

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Keamanan Pangan

Masalah keamanan pangan merupakan isu strategis saat ini di Indonesia. Isu mengenai keamanan pangan (*food safety*) banyak menjadi perhatian dalam upaya meningkatkan kualitas kesehatan dan kualitas hidup masyarakat. Laporan dari berbagai negara menunjukkan bahwa kasus keracunan dan penyakit melalui makanan masih selalu terjadi di berbagai negara (Fardiaz 1996).

Pangan disebut aman jika memenuhi kriteria dari beberapa aspek seperti fisika, kimia, radioaktivitas maupun mikrobiologi (Fardiaz, 1996). Suatu produk pangan dapat disebut aman dari aspek mikrobiologi jika tidak mengandung mikrobia patogen yaitu mikrobia yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan pada manusia yang mengkonsumsinya (Fardiaz, 1996).

Kontaminasi makanan mempunyai peranan yang sangat besar dalam kejadian penyakit-penyakit bawaan makanan atau keracunan makanan (Purawijaya, 1992). Sumber penyakit yang mungkin mencemari makanan dapat terjadi selama proses produksi yang dimulai dari pemeliharaan, pemanenan atau penyembelihan, pembersihan atau pencucian, persiapan makanan atau pengolahan, penyajian serta penyimpanan (Purawijaya, 1992). Selain hal tersebut sekarang juga masih terdapat penggunaan bahan-bahan kimia dalam produksi makanan, sehingga dengan sendirinya resiko kontaminasi oleh bahan-bahan kimia juga tidak sedikit (Purawijaya, 1992).

Sumber-sumber kontaminasi yang potensial antara lain: penjamah makanan, peralatan pengolahan dan peralatan makan, serta adanya kontaminasi silang. Diperkirakan sekitar 80% penyakit bawaan makanan/keracunan makanan disebabkan adanya kontaminasi mikrobial (Purawijaya, 1992).

Pangan atau makanan merupakan kebutuhan primer setiap manusia. Keamanan serta kebersihan makanan tersebut menjadi faktor yang tidak kalah penting untuk diperhatikan oleh masyarakat. Hal tersebut dimaksudkan untuk menghindari adanya efek samping yang ditimbulkan dari beragam makanan seperti terjadinya kontaminasi, penyalahgunaan bahan makanan, dan keracunan makanan. Kasus keracunan makanan sering terjadi pada anak usia sekolah mulai dari anak TK, SD, SLTP bahkan anak usia remaja yaitu SMA (Anonim, 2004).

Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Semarang, menerjunkan tim untuk menyelidiki kasus keracunan makanan warga di Sukoharjo. Seperti diberitakan, sebanyak 49 warga dari sejumlah desa di Tawanghari, Sukoharjo keracunan makanan usai menyantap hidangan pesta ulang tahun ke-5, putri dari pasangan Suparman dan Nurningsih, (19/4/2013). Meski belum mendapatkan laporan, menurut Zulaimah berdasarkan kasus-kasus keracunan makanan selama ini penyebabnya karena buruknya sanitasi makanan, karena sanitasi makanan buruk sehingga menyebabkan masuknya bakteri patogen yakni *Bacillus cereus*, sehingga menyebabkan mual dan muntah. Berdasarkan data BPOM Semarang, kasus keracunan makanan di

Jateng pada 2012 tercatat sebanyak 14 kasus tersebar di 10 kabupaten/kota. Pada tahun 2011 tercatat sebanyak 14 kasus keracunan makanan yang tersebar di sembilan kabupaten/kota (Aryono, 2013).

B. Es Batu

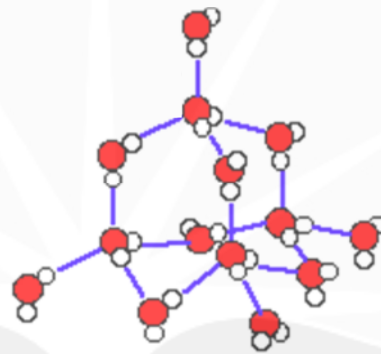
Menurut SNI 01- 3839-1995, es batu merupakan masa padat hasil pembekuan air minum (Gambar 1). Es batu sering ditambahkan pada berbagai jenis minuman untuk memberi kesan dingin dan segar. Untuk beberapa jenis minuman seperti es doger, es cincau dan es campur, es batu tidak hanya berfungsi untuk memberi cita rasa dingin dan segar, tetapi merupakan bagian dari minuman tersebut, sehingga penggunaan es batu tidak dapat digantikan dengan menyimpan minuman tersebut dalam lemari pendingin (Anonim, 2009b).

Air akan mengembang bila dipadatkan, hal unik ini terjadi karena ikatan hidrogen. Air mulai membeku ketika molekul-molekulnya mulai bergerak lambat sehingga tidak mampu memutuskan ikatan hidrogen. Ketika suhu mencapai 0°C , air mulai terjebak dalam kisi kristal, dan masing-masing molekul berikatan dengan maksimum 4 molekul lainnya (Bragg, 1992).



Gambar 1. Es batu (Sumber : Dokumentasi pribadi, 2013)

Es merupakan air yang berada dalam fase padat (kristal) yang diperoleh dari hasil pendinginan dan pembekuan air. Menurut Bragg (1992), es merupakan suatu senyawa yang terdiri dari molekul-molekul H₂O (HOH) yang tersusun sedemikian rupa sehingga 1 atom H terletak di satu sisi antara sepasang atom oksigen molekul-molekul air lainnya, membentuk suatu heksagon simetrik. Satu molekul HOH dapat mengikat 4 molekul HOH yang berdekatan dan jarak atom O-O yang berdampingan sebesar 2,76 Å (Bragg, 1992). Struktur molekul es batu dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur molekul es batu (Sumber : Anonim, 2012a)

Pada pembentukan es terjadi perubahan fisik pada produk meliputi perubahan konsentrasi zat terlarut dan a_w yang akan memengaruhi ketahanan mikrobia (Bragg, 1992). Menurut Lund (2000) pada suhu -5°C produk pangan yang dibekukan akan memiliki a_w senilai dengan 0,9526, ketika suhu diturunkan menjadi -10°C nilai a_w menjadi 0,9074 dan pada suhu -15°C nilai a_w menurun menjadi 0,8642.

Pembekuan merupakan metode yang efektif untuk menghambat pertumbuhan mikrobia. Selama pembekuan mikrobia terkonsentrasi di dalam bagian cairan tak terbekukan (Lund, 2000). Seiring dengan penurunan suhu,

air yang membeku akan semakin banyak sehingga terjadi peningkatan konsentrasi padatan terlarut di dalam cairan tak terbekukan tersebut. Air di dalam sel mikrobial akan berdifusi ke luar (Lund, 2000).

Menurut Anonim (1996), es batu adalah massa padat hasil pembekuan air minum. Air minum yang dipergunakan untuk pembuatan es batu haruslah air yang memenuhi syarat kesehatan. Sebelum dipakai harus diendapkan dulu sampai lumpur yang mungkin ada pada air tersebut mengendap lalu dilakukan klorinasi yaitu dengan menambahkan cairan klorin ke dalam air. Penambahan klorin haruslah dilakukan oleh seorang ahli agar dosis klorin tidak berlebihan (Anonim, 1996).

Potensi es dan minuman es untuk menyebabkan penyakit pada manusia menjadi lebih besar karena es termasuk ke dalam produk pangan yang siap santap dan tidak memerlukan proses pemanasan terlebih dahulu sebelum dikonsumsi. Meskipun bahan baku yang digunakan telah dipanaskan atau dimasak terlebih dahulu namun penanganan atau distribusinya sering tidak dilakukan dengan baik. Penanganan dan distribusi yang baik adalah memperhatikan sanitasi dan higiene suatu produk pangan. Hal inilah yang dapat menjadi sumber penyakit pada manusia (Anonim, 2004b).

Keamanan es yang dijual di pasaran perlu dipertanyakan karena dari beberapa hasil penelitian diketahui bahwa es merupakan produk pangan yang sering menyebabkan penyakit, baik di dalam maupun di luar negeri (Anonim, 2004b). Penelitian yang dilakukan oleh Kelompok Studi Tifoid di daerah

Jatinegara, Jakarta melaporkan bahwa konsumsi minuman es berhubungan dengan demam tifus dan paratifus (Anonim, 2004b).

Adapun syarat mutu es batu yang termasuk golongan es untuk dimakan menurut Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Syarat Mutu Es Batu

Es untuk dimakan (<i>edible ice</i>)		
Es batu, es lilin, es berperisa	ALT (30°C, 72 jam)	1 x 10 ⁴ koloni/g
	APM Koliform	< 3/g
	<i>Salmonella sp.</i>	negatif/25 g
	<i>Escherichia coli</i>	0

(Sumber : Anonim, 2009b)

C. Pengujian Total Mikrobial

Medium *plate count agar* (PCA) dapat berfungsi sebagai medium untuk menumbuhkan mikrobial (Partic, 2008). Untuk penggunaannya, PCA instant sebanyak 22,5 gram untuk 1 Liter aquades. Berdasarkan komposisinya, PCA termasuk ke dalam medium semisintetik, yaitu medium yang komponen dan takarannya sebagian diketahui dan sebagian lagi tidak diketahui secara pasti (Partic, 2008). PCA berwarna putih keabuan, berbentuk granula dan merek yang digunakan adalah Merck. Sebelum dipanaskan tidak larut sepenuhnya dalam air, tetapi masih terlihat serbuk-serbuknya, berwarna kuning dan terlihat keruh. Setelah dipanaskan serbuk media larut seluruhnya dalam air, berwarna kuning (Partic, 2008).

Metode kuantitatif digunakan untuk mengetahui jumlah mikrobial yang ada pada suatu sampel, umumnya dikenal dengan angka lempeng total (ALT)

(Anonim, 2008). Uji angka lempeng total (ALT) dan lebih tepatnya ALT aerob mesofil atau anaerob mesofil menggunakan medium padat dengan hasil akhir berupa koloni yang dapat diamati secara visual berupa angka dalam koloni (cfu) per ml/g atau koloni/100ml. Cara yang digunakan antara lain dengan cara tuang, cara tetes dan cara sebar (Anonim, 2008)

Prinsip pengujian angka lempeng total menurut Metode Analisis Mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06) yaitu pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada medium lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai. Pada pengujian angka lempeng total digunakan *Pepton Dilution Fluid* (PDF) sebagai pengencer sampel dan menggunakan *Plate Count Agar* (PCA) sebagai medium padatnya. Digunakan juga pereaksi khusus *Tri Phenyl Tetrazalim Chlotide* 0,5% (TTC) dalam pengujian angka lempeng total (Anonim, 2008).

D. *Coliform* sebagai Indikator Sanitasi

Untuk digunakan sebagai mikrobia indikator, terdapat persyaratan yang harus dipenuhi oleh mikrobia tersebut, syaratnya antara lain :

1. Dapat digunakan untuk berbagai jenis air
2. Mikroorganisme harus muncul bila patogen enterik dan sumber polusi muncul
3. Tidak ada di air yang terpolusi
4. Mudah diisolasi, murah, mudah diidentifikasi, dan mudah dihitung
5. Lebih banyak jumlahnya dan lebih tahan dibanding patogen

6. Bukan merupakan patogen
7. Tidak berkembang biak di air
8. Merespon perlakuan dan kondisi lingkungan
9. Kepadatan indikator harus berkaitan langsung dengan derajat polusi
10. Menjadi bagian dari mikroflora dalam saluran pencernaan hewan berdarah panas (Anonim, 2013a).

Coliform merupakan suatu grup bakteri yang digunakan sebagai indikator adanya polusi kotoran dan kondisi yang tidak baik terhadap air, makanan, susu dan produk-produk susu. *Coliform* sebagai suatu kelompok dicirikan sebagai bakteri berbentuk batang, Gram negatif (Gambar 3), tidak membentuk spora, aerobik dan anaerobik fakultatif yang memfermentasi laktosa dengan menghasilkan asam dan gas dalam waktu 48 jam pada suhu 35°C. Adanya bakteri *Coliform* di dalam makanan atau minuman menunjukkan kemungkinan adanya mikrobia yang bersifat enteropatogenik dan atau toksigenik yang berbahaya bagi kesehatan (Farida, 2002).



Gambar 3. Bakteri *Coliform* dalam perbesaran 45x (Sumber : Anonim, 2012b)

Gram negatif dan gram positif adalah klasifikasi bakteri yang dibedakan dari ciri- ciri fisik bakteri tersebut. Perbedaan yang mendasar terdapat pada peptidoglikan yang terkandung dalam dinding sel kedua bakteri tersebut. pada bakteri gram positif lapisan peptidoglikannya lebih tebal, sedangkan pada

gram negatif lapisan peptidoglikan lebih tipis. Sehingga saat identifikasi dengan pewarnaan bakteri gram positif akan berwarna sedangkan bakteri gram negatif warna akan hilang saat disiram etanol. Perbedaan kedua adalah Gram positif memiliki bentuk sel bulat, batang atau filamen sedangkan gram negatif bentuk selnya bulat, oval, batang lurus atau melingkar seperti koma, heliks atau flamen, dan beberapa memiliki kapsul pelindung (Rezqi dkk., 2010).

Bakteri *Coliform* dapat dibedakan menjadi 2 grup yaitu : (1) *Coliform* fekal misalnya *Escherichia coli* dan (2) *Coliform* non-fekal misalnya *Enterobacter aerogenes*. *Escherichia coli* merupakan bakteri yang berasal dari kotoran hewan atau manusia, sedangkan *Enterobacter aerogenes* biasanya ditemukan pada hewan atau tanam-tanaman yang telah mati (Fardiaz, 1993). Adanya *Escherichia coli* dalam air minum menunjukkan bahwa air minum itu pernah terkontaminasi feses manusia maupun hewan dan mungkin dapat mengandung patogen usus, oleh karena itu standar air minum mensyaratkan *Escherichia coli* harus nol dalam 100 ml sampel (Farida, 2002).

Menurut Suriawiria (1996), sifat-sifat "*Coliform Bacteria*" yang penting adalah:

- a). Mampu tumbuh baik pada beberapa jenis substrat dan dapat mempergunakan berbagai jenis karbohidrat dan komponen organik lain sebagai sumber energi dan beberapa komponen nitrogen sederhana sebagai sumber nitrogen.
- b). Mempunyai sifat dapat mensintesis vitamin.
- c). Mempunyai interval suhu pertumbuhan antara 10 - 46,5°C.
- d). Mampu menghasilkan asam dan gas.

e). Dapat menghilangkan rasa pada bahan pangan.

Untuk mengetahui jumlah *Coliform* di dalam sampel digunakan metode *Most Probable Number* (MPN) (Widianti dan Ristiati, 2004). Pemeriksaan kehadiran *E. coli* dalam air dilakukan berdasarkan penggunaan medium kaldu laktosa yang ditempatkan di dalam tabung reaksi berisi tabung Durham (tabung kecil yang letaknya terbalik, digunakan untuk menangkap gas yang terjadi akibat fermentasi laktosa menjadi asam dan gas) (Widianti dan Ristiati, 2004). Metode MPN menggunakan sistem 3-3-3 (3 tabung untuk 10 ml, 3 tabung untuk 1,0 ml, 3 tabung untuk 0,1 ml) atau 5-5-5. Kehadiran bakteri *coli* besar pengaruhnya terhadap kehidupan manusia, terbukti dengan kualitas air minum, secara bakteriologis tingkatannya ditentukan oleh kehadiran bakteri tersebut (Widianti dan Ristiati, 2004).

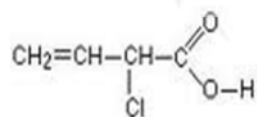
Lactose broth digunakan sebagai medium untuk mendeteksi kehadiran *Coliform* dalam air, makanan, dan produk susu, sebagai kaldu pemer kaya (*pre-enrichment broth*) untuk *Salmonella* dan dalam mempelajari fermentasi laktosa oleh bakteri pada umumnya (Partic, 2008). Pepton dan ekstrak *beef* menyediakan nutrisi esensial untuk metabolisme bakteri. Laktosa menyediakan sumber karbohidrat yang dapat difermentasi untuk organisme *Coliform*. Pertumbuhan dengan pembentukan gas adalah *presumptive test* untuk *Coliform*. *Lactose broth* dibuat dengan komposisi 0,3% ekstrak *beef*; 0,5% pepton; dan 0,5% laktosa (Partic, 2008).

Agar *Eosine Methylene Blue (levine)* merupakan medium padat yang dapat digunakan untuk menentukan jenis bakteri *coli* yang memberikan hasil

positif dalam tabung (Partic, 2008). *Eosine Methylene Blue* yang menggunakan *eosin* dan *metilin blue* sebagai indikator memberikan perbedaan yang nyata antara koloni yang meragikan laktosa dan yang tidak (Partic, 2008). Medium tersebut mengandung sukrosa karena kemampuan bakteri *coli* yang lebih cepat meragikan sukrosa daripada laktosa (Partic, 2008). Untuk mengetahui jumlah bakteri *coli* umumnya digunakan tabel Hopkins yang lebih dikenal dengan nama MPN (*most probable number*) atau tabel JPT (jumlah perkiraan terdekat), tabel tersebut dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah bakteri *coli* dalam 100 ml dan 0,1 ml contoh air (Partic, 2008).

E. Klorin sebagai Desinfektan Air

Klorin adalah desinfektan yang berguna untuk air minum dan industri. Bentuk-bentuk klorin di pasaran antara lain berupa cairan atau gas-Cl₂, Ca (OCl)₂ dan NaOCl (Gambar 4). Bentuk desinfektan yang ditambahkan akan memengaruhi kualitas yang didesinfeksi (Farida, 2002). Penambahan klorin dalam bentuk gas akan menyebabkan turunnya pH air, karena terjadi pembentukan asam kuat. Akan tetapi penambahan klorin dalam bentuk natrium hipoklorit akan menaikkan alkalinitas air tersebut sehingga pH akan lebih besar. Sedangkan kalsium hipoklorit akan menaikkan pH dan kesadahan total air yang didesinfeksi (Farida, 2002).



Gambar 4. Struktur molekul klorin (HOCl) (Sumber : Anonim, 2012c)

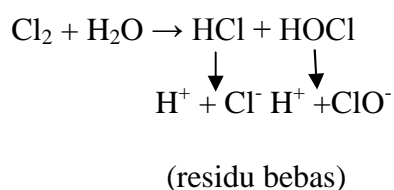
Klor berasal dari gas klor Cl_2 , NaOCl , $\text{Ca(OCl}_2)$ (kaporit), atau larutan HOCl (asam hipoklorit). Menurut Alaerts & Santika (1984), *breakpoint chlorination* (klorinasi titik retak) adalah jumlah klor yang dibutuhkan sehingga:

1. semua zat yang dapat dioksidasi teroksidasi
2. amoniak hilang sebagai gas N_2
3. masih ada residu klor aktif terlarut yang konsentrasinya dianggap perlu untuk pembasmi kuman-kuman.

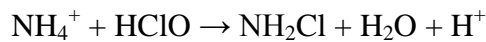
Kebutuhan klorin untuk air yang relatif jernih dan pada air yang mengandung suspensi padatan yang tidak terlalu tinggi biasanya relatif kecil (Alaerts & Santika, 1984). Klorin akan bereaksi dengan berbagai jenis komponen yang ada pada air dan komponen-komponen tersebut akan berkompetisi dalam penggunaan klorin sebagai bahan untuk disinfeksi (Alaerts & Santika, 1984). Pada air yang relatif kotor, sebagian besar akan bereaksi dengan komponen yang ada dan hanya sebagian kecil saja yang bertindak sebagai disinfektan (Alaerts & Santika, 1984).

Menurut Effendi dan Hefni (2003), jika kebutuhan klorin untuk mengoksidasi beberapa senyawa kimia perairan telah terpenuhi, klorin yang ditambahkan akan berperan sebagai disinfektan. Gas klor bereaksi dengan air menurut persamaan sebagai berikut

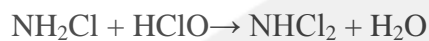
Jika perairan tidak terdapat amoniak:



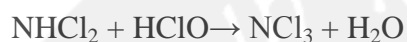
Jika di perairan terdapat amonia:



Monokloramin



Dikloramin



Nitrogen triklorida

Gambar 5. Reaksi klorin dengan air (Effendi dan Hefni, 2003)

Reaksi kesetimbangan sangat dipengaruhi oleh pH. Pada pH 2, klor berada dalam bentuk klorin (Cl_2). Pada pH 2-7, klor kebanyakan terdapat dalam bentuk HOCl, sedangkan pada pH 7,4 klor tidak hanya terdapat dalam bentuk HOCl tetapi juga dalam bentuk ion OCl^- . Pada kadar klor kurang dari 1.000 mg/l, semua klor berada dalam bentuk ion klorida (Cl^-) dan hipoklorit (HOCl) atau terdisosiasi menjadi H^+ dan OCl^- (Effendi dan Hefni, 2003).

Penambahan klorin ke dalam air akan memurnikan air dengan cara merusak struktur sel mikrobia sehingga bakteri patogen akan mati, namun klorin membutuhkan waktu untuk membunuh semua mikrobia karena klorin akan berfungsi sebagai oksidator kemudian sebagai desinfektan (Farida, 2002). Pada air yang bersuhu lebih tinggi atau sekitar 18°C , klorin harus berada dalam air paling tidak selama 30 menit. Jika air lebih dingin, waktu kontak harus ditingkatkan (Farida, 2002). Klorin biasanya ditambahkan ke air segera setelah air dimasukkan ke dalam pipa penyalur. Saat klorin dilarutkan dalam air dalam jumlah yang cukup akan merusak sebagian besar kuman

penyebab penyakit tanpa membahayakan manusia (Reed, 2004). Jika klorin yang ditambahkan cukup, setelah semua organisme rusak akan terdapat sisa klorin dalam air yang disebut sebagai klorin bebas. Klorin bebas akan tetap berada dalam air sampai hilang di dunia luar atau terpakai untuk membunuh kontaminasi yang baru (Reed, 2004).

Mekanisme cara senyawa klorin dapat mematikan kuman bakteri yaitu asam hipoklorit yang merupakan senyawa klorin yang paling aktif akan menghambat oksidasi glukosa dalam sel mikrobia, dengan cara menghambat enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat. Klorin cair atau natrium hipoklorit dalam air akan terhidrolisis membentuk hipoklorit, selanjutnya asam hipoklorit akan terdisosiasi membentuk ion hidrogen dan hipoklorit. Senyawa klorin lebih aktif bila menggunakan pada pH rendah, karena keberadaan asam hipoklorit lebih dominan. Akan tetapi perlu diingat bahwa daya korosi senyawa klorin juga akan meningkat pada pH yang rendah. Pada pH yang tinggi ion hipoklorit tidak memiliki aktivitas bakterisida, sehingga menurunkan efektivitas disinfeksi senyawa klorin (Purnawijayanti, 2001).

F. Kolorimetri Komparator Kit

Kolorimetri merupakan suatu metoda analisis kimia yang didasarkan pada tercapainya kesamaan besaran warna antara larutan sampel dengan larutan standar dengan menggunakan sumber cahaya polikromatis dan detektor mata (Gambar 6). Metoda ini didasarkan pada penyerapan cahaya tampak dan energi radiasi lainnya oleh suatu larutan (Anonim, 2011b).

Analisis cara kolorimetri berdasarkan kepada perbandingan warna larutan yang konsentrasinya tidak diketahui, dengan larutan standar yaitu larutan yang diketahui konsentrasinya (Anonim, 2011b). Yang dimaksud dengan warna disini adalah semua warna mulai dari rentang inframerah hingga ultraviolet. Berdasarkan intensitas warnanya, konsentrasi zat yang mempunyai warna sendiri dapat diukur. Untuk zat yang tidak berwarna, contoh kita jadikan suatu senyawaan yang berwarna dengan menambahkan pereaksi-pereaksi yang sesuai. Intensitas dari cahaya kemudian dibandingkan dengan suatu larutan standar yang telah diketahui kepekatannya (Anonim, 2011b).

Kolorimetri dikaitkan dengan penetapan konsentrasi suatu zat dengan mengukur absorpsi relatif cahaya sehubungan dengan konsentrasi tertentu zat itu (Anonim, 2011b). Dalam kolorimetri visual, cahaya putih alamiah ataupun buatan umumnya digunakan sebagai sumber cahaya, dan penetapan biasanya dilakukan dengan suatu instrument sederhana yang disebut kolorimetri atau pembanding (komparator) warna. Bila mata digantikan oleh sel fotolistrik instrument ini disebut kolorimetri fotolistrik (Anonim, 2011b).



Gambar 6. Kolorimetri komparator kit (Anonim, 2011a)

Keuntungan utama metode kolorimeter adalah bahwa metode ini memberikan cara sederhana untuk menentukan kuantitas zat yang sangat kecil yaitu kurang dari 1 sampai 2 persen. Batas atas metode kolorimeter pada umumnya adalah penetapan konstituen yang ada dalam kuantitas kurang dari 1 atau 2 persen. (Anonim, 2011b).

Asas dasar kebanyakan pengukuran kolorimetrik terdiri dari perbandingan warna yang dihasilkan oleh zat dalam kuantitas yang tak diketahui dengan warna yang sama yang dihasilkan oleh kuantitas yang diketahui dari zat yang akan ditetapkan itu. Menurut Anonim (2011b), ada enam metode yang biasa digunakan untuk mengukur atau membandingkan warna, yaitu:

a. Metode deret standar

Metode ini dilakukan dengan membuat suatu deret larutan standar zat yang akan diketahui konsentrasinya dengan berbagai macam variasi konsentrasi. Larutan sampel dibandingkan dengan deret yang ada. Larutan dengan warna yang serupa secara eksak dengan standar memiliki konsentrasi sama dengan konsentrasi standar.

b. Metode duplikasi

Dibuat satu standar dengan konsentrasi yang telah diketahui. Kemudian sampel diberi reagen pewarna yang sama dengan standar hingga warnanya serupa.

c. Metode pengenceran

Larutan standard dan sampel dimasukkan ke dalam dua tabung dengan ukuran yang sama kemudian dilakukan pengenceran sedikit demi sedikit terhadap larutan yang lebih pekat hingga warnanya sama. Metoda ini sangat tidak tepat.

d. Metode perimbangan

Hampir sama dengan metode pengenceran, namun tabung yang digunakan Silibder Herner.

e. Metode fotometer fotolistrik

Dalam metode ini mata manusia diganti oleh suatu sel fotolistrik yang sesuai. Instrument yang menggunakan fotolistrik mengukur penyerapan cahaya dan bukan warna zat sehingga instrument ini lebih tepat bernama komparator fotolistrik.

f. Metode spektrofotometer

Metode spektrofotometer paling tepat dalam penentuan konsentrasi zat dalam suatu larutan. Namun memiliki harga yang cukup mahal untuk membeli atau menggunakannya (Anonim, 2011b).