# BAB IITINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Bumbu Tabur

### 2.1.1 Pengertian Bumbu Tabur

Bumbu tabur (*seasoning powder)* bumbu perasa yang fungsinya untuk memberikan rasa pelezat pada makanan atau jajanan. Rasa dan warna pada bumbu tabur bermacam-macam jenisnya menambah daya tarik tersendiri. Bumbu tabur dengan penambahan serbuk dilakukan dalam upaya peningkatan kualitas bumbu tabur. Bumbu tabur yang meliputi rasa, warna, tekstur, aroma, dan keseluruhan. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui kadar protein dari bumbu tabur, sehingga terciptalah bumbu tabur sehat, gurih dan pedas untuk keluarga yang kaya akan sumber protein (Oktavianti & Putri, 2021).

Komposisi bahan yang digunakan dalam pembuatan bumbu tabur, antara lain:

1. Cabai merah bubuk

Cabai merupakan salah satu bahan yang dapat digunakan dalam bentuk segar maupun dalam bentuk kering. Capsaicin yang merupakan kandungan utama penyebab rasa pedas pada cabai. Cabai dapat diolah menjadi berbagai macam bentuk seperti cabai giling, saus cabai sebagai perasa pada makanan. Bubuk cabai merupakan produk yang berbentuk bubuk praktis dalam penyimpanan dan memiliki daya simpan yang lama. Kandungan lain dari cabai merah yaitu likopen, dimana likopen yang menyebabkan warnah merah cabai sangat mencolok (Oktavianti, 2021).

1. Garam

Garam merupakan salah satu bumbu dapur yang selalu digunakan untuk memberi rasa pada makanan saat memasak. Garam berfungsi untuk memperkuat aroma, menyeimbangkan rasa makanan, garam juga dapat membuat tekstur makanan menjadi lebih lembut dan ringan (manurung, 2023 ).

1. Lada

Lada merupakan tumbuhan yang merambat yang hidup pada iklim tropis. Biji lada sering dimanfaatkan sabagai bumbu masakan dan kaya akan kandungan kimia seperti minyak lada, minyak lemak (Sulhatun, 2013).

1. Gula Pasir

Gula atau sukrosa (C22H22O11) merupakan suatu karbohidrat sederhana karena dapat larut dalam air dan langsung di serap tubuh untuk menghasilkan energi. Gula banyak digunakan dalam berbagai industri pangan. Penggunaan gula dalam bahan pangan dimaksudkan untuk menambah cita rasa bahan pangan tersebut (Ramandhani,2022).

## 2.2 BahanTambahan Pangan (BTP)

Bahan tambahan pangan adalah bahan yang ditambah dan dicampurkan sewaktu pengolahan makanan untuk meningkatkan mutu. Termasuk didalamnya adalah pewarna, penyedap rasa dan aroma, pemantap, antioksidan, pengawet, pengemulsi, antikempal, pemucat dan pengental.

Pangan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati dan air, baik yang diolah maupun yang tidak diolah yang diperuntukkan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk bahan pangan, bahan baku dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan dan atau pembuatan makanan dan minuman (Setyawati, 2023).

Bahan tambahan pangan bahan yang bukan merupakan bahan utama tetapi sengaja ditambahkan untuk menambah kualitas pangan itu sendiri. Bahan tambahan pangan terdiri dari bahan sintetis dan alami. Bahan tambahan sintetis diantaranya pewarna, pemanis, pengawet, penyedap, antioksidan, penambah aroma dan pengatur keasaman, sementara yang berasal dari bahan alami diantaranya dari tumbuhan, pemanis dari gula, pengawet dari garam, penyedap dari garam dan cabe dan pemberi aroma dari daun jeruk (Cahyadi, 2012).

Secara khusus penggunaan BTP didalam pangan adalah :

1. Mengawetkan pangan dengan mencegah pertumbuhan mikroba perusak pangan atau mencegah terjadinya reaksi kimia yang dapat menurunkan pangan.
2. Membentuk pangan menjadi lebih baik, renyah dan lebih enak dimulut.
3. Memberikan warna dan aroma yang lebih menarik sehingga menambah selera
4. Meningkatkan kualitas pangan.

Bahan tambahan pangan harus memenuhi persyaratan :

1. Tidak dimaksudkan untuk dikonsumsi secara langsung dan tidak sebagai bahan baku pangan.
2. Mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi, yang sengaja ditambahkan kedalam pangan untuk tujuan teknologi pada pembuatan, pengolohan, perlakuan, pengepakan, pengemasan, penyimpanan dan atau pengangkutan pangan untuk mempengaruhi sifat pangan tersebut baik secara langsung maupun tidak langsung.
3. Bahan Tambahan pangan tidak termasuk cemaran atau bahan yang ditambahkan kedalam pangan untuk mempertahankan dan meningkatkan nilai gizi (Rokhmah & Rusmalina, 2023)

Cahyadi 2006 menyatakan pada umumnya bahan tambahan pangan yang digunakan hanya dapat dibenarkan apabila :

1. Dimaksudkan untuk mencapai masing-masing tujuan penggunaan dalam pengelolaan
2. Tidak digunakan untuk menyembunyikan penggunaan bahan yang salah atau tidak memenuhi syarat
3. Tidak digunakan untuk menyembunyikan cara kerja yang bertentangan dengan cara produksi yang baik untuk pangan, dan
4. Tidak menggunakan untuk menyembunyikan kerusakan bahan pangan. Sehingga, dalam penggunaannya harus mempertimbangkan berbagai aturan yang sesuai untuk memberikan rasa aman pada orang lain yang mengkonsumsinya. Bahan tambahan pangan yang sudah diperiksa secara ketat dan aman, memiliki manfaat kesehatan/keamanan,manfaat penyediaan pangan dan keperaktisan (Idealistuti et al., 2022).

### 2.2.1 Pewarna Alami

Pewarna alami adalah zat warna warna yang diperoleh dari alam atau tumbuhan baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tradisional pewarna alami diperoleh dengan ekstraksi atau perebusan tanaman yang ada disekitarnya. Pewarna alami mempunyai efek warna yang indah dan khas yang sulit ditiru pewarna sintetis, sehingga masih banyak orang yang menyukainya dan merupakan pendukung produk produk ekslusif dan bernilai seni tinggi, namun pewarnaan ini melalui proses yang lama sehingga produksinya tidak banyak dalam kurun waktu tertentu.penggunaan pewarna alami memiliki keunggulan dibandingkan pewarna sintetis terutama bagi kesehatan, karena pewarna alami bebas dari unsur logam berat yang dapat membahayakan kesehatan selain itu juga tidak mengandung bahan kimia toksik (bahan beracun). Dalam penerapannya pewarna alami sampai sekarang berbentuk cair, maka untuk mempermudah penggunaan nya dan pengangkutannya dipakai pewarna alami bentuk bubuk (powder) (Paryanto, 2015).

### 2.2.2 Penggolongan Pewarna Alami

Penggolongan pewarna alami dapat dibagi menjadi empat golongan yaitu:

1.Pewarna Mordan (alam)

Kebanyakan pewarna alami tergolongan zat warna alami dapat menempel dengan baik, proses pewarnaannya harus melalui penggabunggan dengan kompleks oksidasi logam membentuk pewarna yang tidak larut.

2.Pewarna Direk

Pewarna ini melekat diserat berdasarkan ikatan hidrogen sehingga ketahanannya rendah.

3.Zat pewarna asam / basa

Zat warna jenis ini mempunyai gugus kombinasi asam dan basa

4.Zat warna bejana

Zat warna ini mewarnai serat melalui proses reduksi oksidasi (redoks) dikenal sebagai pewarna yang paling tua di dunia dengan ketahanan yang paling unggul dibandingkan ke tiga jenis pewarna alami lainnya (Paryanto, 2015)

### 2.2.3 Pewarna Sintetis

Pewarna Rhodami B merupakan zat pewarna sintetis berbentuk serbuk kristal, bewarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, larut dalam air bewarna merah kebiruan sehingga memberikan warna merah muda dan merah.penggunaan zat pewarna sintetis sudah begitu meluas di masyarakat, diperkirakan hampir 90% zat pewarna yang beredar dan sering digunakan adalah pewarna sintetis. Penggunaan zat pewarna sintetis harus dilakukan dengan hati-hati bila terjadi penggunaan yang salah akan sangat berbahaya bagi kesehatan. Penyalahgunaan pemakaian zat pewarna untuk tekstil dipakai untuk mewarna bahan pangan, hal ini sangat jelas berbahaya bagi kesehatan karena adanya residu logam berat pada zat pewarna tersebut (Suwerni et al., 2020).

Pewarna sintetis pada umumnya terbuat dari bahan-bahan kimia misalnya ponceau 4R, Cairmoisin, Briliant Blue, Tartrazin, atau Allura Red. Merupakan pewarna sintetis yang masih di perbolehkan penggunaannya. Kadang kadang pengusaha nakal juga menggunakan pewarna bukan makanan (non-food grade) untuk memberikan warna pada makanan, salah satu contoh pewarna bukan makanan adalah Rhodamin B yang sebenarnya diperuntukan pewarnaan tekstil. Pemakain pewarna sintetis selain memiliki dampak positif bagi produsen serta konsumen, dapat pula menimbulkan dampak negatif terutama bagi konsumen. Apabila dibandingkan dengan pewarna alami, pewarna sintetis lebih memiliki dampak negatif bagi kesehatan. Hal ini dikarenakan zat-zat sintetis jika pemakaian yang terus menerus dan dalam jangka waktu yang lama, akan mempengaruhi organ di dalam tubuh. Penggunaan bahan pewarna buatan yang dilarang dapat menyebabkan gangguan kesehatan. Pewarna yang dilarang dapat meracuni ginjal dan mengakibatkan gangguan fungsi hati maupun kanker karena umumnya pewarna yang dipakai merupakan pewarna tekstil (Handayani, 2018).

Penggunaan zat pemanis sintetik, memberikan rasa manis lebih banyak dibanding dengan pemanis alami dalam takaran kecil seperti tingkat kemanisan kalsium dan natrium pada sakarin memiliki kemanisan 800 kali dibandingkan dengan sukrosa 10%. Pemanis sintetik seperti siklamat berpotensi menyebabkan penyakit kanker, sakarin berpotensi infeksi dan kanker kantong kemih, aspartame berpotensi penyakit gangguan saraf, tumor otak (Amir et al., 2021).

### 2.2.4 Penggunaan Bahan Tambahan Pangan

Peraturan mengenai penggunaan bahan pewarna yang diizinkan dan yang dilarang untuk pangan diatur melalui SK Menteri Kesehatan RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/88 mengenai bahan tambahan. Akan Tetapi meskipun demikian sering terjadi penyalah gunaan pemakaian bahan pewarna berbahaya untuk bahan pangan, misalnya bahan pewarna untuk tekstil dipakai untuk mewarnai bahan pangan, misalnya zat pewarna untuk tekstil dan kulit dipakai untuk mewarnai bahan pangan. Hal ini jelas sangat berbahaya bagi kesehatan karena adanya residu bahan pewarna tersebut. Timbulnya penyalah gunaan bahan pewarna disebabkan oleh ketidak tahuan masyarakat mengenai pewarna untuk pangan, dan juga karena harga bahan pewarna untuk industri relatif jauh lebih murah dibandingkan dengan bahan pewarna untuk pangan. Disamping itu warna dari bahan pewarna tekstil biasanya lebih menarik (Putu Widayanti N. et al., 2019).

### 2.2.5 Tujuan Penggunaan Bahan tambahan

1. Mengawetkan pangan dengan mencegah pertumbuhan mikroba perusak pangan atau mencegah terjadinya reaksi kimia yang dapat menurunkan mutu pangan.
2. Membentuk pangan menjadi lebih baik, renyah dan lebih enak di mulut.
3. Membentuk pangan menjadi lebih baik, renyah dan lebih enak di mulut.
4. Memberikan warna dan aroma yang lebih baik sehingga menambah selera
5. Meningkatkan kualitas pangan
6. Menghemat biaya produsen produk pangan menambahkan BTP degan berbagai tujuan, misalnya membantu proses pengolahan, memperpanjang masa simpan, memperbaiki penampilan dan cita rasa serta pengaturan keseimbangan gizi (Idealistuti et al., 2022)

### 2.2.6 Penggolongan Bahan Tambahan

Adapun penggolongan BTP yang diizinkan digunakan pada pangan menurut peraturan menteri kesehatan RI No.722/Menkes/Per/IX/88 yaitu:

1. Pewarna, yaitu BTP yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada pangan.
2. Pemanis buatan, yaitu BTP yang dapat mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman atau peruaian lain pada pangan yang disebabkan oleh pertumbuhan mikroba.
3. Penyedap rasa dan aroma, menguatkan rasa yaitu BTP yang dapat menambah atau mempertegas rasa aroma.
4. Antikempal, yaitu BTP yang dapat mencegah mengempalnya (mengumpalnya) pangan yang berupa serbuk seperti tepung atau bubuk.

### 2.2.7 Bahan Tambahan Yang Dilarang

Observasi yang dilakukan oleh BPOM menunjukkan ada 4 Jenis bahan berbahaya yang sering ditambahkan pada bahan makanan yaitu Rhodamin B, Methanyl Yellow (pewarna tekstil), formalin dan boraks (Kemenkes, 2011). Hasil penelitian menunjukkan temuan terbesar pada jajanan adalah Rhodamin B (BPOM, 2013).

Adapun bahan tambahan pangan yang dilarang digunakan dalam makanan yaitu:

1. Rhodamin B

Rhodamin B adalah pewarna sintetis bewarna merah keunguan, umumnya digunakan dalam pewarna kertas, tinta dan tekstil. Rhodamin B memberikan dampak buruk bagi kesehatan dan dapat menimbulkam iritasi saluran pernafasan, iritasi kulit, iritasi mata, iritasi saluran pencernaan, gangguan fungsi hati berupa kanker hati dan tumor hati.

1. Formalin

Formalin digunakan sebagai bahan pengawet mayat dan antiseptik untuk membunuh bakteri, mengonsumsi pangan mengandung formalin dapat menyebabkan iritasi dan rasa terbakar pada mulut dan esofagus, nyeri dada, pendarahan gastrointestinal dan gagal ginjal.

1. Boraks

Boraks umumnya digunakan dalam industri kertas, kayu dan antiseptik. Mengkonsumsi pangan yang mengandung boraks dalam waktu yang lama dan banyak dapat menyebabkan gangguan kesehatan, di anataranya kerusakan ginjal, gangguan metabolisme, pencernaan, kejang, pingsan, bahkan dapat menyebabkan kematian.

1. Methanyl yellow

Methanyl yellow merupakan pewarna sintetis bewarna kuning kecoklatan dan biasa digunakan dalam industri tekstil, kertas dan mengkilap sepatu. Dampak negatif yang terjadi akibat mengonsumsi pangan yang mengandung zat methanil yellow dapat berupa iritasi pada tenggorokan (saluran pernafasan), iritasi pada kulit, iritasi pada mata, dan bahaya kanker pada kandungan kemih (sujarwo et al., 2021).

## 2.3 Bahan Tambahan

### 2.3.1 Pewarna

Pewarna makanan digunakan hampir di semua makanan dan minuman olahan yang dikonsumsi banyak orang, terutama makanan anak-anak, mulai dari jajanan, kue, permen, es, minuman, sereal, dan lain-lain sehingga sangat penting bagi kita untuk mengenal pewarna makanan pada makanan olahan tersebut apakah aman dikonsumsi atau tidak. Bahan pewarna makanan terbagi menjadi dua kelompok besar, yakni pewarna makanan alami dan pewarna buatan (sintetis). penggunaan pewarna makanan dan minuman olahan adalah dengan menggunakan pewarna alami yang diperoleh dari tanaman ataupun hewan yang berupa pigmen. Umumnya, pewarna makanan alami tidak cukup stabil terhadap panas,cahaya, dan memiliki warna yang soft atau tidak terang seperti pewarna sintesis. Pewarna alami aman dipergunakan dan tidak menimbulkan efek samping, serta memiliki manfaat untuk meningkatkan kualitas kesehatan (Ngete & Rara, 2020).

### 2.3.2 Pengawet

Pengawet adalah zat yang digunakan untuk mencegah pertumbuhan bakteri pembusuk. Zat pengawet hendaknya tidak bersifat toksik, tidak mempengaruhi warna tekstur, dan rasa makanan. Pengawet umumnya digunakan untuk mengawetkan pangan yang mempunyai sifat mudah rusak. Bahan ini dapat menghambat atau memperlambat proses fermentasi, pengemasan atau peruraian yang disebabkan oleh mikroba. Tetapi tidak jarang produsen menggunakannya pada pangan yang relatif awet dengan tujuan untuk memperpanjang masa simpan atau memperbaiki tekstur. Penggunaan pengawet dalam pangan harus tepat baik jenis maupun dosisnya. Suatu bahan pengawet mungkin efektif untuk mengawetkan pangan tertentu, tetapi tidak efektif untuk mengawetkan pangan lainnya karena pangan mempunyai sifat yang berbeda - beda sehingga mikroba perusak yang akan dihambat pertumbuhan juga berbeda (Tahir et al., 2019).

Pemakaian bahan pengawet di Indonesia telah diatur oleh Kementerian Kesehatan dan proses pengawasannya dilakukan oleh Badan Pengawasan Obat dan Makanan. Dalam kehidupan sehari-hari bahan pengawet sudah digunakan secara umum oleh masyarakat, termasuk dalam pembuatan produk makanan terutama jajanan. Masih banyak produsen pangan yang menggunakan bahan pengawet yang membahayakan kesehatan yang sebenarnya tidak boleh digunakan dalam pengolahan pangan. Bahan pengawet boleh digunakan dalam jumlah yang sedikit atau kadar yang masih masuk dalam batas ambang yang diperbolehkan. Apabila jumlah bahan pengawet yang digunakan melebihi batas ambang dapat memicu gangguan Kesehatan bahkan dapat menyebabkan penyakit (Mahmuda et al., 2023).

Bahan pengawet yang banyak di jual di masyarakat dan digunakan untuk mengawetkan berbagai bahan pangan salah satunya adalah asam benzoat, benzoat ini umumnya terdapat dalam bentuk garam natrium kaliumm benzoat yang sifatnya mudah larut. Benzoat sering digunakan untuk mengawetkan berbagai pangan minuman, seperti sari buah, minuman ringan, saus tomat, saus sambal, selai jeli, manisan, kecap dan lain-lain. Jenis pengawet benzoat merupakan salah satu bahan-bahan yang direkomendasikan oleh Badan POM sesuai dengan Permenkes No 722/ MenKes/Per/ IX/88, untuk digunakan sebagai pengawet, karenya jenis pengawet ini tergolong bersifat halal. Akan tetapi pengawet benzoat ini diindikasikan menimbulkan efek negatif jika dikonsumsi oleh individu tertentuu misalnya yang alergi atau jika digunakan secara berlebihan. Bahan pengawet ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri penghasil toksin (racun), bakteri spora dan bakteri bukan pembusuk, Senyawa ini dapat mempengaruhi rasa (Hayati, 2009).

## 2.4 Rhodamin-B

Rhodamin B adalah salah satu pewarna sintetis yang tidak boleh digunakan pada kosmetik dan makanan. Rhodamin B sangat larut dalam air dan alkohol, sedikit larut dalam asam hidroklorida dan natrium hidroksida. Rhodamin B adalah warna sintetik berbentuk serbuk kristal bewarna hijau, bewarna merah keunguan dalam bentuk terlarut pada konsentrasi rendah. Rhodamin B dapat digunakan untuk pewarna kulit, kapas, wol, serat kulit kayu, nilon, serat asetat, kertas. Rhodamin B merupakan zat warna sintetik yang umum digunakan sebagai pewarna tekstil. Penggunaan Rhodamin B dalam jumlah yang besar maupun berulang-ulang menyebabkan sifat kumulatif yaitu iritasi saluran pernafasan, iritasi kulit, iritasi pada saluran pencernaan, keracuna dan gangguan hati.

Rhodamin B termasuk zat yang apabila diamati dari segi fisiknya cukup mudah untuk dikenal. Bentuk seperti kristal, biasanya bewarna hijau atau ungu kemerahan. Rhodamin tidak berbau serta mudah larut dalam larutan bewarna merah terang berfluorensi, Rhodamin biasa digunakan dalam industri tekstil. Pada awalnya zat ini digunakan sebagai pewarna kain atau pakain. Campuran zat pewarna tersebut akan menghasilkan warna -warna yang menarik.

.



**Gambar 2.1** Struktur Kimia Rhodamin B

Nama Kimia :N-[9-(carboxyphenyl)-(dyetilamino)-3H-Xanten-3-ylidene]N- ethylethanaminium clorida.

Nama Lain : Tetraethylrhodamine, Rhodamin B

Rumus Kimia : C28H31CIN2O3

BM : 479,02

Pemerian : Hablur Hijau atau serbuk ungu kemerahan.

Kelarutan :Sangat mudah larut dalam air, menghasilkan larutan merah kebiruan dan berfluoresensi kuat jika di encerkan. Sangat mudah larut dalam etanol, sukar larut dalam asam encer dan dalam larutan alkali. Larutan dalam asam kuat, membentuk senyawadengan kompleks antimon bewarna merah muda yang larut dalam isopropil eter.

Penggunaan : Sebagai pewarna untuk sutra, katun, wol, nilon, serat asetat, kertas, tinta, dan pernis, sabun, pewarna kayu, bulu, kulit, dan pewarna untuk keramik china. Juga digunakan sebagai pewarna obat dan kosmetik dalam bentuk larutan encer, tablet, kapsul, pasta gigi,sabun, larutan penggeriting rambut, lipstik dan pemerah pipi. Pewarna ini juga digunakan sebagai alat pendeteksian dalam pencemaran air, sebagai pewarna untuk lilin.

Rumus molekul dari Rhodamin B adalah C28H31CIN2O3 dengan berat molekul sebesar 479. Zat yang sngat dilarang penggunaannya dalam makanan, obat-obatan dan kosmetika ini berbentuk kristal hijau atau serbuk ungu kemerah-merahan, 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. Di dalam laboratorium, zat tersebut digunakan sebagai pereaksi untuk identifkasi pb, Bi,Co,AU,Mg, dan Th dan titik leburnya pada suhu 165ºC (Tjiptaningdyah & Bambang Sigit Sucahyo 2016).

Di dalam Rhodamin B sendiri terdapat ikatan dengan klorin (CI) yang dimana senyawa klorin ini merupakan senyawa anorganik yang reaktif dan juga berbahaya reaksi untuk mengikat ion klorin disebut sebagai sintesis zat warna. Selain terdapat ikatan Rhodamin B dengan klorin terdapat juga ikatan konjugsi. Ikatan konjugasi dari Rhodamin B inilah yang dapat menyebabkan Rhodamin B bewarna merah. Ditemukan bahaya yang sama antara Rhodamin B dan klorin yang membuat adanya kesimpulan bahwa klorin yan ada pada Rhodamin B dapat menyebabkan terjadinya efek toksik bila masuk kedalam tubuh manusia. Atom CI termasuk dalam senyawa halogen, dan sifat senyawa halogen yang berada dalam senyawa organi akan menyebabkan toksik dan karsinogenik (Tjiptaningdyah & Bambang Sigit Sucahyo 2016).

Penambahan pewarna pada makanan bertujuan untuk memperbaiki warna makanan yang berubah atau menjadi pucat selama proses pengolahan atau memberi warna pada makanan yang tidak berwarna agar kelihatan lebih menarik. Akan tetapi, sering kali terjadi penyalah gunaan pemakaian zat warna pada makanan, misalnya untuk tekstil dan kulit dipakai untuk mewarnai bahan makanan.Pemerintah Indonesia melalui Peraturan Menteri Kesehatan (Permenkes) No. 239/Menkes/Per/V/1985 menetapkan 30 zat pewarna berbahaya. Rhodamin B termasuk salah satu zat pewarna berbahaya dan dilarang digunakan pada produk pangan. Namun demikian, penyalahgunaan Rhodamin B sebagai zat pewarna pada makanan masih sering terjadi di lapangan dan diberitakan di beberapa media massa.Pada lain pihak, ada yang menyebutkan bahwa peraturan mengenai penggunaan bahan pewarna yang diizinkan dan yang dilarang.

### 2.4.1 Mekanisme Kerja Rhodamin B

Rhodamin B masuk kedalam tubuh dan secara eksentif diabsorbsi oleh traktus gastrointestinal. Rhodamin B tidak dapat di metabolisme di dalam hati. Rhodamin B dapat ditemukan dalam bentuk aslinya di urin atau faces. Dalam struktur Rhodamin B di ketahui mengandung klorin (senyawa halogen), sifat halogen mudah bereaksi atau memiliki reaktivitas yang tinggi maka dengan demikian senyawa tersebut karena merupakan senyawa yang radikal akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara berikatan dengan senyawa-senyawa dalam tubuh manusia sehingga pada akhirnya akan memicu penyakit kanker pada manusia (Irma, 2019).

### 2.4.2 Kegunaan Zat Pewarna Rhodamin B

Rhodamin B adalah zat pewarna sintetik berupa serbuk kristal bewarna hijau atau ungu kemerahan termasuk golongan xhantenes yang digunakan sebagai pewarna tekstil, cat, kertas, atau pakaian. Rhodamin B adalah salah satu zat warna yang biasa dipergunakan dalam bidang industri kertas dan tekstil. Zat tersebut dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan saluran pernafasan serta merupakan zat yang bersifat karsinogenik (dapat menyebabkan kanker), dan menyebabkan kerusakan hati. Rhodamin B zat warna yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya dalam obat, makanan dan kosmetika. Rhodamin B seringkali di salah gunakam untuk pewarna pangan misalnya, sirup, kerupuk dan lain – lain. Namun demikian bila terpapar Rhodamin B dalam jumlah besar maka dalam waktu singkat akan terjadi gejala akut keracunan Rhodamin B. Bila Rhodamin B terhirup akan terjadi iritasi pada saluran pernafasan. Mata yang terkena Rhodamin B juga akan mengalami iritasi yang ditandai dengan mata kemerahan dan timbunan cairan atau udem pada mata. Jika terpapar pada bibir dapat menyebabkan bibir akan pecah -pecah, kering dan gatal dan bahkan kulit bibir bisa terkelupas (Wulandari, 2022).

### 2.4.3 Ciri-ciri Produk Pangan Mengandung Rhodamin B

Warnanya cerah mengkilap dan lebih mencolok, terkadang warna terlihat tidak rata, ada gumpalan warna pada produk, dan bila dikonsumsi rasanya pahit. Biasanya produk pangan yang mengandung zat ini tidak mencantumkan kode, label, merek, atau identitas lengkap lainnya (Widiantara & Hasnelly,2020).

### 2.4.4 Efek Rhodamin

Penggunaan pewarna Rhodamin B dapat merugikan dan membahayakan kesehatan masyarakat. Rhodamin B masuk kedalam tubuh melalui mulut, dalam jangka waktu yang pendek dan jumlah sedikit dapat menyebabkan sakit pada lambung, pusing, dan dapat menyebabkan muntah-muntah. Meskipun di konsumsi sangat kecil lambat akan terjadi penumpukan dalam tubuh. Jika kandungan Rhodamin B di dalam tubuh menumpuk maka akan bereaksi secara kimia dengan hampir semua zat dalam sel sehingga menekan fungsi sel dan menyebabkan kematian sel yang menimbulkan kerusakan pada organ tubuh. penggunaan pewarna Rhodamin B pada makanan dapat menyebabkan kerusakan pada hati (Desnita, n.d).

Rhodamin B mengandung senyawa klorin (CI), senyawa klorin merupakan senyawa halogen yang berbahaya dan juga reaktif. Jika tertelan maka senyawa ini akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara mengikat senyawa lain di dalam tubuh inilah bersifat racun bagi tubuh. Penyebab lain dari Rhodamin B sangat berbahaya karena mengandung senyawa radikal, senyawa radikal adalah senyawa yang tidak stabil. Dalam sruktur Rhodamin B kita ketahui mengandung klorin (senyawa halogen), sifat halogen adalah mudah bereaksi atau memiliki reaktivitas yang tinggi maka dengan demikian senyawa tersebut merupakan senyawa radikal yang akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh yang berkaitan dengan senyawa dalam tubuh sehingga pada akhirnya memicu kanker pada manusia (Desnita, n.d).

### 2.4.5 Tanda-Tanda Keracunan Akut Rhodamin B

Tanda-tanda keracunan akut Rhodamin B, diantaranya yaitu

1. Jika terhirup dapat menimbulkan iritasi pada saluran pernafasan
2. Jika terkena kulit dapat menimbulkan iritasi pada kulit
3. Jika terkena mata dapat menimbulkan iritasi pada mata, mata kemerahan, dan udem pada kelopak mata
4. Jika tertelan dapat menimbulkan gejala keracunan dan air seni bewarna merah atau merah muda (surati, 2015).

### 2.4.6 Bahaya Rhodamin B Bagi Kesehatan

Rhodamin B termasuk karsinogen yang kuat, Efek negatif lainnya adalah menyebabkan gangguan fungsi hati atau bahkan bisa menyebabkan timbulnya kanker hati**,** Rhodamin B menyebabkan terjadinya perubahan sel hati dari normal menjadi nekrosis dan jaringan di sekitarnya mengalami disintegrasi. Kerusakan pada jaringan hati ditandai dengan adanya piknotik sel yang melakukan pinositosis) dan hiperkromatik dari nukleus, degenerasi lemak dan sitolisis dari sitoplasma. Penggunaan Rhodamin B tentunya berbahaya bagi kesehatan. Penumpukan Rhodamin B di lemak dalam jangka waktu yang lama dengan jumlah yang terus menerus bertambah di dalam tubuh, dapat menimbulkan kerusakan pada organ tubuh sampai mengakibatkan kematian (Saputri et al., 2018).

### 2.4.7 Pertolongan Pertama Pada Keracunan Rhodamin B

Adapun beberapa pertolongan pertama pada keracunan Rhodamin B yaitu:

1. Bila terhirup segera di pindahkan korban dari lokasi kejadian, pasang masker berkatup atau pelaratan sejenis untuk melalukan pernafasan buatan
2. Bila terkena kulit segera lepaskan pakaian perhiasan dan sepatu penderita yang terkontaminasi Rhodamin B
3. Cuci kulit dengan sabun dan air mengalir dampai bersih dari rhodamin b selama kurang lebih 15 sampai 20 menit
4. Bila terkena mata, bilas dengan air mengalir, dan mata dikedip-kedipkan sampai dipastikan sisa rhodamin b sudah tidak lagi atau sudah bersih
5. Bila tertelan dan terjadi muntah, letakkan posisi kepala lebih rendah dari pinggul untuk mencegah terjadinya muntahan masuk kedalam saluran pernafasan. bila korban tidak sadar, miringkan kepala ke samping atau kesatu sisi, dan segera hubungi dokter (Juraidah, 2017)

## 2.5 Pengertian Kromatografi

Kromatografi adalah suatu tenik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Istilah kromatografi berasal dari gabungan kata “chroma” (warna) dan “graphein” (menuliskan). Kromatografi dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatf menggunakan dua fase yaitu fase diam (stationer) dan fase gerak (mobile) (Ardianingsih, 2009).

Pemisahan dengan kromatografi dapat dilakukan dengan mudah dan cepat hanya dengan menggunakan peralatan yang relatif sederhana berdasarkan jenis fase gerak dan mekanisme pemisahannya kromatografi dapat dibagi menjadi beberapa jenis kromatografi kertas, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi cair (Ardianingsih, 2009).

### 2.5.1 Jenis – Jenis Kromatografi

1. Kromatografi Kertas

Kromatografi kertas adalah kromatografi paling umum. Kromatografi ini menggunakan kertas sebagai fase diam, pada kertas yang basah berfungsi menarik cairan melewati kertas dan memisahkan campuran. Metode kromatografi kertas digunakan karena pelarut yang dipakai tidak perlu alat alat yang mahal. Dimana hasil- hasil yang lain dapat diperoleh dengan peralatan dan materi - materi sederhana. Dengan metode kromatografi kertas, dapat melakukan percobaan dengan hasil yang baik.

Pemisahan dalam Kromatografi kertas melibatkan prinsip yang sama seperti kromatogarfi lapis tipis, dalam kromatografi kertas bahan uji terdistribusi antara fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam biasanya adalah selembar kertas saring bermutu tinggi. Fase gerak adalah larutan pengembang yang merambat naik pada fase gerak, membawa sampel bersamanya. Komponen sampel akan terpisah bergantung pada kekuatan adsorbsinya pada fasa diam versus kelarutannya pada fase gerak. Ketika sampel bahan kimia bewarna ditotolkan pada kertas saring, pemisahan warna – warna dari sampel akan terjadi ketika ujung kertas dicelupkan kedalam pelarut. Pelarut berdifusi menaiki kertas, melarutkan berbagai molekul dalam sampel sesuai polaritas molekul solut dan pelarut (Fardani, 2023).

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis atau KLT menggunakan material absorben berupa gelas atau pelat plastik. Biasanya plat yang digunakan adalah slika sebagai fase diam sedangkan fase gerak adalah cairan organik. Metode ini sederhana dan cepat untuk mengecek kemurnian dari komponen organik. Kromatografi jenis ini digunakan untuk mendeteksi pestisida atau residunya. Untuk mendeteksi pemisahan campuran dapat dilakukan penyemprotan reagen untuk pemisahannya. Reagen dapat menyebabkan pemisahannya campuran bewarna sehingga jelas atau reagen flouresensi berpendapar yang dilihat di bawah sinar ultra violet.

Prinsip dari Kromatografi Lapis dimana suatu analit bergerak melintasi lapisan fase diam di bawah pengaruh fase gerak, yang bergerak melalui fase diam. semakin polar suatu senyawa fase gerak semakin besar partisi kedalam fase diam gel silika, semakin sedikit waktu yang dibutuhkan fase gerak untuk bergerak menyusuri plat sehingga semakin pendek jarak yang tempuh senyawa tersebut menaiki plat dalam waktu tertentu (syahmani et al., 2017).

1. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan teknik kromatografi yang menggunakan zat penyerap (fase diam) dalam wadah kaca berebentuk buret, fase gerak dituangkan di atas dan menetes di bawah. Dalam kromatografi kolom fase diam ditempatkan dalam kolom yang dilewati fase gerak yang dipengaruhi oleh adanya tekanan gravitasi (syahmani et al., 2017).

Adapun prinsip kromatogarfi kolom yaitu adanya perbedaan absorbansi dari masing masing senyawa campuran yang akan dipisahkan. Senyawa polar lebih kuat diserap dalam gel silika, menyebabkan turun lebih lambat, sedangkan senyawa nonpolar lebih lemah diserap dan bergerak lebih cepat (Emilda & Delfira, 2023).

1. Kromatografi gas

 Kromaografi gas merupakan salah satu teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi pergerakan yang terjadi diantara fase gerak dan fase diam untuk pemisahan senyawa yang berada pada larutan. senyawa gas yang terlarut dalam fase gerak akan melewati kolom partisi yang merupakan fase gerak, akan melewati kolom partisi yang merupakan fase diam (Faricha et al., 2014).

Prinsip kromatografi gas adalah pemisahan campurn senyawa organik menjadi komponen – komponen senyawa sederhana dengan menggunakan gas sebagai fase bergerak yang melewati suatu lapisan serapan (sorben) yang diam (Noprida, 2022).

## 2.6 Kromatografi Lapis Tipis ( KLT )

### 2.6.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (Thin Layer Chromatography / TLC) merupakan teknik kromatografi yang berguna untuk memisahkan senyawa organik. Karena kesederhanaan dan kecepatan, sering digunakan untuk memantau kemajuan reaksi organik dan untuk memeriksa kemurnian produk. Kromatografi lapis tipis teknik kromatografi planar sederhana, hemat biaya, dan mudah dioperasikan yang telah digunakan dilaboratorium dan memiliki aplikasi luas dalam mengidentifikasi kotoran atau keteidakmurnian dalam senyawa.teknik pemisahan dengan KLT memiliki banyak kelebihan, karena KLT merupakan teknik yang sebaguna yang dapat diaplikasikan untuk hampir semua senyawa. Pemisahan dapat dicapai dengan biaya tidak terlalu mahal, yang dihasilkan dari adsorben yang baik dan pelarut yang murni. Pemisahan dapat dicapai dalam waktu yang singkat sehingga memungkinkan KLT merupakan suatu teknik dengan jaminan keberhasilan di dalam pemisahan campuran yang tidak diketahui (Enih & Rosamah, 2019).

### 2.6.2 Prinsip Kromatografi lapis tipis (KLT)

Prinsip dari Kromatografi Lapis dimana suatu analit bergerak melintasi lapisan fase diam di bawah pengaruh fase gerak, yang bergerak melalui fase diam. Semakin polar suatu senyawa fase gerak semakin besar partisi kedalam fase diam gel silika, semakin sedikit waktu yang dibutuhkan fase gerak untuk bergerak menyusuri plat sehingga semakin pendek jarak yang tempuh senyawa tersebut menaiki plat dalam waktu tertentu (syahmani et al., 2017).

### 2.6.3 Kelebihan Kromatografi Lapis Tipis

KLT memiliki lebihan yaitu :

1. Mudah dalam preperasi sampel, sederhana.
2. Biaya operasional relatif murah karena semua komponen sampel dan standar di ujikan dalam waktu yang sama, volume pelarut yang digunakan sedikit, selektif dan sensitif
3. Kromatografi dapa diamati secara visual (syafi’i et al., 2018)

### 2.6.4 Kerugian Kromatografi Lapis Tipis

KLT memeliki kerugian yaitu :

1. Butuh ketekunan dan kesabaran yang ekstra untuk mendapatkan bercak/noda yang diharapkan
2. Butuh sistem trial and eror untuk menentukan sistem eluen yang cocok
3. Memerlukan waktu yang cukup lama jika dilakukan secara tidak tekun (Enih & Rosamah, 2019)

### 2.6.5 Penjerap/Fase diam pada KLT

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupkan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel 10-30 µm. Semakin kecil ukuran rata- rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran untuk fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efesiensi dan resolusinya. Penyerapan yang paling sering digunakan adalah silica dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah adsorpsi dan partisi (Syahmani et al., 2017).

###

### 2.6.6 Fase gerak pada KLT

Dalam kromatografi, eluent adalah fase gerak yang berperan penting pada proses elusi bagi larutan sampel umpan (feed) untuk melewati fasa diam (adsorben). Interaksi antara adsorben dengan eluent sangat menentukan terjadinya pemisahan komponen. Oleh sebab itu pemisahan komponen gula dalam tetes secara kromatografi di pengaruhi oleh laju alir eluent dan jumlah umpan. Eluent dapat digolongkan menurut ukuran kekuatan teradorpsinya pelarut atau campuran pelarut tersebut pada adsorbent dan dalam hal ini yang banyak digunakan adalah jenis adsorbent alumina atau sebuah lapis tipis silika. Penggolongan ini di kenal sebagai deret eluotropik pelarut.yang relatif tak polar dari ikatannya dengan alumina.

Berikut adalah beberapa pertunjukan dalam memilih dan mengoptimalkan fase gerak :

1. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan tekhnik yang sensitif.
2. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga Rf solut terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan
3. untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silica gel, polaritas fase gerak akan mennetukan kecepatan migrasi solute yang berarti juga menentukan nilai Rf. Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzene akan meningkatkan harga Rf secara signifikan
4. suatu pelarut dengan titik didih rendah secara umum lebih disukai karena tahap akhir dalam proses kromatografi adalah untuk memindahkan lempengan dari tank dan menguapkan fase gerak.

Dalam KLT dan juga Kromatografi Kertas, hasil-hasil yang diperoleh digambarkan dengan mencantumkan nilai Rf-nya yang merujuk pada migrasi relatif analit terhadap ujung depan fase gerak atau eluen, dan nilai ini terkait dengan koefesien distribusi komponen. Maka nilai Rf didefenisikan sebagai berikut

Rf = $\frac{Jarak yang di tempuh komponen}{Jarak yang di tempuh pelarut}$

Nilai Rf dapat digunakan sebagai cara untuk analisis kualitatif (Enih & Rosamah, 2019)

### 2.6.7 Deteksi Bercak

Deteksi bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimiawi dan fisika. Cara kimia yang biasa di gunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan cara pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berflouresensi, membuat bercak akan terlihat jelas.

Berikut adalah cara-cara untuk mendeteksi bercak:

1. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan solute yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.
2. Pembentukan warna dapat diamati di bawah sinar Ultra Violet. Silika gel memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan sehingga dapat menyerap dan mengikat sampel di permukaan. Silika gel merupakan GF254 nm karena adanya gugusan kromofor pada noda, gugus kromofor adalah gugus yang dapat menghasilkan warna. Pada panjang gelombang 254 nm, gugus kromofor akan menunjukkan noda yang bewarna gelap, sedangkan pada panjang gelombang 366 nm gugus kromofor akan menghasilkan bercak yang berfluoresensi (memancarkan cahaya).
3. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklatan.
4. Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (peak) dalam pencatat (recorder) (Husa & Mita, 2020).

## 2.7 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### 2.7.1 Pengertian Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau biasa disebut juga dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) adalah tehnik pemisahan dan analisis berdasarkan partisi analit dalam fase diam padat atau cair dan fase gerak cair bertekanan tinggi yang dihubungkan dengan sistem pendeteksi analit. Secara sederhana dapat dikatakan dalam instrumen kromatografi Cair Kinerja Tinggi terdapat dua sistem utama yaitu sistem pemisah dan sistem pendeteksi. Kromatogarafi Cair Kinerja Tinggi memisahkan komponen dari satu campuran dan mengidentifikasi dengan menggunakan waktu retensi serta menentukan kadar masing- masing komponen dengan menggunakan tinggi puncak atau luas area yang dibandingkan dengan standar. Untuk merancang prosedur pemisahan dengan metode KCKT harus dilakukan pemilihan jenis kolom fasa diam, dan fasa gerak yang sesuai dengan senyawa yang dianalisis. Semua proses pemisahan yang terjadi dalam KCKT disebabkan oleh perbedaan distribusi solute (sampel) dalam fasa diam dan fasa gerak. Jika interaksi solute dengan fasa diam lemah maka solute akan mudah terbawa keluar oleh fase gerak. Apabila solute diinjeksikan dalam sistem KCKT dan aliran fasa gerak dihentikan, maka akan terjadi kesetimbangan solute dalam fase diam dan fase gerak (Nina,2023).

### 2.7.2 Prinsip Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Prinsip Cair Kinerja Tinggi atau lebih di kenal HPLC (high perfornance liquid chromatography) adalah pemisahan komponen analit berdasarkan kepolarannya, setiap komponen senyawa yang keluar akan terdeteksi dengan detektor dan di rekam dalam bentuk kromatogram (Handayani,2018)

### 2.7.3 Kelebihan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

KCKT memiliki kelebihan yaitu :

1. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
2. Mudah melaksanakan nya
3. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
4. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis
5. Resolusi yang baik
6. Dapat digunakan bermacam-macam detektor
7. Kolom dapat digunakan kembali (Ardianingsih,2019).

### 2.7.4 Kekurangan Kromatogarafi Cair Kinerja Tinggi

KCKT memiliki kekurangan yaitu :

1. Larutannya harus dicari fase diamnya terlebih dahulu
2. Hanya bisa digunakan untuk asam organik
3. Harganya mahal

### 2.7.5 Jenis Kromatografi Yang sering digunakan

Adapun jenis kromatografi yang sering digunakan sebagai berikut :

1. Kromatogarfi Kertas

Kromatografi kertas adalah kromatografi yang menggunakan fase diam kertas yaitu kandungan selulosa didalam nya, sedangkan fase gerak yaitu pelarut atau campuran pelarut yang tepat. Kertas yang bertindak sebagai fase diam akan dicelupkan kedalam sampel (senyawa) atau pelarut, contoh dan pelarut berdasarkan gaya kapilaritas akan terserap dan bergerak katas. Perbandingan jarak antara sampel dan jarak pelarut dihitung sebagai nilai Rf.

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik analisis kualitatif dari sampel yang ingin diperiksa dengan memisahkan komponen sampel berdasarkan perbedaan kepolaran. Teknik kromatografi menggunakan plat slika sebagai fase diam dan fase gerak yang digunakan disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Larutan atau campuran yang digunakan disebut eluen. Semakin dekat kepolaran antara sampel dan eluen maka sampel akan semakin terbawa fase gerak.

1. Kromatografi Gas

Kromatografi gas merupakan salah satu teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi pergerakan yang terjadi diantara fase gerak dan fase diam Untuk pemisahan senyawa yang berada pada larutan. Senyawa gas yang terlarut dalam fase gerak, akan melewati kolom partisi yang merupakan fase diam. Senyawa yang memiliki kesesuain kepolaran dengan bahan yang berada di dalam fase diam yang diletakkan di dalam kolom partisi akan cenderung bergerak lebih lambat dari pada senyawa yang memiliki perbedaan kepolaran dengan bahan yang ada di kolom partisi ( Faricha et al., 2014).

1. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat –zat kimia (analit) berdasarkan pada perbedaan distribusi masing masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam di bawah pengaruh fase gerak. Fase gerak dapat berupa gas atau zat cair dan fase diam dapat berupa zat cair atau zat padat (Nofita,2018).

### 2.7.6 Cara Kerja Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Rohman, 2009).



**Gambar 2.2** Diagram sistem KCKT

1. wadah fase gerak;
2. pompa;
3. injector
4. kolom;
5. detector;
6. pengolah data

Adapun penjelasan mengenai komponen alat KCKT adalah sebagai berikut :

1. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak terbuat dari bahan yang inert terhadap fase gerak. Bahan yang umumnya digunakan adalah gelas dan baja anti karat. Daya tampung tandon harus lebih besar dari 500 ml sehingga dapat digunakan selama 4 jam dengan kecepatan alir yang umumnya 1-2 ml/menit.

1. Pompa

Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (constant pressure) dan pemindahan konstan (constant displacement). Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu: pompa reciprocating dan pompa syringe. Pompa reciprocating menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur (pulsating), oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk menghasilkan garis dasar (base line) detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadapan aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran reservoir tidak terbatas. Pompa syringe memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas.

1. Injektor (injector)

Sampel yang akan dimasukkan ke bagian ujung kolom, harus dengan disturbansi yang minimum dari material kolom. Terdapat dua model umum, yaitu: Stopped Flow dan Solvent Flowing. Serta terdapat tiga tipe dasar injektor yang dapat digunakan:

1. Stop-Flow: Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfir, sistem tertutup, dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam cairan kecil dan resolusi tidak dipengaruhi.
2. Septum: Septum yang digunakan pada KCKT sama dengan yang digunakan pada Kromtografi Gas. Injektor ini dapat digunakan pada kinerja sampai 60-70 atmosfir. Tetapi septum ini tidak tahan dengan semua pelarut-pelarut kromatografi cair. Partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.
3. Loop Valve: Tipe injektor ini umumnya digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari 10µl dan dilakukan dengan cara automatis (dengan menggunakan adaptor yang sesuai, volume yang lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual). Pada posisi LOAD, sampel diisi kedalam loop pada kinerja atmosfir, bila VALVE difungsikan, maka sampel akan masuk ke dalam kolom.
4. Kolom (Column)

Kolom adalah jantung kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Oleh karena itu ada beberapa hal yang harus diperhatikan, yaitu: pemilihan kolom yang sesuai, pemeliharaan kolom, dan uji terhadap spesifikasi kolom (walaupun kolom tersebut merupakan kolom yang siap dipakai).

1. Detektor (Detector)

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, gangguan (noise) yang rendah, kisar respons linier yang luas, dan memberi respon untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh. Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV 254 nm. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan range yang lebih luas. Detektor indeks refraksi juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV.

1. Komputer

Alat pengolah data seperti komputer, integrator, atau perekam, dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu mem-plotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (pengguna) (Savira, 2021).

#### 2.7.6.1Jenis KCKT

1. Kromatografi Partisi

Merupakan prinsip kromatografi yang paling luas pemanfaatannya dalam KCKT. Pada awalnya, kromatografi partisi digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa non-ionik dan senyawa polar dengan bobot molekul sedang (BM < 3000). Dan sekarang, Dengan semakin berkembangnya metode derivatisasi serta pasangan ion maka prinsip kromatografi partisi juga telah digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa ionik. Kromatografi partisi dapat dibedakan ke dalam dua kategori; kromatografi partisi cair-cair dan kromatografi fase terikat. Perbedaan ke dua teknik ini terletak pada metode pengikatan fase diam pada partikel penyangga kemasan kolom. Pada kromatografi partisi cair-cair, fase diam diikatkan pada permukaan kemasan secara fisika, sedangkan pada kromatografi partisi fase terikat (bonded phase) fase diam terikat secara kimia (Savira, 2021).

1. Kromatografi Adsorpsi

Kromatografi adsorpsi atau kromatografi cair padat adalah bentuk klasik dari kromatografi cair yang pertama diperkenalkan oleh Tswett pada awal abad 20. Pada saat sekarang ini, kromatografi adsorpsi telah diadaptasi dan menjadi bagian yang penting dari metode KCKT. Fase diam yang digunakan pada KCKT cair-padat adalah silica dan alumina, meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silica sebagai fase diamnya. Pada silica dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solute. Gugus silanol pada silica mempunyai reaktivitas yang berbeda, karenanya solute dapat terikat secara kuat sehingga dapat menyebabkan puncak yang berekor (tailing). Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silica atau alumina berupa pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, misalnya n-heksana ditambah dengan methanol (Savira, 2021).

1. Kromatografi Pertukaran

Ion Kromatografi Pertukaran ion adalah suatu metode pemurnian menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Fase diam tersebut merupakan suatu matriks yang kuat (rigid), yang permukaannya mempunyai muatan, dapat berupa muatan positif maupun negatif. Mekanisme pemisahan berdasarkan pada daya tarik elektrostatik. Metode ini banyak digunakan dalam memisahkan molekul protein (terutama enzim). Molekul lain yang umumnya dapat dimurnikan dengan menggunakan kromatografi pertukaran ion ini antara lain senyawa alkohol, alkaloid, asam amino, dan nikotin.

1. Kromatografi Ekslusi

Kromatografi ekslusi adalah suatu kromatografi kolom yang proses pemisahannya didasarkan atas ukuran partikel solute. Kromatografi ekslusi dapat digunakan untuk memisahkan suatu senyawa dari senyawa lain yang mempunyai berat molekul lebih rendah atau tinggi, atau untuk memisahkan molekul-molekul yang mempunyai berat molekul sama tetapi diameter berbeda. Sebagai fase diam pada kromatografi ekslusi digunakan partikelpartikel yang mempunyai pori dengan berbagai macam ukuran. Partikel solute yang besar dari pori tidak akan dapat memasuki pori dan akan keluar sebagai puncak yang pertama pada kromatogram. Sedangkan solute yang mempunyai diameter efektif lebih kecil dari diameter pori akan memasuki pori dan akan muncul lebih lambat pada kromatogram. Berdasarkan pada fase geraknya, kromatografi ekslusi dapat dibedakan menjadi dua yaitu; kromatografi gel filtrasi (bila fase gerak air) dan kromatografi permiasi gel (bila fase gerak adalah pelarut organik (Savira, 2021).