menurun dan puncak yang dihasilkan semakin runcing dan tinggi (Trojanowicz, 2008).

b) Panjang reaktor

Kasus pada bentuk reaktor ini, peningkatan jarak tempuh dapat meningkatkan dispersi sampel. Gambar 2.10 mengenai pengaruh panjang reaktor dengan dispersi sampel:

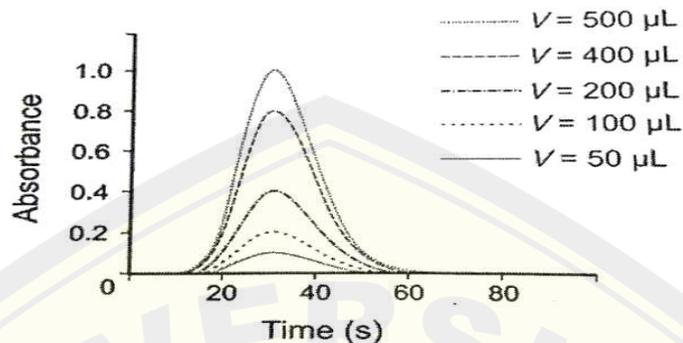


Gambar 2. 10 Pengaruh Panjang Reaktor Terhadap Proses Dispersi
(Sumber: Trojanowicz, 2008)

Gambar 2.10 menunjukkan semakin panjang reaktor/*coil* maka proses dispersi akan mengalami peningkatan sehingga puncak yang dihasilkan lebar dan rendah sedangkan semakin pendek reaktor/*coil* maka proses dispersi semakin sedikit sehingga puncak yang dihasilkan runcing dan tinggi. Panjang reaktor/*coil* semakin panjang maka sampel akan mengalami jarak tempuh yang lebih jauh menuju detektor sehingga sampel akan banyak mengalami proses dispersi (Trojanowicz, 2008).

c) Injeksi Volume

Jumlah volume yang diinjeksikan mempengaruhi tinggi puncak, semakin banyak volume injeksi semakin tinggi puncak yang dihasilkan.

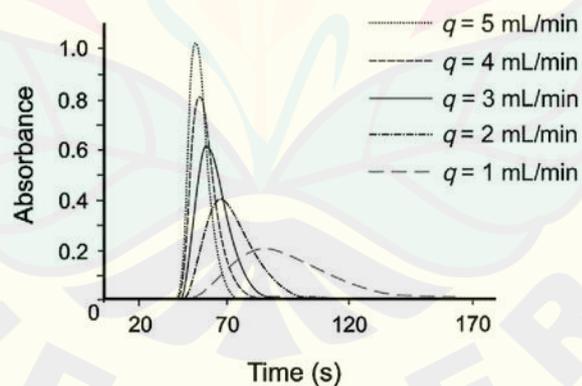


Gambar 2. 11 Pengaruh Injeksi Volume Terhadap Proses Dispersi
(Sumber: Trojanowicz, 2008)

Gambar 2.11 menunjukkan bahwa semakin banyak volume sampel yang di injeksi maka puncak yang dihasilkan semakin tinggi, apabila volume sampel yang di injeksi sedikit maka puncak semakin kecil (Trojanowicz, 2008).

d) Laju Alir

Efek laju alir juga berpengaruh pada proses dispersi, dispersi berkurang dengan meningkatnya laju alir



Gambar 2. 12 Pengaruh Laju Alir Terhadap Proses Dispersi
(Sumber: Cerda dkk., 2014)

Gambar 2.12 menunjukkan semakin besar laju alir maka proses dispersi semakin rendah sehingga menghasilkan puncak yang runcing, sedangkan semakin kecil laju alir maka proses dispersi semakin meningkat sehingga puncak menjadi lebar dan rendah (Trojanowicz, 2008).

2.4 Spektrofotometri

Spektrofotometri melibatkan penggunaan spektrofotometer, yaitu alat atau instrumen yang digunakan untuk mengukur transmittansi atau serapan suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Alat ini terdiri dari spektrometer yang menghasilkan sinar dan spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer sebagai pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometri molekular (baik kualitatif dan kuantitatif) bisa dilakukan di daerah sinar tampak, sama halnya seperti di daerah sinar ultraviolet dan daerah sinar inframerah (Khopkar, 2010).

Spektrofotometri Uv-Vis adalah teknik analisis spektroskopi dengan memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat dan sinar tampak (visible). Panjang gelombangnya sekitar 190-780 nm. Instrumen yang dipakai dalam spektrofotometer adalah spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995). Spektrofotometri UV-Vis merupakan suatu analisis yang menggunakan energi elektronik yang cukup besar dalam menganalisa suatu molekul. Adapun tabel radiasi elektro magnetik dapat dilihat pada Tabel 2.3

Tabel 2.3 Radiasi Elektromagnetik

Macam Sinar	Panjang Gelombang (nm)
Sinar X	10 - 100 pkm
Ultra-violet jauh	10 - 200 nm
Ultra-violet dekat	200 - 400 nm
Sinar tampak	400 - 750 nm
Inframerah dekat	0,75 - 2 μm
Inframerah tengah	2,5 - 50 μm
Inframerah Jauh	50 - 1000 μm
Gelombang mikro	0,1 - 100 μm
Gelombang radio	1 - 1000 μm

(Sumber : Mulja dan Suharman, 1995)

Energi yang dimiliki sinar tampak mampu membuat elektron tereksitasi dari keadaan dasar menuju kulit atom yang memiliki energi lebih tinggi atau menuju keadaan tereksitasi. Sinar tampak mempunyai panjang gelombang antara 400-750 nm. Spektrofotometri sinar tampak memiliki warna yang dapat dihubungkan dengan panjang gelombang. Sinar putih mengandung radiasi pada semua panjang gelombang di daerah sinar tampak dan warna-warna yang dapat

dihubungkan dengan panjang gelombang ini digunakan untuk menandai bagian-bagian dari spektrum tertentu seperti yang diringkas pada Tabel 2.4

Tabel 2.4 Spektrum Cahaya Tampak dan Warn-warna Komplementer

Panjang Gelombang	Warna yang Diserap	Warna Komplementer
400-435	Violet	Kuning-hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-Biru	Orange
490-500	Biru Hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning-hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Orange	Hijau-Biru
610-750	Merah	Biru-hijau

(Sumber : Day dan Underwood, 2002)

2.4.1 Instrumen Spektrofotometer

Bagian utama spektroskopi ada empat bagian, yakni sumber sinar, mono kromator, kuvet, dan detektor cahaya. Sumber Radiasi.

1. Sumber radiasi

Sumber radiasi dapat juga dikatakan sebagai lampu karena pada kenyataannya merupakan dua lampu yang terpisah bersama-sama, lampu tersebut juga mampu untuk menjangkau daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Persyaratan untuk sumber yang digunakan yakni intensitas emisi harus cukup tinggi, stabilitas pendek, dan distribusi spasial dan emisi juga seragam. Lampu yang biasa digunakan meliputi lampu deuterium (190-380 nm / daerah ultraviolet dekat), lampu tungsten (350-2000 nm), dan lampu xenon (200-1000 nm) (Skoog dkk, 2007).

2. Monokromator

Monokromator merupakan bagian untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Bagian-bagian pada monokromatis diantaranya filter optik yang berguna untuk menyerap warna komplementer, sehingga cahaya tampak yang diteruskan merupakan cahaya yang berwarna sesuai dengan filter optik yang digunakan. Prisma merupakan bagian kedua pada monokromator yang berfungsi untuk membiaskan cahaya yang melewatinya. Kisi difraksi merupakan kepingan kecil dari cermin gelas yang di dalamnya terdapat sejumlah garis berarak (Gandjar dan Rohman, 2012).

3. Kuvet

Kuvet adalah suatu wadah berisi sampel yang akan dianalisis. Adapaun macam-macam kuvet yang ditinjau dari sampel yang digunakan ada dua yakni kuvet leburan silika atau kuvet berbahan gelas. Kuvet leburan silika digunakan untuk sampel yang mempunyai panjang gelombang 190-1100 sedangkan kuvet yang berbahan gelas digunakan untuk sampel dengan panjang gelombang 380-1100 nm (Mulja dan Suharman, 1995).

4. Detektor

Bagian terakhir dari spektrofotometer yakni detektor. Detektor berfungsi untuk mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi sinyal elektronik. Adapun macam-macam detektor diantaranya detektor foto sel, detektor tabung foton hampa, detektor tabung penggandaan foton, dan detektor PDA (*Photo Diode-Array*) (Mulja dan Suharman, 1995).

2.4.2 Hukum Dasar Lambert Beer

Analisis suatu komponen atau multi komponen secara spektrofotometri menggunakan landasan hukum dasar yang dikemukakan oleh Lambert (1960) dan Beer (1852), seringkali disebut hukum lambert-beer. Hukum *Lambert-Beer* mengemukakan bahwa jumlah radiasi dari cahaya yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu eksponen dari konsentrasi zat dan tebal dalam larutan. Hukum *Lambert-Beer* dapat disederhanakan dengan rumus berikut (Skoog dkk, 2007).

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I_t}$$

$$A = \epsilon c \cdot b$$

Dimana :

T : Persen Transmitan

E : Absorpsivitas Molar (Lt. Mol⁻¹ cm⁻¹)

I₀ : Intensitas Radiasi yang Datang

c : Konsentrasi (mol. Lt⁻¹)

I_t : Intensitas Radiasi yang Diteruskan

b : Tebal Larutan (cm)

A : Absorban

Absorpsivitas molar (ϵ) dan absorpsivitas (a) adalah suatu konstanta dan nilainya spesifik untuk jenis zat dan panjang gelombang tertentu, sedangkan tebal media (sel) dalam prakteknya tetap. Absorbansi suatu spesies akan merupakan

fungsi linier dari konsentrasi, sehingga dengan mengukur absorbansi suatu spesies konsentrasinya dapat ditentukan dengan membandingkannya dengan konsentrasi larutan standar (Mulja dan Suharman, 1995).

2.5 Software LabVIEW

LabVIEW merupakan software pemrograman yang diproduksi oleh National Instruments. LabVIEW hampir sama juga dengan matlab, Visual basic, dan C++. Bahasa pemrograman dari LabVIEW menggunakan basis grafis atau blok diagram. Program dari LabVIEW biasa dikenal sebagai Vi atau Virtual instrumen, hal ini dikarenakan penampilannya dan operasinya dapat menirukan sebuah instrumen. Langkah pertama yang dilakukan user pada LabVIEW yakni membuat *user interface* (front panel) menggunakan kontrol dan indikator. Adapun yang dimaksud dengan kontrol adalah *knobs, push buttons, dials*, dan peralatan *input* lainnya, sedangkan yang dimaksud dengan indikator yakni *graphs*, LEDs, dan peralatan *display* lainnya. Langkah selanjutnya yakni *user* membuat atau menyusun blok diagram berisikan kode-kode VIs yang digunakan untuk mengontrol panel. Komponn utama pada software LabVIEW yakni *front panel, block Diagram* dari VI, *control*, dan *function Pallet* (Artanto, 2012).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Waktu Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2019 hingga bulan Mei 2022.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang akan digunakan dalam preparasi meliputi labu ukur, *ball* pipet, gelas ukur, neraca analitik, gelas kimia, pipet tetes, batang pengaduk, kuvet, timbangan analitik, botol vial, pemanas dan stirer, dan botol semprot.

Peralatan yang akan digunakan dalam perangkaian alat meliputi komputer (Software labview 2012), konektor, kamera, *Arduino Uno*, *three way solenoid valve*, pompa peristaltik, *tubing coil*, dan spektrofotometer Uv-Vis.

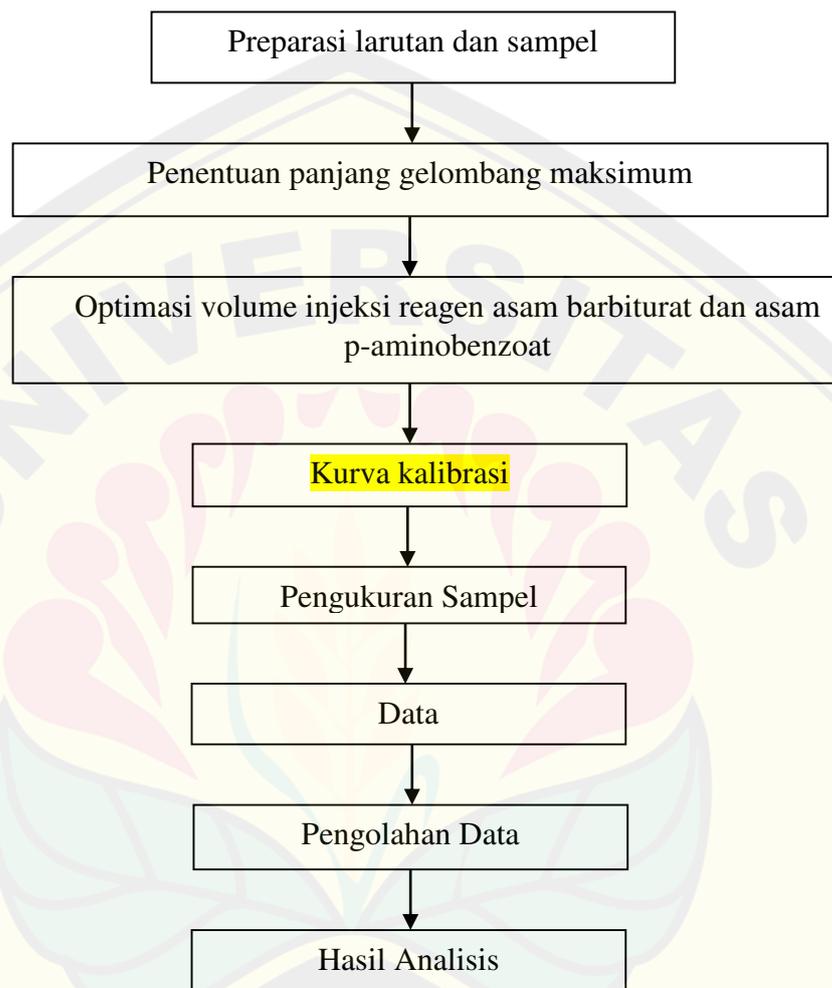
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu madu asli di desa Seputih Mayang Jember dan madu bermerk (A), asam barbiturat, asam p-aminobenzoat asam klorida, larutan Carrez I, larutan Carrez II, larutan standar HMF, dan aquades.

3.3 Diagram Alir

Alur penelitian mengikuti diagram alir yang ditunjukkan pada Gambar 3.1

Diagram alir dalam penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Diagram Analisis Madu Dengan Metode Sistem Alir *Multi-Commutation* Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Larutan

a. Pembuatan Larutan Asam klorida

Asam klorida digunakan sebagai larutan pembawa atau larutan *carier*. Asam klorida dibuat dengan konsentrasi 0.08 mol/L. Asam klorida 37% diambil sebanyak 6.7 mL dan di larutkan dengan akuades kemudian diencerkan dalam labu ukur 1000 mL sampai tanda batas.

b. Pembuatan Larutan Asam barbiturat

Asam Barbiturat diambil sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan akuades dan di aduk menggunakan stirer sampai larutan homogen. Larutan kemudian diencerkan pada labu ukur 1000 mL sampai tanda batas.

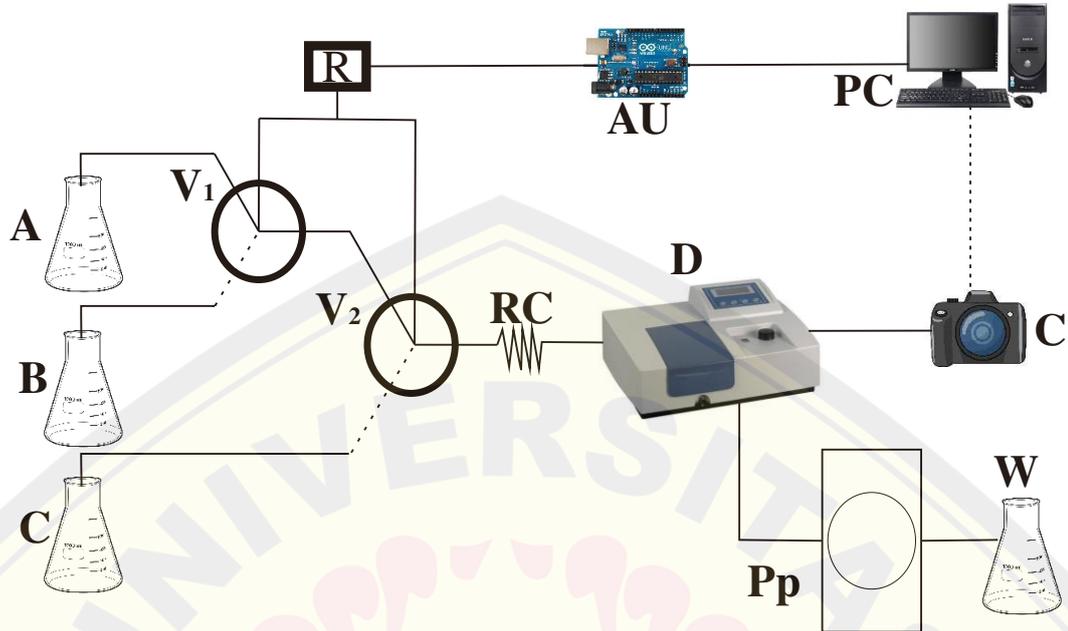
c. Pembuatan Larutan asam p-aminobenzoat

asam p-aminobenzoat diambil sebanyak 6 g kemudian dilarutkan dengan akuades kemudian dipanaskan pada suhu 30 °C dan diaduk menggunakan stirer sampai homogen. Larutan kemudian diencerkan pada labu 1000 mL sampai tanda batas.

d. Pembuatan Stok Larutan Standart HMF

Pembuatan larutan stok HMF yakni dengan mengambil padatan HMF sebanyak 1 g kemudian di larutkan dengan akuades serta diaduk menggunakan stirer sampai homogen. HMF yang sudah di larutkan kemudian di encerkan dalam labu ukur 1000 mL sampai tanda batas. Konsentrasi HMF dibuat dengan beberapa variasi yakni 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Adapaun cara membuat variasi konsentrasi yakni dengan mengambil 5 ml larutan stok HMF 1000 ppm kemudian diencerkan pada labu ukur 100 mL sampai tanda batas. Dilakukan cara yang sama yakni diambil 10 mL untuk konsentrasi 10 ppm, 15 mL untuk konsentrasi 15 ppm, 20 mL untuk konsentrasi 20 ppm, dan 25 mL untuk konsnetrasi 25 ppm.

3.4.2 Skema Alat



Gambar 3. 2 Desain Instrumen MCFIA (*Multi Commutatation Flow Injection Analysis*).

Keterangan :

- A : *Carrier*
- B : Reagen (Asam Barbiturat dan asam p-aminobenzoat)
- C : Larutan Standar/Sampel
- V₁ dan V₂ : *Three Way Selenoid Valve*
- RC : *Reaction Coil*
- D : Detektor Spektro UV-Vis
- Pp : Pompa Peristaltik;
- W : Waste
- C : Kamera
- PC : Komputer
- AU : Arduino Uno
- R : *Relly*.



Gambar 2. 13 Model Aliran *Multi Commutation Flow Injection Analysis* (MCFIA)

3.4.3 Prosedur MCFIA

Prosedur pada MCFIA yakni ketika ketiga *three way valve selenoid* dalam keadaan mati, maka *selenoid* akan menarik larutan *carrier* (HCl) menuju ke detektor dan akan menghasilkan suatu *baseline*. *Valve* kemudian diaktifkan secara

bergantian, dimana V_1 akan mengalir pertama dan diikuti oleh V_2 . Campuran larutan tersebut kemudian akan mengarah di dalam *mixing coil* (RC) untuk bereaksi. Waktu pergantian aliran sesuai pada Gambar 3.2. Pembacaan sinyal dimulai ketika pembentukan produk dari hasil reaksi sampel dengan reagen (asam p-aminobenzoat dan asam barbiturat), kemudian setelah semua *valve selenoid* dimatikan maka *carrier* akan mengalir secara terus-menerus untuk menggantikan semua larutan yang sudah dialirkan sebelumnya.

3.4.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum digunakan untuk memperoleh hasil absorbansi maksimum dari pengukuran kadar HMF menggunakan spektrometri UV-Vis. Penentuan panjang gelombang maksimum menggunakan larutan standart HMF 5 ppm yang sudah ditambahkan dengan reagen asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat dan kuvet blanko diisi dengan akuades. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 420-450 nm dengan interval 10 nm, pada setiap pergantian panjang gelombang serapan di nolkan menggunakan larutan blanko. Langkah selanjutnya, ketika sudah ditemukan panjang gelombang maksimum maka diukur absorbansi larutan kembali dengan interval 2 nm.

1.4.5 Penentuan Volume Maksimum Reagen (Asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat)

Reagen yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam barbiturat 1000 ppm dan asam p-aminobenzoat 6000 ppm yang dicampurkan dengan volume 1:1. Penentuan volume maksimum reagen dilakukan dengan mengalirkan sampel 427 μL pada katub selenoid pertama (V_1) dengan laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Reagen diinjeksikan pada katub selenoid kedua (V_2) sebanyak 600 μL . Reagen selanjutnya dibuat variasi volume 400 μL , 500 μL , 700 μL , dan 800 μL dan panjang gelombang yang digunakan menggunakan panjang gelombang maksimum hasil pengukuran sebelumnya.

1.4.6 Karakteristik Data

a. Kalibrasi

Kalibrasi dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi. Pembuatan kurva kalibrasi dibuat dengan melakukan pengukuran absorbansi larutan standar HMF 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm (Castoldi dkk, 2016). Variasi konsentrasi ini dibuat dari larutan stok 1000 ppm yakni mengambil larutan 5, 10, 15, 20, dan 25 mL yang dilarutkan dengan akuades 100 mL untuk konsentrasi berturut-turut 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan pada kondisi laju alir 25 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Panjang gelombang maksimum, volume reagen yang digunakan sesuai dengan *scanning* pada perlakuan sebelumnya. Kurva kalibrasi dibuat dengan membuat kurva antara absorbansi dan konsentrasi larutan standart. Kurva kalibrasi yang diperoleh akan mendapatkan persamaan regresi linier ($y = mx + C$) yang akan digunakan untuk penentuan kadar HMF pada sampel madu.

b. Linieritas

Linieritas digunakan untuk menunjukkan ukuran seberapa baik kurva yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x) (Gandjar dan Rahman 2012). Uji linieritas dari penelitian ini dilakukan untuk menganalisa kurva yang didapat dari pengukuran absorbansi dan variasi konsentrasi. Absorbansi yang diperoleh pada setiap konsentrasi dirata-rata kemudian dibuat persamaan garis menggunakan metode regresi linier ($y = mx + C$). Nilai *slope* atau kemiringan ditunjukkan oleh (m), intersep ditunjukkan oleh (c), dan parameter adanya hubungan linier ditunjukkan oleh (r) atau yang biasa disebut koefisien kolerasi. Menurut Hubber (2007) hubungan linier yang dapat diterima apabila koefisien kolerasi (r) membunyai nilai $> 0,9950$. Nilai r yang ideal apabila $r = 1$ atau $r = -1$ maka hubungan antara kedua peubah sangat erat, sedangkan apabila nilai r mendekati nol akan bermakna hubungan antara peubah tidak linier.

c. Sensitivitas

Nilai dari sensitivitas diperoleh dari analisa persamaan garis dari kurva kalibrasi antara variasi kadar HMF dengan respon detektor yang ditunjukkan oleh *slope* (m) atau kemiringan dari kurva kalibrasi yang didapatkan. Nilai sensitivitas yang benar apabila perubahan kadar HMF yang kecil dapat memberikan respon absorbansi, sehingga dapat diperoleh respon yang sangat sensitif.

d. Limit Deteksi

Limit deteksi diukur dengan cara menentukan absorbansi larutan blanko. Perlakuan yang dikerjakan sama seperti perlakuan pada sampel yakni akuades diinjeksikan pada laju alir 25 μ L/detik kemudian diinjeksikan reagen dengan volume yang sudah ditentukan pada perlakuan sebelumnya. Panjang gelombang yang digunakan yakni sesuai dengan hasil panjang gelombang maksimum dari pengukuran sebelumnya dan perlakuan diulangi sebanyak 6 kali pengulangan. Berdasarkan signal yang diukur dapat dicari standart deviasinya (S_D) yang dapat digunakan dalam penentuan Y_{LOD} . Rumus yang digunakan dalam penentuan limit deteksi adalah sebagai berikut:

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum (y-y')^2}{n-1}}$$

$$Y_{LOD} = Y_B + 3 S_D$$

Dimana :

S_D = Standart Deviasi

Y_{LOD} = Absorbansi Limit Deteksi

Y_B = Intersep Kurva Kalibrasi

y = Absorbansi Blanko

y' = Absorbansi Rata-rata Blanko

n = Jumlah Pengulangan (Miller dan Miller, 1991)

e. Repeatabilitas

Repeatabilitas ditentukan dengan mengukur deret variasi konsentrasi pada sampel yang dibuat. Perlakuan pengukuran dilakukan dengan analisis yang sama dan pada kondisi yang sama dengan melakukan tiga kali pengulangan dalam interval yang pendek.

1.4.7 Preparasi Sampel

Sampel madu diambil sebanyak 2,5 gram kemudian dilarutkan dengan akuades 25 mL sampai homogen. Larutan sampel kemudian ditambah dengan larutan Carrez I dan larutan Carrez II masing-masing sebanyak 0,5 mL, selanjutnya larutan ditambah dengan akuades sampai volumenya menjadi 50 mL.

1.4.8 Pengukuran Sampel

Sampel dialirkan dan diukur dengan laju alir 25 μL /detik menggunakan panjang gelombang maksimum, volume optimasi reagen sesuai dengan perlakuan sebelumnya. Sampel dialirkan menuju detektor yang berupa spektrofotometer UV-Vis untuk menghasilkan data yang akan ditampilkan oleh komputer.

1.4.9 % Recovery

Nilai dari % recovery dapat ditentukan dari rumus % perolehan kembali. Rumusnya adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{C_f - C_A}{C^*A} \times 100\%$$

Dimana C_f merupakan massa total campuran dari sampel yang ditambah dengan larutan standart. C_A merupakan massa sampel sebenarnya yang diperoleh dari pengukuran dan C^*_A merupakan massa larutan standart yang ditambahkan (Harmita, 2004).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

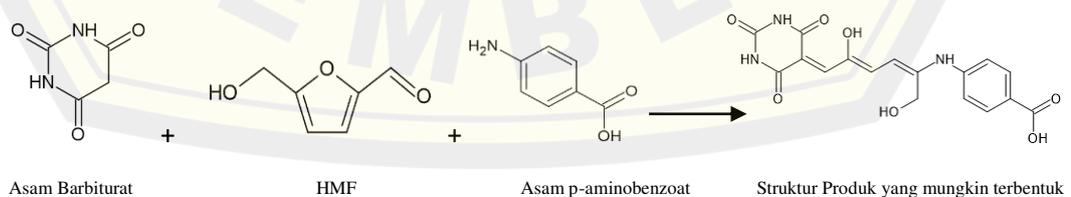
HMF yang terdapat pada madu merupakan suatu senyawa kimia yang terbentuk dari dehidrasi fruktosa ataupun glukosa (Keppy dkk, 2000). Kadar HMF dapat dijadikan untuk penentuan kualitas madu, dimana semakin kecil kandungan HMF dalam madu maka akan semakin bagus kualitas madu. Kandungan HMF dalam madu dapat memberikan informasi mengenai kualitas madu. Penurunan kualitas madu apabila dilihat dari kandungan HMF dapat terjadi karena adanya pemanasan, waktu penyimpanan yang terlalu lama, dan dapat juga karena adanya penambahan gula buatan dalam madu. Gambar 4.1 menunjukkan struktur dari *Hydroxy Methylfurfural* (HMF).



Gambar 4. 1 Struktur Senyawa *Hydroxy Methylfurfural*

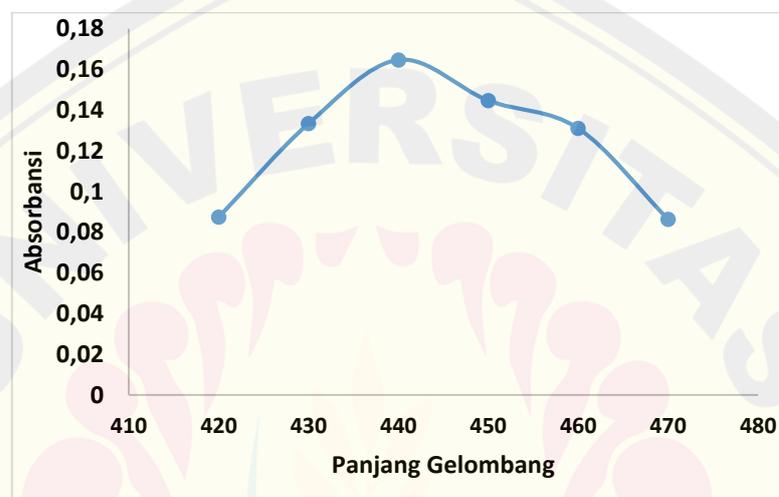
4.1 Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi panjang gelombang digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum dari suatu senyawa. Panjang gelombang maksimum mempunyai nilai absorbansi paling tinggi. Penentuan panjang gelombang maksimum menggunakan larutan standar HMF 15 ppm dengan reagen asam barbiturat 1000 ppm dan asam p-aminobenzoat 6000 ppm, campuran larutan akan membentuk senyawa kompleks yang berwarna kuning dengan struktur yang mungkin dapat terbentuk sesuai pada Gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Reaksi HMF dengan Reagen (Asam Barbiturat dan Asam P-Aminobenzoat)

Serapan cahaya kompleks yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 420 - 470 nm dengan interval 10 ppm dan kemudian interval diperkecil menjadi 2 ppm agar memperoleh absorbansi yang spesifik. Castoldi dkk (2016) menganalisis HMF pada madu menggunakan panjang gelombang maksimum sebesar 390 nm, Zurowska dkk (2009) juga melakukan analisis HMF pada madu menggunakan panjang gelombang maksimum 550 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.3



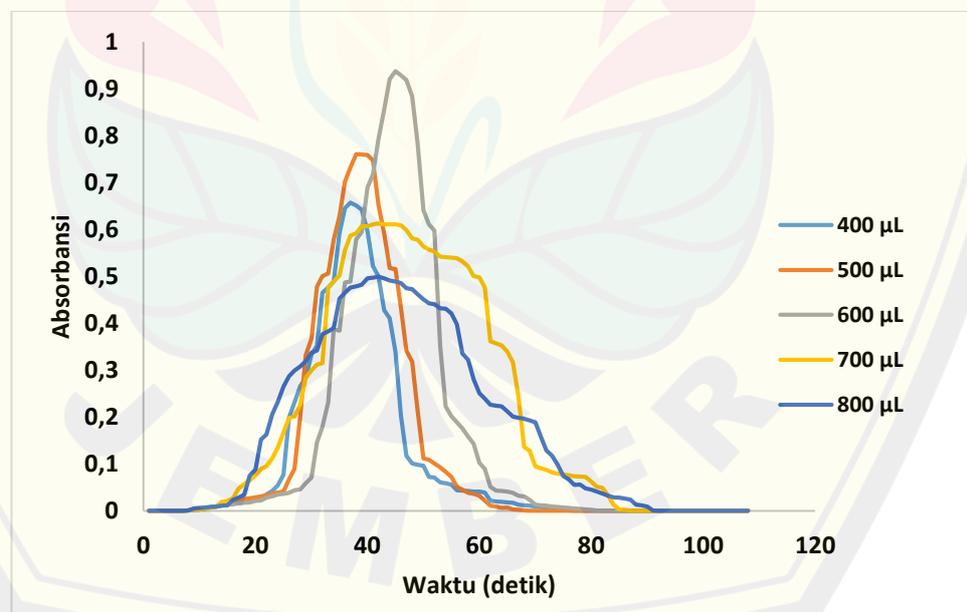
Gambar 4. 3 Panjang Gelombang Maksimum senyawa kompleks antara HMF 15 ppm dengan reagen (asam barbiturat 1000 ppm dan asam p-aminobenzoat 600 ppm) pada panjang gelombang 420-470 nm.

Panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengetahui daerah serapan yang dapat dibaca oleh spektrofotometer yakni dilihat dari nilai absorbansi. Gambar 4.3 menunjukkan bahwa serapan maksimum HMF adalah pada panjang gelombang 440 dengan nilai absorbansi 0,164 nm. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa kompleks yang terbentuk tersebut menyerap kuat pada panjang gelombang 440 nm. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan sudah sesuai dengan literatur. Menurut Day dan Underwood (2002) apabila warna komplementer kuning maka warna yang diserap adalah biru. Warna komplementer kuning akan berada pada kisaran panjang gelombang 435-450 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk mengukur larutan standar dan sampel madu dalam penelitian.

Penelitian ini dilakukan dengan menginjeksi larutan standar dan reagen secara berurutan. Injeksi larutan standar/sampel madu pada katub selenoid ke-1 dan reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) pada katub selenoid ke-2, kemudian akan bereaksi membentuk senyawa kompleks berwarna kuning. Senyawa kompleks yang terbentuk akan mengalami dispersi sampai ke detektor sehingga dapat terukur oleh detektor.

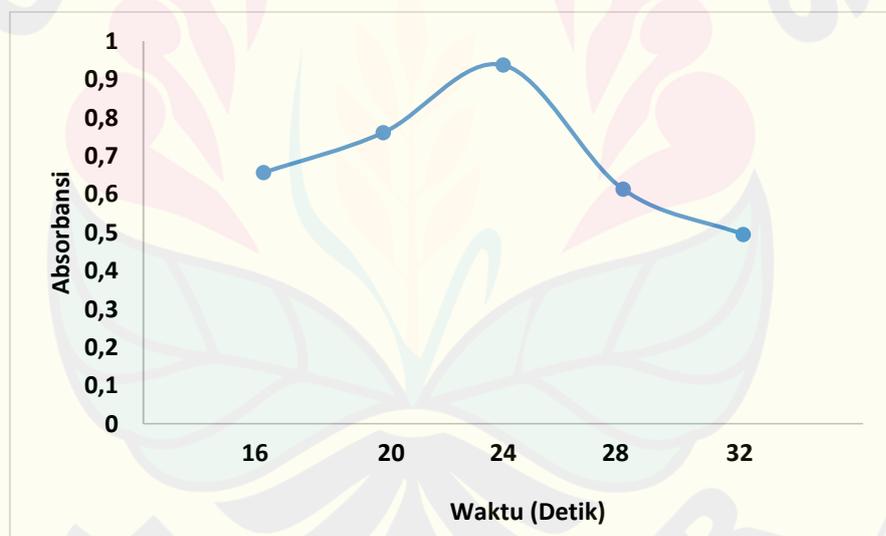
4.2 Optimasi Volume Injeksi Reagen (Asam Barbiturat dan asam p-aminobenzoat)

Variasi volume injeksi reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) dapat mempengaruhi nilai absorbansi dan puncak yang diperoleh. Optimasi volume injeksi reagen bertujuan untuk menentukan volume optimum dari reagen untuk bereaksi dengan larutan standar/sampel madu. Variasi volume yang digunakan dalam penelitian adalah 400, 500, 600, 700, 800 μL . Waktu injeksi larutan untuk mendapatkan volume yang diinginkan secara berurutan adalah 16, 20, 24, 28, dan 32 detik. Volume injeksi optimum reagen ditunjukkan dengan puncak atau absorbansi yang paling tinggi.



Gambar 4. 4 Kurva Pengaruh Volume Injeksi Reagen (Asam Barbiturat dan P-Aminobenzoat) Terhadap Nilai Absorbansi

Menurut Trojanowich (2008) volume injeksi mempengaruhi tinggi puncak dan lebar puncak. Semakin banyak volume yang diinjeksikan maka semakin tinggi pula puncak yang dihasilkan. Gambar 4.4 menunjukkan penurunan puncak dan pelebaran puncak pada saat volume injeksi bertambah. Hal disebabkan karena adanya proses dispersi antara reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) dan larutan standar HMF yang mengakibatkan berkurangnya kompleks yang terbentuk dan nilai absorbansi yang menurun. Penurunan nilai absorbansi pada dikarenakan larutan standar HMF habis bereaksi, dimana larutan HMF bertindak sebagai pembatas dan reagen (p-aminobenzoat dan asam barbiturat) yang masih tersisa. Hal juga menyebabkan puncak semakin melebar. Pelebaran puncak juga dapat dikarenakan waktu yang dibutuhkan dalam bereaksi dan waktu menuju detektor terlalu lama. Volume injeksi reagen yang semakin banyak akan menurunkan intensitas warna kompleks yang terbentuk sehingga kompleks yang terbentuk semakin sedikit.



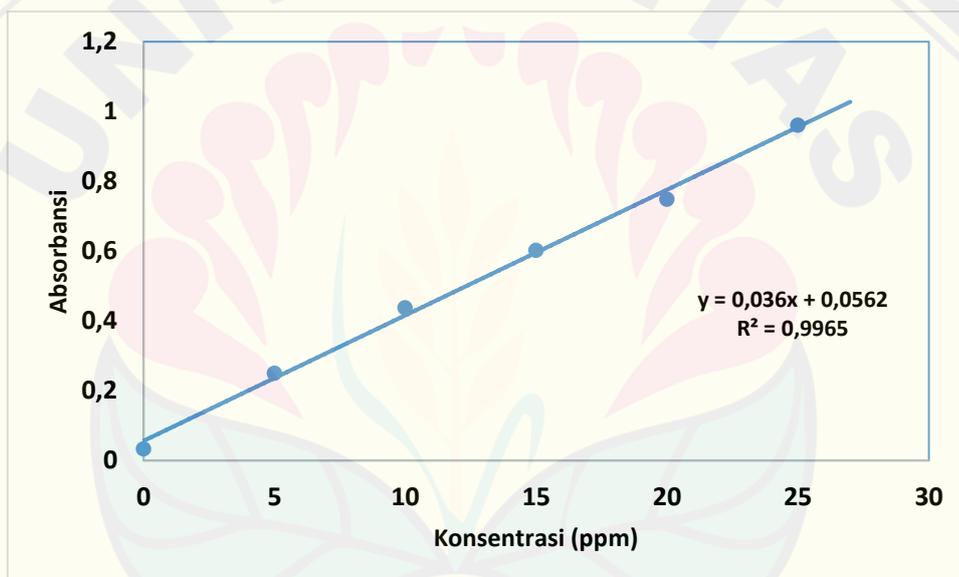
Gambar 4. 5 Hasil Optimasi Volume Reagen (Asam Barbiturat Dan Asam P-Aminobenzoat)

Berdasarkan Gambar 4.5 diketahui bahwa variasi volume injeksi reagen mempengaruhi puncak absorbansi yang dihasilkan. Volume injeksi optimum terjadi pada volume 600 μ L yakni ditandai dengan nilai absorbansi paling tinggi yaitu sebesar 0,938. Hal ini disebabkan volume yang diinjeksikan tersebut menghasilkan

pembentukan kompleks yang stabil sehingga puncak yang dihasilkan juga tidak terjadi pelebaran. Semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan maka warna kompleks juga akan meningkat, hal ini disebabkan senyawa kompleks yang terbentuk juga semakin banyak.

4.3 Kurva Kalibrasi

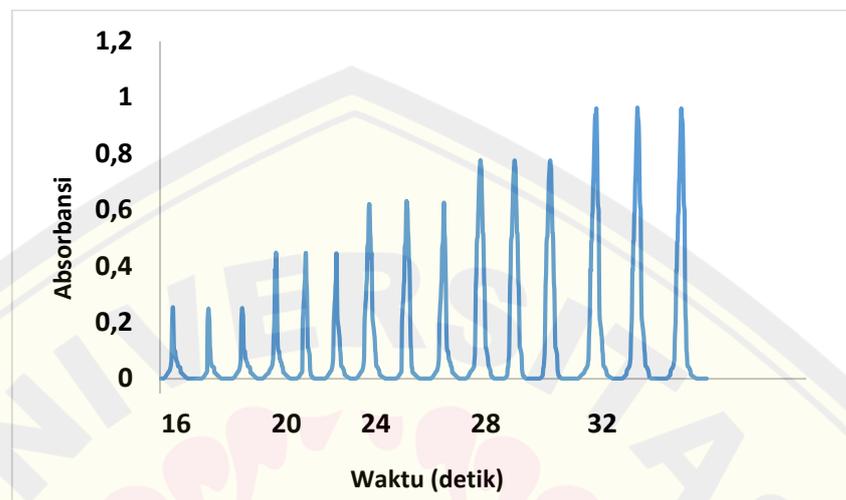
Kurva kalibrasi larutan standar HMF diukur dengan panjang gelombang maksimum 440 nm dan volume optimum reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) sebanyak 600 μ L. Pengukuran dilakukan menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection* (MCFIA). Kurva kalibrasi ditunjukkan pada Gambar 4.6



Gambar 4. 4 Profil Puncak Absorbansi Larutan Standar HMF Menggunakan Metode Sistem Alir *Multi-Commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis

Kurva kalibrasi yang diperoleh dalam penelitian ini digunakan untuk menemukan konsentrasi HMF dalam sampel. Berdasarkan profil kurva kalibrasi pada Gambar 4.6 diperoleh persamaan linier $y = 0,036x + 0,0562$ dengan nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9965. Hasil menunjukkan hubungan linier antara absorbansi terhadap konsentrasi, dimana konsentrasi standar HMF semakin besar maka nilai absorbansi yang diperoleh juga akan semakin besar. Hal ini sesuai dengan hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa nilai absorbansi berbanding lurus

terhadap konsentrasi larutan. Hasil yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 dapat dikatakan sudah baik, hal ini dikarenakan nilai koefisien korelasi (R^2) mendekati. Gambar 4.7 menunjukkan pengaruh absorbansi terhadap konsentrasi dengan 3 kali pengulangan.



Gambar 4. 5 Profil Puncak Absorbansi Larutan Standar HMF Menggunakan Metode Sistem Alir *Multi-Commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis

Variasi konsentrasi yang dilakukan dalam penelitian mendapatkan persamaan kurva kalibrasi $y = 0,036x + 0,0562$. Kurva kalibrasi tersebut dapat digunakan untuk mengetahui karakterisasi data :

a. Linieritas

Linieritas menunjukkan ukuran seberapa baik hasil kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon dari konsentrasi dengan nilai absorbansi. Uji linieritas ditentukan dengan menganalisa nilai koefisien korelasi R^2 yang didapat dari kurva kalibrasi. Menurut Riyanti (2014) nilai koefisien relasi yang dapat diterima yakni $0,0995 \leq r \leq 1$, artinya nilai r yang mendekati 1 menunjukkan kelinieran yang baik antara absorbansi dan konsentrasi sedangkan nilai r yang kurang dari 0,0995 menunjukkan kelinieran yang kurang baik dan tidak linier. Nilai koefisien relasi (R^2) yang diperoleh dalam penelitian dengan menggunakan metode MCFIA adalah sebesar 0,9964. Nilai koefisien korelasi yang di dapat dalam penelitian sudah dapat dikatakan baik karena nilai korelasi yang dihasilkan mendekati 1. Makna dari hasil nilai koefisien relasi yakni $\pm 99,65 \%$ perubahan

absorbansi dipengaruhi oleh HMF sedangkan $\pm 0,35 \%$ kemungkinan besar dipengaruhi oleh faktor lain yakni blanko.

b. Sensitivitas

Nilai sensitivitas ditunjukkan dengan perubahan konsentrasi yang kecil dari HMF yang masih memberikan respon absorbansi pada detektor. Nilai sensitivitas diperoleh dengan menganalisa persamaan garis yang ditunjukkan dengan kemiringan/*slope* (m) dari kurva kalibrasi. Nilai sensitivitas yang diperoleh dalam penelitian dengan menggunakan metode MCFIA sebesar 0,036 absorbansi/ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa setiap perubahan konsentrasi HMF 1 ppm perubahan sinyal absorbansi yang dihasilkan sebanyak 0,036. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa nilai sensitivitas dengan metode MCFIA cukup baik. Nilai *slope* (m) ini menyatakan bahwa respon dari alat sensitif terhadap adanya perubahan konsentrasi.

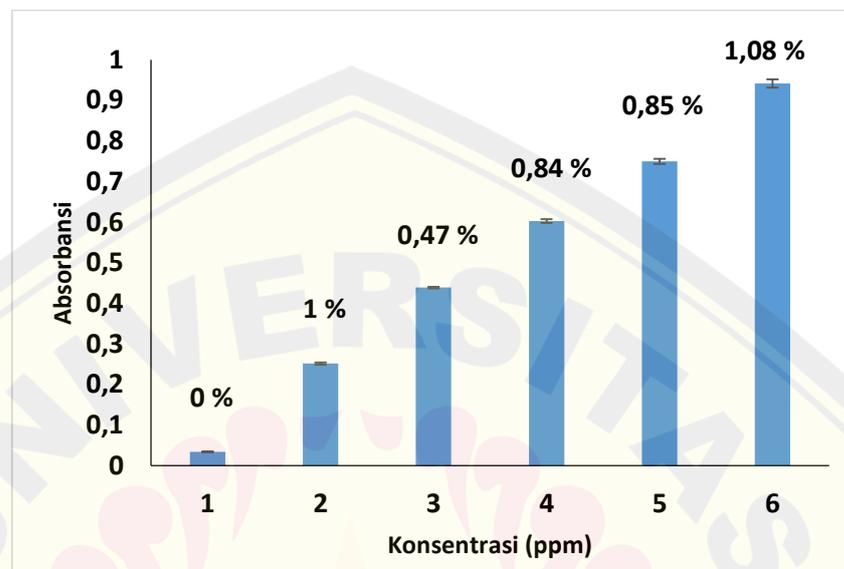
c. Limit Deteksi

Limit deteksi ditentukan dengan mengukur larutan blanko menggunakan panjang gelombang maksimum dan dilakukan sebanyak 10 kali pengulangan. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dicari standar deviasinya yang digunakan untuk menentukan Y_{LOD} . Selanjutnya dimasukkan ke persamaan kurva kalibrasi maka akan didapat nilai konsentrasi dan limit deteksi. Limit deteksi bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dari suatu analit yang dapat dideteksi dengan detektor. Semakin kecil konsentrasi yang dapat diukur maka semakin bagus pula kinerja dari metode MCFIA. Berdasarkan perhitungan, limit deteksi yang didapat pada pengukuran HMF dengan metode analisis sistem alir *Multi-Commutated Flow Injection Analysis* yakni sebesar 0,5 ppm. Maknanya, nilai konsentrasi terkecil yang dapat dianalisis yakni 0,5 ppm dan jika nilainya kurang maka detektor tidak dapat memberikan respon perubahan yang signifikan.

d. Keterulangan (*Repeatabilitas*)

Repeatabilitas atau nilai keterulangan menunjukkan tingkat keberhasilan pengukuran yang dilakukan. Keterulangan dilakukan dengan analisis mengulangi perlakuan pada kondisi yang sama dan interval yang pendek. Keterulangan biasanya disebut juga dengan koefisien relasi (Kv). Batas nilai koefisien relasi yang bagus yakni kurang dari 2%. Nilai Kv yang diperoleh juga dapat digunakan untuk

menentukan nilai ketelitian. Rumus yang digunakan dalam menentukan nilai K_v yakni $100\% - \%RSD$ (simpangan baku relatif) atau dapat disebut juga dengan K_v (Koefisien Variasi) (Harmita, 2004). Hasil nilai ketelitian yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 4.8



Gambar 4. 6 Nilai Kurva Koevisien pada Pengukuran HMF Masing-Masing Konsentrasi

Gambar 4.8 menunjukkan kurva koefisien variasi dari tiga kali pengulangan. Nilai K_v tertinggi yang diperoleh adalah 1% pada konsentrasi 5 ppm sedangkan nilai terendah adalah 0% pada konsentrasi 0 ppm. Nilai K_v dari tiga kali pengulangan kurang 2% menunjukkan alat yang digunakan cukup baik sesuai dengan literatur Harmita (2004). Nilai K_v tersebut juga mempunyai nilai ketelitian sebesar 96%.

4.3 Analisis Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah madu murni yang di ambil dari desa Seputih Mayang Jember dan madu merk A yang didapat dari toko terdekat. *Hydroxymethyl Furfural* (HMF) pada sampel madu dapat dinalisis menggunakan metode sistem alir *multi-commutation* dengan detektor spektrofotometri UV-Vis. Panjang gelombang yang digunakan sesuai dengan hasil dari *scanning* panjang gelombang maksimum yakni 440 nm. Volume injeksi reagen (asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat) menggunakan volume injeksi optimum

yakni 600 μL . Volume sampel yang diinjeksikan sebesar 427 μL . Sampel sebelum di analisis dilakukan preparasi sampel terlebih dahulu. Preparasi sampel yang dilakukan dalam penelitian yakni menambahkan reagen Carrez I dan Carrez II, fungsi dari kedua larutan tersebut yakni untuk menjernihkan sampel madu yang akan dianalisis (BSN, 2004). Hasil pengukuran ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Hasil pengukuran HMF dalam sampel madu

Sampel	Konsentrasi (ppm)			Rata-Rata
	1	2	3	
Madu murni	18,4	18,6	18,7	18,6
Madu merk A	23,8	21,5	23,8	23,1

*Madu murni diambil dari petani madu rumahan di Desa Seputih Kecamatan Mayang Jember, madu merk A di peroleh dari pasar tradisional.

Kadar HMF pada kedua sampel mempunyai hasil yang berbeda. Madu murni mempunyai kadar HMF lebih kecil dibandingkan dengan madu merk A. Kadar HMF menjadi salah satu indikator kerusakan madu karena adanya pemanasan yang berlebihan atau pemalsuan dengan gula (Achmadi, 1991). Semakin kecil kadar HMF pada madu maka semakin bagus pula kualitas suatu madu. Madu murni mempunyai kadar HMF lebih kecil dibandingkan dengan madu merk A, sehingga madu murni kualitas lebih tinggi dan lebih aman dikonsumsi dibandingkan dengan madu merk A.

Pendapat lain tentang kualitas madu apabila ditinjau dari kadar HMF yakni apabila madu mempunyai kandungan HMF kurang dari 50 mg/kg maka madu tersebut masih dikatakan baik. Nilai maksimum HMF yang terkandung dalam madu adalah 50 mg/kg (BSN, 2004). Kadar HMF pada Madu murni adalah sebesar 10,6 mg/kg dan madu merk A sebesar 13,05 mg/kg. Kadar HMF dalam madu yang digunakan dalam penelitian menurut BSN (2004) kualitasnya masih bagus karena kadar HMF yang terkandung kurang dari 50 mg/kg.

4.4 Uji Perolehan Kembali (*Recovery*)

Uji perolehan kembali merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk menunjukkan kadar analit sebenarnya dan ketepatan metode dalam pencampuran.

Kemungkinan adanya gangguan pada komponen akan selalu ada, maka uji perolehan kembali sangat dianjurkan. Uji perolehan kembali dihitung dalam bentuk *% recovery*. Menurut Harmita (2004) persen *recovery* yang dapat diterima yakni kisaran 80-120%. Hasil yang didapat dalam penelitian dapat ditunjukkan dalam Tabel 4.2.

Tabel 4. 2 Perolehan Nilai *% Recovery*

Jenis sampel	Volume sampel (5 mL)	Volume LSHMF (5 mL)	Konsentrasi sampel (ppm)	Konsentrasi campuran (ppm)	<i>% Recovery</i>
Madu murni	5	5	18,6	17,7	113
Madu merk A	5	5	23,1	19,2	104

*LSHMF : Larutan Standar *Hydroxymethyl Furfural*

Tabel 4.2 menunjukkan *% recovery* dari analisis HMF pada sampel madu murni dan sampel madu merk A. Hasil *recovery* dapat diterima karena batas *recovery* ada di rentang 80-120% (Harmita, 2004).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang didapat maka dapat ditarik beberapa kesimpulan yakni :

1. Volume injeksi berpengaruh pada nilai absorbansi. Volume optimum reagen asam barbiturat dan asam p-aminobenzoat mendapatkan nilai absorbansi tertinggi yakni 600 μ L.
2. Parameter data yang digunakan dalam penentuan HMF dalam sampel menggunakan metode *Multi Commutation Flow Injection Analysis* diperoleh linieritas persamaan $y = 0,036x + 0,0562$, koefisien korelasi $R^2 = 0,9965$, sensitivitas sebesar 0,036 Absorbansi/ppm, limit deteksi sebesar 0,2 ppm, repeatabilitas kurang dari 2%, dan uji perolehan kembali (*% recovery*) untuk sampel madu A 104% sedang sampel madu murni 113%.
3. Kadar HMF pada sampel madu rasa 23,1 ppm sedangkan pada madu murni sebesar 18,7 ppm. Kadar HMF pada sampel madu murni 10,6 mg/kg sedangkan madu merk A sebesar 13,5 mg/kg menurut BSN sampel madu yang digunakan masih baik kualitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, S. 1991. *Analisis Kimia Produk Lebah madu dan Pelatihan Staf Laboratorium Pusat Perlebahan Nasional Parung Panjang*. Bogor.: Fakultas dan Ilmu Pengetahuan Alam Bogor.
- Ajlouni. S., dan P. Sujirapinyokul. 2010. *Hydroxymethylfurfuraldehyde and Amylase Contents in Australian Honey*. *Food Chemistry*, 119(3), 1000–1005.
- Antary. P. S. S., K. Ratnayani, dan A. A. I. A. M. Laksmiwati. 2013. *Nilai Daya Hantar Listrik, Kadar Abu, Natrium, dan Kalium Pada Madu Bermerk di Pasaran Dibandingkan dengan Madu Alami (Lokal)*. *Jurnal Kimia*, 7(2), 172–180.
- Ardian, W. 2013. *Alat Pengekstrak Kunyit Otomatis Berbasis Arduino Uno*.
- Artanto, Dian. 2012. *Interaksi Arduino dan LabView*. Jakarta: PT Gramedia. Badan
- Badan Standarisasi Nasional (BSN). 2004. *SNI 8664:2018 Madu*. Jakarta : Badan Standarisasi Nasional
- B. Gustomo. 2015. *Pengenalan Arduino dan Pemrogramannya*. Bandung : Informatika Bandung.
- Bogdanov. S., K. Ruoff, L. P. Oddo. 2004. *Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys : a review To cite this version : HAL Id : hal-00891891 Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys : a review*.
- Bogdanov, S. (2009). *Harmonised Methods of the International Honey Commission*.
- Castoldi, K., M I. Milani, E L Rossini, L. Pezza, dan H R. Pezza. 2016. *Flow Injection Analysis of 5- (Hydroxymethyl) -2-furaldehyde in Honey by a Modified Winkler Method*. 32(April), 413–417.

- Cerda, V., Ferrer, L., Avivar, J., dan Cerda, A. 2014. *Flow Analysis A Practical Guide*. Poland: Elsevier.
- Christian, G. D. 1989. *Analytical Chemistry*. Canada: John Willey and son inc.
- Day, J. R. A. & Underwood, A.I. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Jakarta : Erlangga.
- Evahelda, E, F. Pratama, N. Malahayati, dan B. Santoso. (2017). *Sifat Fisik dan Kimia Madu dari Nektar Pohon Karet di Kabupaten Bangka Tengah , Indonesia Physical and Chemical Characteristics of Honey from Rubber Tree Nectar in Central Bangka Regency , Indonesia*. 37(4), 363–368.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2012. *Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, hal 59-93 dan 468-490.
- Harjo, S S T., L K Radiati, dan D. Rosyidi. 2015. *Perbandingan Madu Karet Dan Madu Rambutan Berdasarkan Kadar Air , Aktivitas Enzim Diastase Dan Hidroximetilfurfural (Hmf*. 10(1), 21–24.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. 1(3). Desember 2004. Departemen Farmasi MIPA UI. 117-135.
- Harvey, D. 2016. *Flow Injection Analysis*. <https://chem.libretexts.org>. [Diakses pada 10 Oktober 2019].
- Hikmah, F. N. 2019. *Analisis Kadar Amonium dan Nitrat dalam Sumber Air Sumur Menggunakan Multi-Commutated Flow Injection Analysis (MCFIA) dengan Deteksi Potensiometri Secara Simultan*. Skripsi. Jember: Program Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories 2nd Edition*. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Iglesia, F. De La., F, Lazaro. R, Puchades. dan A, Maquieira. 1997. *Automatic determination of by a flow injection method*.
- Kadir, Abdul. 2016. *Scratch for Arduino*. Yogyakarta: Andi Offset.

- Karlberg, B., dan G. E. Parcey. 1989. *Flow Injection Analysis A Pratical Guide*. Tokyo: Elsevier.
- Kennedy, J. H. 1990. *Analytical Chemistr. 2nd edition*. New York: Sounders College Publishing.
- Keppy, N. K., M. W. Allen, dan T. F. Scientific. 2000. *The Determination of HMF in Honey with an Evolution Array UV-Visible Spectrophotometer*. 2–3.
- Khopkar, S. M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Koesprimadisari, A. R., D. Arrisujaya, dan R. Syafdaningsih. 2016. *Uji Kandungan HMF (HMF) sebagai Parameter Kualitas Madu*. *J. Sains Natural*, 6(2), 44–51.
- Lavorante, A. F., M. A. Feres, dan B. F. Reis. 2007. *Spectroscopy Letters : An International Journal for Rapid Communication Multi - commutation in Flow Analysis : A Versatile Tool for the Development of the Automatic Analytical Procedure Focused on the Reduction of Reagent Consumption*. (September 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/00387010600867677>
- Mulja, M. dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press, hal. 19-48.
- Miller, J.C. dan J.N. Miller. 1991. *Statistik Untuk Kimia Analitik Edisi Kedua*. Alih Bahasa oleh Suroso. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Nanda, P. B, L. Eka. Radiati, dan D. Rosyidi. (2015). *Perbedaan Kadar Air, Glukosa dan Fruktosa pada Mutu Madu Karet dan Madu Sonokeling*.
- Pramauro, E., Pelizzetti, E., dan Weber, S. G. 1996. *Wilson and Wilson's Compreherensive analytical chemistry*. Amsterdam: Elsevier.
- Rocha, F. R. P., J. A. Nóbrega, dan O. F. Filho. 2001. *Flow analysis strategies to greener analytical chemistry . An overview Green Context*.
- Rocha, F. R. P., B F, Reis, E A G. Zagatto, Lima, J. L. F. C., Lapa, R. A. S., & Santos, J. L. M. 2002. Multicommutation in flow analysis: Concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, 468(1), 119–131. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00628-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00628-1)

- Salinas, F. A, Espinosa Mansilla, J. J. Berzas N. 1990. *Flow-injection Determination of HMF in Honey by the Winkler Method*. 250–251.
- Siregar. H. C. H. 2002. *Pengaruh Metode Penurunan Kadar Air, Suhu dan Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Madu Randu*.
- Skoog, D. A. dan J. J. Leary. 1992. *Principle of Instrumental Analysis*. New York: Sounders Collage Publishing.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., and Crouch, S.R., 2007. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Canada: Thomson Corporation, pp. 367-390.
- Sukarti, E. 1998. Teknik Analisis Suntik Alir Potensiometri dengan Elektrode Membran Ion Selektif. *Jurnal Ilmiah Widya Mandala*. (5): 002.
- Suranto, A. 2004. *Khasiat dan Manfaat Madu Herbal*. Depok: PT Agro Media Pustaka
- Trojanowicz, M. 2008. *Application of Moveable Suspensions of Solid Particles in Flow Analysis*.
- Trojanowicz, M. 2008. *Advances In Flow Injection Analysis*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.kGaA.
- Ulfa. S. M. 2018. *Penentuan Kadar Klorin bebas dalam Beras menggunakan Multi-Commutated Flow Injection Analysis (MCFIA) dengan Deteksi Spektrometri Visible*. Skripsi. Jember : Program Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Wunderlin, D. A., S F, Pesce, M V. Ame, dan P F. Faye. 1998. *Decomposition of Hydroxymethylfurfural in Solution and Protective Effect of Fructose*. 8561(97).
- Zurowska, M. D., Browicz A. *A Comparson of Spectrophotometric Winkler Method and HPLC Techniqui for Determination of 5-Hydroxymethylfurfural In Natural Honey* : Gdansk University of Technology.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Pembuatan Larutan

3.1.1 Pembuatan Larutan Baku HMF 1000 ppm

$$M_r \text{ HMF (C}_6\text{H}_6\text{O}_3\text{)} = 96,0847 \text{ g/mol}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{L} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

3.1.2 Pembuatan Larutan Standart HMF

a) 5 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 5 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} &= 1000 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

b) 10 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 10 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} &= 1000 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_1 &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

c) 15 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 15 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} &= 1000 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_1 &= 1,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

d) 20 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 20 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} &= 1000 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_1 &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

e) 25 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 25 \text{ ppm} \times 100 \text{ ml} &= 1000 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_1 &= 2,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

3.1.3 Pembuatan larutan Asam Klorida (HCl) 37%

$$\text{Mr} \quad : 1,19 \text{ g/mL}$$

$$\text{Berat Molekul} \quad : 36,5 \text{ g/mol}$$

$$N = (10 \times \% \times \text{Mr}) \text{ Valensi} \times \text{BM}$$

$$N = (10 \times 37\% \times 1,19 \text{ g/mL}) \times 1 \times 36,5 \text{ g/mol}$$

$$N = 12,06$$

Dibuat dengan konsentrasi 0,08 M

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$12,06 \times V_1 = 0,08 \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 6,7 \text{ mL}$$

3.1.4 Pembuatan Larutan Asam Barbiturat

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{L} = \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,1 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

3.1.5 Pembuatan Larutan asam p-aminobenzoat

$$6000 \text{ ppm} = \frac{6000 \text{ mg}}{L} = \frac{6 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{0,6 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Lampiran 4.1 Penentuan Panjang gelombang Maksimum

Tabel 4.1.1 Data penentuan panjang Gelombang Maksimum dengan Rentang 10 nm

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-rata
	P1	P2	P3	
420	0,089	0,084	0,089	0,087
430	0,132	0,136	0,132	0,133
440	0,168	0,164	0,162	0,164
450	0,142	0,146	0,146	0,144
460	0,131	0,131	0,131	0,131
470	0,086	0,088	0,085	0,086

Tabel 4.1.2 Data penentuan panjang Gelombang Maksimum dengan Rentang 2 nm

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-rata
	P1	P2	P3	
432	0,136	0,135	0,136	0,136
434	0,144	0,14	0,14	0,141
436	0,148	0,148	0,145	0,147
438	0,154	0,154	0,154	0,154
440	0,16	0,164	0,161	0,162
442	0,156	0,157	0,155	0,156
444	0,152	0,151	0,153	0,152
446	0,147	0,148	0,148	0,148
448	0,144	0,142	0,145	0,144
450	0,142	0,142	0,141	0,142



Gambar 4.3 Panjang Gelombang Maksimum senyawa kompleks antara HMF 15 ppm dengan reagen (asam barbiturat 1000 ppm dan asam p-aminobenzoat 600 ppm) pada panjang gelombang 420-470 nm



Gambar 4.3 Panjang Gelombang Maksimum senyawa kompleks antara HMF 15 ppm dengan reagen (asam barbiturat 1000 ppm dan asam p-aminobenzoat 600 ppm) pada panjang gelombang 420-470 nm.

Lampiran 4.2 Optimasi Volume Injeksi

Tabel 4.2.1 Hasil Optimasi Volume Injeksi Reagen (asam barbiturat dengan p-aminobenzoat)

Volume Reagen (asam barbiturat dengan p-aminobenzoat) (ppm)	Absorbansi			Rata-rata
	P1	P2	P3	
400	0,657	0,654	0,658	0,656
500	0,761	0,761	0,761	0,761
600	0,938	0,937	0,938	0,938
700	0,612	0,613	0,614	0,613
800	0,499	0,489	0,497	0,495

4.1 Perhitungan Waktu Injeksi

$$Q = 25 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}$$

$$Q = \frac{V}{t}$$

$$t = \frac{V}{Q}$$

1. Volume 400 μL

$$t = \frac{V}{Q} = \frac{400 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}}{25 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}} = 16 \text{ detik}$$

2. Volume 500 μL

$$t = \frac{V}{Q} = \frac{500 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}}{25 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}} = 20 \text{ detik}$$

3. Volume 600 μL

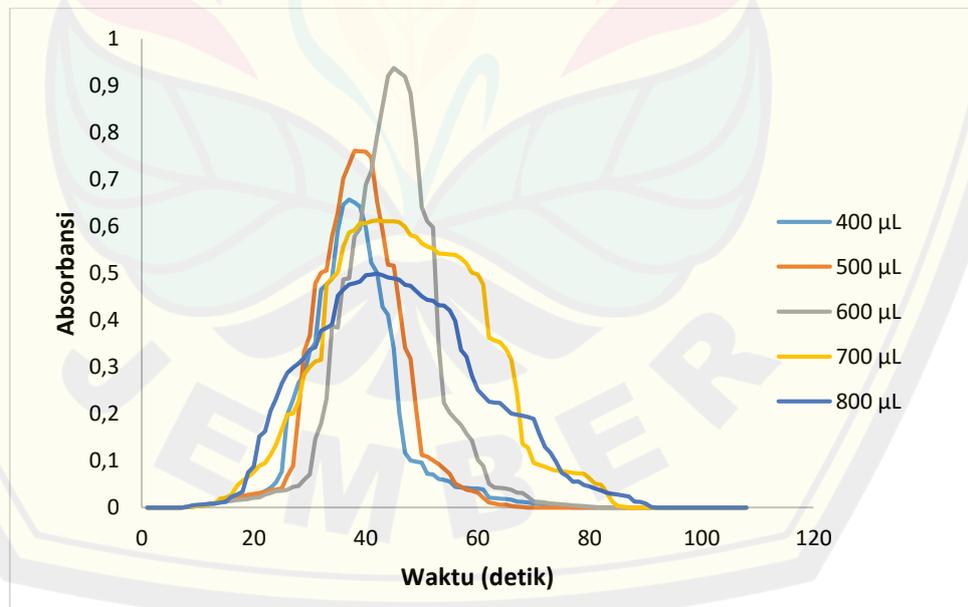
$$t = \frac{V}{Q} = \frac{600 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}}{25 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}} = 24 \text{ detik}$$

4. Volume 700 μL

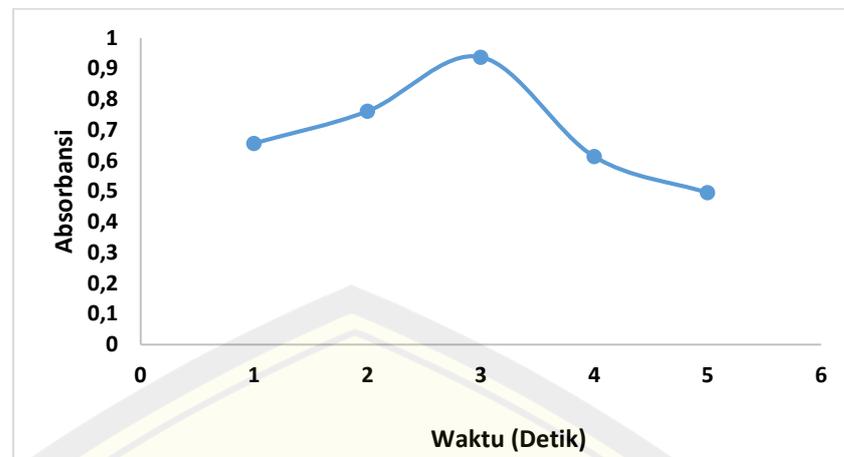
$$t = \frac{V}{Q} = \frac{700 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}}{25 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}} = 28 \text{ detik}$$

5. Volume 800 μL

$$t = \frac{V}{Q} = \frac{800 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}}{25 \frac{\mu\text{L}}{\text{detik}}} = 32 \text{ detik}$$



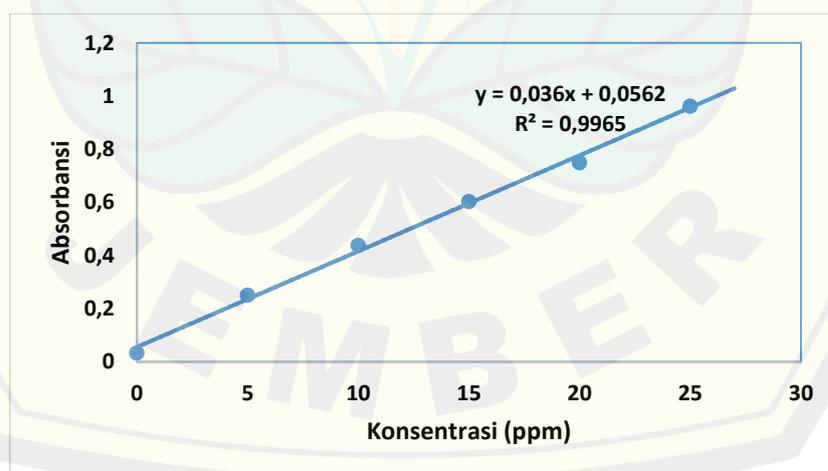
Gambar 4.4 Kurva pengaruh volume injeksi reagen (asam barbiturat dan p-Aminobenzoat) terhadap nilai absorbansi



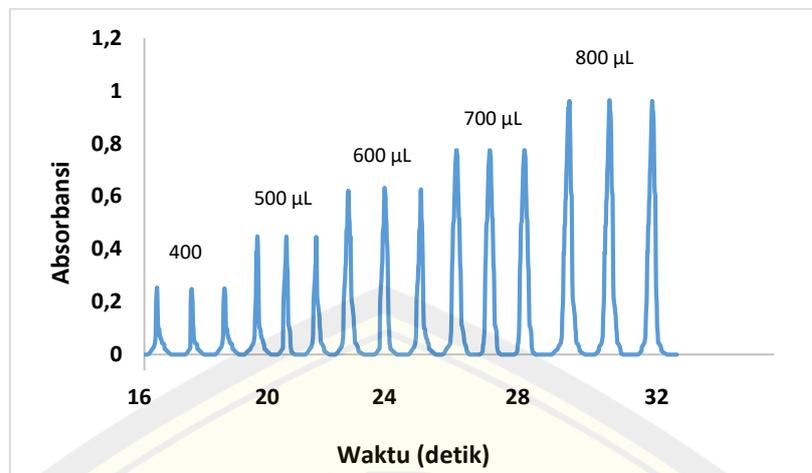
Gambar 4.5 Hasil Optimasi Volume Reagen (Asam Barbiturat Dan Asam P-Aminobenzoat)

Lampiran 4.3 Data Kurva Kalibrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata-rata
	P1	P2	P3	
0	0,034	0,034	0,034	0,034
5	0,254	0,249	0,251	0,251
10	0,438	0,437	0,441	0,438
15	0,598	0,602	0,608	0,603
20	0,757	0,746	0,746	0,749
25	0,951	0,944	0,931	0,962



Gambar 4.6 Profil Puncak Absorbansi Larutan Standar HMF Menggunakan Metode Sistem Alir Multi-Commutation dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis



Gambar 4.6 Profil Puncak Absorbansi Larutan Standar HMF Menggunakan Metode Sistem Alir *Multi-Commutation* dengan Deteksi Spektrofotometri UV-Vis

Lampiran 4.4 Perhitungan Limit Deteksi

Pengulangan	Absorbansi Blanko (Y)	Y-Y ₁	[Y-Y ₁] ²
1	0,031	-0,017	0,000289
2	0,048	0,017	0,000289
3	0,031	-0,016	0,000256
4	0,047	0,01	0,0001
5	0,037	0,011	0,000121
6	0,026	0,005	0,000025
7	0,021	-0,011	0,000121
8	0,032	-0,003	9E-06
9	0,035	-0,003	9E-06
10	0,038	0,0034	0,00001156
Rata-rata (Y _B)	0,0346		∑ = 0,000123

Pers. Kurva Kalibrasi $y = 0,036x + 0,0562$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum [Y - Y_1]^2}{n - 1}}$$

$$= 0,009$$

Pengukuran $Y_{LOD} = Y_B + 3 SD$

$$= 0,0346 + 3 (0,009)$$

$$= 0,0612$$

Konsentrasi limit deteksi

$$(X_{LOD}) = \frac{Y_{LOD} - c}{m}$$

$$= \frac{0,0612 - 0,0562}{0,036}$$

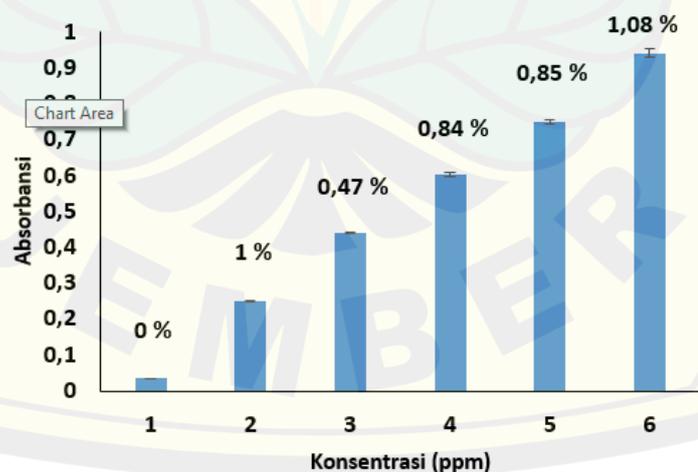
$$= 0,5 \text{ ppm}$$

Jadi, konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi untuk metode *Multi Commutated Flow Injection Analysis* (MCFIA) yaitu 0,5 ppm.

Lampiran 4. 1 Perhitungan Keterulangan (*Repeatability*)

$$Kv = \left[\frac{SD}{\bar{x}} \right] \cdot 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata - rata	SD	Kv (%)
	1	2	3			
0	0,034	0,034	0,034	0,034	0	0
5	0,254	0,249	0,251	0,251	0,0025	1
10	0,438	0,437	0,441	0,439	0,0021	0,47
15	0,598	0,602	0,608	0,603	0,0050	0,84
20	0,757	0,746	0,746	0,749	0,0064	0,85
25	0,951	0,944	0,931	0,942	0,0101	1,08



Gambar 4.8 Konsistensi Nilai Pengukuran HMF Pada Masing-Masing Konsentrasi

Lampiran 4. 2 Perhitungan Konsentrasi HMF dalam Sampel

Persamaan Kurva Kalibrasi $y = 0,036x + 0,0562$

4.6.1 Sampel Madu Merk A

$$\begin{aligned}
 1. \quad y &= 0,899 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,898 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,898 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,842 &= 0,036x \\
 x &= 23,8 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \quad y &= 0,819 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,819 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,898 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,762 &= 0,036x \\
 x &= 21,5 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \quad y &= 0,899 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,899 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,899 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,842 &= 0,036x \\
 x &= 23,8 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Konsentrasi sampel madu merk A (ppm)	FP	Konsentrasi semula	SD
23,8		238	1,3
21,5		215	
23,8	10x	238	
Rata-rata: 23,1		23	

4.6.2 Sampel Madu Murni

$$\begin{aligned}
 1. \quad y &= 0,707 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,707 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,707 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,650 &= 0,036x \\
 x &= 18,4 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \quad y &= 0,716 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,716 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,716 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,659 &= 0,036x \\
 x &= 18,6 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \quad y &= 0,717 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,717 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,717 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,660 &= 0,036x \\
 x &= 18,7 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Konsentrasi sampel madu murni (ppm)	FP	Konsentrasi semula	SD
18,4		184	0,15
18,6	10x	186	
18,7		187	
Rata-rata: 18,6		186	

Lampiran 4. 3 Uji Recovery

Perhitungan konsentrasi HMF dalam campuran sampel dan larutan standar 15 ppm.

Persamaan Kurva Kalibrasi $y = 0,036x + 0,0562$

4.7.1 Sampel madu Merk A + larutan standar 15 ppm

$$1. \quad y = 0,732$$

$$y = 0,036x + 0,0562$$

$$0,732 = 0,036x + 0,0562$$

$$0,732 - 0,0562 = 0,036x$$

$$0,676 = 0,036x$$

$$x = 19,1 \text{ ppm}$$

$$2. \quad y = 0,747$$

$$y = 0,036x + 0,0562$$

$$0,747 = 0,036x + 0,0562$$

$$0,747 - 0,0562 = 0,036x$$

$$0,691 = 0,036x$$

$$x = 19,5 \text{ ppm}$$

$$3. \quad y = 0,741$$

$$y = 0,036x + 0,0562$$

$$0,741 = 0,036x + 0,0562$$

$$0,741 - 0,0562 = 0,036x$$

$$0,683 = 0,036x$$

$$x = 19,3 \text{ ppm}$$

Konsentrasi sampel madu merk A + standar (ppm)	SD
19,1	0,21
19,5	
19,3	
Rata-rata: 19,3	

$$\text{Sampel rata-rata} : 23,05 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL} = 0,115 \text{ mg}$$

$$\text{Standar} : 15 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL} = 0,075 \text{ mg}$$

$$\text{Sampel+Standar rata-rata} : 19,3 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 10 \text{ mL} = 0,193 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[C]f - [C]a}{[C]a^*} \cdot 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Recovery} &= \frac{(0,193 \text{ mg} - 0,115 \text{ mg})}{0,075 \text{ mg}} \times 100\% \\ &= 104 \% \end{aligned}$$

4.7.2 Sampel madu murni + larutan standar 15 ppm

1. $y = 0,681$

$$y = 0,036x + 0,0562$$

$$0,681 = 0,036x + 0,0562$$

$$0,681 - 0,0562 = 0,036x$$

$$0,625 = 0,036x$$

$$x = 17,6 \text{ ppm}$$

2. $y = 0,685$

$$y = 0,036x + 0,0562$$

$$0,685 = 0,036x + 0,0562$$

$$0,685 - 0,0562 = 0,036x$$

$$0,629 = 0,036x$$

$$x = 17,8 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned}
 3. \quad y &= 0,687 \\
 y &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,687 &= 0,036x + 0,0562 \\
 0,67 - 0,0562 &= 0,036x \\
 0,630 &= 0,036x \\
 x &= 17,8 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

$$\text{Sampel rata-rata} : 18,5 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL} = 0,092 \text{ mg}$$

$$\text{Standar} : 15 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL} = 0,075 \text{ mg}$$

$$\text{Sampel+Standar rata-rata} : 17,7 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 10 \text{ mL} = 0,177 \text{ mg}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[C]_f - [C]_a}{[C]_a^*} \cdot 100\%$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Recovery} &= \frac{(0,177 \text{ mg} - 0,092 \text{ mg})}{0,075 \text{ mg}} \times 100\% \\
 &= 113 \%
 \end{aligned}$$

Jenis Madu		
	Madu Murni	Madu merk "Madu Rasa"
HMF	113%	104%

Lampiran 4. 4 Konversi satuan ppm ke satuan molaritas

Mr Hydroxymethylfurfural ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$) = 126,11 gram/msol

a. 1000 ppm

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{126,11 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 7,93 \text{ M}$$

b. 5 ppm

$$5 \text{ ppm} = \frac{5 \text{ mg}}{126,11 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{\text{L}} = 0,0000396 \text{ M}$$

c. 10 ppm

$$10 \text{ ppm} = \frac{10 \text{ mg}}{126,11 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{L} = 0,0000792 \text{ M}$$

d. 15 ppm

$$15 \text{ ppm} = \frac{15 \text{ mg}}{126,11 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{L} = 0,0001189 \text{ M}$$

e. 20 ppm

$$20 \text{ ppm} = \frac{20 \text{ mg}}{126,11 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{L} = 0,000158 \text{ M}$$

f. 25 ppm

$$25 \text{ ppm} = \frac{25 \text{ mg}}{126,11 \text{ g/mol}} \times \frac{1}{L} = 0,000198 \text{ M}$$

Lampiran 4.5 kadar HMF dalam mg/kg

$$\text{HMF mg/100 g} = \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}}$$

$$\text{Faktor} = \frac{126 \times 1000 \times 100}{16830 \times 10 \times 5} = 14,97$$

a. Madu Merk A

1. Absorbansi : 0,898

$$\begin{aligned} \text{HMF mg/100 g} &= \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}} \\ &= \frac{0,898 \times 14,97 \times 5}{5 \text{ (g)}} \\ &= 13,44 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

2. Absorbansi : 0,819

$$\begin{aligned} \text{HMF mg/100 g} &= \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}} \\ &= \frac{0,819 \times 14,97 \times 5}{5 \text{ (g)}} \\ &= 12,26 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

3. Absorbansi : 0,899

$$\begin{aligned} \text{HMF mg/100 g} &= \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}} \\ &= \frac{0,899 \times 14,97 \times 5}{5 \text{ (g)}} \\ &= 13,46 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

Kadar Madu Merk A (mg/100g)	Rata-rata
13,44	
12,26	
13,46	13,05

b. Madu merk A

1. Absorbansi : 0,707

$$\begin{aligned} \text{HMF mg/100 g} &= \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}} \\ &= \frac{0,707 \times 14,97 \times 5}{5 \text{ (g)}} \\ &= 10,58 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

2. Absorbansi : 0,716

$$\begin{aligned} \text{HMF mg/100 g} &= \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}} \\ &= \frac{0,716 \times 14,97 \times 5}{5 \text{ (g)}} \\ &= 10,72 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

3. Absorbansi : 0,717

$$\begin{aligned} \text{HMF mg/100 g} &= \frac{\text{Absorbansi} \times 14,97 \times 5}{\text{Bobot Contoh (g)}} \\ &= \frac{0,899 \times 14,97 \times 5}{5 \text{ (g)}} \\ &= 10,73 \text{ mg/100 g} \end{aligned}$$

Kadar Madu Murni (mg/100g)	Rata-rata
10,58	
10,72	
10,73	10,6

