

## **BAB II** **TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Bahan Tambahan Makanan**

Pada umumnya dalam pengolahan makanan selalu diusahakan untuk menghasilkan produk makanan yang disukai dan berkualitas baik (Widyaningsih, 2006). Bahan Tambahan Makanan secara umum didefinisikan sebagai bahan yang biasanya tidak digunakan sebagai makanan dan biasanya bukan merupakan komponen khas makanan, mempunyai atau tidak mempunyai nilai gizi, yang ditambahkan dengan sengaja ke dalam makanan untuk maksud teknologi pada pembuatan, pengepakan, pengemasan dan penyimpanan (Cahyadi, 2006).

Menurut Puspitasari (2001), Bahan Tambahan Pangan adalah senyawa (atau campuran berbagai senyawa) yang sengaja ditambahkan ke dalam makanan dan minuman dalam proses pengolahan, pengemasan dan penyimpanan dan bukan merupakan bahan (ingredient) utama.

Tujuan penggunaan Bahan Tambahan Makanan adalah dapat meningkatkan dan mempertahankan nilai gizi dan kualitas daya simpan, membuat bahan pangan lebih mudah dihidangkan, serta mempermudah preparasi bahan pangan.

Pada umumnya bahan tambahan pangan yang digunakan hanya dapat dibenarkan apabila (Puspitasari, 2001) dimaksudkan untuk mencapai masing-masing tujuan penggunaan dalam pengolahan, tidak digunakan untuk menyembunyikan penggunaan bahan yang salah atau tidak memenuhi syarat, tidak digunakan untuk menyembunyikan cara kerja yang bertentangan dengan cara produksi yang baik untuk pangan, tidak digunakan untuk menyembunyikan kerusakan bahan pangan.

## **2.2 Zat Pewarna**

Zat Pewarna adalah salah satu bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki atau memberi warna pada makanan. Penambahan pewarna makanan dimaksud untuk memperbaiki warna makanan yang berubah atau memucat selama proses pengolahan atau memberi warna pada makanan yang tidak bewarna agar kelihatan lebih menarik (Noviana, 2005). Adapun secara garis besar berdasarkan sumbernya dikenal dua jenis zat pewarna yang termasuk dalam golongan bahan tambahan pangan.

### **2.2.1 Pewarna Alami**

Pewarna alami adalah zat warna alami (pigmen) yang diperoleh dari tumbuhan, hewan, atau dari sumber-sumber mineral. Zat warna ini telah digunakan sejak dulu dan umumnya dianggap lebih aman dari pada zat warna sintetis, seperti annato sebagai sumber warna kuning alamiah bagi berbagai jenis makanan begitu juga tannin, antosianin, antoxantin, karoten dan klorofil, quonin, xanthon, heme, flavonoid. Dalam daftar FDA pewarna alami dan pewarna identik alami tergolong dalam “uncertified color additives” karena tidak memerlukan sertifikat kemurnian kimiawi. Keterbatasan pewarna alami adalah sering kali memberikan rasa dan flavor khas yang tidak diinginkan, konsentrasi pigmen rendah, keseragaman warna kurang baik dan spectrum warna tidak seluas pewarna sintetis. Sehingga secara kuantitas, dibutuhkan zat pewarna alami yang lebih banyak daripada zat pewarna sintetis untuk menghasilkan tingkat pewarnaan yang sama.

Tabel 1. Zat Pewarna Alami

Kelompok	Warna	Sumber
Karamel	Cokelat	Gula yang dipanaskan
Anthosianin	Jingga Merah Biru	Tanaman
Flavonoid	Tanpa kuning	Tanaman
Leucoanthosianin	Tidak bewarna	Tanaman
Tannin	Tidak bewarna	Tanaman
Batalain	Kuning, merah	Tanaman
Quinon	Kuning, hitam	Tanaman
Xanthon	Kuning	Tanaman
Karotenoid	Tanpa kuning merah	Tanaman/hewan
Klorofil	Hijau cokelat	Tanaman
Heme	Merah, cokelat	Hewan

(Sumber: Tranggiono dkk, 1989 dalam Cahyadi, 2006).

### 2.2.2 Pewarna Sintetis

Pewarna sintetis mempunyai keuntungan yang nyata dibandingkan pewarna alami, yaitu mempunyai kekuatan mewarnai yang lebih kuat, lebih seragam, lebih stabil, dan biasanya lebih murah. Berdasarkan rumus kimianya, zat warna sintetis dalam makanan menurut “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) dapat digolongkan dalam beberapa kelas yaitu : azo, triaril metana, quinolin, xantin dan indigoid (FAO Indonesia, 2007).

*Dyes* adalah zat warna yang larut dalam air sehingga larutannya menjadi berwarna dan dapat digunakan untuk mewarnai bahan. Biasanya diperjual-belikan dalam bentuk granula (butiran), cairan, campuran warna dan pasta. *Dyes* umumnya digunakan untuk mewarnai minuman berkarbonat, minuman ringan, roti, dan kue-kue produk susu, pembungkus sosis dan lain-lain. Zat warna ini stabil untuk berbagai macam penggunaan dalam bahan pangan. Dalam bentuk kering tidak memperlihatkan adanya kerusakan.

Sedangkan *Lakes* adalah pigmen yang dibuat melalui pengendapan dari penyerapan *dye* pada bahan dasar. Produk-produk makanan yang kadar airnya terlalu rendah untuk dapat melarutkan *dye* biasanya menggunakan *lakes*, misalnya untuk pelapisan tablet, campuran adonan kue, cake dan donat. Dibandingkan dengan *dyes*, maka *lakes* pada umumnya bersifat lebih stabil terhadap cahaya, kimia dan panas sehingga harga *lakes* umumnya lebih mahal daripada harga *dyes*.

Beberapa alasan utama penambahan zat pewarna pada makanan, yaitu (Syah, 2005) untuk menutupi perubahan warna akibat paparan cahaya, udara atau temperatur yang ekstrim akibat proses pengolahan dan penyimpanan, memperbaiki variasi alami warna. Produk pangan yang “salah warna” akan diasosiasikan dengan kualitas rendah. Jeruk yang matang di pohon misalnya, sering disemprot pewarna Citrus Red No 2 untuk memperbaiki warnanya yang hijau atau orange kecoklatan. Tujuan penambahan warna untuk menutupi kualitas yang buruk sebetulnya tidak bisa diterima apalagi menggunakan pewarna yang berbahaya, membuat identitas produk pangan, menarik minat konsumen dengan pilihan warna yang menyenangkan, untuk menjaga rasa dan vitamin yang mungkin akan terpengaruh sinar matahari selama produk disimpan.

Di negara-negara yang telah maju, suatu zat sintetik harus melalui berbagai prosedur pengujian sebelum dapat digunakan sebagai zat pewarna makanan. Zat pewarna yang diijinkan penggunaannya dalam makanan dikenal sebagai *certified color*. Untuk penggunaan zat warna tersebut harus dapat menjalani tes dan prosedur penggunaan yang disebut proses sertifikasi (Setiawan, 2011).

Proses sertifikasi ini meliputi pengujian kimia, biokimia, toksikologi, dan analisis media terhadap zat warna tersebut. Proses pembuatan zat pewarna sintetik biasanya melalui perlakuan pemberian asam sulfat atau asam nitrat yang sering kali terkontaminasi oleh arsen atau logam berat lain yang bersifat racun. Pada pembuatan zat pewarna organik sebelum mencapai produk akhir, harus melalui suatu senyawa dahulu yang terkadang berbahaya dan sering kali tertinggal dalam hasil akhir, atau terbentuk senyawa-senyawa baru yang berbahaya (Setiawan, 2011).

Tabel 2. Zat Pewarna Sintetis yang Diizinkan di Indonesia

Pewarna		Nomor indeks warna(C.I.No.)	Batas Maksimum Penggunaan
Amaran	Amaranth:CL food red 9	16185	Secukupnya
Biru berlian	Berliant blue FCF	42090	Secukupnya
	Food red 2	45430	Secukupnya
	Erithrosin:CL	42053	Secukupnya
Hijau FCF	Food Red 14 Fast Green	42053	Secukupnya
	FCF:CL		
Hijau S	Food Green 3 Green	44090	Secukupnya
	S:CL Food		
Indigotin	Green 4 Inodigotin:CL	73015	Secukupnya
	Food		
Ponceau 4R	Blue 1 Ponceau 4R:CL	16255	Secukupnya
	Food		
Kuning	Foodred 7	74005	Secukupnya
Kuinelin	Quineline yellow	15980	Secukupnya
	CL Food yellow		
Kuning FCF	Sunset yellow FCF	-	Secukupnya
	CL Food yellow 3		
Riboflavina	Riboflavina	19140	Secukupnya
Tartrazine	Tartrazine		Secukupnya

(Sumber : Peraturan Menkes RI, Nomor 722/Menkes/Per/IX/88)

Ada beberapa zat pewarna yang dilarang dan dinyatakan berbahaya karena dapat menimbulkan efek yang merugikan bagi kesehatan menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI No.239/Menkes/Per/V/1985 seperti pada tabel 3.

Tabel 3. Zat pewarna yang dilarang dan dinyatakan berbahaya menurut Permenkes RI No.239/ Menkes/Per/V/1985

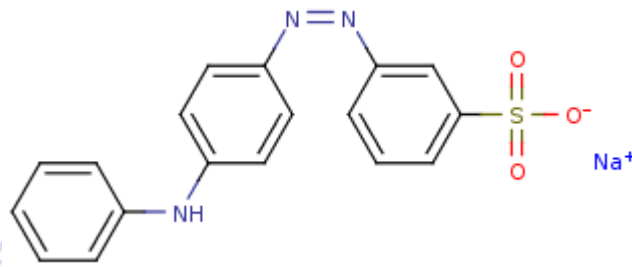
Nama	No. Indeks Warna (C.I No)
Auramin (C.I Basic Yellow 2)	41000
Alkaret	75520
Butter yellow(C.I Solvet Yellow 2)	11020
Black 7984 (Food Black 2)	27755
Blum Umber (Pigment Brown 7)	77491
Cherysoidin (C.I Food Yellow)	11270
Citrus Red	14270
Fast Red E (C.I Food Yellow 2)	12150
Fast Yellow AB (C.I Food Yellow no.3)	16045
Guinea Green B (C.I Acid Green no.3)	13015
Indrantherene Blue RS (C.I Food Blue 4)	42085
Magenta (C.I Basic Violet 4)	69800
Methanyl Yellow (P & C Yellow no.1)	42516
Oil Orange SS (C.I Solvent Orange 2)	13065
Oil Orange XO (C.I Solvent Orange 7)	12100
Oil Orange AB (C.I Solvent Orange 5)	12140
Oil Orange OB (C.I Solvent Orange 6)	11390
Orange G (C.I Food Orange 4)	16230
Orange GGN (C.I Food Orange 4)	15980
Orange RN (Food Orange 1)	15370
Ponceau 3R (C.I Food Red 6)	16155
Ponceau 9X (C.I Food Red 12)	14700
Ponceau 6R (C.I Food Red 8)	16290
Rhodamin B (C.I Food Red 15)	45170
Sudan 1 (C.I Solvent Yellow 14)	12055
Scarlet (C.I Food Red 2)	14815
Violet 613	42640

(Sumber : Depkes RI,1985)

### 2.3 Zat Pewarna Methanyl yellow

Methanyl yellow merupakan bahan pewarna sintetik berupa serbuk yang bewarna kuning kecoklatan. Senyawa methanyl yellow suatu azo amin aromatic yang memiliki bobot molekul 375,38 g/mol dan rumus molekul  $C_{18}H_{14}N_4NaO_3S$ . Beberapa sifat methanyl yellow, antara lain adalah dapat larut dalam air dan alkohol, agak larut dalam aseton serta dapat larut dalam benzene dan eter. Pewarna ini memiliki beberapa nama sinonim, yaitu Acidic metanil yellow, Acid

yellow 36, Brasilan metanil yellow, C.I.13056, C.I Acid yellow, 36 monosodium salt, Metanile yellow O, Diacid methanyl yellow, Eniacid metanil yellow GN, R-3230, R-3240, 568 dan 56827. Struktur methanyl yellow dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur Methanyl yellow  
(Sumber: <http://www.gambar-struktur-metanil-yellow.com>)

Pewarna methanyl yellow tidak boleh digunakan sebagai pewarna makanan. Pewarna ini banyak digunakan sebagai pewarna tekstil, cat kayu, cat lukis, wool, nilon, kulit, kertas, aluminium, detergen, kayu, bulu dan kosmetik. Akan tetapi, para produsen yang tidak bertanggung jawab menggunakan methanyl yellow sebagai pewarna makanan karena dapat menghasilkan warna kuning cerah yang menarik. Produk yang sering ditambahkan metanil yellow adalah minuman, sirup, pisang goreng dan manisan buah.

Bahan untuk membuat methanyl yellow adalah dari asam metanilat dan difenilamin. Bahan-bahan tersebut bersifat toksik sehingga bila masuk kedalam tubuh manusia dalam waktu lama, maka akan terjadi gangguan kesehatan seperti timbulnya tumor dalam jaringan hati, kandung kemih, saluran pencernaan atau jaringan kulit.

Dalam proses pembuatan pewarna sintetis biasanya dilakukan pemberian asam sulfat atau asam nitrat yang sering kali terkontaminasi oleh arsen atau logam berat lainnya. Tentu saja logam berat tersebut bersifat toksik, jika dikonsumsi

secara terus-menerus dalam waktu lama. Kadar arsen yang aman dalam pewarna tidak boleh lebih dari 0.00014% dan timbul tidak boleh lebih dari 0.001%, sedangkan logam berat lainnya tidak boleh ada.

Apabila methanyl yellow terhirup mengenai kulit, mengenai mata dan tertelan, maka efek negatif akan timbul di tempat-tempat masuknya tadi. Efek negatif tersebut dapat berupa iritasi pada saluran pernafasan, iritasi pada kulit, iritasi pada mata dan bahaya kanker pada kandungan dan saluran kemih. Jika methanyl yellow tertelan, maka gejala yang akan timbul antara lain mual, muntah, sakit perut, diare, panas, rasa tidak enak dan tekanan darah rendah. Methanyl yellow juga bertindak sebagai agen pencetus tumor.

#### **2.4 Efek Penggunaan Zat Pewarna Sintetik Terhadap Kesehatan**

Penggunaan zat pewarna dalam makanan akan berdampak positif dan negatif. Dampak positif yang bisa dirasakan oleh produsen dan konsumen diantaranya adalah mengendalikan warna asli suatu produk makanan yang rusak atau pudar akibat proses pengolahan, memperbaiki warna yang kurang menarik, member warna yang seragam pada produk yang diolah pada waktu yang berlainan serta untuk menarik perhatian konsumen.

Selain memberikan dampak positif, penggunaan zat pewarna juga dapat memberikan dampak negatif terhadap kesehatan konsumen. Seperti penelitian yang dilakukan oleh peneliti Rusia, M.M Andrianova, menemukan bahwa pewarna merah No 2 (FD & C Merah No.2) menyebabkan timbulnya kanker pada tikus. Zat warna kuning No.5 juga dianggap dapat mengganggu kesehatan, dengan menjadi penyebab resiko alergi terutama orang-orang yang peka terhadap aspirin.



Sedangkan menurut lembaga pembinaan dan perlindungan konsumen (LP2K). Penggunaan zat pewarna pada makanan secara tidak bertanggung jawab akan mengakibatkan kemunduran kerja otak, sehingga anak-anak menjadi malas sering pusing dan menurunnya konsentrasi belajar (Sastrawijaya, 2000).

Pada saat ini penggunaan pewarna sintesis sudah meluas di masyarakat tetapi ketidaktahuan masyarakat akan peraturan atau dosis penggunaan zat warna, tak jarang menimbulkan penyalahgunaan, sering dijumpai jenis pewarna non pangan, seperti Methanyl yellow, Auramin dan Rhodamin B ternyata banyak digunakan oleh masyarakat. Padahal hasil penelitian pada hewan percobaan dipastikan bahwa ketiga pewarna diatas dapat menimbulkan efek toksik karena adanya residu logam berat pada zat pewarna tersebut.

Hal - hal yang mungkin memberikan dampak negatif tersebut terjadi bila pewarna sintetis ini dimakan dalam jumlah kecil namun berulang, bahan pewarna sintetis ini dimakan dalam jangka waktu yang lama, kelompok masyarakat luas dengan daya tahan yang berbeda-beda yaitu tergantung pada umur, jenis kelamin, berat badan, mutu makanan sehari-hari dan keadaan fisik, berbagai masyarakat yang mungkin menggunakan bahan pewarna sintetis secara berlebihan, penyimpanan bahan pewarna sintetis oleh pedagang bahan kimia yang tidak memenuhi persyaratan.

Adapun senyawa-senyawa daripada zat pewarna dibawa ke dalam darah melalui berbagai bentuk antara lain sebagai molekul yang tersebar bebas dan melarut di dalam plasma, sebagai molekul-molekul yang tersebar terikat dengan protein dalam serum, sebagai molekul bebas dan terikat dengan eritrosit dan unsur-unsur pembentuk darah. Absorpsi zat pewarna di dalam tubuh diawali dari

dalam saluran pencernaan dan sebagian dapat mengalami metabolisme oleh mikro organisme dalam usus. Dari saluran pencernaan dibawa langsung ke hati melalui vena portal atau melalui sistem limfatik ke vena superior. Di hati senyawa dimetabolisme dan dikongjugasi, kemudian di transportasikan ke ginjal untuk di ekskresikan atau dikeluarkan bersama urine (Noviana, 2005).

## **2.5 Zat Karsinogen Penyebab Kanker**

Zat Karsinogen adalah zat yang menyebabkan penyakit kanker. Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan tidak terkendali sel tubuh tertentu yang berakibat merusak sel dan jaringan tubuh lain, bahkan sering berakhir dengan kematian. Karena sifatnya ganas (tumbuh tak terkendali dan berakibat kematian), maka kanker juga disebut sebagai penyakit keganasan, dan sel kanker disebut juga sel ganas. Semua sel tubuh dapat terkena kanker, kecuali rambut, gigi dan kuku (Henry, 2007). Kanker merupakan penyakit atau kelainan pada tubuh sebagai akibat dari sel-sel tubuh yang tumbuh dan berkembang abnormal, diluar batas kewajaran dan sangat liar. Keadaan kanker terjadi jika sel-sel normal berubah dengan pertumbuhan yang sangat cepat, sehingga tidak dapat dikendalikan oleh tubuh dan tidak berbentuk. Kanker dapat terjadi disetiap bagian tubuh. Bila kanker terjadi di bagian permukaan tubuh, akan mudah diketahui dan diobati. Namun bila terjadi di dalam tubuh, kanker itu akan sulit diketahui dan kadang-kadang tidak memiliki gejala. Adapun timbul gejala, biasanya sudah stadium lanjut sehingga sulit diobati (Iskandar, 2007).

Dalam keadaan normal, sel hanya akan membelah diri bila tubuh membutuhkannya seperti mengganti sel-sel yang rusak atau mati. Sebaliknya, sel kanker akan membelah diri meskipun tidak dibutuhkan sehingga terjadi kelebihan

sel-sel baru. Kanker dapat tumbuh di semua sel jaringan tubuh, seperti sel kulit, sel hati, sel darah, sel otak, sel lambung, sel usus, sel paru, sel saluran kencing, dan berbagai macam sel tubuh lainnya. Oleh karena itu, dikenal bermacam-macam jenis kanker menurut sel atau jaringan asalnya. Keadaan ini yang menyebabkan adanya perbedaan kecepatan pertumbuhannya maupun reaksi terhadap pengobatan (Dalimartha, 2004).

### **2.5.1 Mekanisme terjadinya kanker**

Sebagian besar bukti mengisyaratkan bahwa pembentukan kanker merupakan suatu proses bertingkat yang membutuhkan lamanya waktu lama, yang disebut teori inisiasi-promosi pada karsinogenesis. Sel-sel kanker terbentuk dari sel-sel normal dalam suatu proses kompleks yang disebut transformasi yang terdiri dari tahap inisiasi dan promosi (Iskandar, 2007). Teori inisiasi - promosi menyatakan bahwa langkah pertama karsinogenesis adalah mutasi menetap dari DNA sel selama transkripsi DNA. Agar kanker dapat terbentuk dari kejadian awal ini atau mutasi menetap ini, maka harus ada interaksi yang berlangsung lama bagi sel tersebut dengan berbagai zat promoter. Zat-zat promoter adalah zat yang merangsang reproduksi dan pembelahan sel. Jadi, banyaknya penyebab inisiasi, adanya berbagai promoter, faktor keturunan, umur dan lingkungan semua itu berperan dalam pembentukan kanker (Iskandar, 2007). Pada tahap inisiasi atau pengenalan terjadi suatu perubahan menetap tertentu dalam bahan genetik sel yang memancing sel bakal menjadi ganas. Perubahan dalam bahan genetik sel ini disebabkan oleh suatu agen yang disebut karsinogen. Karsinogen secara umum dapat diartikan sebagai penyebab yang dapat merangsang pembentukan kanker. Beberapa karsinogen yang diduga dapat meningkatkan risiko terjadinya kanker

senyawa kimia (zat karsinogen), dalam hal ini adalah zat pewarna, zat pengawet, bahan tambahan pada makanan dan minuman.

Namun, tidak semua sel memiliki kepekaan yang sama terhadap suatu karsinogen (Iskandar, 2007). Promosi merupakan proses induksi tumor pada sel yang sebelumnya telah diinisiasi atau diinduksi oleh zat kimia. Bahkan gangguan fisik menahun pun bisa membuat sel menjadi lebih peka untuk mengalami suatu keganasan. Pada tahap promosi, suatu sel yang telah mengalami inisiasi akan berubah menjadi ganas. Sel yang belum melewati tahap inisiasi tidak akan terpengaruh oleh promosi. Karena itu diperlukan beberapa faktor untuk terjadinya keganasan (gabungan dari sel yang peka dan suatu karsinogen) (Iskandar, 2007).

Dalam suatu proses sebuah sel normal menjadi sebuah sel ganas, pada akhirnya gen DNA (desoksiribonukleid acid) dari sel tersebut akan mengalami perubahan. Perubahan dalam bahan genetik sel sering sulit ditemukan, tetapi terjadinya kanker kadang dapat diketahui dari adanya suatu perubahan dalam ukuran atau bentuk dari satu kromosom tertentu. Semakin sering DNA membelah dan ditranskripsi, semakin besar kemungkinan terjadinya suatu kesalahan, dan kesalahan yang tidak terdeteksi akan bermutasi dan diwariskan (Iskandar, 2007).

### **2.5.2 Pertumbuhan dan penyebaran (Metastasis)**

Kanker tumbuh dan berkembang secara bertahap. Pertumbuhannya dimulai ketika satu sel dari sekian banyak sel normal tiba-tiba mengalami mutasi genetik. Sel tersebut kemudian berkembang dan membelah diri. Beberapa tahun kemudian, sel tersebut mengalami mutasi lagi yang menyebabkan pertumbuhan dan ukuran sel menjadi abnormal. Keadaan ini disebut fase dysplasia. Fase dysplasia terus berkembang mulai dari dysplasia ringan, sedang, berat, dan

akhirnya akan menjadi kanker insitu, yaitu kanker yang belum menembus batas jaringan tempat kanker tersebut tumbuh. Beberapa tahun kemudian, sel kanker dapat menembus jaringan basal dan menyusup ke jaringan sekitarnya. Keadaan ini dinamakan kanker invasive . Sel kanker juga dapat melepaskan diri dari tempat asalnya dan menembus pembuluh darah atau pembuluh getah bening. Kemudian bersama dengan aliran darah atau getah bening, sel kanker terbawa kebagian lain dari tubuh. Ditempat yang baru, sel-sel kanker akan tumbuh dengan sifat-sifat yang sama dengan kanker induknya. Penyebaran kanker ke jaringan tubuh yang lainnya ini dinamakan anak sebar (metastasis) (Delimartha, 2003).

## **2.6 Analisis Zat Pewarna Sintetik**

Pada laboratorium analisis pewarna pangan sudah rutin dilakukan dengan berbagai metode, tehnik dan cara. Sebagian besar analisis berdasarkan suatu prinsip kromatografi ataupun menggunakan alat spektrofotometer. Cara tersebut digunakan untuk mendeteksi zat pewarna secara teliti, karena itu minimal diperlukan fasilitas serta tersedianya pelarut organik yang biasanya cukup mahal harganya dan tehnik ini memerlukan waktu yang cukup lama (Cahyadi, 2006).

## **2.7 Kromatografi Kertas**

Berbagai jenis pemisahan yang sederhana dengan kromatografi kertas telah dikerjakan dimana proses dikenal sebagai analisa kapiler. Kromatografi kertas atau KKt pada hakekatnya adalah KLT pada lapisan tipis selulosa atau kertas. Cara ini ditemukan jauh sebelum KLT dan tetap dipakai secara efektif selama bertahun-tahun untuk pemisahan molekul biologi seperti asam amino, gula dan nukleotida. KKt tidak memerlukan pelat pelindung dan kertas dapat mudah diperoleh dengan dalam bentuk murni sebagai kertas saring. Lapisan selulosa

harus dicetak lebih panjang dari pada serabut pada lapisan selulosa yang lazim, menyebabkan lebih banyak terjadi difusi kesamping dan bercak lebih besar. Akhirnya lapisan selulosa lebih rapat dan pelarut lebih cenderung mengalir melaluinya lebih cepat menghasilkan pemisahan lebih tajam (Roy, 1991).

Mekanisme pemisahan dengan kromatografi kertas prinsipnya sama dengan mekanisme pada kromatografi kolom. Adsorben dalam kromatografi kertas adalah kertas saring, yakni selulosa. Sampel yang akan dianalisis ditotolkan ke ujung kertas yang kemudian digantung dalam wadah. Kemudian dasar kertas saring dicelupkan kedalam pelarut yang mengisi dasar wadah. Fase gerak (pelarut) dapat saja beragam. Air, etanol, asam asetat atau campuran zat-zat ini dapat digunakan. Kromatografi kertas diterapkan untuk analisis campuran asam amino dengan sukses besar. Karena asam amino memiliki sifat yang sangat mirip, dan asam-asam amino larut dalam air dan tidak mudah menguap. Maka, penemuan kromatografi kertas merupakan berita sangat baik bagi mereka. Kimiawan Inggris Richard Laurence Millington Synge (1914-1994) adalah orang pertama yang menggunakan metode analisis asam amino dengan kromatografi kertas. Saat campuran asam amino menaiki lembaran kertas secara vertikal karena ada fenomena kapiler, partisi asam amino antara fase gerak dan fase diam (air) yang terabsorpsi pada selulosa berlangsung berulang-ulang. Ketika pelarut mencapai ujung atas kertas proses dihentikan. Setiap noda bergerak dari titik awal sepanjang jarak tertentu.

Menurut Sastrohamidjojo, (1991) menyatakan bahwa apabila akan melakukan pemisahan dengan kromatografi kertas maka hal-hal seperti berikut perlu mendapatkan perhatian. Ada beberapa metode dalam pemisahan dengan

kromatografi kertas diantaranya : Metode penurunan yaitu berupa bejana yang terbuat dari gelas, platina atau logam tahan karat yang di atasnya ditutup untuk mencegah dari pelarut, untuk menyangga agar kertas tak lepas perlu diberi penahan dari batang gelas, untuk beberapa centimeter pelarut mengalir oleh gaya kapiler dan mengalir oleh gravitasi setelah permukaan pelarut melintasi batang gelas. Metode penaikan bejana yang digunakan untuk kromatografi penaikan sama seperti untuk kromatografi penurunan, tetapi pelarut diletak dibagian bawah bejana dan kertas dicelupkan di atasnya.

Kromatografi kertas menggunakan kertas saring Whatman no. 1 dan sampai saat ini masih dipakai. Kertas dalam pemisahan terutama mempunyai pengaruh pada kecepatan alir pelarut. Sedangkan fungsi dari kertas sendiri sangat kompleks tetapi aliran pelarut pada suhu yang tertentu, ditentukan oleh kerapatan dan tebalnya kertas. Fase bergerak biasanya merupakan campuran yang terdiri atas satu komponen organik yang utama, air dan berbagai tambahan seperti asam-asam, basa atau pereaksi-pereaksi kompleks untuk memperbesar kelarutan dari beberapa senyawa atau untuk mengurangi yang lainnya. Pelarut harus sangat mudah menguap, karena terlampaui cepat mengadakan kesetimbangan, pada keadaan yang lain volalitas yang tinggi mengakibatkan lebih cepat hilang meninggalkan lembaran kertas setelah bergerak. Kecepatan Bergeraknya harus tidak cepat dipengaruhi oleh perubahan suhu, penambahan air terhadap pelarut akan menyebabkan senyawa-senyawa tersebut untuk bergerak. Jadi n-butanol bukan merupakan suatu pelarut untuk asam-asam amino jika tidak dijenuhkan dengan air penambahan asam cuka disertai dengan pemberian lebih banyak air akan menjadi baik, yaitu akan menaikkan kelarutan dari asam-asam amino

terutama yang bersifat basa, campuran tiga komponen ini sangat baik untuk senyawa-senyawa asam amino.

Larutan campuran yang akan dipisahkan ditempatkan pada kertas yang berupa noda. Biasanya dibiarkan untuk berkembang membentuk suatu bulatan . Menurut Sastrohamidjojo, (1991) menyatakan bahwa dalam mengidentifikasi noda-noda dalam kertas sangat lazim menggunakan harga Rf (retordation factor) yaitu merupakan parameter karakteristik kromatografi kertas untuk mengukur kecepatan migrasi suatu senyawa pada komatogram yang dirumuskan sebagai :

$$Rf = \frac{\text{Jarak gerak zat terlarut}}{\text{Jarak gerak zat pelarut}}$$

Ada beberapa faktor yang menentukan harga Rf yaitu diantaranya adalah : Pelarut, disebabkan pentingnya koefisien partisi, maka perubahan-perubahan yang sangat kecil dalam komposisi pelarut dapat menyebabkan perubahan-perubahan harga Rf. Suhu, perubahan dalam suhu merubah koefisien partisi dan juga kecepatan aliran. Ukuran dari bejana, volume dari bejana mempengaruhi homogenitas dari atmosfer jadi mempengaruhi kecepatan penguapan dari komponen-komponen pelarut dari kertas. Kertas, pengaruh utama kertas pada harga Rf timbul dari perubahan ion dan serapan, yang berbeda untuk macam-macam kertas. Kertas mempengaruhi kecepatan aliran. ia akan juga mempengaruhi pada kesetimbangan partisi. Sifat dari campuran berbagai senyawa mengalami partisi dan antara volume-volume yang sama dari fase tetap dan bergerak. Mereka hampir selalu mempengaruhi karakteristik dari kelarutan satu terhadap yang lainnya hingga harga Rf nya.