

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia mempunyai beragam kreasi makanan dari bentuk, aroma, dan warnanya. Tak jarang makanan tersebut dikemas dan dimodifikasi menjadi buah tangan. Makanan jajanan merupakan yang banyak digemari Masyarakat perkotaan maupun pedesaan (Duhita *et al.*, 2020). Di Indonesia makanan jajanan berkembang pesat dan sangat beragam jenisnya, zat besi untuk tubuh yang terdapat dalam makanan jajanan berkisar antara 10-20%. Karena adanya beberapa makanan yang tidak higienis akibatnya sangat beresiko pada ceraman yang dapat mengganggu kesehatan, masyarakat perlu lebih memperhatikan mengenai makanan jajanan (Nur *et al.*, 2019). Berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pangan, menghadirkan transformasi signifikan dalam industri makanan dan minuman. Seperti banyaknya penggunaan Bahan Tambahan Makanan (BTM) dalam produk olahan. Salah satu contohnya adalah untuk meningkatkan daya tarik visual produk umumnya ditambahkan zat pewarna (Lukitasari & Yugatama, 2017).

Di Indonesia, cenderung adanya penyalahgunaan pewarna secara berlebihan untuk berbagai bahan makanan. Misalnya pewarna tekstil dan kulit yang digunakan untuk mewarnai makanan. Pewarna tersebut mengandung residu logam berat, maka sangat berbahaya bagi kesehatan (Setiawan *et al.*, 2023). Menurut data dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) pada tahun 2012, kasus paling tinggi di Indonesia adalah terjadinya keracunan makanan, yaitu sebesar 66,7%, dibandingkan dengan keracunan lain seperti obat-obatan dan kosmetik. Salah satu faktor penyebab keracunan makanan adalah adanya kontaminasi bahan kimia di dalam makanan. Terdapat empat jenis bahan berbahaya yang sering kali ditambahkan pada makanan yang ditemukan oleh BPOM, Rhodamin-B, *methanyl yellow* (pewarna tekstil), formalin, dan boraks (Afdaliah *et al.*, 2024).

Jajanan merupakan bagian dari kuliner tradisional Indonesia yang banyak digemari masyarakat dari berbagai kalangan. Jajanan tradisional terbagi menjadi dua jenis, yaitu jajanan basah dan jajanan kering. Jajanan basah adalah olahan makanan yang mudah mengalami kerusakan dan cepat basi. Sebaliknya, jajanan kering merupakan olahan makanan yang memiliki daya tahan lebih lama dibandingkan jajanan basah. Jajanan basah yang mudah rusak dan cepat basi, memicu adanya penambahan bahan kimia dengan tujuan mengawetkan dan membuat daya tarik terutama pada warna dengan menambahkan pewarna sintesis seperti Rhodamin B (Azhar, 2022).

Jajanan tradisional sering dijual di pasar tradisional (Alfisyah, 2019). Pasar Kreneng merupakan salah satu pasar tradisional di kota Denpasar yang menjual aneka jajanan, seperti jajan basah, jajan kering, gorengan, dan camilan lainnya. Pasar ini menjadi tempat favorit masyarakat setempat maupun wisatawan untuk mencari jajanan khas dengan cita rasa autentik. Namun, di balik popularitasnya, jajanan yang beredar di pasar sering kali menjadi perhatian karena potensi risiko terhadap kesehatan akibat penggunaan bahan tambahan makanan yang tidak aman, salah satunya adalah Rhodamin B. Pada tahun 2018 di Provinsi Bali terdapat 287 kejadian keracunan makanan (Suardaningsih, 2024). Pada tahun yang sama BPOM melakukan uji pada 28 sampel makanan di pasar Kreneng. Hasil dari pengujian tersebut terdapat lima sampel makanan mengandung Rhodamin B (Supartika, 2018).

Berdasarkan SK Menteri Kesehatan RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/88, tentang zat pewarna yang diizinkan dan yang dilarang untuk pangan. Rhodamin B merupakan pewarna sintesis yang dilarang penggunaannya dalam makanan. Pewarna sintesis tetap banyak digunakan di kalangan produsen karena ingin mendapatkan keuntungan yang lebih besar tetapi dengan harga murah untuk mempertahankan tampilan makanan agar terlihat menarik dan mencolok (Desnita, 2022). Makanan berwarna merah terang dan mencolok merupakan ciri-ciri yang sering ditemui pada makanan yang mengandung Rhodamin B (Tjiptaningdyah *et al.*, 2017). Rhodamin B memiliki potensi bahaya bagi kesehatan manusia, zat ini dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan saluran

pernapasan, serta dikategorikan sebagai karsinogen. Konsumsi rhodamin B dalam dosis tinggi dapat mengakibatkan kerusakan hati (Herdini & Wahyudiana, 2019).

Dalam Rhodamin B terdapat zat klorin akan bereaksi dengan senyawa lain di dalam tubuh untuk mencapai stabilitas yang justru menghasilkan zat-zat berbahaya yang dapat merusak sel. Selain itu, Rhodamin B mengandung senyawa pengalkilasi ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$) yang bersifat radikal sehingga dapat mengikat komponen penting dalam sel seperti protein, lemak, dan DNA, mengakibatkan terganggunya fungsi sel secara keseluruhan (Permatahati *et al.*, 2020). Meski demikian, penyalahgunaan zat pewarna masih banyak ditemukan, yang mana zat pewarna yang seharusnya digunakan untuk tekstil atau kulit justru digunakan pada makanan. Penyebab banyaknya penyalahgunaan zat pewarna tersebut karena kurangnya pengetahuan masyarakat serta pengawasan dari pemerintah, karena harga zat pewarna untuk industri relatif jauh lebih murah dibandingkan dengan zat pewarna untuk makanan (Nursinah & Mahdi, 2017).

Pangan merupakan kebutuhan pokok manusia yang harus terjamin ketersediaannya, keamanan, dan nilai gizinya. Peraturan Kepala BPOM Nomor 36 Tahun 2013 mendefinisikan pangan sebagai segala produk yang berasal dari sumber hayati, baik dalam bentuk olahan maupun mentah, yang ditujukan untuk dikonsumsi manusia (Permatahati *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penting untuk melakukan analisis terhadap zat pewarna yang digunakan dalam makanan yang beredar di pasaran untuk memastikan keamanannya, sehingga masyarakat sebagai konsumen dapat terhindar dari efek berbahaya pewarna yang dilarang (Komarudin *et al.*, 2019).

Sebelumnya telah dilakukan penetapan kadar Rhodamin-B dengan metode voltametri. Namun, metode ini dinilai kurang efektif karena memerlukan modifikasi elektroda untuk mendapatkan hasil yang selektif (Ngo *et al.*, 2020). Oleh karena itu, diperlukan metode analisis yang memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi (Fauziyah *et al.*, 2021). Analisis senyawa Rhodamin B dapat dilakukan dengan HPLC, Menurut Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Tahun 2011. High Performance Liquid Chromatography

(HPLC) merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif dan beragam sehingga mampu menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif, baik komponen tunggal maupun campuran (Komarudin *et al.*, 2019). Analisis Rhodamin-B dengan menggunakan HPLC memiliki selektivitas yang tinggi sehingga diperoleh hasil yang sesuai dan tepat (Fauziyah *et al.*, 2021). Sehingga peneliti tertarik untuk melakukan pengujian mengenai analisis rhodamin B pada jajanan di pasar Kreneng, yang dipilih berdasarkan pedagang yang dicurigai serta ramai pembelinya dengan menggunakan metode HPLC.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah kadar Rhodamin B pada jajanan basah lebih tinggi dibandingkan dengan jajanan kering yang beredar di pasar Kreneng?
2. Bagaimana validasi metode senyawa Rhodamin B dengan metode analisis HPLC?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk menentukan apakah kandungan Rhodamin B lebih tinggi terdapat di jajanan basah atau di jajanan kering yang beredar di pasar Kreneng.
2. Untuk mengetahui bagaimana validasi metode senyawa Rhodamin B dengan metode analisis HPLC

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar atau referensi bagi peneliti lain yang ingin melakukan studi lanjutan terkait bahan tambahan makanan berbahaya.

1.4.2 Manfaat Praktis

Diharapkan hasil dari penelitian ini dapat menjadi sumber referensi serta informasi bagi masyarakat akan penyalahgunaan pewarna pada makanan dan minuman.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Makanan Jajanan

Makanan merupakan zat atau bahan tertentu yang mempunyai manfaat jika masuk ke dalam tubuh manusia dan memiliki unsur kimia sehingga dapat diolah menjadi zat gizi yang dibutuhkan. Secara biologis makanan memiliki manfaat dalam memenuhi zat-zat yang diperlukan oleh tubuh seperti karbohidrat, protein, lemak, serta vitamin dan mineral agar dapat memenuhi fungsi fisiologisnya (Pasaribu, 2023).

Jajanan merupakan makanan dan minuman dikenal dengan istilah “*street food*” yang disiapkan dan atau dijual oleh pedagang kaki lima, di pinggir jalan, di stasiun, dipasar, di sekolah, tempat pemukiman serta tempat yang sejenisnya yang langsung dimakan atau dikonsumsi tanpa pengolahan lebih lanjut atau persiapan. Kandungan karbohidrat lebih banyak dari pada protein, vitamin, dan mineral dalam makanan jajanan. Sarapan atau makan siang tidak dapat digantikan dengan makanan jajanan, karena ketidaklengkapan gizi dalam makanan jajanan. Jika mengonsumsi makanan jajanan, perut akan terasa kenyang karena padatnya kalori yang masuk dalam tubuh. Sedangkan gizi seperti protein, vitamin, dan mineral yang masuk ke dalam tubuh masih sangat kurang (Rahmi, 2018). Jika makanan jajanan yang sering dikonsumsi tidak mengandung gizi yang cukup sesuai dengan kebutuhan serta kebersihan dan keamanannya tidak terjamin, maka dapat memberikan dampak negatif bagi tubuh (Rahman *et al.*, 2022).

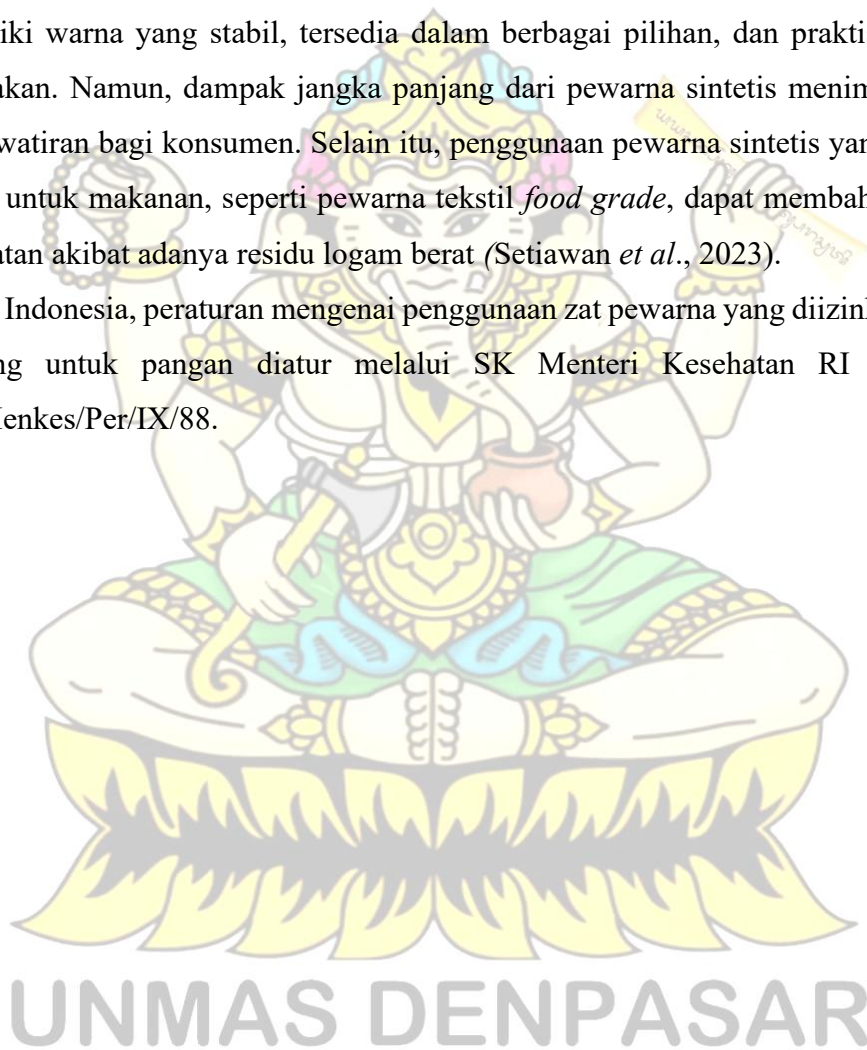
Jajanan tradisional terbagi menjadi dua jenis, yaitu jajanan basah dan jajanan kering. Jajanan basah adalah olahan makanan yang mudah mengalami kerusakan dan cepat basi. Sebaliknya, jajanan kering merupakan olahan makanan yang memiliki daya tahan lebih lama dibandingkan jajanan basah. Jajanan basah yang mudah rusak dan cepat basi, memicu adanya penambahan bahan kimia dengan tujuan mengawetkan dan membuat daya tarik terutama pada warna bagi konsumen (Azhar, 2022).

2.2 Zat Pewarna Makanan

Pewarna makanan adalah jenis bahan tambahan yang paling menarik perhatian karena warna suatu produk makanan atau minuman sering kali menjadi faktor utama yang menarik minat konsumen (Junaidi & Syahrizal, 2020).

Terdapat dua jenis pewarna yaitu pewarna alami dan pewarna buatan. Pewarna sintetis populer di kalangan produsen karena mudah didapat, harganya terjangkau, memiliki warna yang stabil, tersedia dalam berbagai pilihan, dan praktis untuk digunakan. Namun, dampak jangka panjang dari pewarna sintetis menimbulkan kekhawatiran bagi konsumen. Selain itu, penggunaan pewarna sintetis yang tidak sesuai untuk makanan, seperti pewarna tekstil *food grade*, dapat membahayakan kesehatan akibat adanya residu logam berat (Setiawan *et al.*, 2023).

Di Indonesia, peraturan mengenai penggunaan zat pewarna yang diizinkan dan dilarang untuk pangan diatur melalui SK Menteri Kesehatan RI Nomor 722/Menkes/Per/IX/88.



Berikut tabel pewarna sintetis yang dilarang penggunaannya di Indonesia:

Tabel 2.1 Pewarna yang dilarang untuk pangan di Indonesia

No	Pewarna	Nomor Indeks Warna (C.I. No)
1	Citrus res No.2	12156
2	Ponceau 3R (<i>Red G</i>)	16155
3	Ponceau SX (<i>Food red No.1</i>)	14700
4	Rhodamin B (<i>Food red No.5</i>)	45170
5	Guinea Green B (<i>Acid Green No.3</i>)	42085
6	Magenta (<i>Basic Violet No.14</i>)	42510
7	Chrysoidine (<i>Basic Orange No.14</i>)	11270
8	Butter Yellow (<i>Solvent Yellow No.2</i>)	11020
9	Sudan I (<i>Food Yellow No. 2</i>)	12055
10	Methanil yellow (<i>Food Yellow No. 14</i>)	13065
11	Auramine (Ext. D & C <i>Yellow No. 1</i>)	41000
12	Oil Orange SS (<i>Basic Yellow No. 14</i>)	12100
13	Oil Orange XO (<i>Solvent Orange No. 7</i>)	12140
14	Oil Yellow AB (<i>Solvent Orange No. 5</i>)	11380
15	Oil Yellow OB (<i>Solvent Orange No. 6</i>)	11390

Sumber : Peraturan Menkes RI No. 722/Menkes/Per/IX/88 (Desnita, 2022)

2.2.1 Pewarna alami

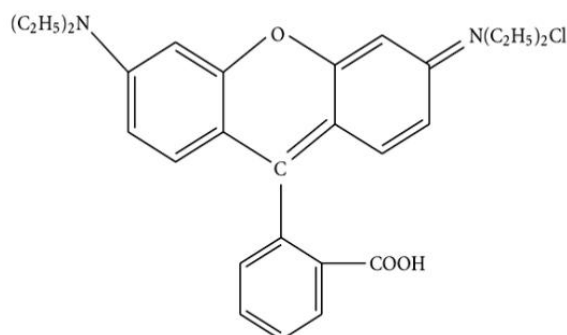
Pewarna alami (pewarna makanan alami) adalah zat warna yang diperoleh melalui proses ekstraksi, isolasi, atau derivatisasi dari sumber-sumber alami seperti tumbuhan, hewan, mineral, atau lainnya. Kekurangan pewarna alami terletak pada ketidakstabilannya terhadap suhu tinggi, perubahan pH, cahaya, dan zat pengoksidasi (Pujilestari, 2015). Penggunaan pewarna alami dianggap lebih aman dibandingkan pewarna sintetis karena sifatnya yang non-karsinogenik dan ramah lingkungan. Selain itu, pewarna alami juga memiliki keunggulan lain, yaitu warna yang dihasilkan cenderung memberikan kesan luwes, lembut, dan elegan, serta memberikan tampilan yang sejuk saat dilihat (Kaswinarni *et al.*, 2019).

2.2.2 Pewarna sintesis

Pewarna sintetis adalah pewarna buatan yang digunakan untuk memberikan tampilan warna yang lebih menarik pada makanan (Pujilestari, 2015). Pewarna sintetis dihasilkan melalui serangkaian proses kimia yang menjadikannya lebih stabil. Penggunaan pewarna ini meluas ke berbagai jenis makanan, bahkan pewarna yang awalnya dibuat untuk tekstil dan kulit sering kali digunakan untuk makanan (Setiawan *et al.*, 2023). Pewarna sintetis memiliki beragam fungsi, tidak hanya untuk mewarnai tekstil, kerajinan, peralatan rumah tangga, kendaraan, dan dekorasi interior/eksterior, tetapi juga untuk makanan dan minuman. Penggunaan zat pewarna sintetis dalam makanan dan minuman sangat berbahaya bagi kesehatan, karena dapat memicu kanker serta menyebabkan kerusakan pada ginjal dan hati (Pujilestari, 2015).

2.3 Rhodamin B

Rhodamin B adalah pewarna sintetis yang banyak digunakan dalam industri. Menurut Farmakope Indonesia edisi IV (1993), Rhodamin B memiliki sifat kimia yang sangat mudah larut dalam air, menghasilkan larutan berwarna merah kebiruan dengan fluoresensi kuat saat diencerkan. Zat ini juga sangat mudah larut dalam etanol, tetapi sukar larut dalam asam encer dan larutan alkali. Dalam asam kuat, Rhodamin B akan membentuk senyawa kompleks berwarna merah muda yang larut dalam isopropil eter (Desnita, 2022). Rhodamin B memiliki titik lebur 165°C, titik leleh 270°C, dan titik didih 310°C. Rumus molekul Rhodamin B adalah $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ (Permatahati *et al.*, 2020). Panjang gelombang maksimum Rhodamin B pada spektrofotometer UV-Vis adalah 554 nm, karena rhodamin B memiliki gugus kromofor sehingga dapat mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan sinar tampak (Purba & Sembiring, 2024).



Sumber: Desnita (2022, Gambar 2.1)

Gambar 2.1 Rumus molekul rhodamin B

Rhodamin B adalah pewarna sintetis berbentuk serbuk kristal, biasanya berwarna hijau atau ungu kemerahan. Saat larut dalam konsentrasi tinggi, warnanya hijau atau ungu kemerahan, tetapi pada konsentrasi rendah, warnanya berubah jadi merah terang. Zat ini sering digunakan sebagai pewarna untuk kertas, tekstil, dan juga sebagai bahan reagen kimia. Rhodamin B tidak berbau dan mudah larut dalam air, menghasilkan larutan merah terang yang berfluoresensi. Zat ini juga dikenal dengan beberapa nama lain, seperti Tetra Ethyl Rhodamin, Rheonine B, D&C Red No.19, C.I *Basic Violet* 10, C.I No. 45179, *Food Red* 15, dan ADC Rhodamin B. Saat larut dalam air, warnanya menjadi merah kebiruan dengan fluoresensi yang kuat (Desnita, 2022)

2.3.1 Dampak Rhodamin B Dalam Tubuh

Proses pembuatan pewarna sintetis biasanya melibatkan penggunaan asam sulfat atau asam nitrat. Sayangnya, proses ini sering terkontaminasi oleh arsenik atau logam berat lain yang beracun. Dalam pembuatan pewarna organik, sebelum sampai ke tahap akhir, biasanya ada senyawa antara yang bisa berbahaya dan kadang-kadang masih tertinggal dalam produk akhir. Selain itu, senyawa-senyawa baru yang berbahaya juga bisa terbentuk selama proses tersebut (Desnita, 2022).

Rhodamin B bersifat karsinogenik dan genotoksik. Menurut WHO, Rhodamin B berbahaya untuk kesehatan manusia karena sifat kimianya dan kandungan logam berat di dalamnya. Zat ini mengandung senyawa klorin (Cl), yang mana senyawa klorin termasuk dalam kelompok halogen. Klorin bersifat reaktif, sehingga mudah

bereaksi dan berbahaya. Jika masuk ke dalam tubuh, senyawa ini akan mengikat senyawa lain dalam tubuh untuk mencapai kestabilannya. Hal itulah yang membuatnya menjadi racun bagi tubuh, yang mana dapat memicu terjadinya kanker (Desnita, 2022).

Beberapa sifat berbahaya dari Rhodamin B antara lain dapat menyebabkan iritasi pada mata, serta menyebabkan kulit iritasi dan kemerahan jika terpapar kulit. Efek ini mirip dengan sifat klorin, yang berkaitan dengan struktur Rhodamin B. Klorin pada suhu ruangan berbentuk gas, dan sifat dasarnya adalah gas beracun yang dapat menyebabkan iritasi pada sistem pernapasan. Efek toksik dari klorin disebabkan oleh kekuatannya dalam mengoksidasi. Jika Rhodamin B tercampur dalam makanan dapat menimbulkan gejala seperti mual, muntah, gangguan fungsi pencernaan, dan iritasi pada usus besar. Pemeriksaan radiologi dan patologi menunjukkan adanya penipisan dinding mukosa di mulut, hilangnya lapisan mukosa normal di saluran pencernaan, serta pendarahan pada saluran cerna. Kerusakan pada sel-sel mukosa ini biasanya disebabkan oleh paparan radikal oksigen yang diinduksi, dan juga kontak langsung dengan zat beracun tersebut (Desnita, 2022).

Kadar antioksidan alami di jaringan mukosa mulut cenderung lebih rendah dibandingkan bagian lain dari saluran pencernaan. Karena sifat Rhodamin B yang polar, bisa menjadi salah satu penyebab kerusakan organ secara sistemik. Sifat polarnya membuat Rhodamin B yang tidak dimetabolisme oleh hati kemudian menyebar melalui aliran darah. Dalam proses ini, Rhodamin B dapat berinteraksi dengan asam amino dalam darah, sehingga meningkatkan risiko paparan senyawa yang bersifat mutagenik dan karsinogenik (Desnita, 2022). Efek dan reaksi kimia yang terjadi jika Rhodamin B terserap dalam tubuh bisa berbeda-beda, tergantung pada beberapa faktor seperti dosis, cara paparan, serta faktor individu seperti usia dan kondisi Kesehatan (Afdaliah *et al.*, 2024).

2.4 Prevalensi Dampak Penggunaan Rhodamin B di Indonesia

Kasus keracunan makanan cukup sering terjadi di Indonesia. Menurut BPOM 2012, pada tahun 2011 tercatat ada 128 kejadian luar biasa (KLB) keracunan makanan di 25 provinsi. Dari kejadian tersebut, sebanyak 18.144 orang

terdampak, dengan tingkat serangan (*attack rate*/AR) sebesar 38,10% (6.901 kasus) dan tingkat kematian (*case fatality rate*/CFR) sebesar 0,16% (11 kasus) (Pitriyanti *et al.*, 2019).

Berdasarkan Kemenkes 2015, pada tahun 2012, jumlah kasus keracunan makanan menurun hingga 44%, dengan 84 kejadian yang tersebar di 23 provinsi. Korban terdampak sebanyak 8.590 orang, dengan AR 37,66% (3.235 kasus), namun angka kematian meningkat menjadi 0,58% (19 kasus). Pada tahun 2013, jumlah KLB kembali turun sebesar 36%, menjadi 48 kejadian, tetapi menyebar ke 34 provinsi. Korban terdampak sebanyak 6.926 orang dengan AR 24,40% (1.690 kasus) dan CFR meningkat lagi menjadi 0,71% (12 kasus) (Pitriyanti *et al.*, 2019).

Menurut data WHO, sekitar dua juta orang di dunia meninggal setiap tahun akibat keracunan makanan. Di Indonesia, pada tahun 2017 menunjukkan bahwa provinsi dengan kasus keracunan makanan terbanyak adalah Jawa Barat (25 kasus), diikuti oleh Jawa Tengah (17 kasus), Jawa Timur (14 kasus), Bali (13 kasus), dan Nusa Tenggara Barat (12 kasus). Secara keseluruhan, kejadian keracunan makanan yang dilaporkan sepanjang tahun 2017 menyebabkan 893 orang sakit dan 8 orang meninggal (Nugrahaeni & Pertiwi, 2020). Meskipun jumlah kasus terus berkurang, angka kematian justru meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa keracunan makanan tetap menjadi masalah kesehatan yang harus ditangani dengan serius (Pitriyanti *et al.*, 2019).

2.5 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah instrumen yang digunakan dalam teknik analisis untuk pemisahan secara kualitatif, kuantitatif, serta untuk isolasi dan pemurnian zat. Teknik kromatografi pertama kali ditemukan oleh Tsweet pada tahun 1903, ketika ia berhasil memisahkan pigmen daun menggunakan kolom yang berisi kapur (CaSO_4). Tsweet juga memperkenalkan istilah "kromatografi" untuk menggambarkan lapisan berwarna yang bergerak menuju bawah kolom (Angraini & Desmaniar, 2020). HPLC merupakan perkembangan terbaru dari teknik kromatografi cair kolom klasik, dengan peningkatan pada kolom, detektor yang

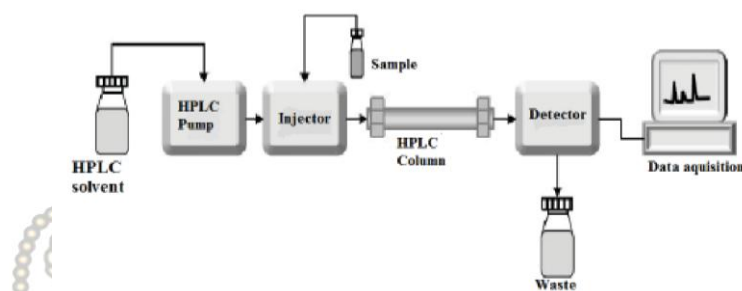
lebih sensitif, dan teknologi pompa bertekanan tinggi. Kemajuan ini membuat HPLC menjadi metode pemisahan zat yang cepat dan efisien (Rosydiati & Saleh, 2019).

Analisis menggunakan HPLC memiliki beberapa keunggulan, antara lain waktu analisis yang relatif singkat, penggunaan volume sampel yang kecil, kemampuan untuk menganalisis senyawa organik dan anorganik, serta kolom yang dapat digunakan berulang kali (Rosydiati & Saleh, 2019). memberikan pemisahan cepat, efisien dan resolusi tinggi (Alatas *et al.*, 2019). Prinsip dasar HPLC mencakup proses adsorpsi yang dinamis, yang mana molekul analit bergerak melalui celah-celah kecil pada kolom. Pemisahan terjadi karena adanya interaksi antara material kolom (fase diam) dengan komponen sampel. Waktu retensi atau durasi interaksi ini dipengaruhi oleh kekuatan interaksi antara material kolom (fase diam) dengan komponen sampel (Abriyani *et al.*, 2024). HPLC/KCKT menggunakan fase diam berupa partikel padat kecil (5-10 μm) dan menerapkan tekanan tinggi (300 – 3000 psi) untuk mengalirkan fase gerak secara konstan. Metode ini sangat cocok untuk memisahkan dan menentukan konsentrasi campuran senyawa yang memiliki konsentrasi rendah, tekanan uap rendah, dan bersifat termolabil (Salamah & Guntarti, 2023).

Prinsip kerja KCKT, atau yang lebih dikenal sebagai HPLC (kromatografi cair kinerja tinggi), adalah pemisahan komponen analit berdasarkan kepolarannya. Setiap komponen yang terpisah akan terdeteksi oleh detektor dan dicatat dalam bentuk kromatogram. Jumlah puncak pada kromatogram menunjukkan jumlah komponen, sementara luas puncak mencerminkan konsentrasi masing-masing komponen dalam senyawa (Zainal *et al.*, 2018). HPLC menggunakan dua fase kerja, yaitu fase gerak (*mobile phase*) dan fase diam (*stationary phase*). Fase gerak terdiri dari cairan atau pelarut yang berfungsi untuk mengangkut komponen campuran menuju detektor, sedangkan fase diam adalah fase tetap dalam kolom yang terdiri dari partikel dengan pori-pori kecil dan luas permukaan yang tinggi (Angraini & Desmaniar, 2020).

Dalam teknik HPLC terdapat beberapa jenis fase, yaitu fase normal (di mana pelarut non-polar berfungsi sebagai fase gerak), fase terbalik (di mana pelarut polar

digunakan sebagai fase gerak), dan fase penukar ion (yang menggunakan gradien konsentrasi ion dalam fase gerak) (Abriyani *et al.*, 2024). Analisis dianggap baik jika waktu analisisnya pendek dan daya pisahnya tinggi. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil pemisahan antara lain pengaturan komposisi fase gerak, laju alir, dan apakah terdapat penambahan asam atau tidak (Rosydiati & Saleh, 2019).



Sumber: Abdu Hussen (2022, Gambar 2.2)

Gambar 2.2 Komponen HPLC

2.5.1 Komponen HPLC

Komponen HPLC berdasarkan pada buku dari (Salamah & Guntarti, 2023)

1. Komponen reservoir fase gerak.

Pada peralatan HPLC modern, reservoir fase gerak terdiri dari satu atau lebih wadah, dan sering dilengkapi dengan alat degasser untuk menghilangkan gas terlarut seperti oksigen dan nitrogen. Jika tidak dihilangkan, gas-gas ini dapat membentuk gelembung yang masuk ke dalam kolom dan detektor, yang dapat menyebabkan pelebaran pita dan mengganggu respons detektor. Selain harus bebas dari gas, pelarut juga harus disaring terlebih dahulu menggunakan kertas millipore agar terbebas dari partikel halus.

Pemisahan yang menggunakan satu jenis pelarut dengan konsentrasi tetap disebut elusi isokratik. Sebaliknya, jika elusi dilakukan dengan lebih dari satu jenis pelarut yang memiliki polaritas berbeda dan perbandingannya diubah selama proses pemisahan, maka disebut elusi gradien.

Pemisahan sering dilakukan dengan menggunakan elusi gradien untuk meningkatkan efisiensi. Elusi gradien memiliki beberapa keuntungan dibandingkan elusi isokratik, yaitu: retensi senyawa dapat dikendalikan, serta

dapat mencegah gangguan atau perubahan sifat kolom akibat adanya material yang tidak terelusi dengan baik pada program isokratik; juga dapat meningkatkan sensitivitas deteksi, karena pada program gradien nilai k' dapat diturunkan dan bentuk pita dapat diperbaiki menjadi lebih tajam dan sempit; serta memungkinkan pengujian sampel yang lebih besar dibandingkan dengan program isokratik tanpa menyebabkan efek pelebaran pita.

Fase gerak yang digunakan dalam HPLC bisa berupa air, larutan buffer encer, campuran organik, pelarut organik, atau kombinasi dari pelarut organik. Fase gerak yang ideal adalah yang mampu melarutkan sampel dengan baik.

2. Pompa

Pompa sebaiknya memenuhi kriteria menghasilkan tekanan lebih dari 6000 psi, tidak menghasilkan getaran, memiliki kecepatan aliran antara 0,001-10 ml/menit, reproduibilitas aliran sebesar 0,5%, serta terbuat dari bahan yang tahan secara kimia, seperti teflon dan stainless steel. Umumnya, pompa dirancang untuk mendorong pelarut (fase gerak) melalui kolom yang berisi material padat dan padat. Mengingat adanya tekanan balik yang tinggi dari kolom terhadap aliran fase gerak, pompa yang digunakan juga harus mampu beroperasi pada tekanan tinggi.

3. Sistem injeksi sampel

Sistem injeksi sampel harus memiliki reproduibilitas yang baik untuk sampel yang dimasukkan ke dalam kolom, karena hal ini menentukan presisi perhitungan dalam kromatografi. Sampel yang dimasukkan ke dalam kolom dengan tekanan tinggi sebaiknya berbentuk pita yang tipis, sehingga pelebaran pita selama proses ini dapat diabaikan.

Dalam HPLC, sampel tidak perlu diuapkan seperti pada kromatografi gas. Yang perlu diperhatikan adalah konsentrasi sampel yang diinjeksikan harus berada dalam rentang linier detektor. Jumlah sampel juga harus diperhatikan untuk menghindari pelebaran pita akibat jumlah analit yang terlalu banyak atau volume yang terlalu besar (*volume overloading*).

Volume *overloading* dapat terjadi jika kelarutan analit dalam pelarut jauh lebih tinggi dibandingkan kelarutannya dalam fase gerak. Larutan sampel yang diinjeksikan akan masuk ke dalam loop untuk bercampur dengan fase gerak, kemudian dibawa oleh fase gerak ke dalam kolom. Jika kelarutan sampel dalam fase gerak rendah, maka volume fase gerak yang dibutuhkan akan sangat besar, sehingga dapat menyebabkan pelebaran pita. Apabila volume larutan sampel yang diinjeksikan sudah sangat kecil namun masih terjadi pelebaran pita, kemungkinan ada kelebihan massa sampel yang melebihi kapasitas kolom, bahkan dapat menyebabkan kejenuhan kolom akibat sampel. Berat maksimum yang diperbolehkan per jenis senyawa dalam sampel yang diinjeksikan (W_{maks}) adalah:

$$W_{maks} = 50 \frac{1+k'^2}{k'} dc$$

Dimana dc = diameter internal kolom

Overloading sampel akan mengakibatkan penurunan resolusi, berkurangnya jumlah lempeng teori, dan waktu retensi yang lebih singkat, sehingga kualitas pemisahan secara keseluruhan menjadi menurun.

4. Kolom Kromatografi

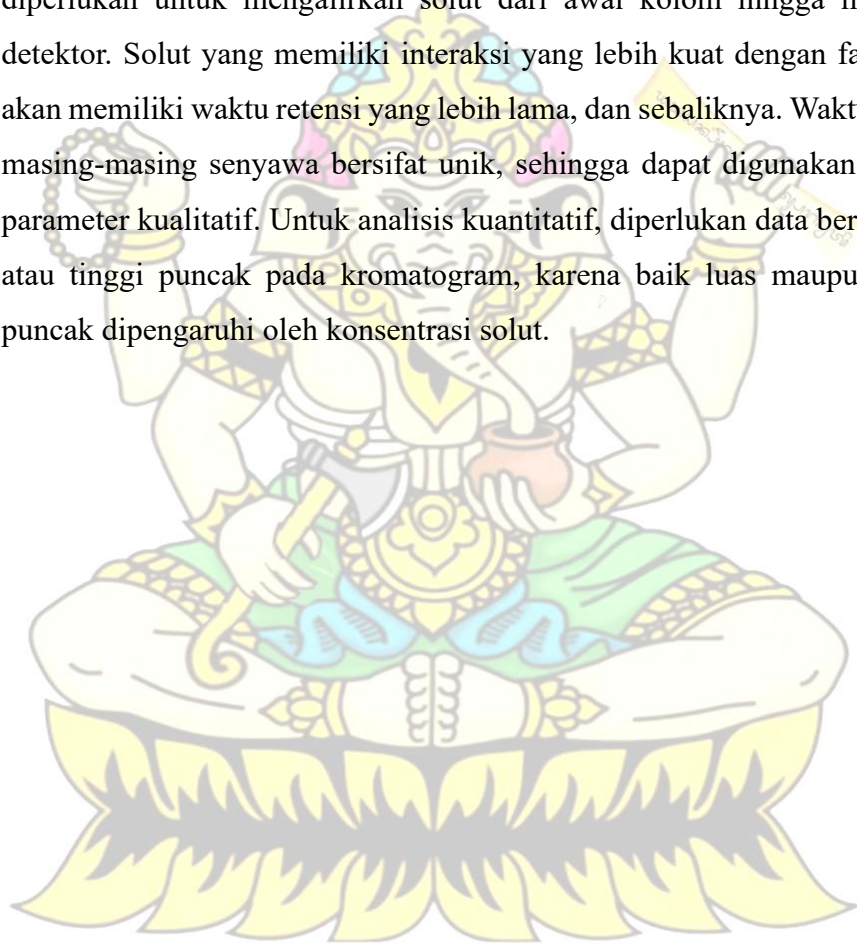
Kolom kromatografi merupakan inti dari proses kromatografi. Keberhasilan analisis sangat bergantung pada pemilihan kolom dan kondisi operasinya. Kolom dapat dibedakan menjadi dua jenis. Pertama, kolom analitik, yang umumnya memiliki diameter maksimum 8 mm dan panjang maksimum 30 cm. Kedua, kolom preparatif yang biasanya memiliki diameter minimum 8 mm dengan panjang antara 25 hingga 100 cm. Bagian luar kolom kadang-kadang dilapisi logam untuk menahan tekanan hingga 6000 psi. Sambungan di awal dan akhir kolom harus dirancang tanpa kantong-kantong yang dapat menyebabkan fase gerak terjebak.

5. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi dan mengukur keberadaan komponen sampel yang melewati kolom. Detektor harus memiliki sensitivitas tinggi dan respons yang linier, sehingga volume internal yang

diperlukan dapat diminimalkan. Hal ini bertujuan untuk menghindari pelebaran pita pada kromatogram. Dalam pemisahan berbagai senyawa, seringkali digunakan kombinasi dari berbagai jenis detektor. Beberapa detektor yang umum digunakan meliputi spektrofotometer UV-Vis, detektor elektrokimia, refraktometer, dan spektrofluorometer.

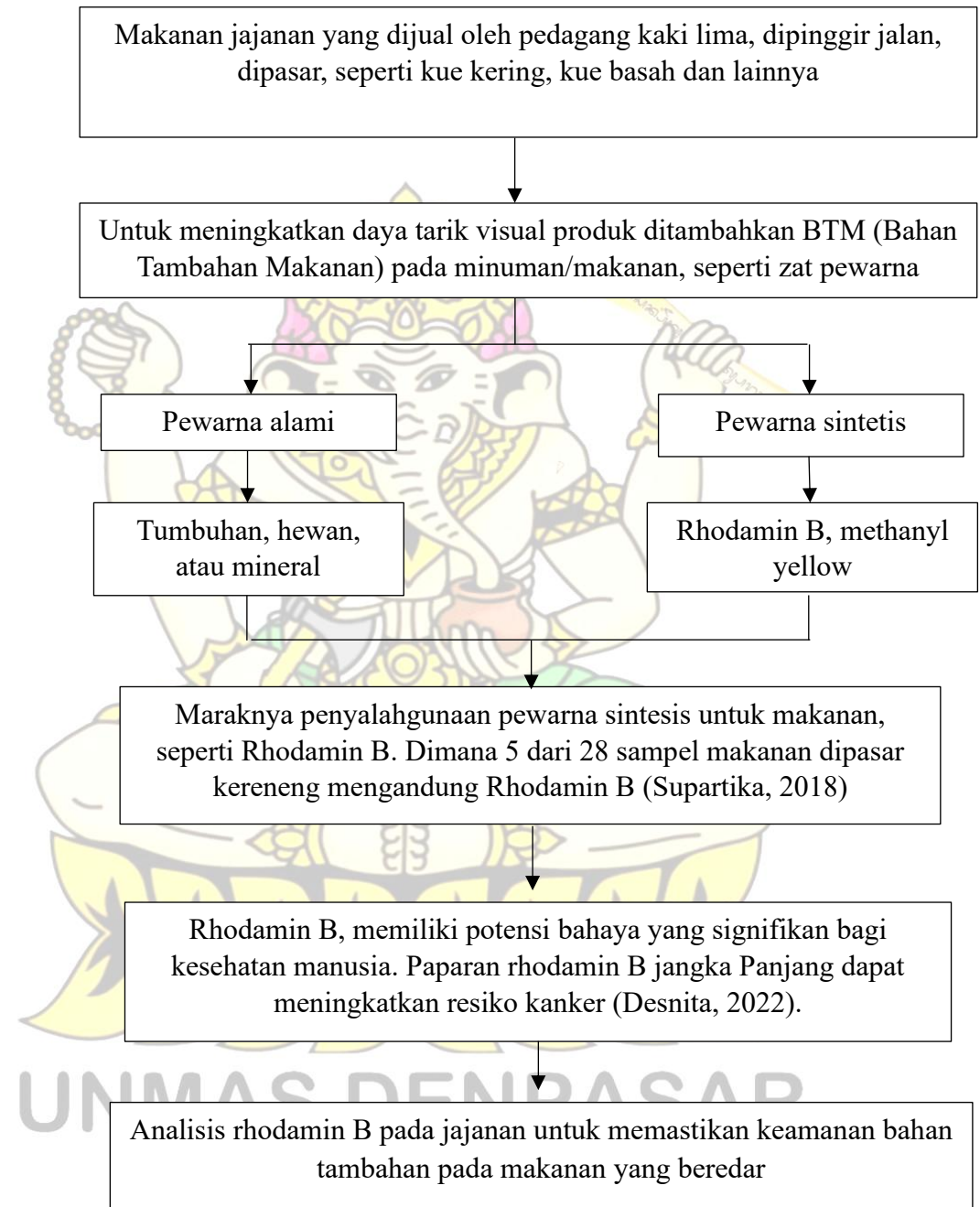
Pemisahan komponen didasarkan pada waktu retensi, yaitu waktu yang diperlukan untuk mengalirkan solut dari awal kolom hingga mencapai detektor. Solut yang memiliki interaksi yang lebih kuat dengan fase diam akan memiliki waktu retensi yang lebih lama, dan sebaliknya. Waktu retensi masing-masing senyawa bersifat unik, sehingga dapat digunakan sebagai parameter kualitatif. Untuk analisis kuantitatif, diperlukan data berupa luas atau tinggi puncak pada kromatogram, karena baik luas maupun tinggi puncak dipengaruhi oleh konsentrasi solut.



UNMAS DENPASAR

2.6 Kerangka Konseptual

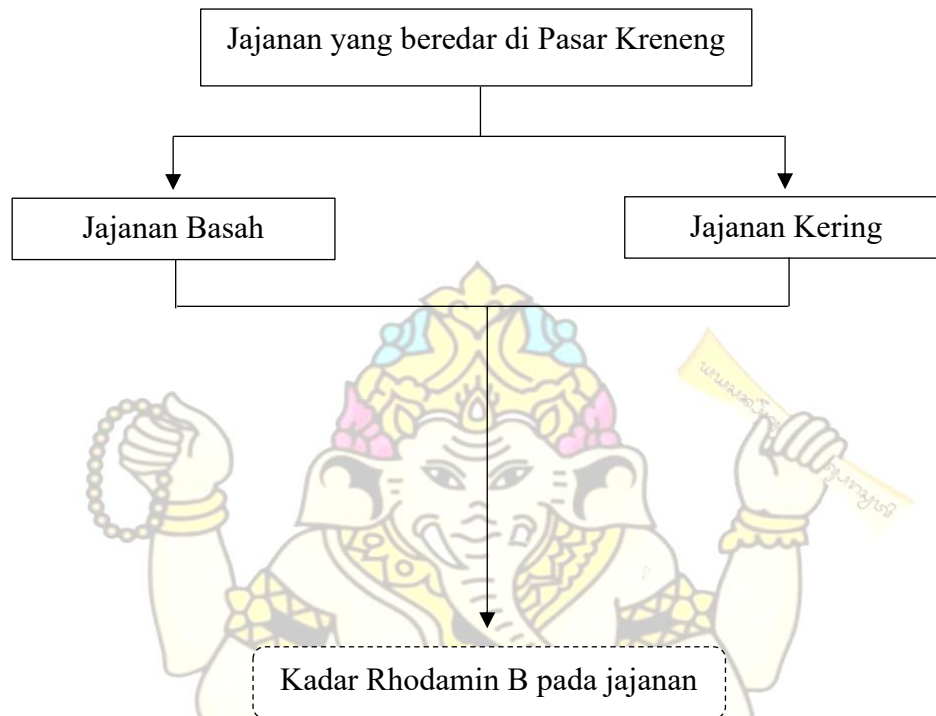
2.6.1 Kerangka Teori



Sumber: Dokumen pribadi (2024, Gambar 2.3)

Gambar 2.3 Skema Kerangka Teori

2.6.2 Kerangka Konsep



Keterangan :

: Variabel bebas

: Variabel terikat

Sumber: Dokumen pribadi (2024, Gambar 2.4)

Gambar 2.4 Skema Kerangka Konsep

2.7 Hipotesis

Diduga jajanan basah lebih tinggi mengandung Rhodamin B dibandingkan jajanan kering yang beredar di pasar Kreneng.