

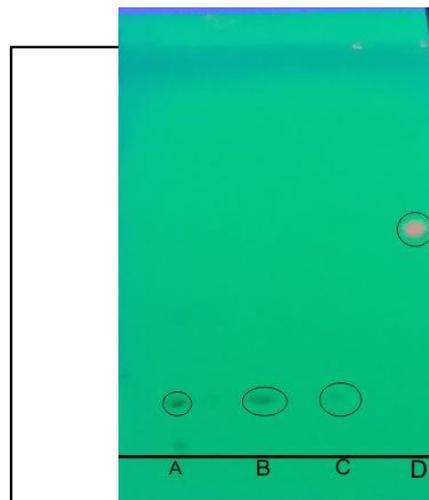
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi Zat Pewarna Rhodamin B Menggunakan KLT

Identifikasi zat pewarna Rhodamin B dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif, identifikasi secara kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan membandingkan nilai Rf dan apabila dilihat secara visual bewarna merah jambu, dan jika dilihat dibawah sinar UV 254 nm akan berflorosensi kuning (BPOM, 2006). Hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 1. Hasil plat sampel saus dengan standar Rhodamin B dilihat dibawah sinar UV 256 nm, A : sampel saus A, B sampel saus B, C : sampel saus C, D : baku pembanding, fase gerak : n-Butanol: asam asetat : ammonia, fase diam Silika gel Gf 254

Tabel 1. Hasil Identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Sampel	UV 254 nm	Jarak noda (cm)	Jarak eluen (cm)	Nilai Rf
--------	-----------	-----------------	------------------	----------

A	Tidak berflourosensi	1,7	8	0,212
	Tidak berflourosensi	1,4	8	0,225
	Tidak berflourosensi	2,6	8	0,212
B	Tidak berflourosensi	1,8	8	0,175
	Tidak berflourosensi	1,6	8	0,2
	Tidak berflourosensi	2,2	8	0,137
C	Tidak berflourosensi	1,7	8	0,325
	Tidak berflourosensi	1,1	8	0,275
	Tidak berflourosensi	2,5	8	0,312
Baku Pemanding	Berflourosensi merah muda	4	8	0,5

Keterangan :

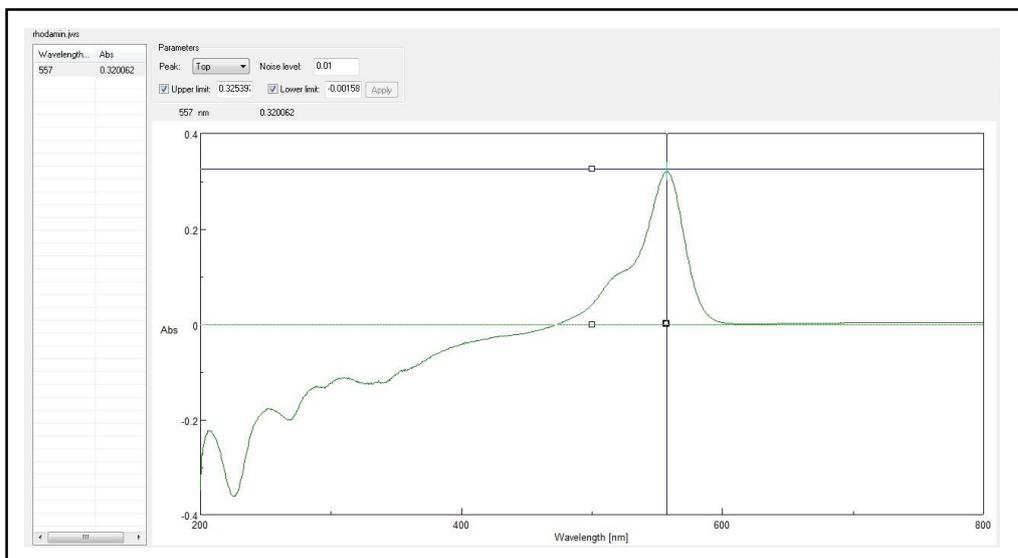
Rf = *Retradation factor*

Uv = *Ultraviolet*

2. Analisis Spektrofotometri

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

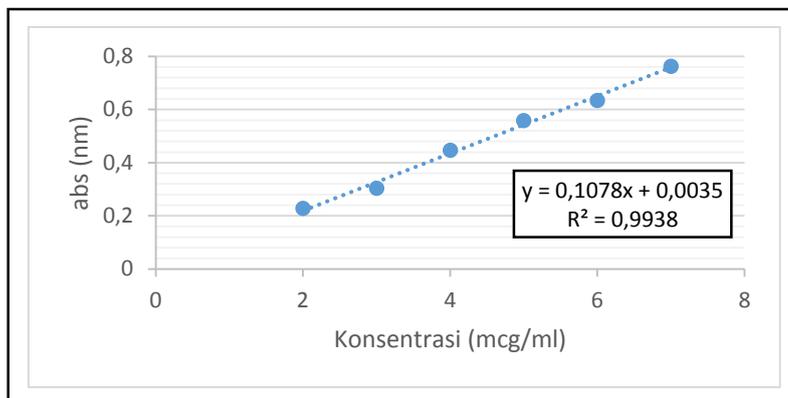
Penentuan panjang gelombang maksimal Rhodamin B dilakukan dengan mengukur dengan rentang panjang 450 -750 nm. Panjang gelombang maksimal Rhodamin B bisa dilihat pada Gambar 8.



Gambar 2.
Hasil Pengukuran Panjang Gelombang Maksimal Rhodamin B adalah 557 nm.

b. Pembuatan kurva baku Rhodamin B

Kurva baku Rhodamin B dilakukan dengan membuat larutan dengan 6 konsentrasi yaitu konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 ppm kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal yang telah diketahui sebelumnya yaitu 557 nm. Blanko yang digunakan adalah HCl 0,1 N. Kurva baku Rhodamin B dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Larutan Rhodamin B dengan Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis Pada Panjang Gelombang 557 nm.

c. Analisis sampel

Larutan sampel yang telah disiapkan, dibaca serapannya pada panjang gelombang 557, hal ini karena Rhodamin B memberikan serapan yang maksimal pada panjang gelombang tersebut. Hasil pembacaan Rhodamin B dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 2. Hasil Absorbansi Pada Sampel Saus yang Beredar dengan Replikasi 3 Kali

Sampel	Berat Sampel (gram)	Absorbansi
A	5,0423	0,0145
	5,0881	0,0212
	5,0112	0,0179
B	5,0964	0,0269
	5,0090	0,0267
	5,0470	0,0219
C	5,0511	0,0757
	5,0897	0,0739
	5,0093	0,0741

B. Pembahasan

1. Identifikasi Zat Pewarna Rhodamin B Menggunakan KLT

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya zat pewarna Rhodamin B pada saus yang beredar di pasar Gamping Kabupaten Sleman, serta berapa banyak kadar yang terkandung pada saus tersebut. Identifikasi secara kualitatif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu metode kromatografi dengan prinsip pemisahan senyawa “*like dissolve like*” yaitu senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat nonpolar akan larut dengan pelarut nonpolar (Gandjar dan Rohman, 2007). KLT digunakan karena pengujian ini mudah dan murah dilakukan. Persiapan sampel identifikasi menggunakan KLT dimulai dengan merendam sampel saus sebanyak 10 gram dengan 100 ml larutan amonia 2% dalam 70 % etanol selama semalam. Perendaman dalam amonia untuk mengikat Rhodamin B. Larutan yang telah didiamkan semalam dipekatkan dengan cara dipanaskan diatas *hot plate* dan ditambahkan 10 ml

aquades dan 5 ml asam asetat 5% untuk menstabilkan Rhodamin B agar tidak berubah dari bentuk ionisasi ke bentuk netral (Putri, 2009).

Langkah berikutnya memasukan benang wol dengan ukuran 15 cm dalam larutan dan didihkan diatas *hot plate* selama 10 menit. Benang wol digunakan untuk mengekstrasi Rhodamin B dalam sampel dan sebagai adsorben warna saus, kemudian asam asetat berfungsi sebagai pemberi suasana asam dimana Rhodamin B akan tertarik oleh asam dan berikutnya akan terabsorpsi oleh benang wol. Benang wol kemudian diambil dan ditambahkan 10 ml amonia 10% dalam etanol 70% sehingga benang wol akan melepas warna dan warna akan masuk kelarutan basa (Puji dkk, 2015).

Fase diam pada penelitian ini adalah plat alumunium silika gel GF 254, fase diam berfungsi sebagai jalanya migrasi analit oleh solvent. Pada fase gerak digunakan n-butanol : asam asetat : amonia (10: 4: 5), fase gerak tersebut berfungsi untuk menciptakan suasana organik sehingga sampel dapat terdistribusi dari fase air ke fase organik (Wardanita, 2014). Semakin polar maka antara sampel dan eluen maka sampel akan terbawa oleh fase gerak tersebut (Yamlean, 2011).

Asam asetat, dan amonia bersifat polar, sedangkan n-Butanol bersifat semipolar, pemilihan eluen yang bersifat polar dikarenakan zat pewarna Rhodamin B bersifat polar karena memiliki gugus karboksil dengan gugus amina dan pasangan elektron bebas pada struktur molekulnya, gugus amina dan karboksil akan membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut polar sehingga mudah larut dan dapat mengelusi Rhodamin B dengan sempurna. Eluent juga dipilih dengan kepolaran yang lebih dari Rhodamin B agar zat tersebut tidak terikat terikat pada fase diamnya. Kombinasi eluen agar dapat menghasilkan pemisahan yang baik, spot yang baik, dan waktu pemisahanya yang tidak terlalu lama (Wisnu, 2008).

Fase gerak kemudian dimasukkan dalam *chamber* dan dijenuhkan terlebih dulu menggunakan kertas saring, tujuan penjenuhan adalah untuk mengoptimalkan naiknya eluen dengan memastikan fase gerak terdistribusi merata, sehingga proses pergerakan spot berlangsung maksimal, kemudian dilakukan pentolan sampel dan larutan baku menggunakan *syringe* agar memperoleh hasil pentolan yang kecil. Penotolan diusahakan sekecil mungkin untuk menghindari pelebaran spot yang bisa menurunkan resolusi. Plat kemudian dimasukkan kedalam *chamber* yang berisi fase gerak. Fase gerak secara perlahan bergerak naik, dan setelah mencapai batas atas angkat dan keringkan untuk dilihat dibawah sinar UV 254 dan menghitung nilai Rf-nya.

Dari hasil pengamatan dibawah sinar UV 254 (gambar 7) sampel terlihat bewarna gelap baik sampel A, B dan C, sedangkan baku Rhodamin B dibawah sinar UV bewarna merah jambu dilihat dari nilai Rf-nya sampel A memiliki nilai Rf 0,212, pada saus sampel B nilai Rf yang didapat adalah 0,225, dan pada sampel C nilai Rf yang didapat adalah 0,212. Hal ini sangat jauh dari nilai Rf standar Rhodamin B yaitu sebesar 0,5. Data kromatogram diatas menunjukkan bahwa sampel A, B, dan C negatif mengandung Rhodamin B, karena suatu senyawa yang mengandung Rhodamin B seharusnya terlihat bewarna merah jambu secara visual, dan berflourosensi oranye saat dibawah sinar UV (BPOM, 2006).

1. Identifikasi Spektrofotometri

Penentuan panjang gelombang maksimal Rhodamin B dilakukan dengan mengukur dengan rentang panjang 450 -750 nm. Hal ini karena Rhodamin B adalah larutan yang bewarna, sehingga penyerapan dan kepekaanya akan maksimum. Perhitungan panjang gelombang maksimal Rhodamin B dilakukan pada konsentrasi 2 ppm yaitu sebesar 557 nm (gambar 8). Walaupun berbeda dengan yang ditetapkan

BPOM yaitu panjang gelombang sebesar 554 nm , perbedaan panjang gelombang sebesar lebih kurang 3 nm masih dapat ditoleransi (FI IV, 1995).

Pembuatan kurva baku Rhodamin B dilakukan dengan membuat larutan dengan 6 seri kadar konsentrasi yaitu 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 ppm, kemudian mengukur kadar serapannya pada panjang gelombang 557 nm. Hasil kurva kalibrasi dapat dilihat pada gambar 9. Perhitungan persamaan regresi kurva baku diperoleh persamaan $y = 0,1938x + 0,005$ dengan koefisien korelasi (r) 0,9938. Dari hasil tersebut dapat diaktakan terdapat korelasi yang positif antara kadar dan serapan, yang berarti semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula absorbansinya (Sudjana, 2002).

Penggunaan spektrofotometri pada analisa Rhodamin B dikarenakan Rhodamin B memiliki gugus kromofor yang mampu menyerap sinar tampak dan sinar UV. Sampel yang akan dianalisis menggunakan spektrofotometri terlebih dahulu disiapkan dengan cara merendam semalam sebanyak 5 gram sampel saus dengan 100 ml larutan amonia 2% dalam etanol 70 %, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* dengan suhu 65 °C selama 4 jam, pemekatan dilakukan untuk menguapkan pelarut. Langkah berikutnya menambahkan larutan basa kuat NaOH 10 % untuk mempertahankan struktur garam Rhodamin B dengan cara melepas gugus Cl^- . Larutan kemudian ditambahkan 30 ml aquades yang berfungsi sebagai fase polar.

Larutan kemudian dimasukan dalam corong pisah, kemudian ditambahkan dietil-eter 30 ml , tujuan penambahan dietil eter sebagai fase non polar adalah untuk mengikat garam Rhodamin B yang bersifat non polar, kemudian akan terbentuk dua fasa karena perbedaan kepolaran dimana fase bawah merupakan ekstrak eter dan fase atas berupa air yang berwarna merah. Ekstrak eter berada di fase bawah karena memiliki masa jenis yang lebih tinggi daripada fase air yang berada dibawah. Fase yang diambil adalah fase bawah, dan air merah dibuang (Putri, 2009).

Larutan yang didapat diekstrak dengan HCl 0,1 N. Fungsi penambahan HCl adalah untuk mengembalikan gugus Cl^- agar mengembalikan kepolarannya. Rhodamin B akan terikat pada fase asam yang berada di atas karena memiliki massa jenis yang lebih rendah daripada dietil eter. Larutan kemudian ditampung dalam labu takar 50 ml dan ditambahkan HCl 0,1 N sampai tanda tara. Larutan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 557 nm (daerah visibel).

Berdasarkan tabel 6, nilai absorbansi yang didapat pada sampel A sebesar 0,0145 sampel B 0,0269 dan sampel C 0,0757. Absorbansi yang didapat tidak menunjukkan adanya Rhodamin B karena tidak terletak pada rentang 0,2 – 0,8, bahkan setelah dilakukan proses pemekatan. Absorbansi yang terukur bisa disebabkan karena proses pemisahan dalam preparasi sampel yang tidak sempurna, sehingga ada kemungkinan senyawa lain seperti pewarna ponceau 4R Cl^- yang juga ada pada komposisi saus dan ikut terbaca absorbansinya pada panjang gelombang 557 nm (Komang Li, dkk, 2012).