

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Fermentasi

Fermentasi berasal dari kata *fervere* (Latin), yang berarti mendidih, menggambarkan aksi ragi pada ekstrak buah selama pembuatan minuman beralkohol. Pengertian fermentasi agak berbeda antara ahli mikrobiologi dan ahli biokimia. Pengertian fermentasi dikembangkan oleh ahli biokimia yaitu proses yang menghasilkan energi dengan perombakan senyawa organik. Ahli mikrobiologi industri memperluas pengertian fermentasi menjadi segala proses untuk menghasilkan suatu produk dari kultur mikroorganismenya (14).

Fermentasi juga dapat diartikan sebagai suatu disimilasi senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganismenya. Disimilasi merupakan reaksi kimia yang membebaskan energi melalui perombakan nutrien. Pada proses disimilasi, senyawa substrat yang merupakan sumber energi diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana atau tingkat energinya lebih rendah. Reaksi disimilasi merupakan aktivitas katabolik sel (15, 16).

Proses fermentasi mendayagunakan aktivitas suatu mikroba tertentu atau campuran beberapa spesies mikroba. Mikroba yang banyak digunakan dalam proses fermentasi antara lain khamir, kapang dan bakteri (16). Kemajuan dalam bidang teknologi fermentasi telah memungkinkan manusia untuk memproduksi berbagai produk yang tidak dapat atau sulit diproduksi

melalui proses kimia. Teknologi fermentasi merupakan salah satu upaya manusia dalam memanfaatkan bahan-bahan yang berharga relatif murah bahkan kurang berharga menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi dan berguna bagi kesejahteraan hidup manusia. Oleh karena itu, penelitian dalam bidang teknologi fermentasi telah dan terus dikembangkan. Salah satu penelitian dalam bidang ini diarahkan untuk mencari bahan mentah berharga murah dan banyak tersedia untuk dimanfaatkan sebagai substrat (17).

Secara umum ada empat kelompok fermentasi yang penting secara ekonomi (18) :

1. Fermentasi yang memproduksi sel mikroba (biomass)

Produksi komersial dari biomass dapat dibedakan menjadi produksi *yeast* untuk industri roti, dan produksi sel mikroba untuk digunakan sebagai makanan manusia dan hewan.

2. Fermentasi yang menghasilkan enzim dari mikroba

Secara komersial, enzim dapat diproduksi oleh tanaman, hewan, dan mikroba, namun enzim yang diproduksi oleh mikroba memiliki beberapa keunggulan yaitu, mampu dihasilkan dalam jumlah besar dan mudah untuk meningkatkan produktivitas bila dibandingkan dengan tanaman atau hewan.

3. Fermentasi yang menghasilkan metabolit mikroba

Metabolit mikroba dapat dibedakan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Produk metabolisme primer yang dianggap penting contohnya etanol, asam sitrat, polisakarida, aseton, butanol, dan vitamin.

Sedangkan metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba contohnya antibiotik, pemacu pertumbuhan, inhibitor enzim, dan lain-lain.

4. Proses transformasi

Sel mikroba dapat digunakan untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang masih memiliki kemiripan struktur namun memiliki nilai komersial yang lebih tinggi. Proses transformasi dengan menggunakan mikroba ini lebih baik bila dibandingkan dengan proses kimia, berkaitan dengan penggunaan reagen kimia yang lebih sedikit. Selain itu proses dapat berlangsung pada suhu rendah tanpa membutuhkan katalis logam berat yang berpotensi menimbulkan potensi.

Fermentasi dapat dilakukan dengan metode kultur permukaan dan kultur terendam (*submerged*). Medium kultur permukaan dapat berupa medium padat, semi padat atau cair. Sedangkan kultur terendam dilakukan dalam medium cair menggunakan bioreaktor yang dapat berupa labu yang diberi aerasi, labu yang digoyang dengan *shaker* atau fermentor (17).

Dibandingkan dengan medium padat, medium cair mempunyai beberapa kelebihan, yaitu (17) :

1. jenis dan konsentrasi komponen-komponen medium dapat diatur sesuai dengan yang diinginkan,
2. dapat memberikan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan,
3. pemakaian medium lebih efisien.

Fermentasi permukaan medium cair merupakan cara fermentasi yang telah sejak lama dipraktekkan untuk memproduksi berbagai produk

fermentasi, misalnya produksi asam asetat secara tradisional. Fermentasi permukaan medium cair ini mulai ditinggalkan sejak fermentasi terendam terbukti lebih efisien, khususnya dalam memproduksi produk-produk fermentasi yang bernilai ekonomis tinggi dan menghendaki sterilitas yang tinggi, seperti misalnya produksi antibiotika (17).

Kondisi yang optimum untuk suatu proses fermentasi tergantung pada jenis organismenya. Pengendalian faktor-faktor fermentasi bertujuan untuk menciptakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit yang diinginkan dari suatu organisme tertentu. Fermentasi medium cair lebih memungkinkan untuk mengendalikan faktor-faktor fisik dan kimia yang mempengaruhi proses fermentasi seperti suhu, pH dan kebutuhan oksigen (17).

Pada fermentasi skala laboratorium yang menggunakan labu goyang (*shake flask*), pengendalian suhu dapat dilakukan melalui penggunaan inkubator yang dilengkapi dengan *thermostat* pengatur suhu atau menggunakan penangas air (*waterbath*). Penambahan asam atau basa untuk mengatur pH medium pada fermentasi yang menggunakan labu goyang, dilakukan secara manual. Ke dalam medium ditambahkan larutan indikator pH yang akan menunjukkan pada saat diperlukannya penambahan asam atau basa ke dalam medium (17).

Penggunaan labu goyang yang memiliki tonjolan-tonjolan pipih di bagian dasarnya dapat memberikan aerasi yang cukup untuk proses fermentasi skala laboratorium. Tonjolan-tonjolan pipih pada labu goyang

mempunyai fungsi seperti *baffle* pada fermentor. Selama fermentasi berlangsung, labu goyang diletakkan di atas *shaker* yang kecepatannya dapat diatur. Gerakan berputar *shaker* ditambah dengan adanya tonjolan-tonjolan pipih di bagian dasar labu goyang menyebabkan medium bergolak sehingga terjadi aerasi. Selama fermentasi berlangsung di atas *shaker*, labu goyang dalam keadaan tertutup, dan agar supaya udara tetap dapat masuk ke dalam labu, digunakan tutup dari kapas, busa atau bahan lain yang tidak dapat menghambat aliran udara ke dalam labu tetapi sterilitas medium tetap terjaga. Tingkat aerasi dalam labu goyang merupakan fungsi dari kecepatan *shake*, efek dari tonjolan pipih yang terdapat di dasar labu, jenis bahan penutup yang digunakan, dan volume medium dalam labu (17).

Fermentasi medium cair dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu fermentasi tertutup (*batch culture*), fermentasi kontinyu dan fermentasi "fed-batch" (17).

Pada fermentasi tertutup, setelah inokulasi tidak dilakukan lagi penambahan medium ke dalam fermentor, kecuali pemberian oksigen (udara steril), antibiuh dan asam/basa untuk mengatur pH. Karena itu pada sistem tertutup ini, dengan semakin lamanya waktu fermentasi, laju pertumbuhan spesifik mikroba semakin menurun sampai akhirnya pertumbuhan berhenti. Penurunan dan berhentinya pertumbuhan disebabkan karena dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi, nutrisi-nutrisi esensial dalam medium semakin berkurang atau terjadi akumulasi autotoksin yang mempengaruhi laju pertumbuhan, atau kombinasi dari keduanya. Dengan

demikian pada fermentasi tertutup jumlah sel pada fase stasioner merupakan jumlah sel maksimum (17).

Dalam fermentasi kontinyu, larutan nutrien steril dalam volume tertentu ditambahkan ke dalam fermentor secara terus-menerus, dan pada saat bersamaan cairan fermentasi yang mengandung sel dan produk-produk fermentasi dikeluarkan dari fermentor dengan volume yang sama. Penambahan medium baru dengan kecepatan tertentu dapat menghasilkan keadaan *steady state*, yaitu suatu keadaan dimana jumlah sel-sel yang terbentuk sama dengan jumlah sel-sel yang dikeluarkan dari fermentor (17).

B. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus adalah kapang yang termasuk dalam divisi Ascomycetes. Berikut ini adalah sistematika lengkap dari *Aspergillus flavus* (19) :

Kingdom : Fungi
Divisi : Ascomycetes
Sub-divisi : Pezizomycotina
Kelas : Eurotiomycetes
Orde : Eurotiales
Famili : Trichocomaceae
Genus : *Aspergillus*
Species : *Aspergillus flavus*

Hifa *Aspergillus flavus* mempunyai ciri-ciri sebagai berikut, yaitu bercabang, mempunyai septa, dan selnya memiliki banyak inti. Struktur yang khas dari *Aspergillus flavus* adalah adanya konidiofor (kepala konidium) dengan ujung berbentuk bulat yang disebut vesikel (20).

Aspergillus flavus merupakan organisme kosmopolitan, dan tidak seperti fungi yang lain, *A.flavus* tumbuh baik pada kondisi kering maupun panas. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37⁰C dan masih bisa tumbuh pada range suhu 12-48⁰C. Suhu yang tinggi tersebut turut berperan dalam patogenesisnya pada manusia (20, 21).

Aspergillus flavus bisa bersifat patogen pada tumbuhan dan manusia. Pada tumbuhan, *A.flavus* dapat menginfeksi benih jagung, kacang, dan kapas. Pertumbuhan kapang ini pada bahan makanan dapat menyebabkan kontaminasi oleh aflatoxin, suatu senyawa yang bersifat toksik dan karsinogenik (18). Kontaminasi ini dapat terjadi pada beberapa produk pertanian seperti kacang, sereal, kentang, jagung, dan padi (22). *A.flavus* juga merupakan penyebab aspergillosis pada manusia, pasien yang terinfeksi oleh kapang ini sering memiliki sistem imun yang menurun atau *immunocompromise* (18, 22).

C. Metabolit Sekunder

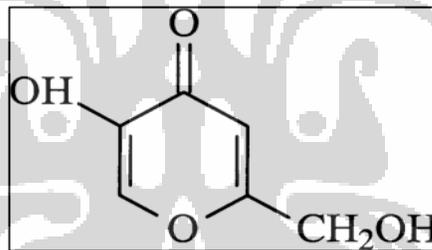
Suatu mikroorganisme dapat menghasilkan produk metabolisme yang disebut metabolit. Senyawa yang dihasilkan selama fase pertumbuhan

primer (tropofase, fase eksponensial atau fase log) disebut metabolit primer. Senyawa yang diproduksi selama fase stasioner (fase idiofase) disebut metabolit sekunder (23,24). Metabolit sekunder biasanya dibentuk dari sejumlah produk antara yang terakumulasi, baik di medium kultur atau di dalam sel, maupun dari produk akhir dalam metabolisme primer. Metabolit sekunder tidak dihasilkan oleh seluruh mikroorganisme, selain itu jenis metabolit sekunder yang terbentuk berbeda antara mikroorganisme satu dengan yang lain. Pembentukan metabolit sekunder sangat bergantung pada kondisi pertumbuhan, terutama komposisi medium. Metabolit sekunder tidak esensial untuk pertumbuhan atau reproduksi organisme itu sendiri dan hanya diproduksi dalam jumlah sedikit, namun karena efek farmakologi yang dimilikinya, beberapa metabolit sekunder berpengaruh pada kehidupan manusia baik menguntungkan maupun merugikan (24). Sebagai contoh, metabolit sekunder yang berguna bagi manusia yaitu asam kojat yang banyak digunakan dalam industri kosmetik, obat-obatan dan makanan. Sementara itu contoh metabolit sekunder yang merugikan adalah aflatoksin yang bersifat toksik bagi manusia.

1. Asam Kojat

Asam kojat (5-hidroksi-2-hidroksimetil-1,4-piron) adalah metabolit sekunder yang banyak diproduksi oleh spesies jamur dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium* melalui proses fermentasi dalam kondisi aerob. Senyawa ini

pertama kali ditemukan di Jepang oleh Saito pada tahun 1907 yang diisolasi dari miselium *Aspergillus oryzae* yang tumbuh pada *steamed rice* (disebut “koji” dalam bahasa Jepang) pada proses fermentasi untuk pembuatan sake (3, 25). Asam kojat memiliki rumus empiris $C_6H_6O_4$ dengan berat molekul 142,11. Asam kojat sangat mudah larut dalam air, etanol, dan aseton; mudah larut dalam etil asetat, kloroform, dan piridin. Asam kojat membentuk kristal jarum prismatis dengan aseton, etanol, eter dan etil asetat, atau metanol dan etil asetat. Titik leburnya adalah 153-154⁰C dan memiliki nilai pKa berkisar dari 7,90 hingga 8,03. Berikut adalah rumus bangun dari asam kojat (4) :



Gambar 1. Rumus Bangun Asam Kojat

Mekanisme biosintesis asam kojat selama proses fermentasi belum sepenuhnya dipahami. Arnstein dan Bentley (1953) menyelidiki jalur biosintesis asam kojat dengan menggunakan glukosa yang dilabel, yaitu 1-D-[¹⁴C] glukosa dan 3,4-D-[¹⁴C] glukosa. Berdasarkan penelitian tersebut, disimpulkan bahwa asam kojat terbentuk secara langsung dari glukosa, tanpa ada perubahan pada struktur dasar glukosa (8). Bajpai dkk (1982) menyatakan bahwa asam kojat terbentuk langsung melalui proses biotransformasi multistep dari glukosa, dan terdapat lebih dari satu jalur

biotransformasi. Berdasarkan jalur biosintesis asam kojat selama proses fermentasi yang tersebut diketahui bahwa beberapa enzim seperti glukosa-6-fosfat-dehidrogenase, heksokinase, dan glukonat dehidrogenase terlibat dalam biosintesis asam kojat (7). Untuk itu dibuatlah hipotesis jalur biosintesis asam kojat yang melibatkan enzim tersebut (Gambar 4).

Asam kojat memiliki aktivitas yang luas dalam kehidupan. Secara garis besar, penggunaan asam kojat dalam kehidupan sehari-hari dapat dibagi sebagai berikut:

1. Pada industri kosmetik

Asam kojat merupakan senyawa pengkhelat ion logam transisi, seperti Fe^{3+} dan Cu^{2+} . Dengan adanya kemampuan untuk mengkhelat ion logam Cu^{2+} tersebut, asam kojat dapat menghambat kerja enzim tirosinase yang tergantung adanya ion Cu^{2+} pada posisi aktifnya. Tirosinase merupakan enzim yang bertanggung jawab dalam pembentukan pigmen melanin sehingga asam kojat dapat menghambat produksi melanin (26). Oleh karena itu asam kojat dapat digunakan sebagai pemutih kulit. Asam kojat juga dapat digunakan sebagai produk perawatan mulut dan gigi (4).

2. Pada industri obat-obatan

Asam kojat memiliki aktivitas antibakteri. Pada awal tahun 1934 asam kojat dilaporkan bahwa kemampuannya menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif lebih kuat daripada terhadap bakteri Gram positif (8). Selain itu asam kojat juga memiliki aktivitas anti-inflamasi, analgesik, antifungi, dan antikanker, sehingga banyak digunakan dalam pengobatan

(3, 4, 27). Asam kojat juga telah diselidiki aktivitasnya sebagai obat baru dalam terapi penyakit seperti diabetes atau anemia (21).

3. Pada industri makanan

Sebagai bahan tambahan makanan, asam kojat digunakan sebagai antioksidan untuk menjaga stabilitas minyak dan lemak, antiseptik, dan pengawet (24). Dalam pertanian, asam kojat digunakan untuk mencegah pencoklatan pada produk-produk pertanian seperti sayuran dan buah-buahan sehingga dapat mencegah pembusukan (1). Asam kojat digunakan pula sebagai prekursor untuk sintesis maltol dan etil maltol yaitu suatu penguat rasa (4).

4. Lain-lain

Asam kojat juga dapat digunakan sebagai insektisida, dan bahan kimia untuk analisis Thorium (4).

2. Aflatoksin

Aflatoksin adalah salah satu jenis mikotoksin, yaitu senyawa kimia yang dihasilkan oleh fungi yang tumbuh pada substrat organik, seperti jagung, kapas, dan kacang, dimana bila dikonsumsi menimbulkan efek yang tidak diinginkan (28). Pada awalnya, aflatoksin diproduksi oleh *Aspergillus flavus* oleh karena itu dinamakan *A-fla-toksin* (29). Selain itu, aflatoksin juga dihasilkan oleh sejumlah spesies *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Rhizopus* yang berbeda, namun pada komoditi agrikultural, toksin ini paling banyak

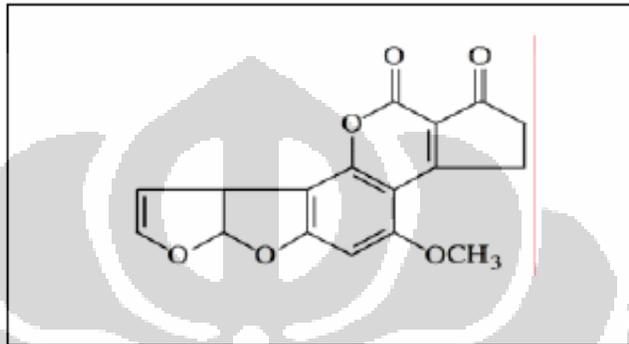
dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* (29,30). Aflatoksin adalah senyawa yang paling toksik dan karsinogenik dibandingkan mikotoksin lainnya (29).

Aflatoksin dibagi menjadi empat golongan utama, yaitu aflatoksin B₁, B₂, G₁, dan G₂. Penggolongan tersebut didasarkan pada fluoresensi tertentu dibawah sinar UV (30). Penamaan B (*Blue*=Biru) dan G (*Green*=Hijau) didasarkan pada warna fluoresensi yang terlihat dibawah sinar UV. Golongan lain aflatoksin yang penting adalah aflatoksin M₁ dan M₂ yang merupakan bentuk oksidatif dari aflatoksin B₁ yang dimodifikasi pada saluran pencernaan beberapa hewan dan diisolasi dari susu, urin, dan feses. Sapi perah dapat mengekskresikan aflatoksin M₁ dalam susu kira-kira 0,9% dari total asupan aflatoksin (29,31).

Aflatoksin menunjukkan efek immunosupresif, mutagenik, teratogenik, dan hepatokarsinogenik pada hewan percobaan. Diantara keempat golongan utama aflatoksin, aflatoksin B₁ adalah yang paling toksik karena merupakan senyawa prokarsinogenik. Aktivitas karsinogenik dan mutagenik dari aflatoksin B₁ disebabkan karena oksidasi aflatoksin B₁ di hati membentuk senyawa 8,9-epoksid. Metabolisme lebih lanjut akan membentuk dihidrodiol yang menghambat sintesis protein yang dapat menyebabkan gangguan liver. Aflatoksin B₁ memerlukan aktivasi oleh sitokrom P-450 untuk dapat berikatan dengan DNA yang kemudian akan menghambat sintesis asam nukleat. Bentuk aflatoksin B₁ yang telah teraktivasi akan membentuk

adduct dengan residu guanin pada DNA, yang dapat menimbulkan efek mutagenik dan karsinogenik (31).

Berikut adalah struktur aflatoksin B₁:



Gambar 5. Rumus Bangun Aflatoksin B₁ (30)

Aspergillus flavus menghasilkan aflatoksin B₁ dan B₂. *Aspergillus parasiticus* dan *Aspergillus nomius* menghasilkan aflatoksin B₁, B₂, G₁ dan G₂ (19).

D. Kromatografi

Kromatografi merupakan prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu di antaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion. Dengan demikian

masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik (32).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir. Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai zat penjerap, seperti halnya penjerap alumina yang diaktifkan, silika gel dan resin penukar ion, atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (33). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*). Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas dan kromatografi cair (33).

Macam-macam kromatografi yang umum digunakan dalam bidang farmasi antara lain kromatografi kolom, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi (32).

1. Kromatografi Lapis Tipis Densitometri

Kromatografi Lapis tipis adalah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi, atau gabungannya. Teknik kromatografi lapis tipis sangat bermanfaat untuk analisis bahan dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu cukup singkat (15-60 menit), dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil (kira-kira 0,01 g senyawa murni, 0,1 g simplisia). Di samping itu tidak memerlukan ruang besar dan teknik pengerjaannya sederhana (32).

Densitometri adalah salah satu cara untuk mendeteksi bercak pada kromatogram, pengukuran bercak pada lapis tipis menggunakan peralatan yang menentukan serapan dari bercak (35).

Posisi dan identifikasi tiap bercak zat terlarut ditunjukkan oleh faktor retensi (R_f), yaitu perbandingan antara pusat bercak dan garis awal dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak dihitung dari garis awal tempat penotolan. Nilai R_f dipengaruhi oleh kelembaban zat penjerap, penjumlahan bejana kromatografi, suhu, pH fase diam, ukuran sampel dan parameter pelarut (34).

E. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah ilmu yang mempelajari interaksi antara energi radiasi dengan materi yang akan menghasilkan spektra (35).

Spektrofotometri serapan merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Teknik yang sering digunakan dalam analisis farmasi meliputi spektroskopi serapan ultraviolet, cahaya tampak, inframerah dan serapan atom. Pengukuran spektrofotometri di dalam daerah cahaya tampak mula-mula disebut kolorimetri. Tetapi istilah kolorimetri lebih tepat digunakan untuk persepsi tentang warna (32)

Jangkauan panjang gelombang yang tersedia untuk pengukuran membentang dari panjang gelombang pendek ultraviolet sampai ke inframerah. Untuk kemudahan pengacuan, daerah spektrum ini pada garis besarnya dibagi dalam daerah ultraviolet (190 nm hingga 380 nm), daerah cahaya tampak (380 nm hingga 780 nm), daerah inframerah dekat (780 nm hingga 3000 nm) dan daerah inframerah (2,5 μm hingga 40 μm atau 4000 cm^{-1} hingga 250 cm^{-1}) (32).

1. Spektrofotometri Ultra Violet-Visible

Spektrofotometri adalah studi kuantitatif dari spektrum elektromagnetik. Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. REM merupakan bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton) (33).

Spektrofotometer UV-Vis digunakan terutama untuk analisis kuantitatif, tetapi dapat juga untuk analisis kualitatif. Untuk analisis kualitatif

yang diperhatikan adalah membandingkan panjang gelombang maksimum, membandingkan serapan dan daya serap serta membandingkan spektrum serapannya (33).

Faktor-faktor yang mempengaruhi spektrum serapan adalah jenis pelarut, pH larutan, kadar larutan, tebal larutan dan lebar celah. Pemilihan pelarut yang digunakan dalam spektrofotometri UV sangat penting. Pelarut tidak boleh mengabsorpsi cahaya pada daerah panjang gelombang di mana dilakukan pengukuran sampel. Untuk beberapa zat tertentu dapat memberikan hasil serapan dan panjang gelombang yang berbeda dengan adanya perubahan pH. Pada senyawa yang sangat sensitif oleh pengaruh pH maka penetapan kadar senyawa ini dilakukan pada titik isobestis, yaitu panjang gelombang di mana suatu senyawa dengan konsentrasi sama, tetapi pH tidak sama memberikan serapan yang sama. Pengukuran kadar larutan dengan konsentrasi tinggi akan terjadi polimerisasi yang menyebabkan panjang gelombang maksimum berubah, maka sebaiknya dilakukan pengenceran konsentrasi larutan yang akan diukur. Penggunaan kuvet dengan ketebalan yang berbeda akan memberikan spektrum serapan yang berbeda pula, maka sebaiknya menggunakan satu kuvet untuk pengukuran sampel yang sama. Semakin lebar celah maka semakin lebar pula serapan, cahaya semakin polikromatis sehingga resolusi dan puncak-puncak kurva tidak sempurna (33).