

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Formalin

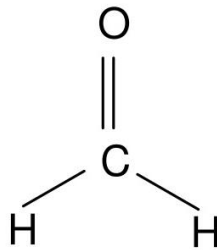
Menurut Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 11 Tahun 2019 bahan tambahan pangan yang disingkat BTP adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan. Berdasarkan Permenkes No 33 Tahun 2012 BTP dibedakan menjadi dua, yaitu BTP yang diizinkan dan BTP yang dilarang penggunaannya. BTP yang diizinkan dalam penggunaannya harus memperhatikan batas penambahan BTP sesuai dengan persyaratan yang telah ditentukan yang dikenal dengan ambang penggunaan, sehingga tidak akan menimbulkan masalah kesehatan. Sedangkan BTP yang dilarang dalam penggunaannya dosis sekecil apapun tidak diperbolehkan. Pemerintah telah melarang 19 bahan yang dilarang digunakan sebagai Bahan Tambahan pangan (BTP) (Wahyudi et al. 2017).

Tabel 2. 1 Bahan yang dilarang digunakan sebagai Bahan Tambahan Pangan

No	Nama Bahan
1	Asam borat dan senyawanya
2	Asam salisilat dan garamnya
3	Dietilpirokarbonat
4	Dulsin
5	Formalin
6	Kalium bromate
7	Kalium klorat
8	Kloramfenikol
9	Minyak nabati yang dibrominasi
10	Nitrofu rason
11	Dulkamara
12	Kokain
13	Nitrobenzen
14	Sinamil antranilat
15	Dihidrosafrol
16	Biji tonka
17	Minyak kalamus
18	Minyak tansi
19	Minyak sassafras

Sumber: (Wahyudi et al. 2017)

Salah satu bahan yang dilarang penggunaannya sebagai BTP adalah formalin. Formalin adalah senyawa organik dengan struktur CH_2O yang dihasilkan dari pembakaran tak sempurna sejumlah senyawa organik. Formalin memiliki titik didih 101°C , pH 2,8 – 4,0, densitas 1,067 (udara = 1), $\text{pK}_a = 13,27$ pada suhu 25°C , titik nyala 85°C dapat larut dalam alcohol, eter, aseton, dan benzene. Dengan kelarutan dalam air sebesar 4×10^5 mg/L pada suhu 20°C . Larutan formalin stabil pada suhu dan tekanan yang normal (Badan POM RI 2008).



Gambar 2. 1 Struktur Formalin

Formalin mengandung sekitar 37% formaldehid dalam air, termasuk larutan yang tidak berwarna, sedikit asam, korosif dan memiliki bau yang sangat menusuk. Formalin sering digunakan sebagai bahan desinfektan, bahan insektisida, bahan baku industri plastik dan digunakan juga pada berbagai macam industri seperti industri tekstil, farmasi, kosmetika serta digunakan untuk mengawetkan mayat (Sulfiani and Sukmawati 2020). Menurut BPOM Formalin digunakan untuk pembunuh kuman sehingga banyak dimanfaatkan sebagai pembersih lantai, kapal, gudang dan pakaian, pembasmi lalat dan serangga lainnya, bahan untuk pembuatan sutra buatan, zat pewarna, pembuatan gelas dan bahan peledak. Selain itu formalin juga digunakan dalam fotografi sebagai pengeras lapisan gelatin dan kertas, bahan pembuatan pupuk lepas lambat (*slow-release fertilizer*) dalam bentuk urea formaldehid, bahan untuk pembuatan parfum, bahan pengawet produk kosmetika dan pengeras kuku, pencegah korosi untuk sumur minyak, bahan untuk insulasi busa, bahan perekat untuk produk kayu lapis (*plywood*). Dan dalam konsentrasi yang sangat kecil ($< 1\%$) digunakan sebagai pengawet untuk berbagai produk konsumen seperti pembersih rumah tangga, cairan pencuci piring, pelembut, perawat sepatu, shampoo mobil, lilin dan pembersih karpet.

Meskipun dalam penggunaannya di bidang pangan sudah dilarang, pada kenyataannya masih banyak ditemukan kasus penggunaan formalin untuk pengawetan pada produk pangan seperti ikan asin, ikan segar, tahu, mie basah ayam potong bahkan bakso, hal tersebut sering kali dilakukan oleh produsen pangan yang tidak bertanggung jawab. Mengonsumsi formalin dalam dosis yang cukup tinggi dapat menyebabkan efek langsung pada kesehatan khususnya pada sistem pencernaan dan sistem syaraf pada saluran pernafasan dan pencernaan.

2.2 Ikan Asin

Ikan merupakan bahan pangan yang mudah rusak. Penyebabnya karena kadar air pada ikan yang sangat tinggi, teksturnya lunak dan kandungan gizi yang tinggi menjadi media yang baik untuk pertumbuhan jasad renik seperti bakteri. Pengawetan ikan tradisional di Indonesia meliputi pengasinan, pemindangan, pembuatan peda, terasi, petis, dan lain-lain. Menurut Peraturan Kepala Badan POM Nomor 21 tahun 2016 tentang kategori pangan, ikan asin adalah produk olahan yang berasal dari ikan segar dalam bentuk utuh atau disiangi, dengan atau tanpa mengalami perlakuan seperti perebusan, pemasakan dengan penambahan garam, gula atau rempah-rempah, yang selanjutnya dilakukan penggaraman dan pengeringan. Prinsip pengawetan dalam pembuatan ikan asin merupakan kombinasi penambahan garam dan pengeringan.



Gambar 2. 2 Ikan Asin

Sumber: (Efwe 2022)

Dalam jumlah yang cukup, garam dapat mencegah terjadinya autolisis, yaitu kerusakan ikan yang disebabkan oleh enzim-enzim yang terdapat pada ikan, dan mencegah terjadinya pembusukan oleh jasad renik. Selain karena garam, ikan asin menjadi awet karena perlakuan pengeringan. Pada dasarnya cara pembuatan ikan asin terdapat tiga cara, yaitu dengan penggaraman kering, penggaraman basah dan kombinasi keduanya. Penggaraman kering dilakukan dengan cara ikan dilumuri Kristal garam pada seluruh bagian ikan, sehingga air yang terdapat dalam daging ikan akan keluar dan membentuk larutan garam pekat, yang kemudian berfungsi sebagai larutan perendam ikan, digunakan untuk ikan dengan ukuran besar seperti jambal, tongkol, tenggiri, gabus dan cucut. Penggaraman basah yaitu merendam ikan dengan menggunakan larutan garam jenuh dengan kadar garam 20% - 40% dari berat ikan, biasanya digunakan untuk ikan yang berukuran kecil seperti teri.

Pembuatan ikan asin yang umum dilakukan oleh para nelayan adalah kombinasi penggaraman kering dan basah, kemudian dikeringkan dengan dijemur. Lama proses penggaraman berkisar antara 1-6 hari. Pada cuaca yang baik, pengeringan ikan-ikan kecil seperti teri cukup dilakukan selama 5 – 7 jam, sedangkan ikan berukuran sedang membutuhkan waktu 2 hari, dan ikan berukuran besar membutuhkan lebih lama kadang-kadang sampai 4 hari (Badan POM RI 2017). Persyaratan mutu dan keamanan pada ikan asin kering telah diatur dalam (SNI 8273:2016).

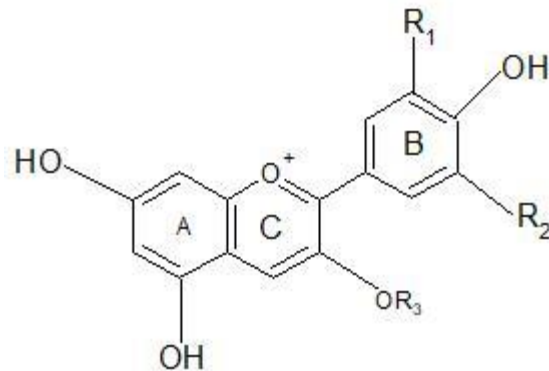
Tabel 2. 2 Persyaratan mutu dan keamanan pada ikan asin

Parameter	Satuan	Persyaratan			
a. Sensori		Min. 7,0*			
b. Kimia					
- Kadar air	%	Maks. 40,0			
- Kadar garam	%	12,0-20,0			
- Kadar abu larut dalam asam	%	Maks. 0,3			
c. Cemaran Mikroba		n	c	m	M
- ALT (3 kelas sampling)	Koloni/g	5	2	10 ³	10 ⁶
- <i>Escherichia coli</i> (3 kelas sampling)	APM/g	5	1	< 3	3,6
<p>CATATAN * untuk setiap parameter sensori</p> <p>n jumlah sampel uji</p> <p>c 2 kelas sampling: jumlah maksimum sampel yang diperbolehkan melebihi batas persyaratan maksimum yang tercantum pada m</p> <p>3 kelas sampling: jumlah maksimum sampel persyaratannya berada antara m dan M dan tidak boleh satupun sampel melebihi batas persyaratan maksimum yang tercantum pada M serta sampel yang lain harus kurang dari nilai m</p> <p>m (2 kelas sampling): batas persyaratan maksimum</p> <p>M (3 kelas sampling): batas persyaratan maksimum</p>					

2.3 Antosianin

Menurut Baublis (2006) dalam Santoso (2017) Anthocyanin berasal dari kata *anthocyan* bahasa dari bahasa Yunani (*anthos* = bunga dan *kyanos* = biru) yang berarti antosianin adalah pigmen *vacuolar* yang larut dalam air, dengan warna yang tampak merah, ungu, atau biru tergantung pada pH larutan senyawa tersebut. Antosianin dapat memiliki warna yang berbeda-beda, tergantung pada jumlah proton yang dilepas dan tetap melekat pada molekulnya. Antosianin merupakan

asam organik lemah, sesuai dengan teori asam-basa Lewis, asam adalah senyawa yang bertindak sebagai donor proton, dan bila telah melepaskan protonnya maka akan menjadi basa konjugasi. Antosianin adalah senyawa yang dapat menyerap dan memantulkan cahaya, karena antosianin juga merupakan bagian dari senyawa gula pada tanaman golongan glukosida. Berdasarkan wujud asam – basa konjugatnya tersebut maka antosianin akan menyerap dan memantulkan berbagai cahaya dengan panjang gelombang yang berbeda, sebagai akibatnya menyebabkan penampakan warna yang berbeda-beda pula (Santoso and Sri Mulyono 2017).



Gambar 2. 3 Struktur Antosianin

Antosianin merupakan komponen bioaktif kelompok flavonoid yang dapat memberikan warna merah, ungu, biru, pada bunga, daun, umbi, buah dan sayur yang bergantung pada pH lingkungan tempatnya berada. Antosianin larut dalam air dan aman untuk dikonsumsi, sehingga umumnya digunakan sebagai pewarna alami untuk produk makanan dan minuman. Antosianin memiliki fungsi yang baik untuk kesehatan seperti mencegah risiko kanker usus kolon dan kanker hati. Antosianin juga diketahui sebagai antidiabetes dan antioksidan. Sifat antosianin, termasuk perubahan warna, dan aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh pH dan struktur dari antosianin. Berbagai macam sayur, buah, bunga, dan umbi sudah ditemukan mengandung antosianin seperti kubis merah, kulit leci, beras hitam, paria, paprika, kulit bawang, kulit anggur, murbei, buah bit, rosella, buah duwet, bunga telang, dan ubi jalar ungu.

Menurut Andarwulan (2012) dalam Achyadi (2019) Faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas antosianin yaitu adanya modifikasi pada struktur spesifik antosianin (glikosilasi, asilasi dengan asam alifatik atau aromatik), pH, suhu, cahaya, keberadaan ion logam, oksigen, kadar gula, dan enzim. Antosianin merupakan senyawa yang bersifat termolabil (peka terhadap suhu tinggi). Selain itu keadaan yang semakin asam menyebabkan semakin banyak dinding sel vakuola yang pecah sehingga pigmen antosianin semakin banyak yang terekstrak. Sehingga diperlukan perlakuan yang benar untuk mengoptimalkan perolehan antosianin dari tanaman. Sifat pigmen antosianin umumnya bersifat asam dan lebih stabil dalam kondisi asam. Keadaan yang semakin asam apalagi mendekati pH 1 akan menyebabkan semakin banyaknya pigmen antosianin berada dalam bentuk kation flavilium atau oksonium yang berwarna (Achyadi 2019).

Pada umumnya, penambahan hidroksilasi menurunkan stabilitas, sedangkan penambahan metilasi meningkatkan stabilitas. Warna dalam makanan mengandung antosianin yang kaya akan pelargonidin, sianidin, atau aglikon delphinidin kurang stabil dari makanan yang kaya akan petunidin atau aglikon malvidin. Faktor pH ternyata tidak hanya mempengaruhi warna antosianin ternyata juga mempengaruhi stabilitasnya. Senyawa antosianin, jika dalam keadaan asam akan berwarna merah dan jika dalam keadaan basa akan berwarna biru, hijau sampai kuning.

2.4 Murbei



Gambar 2. 4 Buah Murbei

Sumber: (Ayu Lestari & Lukas Goentoro, 2021)

Murbei merupakan tanaman berkayu yang awalnya masuk ke dalam bangsa *Urticales*. Linnaeous (1753) membagi bangsa *Urticales*, suku *Moraceae*, marga

Morus menjadi 7 spesies yaitu *Morus alba*, *Morus indica*, *Morus nigra*, *Morus papyrifera*, *Morus rubra*, *Morus tartarica*, *Morus tinctoria*. Pada awalnya Tanaman murbei ini hanya dikenal masyarakat sebagai pakan ulat sutera. Namun, atas perkembangan teknologi dan penelitian menunjukkan bahwa tanaman murbei ternyata memiliki ragam manfaat baik sebagai bahan pangan, obat-obatan/kesehatan dan lingkungan. Buah murbei dapat dimakan sebagai buah meja, jus maupun minuman olahan lainnya (Pertanian, Balitbangtan, and Balijestro 2021).

Tumbuhan murbei ini dapat tumbuh sangat cepat ketika muda, tetapi menjadi lambat sesudahnya. Pada banyak spesies tanaman akan menjadi warna putih tetapi kemudian berubah menjadi kuning pucat dengan tepi merah muda dan kemudian menjadi merah setelah matang. Warnanya selanjutnya berubah menjadi ungu tua menjadi hitam saat matang sepenuhnya. Buah murbei memiliki kandungan senyawa fitokimia dan aktivitas biologi seperti kandungan senyawa flavonoid, alkaloid, phenol acid, dan antosianin. Selain itu buah murbei juga memiliki efek farmakologi seperti penggunaan untuk treatment diabetes mellitus, Fraksi larut etil asetat dari *M. alba* menunjukkan kemanjuran yang menjanjikan untuk pengelolaan gangguan stres yang diinduksi stres kronis (RS) dalam status stres oksidatif perilaku, biokimia dan otak, aktivitas antimikroba, *anti-dopaminergic effect*.

Selain itu beberapa senyawa obat telah diisolasi dari berbagai bagian *M. alba* termasuk pohon, buah, dan daun adalah *chlorogenic acid* (CA), rutin (RT), *quercetin-3-O-(6-O-malonyl)-b-D-glucoside*, *isoquercitrin*, *astragalin*, dan *kaempferol-3-O-(6-O-malonil)-b-D-glukosida*. Semua senyawa ini bersifat fenolik dan struktur senyawa fenolik ini diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, spektroskopi infra merah transformasi-fourier, resonansi magnetik nuklir, dan spektrometri massa. Diamati bahwa kadar polifenol ini bervariasi pada pohon murbei berdasarkan kisaran yang dibudidayakan (Hussain et al. 2017).

Buah murbei ini merupakan salah satu buah yang memiliki senyawa antosianin, hal tersebut dapat dilihat dari warna buah yang terlihat merah hingga kehitaman. Antosianin akan memberikan warna merah, biru hingga violet pada buah, sayur dan bunga. Berdasarkan penelitian (Winata and Yuniarta 2015) yang

mengekstraksi antosianin buah murbei menggunakan metode *ultrasonic bath* diperoleh rerata kadar antosianin tertinggi terdapat pada perlakuan waktu ekstraksi 30 menit dan rasio bahan: pelarut 1:7 (b/v) sebesar 3344.62 ppm. Sedangkan rerata kadar antosianin paling rendah terdapat pada perlakuan waktu ekstraksi 20 menit dengan rasio bahan: pelarut 1:5 (b/v) sebesar 2074.59 ppm.

Kandungan antosianin dalam murbei dengan metode ekstraksi maserasi yang didapatkan oleh (Handaratri and Limantara 2016) sebesar 4,45-95,85 mg/L. Ekstrak antosianin dengan maserasi selama 20 menit paling tinggi yaitu 95,85 mg/L, namun selanjutnya mengalami penurunan. Tingkat kecerahan ekstraksi antosianin buah murbei dengan metode maserasi berkisar antara nilai 1,51–3,42. Nilai terendah didapatkan dari 20 menit proses maserasi. Menurut (Winata and Yuniarta 2015) tingkat kecerahan menunjukkan semakin banyak antosianin yang terekstrak akan menyebabkan warna ekstrak semakin gelap sehingga menurunkan tingkat kecerahannya.

2.5 Analisis Kualitatif Formalin

Untuk mengetahui kandungan formalin dalam bahan pangan, bisa dengan menggunakan analisis kuantitatif dan kualitatif. Analisis kuantitatif untuk mengetahui kadar formalin yang terkandung dalam bahan pangan tersebut. Sedangkan analisis kualitatif digunakan untuk mengetahui ada dan tidaknya kandungan formalin dalam bahan pangan. Mengingat formalin termasuk bahan tambahan pangan yang dilarang penggunaannya maka analisis bisa hanya dengan menggunakan analisis kualitatif.

Analisis kualitatif kandungan formalin pada bahan pangan telah banyak dilakukan. Analisis ini menggunakan pereaksi kimia yang kemudian diamati perubahan warna yang terjadi apabila suatu produk pangan mengandung formalin. Beberapa pereaksi yang seringkali digunakan untuk analisis kualitatif formalin adalah $KMNO_4$, Schiff, Asam kromatofat, nash, dan lain-lain. Berdasarkan SNI 1-2894-1992 uji formalin pada bahan pangan dengan menggunakan asam kromatofat. Pada pereaksi asam kromatofat produk pangan yang mengandung formalin akan ditunjukkan dengan berubahnya warna dari bening menjadi ungu dan negatif akan

berwarna coklat, pereaksi asam kromatofat merupakan pereaksi yang spesifik untuk formalin. Semakin ungu berarti kadar formalin semakin tinggi

Pada pereaksi Schiff apabila produk pangan mengandung formalin maka warna yang dihasilkan adalah merah keunguan. Sedangkan pada pereaksi KMNO_4 (kalium permanganat) larutan yang mengandung formalin akan berubah dari berwarna merah muda menjadi bening atau tidak berwarna setelah ditetesi pereaksi KMNO_4 .

2.6 Paper Tes Kit

Tes kit merupakan suatu alat yang dirancang dengan tujuan untuk menguji secara cepat kandungan berbahaya dalam suatu sampel, baik sampel makanan ataupun minuman. Penggunaan tes kit sebagai salah satu metode uji secara kualitatif telah banyak digunakan. Salah satunya adalah pengujian untuk keamanan pangan, digunakan untuk deteksi bahan berbahaya yang terkandung didalamnya. Tes kit dalam keamanan pangan biasanya digunakan untuk mendeteksi boraks, formalin, dan pestisida.

Penggunaan tes kit memiliki kelebihan yaitu praktis, pengujian tidak terlalu lama, tidak memerlukan keahlian khusus dan instrument khusus untuk melakukan uji. Tes kit sendiri sudah dijual bebas dipasaran, namun harganya relatif mahal. Selain itu tes kit yang sudah diperdagangkan kebanyakan menggunakan reagen kimia. Oleh karena itu untuk pemakaian tes kit dengan reagen kimia akan semakin mahal apabila digunakan untuk uji tes rutin.

Salah satu jenis tes kit yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif adalah *paper* tes kit. *Paper* tes kit digunakan dengan mangabsorbiskan suatu reagen ke media yang berupa kertas saring. Kertas saring dipilih karena kemampuan kertas saring yang mampu mengabsorbsi dengan baik, selain itu mudah diperoleh dan harganya yang terjangkau.

Salah satu alternatif untuk mengatasi mahalnya reagen kimia yang digunakan pada tes kit adalah dengan menggunakan reagen dari bahan alam. Telah banyak dianalisis pembuatan tes kit dengan bahan alami karena memiliki kelebihan yaitu lebih aman digunakan atau apabila terkena tubuh dibanding dengan tes kit

berbahan dasar bahan kimia, ramah lingkungan, sumber daya yang digunakan tersedia dalam jumlah besar dan mudah ditemukan, dapat meningkatkan nilai pemanfaatan sumber daya alam khususnya limbah, dan mampu meningkatkan nilai jual dari bahan tersebut serta limbah yang dihasilkan lebih aman dari pada limbah berbahan kimia yang sering digunakan pada uji lainnya.

2.7 Validasi Metode

Menurut ISO 17025 Validasi adalah konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus dipenuhi. Laboratorium harus memvalidasi metode non-standar, metode tidak baku, metode yang desain/dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan, dan penegasan serta modifikasi dari metode baku untuk mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan. Validasi harus seluas yang diperlukan untuk memenuhi kebutuhan penerapan yang ditetapkan atau bidang penerapan. Laboratorium harus merekam hasil yang diperoleh, prosedur yang digunakan untuk validasi, dan pernyataan bahwa metode tersebut tepat untuk penggunaan yang dimaksud.

Berdasarkan USP (*United States Pharmacopeial*) validasi metode analitik adalah proses yang menetapkan, melalui studi laboratorium, bahwa karakteristik kinerja metode tersebut memenuhi persyaratan untuk aplikasi analitik yang dimaksud. Karakteristik kinerja analitik yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode tertera pada tabel 2.3. Teknik yang digunakan untuk menentukan unjuk kerja suatu metode hendaknya mencakup salah satu atau kombinasi dari hal-hal berikut: Kalibrasi menggunakan standar atau bahan acuan, perbandingan hasil yang diperoleh dengan metode lain, uji banding antar laboratorium, asesmen yang sistematis pada faktor-faktor yang mempengaruhi hasil, asesmen pada ketidakpastian hasil berdasarkan pemahaman ilmiah dari prinsip teoritis metode dan pengalaman praktis, kekokohan metode pengujian melalui variasi parameter yang dikontrol, seperti suhu inkubator, volume dibagikan.

Tabel 2. 3 Karakteristik Kinerja Analitik dalam Validasi Metode

Ketepatan (<i>Accuracy</i>)
Presisi (<i>Precision</i>)
Kekhususan (<i>Specificity</i>)
Batas deteksi (<i>Detection limit</i>)
Batas kuantitasi (<i>Quantitation limit</i>)
Linearitas (<i>Linearity</i>)
Jarak (<i>Range</i>)
Kekasaran (<i>Ruggedness</i>)

Sumber: (United States Pharmacopeial Convention. 2017)

Validasi metode untuk pengujian kuantitatif dan kualitatif berbeda. Pada pengujian kuantitatif parameter metode validasi yang harus di penuhi seperti ketepatan, presisi, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linearitas, jarak dan kekasaran. Sedangkan pengujian kualitatif menurut USP parameter validasi metode yang dipenuhi adalah spesifisitas. Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lainyang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi (Riyanto 2014). Pengujian validasi pada penelitian ini dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran dalam hal ini larutan formalin dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan larutan formalin, pengujian dengan menggunakan ekstrak buah murbei dan asam kromatofat.