

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Zat Pewarna

Zat pewarna merupakan bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada makanan. Aneka jenis pewarna ada yang berupa bubuk, pasta atau cairan. Pewarnaan pada makanan pada dasarnya untuk menarik para konsumen agar menjadi lebih berminat dengan suatu produk yang dijual. Selain itu warna dalam bahan pangan dapat menjadi ukuran terhadap mutu. Warna juga dapat digunakan sebagai indikator kesegaran atau kematangan juga menambahkan apabila suatu produk pangan memiliki nilai gizi yang baik, enak dan tekstur yang sangat baik akan tetapi jika memiliki warna yang tidak sedap dipandang akan memberi kesan bahwa produk pangan tersebut telah menyimpang (Fatimah, 2018).

Menurut Peraturan Menteri Kesehatan No. 033 tahun 2012, keberadaan bahan tambahan dalam pangan memang diizinkan untuk jenis dan batas tertentu. Pewarna sintetis (*food grade*) banyak digunakan untuk berbagai jenis makanan, terutama produk jajanan pasar serta berbagai makanan olahan yang dibuat oleh industri kecil atau industri rumah tangga juga ditemukan pada berbagai jenis makanan yang dibuat oleh industri besar (Sahara, 2018).

Bahan pewarna yang sering digunakan dalam makanan olahan yaitu pewarna sintetis (buatan) dan pewarna natural (alami). Pewarna sintetis terbuat dari bahan kimia tartrazin untuk warna kuning atau alleura red untuk warna merah, namun pengusaha yang nakal menggunakan pewarna buatan untuk memberikan warna pada makanan agar mendapatkan keuntungan, produsen sering menggunakan pewarna tekstil untuk makanan. Salah satunya yaitu menggunakan Rhodamin B pewarna tekstil untuk mewarnai terasi, kerupuk dan minuman sirup, sedangkan pewarna tersebut dilarang keras karena bisa menimbulkan kanker dan penyakit lainnya. Pewarna sintetis yang boleh digunakan untuk makanan harus dibatasi penggunaannya, karena pada

dasarnya setiap senyawa sintetis yang masuk ke dalam tubuh akan menimbulkan efek (La Ifu, 2016).

2.1.1 Macam-Macam Zat Pewarna Makanan

Berdasarkan sumbernya dibagi menjadi dua jenis zat pewarna yang termasuk dalam golongan bahan tambahan makanan, yaitu bahan pewarna alami dan bahan pewarna sintetis (buatan).

a. Pewarna Alami

Zat warna alami adalah zat warna yang diperoleh dari alam atau tumbuhan baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tradisional zat warna alami diperoleh dengan ekstraksi atau perebusan tanaman. Dapat menurunkan risiko terjadinya kanker prostat dan kanker payudara. Selain itu juga dapat menurunkan oksidasi LDL dan menurunkan penyakit hati dan juga katarak (Farid et al., 2019).

Banyak warna cemerlang yang dimiliki oleh tanaman dan hewan dapat digunakan sebagai pewarna untuk makanan. Beberapa pewarna alami ikut menyumbangkan nilai nutrisi (karotenoid, riboflavin, dan kobalamin) merupakan bumbu (kunir dan paprika) atau pemberi rasa caramel ke bahan olahannya (Rahmah, 2019). Pewarna alami lebih aman untuk kesehatan dibandingkan dengan pewarna sintetis. Zat warna alami terdapat pada sayur-sayuran yang sering dikonsumsi, dapat dimanfaatkan untuk mewarnai makanan. Zat warna alami yang terdapat sayur-sayuran dapat memberi warna pada makanan yaitu: klorofil (zat hijau daun terdapat pada daun pandan dan daun suji), karotenoid (pigmen warna kuning, merah orange terdapat pada kunyit dan wortel), antosianin (warna merah, biru dan ungu terdapat pada buah anggur, ubi ungu dan Bunga rosella (Putri et al., 2017). Bahan pewarna alami yang diizinkan di Indonesia terdapat dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 033 Tahun 2012 Tentang Bahan Tambahan Pangan yang ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Bahan Tambahan Pangan Pewarna Alami

NO	Nama BTP Pewarna Alami (<i>Natural Color</i>)	INS
1.	Kurkumin CI.No 75300 (<i>Curcumin</i>)	101 (i)
2.	Riboflavin (<i>Riboflavins</i>):	
	Riboflavin (Sintetik) (<i>Riboflavin Synthetic</i>)	101 (i)
	Riboflavin5'-Natrium Fosfat <i>Riboflavin5'-Phosphate sodium</i>)	101 (i)
3.	Karmin dan ekstrak cochineal CI. No. 75470 (<i>Carmines and cochineal extract</i>):	
	Karmin CI. No 75740 (<i>Carmines</i>)	120
	Ekstrak cochineal No. 75470 (<i>Cochineal extract</i>)	120
4.	Klorofil CI. No 75810 (<i>Chlorophyll</i>)	140
5.	Klorofil dan klorofilin tembaga kompleks sci. No. 75810 (<i>Chlorophyll and chlorophyllins, copper complexes</i>)	141
6.	Karamel 1 (Caramel 1-plain)	150a
7.	Karamel 111 amonia proses (<i>Caramel 111-ammonia process</i>)	150c
8.	Karamel IV amonia sulfit proses (<i>Caramel IV-sulphite ammonia process</i>)	150d
9.	Karbon tanaman CI. 77266 (<i>Vegetable carbon</i>)	153
10.	Beta-karoten (sayuran) CI. No. 75130 (<i>Carotenes,beta(vegetables)</i>)	160a (ii)
11.	Ekstrak anato CI. No 75120 (berbasisbixin) (<i>annattoextracts,bixin based</i>)	160b (ii)
12.	Karotenoid (<i>Carotenoids</i>):	
	Beta-karoten (sintetik) CI. No 40800 (<i>beta-Carotenes,synthetic</i>)	160a (i)
	Beta-karoten dari <i>Blakeslea trispora</i> (<i>beta-Carotenes(Blakeslea Trispora)</i>)	160a (ii)
	Beta-apo-8'-Karotenal CI. No 40825 (<i>beta-apo-8'-Carotenoicacid ethyl ester</i>)	160f
13.	Merah bit (<i>Beet red</i>)	162
14.	Antosianin (<i>anthocyanins</i>)	163
15.	Titanium dioksida CI. No. 77891 (<i>titanium dioxide</i>)	171

Sumber: Permenkes Nomor 033 Tahun 2012 Tentang Bahan Tambahan Pangan

b. Pewarna Sintetis (buatan)

Pewarna sintetis untuk bahan tambahan pangan yang dibuat secara kimia oleh pabrik industri kimia. Bahan pewarna ini dijual di pasaran dengan tanda khusus pada label atau kemasannya, yaitu tulisan FD&C (Food, Drugs, Cosmetic). Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 33 Tahun 2012 menyatakan bahwa Bahan Tambahan Pangan (BTP) merupakan bahan yang ditambahkan dalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan. Peraturan tersebut juga menyatakan bahwa rhodamin B merupakan Bahan Tambahan Pangan yang dilarang penggunaannya dalam makanan (Mamay and Gunawan, 2017).

Penyalahgunaan zat sintetis yang sering terjadi adalah penggunaan bahan tambahan makanan baik pewarna, penyedap rasa, aroma, antioksidan, pemanis, pengawet dan pengental. Rhodamin B merupakan salah satu jenis zat aditif yang digunakan sebagai pewarna dalam industri tekstil, namun masyarakat menggunakannya sebagai pewarna makanan. Jenis pewarna sebagai Bahan Tambahan Pangan (BTP) yang memberikan kesan warna merah selain 15 jenis pewarna alami terdapat 11 jenis pewarna sintetis yang diizinkan untuk digunakan. Pewarna sintetis yang paling sering digunakan dalam produk snack atau minuman yaitu Karmoisin CI. No. 14620 dapat memberikan warna merah hingga maroon, Merah allura CI. No 16035 memberikan warna merah kekuningan hingga merah oranye, Eritrosin CI. No. 45430 dapat memberikan warna merah cherry pink (Amelia and Zairinayati, 2021).

Ciri-ciri pangan yang mengandung zat warna sintetis yang dilarang yaitu warnanya cerah mengkilap dan lebih mencolok, terkadang warna terlihat tidak rata, ada gumpalan warna pada produk dan bila dikonsumsi rasanya sedikit lebih pahit. Biasanya produk pangan yang mengandung zat warna sintetis yang dilarang tidak mencantumkan kode, label, merek, atau identitas lengkap lainnya (Adriani and Zarwinda, 2019). Menurut

Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 33 Tahun 2012 yang mencantumkan daftar pewarna yang diizinkan untuk ditambahkan ke dalam bahan pangan dalam jumlah secukupnya Tabel 2.2.

Tabel 2. 2 Bahan Pewarna Sintetis yang Diizinkan di Indonesia

Pewarna	Nomor Indeks Warna (C.I.No.)
Tartrazin (Tartrazine)	19140
Kuning kuinolin (Quinoline yellow)	47005
Kuning FCF (Sunset yellow FCF)	15985
Karmoisin (carmoisine)	14720
Ponceau 4R (Ponceau 4R)	16255
Eritrosin (Erythrosine)	45430
Merah Allura (Allura red)	16035
Indigotin (Indigotine)	73015
Biru berlian FCF (Brilliant blue FCF)	42090
Hijau FCF (Fast green FCF)	42053
Coklat HT (Brown HT)	20285

Sumber: Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 033 tahun 2012.

Selain itu ada juga bahan pewarna sintetis yang tidak diizinkan. Jenis pewarna makanan yang sering dilarang digunakan dan dilarang oleh BPOM berdasarkan Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Pangan Nomor : 00386/C/SK/II/90 tentang perubahan lampiran Peraturan Menteri Kesehatan Nomor : 239/Menkes/Per/V/85 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya ditetapkan beberapa bahan pewarna sintetis yang dilarang untuk ditambahkan pada pangan, yaitu Auramin, Ponceau 3R dan Rhodamin B untuk pewarna merah atau orange dan Methanyl Yellow untuk pewarna Kuning (Pamungkas and Nopiyanti, 2016). Bahan pewarna sintetis yang tidak diizinkan di Indonesia terdapat dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 239/MenKes/Per/V/85 yang ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2. 3 Bahan Pewarna Sintetis yang Tidak Diizinkan di Indonesia

Pewarna	Nomor Indeks Warna
Auramine (C.I. Basic Yellow 2)	41000
Alkanet	75520
Butter Yellow (C.I Solvent Yellow 2)	11020
Black 7984 (Food Black 2)	27755
Burn Unber (Pigment Brown 7)	77491
Chrysoidine (C.I Basic Orange 2)	11270
Chrysoine (C.I Food Yellow 8)	14270
Citrus Red No. 2	12156
Chocolate Brown FB (Food Brown 2)	-
Fast Red E (C.I Food Red 4)	16045
Fast Yellow AB (C.I Food Yellow 2)	13015
Guinea Green B (C.I Acid Green No. 3)	42085
Indanthrene Blue RS (C.I Food Blue)	69800
Magenta (C.I Basic Violet 14)	42510
Metanil Yellow (Ext. D&C Yellow No. 1)	13065
Oil Orange SS (C.I Solvent Orange 2)	12100
Oil Orange XO (C.I Solvent Orange 7)	12140
Oil Yellow AB (C.I Solvent Yellow 5)	11380
Oil Yellow OB (C.I Solvent Yellow 6)	11390
Orange G (C.I Food Orange 4)	16230
Orange GGN (C.I Food Orange 2)	15980
Orange RN (Food Orange 1)	15970
Orchid and Orcein	-
Ponceau 3R (Acid Red 6)	16155
Ponceau SX (C.I Food Red 1)	14700
Ponceau 6R (C.I Food Red 8)	16290
Rhodamin B (C.I Food Red 15)	45170
Sudan I (C.I Solvent Yellow 14)	12055
Scarlet GN (Food Red 2)	14815
Violet 6 B	42640

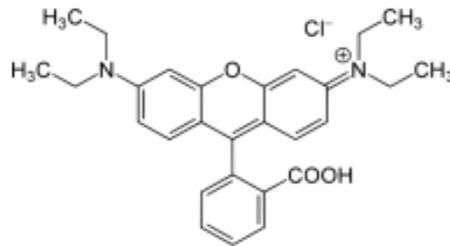
Sumber: Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 239/Menkes/Per/V/85

2.2 Rhodamin B

2.2.1 Pengertian Rhodamin B

Rhodamin B adalah pewarna yang dipakai untuk industri cat, tekstil dan kertas. Rhodamin B merupakan zat warna sintetis berbentuk serbuk kristal, tidak berbau, berwarna merah keunguan, dalam bentuk larutan berwarna merah terang berpendar (berfluoresensi). Rhodamin B ini dapat menyebabkan iritasi pada saluran pernapasan dan merupakan zat karsinogenik (dapat menyebabkan kanker). Rhodamin B dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada hati (Saputri et al., 2018).

Rumus molekul dari Rhodamin B yaitu $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ dengan berat molekul sebesar 479.000. Sangat larut dalam air yang akan menghasilkan warna merah kebiru-biruan dan berfluoresensi kuat. Rhodamin B juga merupakan zat yang larut dalam alkohol, HCl dan NaOH selain dalam air (Saputra, 2020).



Gambar 2. 1 Struktur Rhodamin B

Keterangan gambar :

Nama Kimia	: N-[9-(<i>carboxyphenyl</i>)-6-(<i>diethylamino</i>)-3H-xanten-3-ylidene]-N-ethylethanaminium clorida
Nama Lazim	: <i>tetraethylrhodamine</i> ; D&C Red No. 19; <i>Rhodamin Bclorida</i> ; C.I Basic Violet 10; C.I 45170
Rumus Kimia	: $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$
BM	: 479



Gambar 2. 2 Serbuk Rhodamin B

2.2.2 Efek Rhodamin B Terhadap Kesehatan

Penggunaan Rhodamin B pada produk makanan dalam jangka panjang akan mengakibatkan kanker dan gangguan fungsi hati. Kandungan klorin (Cl) pada Rhodamin B merupakan senyawa halogen yang tidak hanya berbahaya tetapi juga reaktif. Jika klorin (Cl) tertelan di dalam tubuh akan membuat senyawa tersebut berusaha mendapatkan kestabilan dalam tubuh meski harus dengan mengikat senyawa lain yang berada di dalam tubuh sehingga kehadirannya menjadi racun bagi tubuh. Senyawa lain yang diikat tersebut tidak lagi berfungsi dengan baik sehingga kinerja tubuh tidak lagi optimal. Jika terpapar Rhodamin B dalam jumlah besar maka akan terjadi gejala keracunan Rhodamin B. Jika Rhodamin B masuk ke dalam tubuh melalui makanan akan mengakibatkan terjadinya iritasi pada saluran pencernaan dan akan mengakibatkan gejala keracunan dengan mengeluarkan urine yang berwarna merah atau merah muda. Jika Rhodamin B masuk melalui pernapasan maka akan terjadi iritasi pada saluran pernapasan. Jika Rhodamin B terkena mata akan menimbulkan iritasi yang ditandai dengan mata kemerahan dan timbunan cairan atau edema pada mata. Jika Rhodamin B terpapar pada bibir maka akan menyebabkan bibir menjadi pecah-pecah, kering dan gatal bahkan dapat menyebabkan kulit bibir terkelupas (Anggraini, 2019).

Bahaya yang timbul akibat mengonsumsi makanan yang mengandung zat pewarna sintetis tidak dapat secara langsung. Gangguan akan terasa dalam waktu lama setelah 10 atau 20 tahun. Berdasarkan penelitian telah dibuktikan bahwa zat pewarna sintetis bersifat racun bagi manusia sehingga dapat membahayakan kesehatan konsumen dan senyawanya dapat bersifat karsinogenik. Tanda-tanda dan gejala akut apabila terpapar Rhodamin B yaitu jika terhirup dapat menimbulkan iritasi pada saluran pernafasan, jika terkena kulit dapat menimbulkan iritasi pada kulit, iritasi pada mata kemerahan, udem pada kelopak mata, dan jika tertelan dapat menimbulkan gejala keracunan dan air seni berwarna merah dan merah muda (Tjiptaningdyah and Sucahyo, 2017).

2.2.3 Jalur Masuk Rhodamin B ke dalam Tubuh

Ada beberapa macam jalan/route of entry dari Rhodamin B ke dalam tubuh manusia, diantaranya :

- a. Alur masuk Rhodamin B melalui inhalasi/terhirup :
 1. Rhodamin B terhirup masuk melalui saluran pernapasan.
 2. Rhodamin B terakumulasi di alveoli-alveolus, menghalangi difusi oksigen ke dalam darah.
 3. Rhodamin B yang terakumulasi akan menyebabkan inflamasi pada dinding alveoli, hal ini karena radikal bebas yang terkandung dalam senyawa Rhodamin B mengganggu sirkulasi oksigen dan nutrisi ke dalam sel-sel, dan selanjutnya mengakibatkan iskemik pada sel tersebut. Iskemik yang berkelanjutan akan menjadi infark, dan berujung pada nekrosis. Respon terhadap Rhodamin B pada rute ini termasuk respon akut.
- b. Alur masuk Rhodamin B melalui dermal/kulit:

Rhodamin B menempel di permukaan kulit, namun tidak akan terserap, hanya menimbulkan iritasi.
- c. Alur masuk Rhodamin B melalui oral/makanan dan minuman:
 1. Rhodamin B masuk melalui makanan dan minuman lewat mulut
 2. Rhodamin B masuk ke lambung mulai terjadi penyerapan
 3. Penyerapan secara maksimal terjadi di usus halus
 4. Setelah diserap di usus halus, Rhodamin B ikut terbawa bersama nutrisi-nutrisi makanan ke hepar melalui vena porta
 5. Dalam vena porta, hepar berusaha melakukan detoksifikasi Rhodamin B dengan bantuan sel kupffer yang memang berguna untuk memfagosit senyawa-senyawa asing (Saputra, 2020).

2.3 Arum Manis

Arum manis adalah jenis pangan yang dibuat dari gula yang diberi pewarna makanan. Yang dibuat dengan menggunakan mesin modern. Makanan ini sudah

ada sejak lama sehingga anak-anak sampai orang dewasa suka mengonsumsinya juga bentuknya unik, warna yang beraneka ragam dan harga yang terjangkau (Ananda, 2020).

Arum manis terasa manis dan lengket, meskipun bentuknya seperti benang wol tetapi dapat segera mencair ketika dimasukkan ke dalam mulut dan juga dapat berubah menjadi lengket bila terkena uap air karena gulanya bersifat higroskopis dan mempunyai ruang permukaan yang sangat luas. Arum manis akan menjadi makin keras, kasar dan biasanya tidak begitu halus lagi setelah terpapar atmosfer. Dalam iklim yang lembab arum manis harus segera dimakan dalam beberapa jam jika tidak maka akan mengeras. Sebagian besar arum manis terdiri dari udara sehingga hasilnya sering kali mengembang. Sebuah kerucut arum manis biasanya mencapai ukuran sebesar bola basket atau ada yang memanjang. Arum manis biasanya ramai dijual di pasar malam atau sirkus. Warna arum manis yang paling populer adalah merah muda (Saputra, 2020).

Pada jajanan arum manis juga bisa dilakukan analisis kandungan pemanis sakarin. Menurut penelitian Atik Setyani (2016) menyatakan bahwa arum manis yang dijual di alun-alun Kota Boyolali dari tiga sumber penjual dinyatakan positif mengandung pemanis sakarin. Penggunaan sakarin harus dibatasi karena dapat membahayakan kesehatan. Penggunaan sakarin dalam dosis tinggi dapat memicu terjadinya tumor kandung kemih. Selain itu, secara khusus mengonsumsi sakarin dapat menimbulkan dermatologis bagi anak-anak yang mempunyai alergi terhadap sulfamat dan akan memicu timbulnya tumor bersifat karsinogenik.

Penelitian pemanis pada arum manis lainnya yaitu natrium siklamat. Menurut penelitian Santi dan Retno (2013) menyatakan bahwa arum manis yang dijual di SDN Pucang I dan Pucang IV Sidoarjo tidak ditemukan adanya pemanis natrium siklamat. Kadar natrium siklamat yang didapat yaitu 0,00 ppm. Meskipun tidak ada kandungan pemanis natrium siklamat pada arum manis, tetapi masih harus diperhatikan lagi untuk penambahan pemanis dalam makanan. Natrium siklamat merupakan pemanis yang hanya boleh digunakan

dalam pangan khusus untuk orang yang menderita diabetes melitus atau sedang menjalani diet rendah kalori. Batas maksimum dalam penggunaan natrium siklamat yaitu 500 mg – 3 g/kg. Dan hanya boleh digunakan untuk pangan rendah kalori dan dibatasi tingkat konsumsinya sebesar 0,5 mg/kg berat badan/hari.

Menurut penelitian Abdullah Al Tamimi, dkk (2020), analisis pewarna makanan pada arum manis dapat dilakukan dengan menggunakan metode sederhana yaitu dengan kromatografi cair/spektrometri massa tandem. Dengan metode ini dapat mendeteksi dan menghitung secara simultan 15 pewarna terlarang. Metode yang baru dikembangkan telah divalidasi menggunakan kriteria yang ditentukan oleh ISO/IEC 17025:2005. Prosedur persiapan sampel pada metode ini hanya membutuhkan 1 gram bahan dan telah terbukti memiliki pemulihan yang sangat baik.



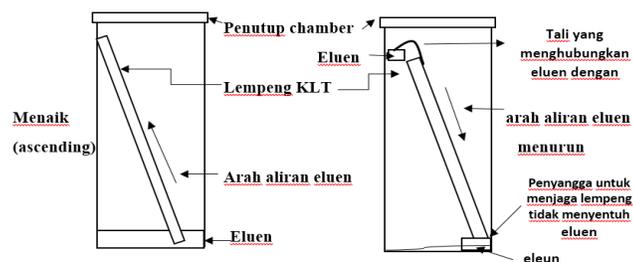
Gambar 2. 3 Arum Manis

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan campuran senyawa yang menggunakan fase diam dan fase gerak serta dimanfaatkan dalam melakukan analisis (kualitatif, kuantitatif dan preparatif). Terdapat beberapa jenis metode Kromatografi salah satunya adalah Kromatografi Lapis Tipis. Kromatografi Lapis Tipis merupakan Kromatografi planar. Pada Kromatografi Lapis Tipis terdapat sistem fase diam dan fase gerak (Gandjar and Rohman, 2018; Lero, 2021).

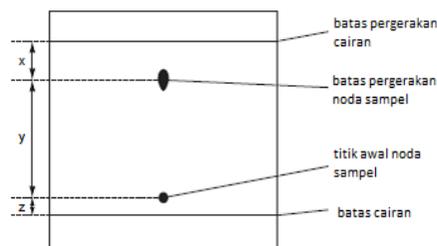
Kromatografi Lapis Tipis atau KLT (*Thin Layer Chromatography* atau TLC) adalah suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara cepat dan sederhana. Metode ini termasuk dalam kromatografi cair-padat. Prinsip dari KLT yaitu pemisahan pada KLT didasarkan atas adsorpsi senyawa-senyawa oleh fasa diam dan fasa gerak. Pemisahan dapat terjadi akibat perbedaan kepolaran antara senyawa-senyawa dalam campuran dengan fasa diam dan fasa gerak. Perbedaan kepolaran ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan yang diamati melalui tampaknya bercak atau noda dengan nilai R_f yang berbeda berdasarkan kecepatan migrasi tiap senyawa. Manfaat kromatografi lapis tipis yaitu sederhana, mudah dan murah, selain itu digunakan untuk preparatif dan kualitatif (Leba, 2019).

Fase diam berupa lapisan yang terdapat pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium atau plat plastik. Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa. Fase gerak dikenal sebagai pelarut pengembang yang bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*) atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gambar 2.4). Fase gerak atau eluen pada KLT berupa pelarut tunggal dan campuran pelarut dengan perbandingan tertentu. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang tinggi (Gandjar and Rohman, 2018; Lero, 2021).

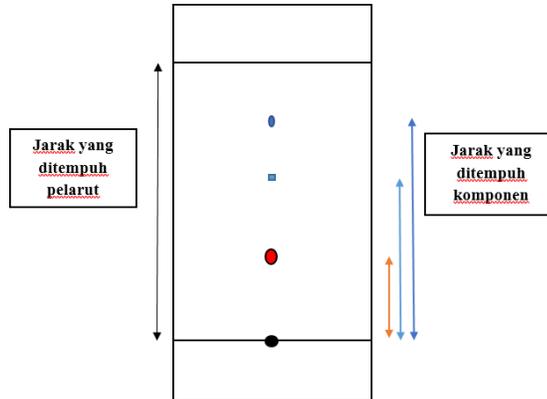


Gambar 2. 4 Pengembangan menaik (*ascending*) dan menurun (*descending*)

Jarak rambat senyawa pada kromatogram dinyatakan dengan nilai R_f (*retardation factor*) (Gambar 2.5). Nilai R_f diperoleh dengan mengukur jarak yang ditempuh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut (Gambar 2.6). Nilai R_f dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Bila identifikasi nilai R_f memiliki nilai yang sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama. Senyawa yang mempunyai harga R_f lebih besar berarti mempunyai kepolaran lebih rendah, begitu juga sebaliknya. Hal ini dikarenakan fasa diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar tertahan kuat pada fasa diam sehingga menghasilkan nilai R_f yang rendah (Ananda, 2020). Selain itu, bercak yang dihasilkan pada proses KLT dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu kelebihan jumlah sampel yang ditotolkan, penguapan fase gerak selama pengembangan, kehadiran substansi lain dan perubahan temperature (Ratnaningtyas, 2013). Bercak/noda pada proses KLT, diamati secara visual dan di bawah sinar UV. Jika secara visual noda berwarna merah jambu dan dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm berfluoresensi kuning atau orange, hal ini menunjukkan adanya Rhodamin B (Dawile et al., 2013). Ada beberapa hal yang mempengaruhi nilai R_f dalam kromatografi lapis tipis, yaitu: struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan, sifat fase diam, tebal lapisan fase diam, kemurnian fase gerak dan kejenuhan uap dari fase gerak dalam wadah yang digunakan (Leba, 2019).



Gambar 2. 5 Jarak rambat senyawa pada kromatogram



Gambar 2. 6 Penentuan untuk perhitungan nilai Rf

Pada penelitian ini, fase gerak yang digunakan adalah N-butanol : etil asetat : ammonia (10:4:5). Hal ini karena etil asetat dan ammonia bersifat polar sedangkan N-butanol bersifat semipolar. Penggunaan eluen ini disesuaikan dengan sifat Rhodamin B yang polar karena Rhodamin B memiliki gugus karboksil dengan pasangan elektron bebas dan gugus amina pada struktur molekulnya. Gugus amina dan karboksil akan membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut polar sehingga mudah larut dan dapat melulusi Rhodamin B dengan sempurna (Nafiq et al., 2020).