

PENETAPAN KADAR NITRIT (NO_2^-) DALAM BAYAM MERAH DAN BAYAM HIJAU DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI VISIBEL

Emma Emawati, Anne Yuliantini, Yusiana

Fakultas Farmasi, Universitas Bahkti Kencana, Bandung
Email : emma.emawati@ubk.ac.id

ABSTRACT

Green and red spinach is a vegetable that has a lot of nutritional content and is needed by the body. Besides containing many nutrients that are beneficial to the body, spinach vegetables also contain compounds that are toxic, can harm the body such as nitrite (NO_2^-) and cause methemoglobinemia. The purpose of this study was to analyze the levels of nitrites in green and red spinach with a visible spectrophotometric method and to determine whether the nitrites contained were still within safe limits of consumption in accordance with the ADI (Acceptable Daily Intake) value. Before the content analysis, a validation method was conducted with parameters including linearity with $r = 0.9994$, $BD = 0.0499 \mu\text{g} / \text{mL}$, $BK = 0.1664 \mu\text{g} / \text{mL}$, % recovery of day 1 = 1.5597 to 2 = 1.7547, the 3rd = 1.0126 and accuracy at a concentration of $0.3 \mu\text{g} / \text{mL} = 88.800\%$, $0.5 \mu\text{g} / \text{mL} = 95.332\%$ and $0.7 \mu\text{g} / \text{mL} = 107.410\%$. Nitrite levels in fresh green spinach obtained an average of $23.4084 \text{ mg} / \text{kg}$, and $12.7272 \text{ mg} / \text{kg}$ in red spinach. Furthermore, the green spinach after boiling yields an average of $16.8392 \text{ mg} / \text{kg}$ and red spinach was $5.3359 \text{ mg} / \text{kg}$. Nitrite levels from all green and red spinach samples are still within safe limits for consumption in accordance with the ADI (Acceptable Daily Intake) value of $0.07 \text{ mg} / \text{kg}$ of a predetermined human body weight.

Key words: Nitrite, green and red spinach, visible spectrophotometry.

PENDAHULUAN

Sayuran merupakan sumber nutrisi, serat dan vitamin yang sangat dibutuhkan tubuh. Selain memiliki banyak manfaat, sayuran juga mengandung zat anti gizi yang berbahaya bagi tubuh. Salah satu sayuran yang banyak dikonsumsi adalah bayam. Yang banyak mengandung vitamin dan juga mudah diperoleh. Bayam selain banyak manfaatnya untuk kesehatan tapi bayam juga mengandung senyawa nitrit (NO_2^-) yang berbahaya untuk kesehatan.⁵

Nitrit (NO_2^-) adalah senyawa alami yang ada dalam tanaman, sumber dari kandungan nitrit dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya penggunaan pupuk, intensitas cahaya, waktu panen, lokasi dan jenis tanah, dan kondisi pertumbuhan tanaman.⁸ Salah satu efek berbahaya yang

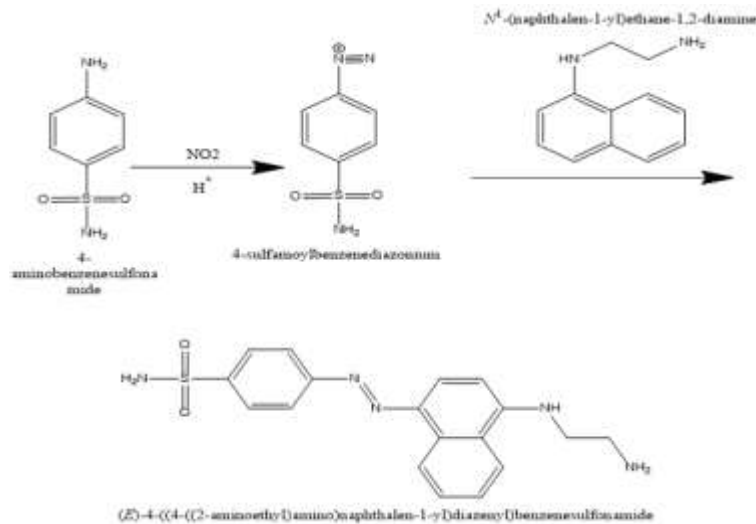
ditimbulkan nitrit bagi tubuh adalah methemoglobinemia, dimana senyawa nitrit mengoksidasi besi (Fe^{2+}) menjadi ion ferri (Fe^{3+}) didalam hemoglobin dan mengubah hemoglobin menjadi methaemoglobin yang tidak mampu mengikat molekul oksigen, sehingga akan terjadi penurunan kadar oksigen, methemoglobin lebih rentan terjadi pada bayi disebut dengan *blue baby syndrome*.⁶

Analisis kadar nitrit (NO_2^-) dapat ditentukan dengan beberapa metode yaitu spektrofotometri sinar tampak, HPLC, dan nitrimetri. Salah satu metode spektrofotometri visible dengan menggunakan pereaksi Griess. Dengan prinsip berdasarkan reaksi diazotasi asam sulfanilat oleh asam nitrit, yang diikuti dengan reaksi kopling dengan α -naftilamina membentuk suatu zat pewarna azo

Penetapan kadar nitrit (NO_2^-) dalam bayam merah dan bayam hijau dengan metode spektrofotometri visibel

yang merah, kemudian dianalisis dengan spektrofotometri visible pada rentang panjang gelombang 400-800 Nm.^{2,9} PERKABPOM RI Nomor 36 tahun (2013)⁷,

menetapkan jumlah asupan harian atau ADI (*Acceptable Daily Intake*) kandungan nitrit (NO_2^-) yang diperbolehkan adalah 0– 0,07 mg/kg berat badan manusia.



Gambar 1. Mekanisme Reaksi Griess¹

METODE PENELITIAN

Tahap awal penelitian ini adalah pengumpulan sampel yang diperoleh dari salah satu pasar tradisional yang berlokasi di Bandung Timur. Pereaksi pereaksi yang digunakan antara lain Asam Klorida 2 N, Pereaksi Griess yang terdiri dari dua larutan yaitu asam sulfanilat dan dan naftil-etilendiamin (NED.). Sebelum dilakukan analisis sampel terlebih dahulu dilakukan scan panjang gelombang maksimum. Kemudian dilakukan pembuatan kurva baku Nitrit dengan seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6 ($\mu\text{g/mL}$). Setelah itu dilakukan validasi metode dengan parametric linieritas, BD, BK, Presisi dan Akurasi.

Preparasi Sampel

Analisis sampel dilakukan dengan cara ditimbang 2 g sampel bayam, dan dididihkan dengan aquades 10 mL di *waterbath* pada suhu 100°C selama 30 menit, kemudian disaring menggunakan kertas saring.²

Penetapan Kadar Nitrit

Dipipet 1 mL sampel dan 0,5 mL asam sulfanilat dan HCl 1mL dimasukkan kedalam tabung reaksi. Dibiarkan bereaksi selama 10 menit ditambahkan dengan 0,5 mL larutan naftil-etilen diamnin dihidrklorida aduk dan biarkan bereaksi selama 30 menit. Larutan dimasukkan dalam kuvet kemudian dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

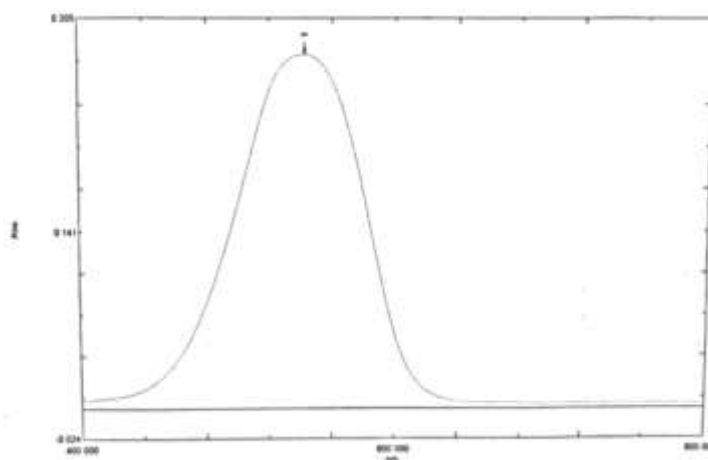
Proses preparasi sampel dilakukan untuk mempermudah analisis, dalam preparasi sampel bayam hijau dan bayam merah ada dua perlakuan yaitu sampel dalam keadaan segar atau tanpa perebusan dan sampel dengan dilakukan perebusan. Dalam proses preparasi sampel dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut aquadest. Karena ditrit dalam bentuk ion sehingga dapat larut dalam aquadest.

Metode yang digunakan untuk analisis kadar nitrit adalah spektrofotometri visibel,

Penetapan kadar nitrit (NO_2^-) dalam bayam merah dan bayam hijau dengan metode spektrofotometri visibel

sampel yang sebelumnya sudah dipreparasi, direaksikan dengan pereaksi Griess (reagensia asam sulfanilat dan α -naftilamina diamin dihidroklorida). Prinsip reaksi Griess adalah pembentukan garam diazotasi asam sulfanilat oleh asam nitrit, yang diikuti dengan reaksi kopling dengan α -naftilamina membentuk suatu zat pewarna azo yang merah.

Penentuan panjang gelombang maksimum standar nitrit (NO_2^-) menggunakan baku natrium nitrit (NaNO_2) dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ ditambah dengan HCl dan pereaksi Griess, kemudian di scan pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Hasil yang diperoleh dari penentuan panjang gelombang maksimum yaitu 542 nm. Berikut adalah hasil spektrum panjang gelombang maksimum.



Gambar 2. Spektrum panjang gelombang maksimum nitrit (NO_2^-) dengan pereaksi Griess

Penentuan kurva kalibrasi nitrit dilakukan dengan mengukur masing-masing konsentrasi seri larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, dan 6 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan larutan baku nitrit yaitu natrium nitrit (NaNO_2). Hasil kurva kalibrasi yang diperoleh kemudian dilakukan perhitungan secara statistik, didapatkan persamaan garis regresi linear yaitu $y=bx+a$ ($y=3028x+0,1356$) dimana y adalah hasil dari

pengukuran berupa absorbansi, b adalah nilai slope, x adalah konsentrasi analit dan a adalah nilai intersep, dan koefisien korelasi $r = 0,9994$. Nilai koefisien korelasi yang didapat sesuai dengan persyaratan yaitu r harus mendekati 1 atau 1, pada kurva kalibrasi nitrit didapatkan hasil yang baik yaitu membentuk garis lurus bahwa adanya hubungan antara konsentrasi dan absorbansi.

Tabel 1. Data kuva kalibrasi nitrit (NO_2^-)

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
1	1	0,231
2	2	0,338
3	3	0,44
4	4	0,539
5	5	0,644
6	6	0,735

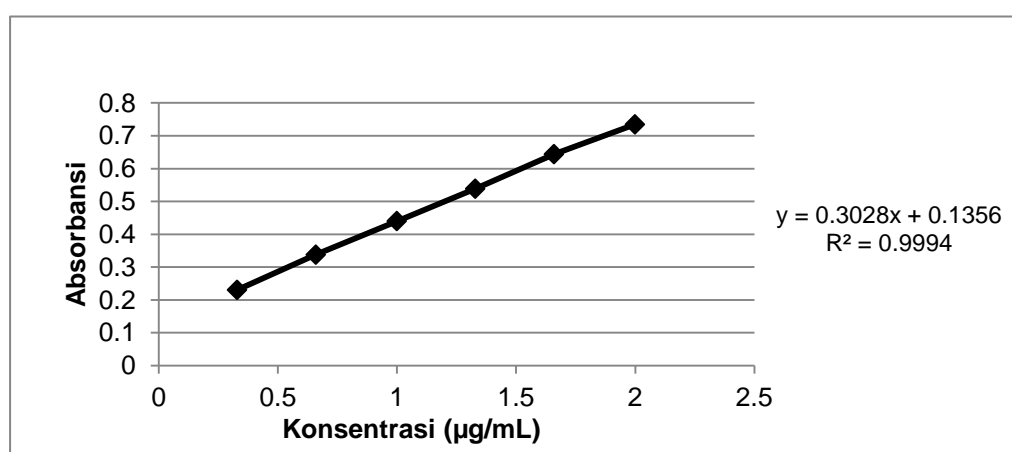
Penetapan kadar nitrit (NO_2^-) dalam bayam merah dan bayam hijau dengan metode spektrofotometri visibel

Validasi metode analisis dilakukan untuk memastikan bahwa parameter-parameter yang digunakan dalam penelitian memenuhi syarat yang ditetapkan dan menjamin hasil yang akurat dan dapat dipercaya. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini meliputi linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantisasi (BK), presisi dan akurasi. Dari hasil data linearitas kurva kalibrasi larutan baku nitrit (NO_2^-) dilakukan perhitungan batas deteksi dan batas kuantisasi, dimana batas deteksi merupakan

konsentrasi terendah yang dapat dideteksi dan hasil nilai yang diperoleh yaitu $0,0499 \mu\text{g/mL}$, batas deteksi yang didapatkan bahwa nilai tersebut adalah kadar terendah yang dapat teranalisis dalam sampel. Batas kuantisasi merupakan kadar analit terendah yang dapat dikuantitatif, dan hasil nilai yang diperoleh yaitu $0,1664 \mu\text{g/mL}$. Selanjutnya nilai koefisien variasi dari fungsi (V_{x0}) diperoleh hasil nilai $0,433$ bahwa hasil yang diperoleh memenuhi syarat yaitu <2 , sehingga data linearitas dapat digunakan dalam analisis.

Tabel 2. Parameter linearitas nitrit (NO_2^-)

Parameter	Hasil	Syarat
Persamaan regresi	$y=0,3028x+0,1356$	
Slop (nilai b)	0,3028	
Intersep	0,1356	
Nilai r	0,9994	Mendekati 1 atau -1
Syx	0,0050	
BK	$0,1664 \mu\text{g/mL}$	
BD	$0,0499 \mu\text{g/mL}$	
V_{x_0}	1,4302	$<2 \%$



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Nitrit (NO_2^-)

Akurasi merupakan ukuran ketepatan metode analisis atau kedekatan nilai hasil uji yang diperoleh dengan nilai yang sebenarnya. Dinyatakan dalam persen perolehan kembali analit pada penentuan kadar sampel yang

mengandung analit dalam jumlah yang diketahui Akurasi dilakukan dengan metode adisi dimana sejumlah larutan baku nitrit ditambahkan pada sampel. Larutan baku yang ditambahkan sebanyak 3 seri konsentrasi

Penetapan kadar nitrit (NO₂⁻) dalam bayam merah dan bayam hijau dengan metode spektrofotometri visibel

yang berbeda yaitu 0,3 µg/mL, 0,5 µg/mL dan 0,7 µg/mL dan masing-masing konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Hasil perolehan

kembali (% recovery) yang diperoleh memenuhi persyaratan yaitu 80-120%.⁴

Tabel 3. Data hasil akurasi nitrit (NO₂⁻)

Konsentrasi teoritis (µg/mL)	Konsentrasi pengukuran (µg/mL)	% recovery	Rata-rata	SD
0,3	0,4438	88,433	88,800%	1,6815
	0,4504	90,635		
	0,4405	87,333		
0,5	0,6585	95,992	95,332%	0,6605
	0,6519	94,671		
	0,6552	95,332		
0,7	0,9326	107,724	107,410%	0,2723
	0,9293	107,252		
	0,9293	107,252		

Selanjutnya dilakukan parameter presisi, presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis, bertujuan untuk mengetahui ukuran ketepatan atau kesesuaian hasil dari analisis pada kondisi yang sama dan dilakukan berulang-ulang.⁴ Pengujian presisi menggunakan metode adisi dilakukan secara *interday* yaitu dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali selama 3 hari

dengan konsentrasi yang sama yaitu 6 µg/ml. Dari hasil yang diperoleh didapatkan nilai presisi dari koefisien variasinya (KV) menunjukkan bahwa tidak melebihi syarat yang ditentukan yaitu <2, artinya bahwa metode yang digunakan memiliki presisi atau ketepatan yang baik. Hasil penentuan presisi nitrit dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4. Data hasil *presisi interday* nitrit (NO₂⁻)

No	Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi(µg/mL)		
		Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
1	0,7	0,9756	0,9822	0,9954
2		0,9657	0,9822	0,9954
3		0,9557	1,0119	0,9789
4		0,9855	1,0086	0,9723
5		0,9690	0,9690	0,9756
6		0,9425	0,9789	0,9855
Rata-rata		0,9657	0,9888	0,9838
SD		0,0151	0,0173	0,0100
% KV		1,5597	1,7547	1,0126

Tabel 5. Data Hasil Presisi Ekstraday Nitrit (NO₂⁻)

Hari ke-	Konsentrasi (µg/mL)
1	0,9657
2	0,9888
3	0,9838
Rata-rata	0,9794
SD	0,01215
% KV	0,24085

Penetapan kadar nitrit (NO₂⁻) dalam bayam merah dan bayam hijau dengan metode spektrofotometri visibel

Selanjutnya dilakukan penetapan kadar nitrit pada masing-masing sampel bayam hijau dan merah dengan perlakuan yang berbeda pada setiap sampel yaitu bayam hijau dan merah segar atau tanpa perlakuan kemudian bayam hijau dan bayam merah sesudah perebusan. Dalam melakukan analisis kadar nitrit sebelumnya dilakukan preparasi sampel untuk menyiapkan sampel sehingga siap untuk dilakukan analisis menggunakan metode spektrofotometri visibel dengan pereaksi Griess. Pereaksi Griess berisi reagensia asam sulfanilat dan α -naftilamina diamin dihidroklorida. Prinsip reaksi Griess adalah pembentukan garam

diazotasi asam sulfanilat oleh asam nitrit, yang diikuti dengan reaksi kopling dengan α -naftilamina membentuk suatu zat pewarna azo yang merah.

Preparasi sampel dimulai dengan pencucian semua sampel bayam, kemudian bayam yang sudah bersih dilakukan perajangan kecil-kecil tujuannya untuk memperluas permukaan sampel yang akan digunakan dalam analisis. Pelarut yang digunakan dalam analisis sampel adalah aquades, karena nitrit merupakan ion sehingga ion nitrit (NO₂⁻) akan terlarut baik dalam aquadest. Berikut adalah hasil dari analisis kadar nitrit :

Tabel 6. Kadar nitrit (NO₂⁻) bayam hijau dan merah segar

Sampel	konsentrasi	Bobot (g)	Kadar (mg/kg)	Rata-rata (mg/kg)	SD
Bayam hijau	1,5766	2,0107	23,5234	23,4084	0,1025
	1,5634		23,3263		
	1,5667		23,3756		
Bayam merah	0,8699	2,0219	12,9068	12,7272	0,1720
	0,8567		12,7108		
	0,8468		12,5638		

Tabel 7. Kadar Nitrit (NO₂⁻) Bayam Hijau dan Merah Setelah Perebusan

Sampel	Konsentrasi	Bobot (g)	Kadar (mg/kg)	Rata-rata (mg/kg)	SD
Bayam hijau	1,1439	2,0067	17,1025	16,8392	2,3316
	1,2727		19,0280		
	0,9623		14,3870		
Bayam merah	0,3579	2,0251	5,3033	5,3359	0,0282
	0,3613		5,3522		
	0,3613		5,3522		

Berdasarkan hasil data yang diperoleh penetapan kadar nitrit dengan tiga kali pengukuran masing-masing bayam dalam keadaan segar dan setelah dilakukan perebusan, bayam dalam keadaan segar

memiliki kadar nitrit yang lebih besar dengan bayam setelah dilakukan perebusan, yaitu terjadi penurunan kadar nitrit, dalam proses perebusan. Kadar nitrit pada bayam hijau segar diperoleh hasil rata-rata 23,4084 mg/kg,

Penetapan kadar nitrit (NO₂⁻) dalam bayam merah dan bayam hijau dengan metode spektrofotometri visibel

dan pada bayam merah 12,7272 mg/kg. Selanjutnya pada bayam hijau sesudah dilakukan perebusan diperoleh hasil rata-rata 16,8392 mg/kg dan pada bayam merah adalah 5,3459 mg/kg.

Standar nilai ADI (Acceptable Daily Intake) adalah 0,07 mg/kg berat badan manusia, jika seseorang mempunyai berat badan 60 kg maka nilai kadar nitrit yang masih aman untuk dikonsumsi adalah setara dengan 4,2 mg nitrit perhari. Apabila diambil dari salah satu contoh konsentrasi yang didapatkan dari hasil penelitian yaitu 23,4084 mg/kg mengkonsumsi 100g bayam perhari, maka diperoleh hasil perhitungan 2,340 mg, sehingga hasil tersebut masih aman dari batas paparan nitrit yang ditetapkan oleh ADI (Acceptable Daily Intake) yaitu sebesar 4,2 mg nitrit perhari.

KESIMPULAN

Hasil kadar nitrit pada bayam hijau segar diperoleh rata-rata 23,4084 mg/kg, dan pada bayam merah 12,7272 mg/kg, pada bayam hijau sesudah dilakukan perebusan diperoleh hasil rata-rata 16,8392 mg/kg dan pada bayam merah adalah 5,3459 mg/kg. Kadar nitrit dari semua sampel bayam hijau dan merah masih dalam batas aman untuk dikonsumsi sesuai dengan nilai ADI (Acceptable Daily Intake) 0,07 mg/kg berat badan manusia yang telah ditetapkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada LP3M Universitas Bahkti Kencana yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Correa-Duarte MA, Perez NP, Guerrini L, Giannini V, Alvarez-Puebla RA. Boosting the Quantitative Inorganic Surface-Enhanced Raman Scattering Sensing to the Limit: The Case of Nitrite/Nitrate Detection. *J. Phys. Chem. Lett.* 2015;6(5):868-874.
2. Emawati E, Musfiroh I, Gama IM. Analisis Kadar Nitrat Pada Kangkung (*Ipomoea Aquatic Forssk*) dengan Metode Kolometri. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, 2017. ISBN : 978-602-73060-1-1.
3. Emawati E, Mustika T, Tursino. Analisis Kandungan Nitrat Dan Nitrit Dalam Air Minum Isi Ulang Dengan Pereaksi Gries Menggunakan Metode Spektrofotometri Sinar Tampak. *Jurnal Farmasi Galenika.* 2017;4. Edisi Khusus SemNas Tanaman Obat Indonesia.
4. Harmita. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2004;1(3):117 – 135.
5. Haryadi J. Buah dan Sayur Yang Berbahaya. Cipayung-Jakarta Timur: Dunia Sehat, 2013.
6. Hord NG, Tang Y and Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(1):1-10.
7. Anonim. Peraturan Kepala Badan POM RI No. 36 Tahun 2013 Tentang Batas Maksimum Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pengawet. Jakarta : Badan POM RI, 2013.
8. Ranasinghe RASN, and Marapana RAUJ. Nitrate and nitrite content of vegetables: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2018 7(4):322-328.
9. Shevla G. Vogel Analisis Anorganik Kulaitatif Makro dan Semimikro Edisi Ke Lima. Jakarta: PT. Kalman Media Pusaka, 1990.