

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pewarna Makanan

Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi untuk tujuan teknologis pada pembuatan, pengolahan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, penyimpanan dan pengangkutan pangan untuk menghasilkan suatu komponen yang mempengaruhi sifat pangan tersebut, baik secara langsung atau tidak langsung (Permenkes, 2012). Salah satu bahan yang termasuk sebagai bahan tambahan pangan yaitu pewarna. Pewarna merupakan BTP yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada pangan yang terdiri dari pewarna alami dan pewarna sintetis (Permenkes, 2012).

Zat pewarna adalah bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki warna makanan yang berubah atau menjadi pucat selama proses pengolahan atau untuk memberi warna pada makanan yang tidak berwarna agar kelihatan lebih menarik. Meskipun nilai gizi makanan merupakan faktor yang amat penting, dalam kenyataannya daya tarik suatu jenis makanan lebih dipengaruhi oleh penampakan, bau dan rasanya. Warna, sebagai salah satu sifat penampakan, merupakan bagian integral dari kehidupan sehari-hari. Pengalaman manusia sejak lahir telah menciptakan kebiasaan-kebiasaan untuk mengasosiasikan makanan tertentu dengan suatu warna yang khas, bahkan seringkali juga warna diasosiasikan dengan kualitas dan sifat-sifat organoleptis (BPOM, 2006).

Penggunaan zat pewarna baik alami maupun buatan sebagai bahan tambahan makanan telah diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 722/MenKes/Per/VI/88 mengenai Bahan Tambahan Makanan. Sedangkan zat warna yang dilarang digunakan dalam pangan tercantum dalam Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 239/MenKes/Per/V/85 mengenai Zat Warna Tertentu yang Dinyatakan sebagai Bahan Berbahaya.

Secara umum bahan pewarna yang sering digunakan dalam makanan olahan terbagi atas pewarna sintetis (buatan) dan pewarna natural (alami). Pewarna sintetis pada umumnya terbuat dari bahan-bahan kimia. Misalnya tartrazin untuk warna kuning, allura red untuk warna merah, dan seterusnya. Terkadang

pengusaha yang nakal juga menggunakan pewarna bukan makanan (non food grade) untuk memberikan warna pada makanan (Nugraheni, 2014).

2.1.1 Pewarna Sintetis

Pewarna sintetis merupakan pewarna yang diperoleh secara kimiawi (Permenkes, 2012). Pewarna buatan atau pewarna sintetis merupakan bahan kimia yang dengan sengaja ditambahkan pada makanan untuk memberikan tambahan warna yang diinginkan karena warna semula hilang selama proses pengolahan atau karena seseorang menginginkan adanya warna tertentu (Susanti, 2016). Bahan pewarna sintetis yang boleh digunakan untuk makanan (food grade) pun harus dibatasi jumlahnya. Karena pada dasarnya, setiap benda sintetis yang masuk ke dalam tubuh kita akan menimbulkan efek (Nugraheni, 2014).

Saat ini pewarna sintetis masih sangat diminati oleh para produsen makanan. Pertama adalah masalah harga, pewarna kimia tersebut dijual dengan harga yang jauh lebih murah dibandingkan dengan pewarna alami. Masalah ini tentu saja sangat diperhatikan oleh produsen, mengingat daya beli masyarakat Indonesia yang masih cukup rendah. Faktor kedua adalah stabilitas. Pewarna sintetis memiliki tingkat stabilitas yang lebih baik, sehingga warnanya tetap cerah meskipun sudah mengalami proses pengolahan dan pemanasan. Sedangkan pewarna alami mudah mengalami degradasi atau pemudaran pada saat diolah dan disimpan (Nugraheni, 2014).

Tabel 2. 1 Daftar Pewarna yang Diizinkan di Indonesia

No.	Bahan Pewarna	No. Indeks Warna	INS
1.	Tatrazin	19140	102
2.	Kuning Kuinolin	47005	104
3.	Kuning FCF.	15985	110
4.	Karmoisin	14720	122
5.	Ponceau	16255	124
6.	Eritrosin	45430	127
7.	Merah allura	16035	129
8.	Indigotin	73015	132
9.	Biru Berlian	42090	133
10.	Hijau FCF	42053	143
11.	Coklat HT	20285	155

(Sumber: Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 033 Tahun 2012)

2.1.2 Pewarna yang Dilarang di Indonesia

Di negara maju, suatu zat pewarna buatan harus melalui berbagai prosedur pengujian sebelum digunakan sebagai pewarna makanan. 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. Pada pembuatan zat pewarna organik sebelum mencapai produk akhir, harus melalui suatu senyawa dulu yang kadang - kadang berbahaya dan sering kali tertinggal dalam hasil akhir, atau terbentuk senyawa-senyawa baru yang berbahaya. Namun sering sekali terjadi penyalahgunaan pemakaian pewarna untuk sembarang bahan pangan, misalnya zat pewarna tekstil dan kulit untuk mewarnai bahan pangan. Bahan tambahan pangan yang ditemukan adalah pewarna yang berbahaya terhadap kesehatan seperti Amaran, Auramin, Methanyl Yellow dan Rhodamin B (Nugraheni, 2014).

Timbulnya penyalahgunaan bahan tersebut disebabkan karena ketidaktahuan masyarakat mengenai zat pewarna untuk pangan, dan juga disebabkan karena harga zat pewarna untuk industri jauh lebih murah dibandingkan dengan harga zat pewarna. Kemajuan teknologi pangan memungkinkan zat pewarna dibuat secara sintetis. Dalam jumlah yang sedikit, suatu zat kimia bisa memberi warna yang stabil pada produk pangan. Pemakaian zat pewarna sintetis dalam makanan dan minuman mempunyai dampak positif bagi produsen dan konsumen, diantaranya dapat membuat suatu makanan lebih menarik, meratakan warna makanan, mengembalikan warna bahan dasar yang hilang selama pengolahan dapat menimbulkan hal-hal yang tidak diinginkan dan bahkan memberikan dampak yang negatif bagi kesehatan konsumen (Nugraheni, 2014).

Tabel 2. 2 Daftar Pewarna yang Dilarang di Indonesia

No.	Bahan Pewarna	Nomor Indeks Warna
1.	Auramine (C.I Basic Yellow 2)	41000
2.	Alkanet	75520
3.	Butter Yellow (C.I. Solvent Yellow 2)	11020
4.	Black 7984 (Food Brown 7)	27755
5.	Burn Unber (Pigmen Brown 7)	77491
6.	Chrysoidine (C.I. Basic Orange 2)	11270
7.	Chrysoine S (C.I. Food Yellow 8)	14270
8.	Citrus Red No. 2	12156
9.	Chocolate Brown FB (Food Brown 2)	-
10.	Fast Red E (C.I. Food Red 4)	16045
11.	Fast Yellow AB (C.I. Food Yellow 2)	13015
12.	Guinea Green B (C.I. Acid Green No.3)	42085
13.	Indanthrene Blue RS (C.I. Food Blue)	69800
14.	Magenta (C.I. Basic Violet 14)	42510
15.	Methanil Yellow (Ext. D&C Yellow No.1)	13065
16.	Oil Orange SS (C.I. Solvent Orange 2)	12100
17.	Oil Orange XO (C.I. Solvent Orange 7)	12140
18.	Oil Orange AB (C.I. Solvent Orange 5)	11380
19.	Oil Orange OB (C.I. Solvent Orange 6)	11390
20.	Orange G (C.I. Food Orange 4)	16230
21.	Orange CGN (C.I. Food Orange 2)	15980
22.	Orange RN (Food Orange 1)	15970
23.	Orchid and Orchein	-
24.	Ponceau 3R (Acid Red 6)	16155
25.	Ponceau SX (C.I. Food Red 1)	14700
26.	Ponceau 6R (C.I. Food Red 8)	16290
27.	Rhodamin B (C.I. Food Red 15)	45170
28.	Sudan I (C.I. Solvent Yellow 14)	12055
29.	Scarlet GN (Food Red 2)	14815
30.	Violet 6B	42620

(Sumber: Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 239/Men.Kes/Per/85)

2.2 Saus Tomat

Tomat (*Solanum lycopersicum* Linn.) merupakan salah satu produk hortikultura yang mudah diperoleh di Indonesia. Tomat (*Solanum lycopersicum* Linn.), merupakan komoditas yang cepat rusak (*perishable*), sehingga memerlukan penanganan yang tepat setelah panen. Menurut Maulida (2010),

kehilangan hasil akibat penanganan pasca panen yang salah dapat mencapai 25%. Pengolahan tomat menjadi berbagai produk pangan menjadi salah satu pilihan untuk mengatasi melimpahnya produksi, misalnya saus tomat. Saus tomat merupakan produk yang dihasilkan dari campuran bubur tomat atau pasta tomat, diperoleh dari tomat yang masak, diolah dengan bumbu-bumbu dan bahan tambahan pangan.

Saus adalah bahan pelengkap makanan yang terbuat dari tomat. Saus merupakan salah satu bahan penyedap dan penambah rasa pada makanan. Saus yang berwarna merah biasanya menggunakan zat pewarna sintetis Rhodamin B yang seharusnya digunakan untuk pewarna tekstil (Giovani *et al*, 2017). Saus merupakan salah satu produk olahan yang sangat populer, umumnya saus berwarna orange hingga merah, dalam pembuatan saus dapat juga ditambahkan zat pewarna makanan alami maupun buatan (zat pewarna untuk makanan), bahan baku saus dapat berasal dari pasta atau tomat, cabai dan pepaya (Adriani & Zarwinda, 2019)

Saus adalah produk berbentuk pasta yang dibuat dari bahan baku buah atau sayuran yang mempunyai aroma serta rasa yang merangsang. Saus yang umum diperjualbelikan di Indonesia adalah saus tomat dan saus cabai, adapula yang membuat saus pepaya, tetapi pepaya hanya digunakan sebagai bahan campuran (Hambali, 2006).

Macam-macam saus, yaitu :

3 Saus Cabe menurut Standar Nasional Indonesia (SNI-01-2976-1992)

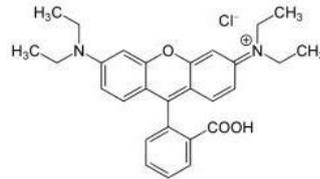
Saus cabai didefinisikan sebagai saus yang diperoleh dari pengolahan cabe (*Capsicum annum*) yang matang dan baik dengan tambahan lain dan digunakan sebagai penyedap makanan. Saus tomat adalah salah satu bentuk olahan yang dipergunakan sebagai bahan penyedap makanan. Saus tomat biasanya menjadi pelengkap hidangan seperti bakso, mie ayam, gorengan, dan masih banyak lagi. Saus tomat merupakan produk yang dihasilkan dari campuran bubur tomat atau pasta tomat, diperoleh dari tomat yang masak, diolah dengan bumbu-bumbu dan bahan tambahan pangan (Wandestri dkk, 2016).

4 Saus Pepaya

Merupakan saus yang bahan dasar pembuatannya adalah buah pepaya yang

masak, dengan bahan pelengkapya adalah gula pasir, garam, cuka dan rempah-rempah sebagai penyedap, saus pepaya berupa bubur halus yang cukup kental dan umumnya berwarna merah segar (Haryoto, 2001).

2.3 Rhodamin B



[9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]
diethylammonium chloride

Gambar 2. 1 Struktur Kimia Rhodamin B

2.3.1 Sifat Fisika & Kimia

Rhodamin B adalah zat warna sintetis berbentuk hablur hijau atau serbuk ungu kemerahan. Nama lain Rhodamin B adalah *D and C Red no 19*, *Food Red 15*, *ADC Rhodamine B*, *Aizen Rhodamine*, dan *Brilliant merah muda*. Rhodamin B sangat mudah larut dalam air, menghasilkan larutan merah, kebiruan dan berfluoresensi kuat jika diencerkan, sangat mudah larut dalam etanol, sukar larut dalam asam encer dan dalam larutan alkali, larut dalam asam kuat, membentuk senyawa dengan kompleks antimon berwarna merah muda yang larut dalam isopropil eter (Ditjen POM, 2014).

2.3.2 Penggunaan

Rhodamin B dalam dunia perdagangan sering dikenal dengan nama *tetraethylrhodamin*, *rheonine B*, *D* dan *Red no. 19*, *C,I*, *Basic violet 10*, *C.I. No. 45179*. Pewarna ini sebenarnya adalah warna untuk kertas, tekstil (Yuliarti, 2007). Rhodamin B digunakan sebagai zat warna untuk kertas, tekstil, wol, sutra, dan sebagai reagensia untuk analisis antimon, kobalt, bismut, dan lain-lain (BPOM, 2008). Rhodamin B adalah salah satu pewarna sintetis yang dilarang digunakan sebagai bahan tambahan pangan. Rhodamin B merupakan zat warna golongan *xanthenes dyes* yang digunakan pada industri tekstil dan kertas, sebagai pewarna kain, kosmetika, produk pembersih mulut, dan sabun. Rhodamin B adalah zat pewarna yang biasa digunakan sebagai bahan pewarna tekstil, cat, kertas atau pakaian (Khan dkk., 2011).

2.3.3 Efek Toksik

Penggunaan jangka pendek dari Rhodamin B pada kulit dapat menyebabkan iritasi. Paparan jangka pendek penggunaan Rhodamin B pada kulit dapat menyebabkan iritasi pada kulit. Rhodamin B dapat berikatan dengan protein dan makromolekul organik sehingga kulit dapat berfungsi sebagai *reservoir* (tempat penyimpanan) dari Rhodamin B. Karena jumlah Rhodamin B yang meningkat pada kulit maka dapat terjadi penyerapan sistemik Rhodamin B (BPOM, 2014).

Rhodamin B mempunyai efek akut dan kronis. Pada efek akut, paparan menyebabkan kerusakan parah pada mata, kontak dengan kulit akan menyebabkan iritasi, dan bila masuk pembuluh darah melalui lesi, abrasi, atau luka akan menyebabkan kerusakan sistemik. Pada efek kronis tampak sifat-sifat karsinogenik dan genotoxin (Najib, 2018).

Rhodamin B dapat menyebabkan iritasi pada saluran pernapasan dan merupakan zat karsinogenik. Dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada hati (BPOM, 2014). Ciri-ciri produk yang mengandung Rhodamin B adalah warnanya cerah mengkilap dan lebih mencolok, terkadang warnanya terlihat tidak homogen (rata), adanya gumpalan warna pada produk, tidak mencantumkan kode, label, merek, informasi kandungan, atau identitas lengkap lainnya (Purniati dkk., 2015).

Pada Rhodamin B sendiri terdapat ikatan dengan klorin (Cl), dimana senyawa klorin ini merupakan senyawa anorganik yang reaktif dan juga berbahaya. Selainterdapat ikatan Rhodamin B dengan Klorin, terdapat juga ikatan konjugasi. Ikatan konjugasi dari Rhodamin B inilah yang menyebabkan Rhodamin B berwarna merah. Penelitian terkait bahaya yang sama antara Rhodamin B dan Klorin membuat adanya kesimpulan bahwa atom Klorin yang ada pada Rhodamin B adalah penyebab terjadinya toksik bila masuk ke dalam tubuh manusia. Atom Cl termasuk golongan hogen, dimana hogen didalam senyawa organik bersifat toksik dan karsinogenik (Masthura, 2019).

Rhodamin B dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui cara inhalasi, kontak pada kulit dan mata, serta tertelan ke dalam saluran pencernaan. (Alsuhendra dan Ridawati, 2013:242). Beberapa dari hasil penelitian uji toksisitas

menunjukkan Rhodamin B memiliki LD50 lebih dari 2000 mg/kg, dan dapat menimbulkan iritasi kuat pada membran mukosa sedangkan pada hewan percobaan tikus ditemukan bahwa dosis lethal LD50 per-oral sebesar 887 mg/kg, dan dosis terendah sebesar 500 mg/kg (Alsuhendra dan Ridawati, 2013:242).

2.4 Metode Analisis Rhodamin B

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk menganalisis Rhodamin B, yaitu :

2.4.1 Reaksi Kimia

Cara reaksi kimia dilakukan dengan cara menambahkan pereaksi-pereaksi HCl pekat, H₂SO₄ pekat, NaOH 10%, dan NH₄OH 10%. Lalu diamati perubahan warna yang terjadi pada masing-masing sampel yang sudah dilakukan pemisahan dari bahan-bahan pengganggu (Cahyadi, 2008).

2.4.2 Kromatografi Kertas

Kromatografi kertas ini ditemukan jauh sebelum kromatografi lapis tipis dan telah dipakai secara relatif dan bertahun-tahun untuk memisahkan zat pewarna makanan maupun pewarna tekstil. Kromatografi kertas memiliki beberapa keuntungan yaitu, metode pemisahan lebih tajam, peralatan yang digunakan lebih sederhana, pekerjaan dapat diulang, hasilnya efektif (Moleong, 2011).

2.4.3 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode kromatografi cair yang paling sederhana. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Untuk meyakinkan identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan lebih dari 1 fase gerak dan jenis semprot. Teknik spiking dengan menggunakan senyawa baku yang telah diketahui sangat direkomendasikan untuk lebih meyakinkan pengambilan keputusan identifikasi senyawa. Kedua, dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dengan KLT. Pertama bercak diukur langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau densitometri. Cara kedua adalah dengan mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak tersebut dengan metode analisis lain, misalkan dengan metode spektrofotometri (Gandjar, 2007).

Analisis kualitatif Rhodamin B dengan menggunakan metode Kromatografi

Lapis Tipis (BPOM, 2000) dengan prinsip membandingkan harga R_f , jika dilihat secara visual berwarna merah jambu dan jika dilihat dibawah sinar UV 254nm berfluoresensi kuning.

2.4.4 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode kromatografi klasik yang masih banyak digunakan. Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam jumlah yang banyak berdasarkan adsorpsi dan partisi. Cara pembuatannya ada dua macam yaitu cara basah dan cara kering (Gritter, et al 1991). Cara ini praktis untuk mengecek atau mengidentifikasi zat warna dalam kemasan yang akan digunakan untuk mengolah makanan secara spesifik. Akan tetapi hasil uji dengan metode tersebut perlu dikonfirmasi lebih lanjut dengan uji yang dikerjakan di laboratorium dengan metoda konvensional (Femia, 2009).

2.4.5 Spektrofotometri Sinar Tampak

Analisis kualitatif dan kuantitatif Rhodamin B dapat dilakukan dengan metode spektrofotometer sinar tampak (BPOM, 2006). Untuk analisis kualitatif Rhodamin B dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak yaitu dengan membandingkan kurva absorbansi yang diukur secara spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 450-750nm (Kenkel, 1994) dan untuk analisis kuantitatif dengan spektrofotometer sinar tampak dengan mengukur absorbansinya kemudian kadar Rhodamin B dalam sampel dapat dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = ax + b$.

2.5 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan campuran atau larutan senyawa kimia dengan absorpsi memilih pada zat penyerap, zat cair dibiarkan mengalir melalui kolom zat penyerap, misalnya kapur, alumina dan sebagainya sehingga penyusunnya terpisah menurut tingkat kepolaran senyawa, pada sebagian senyawa perbedaan tersebut dapat dicirikan oleh adanya perbedaan warna (Sastrohamidjojo, 1991). Berdasarkan sifat instrumen yang digunakan, metode analisis Kromatografi terdiri dari 2 macam yaitu konvensional dan modern. Kromatografi modern adalah teknik pemisahan komponen zat atau zat aktif dari suatu senyawa yang memiliki berat molekul tinggi dengan menggunakan instrumen canggih. Kromatografi konvensional merupakan teknik pemisahan

yang dilakukan dengan cara menggunakan instrumen yang sederhana, diantaranya kromatografi kertas, kromatografi kolom, dan kromatografi lapis tipis (Kemendikbud, 2018).

Kromatografi adalah metode pemisahan secara fisika yang mana komponen-komponen yang dipisahkan terbagi diantara dua fase, yang satu adalah fase diam yang lain adalah fase gerak yang bergerak pada arah tertentu (Gandjar, 2012). Alasan keunggulannya dikarenakan fleksibilitasnya untuk dapat mendeteksi hampir semua senyawa, bahkan beberapa senyawa anorganik (Gandjar, 2007). Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi diantara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya fase 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 fase zat penjerap, seperti halnya menjerap alumina yang diaktifkan, silica gel dan resin penukar ion atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (Depkes RI, 1995).

2.5.1 Kromatografi Kertas

a. Definisi

Kromatografi kertas yaitu kertas mengadsorpsi air dari lingkungan sekitar. Air tersedia dilingkungan dalam bentuk kelembaban dan bertindak sebagai salah satu komponen dalam larutan pengelusi (fase gerak). Air juga bertindak sebagai fase diam. Kromatografi kertas menggunakan sistem “cair-cair”. Kromatografi kertas banyak digunakan untuk keperluan analitis, dan termasuk dalam kelompok kromatografi planar, dimana pemisahannya menggunakan medium pemisah dalam bentuk bidang (umumnya bidang datar) yaitu bentuk kertas (Sastrohamidjojo, 1991).

b. Prinsip

Prinsip kromatografi kertas yaitu metode pemisahan dari substansi menjadi komponen-komponennya yang bergantung pada distribusi suatu senyawa pada dua fase yaitu fase diam dan fase gerak, pelarut bergerak lambat pada kertas, komponen-komponen bergerak pada laju yang berbeda dan campuran dipisahkan

berdasarkan pada perbedaan bercak warna. Berbagai jenis pemisahan dengan kromatografi kertas dilakukan yang dikenal sebagai "analisa kapiler". Metode ini sangat sesuai dengan kromatografi serapan dan kromatografi kertas sebagai perkembangan dari sistem partisi (Suryadarma, 2014).

c. Peralatan

Peralatan yang digunakan pada kromatografi kertas adalah bejana tertutup (chamber tertutup), pinset, penggaris, pipa kapiler, pensil dan gunting. Senyawa-senyawa yang terpisahkan dapat dideteksi pada kertas dan dapat diidentifikasi bahkan komponen-komponen yang terpisahkan dapat diambil dari kertas dengan cara memotong-motong kertas yang kemudian dilarutkan secara terpisah (Kemendikbud, 2018). Salah satu zat padat yang dapat digunakan untuk menyokong fasa tetap yaitu bubuk selulosa.

d. Fase Diam

Analisis pada kromatografi kertas terdiri dari dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Fase diam pada kromatografi kertas adalah kertas serap yang sangat seragam dan fase geraknya adalah pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Kertas terdiri dari serat-serat selulosa yang mengandung "kotoran" tergantung dari jenis kertasnya. Misalnya kotoran yang berupa ion logam (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , dll) dapat mengganggu karena terjadi pertukaran ion.

Kertas yang khusus dibuat untuk kromatografi telah mengalami proses-proses pemurnian, misalnya pencucian dengan HCl dan lain-lain untuk menghilangkan ion-ion logam. Adapula pada pembuatannya, kertas itu serat-serat selulosanya tersusun menurut arah tertentu. Pada kertas kromatografi sering tanda (\rightarrow) untuk menunjukkan arah elusi. Elusi sebaiknya dilakukan menurut arah panah itu (arah serat) supaya diperoleh noda-noda yang lebih nyata.

Kertas kromatografi banyak jenisnya. Aliran pelarut (eluen) pada kertas pada suhu tertentu dipengaruhi oleh kerapatan atau ketebalan kertas. Kertas antara lain mempengaruhi :

1. Baik tidaknya pemisahan
2. Jelas atau tidaknya noda
3. Pembentukan "ekor" noda
4. Kecepatan mengalir pelarutnya

5. Harga Rf

Kertas yang banyak dipakai adalah kertas Whatman. Kertas Whatman No. 4 mempunyai karakteristik mirip seperti no.1, tetapi memberikan efek dua kali lebih cepat. Kertas-kertas yang lebih tebal (Whatman no.3) biasanya digunakan untuk pemisahan jumlah yang lebih besar, karena dapat menempuh lebih banyak “cuplikan” tanpa menaikkan area dari noda mula-mula.

Perbedaan antara jenis-jenis kertas terletak pada :

1. Kerapatan serat-serat
2. Kecepatan mengalir (*flow rate*) larutan elusi
3. Tebal kertas
4. Kehalusan permukaan
5. Cara pembuatan dan pemurnian

Adanya kertas yang dipakai harus didapar (*buffer*) dulu untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Dapar/*buffer* yang biasa dipakai adalah :

1. Sitrat-fosfat pH 8 - 9 untuk barbital
2. Fosfat pH 8 dan borat pH 8

e. Fase Gerak

Larutan elusi pada kromatografi pembagian umumnya terdiri dari 2 fase, yaitu fasa air (*stasioner*) dan fasa pelarut organik (*mobile*). Pemilihan larutan elusi ditentukan oleh banyak faktor, terutama oleh kelarutan zat yang diperiksa dalam pelarut. Perbandingan di atas menentukan harga Rf, makin besar perbedaan nilai tersebut makin baik pemisahan. Kecepatan mengalir larutan elusi juga berpengaruh. Umumnya larutan elusi yang lambat Bergeraknya memberi noda-noda yang jelas. Rf terutama sekali dipengaruhi oleh koefisien pembagian itu, selain itu dipengaruhi oleh temperatur / suhu, tekanan uap / kelembaban udara.

Selama elusi ruang kromatografi harus jenuh uap larutan itu, maka sebelum elusi dimulai harus disediakan waktu untuk menjenuhkan ruangan itu dengan uap larutan elusi. Temperatur selama elusi harus konstan. Karena dalam praktek tidak selalu dapat diadakan pada keadaan-keadaan yang sudah ditentukan, seringkali digunakan zat pembanding untuk membantu identifikasi.

Syarat larutan elusi :

1. Tidak boleh bereaksi dengan zat
2. Harus cukup stabil, sehingga waktu penguraian tidak mengalami perubahan mudah menguap sehingga kertas mudah dikeringkan
3. Viskositas tidak terlalu besar sehingga pengaliran tidak terlalu lama. Sedangkan kecepatan merambat elusi selain tergantung pada viskositas juga tergantung dari mutu kertas, berat jenis dan tegangan permukaan (Kemendikbud, 2018).

Terdapat beberapa jenis fase gerak yang tercantum dalam SNI 01-2895-1992 tentang cara uji pewarna tambahan makanan, yaitu :

1. Larutan elusi I = Campuran n-butanol, asam asetat glasial, air, dengan perbandingan 4:5:1.
2. Larutan elusi II = Campuran iso butanol, etanol, air, dengan perbandingan 3:2:2.
3. Larutan elusi III = Larutan NaCl 2% dalam alkohol 50%.
4. Larutan elusi IV = Campuran etil metil keton, asetat, air dengan perbandingan 7:3:3.
5. Larutan elusi V = Campuran n-butanol, asam asetat glasial, air, dengan perbandingan 4:2:2,4.
6. Larutan elusi VI = Campuran fenol dan air dengan perbandingan 4:1.
7. Larutan elusi VII = Campuran etil metil keton, asetat, piridin, air, dengan perbandingan 11:5:5.
8. Larutan elusi VIII = Campuran etil metil keton, aseton, air, amonia pekat, dengan perbandingan 3,5:1,5
9. Larutan elusi IX = Campuran larutan amonium (5 ml amonia pekat (Bj=0,88) dalam 100 ml air) dengan 2 gram trinatrium sitrat.

2.6 Nilai R_f

Solut pada kromatografi ini dikarakterisasi dengan jarak migrasi solute terhadap jarak ujung fase geraknya. Nilai R_f dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana dalam persamaan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai R_f ini terkait dengan faktor perlambatan. Nilai R_f bukanlah suatu nilai

fisika absolut untuk suatu komponen; meskipun demikian, dengan pengendalian kondisi KLT secara hati-hati, nilai Rf dapat digunakan sebagai cara untuk identifikasi kualitatif. Disebabkan oleh banyaknya variabel yang berpengaruh pada nilai Rf misalnya adanya sedikit perbedaan komposisi fase gerak, suhu, ukuran chamber, lapisan penjerap, dan sifat campuran cara yang harus dilakukan ketika melakukan identifikasi untuk membuktikan adanya suatu komponen/analit yang dituju dalam sampel (Gandjar, 2012).

2.7 Kerangka Konsep

