

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Keamanan Pangan**

Keamanan pangan adalah upaya dan kondisi untuk mencegah pangan dari kemungkinan terjadinya cemaran biologis, kimia, dan benda lain yang dapat merugikan, membahayakan dan mengganggu kesehatan. Pangan yang bermutu dan bergizi serta aman perannya sangat penting bagi pemeliharaan, perumbuhan dan peningkatan kecerdasan masyarakat serta peningkatan derajat kesehatan (Hidayati, 2006:55).

Menurut Undang-undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan, pangan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk pertanian, perkebunan, kehutanan, perikanan, peternakan, perairan dan air, baik yang diolah maupun yang tidak diolah diperuntukkan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk bahan tambahan pangan, bahan baku pangan, dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan dan pembuatan makanan atau minuman. Kebutuhan dasar manusia yang paling utama dan pemenuhannya menjadi bagian dari hak asasi setiap rakyat Indonesia adalah pangan. Di Indonesia, penyelenggaraan pangan digunakan sebagai kebutuhan dasar untuk menyediakan pangan yang beraneka ragam dan memenuhi persyaratan keamanan, mutu dan gizi bagi konsumsi masyarakat. Sehingga aspek keamanan dan mutu pangan merupakan aspek penting dari pangan, dan bahkan dapat dikatakan sebagai pra syarat dasar bagi pangan di Indonesia.

#### **2.2. Bahan Tambahan Pangan**

Bahan tambahan pangan adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk memengaruhi sifat atau bentuk pangan. Penambahan bahan tambahan pada makanan memiliki dosis tertentu karena bahan tambahan makanan dapat

menyebabkan bahaya kesehatan. Penggunaan Bahan Tambah Pangan dalam proses produksi pangan perlu diwaspadai bersama, baik oleh produsen maupun oleh konsumen (Febrianti dan Hakim, 2018).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Nomor : 1168/Menkes/Per/X/1999 tentang Perubahan atas Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 722/Menkes/per/IX/1988 Tentang Bahan Tambah Makanan, bahan tambahan yang dilarang digunakan dalam makanan adalah : Asam Borat (Boric Acid) dan senyawanya, Asam Salisilat dan garamnya (Salicylic Acid and its salt), Dietilpirokarbonat (Diethylpirocarbonate DEPC), Dulsin (Dulcin), Kalium Klorat (Potassium Chlorate), Kloramfenikol (Chloramphenicol), Minyak Nabati yang dibrominasi (Brominated vegetable oils), Nitrofurazon (Nitrofurazone), Formalin (Formaldehyde), Kalium Bromat (Potassium Bromate).

Di dalam industri pangan, terutama industri rumah tangga yang pengetahuan mereka masih terbatas, penggunaan bahan tambahan yang berbahaya masih sering dilakukan (Anggrahini, 2007). Bahan tambahan berbahaya yang paling sering ditambahkan produsen adalah zat pewarna Rhodamine B dan Methanyl yellow, pemanis buatan siklambat dan sakarin, serta pembuat kenyal berupa formalin dan boraks (Didinkaem, 2007).

Penggunaan pewarna sintetis di industri makanan saat ini sangat besar, hampir 90% industri makanan memilih menggunakan pewarna sintetis hal ini dikarenakan harga yang terjangkau dan kepraktisannya. Pewarna buatan atau sintetis merupakan zat aditif yang ditambahkan pada makanan yang bertujuan untuk memperbaiki warna dari makanan.. Pewarna buatan atau sintetis untuk makanan diperoleh melalui sintesis kimia buatan yang mengandalkan bahan-bahan kimia, atau dari bahan yang mengandung pewarna alami melalui ekstraksi secara kimiawi.

Menurut Permenkes RI No.033 Tahun 2012 tentang bahan tambahan pangan, pewarna sintetis yang diperbolehkan yaitu Tartrazin CI. No. 19140

(Tartrazine), Kuning kuinolin CI. No. 47005 (Quinoline yellow), Kuning FCF CI. No. 15985 (Sunset yellow FCF), Karmoisin CI. No. 14720 (carmoisine), Ponceau 4R CI. No. 16255 (Ponceau 4R), Eritrosin CI. No. 45430 (Erythrosine), Merah allura CI. No. 16035 (Allura red), Indigotin CI. No. 73015 (Indigotine), Biru berlian FCF CI No. 42090 (Brilliant blue FCF), Hijau FCF CI. No. 42053 (Fast green FCF), Coklat HT CI. No. 20285 (Brown HT). Namun harus diperhatikan bahwa pewarna buatan dapat membahayakan kesehatan apabila ditambahkan dalam jumlah berlebih pada makanan atau dalam jumlah kecil apabila dikonsumsi secara terus menerus dalam jangka waktu lama. Sedangkan pewarna makanan buatan yang tidak aman dan tidak layak untuk dikonsumsi adalah Rhodamin B dan Methanil Yellow yang merupakan pewarna tekstil.

Makanan yang diwarnai dengan pewarna ” Non Food Colour (Pewarna Buatan)” akan cerah sekali, karena pewarna cepat meresap kedalam produk. Biasanya tempat atau bejananya juga akan berwarna, sukar sekali dihilangkan meskipun telah dicuci. Begitupun bila kita pegang, maka bekas pewarna akan tetap menempel.

Ciri-ciri visual yang dapat digunakan sebagai patokan dalam memilih makanan di pasaran, adalah sebagai berikut :

- Pewarna Alami :
  1. Warna agak suram
  2. Mudah larut dalam air
  3. Membutuhkan bahan pewarna lebih banyak (kurang mampu mewarnai dengan baik)
  4. Membutuhkan waktu lama untuk meresap kedalam produk
- Pewarna Non Food Colour :
  1. Warna cerah sekali
  2. Tidak mudah larut dalam air

3. Membutuhkan bahan pewarna lebih sedikit, karena dalam konsentrasi rendah sudah mampu mewarnai dengan baik.
4. Cepat meresap ke dalam produk

Rhodamin B merupakan pewarna sintetis berbentuk serbuk kristal, berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, dan dalam larutan akan berwarna merah terang berpendar/berfluorosensi. Rhodamin B merupakan zat warna golongan xanthenes dyes yang digunakan pada industri tekstil dan kertas, sebagai pewarna kain, kosmetika, produk pembersih mulut, dan sabun. Nama lain rhodamin B adalah D and C Red no 19, Food Red 15, ADC Rhodamine B, Aizen Rhodamine, dan Brilliant Pink (BPOM, 2005). Rhodamin B sering disalahgunakan pada pembuatan kerupuk, terasi, cabe merah giling, agar-agar, aromanis/kembang gula, manisan, sosis, sirup, minuman, dan lain-lain.

Ciri-ciri pangan yang mengandung rhodamin B antara lain:

- a) Warnanya cerah mengkilap dan lebih mencolok;
- b) Terkadang warna terlihat tidak homogen (rata), ada gumpalan warna pada produk;
- c) Bila dikonsumsi rasanya sedikit lebih pahit;
- d) Biasanya produk pangan yang mengandung rhodamin B tidak mencantumkan kode, label, merek, atau identitas lengkap lainnya.

Menurut WHO, rhodamin B berbahaya bagi kesehatan manusia karena sifat kimia dan kandungan logam beratnya. Rhodamin B termasuk bahan karsinogen (penyebab kanker) yang kuat. Konsumsi rhodamin B dalam jangka panjang dapat terakumulasi di dalam tubuh dan dapat menyebabkan gejala pembesaran hati dan ginjal, gangguan fungsi hati, kerusakan hati, gangguan fisiologis tubuh, atau bahkan bisa menyebabkan timbulnya kanker hati. Rhodamin B juga dapat menimbulkan efek akut jika tertelan sebanyak 500 mg/kg BB, yang merupakan dosis toksiknya dan efek toksik yang mungkin terjadi

adalah iritasi saluran cerna, cirinya air seni akan berwarna merah atau merah muda.

### 2.3 Bubuk Balado



Gambar 1. Perasa Bubuk Balado

Bumbu bubuk didefinisikan sebagai bahan yang mengandung satu atau lebih jenis rempah yang ditambahkan ke dalam bahan makanan pada saat makanan tersebut diolah (sebelum disajikan) dengan tujuan untuk memperbaiki aroma, citarasa, tekstur, dan penampakan secara keseluruhan. Setiap komponen bumbu menyumbangkan citarasa, warna, aroma, dan penampakannya yang khas, sehingga kombinasinya satu sama lain akan memberikan sensasi baru yang dapat meningkatkan selera, daya terima, dan identitas tersendiri kepada setiap produk yang dihasilkan. Secara alami rempah-rempah mengandung berbagai macam komponen aktif yang sangat besar perannya dalam penciptaan rasa suatu produk. Rempah-rempah mengandung zat antioksidan, anti bakteri, antikapang, anti khamir, antiseptic, antikanker, dan antibiotik yang kesemuanya itu sangat besar perannya, membuat bumbu menjadi awet (Astawan, 2009).

Bumbu tabur atau seasoning powder atau bumbu perasa merupakan bumbu yang fungsinya untuk memberikan rasa pelezat pada makanan atau jajanan misalnya: makaroni goreng, tela-tela, emping, kerupuk, keripik, kentang goreng, jagung bakar, dan jagung manis. Rasa dan warna pada bumbu tabur bermacam-macam jenisnya menambah daya tarik tersendiri. Jajanan yang

memiliki bumbu berwarna yang mencolok membuat konsumen tertarik untuk mengkonsumsinya (Sari, 2017)

Rasa untuk bumbu tabur ini ada berbagai macam rasa antara lain: bumbu tabur rasa keju, bumbu tabur rasa balado, bumbu tabur rasa barbeku, bumbu tabur rasa jagung manis, bumbu tabur rasa jagung bakar, bumbu tabur rasa ayam bawang, dan lain-lain. Bumbu tabur ini digunakan sesuai dengan camilan apa yang akan dibuat.

Kualitas bumbu tabur ini juga berbeda-beda. Kualitas bumbu tabur yang baik antara lain:

1. Butiran-butiran atau partikel-partikel lebih halus dan kering.
2. Bumbu tabur juga dapat larut dalam minyak.
3. Warnanya memakai pewarna makanan dengan kualitas tinggi, sehingga warna tidak menempel di mulut/lidah ketika dimakan.
4. Memakai perasa makanan yang asli dan bukan sekadar aroma.
5. Memakai kandungan vetsin yang wajar untuk dikonsumsi.

Cara penggunaan bumbu tabur secara optimal dapat dilakukan dengan cara bumbu tabur diberikan untuk makanan ringan yang masih dalam keadaan panas. Setelah diberikan, diamkan selama 2 hingga 3 menit lalu setelah itu baru diaduk sampai merata. Hal ini terjadi karena pori-pori makanan yang melebar ketika panas, sehingga bumbu tabur dapat melekat dengan baik di makanan ringan.

Standar pemakaian bumbu tabur adalah sebagai rasa yang standar, berikan bumbu tabur sebesar 5%-7% dari berat produk matang. Untuk rasa yang lebih kuat lagi, berikan 10% dari berat produk matang. Misalnya jika untuk 2 kg produk matang, maka diberikan bumbu tabur 1 ons - 2 ons.

Bubuk balado merupakan produk yang berbentuk bubuk, praktis dalam penyiapan dan memiliki daya simpan lama. Sifat produk bubuk ini adalah mempunyai ukuran partikel yang sangat kecil, memiliki kadar air rendah (Sudaryati dkk, 2012).

Bubuk balado diperoleh dari pasar tradisional dan toko online. Untuk pasar tradisional yang dipilih adalah pasar bululawang, pasar krebbe, pasar gedog turen dan toko prima malang. Dari pasar tersebut dipilih toko yang menjual perasa bubuk balado dengan toko yang paling sering dikunjungi pembeli dengan kata lain toko tersebut selalu didatangi ketika ingin membeli perasa bubuk rasa balado. Pembelian di toko online menggunakan aplikasi shopee. Pembelian di shoppe dipilih toko yang memiliki jumlah pembeli bubuk tabur rasa balado yang tinggi dan memiliki penilaian yang baik seperti bintang lima pada nilai pesannya.

## **2.4 Rhodamin B**

### **2.4.1 Definisi Rhodamin B**

Rhodamin B adalah zat pewarna sintetis yang berwarna merah terang dan beracun dan bersifat karsinogenik. Rhodamin B mengandung senyawa klorin (Cl). Senyawa klorin merupakan senyawa yang berbahaya dan reaktif (cenderung bereaksi terhadap sesuatu yang timbul). Jika tertelan, maka senyawa ini akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara mengikat senyawa lain dalam tubuh, hal inilah yang bersifat racun bagi tubuh. Selain itu, rhodamin B juga memiliki senyawa pengalkilasi (CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>) yang bersifat radikal sehingga dapat berikatan dengan protein, lemak, dan DNA dalam tubuh (Situmorang dan Silitonga, 2015).

Tabel 1. Sifat Kimia Rhodamin

Berat molekul	479
---------------	-----

Rumus molekul	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Nomor CAS	81-88-9
Nomor IMIS	0848
Titik Lebur	165°C
Kelarutan	Sangat larut dalam air dan alcohol, sedikit larut dalam asam klorida dan natrium hidroksida
Sinonim	Tertraetilrhodamin, D&C Red No. 19, Rhodamin B Klorida, C.I basic violet 10 : CI. 45170
Deskripsi	Kristal hijau atau serbuk warna violet

Rodhamin B adalah pewarna tekstil dan sama sekali tidak boleh digunakan sebagai pewarna makanan. Zat ini tidak diatur lagi dalam Permenkes 033 tahun 2012 tentang Bahan Tambah Pangan, namun pelarangan penggunaan zat warna ini tertuang dalam Peraturan Menteri Kesehatan RI No.239/Menkes/Per/V/85 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya. Yuliarti dalam Ripaldy, dkk., (2017) mengatakan bahwa mengkonsumsi rhodamin B dalam jumlah banyak dalam waktu singkat dapat menyebabkan gejala akut keracunan. Rhodamin B yang ditambahkan pada makanan dapat mengakibatkan iritasi pada saluran pencernaan dan dapat menimbulkan gejala keracunan yang ditandai dengan air kencing berwarna merah maupun berwarna merah muda. Rhodamin B yang terhirup dapat mengakibatkan gangguan kesehatan seperti terjadinya iritasi pada saluran pernafasan.



#### 2.4.2 Karakteristik Rhodhamin B



Gambar 2. Serbuk Rhodhamin B

Rhodamin B adalah zat warna sintesis berbentuk serbuk kristal, berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, dan dalam larutan berwarna merah terang berfluorensi. Rhodamin B semula digunakan untuk kegiatan histologi dan sekarang berkembang untuk berbagai keperluan seperti sebagai pewarna kertas dan tekstil. Rhodamin B sering disalah gunakan untuk pewarna pangan dan pewarna kosmetik, misalnya sirup, saus, lipstik, pemerah pipi, dan lain-lain. Pewarna ini terbuat dari dietillaminophenol dan phatalic anhidria dimana kedua bahan baku ini sangat toksik bagi manusia. Biasanya pewarna ini digunakan untuk pewarna kertas, wol dan sutra (Sugiharti, 2004).

#### 2.4.3 Dampak Kesehatan

Penggunaan rhodamin B pada makanan dalam waktu yang lama (kronis) akan dapat mengakibatkan gangguan fungsi hati maupun kanker. Jika terpapar Rhodamin B dalam jumlah besar maka dalam waktu singkat akan terjadi gejala akut keracunan rhodamin B. Rhodamin B masuk kedalam tubuh melalui beberapa faktor yaitu: Melalui makanan, yang bisa mengakibatkan iritasi pada saluran pencernaan dan mengakibatkan gejala keracunan dengan air kencing yang berwarna merah atau merah muda. Apabila zat rhodamin B terhirup dapat mengakibatkan gangguan kesehatan, yakni terjadinya iritasi pada saluran pernapasan. Dan bila zat kimia ini mengenai kulit, maka kulit akan mengalami iritasi. Jika rhodamin B terkena mata akan mengalami iritasi yang ditandai

dengan mata kemerahan dan timbunan cairan atau udem pada mata (Yamlean, 2011).

Pada umumnya, bahaya akibat rhodamin B akan muncul jika zat warna ini dikonsumsi dalam jangka panjang. Tetapi rhodamin B juga dapat menimbulkan efek akut jika tertelan sebanyak 500 mg/kg BB, yang merupakan dosis toksiknya. Efek toksik yang mungkin terjadi adalah iritasi saluran cerna. Jika hal tersebut terjadi maka tindakan yang harus dilakukan adalah segera berkumur, periksa bibir dan mulut jika ada jaringan yang terkena zat beracun. Jika terjadi muntah, letakan posisi kepala lebih rendah dari pinggul untuk mencegah terjadinya muntahan masuk ke saluran pernapasan (aspirasi paru). Longgarkan baju, dasi, dan ikat pinggang untuk melancarkan pernapasan. Segera bawa ke rumah sakit atau dokter terdekat untuk penanganan selanjutnya (Tarmizi, 2014).

Dampak dari penggunaan Rhodamin b adalah hiperaktivitas dan kanker. Hiperensitifitas adalah kondisi yang sering disebut sebagai gangguan hiperkinetik yaitu tingkah laku individu-individu yang tidak dapat dikontrol, yang dianggap sangat aktif, terlalu menuruti kata hati, kurang dapat berkonsentrasi atau anak sulit diatur (Thompson, 2002).

Seorang anak dapat disebut memiliki gangguan hiperaktif ada tiga yaitu inatensi, hiperaktif, dan impulsif. Inatensi adalah pemusatan perhatian yang kurang baik atau kegagalan seorang anak dalam memberikan perhatian secara utuh (Fadhili, 2010). Implusif adalah ketidakmampuan mengendalikan dorongan yang menyebabkan kecenderungan anak bertindak tiba-tiba tanpa berfikir (Gichara, 2008). Kanker merupakan penyakit yang terjadi akibat kerusakan gen atau DNA sel. Jika salah satu sel genetik mengalami kerusakan maka akan menghasilkan sel kanker atau neoplasma. Dan sel yang rusak tersebut akan terus tumbuh dan berkembang biak di dalam tubuh dan membentuk jaringan baru, sehingga terbentuklah jaringan tumor atau kanker (Mardiah dkk. 2006).

Penyebab kanker ini beragam salah satunya adalah dari pangan yang kita konsumsi berupa bahan tambahan pangan yang sering digunakan di dalam proses pengolahan pangan (Mardiah dkk. 2006).

#### **2.4.4 Penyalahgunaan Rhodamin B pada Makanan**

Penggunaan Rhodamin B pada makanan dalam waktu yang lama (kronis) akan dapat mengakibatkan gangguan fungsi hati maupun kanker. Namun demikian, bila terpapar Rhodamin B dalam jumlah besar maka dalam waktu singkat akan terjadi gejala akut keracunan Rhodamin B. Bila Rhodamin B tersebut masuk melalui makanan maka akan mengakibatkan iritasi pada saluran pencernaan dan mengakibatkan gejala keracunan dengan air kencing yang berwarna merah atau merah muda. Dengan menghirup Rhodamin B dapat pula mengakibatkan gangguan kesehatan, yakni terjadinya iritasi pada saluran pernapasan. Demikian pula apabila zat kimia ini mengenai kulit, maka kulit pun akan mengalami iritasi. Mata yang terkena Rhodamin B juga akan mengalami iritasi yang ditandai dengan mata kemerahan dan timbunan cairan atau udem pada mata (Yuliarti, 2007).

Berbagai penelitian dan uji telah membuktikan bahwa dari penggunaan zat pewarna ini pada makanan dapat menyebabkan kerusakan pada organ hati. Pada uji terhadap mencit, diperoleh hasil yaitu terjadi perubahan sel hati dari normal menjadi nekrosis dan jaringan disekitarnya mengalami disintegrasi atau disorganisasi. Kerusakan pada jaringan hati ditandai dengan terjadinya piknotik dan hiperkromatik dari nukleus, degenerasi lemak dan sitolisis dari sitoplasma, batas antar sel tidak jelas, susunan sel tidak teratur dan sinusoid tidak utuh. Semakin tinggi dosis yang diberikan, maka semakin berat sekali tingkat kerusakan jaringan hati mencit (Anonima, 2006).

Pewarna secara umum mengandung residu logam berat karena pada proses pembuatan zat warna sintetis biasanya melalui perlakuan pemberian asam sulfat atau asam nitrat yang seringkali terkontaminasi oleh arsen atau logam berat lain yang bersifat racun. Di Indonesia, peraturan mengenai penggunaan zat

pewarna yang diizinkan dan dilarang untuk pangan diatur melalui SK Menteri Kesehatan RI No. 722/MenKes/Per/IX/88 mengenai bahan tambahan pangan. Akan tetapi, seringkali terjadi penyalahgunaan pemakaian zat pewarna untuk sembarang bahan pangan, misalnya zat pewarna untuk tekstil dan kertas dipakai untuk mewarnai bahan pangan. Hal ini jelas sangat berbahaya bagi kesehatan karena adanya residu logam berat pada zat pewarna tersebut.

Timbulnya penyalahgunaan tersebut antara lain disebabkan oleh ketidaktahuan masyarakat mengenai zat pewarna untuk pangan, dan di samping itu, harga zat pewarna untuk industri jauh lebih murah dibandingkan dengan harga zat pewarna untuk pangan. Lagipula warna dari zat pewarna tekstil atau kertas biasanya lebih menarik (Yuliarti, 2007).

Pada penelitian Yamlean, P.V. (2011) tentang identifikasi dan penetapan kadar rhodamin B pada jajanan kue berwarna merah muda yang beredar di Kota Manado menggunakan metode analisis Spektrofotometri UV Vis, kue tersebut ternyata ada yang positif mengandung rhodamin B yaitu kue bolu kukus yang beredar di Manado masih ada yang menggunakan pewarna rhodamin B. Nilai rata-rata rhodamin B yang terdeteksi pada sampel kue bolu kukus yaitu dari pasar Karombasan pada penjual I (0,0019798  $\mu\text{g/ml}$ ), penjual II (0,0011963  $\mu\text{g/ml}$ ), dari pasar Bersehati pada penjual I (0,00123415  $\mu\text{g/ml}$ ), penjual II (0,00122575  $\mu\text{g/ml}$ ) dan dari pasar Tuminting pada penjual I (0,00241365  $\mu\text{g/ml}$ ).

Berdasarkan hasil uji kualitatif identifikasi rhodamin B dalam saus sambal yang beredar di pasar tradisional dan modern kota Denpasar, bahwa dari 5 sampel pasar tradisional terdeteksi 2 sampel mengandung rhodamin B sedangkan semua sampel di pasar modern dinyatakan aman dari zat pewarna sintetis rhodamin B. Rhodamin B ditunjukkan dengan perubahan warna pada benang wool. Selain itu, hasil analisis juga dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Sampel yang positif mengandung rhodamin B menunjukkan

perubahan warna yang sama seperti kontrol positif yaitu sampel yang berwarna orange kemerahan berubah menjadi warna orange. Hasil analisis kualitatif pada sampel saus sambal yang berasal dari pasar modern menunjukkan bahwa semua sampel tidak mengandung rhodamin B dimana sampel yang berwarna orange kemerahan tidak berubah warna menjadi orange. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada benang wol. Hasil pengujian menunjukkan warna yang sama dengan kontrol negatif (Widayanti, N. P., dkk 2018).

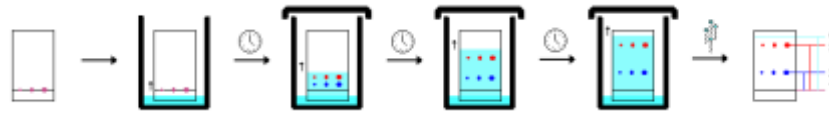
Untuk menghindari bahaya rhodamin B, ada beberapa ciri-ciri jajanan yang mengandung rhodamin B antara lain warnanya cerah mengkilap dan warna merah lebih mencolok, terkadang warna terlihat tidak merata, ada gumpalan warna pada produk, dan bila dikonsumsi rasanya sedikit lebih pahit (Eka Kumalasari, 2017). Jadi, diharapkan bagi konsumen agar lebih berhati-hati dalam mengkonsumsi bumbu tabur pada jajanan yang beredar.

## **2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

### **2.5.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Meskipun demikian, kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom.

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu metode yang dapat memisahkan suatu senyawa dari campurannya dengan menggunakan 2 fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah silika gel, sedangkan fase geraknya adalah asam asetat glacial.



Gambar 3. Kromatografi Lapis Tipis

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (ascending), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (descending). Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan. Dalam kromatografi lapis tipis, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan bahwa hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara tepat. Beberapa keuntungan lain kromatografi lapis tipis adalah :

1. Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis
2. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet
3. Dapat dilakukan elusi secara menaik (ascending), menurun (descending), atau dengan cara elusi 2 dimensi
4. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

Prinsip kerja kromatografi lapis tipis adalah pemisahan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran dari sampel versus pelarut fase gerak yang digunakan. Teknik KLT menggunakan fase diam dalam bentuk plat tipis silika dan fase geraknya bisa berupa air atau pelarut organik. Pemilihan fase gerak ini tergantung dengan jenis sampel yang akan dipisahkan. Eluen merupakan larutan/larutan campuran yang digunakan untuk sebagai fase gerak. Bila sampel

semakin mendekati kepolaran eluen maka sampel akan lebih terbawa dan terpisah oleh fase gerak.

Pada dasarnya, pemisahan senyawa-senyawa dalam kromatogram dipengaruhi oleh bagaimana kelarutan senyawa dalam pelarut, tergantung pada bagaimana besar antaraksi molekul-molekul senyawa dengan pelarut serta bagaimana senyawa melekat pada fasa diam yang tergantung pada antaraksi senyawa dengan fasa diam. Dalam proses analisis spot/pemisahan zat, chamber yang berisi eluen dijenuhkan dan ditutup dengan tujuan agar pelarut yang digunakan tidak menguap, karena hal tersebut dapat mempengaruhi proses pemisahan.

Untuk membantu mengidentifikasi zat-zat yang ada dapat dihitung nilai  $R_f$  (Retardation factor) dari masing-masing zat yang ada pada kromatogram. Nilai  $R_f$  dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{jarak (bercak) yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai  $R_f$  yang diperoleh ini menyatakan ukuran daya pisah suatu zat dengan kromatografi planar (KLT), dimana jika nilai  $R_f$ -nya besar berarti daya pisah zat yang dilakukan solvent (eluenya) maksimum sedangkan jika nilai  $R_f$ -nya kecil berarti daya pisah zat yang dilakukan solvent (eluenya) minimum.  $R_f$  yang optimum yaitu berada pada rentang 0.5-0.8. Hasil yang didapatkan tersebut menunjukkan bahwa Rhodamin B dalam sampel tidak dapat terpisah secara sempurna. Adapun faktor yang dapat mempengaruhi nilai  $R_f$ , yaitu ukuran partikel pada absorben, derajat keaktifan dari lapisan penjerap, ketetapan perbandingan dari eluen, konsentrasi zat yang dipanaskan, kejenuhan chamber, diameter penotol, teknik percobaan, suhu, keseimbangan, jumlah cuplikan yang digunakan, tebal dan kerataan dari lapisan penjerap, pelarut dan struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan.

### **2.5.2 Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

KLT digunakan secara luas untuk analisis solut-solut organik terutama dalam bidang biokimia, farmasi, klinis, forensik, baik untuk analisis kualitatif dengan cara membandingkan nilai Rf solut dengan nilai Rf senyawa baku atau untuk analisis kualitatif. Penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas kemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, serta untuk memantau kromatografi kolom, melakukan screening sampel untuk obat.

### **2.5.3 Analisis Kualitatif pada Rhodamin B**

KLT dapat digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai Rf. Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai Rf yang sama jika diukur maka kondisi KLT yang sama. Untuk meyakinkan identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan lebih dari satu fase gerak dan jenis pereaksi semprot. Teknik spiking dengan menggunakan senyawa baku yang sudah diketahui sangat dianjurkan untuk lebih memantapkan pengambilan keputusan identifikasi senyawa.

Pada analisis kualitatif rhodamin B prinsip kromatografi lapis tipis yaitu perbedaan kepolaran "like disolve like" dimana pelarut yang bersifat polar akan berikatan dengan senyawa yang bersifat polar juga dan sebaliknya, semakin dekat kepolaran antara senyawa dengan eluent maka senyawa akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut. Tahap pertama yang dilakukan adalah preparasi sampel dilakukan untuk memperoleh larutan rhodamin B dalam sampel sehingga bisa dianalisis dengan KLT dimana sampel yang diuji harus berbentuk larutan. Kemudian penarikan rhodamin menggunakan benang wol berfungsi untuk mengekstraksi rhodamin B dalam sampel yang telah menerima perlakuan, dengan bantuan asam asetat yang sebelumnya telah ditambahkan terlebih dahulu, sehingga dihasilkan warna benang wol yang berubah dari putih menjadi merah



terang. Selain itu, fungsi digunakannya benang wol adalah sebagai adsorben warna sedangkan asam asetat glasial berfungsi sebagai pemberi suasana asam dimana pada suasana ini rhodamin B akan tertarik oleh asam dan selanjutnya akan teradsorpsi oleh benang wol. Selanjutnya dilakukan penyiapan fasa diam dan fasa gerak dari sistem kromatografi lapis tipis. Fasa diam yang digunakan adalah plat aluminium. Plat tipis aluminium berfungsi sebagai fasa diam yang merupakan tempat berjalannya adsorben sehingga proses migrasi analit oleh solventnya dapat berjalan, sedangkan fase geraknya berupa eluen yang bersifat polar tujuannya agar dapat mengelusi rhodamin B dengan baik sebab rhodamin B juga bersifat polar. Apabila digunakan eluen yang bersifat non polar seperti kloroform, maka rhodamin B tidak akan terelusi. Selain itu, eluent tersebut dipilih karena sifatnya lebih polar dari fase diamnya sehingga sampel yang polar tidak terikat kuat pada fase diamnya. Penggunaan eluen ini disesuaikan dengan sifat polar rhodamin B karena memiliki gugus karboksil dengan pasangan elektron bebas dan gugus amina pada struktur molekulnya. Gugus karboksil dan amina ini akan membentuk ikatan hidrogen intermolekular dengan pelarut polar sehingga mudah larut dalam pelarut polar. Oleh karena itu, digunakan campuran eluen polar agar dapat mengelusi rhodamin B dengan baik.

Sebelum mempartisi sampel, eluen terlebih dahulu dijenuhkan dengan tujuan untuk memastikan partikel fasa gerak terdistribusi merata pada seluruh bagian chamber sehingga proses pergerakan spot di atas fasa diam oleh fasa gerak berlangsung optimal, dengan kata lain penjenuhan digunakan untuk mengotimalkan naiknya eluent dan untuk menghindari hasil tailing pada pelat KLT selain itu penjenuhan yang dilakukan bertujuan untuk memudahkan saat elusi sampel. Plat tersebut diberi batas atas dan bawah fungsinya sebagai penanda jarak tempuh eluen. Batas bawah plat dibuat 1 cm agar tidak terendam oleh eluent. Jarak penotolan disesuaikan dengan lebar plat yang tersedia. Penotolan dilakukan pada 3 titik atau lebih, dimana 2 titik untuk ekstrak sampel dan 1 titik untuk larutan standar rhodamin. Plat dimasukkan dengan hati-hati ke

dalam chamber tertutup yang berisi fasa gerak (eluent) dengan posisi fasa gerak berada di bawah garis pada plat. Hasil dari KLT diamati dibawah sinar UV. Pemisahan KLT, dapat dipengaruhi beberapa faktor-faktor seperti struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktifitasnya, tebal dan kerataan zat penyerap, kemurnian pelarut, derajat kejenuhan, teknik percobaan, jumlah cuplikan, temperatur, dan kesetimbangan.