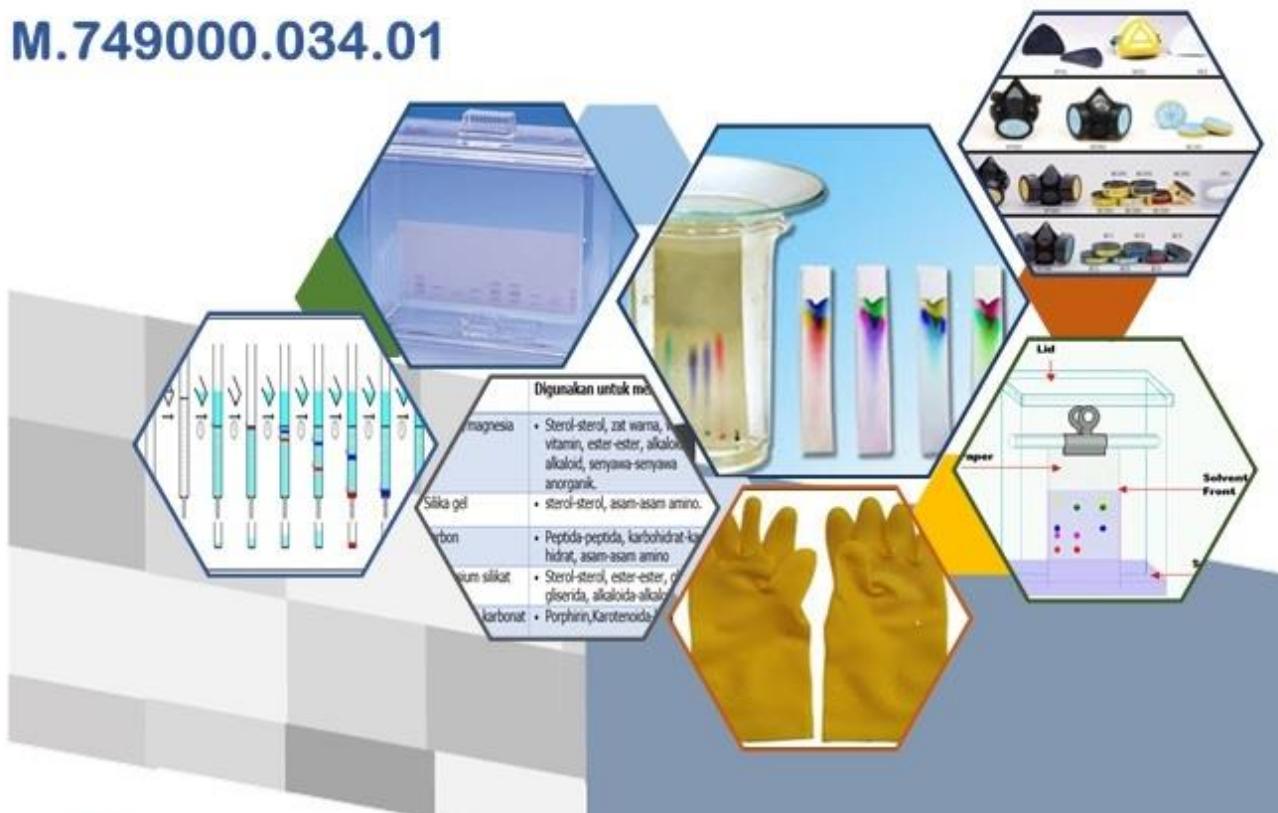


**BUKU INFORMASI  
MELAKSANAKAN ANALISIS SECARA  
KROMATOGRAFI KONVENTSIONAL  
MENGIKUTI PROSEDUR**

**M.749000.034.01**



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
DIREKTORAT JENDERAL GURU DAN TENAGA KEPENDIDIKAN  
**PUSAT PENGEMBANGAN DAN PEMBERDAYAAN PENDIDIK DAN  
TENAGA KEPENDIDIKAN PERTANIAN**

## KATA PENGANTAR

Modul pengembangan keprofesian berkelanjutan (PKB) berbasis kompetensi merupakan salah satu media pembelajaran yang dapat digunakan sebagai media transformasi pengetahuan, keterampilan dan sikap kerja kepada peserta pelatihan untuk mencapai kompetensi tertentu berdasarkan program pelatihan yang mengacu kepada Standar Kompetensi.

Modul pelatihan ini berorientasi kepada pelatihan berbasis kompetensi (*Competence Based Training*) diformulasikan menjadi 3 (tiga) buku, yaitu Buku Informasi, Buku Kerja dan Buku Penilaian sebagai satu kesatuan yang tidak terpisahkan dalam penggunaanya sebagai referensi dalam media pembelajaran bagi peserta pelatihan dan instruktur, agar pelaksanaan pelatihan dapat dilakukan secara efektif dan efisien. Untuk memenuhi kebutuhan pelatihan berbasis kompetensi tersebut, maka disusunlah modul pelatihan berbasis kompetensi dengan judul **“Melaksanakan Analisis Secara Kromatografi Konvensional Mengikuti Prosedur”**.

Kami menyadari bahwa modul yang kami susun ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kami sangat mengharapkan saran dan masukan untuk perbaikan agar tujuan dari penyusunan modul ini menjadi lebih efektif.

Demikian kami sampaikan, semoga Tuhan YME memberikan tuntunan kepada kita dalam melakukan berbagai upaya perbaikan dalam menunjang proses pelaksanaan pembelajaran di lingkungan direktorat guru dan tenaga kependidikan.

Jakarta, .....2018

**DAFTAR ISI**

KATA PENGANTAR .....	i
DAFTAR ISI .....	ii
DAFTAR GAMBAR .....	iv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Tujuan Umum .....	1
B. Tujuan Khusus .....	1
BAB II. MENYIAPKAN ANALISIS.....	2
A. Pengetahuan yang diperlukan dalam menyiapkan analisis.....	2
1. Jenis Alat Pelindung Diri yang Dikenakan .....	2
2. Metode Uji Kromatografi dan Peralatan Pendukung .....	3
3. Penyiapan bahan standar, bahan kimia, dan sampel.....	9
4. Menyiapkan Fasa diam dan Fasa Gerak .....	12
B. Keterampilan yang diperlukan dalam menyiapkan Analisis .....	18
C. Sikap kerja yang diperlukan dalam menyiapkan Analisis .....	18
BAB III. MELAKUKAN ANALISIS KROMATOGRAFI KONVENTSIONAL .....	19
A. Pengetahuan yang diperlukan dalam melakukan Analisis Kromatografi Konvensional .....	19
1. Mengenakan Alat Pelindung Diri (APD) .....	19
2. Mengoperasikan Alat Kromatografi sesuai dengan Panduan Pengoperasian Alat.....	24
3. Mengaplikasikan Standar dan Sampel ke Sistem Pemisahan sesuai prosedur.....	31
4. Proses Pemisahan sesuai Prosedur .....	33
5. Proses Hasil Pemisahan dan Pengukuran sesuai Prosedur .....	56
6. Penyimpanan kembali Peralatan dan Bahan sesuai Prosedur.....	64
B. Keterampilan yang diperlukan dalam Melakukan Analisis Kromatografi Konvensional .....	67
C. Sikap kerja yang diperlukan dalam Melakukan Analisis Kromatografi Konvensional .....	67

Modul Diklat Berbasis Kompetensi Sub-Golongan : Analisis Kimia	Kode Modul M.749000.034.01																		
<table> <tr> <td style="width: 70%;"><b>BAB IV. MELAPORKAN HASIL ANALISIS.....</b></td> <td style="text-align: right;"><b>68</b></td> </tr> <tr> <td>A. Pengetahuan yang diperlukan dalam Melaporkan Hasil Analisis .....</td> <td style="text-align: right;">68</td> </tr> <tr> <td>    1. Pengolahan Data Hasil Analisis.....</td> <td style="text-align: right;">68</td> </tr> <tr> <td>    2. Pelaporan Hasil Analisis .....</td> <td style="text-align: right;">71</td> </tr> <tr> <td>B. Keterampilan yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan pembuatan larutan pereaksi .....</td> <td style="text-align: right;">71</td> </tr> <tr> <td>C. Sikap kerja yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan pembuatan larutan pereaksi .....</td> <td style="text-align: right;">72</td> </tr> <tr> <td><b>DAFTAR PUSTAKA.....</b></td> <td style="text-align: right;"><b>73</b></td> </tr> <tr> <td><b>DAFTAR ALAT DAN SAMPEL .....</b></td> <td style="text-align: right;"><b>Error! Bookmark not defined.</b></td> </tr> <tr> <td><b>DAFTAR PENYUSUN .....</b></td> <td style="text-align: right;"><b>74</b></td> </tr> </table>		<b>BAB IV. MELAPORKAN HASIL ANALISIS.....</b>	<b>68</b>	A. Pengetahuan yang diperlukan dalam Melaporkan Hasil Analisis .....	68	1. Pengolahan Data Hasil Analisis.....	68	2. Pelaporan Hasil Analisis .....	71	B. Keterampilan yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan pembuatan larutan pereaksi .....	71	C. Sikap kerja yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan pembuatan larutan pereaksi .....	72	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>73</b>	<b>DAFTAR ALAT DAN SAMPEL .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>	<b>DAFTAR PENYUSUN .....</b>	<b>74</b>
<b>BAB IV. MELAPORKAN HASIL ANALISIS.....</b>	<b>68</b>																		
A. Pengetahuan yang diperlukan dalam Melaporkan Hasil Analisis .....	68																		
1. Pengolahan Data Hasil Analisis.....	68																		
2. Pelaporan Hasil Analisis .....	71																		
B. Keterampilan yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan pembuatan larutan pereaksi .....	71																		
C. Sikap kerja yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan pembuatan larutan pereaksi .....	72																		
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>73</b>																		
<b>DAFTAR ALAT DAN SAMPEL .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>																		
<b>DAFTAR PENYUSUN .....</b>	<b>74</b>																		
<p>Judul Modul : Melaksanakan Analisis secara Kromatografi Konvensional mengikuti Prosedur Buku Informasi - Versi 2018</p>																			
Halaman: <b>iii</b> dari <b>80</b>																			

## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. (a) Sarung tangan kain, (b) Sarung tangan asbes (c) Sarung tangan karet	22
Gambar 2. Jas laboratorium	23
Gambar 3. Masker	24
Gambar 4. Berbagai jenis respirator dan filter	24
Gambar 5. Chamber tertutup.	25
Gambar 6. Chamber/Bejana.	26
Gambar 7. Penololan senyawa pada kertas kromatografo dimasukkan ke dalam chamber	26
Gambar 8. Pelarut Bergerak Hampir Seluruhnya Ke Atas	27
Gambar 9. Pemisahan Suatu Campuran Dengan Kolom Kromatografi Dan Jalur-Jalur Serapan	28
Gambar 10. Chamber dan Plat pada KLT	30
Gambar 11. a. Sebelum Disemprot Dengan Ninhidrin, b. Setelah Disemprot Dengan Ninhidrin.	34
Gambar 12. Kromatografi Pita/Noda.	35
Gambar 13. Kromatografi Dua arah	36
Gambar 14. Rangkaian Proses Kromatografi Kolom	46
Gambar 15. Hasil pemisahan zat dengan kromatografi kertas	57
Gambar 16. Hasil Pemisahan Suatu Senyawa Dengan KLT	59
Gambar 17. Kode-Kode Warna-Warna Yang Terdapat Pada Bercak Plat Kromatogram	60

## **BAB I.**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Tujuan Umum**

Setelah mempelajari modul ini peserta diharapkan mampu melaksanakan analisis secara kromatografi konvensional.

#### **B. Tujuan Khusus**

Adapun tujuan mempelajari unit kompetensi melalui buku Melaksanakan Analisis secara Kromatografi Konvensional ini guna memfasilitasi peserta sehingga pada akhir diklat diharapkan memiliki kemampuan sebagai berikut:

1. Menyiapkan analisis secara kromatografi konvensional meliputi kegiatan mengenakan alat pelindung diri, menyiapkan metode uji kromatografi dan peralatan pendukung, menyiapkan bahan standar, bahan kimia dan sampel, serta menyiapkan fase diam dan fase gerak mengikuti prosedur analisis.
2. Melakukan analisis secara kromatografi konvensional yang meliputi kegiatan mengenakan alat pelindung diri, mengoperasikan alat kromatografi, mengaplikasikan standar dan sampel ke sistem pemisahan, melakukan proses pemisahan, memproses hasil pemisahan dan pengukuran, serta menyimpan kembali semua peralatan dan bahan.
3. Melaporkan hasil analisis yang meliputi kegiatan mengolah data hasil analisis dan melaporkan hasil analisis.

## **BAB II.**

### **MENYIAPKAN ANALISIS**

#### **A. Pengetahuan yang diperlukan dalam menyiapkan analisis**

##### **1. Jenis Alat Pelindung Diri yang Dikenakan**

Pada saat menyiapkan analisis untuk melaksanakan analisis secara kromatografi konvensional diharuskan mengenakan alat pelindung diri (APD). APD yang dikenakan dalam menyiapkan analisis adalah jas lab, sarung tangan dan masker. APD tersebut dikenakan sesuai prosedur dan digunakan dengan baik, benar dan lengkap.

Mengenakan alat pelindung diri tersebut bertujuan untuk melindungi pemakainya selama melaksanakan pekerjaan, sehingga dapat mengisolasi tubuh atau bagian tubuh dari bahaya serta dapat memperkecil akibat/resiko yang mungkin timbul. Selain itu mengenakan APD adalah untuk menjamin keselamatan dirinya dan aspek perilaku petugas sendiri terhadap disiplin pemakaian alat pelindung diri (APD), sehingga APD harus dikenakan sesuai prosedur. APD yang dipilih hendaknya memenuhi ketentuan sebagai berikut:

- a. Dapat memberikan perlindungan terhadap bahaya
- b. Berbobot ringan
- c. Dapat dipakai secara fleksibel (tidak membedakan jenis kelamin)
- d. Tidak menimbulkan bahaya terhadap sampel
- e. Tidak mudah rusak
- f. Memenuhi ketentuan dari standar yang ada
- g. Pemeliharaan mudah
- h. Penggantian suku cadang mudah
- i. Tidak membatasi gerak
- j. Rasa "tidak nyaman" tidak berlebihan (rasa tidak nyaman tidak mungkin hilang sama sekali, namun diharapkan masih dalam batas toleransi)

Ketentuan mengenakan Alat Pelindung Diri adalah:

- a. Alat pelindung diri harus disediakan bagi pekerja di laboratorium secara cuma-cuma dan harus dikenakan saat bekerja.
- b. Alat pelindung diri harus disimpan dalam kondisi yang bersih dan sehat seperti dalam lemari loker khusus atau sejenisnya.
- c. Setiap pekerja yang diharuskan mengenakan alat pelindung diri, akan diberikan APD dalam ukuran dan model yang sesuai sehingga dapat dikenakan dengan baik.

## **2. Metode Uji Kromatografi dan Peralatan Pendukung**

Sebelum mengecek ketersediaan prosedur dan peralatan dalam menyiapkan peralatan untuk analisis, maka semua pengguna laboratorium diharuskan sudah memahami dengan benar bagaimana mengoperasikan peralatan yang akan digunakan dan metode uji yang akan dilaksanakan. Apabila belum memahami peralatan yang akan dioperasikan di laboratorium maupun metode uji yang akan dilaksanakan, maka harus dalam pengawasan pembimbing atau laboran.

### **a. Metode uji kromatografi**

Kromatografi merupakan metode pemisahan campuran atau larutan senyawa kimia dengan absorpsi memilih pada zat penyerap, zat cair dibiarkan mengalir melalui kolom zat penyerap, misalnya kapur, alumina dan semacamnya sehingga penyusunnya terpisah menurut tingkat kepolaran senyawa, pada sebagian senyawa perbedaan tersebut dapat dicirikan oleh adanya perbedaan warna (Sastrohamidjojo, 1991). Berdasarkan sifat instrumen yang digunakan, metode analisis Kromatografi terdiri dari 2 macam yaitu konvensional dan modern. Kromatografi modern adalah teknik pemisahan komponen zat atau zat aktif dari suatu senyawa yang memiliki berat molekul tinggi dengan menggunakan instrumen canggih. Alat yang digunakan diantaranya adalah HPLC (High Performance Liquid Cromatography) dan GC-MS (Gas Cromatography – Mass Spektro).

Kromatografi konvensional merupakan teknik pemisahan yang dilakukan dengan cara menggunakan instrumen yang sederhana, diantaranya kromatografi kertas, kromatografi kolom, dan kromatografi lapis tipis.

### **1) Kromatografi Kertas**

Kromatografi kertas yaitu kertas mengadsorpsi air dari lingkungan sekitar. Air tersedia dilingkungan dalam bentuk kelembaban dan bertindak sebagai salah satu komponen dalam larutan pengelusi (fase gerak). Air juga bertindak sebagai fase diam. Kromatografi kertas menggunakan sistem "cair-cair". Kromatografi kertas banyak digunakan untuk keperluan analitis, dan termasuk dalam kelompok kromatografi planar, dimana pemisahannya menggunakan medium pemisah dalam bentuk bidang (umumnya bidang datar) yaitu bentuk kertas (Sastrohamidjojo, 1991).

Prinsip kromatografi kertas yaitu metode pemisahan dari substansi menjadi komponen-komponennya yang bergantung pada distribusi suatu senyawa pada dua fase yaitu fase diam dan fase gerak, pelarut bergerak lambat pada kertas, komponen-komponen bergerak pada laju yang berbeda dan campuran dipisahkan berdasarkan pada perbedaan bercak warna. Berbagai jenis pemisahan dengan kromatografi kertas dilakukan yang dikenal sebagai "analisa kapiler". Metoda ini sangat sesuai dengan kromatografi serapan dan kromatografi kertas sebagai perkembangan dari sistem partisi (Suryadarma, 2014). Salah satu zat padat yang dapat digunakan untuk menyokong fasa tetap yaitu bubuk selulosa.

### **2) Kromatografi Kolom**

Kromatografi kolom terbagi dalam kromatografi kolom terbuka (konvensional) dan kromatografi kolom tertutup. Ditinjau dari

mekanismenya kromatografi kolom merupakan kromatografi serapan atau adsorpsi.

Kromatografi adsorpsi banyak digunakan dalam pemisahan senyawa-senyawa organik, senyawa-senyawa nonpolar dan konsistuen-konstituen yang sulit untuk menguap (Sastrohamidjojo, 1991).

Pemisahan kromatografi kolom adsorpsi didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda-beda terhadap permukaan fase diam. Kromatografi kolom adsorpsi termasuk pada cara pemisahan cair-padat. Kromatografi cair-padat juga disebut Kromatografi Adsorpsi, metode ini banyak digunakan untuk analisis biokimia dan organic (Suryadarma, 2014). Teknik pelaksanaannya dilakukan dengan kolom. Sebagai fasa diam di dalam kolom dapat dipilih silika gel atau alumina.

Keuntungan pemisahan dengan metode kromatografi kolom adalah:

- a) Dapat digunakan untuk sampel atau konstituen yang sangat kecil.
- b) Cukup selektif terutama untuk senyawa-senyawa organik multi komponen.
- c) Proses pemisahan dalam dilakukan dalam waktu yang relatif singkat.
- d) Seringkali murah dan sederhana karena umumnya tidak memerlukan alat yang mahal dan rumit.

### **3) Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan kromatografi planar, yang fase diamnya berupa lapisan seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium, atau plat plastik.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya (Sastrohamidjojo, 1991). Kromatografi juga merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya. KLT dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida-lipida dan hidrokarbon yang sukar dikerjakan dengan kromatografi kertas. KLT juga dapat berguna untuk mencari eluen untuk kromatografi kolom, analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni skala kecil.

Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu metode isolasi yang terjadi berdasarkan perbedaan daya serap (adsorpsi) dan daya partisi serta kelarutan dari komponen-komponen kimia yang akan bergerak mengikuti kepolaran eluen (Suryadarma, 2014). Oleh karena daya serap adsorben terhadap komponen kimia tidak sama, maka komponen bergerak dengan kecepatan yang berbeda, sehingga hal inilah yang menyebabkan pemisahan.

Kelebihan Metode Kromatografi Lapis Tipis adalah sebagai berikut :

- a) Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis.
- b) Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluorosensi atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet.
- c) Dapat dilakukan elusi secara menaik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi 2 dimensi.
- d) Dapat untuk memisahkan senyawa hidrofobik (lipid dan hidrokarbon) yang dengan metode kertas tidak bisa
- e) Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.
- f) Hanya membutuhkan sedikit pelarut.

- g) Waktu analisis yang singkat (15-60 menit)
- h) Investasi yang kecil untuk perlengkapan (Biaya yang dibutuhkan ringan).
- i) Preparasi sample yang mudah
- j) Kemungkinan hasil palsu yang disebabkan oleh komponen sekunder tidak mungkin
- k) Kebutuhan ruangan minimum

Analisis kromatografi lapis tipis banyak digunakan karena :

- a) Waktu yang diperlukan untuk analisis senyawa relatif pendek
- b) Dalam analisis kualitatif dapat memberikan informasi semi kuantitatif tentang konstituen utama dalam sampel
- c) Cocok untuk memonitor identitas dan kemurnian sampel
- d) Dengan bantuan prosedur pemisahan yang sesuai, dapat digunakan untuk analisis kombinasi sampel terutama dari sediaan herbal.

## **b. Menyiapkan Peralatan Pendukung Analisis Kromatografi Konvensional**

Kesesuaian penyiapan peralatan akan mempermudah dalam operasional ataupelaksanaan pekerjaan, disamping itu faktor keselamatan kerja akan terjamin. Peralatan yang akan digunakan untuk menyiapkan analisis secara kromatografi konvensional harus disiapkan sesuai dengan standar prosedur, yaitu menurut petunjuk dan praktik yang dilakukan.

Selama masa penggunaan peralatan di laboratorium, ada prosedur penyiapan peralatan, yaitu peminjam peralatan harus mengajukan surat peminjaman peralatan kepada laboran maksimal 3 hari sebelum masa penggunaan, laboran menyiapkan peralatan untuk analisis dilakukan maksimal 1 hari sebelum peralatan digunakan untuk analisis, maka sebelum menggunakan peralatan, pengguna diwajibkan mengecek peralatan yang sudah disediakan oleh laboran sesuai dengan daftar

peralatan yang sudah tersedia. Bila ada ketidaksesuaian antara daftar peralatan dan jenis maupun jumlah alat, pengguna wajib melapor kepada laboran.

Pengguna peralatan harus mengetahui intruksi kerja penggunaan peralatan di laboratorium. Pengguna harus mengecek ulang terkait jenis, jumlah, spesifikasi peralatan sebelum menggunakan peralatan, pengguna diwajibkan mengisi *log book* penggunaan.

Saat menggunakan alat, peralatan yang dipakai tidak boleh dipinjamkan atau dipindahkan ke tempat lain. Apabila menggunakan alat analisa, wajib menghubungi laboran untuk mengoperasikan. Pengguna boleh meninggalkan laboratorium setelah alat diperiksa kelengkapannya dan kondisi kebersihannya. Ketika selesai menggunakan, peralatan harus dikembalikan ke laboran dalam kondisi bersih dan sesuai kondisi alat diawal peminjaman.

Berikut peralatan yang perlu dipersiapkan sesuai kebutuhan analisis dan sesuai dengan metode analisis kromatografi kertas, kolom atau lapis tipis. Peralatan yang digunakan pada kromatografi kertas adalah bejana bertutup (*Chamber* bertutup), pinset, penggaris, pipa kapiler, pensil dan gunting. Senyawa-senyawa yang terpisahkan dapat dideteksi pada kertas dan dapat diidentifikasi bahkan komponen-komponen yang terpisahkan dapat diambil dari kertas dengan cara memotong-motong kertas yang kemudian dilarutkan secara terpisah.

Peralatan yang digunakan pada kromatografi kolom sederhana, terdiri dari kolom dari kaca yang ada krannya. Umumnya panjang kolom minimum 10 x diameter pipa kaca yang digunakan dan labu erlenmeyer sebagai penampung eluen. Peralatan pendukung lainnya adalah beaker glas, Batang pengaduk, Mortal dan martil, Corong, Kolom, Erlenmeyer kecil.

Peralatan yang digunakan untuk KLT adalah *chamber* (wadah untuk proses KLT), pinset, plat KLT, dan eluen. plat pendukung (umumnya dibuat dari bahan kaca atau lembaran logam Al).

Flat-plat kaca sebelum dipakai dicuci dulu menggunakan detergent kemudian dikeringkan. Pencucian terakhir dapat memakai aseton (jika perlu). Suatu hal yang perlu diperhatikan jangan menyentuh permukaan dari plat yang bersih dengan jari-jari.

### **3. Penyiapan bahan standar, bahan kimia, dan sampel**

#### **a. Bahan standar**

Bahan standar untuk analisis kromatografi kertas disiapkan berupa kertas saring sebagai fasa diam dan pembuatan lapis tipis untuk pengujian kromatografi lapis tipis yaitu bahan standar yang digunakan sebagai fasa diam dan fasa gerak, serta bahan standar untuk kromatografi kolom yang berupa bubur (slurry) dari bubuk alumina yang digunakan sebagai fasa diam dan fasa geraknya adalah berupa larutan atau air.

#### **b. Bahan kimia**

Jenis bahan kimia yang harus disiapkan untuk analisis kromatografi secara umum adalah bahan kimia berupa pelarut organik yang memiliki tingkat kepolaran tinggi, misal khloroform, benzen, aseton, n-heksan dan air.

#### **c. Sampel**

Sampel dari sampel organik atau anorganik dapat diketahui jenis dan atau jumlah komponen yang menyusunnya melalui prosedur analisis kromatografi tertentu, baik kualitatif maupun kuantitatif. Sampel organik atau anorganik biasanya berbentuk campuran heterogen atau campuran homogen dalam fasa padat, cair, maupun gas.

Beberapa syarat yang harus dipenuhi sebelum sampel tersebut dianalisis secara kromatografi, antara lain ukuran sampel harus diketahui sekian mesh/mikrometer atau berapa konsentrasiannya. Jadi, sampel yang akan di

analisis harus memiliki ukuran yang sesuai dengan standar yang menjadi metode dalam analisis tersebut, sehingga hasil analisis menjadi akurat dan presisi.

Teknik preparasi sampel adalah bagian dari proses analisis yang harus dilakukan untuk menyiapkan sampel sehingga siap untuk dianalisis dengan menggunakan instrumentasi atau peralatan kromatografi yang sesuai. Sediaan sampel secara umum tidak dapat dianalisis secara langsung.

Preparasi sampel dalam analisis khromatografi bertujuan untuk mempersiapkan sampel agar siap dilakukan analisis. Misal sampel yang bentuknya padatan sulit untuk dianalisis secara langsung, maka sampel harus diubah dulu menjadi bentuk yang mudah dianalisis, yaitu dengan perlakuan awal terhadap sampel (preparasi sampel), agar mendapatkan hasil analisis yang valid.

Preparasi sampel analisis perlu mengenali:

- 1) Sifat dan stabilitas dari sampel
- 2) Sifat matrik sampel
- 3) Kondisi dimana analisis dilakukan
- 4) Pendukumentasian dengan lengkap riwayat dari sampel (sumber, tata cara pengambilan sampel, penyimpanan, dan penampilan (organoleptis dari sampel).

Berikut merupakan urutan preparasi sampel yang biasa dilakukan sebelum dilakukan analisis/pengujian :

- 1) Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dari lokasi atau tempat yang telah ditentukan sebelumnya. Sampel yang diambil jumlahnya disesuaikan dengan kebutuhan analisis. Pengambilan sampel padatan bisa dilakukan dengan cara menggunakan kantong plastik sebagai wadah. Berbeda dengan sampel dalam bentuk cair dengan

menggunakan botol tertentu.

2) Pengeringan sampel

Selanjutnya dalam rangkaian analisis, setelah sampel diambil maka dilakukan pengeringan. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam sampel. Pengeringan dilakukan dengan metode kering angin (di angin-anginkan) atau dengan menggunakan oven dengan memanaskan sampel padatan pada suhu 100-110°C sampai diperoleh berat yang konstan.

3) Penggilingan sampel

Setelah sampel kering, maka dilakukan penggilingan untuk memperkecil ukuran sampel. Hal ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan dari sampel sehingga mudah di analisis lebih lanjut. Penggilingan dilakukan dengan menggunakan mesin penggiling.

4) Pengayakan

Setelah digiling maka didapatkan sampel yang telah halus. Namun untuk memisahkan ukurannya dilakukan pengayakan/screening. Hal ini bertujuan untuk memisahkan ukuran sampel berdasarkan ukurannya. Setelah di ayak maka akan diperoleh sampel dengan ukuran yang sesuai SOP dalam analisis.

5) Pengukuran Berat (volume) Sampel

Untuk mengetahui berat dan volume sampel dapat dilakukan menggunakan metode penimbangan. Metode ini penting sekali dilakukan ketika akan mengidentifikasi sampel secara kuantitatif.

6) Pelarutan Sampel

Metode pelarutan ini dilakukan agar proses analisis mudah dilakukan apalagi sampelnya masih dalam bentuk padatan. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel harus sesuai agar sampel dapat larut secara sempurna.

#### 4. Menyiapkan Fasa diam dan Fasa Gerak

##### a. Fasa Diam dan Fasa Gerak untuk Kromatografi Kertas

###### 1) Kertas serap sebagai fase diam

Kromatografi kertas adalah teknik metode analisis untuk memisahkan dan mengidentifikasi campuran yang bisa berwarna (terutama pigmen) yang terdiri dari dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. **Fase diam** pada kromatografi kertas adalah **kertas serap** yang sangat seragam dan **fase geraknya** adalah **pelarut** atau campuran pelarut yang sesuai.

Kertas terdiri dari serat-serat selulosa yang mengandung "kotoran" tergantung dari jenis kertasnya. Misalnya kotoran yang berupa ion logam (  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dll ) Dapat mengganggu karena terjadi pertukaran ion. Kertas yang khusus dibuat untuk kromatografi telah mengalami proses-proses pemurnian, misalnya pencucian dengan HCl dan lain-lain untuk menghilangkan ion-ion logam. Adapula pada pembuatannya, kertas itu serat-serat selulosanya tersusun menurut arah tertentu. Pada kartas kromatografi sering tanda ( → ) untuk menunjukkan arah elusi. Elusi sebaiknya dilakukan menurut arah panah itu (arah serat) supaya diperoleh noda-noda yang lebih nyata.

Kertas kromatografi banyak jenisnya. Aliran pelarut (eluen) pada kertas pada suhu tertentu dipengaruhi oleh kerapatan atau ketebalan kertas. Kertas antara lain mempengaruhi :

- a) baik tidaknya pemisahan
- b) jelas atau tidaknya noda
- c) pembentukan "ekor" noda
- d) kecepatan mengalir pelarutnya
- e) harga  $R_f$

Kertas yang banyak dipakai adalah kertas Whatman. Kertas Whatman No. 4 mempunyai karakteristik mirip seperti no.1, tetapi memberikan efek dua kali lebih cepat. Kertas-kertas yang lebih tebal (Whatman no.3) biasanya digunakan untuk pemisahan jumlah yang lebih besar, karena dapat menempuh lebih banyak "cuplikan" tanpa menaikkan area dari noda mula-mula.

Perbedaan antara jenis-jenis kertas terletak pada :

- a) kerapatan serat-serat
- b) kecepatan mengalir (flow rate) larutan elusi
- c) tebal kertas
- d) kehalusan permukaan
- e) cara pembuatan dan pemurnian

Adanya kertas yang dipakai harus didapar (buffer) dulu untuk mendapatkan hasil yang lebih baik. Dapar / buffer yang biasa dipakai adalah :

- a) sitrat-fosfat pH 8 - 9 untuk barbital
- b) fosfat pH 8 dan borat pH 8

## 2) Pelarut sebagai fasa gerak

Larutan elusi pada kromatografi pembagian umumnya terdiri dari 2 fase, yaitu fasa air (stasioner) dan fasa mobil (pelarut organik). Pemilihan larutan elusi ditentukan oleh banyak faktor, terutama oleh kelarutan zat yang diperiksa dalam pelarut. Perbandingan di atas menentukan harga  $R_f$ , makin besar perbedaan nilai tersebut makin baik pemisahan. Kecepatan mengalir larutan elusi juga berpengaruh. Umumnya larutan elusi yang lambat bergeraknya memberi noda-noda yang jelas.  $R_f$  terutama sekali dipengaruhi oleh koefisien pembagian itu, selain itu dipengaruhi oleh temperatur / suhu, tekanan uap / kelembaban udara.

Selama elusi ruang kromatografi harus jenuh uap larutan itu, maka sebelum elusi dimulai harus disediakan waktu untuk menjenuhkan ruangan itu dengan uap larutan elusi. Temperatur selama elusi harus konstan. Karena dalam praktik tidak selalu dapat diadakan pada keadaan-keadaan yang sudah ditentukan, seringkali digunakan zat pembanding untuk membantu identifikasi.

Syarat larutan elusi :

- a) tidak boleh bereaksi dengan zat
- b) harus cukup stabil, sehingga waktu penguraian tidak mengalami perubahan
- c) mudah menguap sehingga kertas mudah dikeringkan
- d) viskositas tidak terlalu besar sehingga pengaliran tidak terlalu lama

Sedangkan kecepatan merambat elusi selain tergantung pada viskositas juga tergantung dari mutu kertas, berat jenis dan tegangan permukaan.

### **b. Fasa Diam dan Fasa Gerak untuk Kromatografi Kolom**

Fasa gerak dalam kromatografi kolom bertindak sebagai pembawa campuran, komponen-komponen campuran akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda-beda akibat hambatan dari fase diam sehingga terjadi pemisahaan. Fasa gerak dalam analisis kromatografi kolom dapat berupa pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut dengan komposisi tertentu. Pelarut dapat merupakan pelarut polar dan pelarut non polar. Fasa gerak atau eluen adalah campuran cairan murni. Eluen dipilih sedemikian rupa sehingga faktor retensi senyawa berkisar antara 0,2-0,3 supaya meminimalisasi penggunaan waktu dan jumlah eluen melewati kolom. Jenis eluen yang digunakan pada kromatografi kolom dipilih supaya senyawa yang berbeda dapat dipisahkan secara efektif.

Fasa diam yang digunakan dalam kromatografi kolom adalah berupa adsorben yang tidak boleh larut dalam fasa gerak, ukuran partikel fasa diam harus seragam. Fasa diam berbentuk serbuk microsporous untuk meningkatkan luas permukaan. Fase diamsilika dapat berupa :

- 1) Silika gel tanpa pengikat (silika gel H dan N)
- 2) Silika gel dengan pengikat (silika gel G)
- 3) Silica gel dengan pengikat dan zat berfluoresensi (GF)
- 4) Slika gel untuk kolom kromatografi (preparatif)

### **c. Fasa Diam dan Fasa Gerak untuk Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

#### **1) Fasa Diam**

Fasa diam yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis adalah bahan penyerap ("*adsorbent*"). Sifat umum dari bahan penyerap untuk Kromatografi Lapis Tipis sama dengan yang digunakan untuk Kromatografi Kolom. Dua sifat penting yang harus diperhatikan untuk Kromatografi Lapis Tipis adalah besar/kecilnya (ukuran) serta homogenitasnya, sebab daya lekat pada pendukung sangat ditentukan oleh kedua sifat tersebut. Partikel yang kasar tidak dapat memberikan pemisahan yang baik dan untuk memperbaikinya dapat digunakan butiran yang halus. Besar partikel yang biasa digunakan adalah 1 – 25 mikron. Berbeda dengan tujuan untuk kromatografi kolom, dimana partikel yang kecil dan halus dapat memperlambat aliran pelarut, sedang pada Kromatografi Lapis Tipis malahan akan mempercepat aliran pelarut.

Beberapa macam bahan penyerap yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis :

#### **a) Silika gel**

Paling banyak dipakai dan bersifat asam, zat pengikatnya untuk memberikan kekutan pada lapisan dan menambah adisi pada gelas penyokong, biasanya adalah Kalsium sulfat ( $\text{CaSO}_4$ ) = *Plaster of Paris* = Gypsum.

Dalam perdagangan biasanya silica gel telah diberi zat pengikat misalnya Silica gel "G" Merck. Suspensi silica gel yang "G" telah dicampur dengan air harus dipakai paling lambat 3 – 4 menit sesudah dibuat. Disamping Kalsium sulfat ( $\text{CaSO}_4$ ) semihidrat dapat pula dipakai tepung beras sebagai pengikatnya, tetapi kurang baik. Jika zat yang dipisahkan basa-basa, maka pelarut sebaiknya mengandung sedikit Amonium hidroksida atau dietilamin (  $\pm 1\%$  ). Jika asam-asam yang akan dipisahkan perlu ditambah asam asetat (  $\pm 1\%$  ). Asam dan basa ini bersifat pertolongan aditif sebagai buffer untuk zat yang akan dipisahkan → akan tetap dalam bentuk non ionik, sehingga dapat memberikan noda yang kompak. Disamping air dapat pula dipakai pelarut organik misalnya aseton, atau kloroform dan metanol (2 : 1) untuk membuat pastanya. Untuk memudahkan identifikasi ditambah lagi dengan zat yang berfluoresensi sehingga dikenal "Silica gel GF".

**b) Alumina**

Alumina atau aluminium oksida (  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ) suatu adsorban yang sedikit bersifat basis. Tetapi kini dalam perdagangan ada juga yang bersifat asam dan netral

- a)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bersifat basis ( pH = 9 )
- b)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bersifat netral ( pH = 7,5 )
- c)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  bersifat asam ( pH = 4 )

Daya menyerapnya tidak sekuat silika gel. Tidak baik untuk memisahkan asam-asam karena akan diikat lebih kuat pada adsorben dan sangat susah bergerak. "*Edge-effect*" disebabkan penyerapan yang tidak rata dari pelarut. Komponen yang mudah menguap, pada sisi keping lapis lebih mudah daripada di tengah → karena itu harga Rf makin ke pinggir (sisi) makin besar → perlu penjenuhan, dipakai kertas saring pada sisi bejana. Terutama dipakai untuk memisahkan basa-basa.

**c) Selulosa**

Penyerap jenis ini dapat digunakan dengan atau tanpa bahan pengikat. Pada Kromatografi Lapis Tipis, penyerap ini terdapat sebagai butiran-butiran yang halus dan ukurannya sama, berbeda seperti pada Kromatografi kertas dimana selulosa berupa serabut. Lapisan tipis yang dibuat dari sellulosa mempunyai ruang antara yang lebih kecil, akan tetapi lebih teratur sehingga aliran pelarut lebih cepat dan peristiwa difusi lebih sedikit.

**d) Sephadex**

Jenis penyerap ini yang digunakan pada Kromatografi Lapis Tipis mempunyai ukuran  $10 - 40 \mu\text{m}$  dan digunakan untuk pemisahan zat atas dasar perbedaan besar molekul seperti protein, hormon, enzim, asam amino dan lain-lain.

**e) Kiesulguhr (Diatomaceus earth )**

Adalah suatu adsorben yang netral, tetapi daya adsorbsinya lebih lemah daripada silika gel atau alumina dan mempunyai daya pemisahan lebih kecil. Dapat ditambahkan pada silika gel untuk mendapatkan bentuk yang kurang aktif, untuk memisahkan zat-zat yang sangat polar misalnya: karbohidrat, asam-asam amino.

**f) Magnesium silikat**

1 bagian Magnesium silikat dengan 3 bagian air dikocok dan dioleskan atau dilapiskan ke plat KLT

**2) Fasa Gerak**

Pemilihan fasa gerak untuk Kromatografi Lapis Tipis tergantung pada faktor yang sama pada pemilihan fasa gerak untuk keperluan Kromatografi Kolom penyerapan. Sebaiknya digunakan pelarut yang polaritasnya rendah sebab pelarut dengan polaritas yang tinggi sifat kromatografi berubah menjadi kromatografi pembagian.

Disamping itu pelarut tersebut dapat mempermudah lepasnya/rusaknya lapisan tipis. Selain pelarut tunggal dapat juga digunakan campuran pelarut, tetapi sebaiknya jangan lebih dari 3 jenis pelarut sebab campuran yang lebih kompleks akan cepat mengalami perubahan-perubahan fasa terhadap perubahan suhu. Kemurnian pelarut penting karena dalam hal ini digunakan untuk pemisahan sampel dengan jumlah sedikit.

## **B. Keterampilan yang diperlukan dalam menyiapkan Analisis**

Keterampilan yang diperlukan dalam Menyiapkan Analisis Kromatografi antara lain adalah:

1. Mengenal dan menentukan jenis alat pelindung diri dalam melaksanakan kegiatan analisis kromatografi.
2. Menentukan metode analisis yang tepat dalam analisis kromatografi.
3. Menyiapkan peralatan, bahan dan sampel/contoh uji dalam analisis kromatografi.
4. Menyiapkan fase gerak dan fase diam dalam analisis kromatografi

## **C. Sikap kerja yang diperlukan dalam menyiapkan Analisis**

Sikap kerja yang diperlukan dalam menyiapkan Analisis kromatografi antara lain adalah:

1. Tertib dan disiplin dalam menentukan dan menggunakan alat pelindung diri dengan tepat.
2. Cermat dan teliti dalam menentukan kesesuaian contoh uji dengan metode analisis.
3. Tertib dan taat asas dalam menyiapkan, menggunakan dan menyimpan bahan, peralatan, dan contoh uji dalam analisis kromatografi.
4. Cermat dan teliti dalam menyiapkan fase gerak dan fase diam dalam analisis kromatografi

## BAB III.

# MELAKUKAN ANALISIS KROMATOGRAFI KONVENTSIONAL

## A. Pengetahuan yang diperlukan dalam melakukan Analisis Kromatografi Konvensional

### 1. Mengenakan Alat Pelindung Diri (APD)

APD atau yang dalam istilah Bahasa Inggris disebut sebagai *Personal Protective Equipment* (PPE) adalah “seperangkat alat yang digunakan tenaga kerja untuk melindungi sebagian atau seluruh tubuhnya dari adanya potensi bahaya/kecelakaan kerja”. APD merupakan suatu alat yang dipakai tenaga kerja dengan maksud menekan atau mengurangi resiko masalah kecelakaan akibat kerja yang akibatnya dapat timbul kerugian bahkan korban jiwa atau cedera.

Alat pelindung diri (APD) sesuai dengan istilahnya, bukan sebagai alat pencegahan kecelakaan namun berfungsi untuk memperkecil tingkat cederanya. APD harus memiliki fungsi untuk melindungi pemakainya dalam melaksanakan pekerjaan sehingga dapat mengisolasi tubuh atau bagian tubuh dari bahaya serta dapat memperkecil akibat/resiko yang mungkin timbul.

#### a. Pemilihan Alat Pelindung diri (APD)

- 1) Dengan tujuan untuk mengendalikan paparan bahaya terhadap pekerja/analisis/laboran secara efektif, tersedianya alat tersebut di tempat kerja harus diseleksi dengan cermat.
- 2) Langkah pertama dari aktifitas pemilihan alat ini adalah evaluasi bahaya di tempat kerja.
- 3) Hasil evaluasi harus ditinjau ulang untuk menentukan jenis bahaya dan tingkat sampel pencemar yang ada selama dilakukan pekerjaan rutin maupun pemeliharaan.

- 4) Kriteria lain yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan alat pelindung diri adalah kebutuhan pemakaian dan derajat perlindungan yang diberikan oleh peralatan.
- 5) Selanjutnya alat pelindung diri yang telah dipilih harus dirancang agar memenuhi persyaratan standar atau peraturan dari : ANSI, OSHA, NFPA, UL, NIOSH, dan SNI bagi sepatu pelindung dan sarung tangan kanvas.

**b. Ketentuan Mengenakan Alat Pelindung Diri**

- 1) Alat pelindung diri harus disediakan bagi pekerja di laboratorium secara cuma-cuma dan harus dikenakan saat bekerja.
- 2) Alat pelindung diri harus disimpan dalam kondisi yang bersih dan sehat seperti dalam lemari loker khusus atau sejenisnya.
- 3) Setiap pekerja yang diharuskan mengenakan alat pelindung diri akan diberikan APD dalam ukuran dan model yang sesuai sehingga dapat dikenakan dengan baik.

**c. Pemeliharaan Alat Pelindung Diri**

- 1) Alat pelindung diri dapat mengalami degradasi kemampuan secara bertahap yang disebabkan oleh penggunaan sehari-hari maupun akibat kondisi yang ekstrim, maka pemeliharaan harus dilaksanakan dengan seksama.
- 2) Sebelum dan setelah digunakan, seluruh alat pelindung diri harus diperiksa apakah ada kerusakan.
- 3) Bila terdeteksi adanya kerusakan pada alat pelindung diri, alat tersebut harus ditarik dari penggunaan sampai selesai dilakukan perbaikan atau diganti dengan alat baru.
- 4) Setelah dipakai, baju pelindung kimia dan peralatan (bila bukan peralatan yang sekali pakai) harus diperiksa dan disuci hamakan seperlunya. Jika pemakaiannya hanya sekali saja, baju pelindung kimia dan peralatan tersebut harus dibuang sesuai prosedur yang benar.

#### **d. Cara Mengenakan Alat Pelindung Diri**

Alat Pelindung diri (APD) dalam penyiapan sampel merupakan perlengkapan yang diperlukan dalam melakukan analisis, seperti jas laboratorium, masker, dansarungtangan. Setiap pekerja yang bekerja dilaboratorium untuk melakukan analisis sampel diwajibkan memakai alat pelindung diri (APD), karena pada dasarnya APD merupakan sistem pengaman terakhir untuk pekerja. Alat Pelindung Diri (APD) di tempat kerja harus dilihat dalam konteks sebagai pengaman pekerja untuk mencegah terjadinya kecelakaan dan penyakit akibat kerja, termasuk alat pelindung diri di laboratorium demi menunjang terciptanya kenyamanan orang yang melakukan pekerjaan di laboratorium.

APD yang dipakai secara benar ketika bekerja di laboratorium pada saat melakukan analisis kromatografidiantaranya adalah :

##### **1) Pelindung Kaki**

- a) Pelindung kaki harus dikenakan oleh laboran/pekerja saat bekerja di area dimana terdapat bahaya cedera kaki yang disebabkan karena benda jatuh atau menggelinding atau benda yang menembus sol, serta area dimana kaki pekerja terpapar oleh potensi bahaya listrik.
- b) Saat bereaksi pada tumpahan atau buangan zat-zat yang berbahaya, sepatu yang tahan pada sampel kimia harus dikenakan.
- c) Sepatu keselamatan harus tersedia dalam jenis yang sangat beragam dengan berbagai keistimewaan termasuk baja pelindung jari, sol tahan oli, pelindung kaki dan sampel yang tidak menimbulkan percikan api.
- d) Semua sepatu pelindung kaki akan mengikuti ANSI Z41-1991 atau Standar Nasional Indonesia.

## 2) Pelindung Tangan

Pelindung tangan harus dikenakan saat tangan pekerja terpapar bahaya, seperti :

- a) Kulit terkena zat-zat seperti korosif (perusak), cairan pelarut, pestisida atau sampel kimia'.
- b) Luka parah, luka goresan, luka lecet, atau luka tusuk.
- c) Sengatan listrik
- d) Luka bakar dari sampel kimia atau suhu panas.
- e) Suhu yang ekstrim (panas atau dingin).



(a)



(b)



(c)

Gambar 1. (a) Sarung tangan kain, (b) Sarung tangan asbes  
(c) Sarung tangan karet

Sumber : lazuardimimipi.blogspot.com

## 3) Pakaian Pelindung

- a) Pakaian pelindung terhadap sampel kimia harus digunakan untuk memberikan perlindungan dari paparan sampel-sampel berbahaya atau beracun.
- b) Agar efektif dalam melindungi diri dari bahaya sampel kimia, pakaian pelindung terhadap sampel kimia harus dikenakan sebagai bagian dari kesatuan perlengkapan yang juga meliputi pelindung tangan yang tepat, sepatu dan peralatan lain yang dibuat sesuai dengan karakteristik sampel kimia dan situasi setempat.
- c) Pakaian pelindung terhadap sampel kimia harus dipilih berdasarkan pertimbangan dari faktor-faktor berikut ini :

- Potensi bahaya yang terkait dengan sampel kimia yang mungkin akan ditemui (sampel: korosif, racun atau reaksi alergi).
- Lama dan karakteristik kontak yang mungkin terjadi (sampel: berapa lama kontak terjadi dan bagaimana terjadinya).
- Bagian tubuh yang mungkin terkena (tangan, kaki, lengan, dada, wajah, dll.)
- Karakteristik daya tembus, degradasi dan penetrasi dari kain.
- Sifat fisik dari kain pelindung (kelenturan, ketahanan terhadap tusukan dan goresan, berat, perlindungan, suhu, dll).
- Dapat dibuang (sekali pakai) atau tidak dapat dibuang (pemakaian berulang-ulang).



Gambar 2. Jas laboratorium  
Sumber : semarang.indonetwork.co.id

#### 4) Alat Pelindung Pernapasan

- a) Respirator dengan penyaring udara.

Respirator dengan penyaring udara mengalirkan udara sekitar ke elemen pembersihan udara yang menghilangkan sampel pencemar. Alat bantu pernapasan dengan penyaring udara terdiri dari dua jenis.

Alat bantu pernapasan untuk menyaring beberapa partikel (debu, uap, asap).



Gambar 3. Masker.  
Sumber : semarang.indonetwork.co.id

b) Respirator dengan Katrid Kimia



Gambar 4. Berbagai jenis respirator dan filter  
Sumber : ipapandebesi.wordpress.com

Mengoperasikan Alat Kromatografi sesuai dengan Panduan Pengoperasian  
Alat :

**a. Kromatografi Kertas**

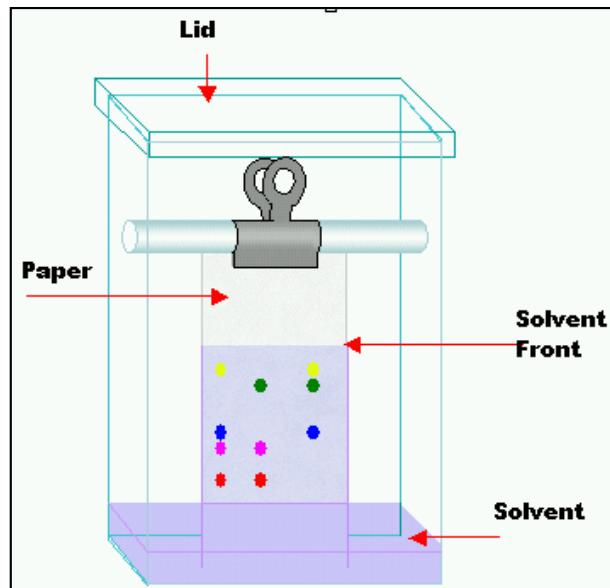
Pengoperasian alat untuk masing-masing kromatografi berbeda, tergantung dari jenis metode uji yang digunakan. Peralatan yang digunakan pada kromatografi kertas adalah bejana bertutup gambar 5 (*Chamber* bertutup), pinset, penggaris, pipa kapiler, pensil dan gunting.

Prinsip dasar kromatografi kertas adalah partisi multiplikatif suatu senyawa antara dua cairan yang saling tidak bercampur (Sastrohamidjojo, 1991). Jadi partisi suatu senyawa terjadi antara kompleks selulosa-air dan fasa mobil yang melewatinya berupa pelarut organik yang sudah dijenuhkan dengan air atau campuran pelarut.



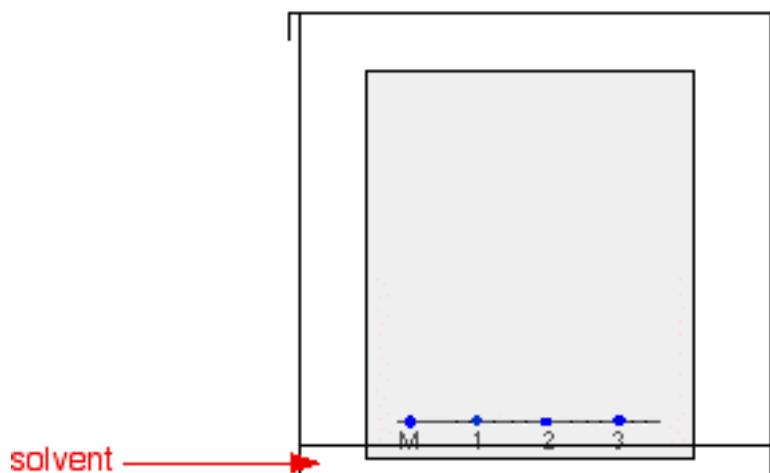
Gambar 5. Chamber tertutup.  
Sumber : <https://www.google.com/> kromatografi-lapis-tipis-

Senyawa-senyawa yang terpisahkan dapat dideteksi pada kertas dan dapat diidentifikasi bahkan komponen-komponen yang terpisahkan dapat diambil dari kertas dengan cara memotong-motong kertas yang kemudian dilarutkan secara terpisah (Sastrohamidjojo, 1991). Teknik analisis dengan kromatografi kertas adalah kertas digantungkan pada chamber atau bejana (gambar 6) yang berisi lapisan tipis pelarut atau campuran pelarut yang sesuai didalamnya. Perlu diperhatikan bahwa batas pelarut berada dibawah garis pada bercak diatasnya. Kadang-kadang kertas hanya digulungkan secara bebas pada silinder dan diikatkan dengan klip kertas pada bagian atas dan bawah. Silinder kemudian ditempatkan dengan posisi berdiri pada bawah chamber/bejana seperti pada gambar 6 berikut:



Gambar 6. Chamber/Bejana.  
Sumber :[http://antonchemical.blogspot.co.id/2013/01/kromatografi\\_24.html](http://antonchemical.blogspot.co.id/2013/01/kromatografi_24.html)

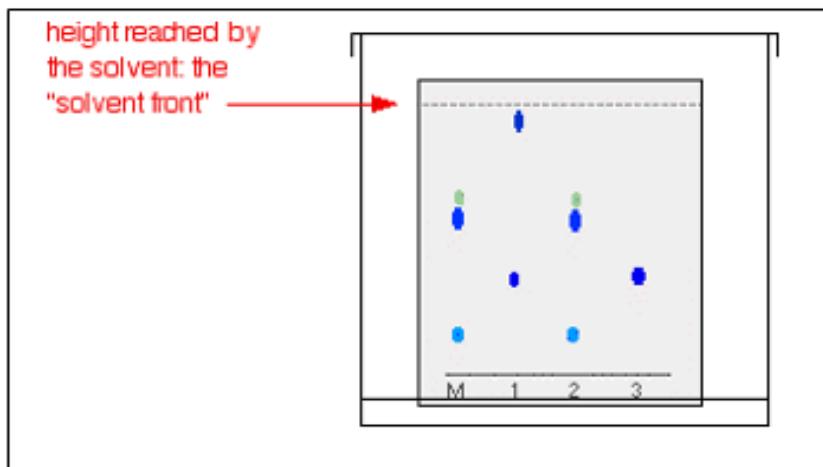
Chamber harus bertutup adalah untuk meyakinkan bahwa atmosfer dalam gelas kimia atau chamber terjenuhkan dengan uap pelarut. Penjenuhan udara dalam chamber dengan uap menghentikan penguapan pelarut sama halnya dengan pergerakan pelarut pada kertas.



Gambar 7. Penotolan senyawa pada kertas kromatografo dimasukkan ke dalam chamber  
Sumber <https://www.academia.edu/5087478/Kromatografi>

Karena pelarut bergerak lambat pada kertas, komponen-komponen yang berbeda dari analit misal campuran tinta akan bergerak pada laju yang berbeda dan campuran dipisahkan berdasarkan pada perbedaan bercak warna.

Gambar menunjukkan apa yang tampak setelah pelarut bergerak hampir seluruhnya ke atas, seperti terlihat pada gambar 8 berikut:



Gambar 8. Pelarut Bergerak Hampir Seluruhnya Ke Atas.  
Sumber [http://antonchemical.blogspot.co.id/2013/01/kromatografi\\_24.html](http://antonchemical.blogspot.co.id/2013/01/kromatografi_24.html)

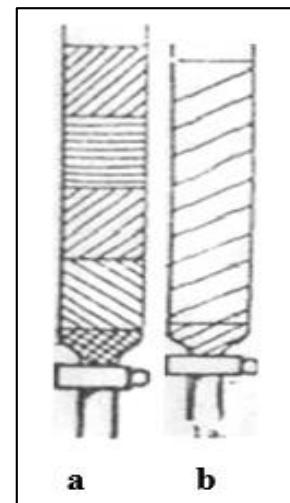
### b. Kromatografi Kolom

Alat kromatografi kolom sederhana, terdiri dari kolom dari kaca yang ada krannya. Umumnya panjang kolom minimum 10 x diameter pipa kaca yang digunakan dan labu erlenmeyer sebagai penampung eluen.

Kromatografi kolom adalah kromatografi yang menggunakan kolom sebagai alat untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran (Sastrohamidjojo, 1991). Alat tersebut berupa pipa gelas yang dilengkapi suatu kran di bagian bawah kolom untuk mengendalikan aliran zat cair, ukuran kolom tergantung dari banyaknya zat yang akan dipindahkan. Secara umum perbandingan panjang dan diameter kolom sekitar 8:1 sedangkan daya penyerapnya adalah 25-30 kali berat bahan yang akan dipisahkan.

Kolom biasanya berbentuk seperti buret untuk titrasi, ukurannya beragam. Perbandingan panjang kolom sekurang-kurangnya 10 kali diameternya, perbandingan ini tergantung mudah tidaknya komponen dipisahkan. Perbandingan berat sampel dan fase gerak (1 : 30) biasanya cukup memadai untuk pemisahan yang mudah, perbandingan dapat ditingkatkan hingga (1:50) untuk komponen yang susah dipisahkan.

Berbagai ukuran kolom dapat digunakan, yang dipertimbangkan adalah kapasitas yang memadai untuk menerima sampel-sampel tanpa melalui fasa diamnya. Kolom terbuat dari kaca, kecuali jika dinyatakan lain. Kolom dengan beragam ukuran dapat digunakan, tetapi umumnya antara 0,6 m hingga 1,8 m serta diameter dalam 2 mm hingga 4 mm. Sebagai fase cair dapat digunakan beraneka ragam senyawa kimia, seperti poly etilen glikol, ester dan amida berbobot molekul tinggi, hidrokarbon, gum, dan cairan silicon.



Gambar 9. Pemisahan Suatu Campuran Dengan Kolom Kromatografi Dan Jalur-Jalur Serapan.  
Sumber : Harjono, Kromatografi, 1991

Kolom harus dikondisikan dengan jalan mengoperasikan sampai keadaan stabil pada suhu yang lebih tinggi dari suhu yang digunakan seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Suatu uji yang sesuai terhadap sifat inert penyangga, yang perlu untuk fase cair dengan polaritas yang rendah, ada kalanya suatu kolom dapat dikondisikan dengan menyuntikkan ulang senyawa yang dikromatografi. Merupakan aturan praktis yang umum bahwa panjang kolom harus sekurang-kurangnya 10 kali ukuran diameternya. Jika kita mempunyai kolom dengan panjang 20 cm, dan diameternya 1 atau 2 cm. Bahan pengemasnya suatu adsorben seperti alumina atau resin penukar ion, dimasukkan dalam bentuk suspensi kedalam porsi fasa bergerak dan dibiarkan diam didalam hamparan basah dengan sedikit cairan. Kolom untuk analisis farmasi umumnya digunakan kolom isi dan sebaiknya hanya isi kolom yang mempengaruhi gerak relative zat terlarut melalui system. Kolom serapan yaitu untuk memisahkan suatu campuran, kolom seperti Gambar 9.a dapat digunakan dan diisi dengan penyerap zat padat seperti alumina sebagai fasa tetap dan dialiri dengan pelarut seperti benzena sebagai fasa gerak.

Sejumlah kecil cuplikan dari campuran dimasukkan melalui sebelah atas dari kolom yang kemudian membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa, seperti Gambar 9.b.

Bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom ia akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen-komponen dari campuran. Kecepatan bergerak dari suatu komponen tergantung pada berapa besarnya zat terhambat/tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat (Sastrohamidjojo, 1991). Akan terlihat bahwa jika perbedaan-perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna, seperti terlihat pada Gambar 9.b.

Pengisian kolom adalah tidak mudah untuk mernperoleh pengisian kolom yang homogen, tetapi perlu dicoba hingga mendapatkan hasil yang maksimum. Pengisian yang tidak teratur dari penyerap akan mengakibatkan merusak batas-batas pita krommatografi. Putusnya penyerap dalam kolom biasanya disebabkan oleh gelembung-gelembung udara selama pengisian. Untuk rnencegah hal-hal tersebut sedapat mungkin zat pengisi/penyerap dibuat menjadi "bubur" dengan pelarut kemudian dituangkan perlahan-lahan dalam tabung.

Jika penyerap dibiarkan turun perlahan-lahan dapat dibantu dengan mengguncang perlahan-lahan maka akan diperoleh pengisian yang homogen. Jika besarnya partikel-partikel penyerap sama, akan lebih mudah untuk mendapatkan pengisian yang homogen. Tetapi hal ini sangat jarang. Harus diperhatikan penyerap yang telah dimasukkan jangan sampai ada bagian yang kering baik selama pengisian atau selama pemisahan.

### c. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sangat berguna untuk mengetahui jumlah komponen dalam sampel. Peralatan yang digunakan untuk KLT adalah *chamber* (wadah untuk proses KLT) , pinset, plat KLT, dan eluen.

Langkah-langkah mengoperasikan KLT yaitu sebagai berikut:

- 1) Potong plat KLT sesuai ukuran. Plat terbuat dari kaca, plat plastik, atau aluminium foil dengan berbagai ukuran.
- 2) Biasanya, untuk satu spot menggunakan plat selebar 1 cm. Berarti jika menguji 3 sampel (3 spot) berarti menggunakan plat selebar 3 cm.
- 3) Buat garis dasar (*base line*) di bagian bawah, sekitar 0,5 cm dari ujung bawah plat, dan garis akhir di bagian atas.
- 4) Menggunakan pipa kapiler, totolkan sampel cairan yang telah disiapkan sejajar, tepat di atas base line. Jika sampel padat, larutkan pada pelarut tertentu. Keringkan totolan.
- 5) Dengan pipet yang berbeda, masukkan masing-masing eluen ke dalam *chamber* dan campurkan.
- 6) Tempatkan plat pada *chamber* berisi eluen. *Base line* jangan sampai tercelup oleh ulen. Tutuplah *chamber*.
- 7) Tunggu eluen mengelusi sampel sampai mencapai garis akhir, di sana pemisahan akan terlihat.
- 8) Setelah mencapai garis akhir, angkat plat dengan pinset, keringkan dan ukur jarak spot. Jika spot tidak kelihatan, amati pada lampu UV. Jika masih tak terlihat, semprot dengan pewarna tertentu seperti kalium kromat atau ninhidrin.



Gambar 10. Chamber dan Plat pada KLT  
Sumber :  
<https://www.google.com/kromatografi-lapis-tipis>

## 2. Mengaplikasikan Standar dan Sampel ke Sistem Pemisahan Sesuai Prosedur

### a. Kromatografi Kertas

Cuplikan atau sampel yang mengandung campuran yang akan dipisahkan diteteskan /diletakkan pada daerah yang diberi tanda di atas sepotong kertas saring, dimana totolan cuplikan akan meluas membentuk noda yang bulat. Bila noda telah kering kertas dimasukkan dalam bejana tertutup yang sesuai dengan satu ujung, dimana tetesan cuplikan ditempatkan, tercelup dalam pelarut yang dipilih sebagai fasa gerak.

Pelarut bergerak melalui serat dari kertas oleh gaya kapiler dan menggerakkan komponen dari campuran cuplikan pada perbedaan jarak dalam arah aliran pelarut. Bila permukaan pelarut telah bergerak sampai jarak yang cukup jauhnya atau setelah waktu yang telah ditentukan, kertas diambil dari bejana dan kedudukan dari permukaan pelarut diberi tanda dan lembaran kertas dibiarkan kering. Jika senyawa-senyawa berwarna, maka akan terlihat sebagai pita atau noda yang terpisah seperti terlihat pada gambar .

Jika senyawa tidak berwarna harus dideteksi dengan cara fisika dan kimia yaitu dengan menggunakan suatu pereaksi–pereaksi yang memberikan sebuah warna terhadap beberapa atau semua dari senyawa-senyawa. Bila daerah dari noda yang terpisah telah dideteksi, maka perlu mengidentifikasi tiap-tiap dari senyawa. Metoda identifikasi yang paling mudah adalah berdasarkan pada kedudukan dari noda relatif terhadap permukaan pelarut, menggunakan harga  $R_f$ .

### b. Kromatografi Kolom

Sebelum sampel dimasukkan ke dalam kolom, pelarut dikeluarkan sedemikian rupa hingga cairan di atas fase diam hampir kering. Sampel

dimasukkan pada bagian atas dari fase diam dengan bantuan pipet tetes. Sejumlah kecil pengelusi (fase gerak) digunakan untuk mencuci sisa sampel dalam wadah sampel dan selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom.

Setelah sampel dimasukkan, biasanya ditambah lagi eluen hingga ketinggian fase gerak di atas fase diam 5-10 cm. Selanjutnya, hubungkan dengan wadah fase gerak (proses elusi dilakukan) dan alirkan pengelusihingga ketinggian cairan di atas fase diam dipertahankan. Proses elusi dilakukan sampai komponen yang diinginkan keluar dari kolom.

### c. Kromatografi Lapis Tipis

Sampel harus diaplikasikan/ditotolkan pada lempeng KLT dengan sangat hati-hati dengan pertimbangan bahwa gangguan yang mungkin timbul pada lempeng KLT dikendalikan sekecil mungkin. Pada umumnya, sampel secara manual ditotolkan melalui pipa kapiler, mikropipet atau melalui penyuntik mikro kaca yang telah terkalibrasi, sehingga tetesan tepat menyentuh permukaan lempeng atau plat, sementara ujung alat penotol masih tetap di atas penyerap lempeng KLT.

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal diperoleh jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Metode penotolan sampel secara otomatis diperlukan untuk menghasilkan reproduksibilitas yang baik, dan diperlukan untuk analisis kuantitatif.

Untuk memperoleh reproduksibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5  $\mu$ l. Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari 2-10  $\mu$ l maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan

dilakukan pengeringan antar totolan. Jarak antar pusat penotolan bercak sebaiknya lebih dari 1 cm, bercak sebaiknya berdiameter antara 2-5 mm dan tidak terlalu dekat dengan ujung lempeng (sebaiknya jaraknya 1,5 cm dari ujung pada lempeng  $20 \times 20$  cm).

### 3. Proses Pemisahan sesuai Prosedur

#### a. Kromatografi Kertas

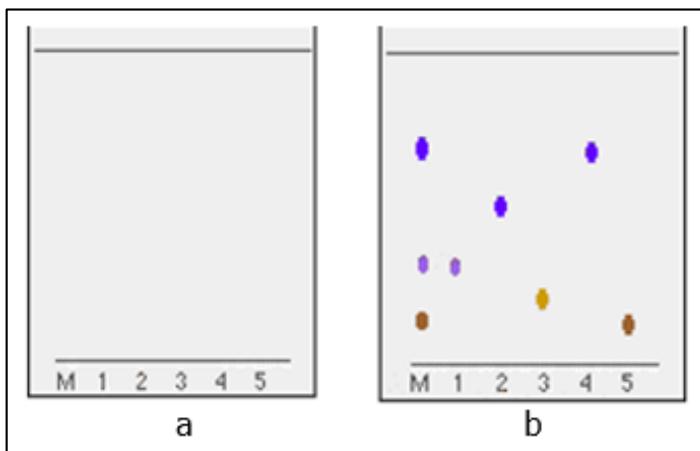
Teknik kromatografi kertas yaitu proses pengeluaran asam mineral dari kertas disebut *desalting*. Larutan ditempatkan pada kertas dengan menggunakan mikropipet pada jarak 2 – 3 cm dari salah satu ujung kertas dalam bentuk coretan garis horizontal. Setelah kertas dikeringkan, diletakkan diruang yang sudah dijenuhkan dengan air atau dengan pelarut yang sesuai. Penjenuhan dapat dilakukan 24 jam sebelum analisis.

*Descending* adalah salah satu teknik analisis kromatografi kertas di mana cairan dibiarkan bergerak menurun pada kertas akibat gravitasi. Pada teknik *ascending*, pelarut bergerak ke atas dengan gaya kapiler. Nilai *Rf* harus sama baik pada *descending* maupun *ascending*. Sedangkan yang ketiga dikenal sebagai cara radial atau kromatografi kertas sirkuler. Kondisi-kondisi berikut harus diperhatikan untuk memperoleh nilai *Rf* yang reproduksibel. Temperatur harus dikendalikan dalam variasi tidak boleh lebih dari  $0,5^{\circ}\text{C}$ . Kertas harus didiamkan dahulu paling tidak 24 jam dengan atmosfer pelarutnya, agar mencapai kesetimbangan sebelum pengaliran pelarutnya pada kertas. Dilakukan beberapa pengeraan yang paralel, *Rf*nya tidak boleh berbeda lebih dari 0,02 (Khopkar, 2008).

Dalam beberapa kasus, dimungkinkan membuat bercak menjadi tampak dengan mereaksikannya dari beberapa pereaksi yang menghasilkan produk yang berwarna. Contoh yang baik yaitu kromatogram yang dihasilkan dari campuran asam amino. Setetes larutan campuran ditempatkan pada garis dasar kertas, dan dengan cara yang sama ditempatkan asam amino yang telah diketahui ditetaskan disampingnya.

Kertas lalu ditempatkan dalam pelarut yang sesuai dan dibiarkan seperti sebelumnya. Dalam gambar, campuran adalah M, dan asam amino yang telah diketahui ditandai 1 sampai 5. Posisi pelarut depan ditandai dengan pinsil dan kromatogram lalu dikeringkan kemudian disemprotkan dengan larutan ninhidrin.

Ninhidrin bereaksi dengan asam amino menghasilkan senyawa berwarna, utamanya coklat atau ungu seperti pada gambar berikut :



Gambar 1. a. Sebelum Disemprot Dengan Ninhidrin,  
b. Setelah Disemprot Dengan Ninhidrin.

Sumber [http://antonchemical.blogspot.co.id/2013/01/kromatografi\\_24.html](http://antonchemical.blogspot.co.id/2013/01/kromatografi_24.html)

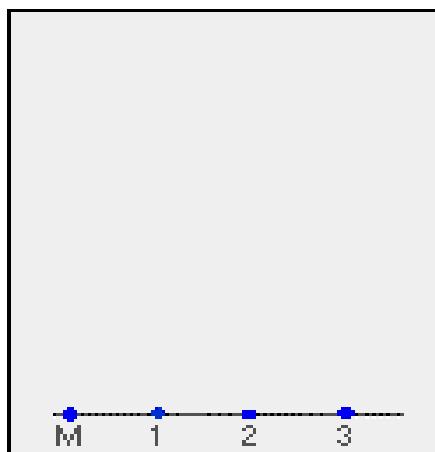
Gambar a menunjukkan kertas setelah dilalui pelarut hampir pada bagian atas kertas. Bercak masih belum tampak. Gambar b menunjukkan apa yang mungkin tampak setelah penyemprotan ninhidrin. Tidak diperlukan untuk menghitung nilai  $R_f$  karena dengan mudah dapat membandingkan bercak dalam campuran dengan asam amino-asam amino yang telah diketahui berdasarkan posisi dan warnanya. Dalam contoh ini, campuran mengandung asam amino yang diberi tanda 1,4 dan 5.

Berikut proses pemisahan atau analisis kromatografi kertas :

Setetes dari larutan cuplikan yang mengandung campuran akan dipisahkan kemudian diteteskan/diletakkan pada daerah yang diberi tanda di atas sepotong kertas saring dimana akan meluas membentuk noda yang bulat. Bila noda telah kering, kertas dimasukkan dalam bejana tertutup yang sesuai dengan satu ujung dimana tetesan cuplikan

ditempatkan dan tercelup dalam pelarut yang dipilih sebagai fasa bergerak (jangan sampai noda tercelup karena senyawa yang akan dipisahkan akan terlarut dari kertas), lihat gambar 12.

Pelarut bergerak melalui serat-serat dari kertas oleh gaya kapiler dan menggerakkan komponen-komponen dari campuran cuplikan pada perbedaan jarak dalam arah aliran pelarut. Perlu diperhatikan bahwa permukaan dari kertas jangan sampai terlalu basah dengan pelarut, karena tidak akan memisahkan sama sekali atau daerah-daerah noda akan menjadi kabur. Bila permukaan pelarut telah bergerak sampai jarak yang cukup jauhnya atau setelah waktu yang telah ditentukan, maka kertas diambil dari bejana dan kedudukan dari permukaan pelarut diberi tanda dan lembaran kertas dibiarkan kering.



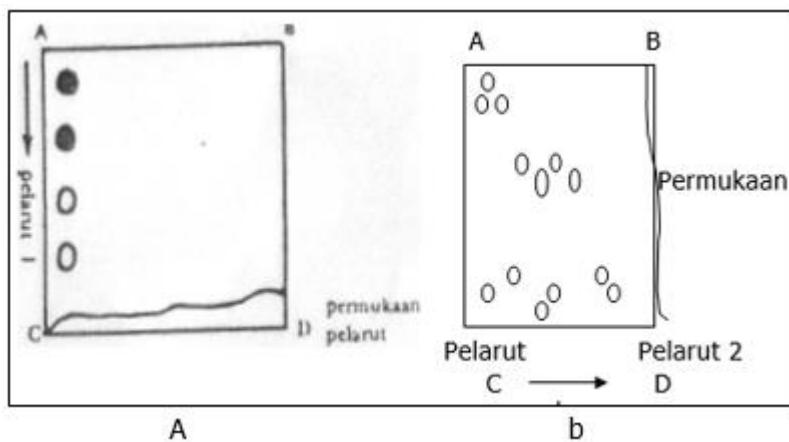
Gambar 12. Kromatografi Pita/Noda.  
Sumber :[Http://Antonchemical.Blogspot.Co.Id/2013/01/Kromatografi\\_24.Html](http://Antonchemical.Blogspot.Co.Id/2013/01/Kromatografi_24.Html)

Jika senyawa-senyawa tidak berwarna maka dideteksi dengan cara fisika dan kimia. Caranya adalah menggunakan suatu pereaksi yang memberikan sebuah warna terhadap beberapa senyawa. Sering juga menggunakan cara deteksi dengan sinarultra ungu atau teknik radio kimia. Bila daerah-daerah dari noda yang terpisah telah dideteksi diperlukan untuk mengidentifikasi tiap-tiap individu dari senyawa.

Metoda identifikasi yang paling mudah adalah didasarkan pada kedudukan dari noda relatif terhadap permukaan pelarut,

menggunakan harga Rf. Terutama pada gugus-gugus yang besar dari senyawa-senyawa yang susunan kimianya mirip seperti asam amino, harga Rf sangat berdekatan sama lain. Dalam hal ini perlu melakukan teknik dua jalan atau dua arah.

Kertas yang dan dan cuplikan ditempatkan pada satu sudut. Pengembangan dengan campuran pelarut 1, dengan ujung kertas AB dicelupkan, memberikan pemisahan sebagian seperti ditunjukkan dalam gambar 13.a. Lembaran kertas diambil dan dikeringkan dan kemudian dimasukkan dalam bejana kedua dengan ujung AC dicelupkan dalam pelarut 2. Pengembangan dengan pelarut ini, diikuti dengan pengeringan dan pemberian pereaksi tertentu akan memberikan noda-noda seperti gambar 13.b.



Gambar 13. Kromatografi Dua arah.  
Sumber : Harjono 1991, Kromatografi

Kertas saring dapat digantungkan/diletakkan sehingga pelarut bergerak ke atas, ke bawah atau mendatar. Hasil-hasil dari metoda pertama dan kedua adalah mirip tetapi berbeda dari metoda ketiga.

Dalam metoda penaikkan (*ascending*) kertas dicelupkan hingga ujung di mana aliran mulai bergerak terletak sedikit di atas permukaan dari pelarut dan pelarut naik melalui serat-serat dari kertas oleh gaya kapiler. Di dalam metoda penurunan (*descending*) ujung alas dari kertas dicelupkan dalam pelarut dan mengalir, meskipun diawali oleh gaya kapiler diteruskan oleh gravitasi. Metoda mendatar (*horizontal*)

sangat berbeda dari kedua metoda di atas. Noda cuplikan ditempatkan pada pusat dari kertas (biasanya kertas saring berbentuk bulat) dan pelarut diteteskan juga di pusat kertas. Aliran juga oleh gaya kapiler, senyawa-senyawa dalam campuran segera berkembang dengan pelarut. Bila akan melakukan pemisahan dengan kromatografi kertas, maka hal-hal yang perlu diperhatikan adalah :

- 1) Metoda (penaikan, penurunan atau mendatar)
- 2) Macam dari kertas
- 3) Pemilihan dan pembuatan pelarut (fasa bergerak)
- 4) Kesetimbangan dalam bejana yang dipilih
- 5) Pembuatan cuplikan
- 6) Waktu pengembangan
- 7) Metoda deteksi dan identifikasi

Disamping sifat-sifat dari kertas dan pelarut, ada faktor-faktor penting yang mempengaruhi pemisahan yaitu : suhu, besarnya bejana, waktu pengembangan dan arah dari aliran pelarut.

### **1) Cara Penempatan Cuplikan pada Kertas**

Larutan campuran yang akan dipisahkan ditempatkan pada kertas berupa noda. Noda tersebut dibiarkan untuk berkembang membentuk suatu bulatan. Bagian dari kertas yang ditetesi dibiarkan dalam keadaan mendatar, sehingga larutan tetap dalam keadaan kompak dalam bentuk bulatan. Kertas jangan sampai tersentuh oleh zat-zat yang tak dikehendaki. Besarnya noda tergantung pada percobaan, tetapi diameter harus tidak lebih dari kira-kira 0,5 cm. Diameter ini dihubungkan dengan tebal dan karakteristik serapan dari kertas, tetapi biasanya noda yang lebih kecil akan menghasilkan pemisahan yang lebih baik.

Dalam penempatan cuplikan di atas kertas yang penting bukan jumlah volume, tetapi banyaknya campuran yang tertinggal bila pelarut telah teruapkan. Jika larutan terlalu encer untuk

ditempatkan satu kali, maka larutan dapat "dipekatkan" di atas kertas dengan cara meneteskan berkali-kali pada tempat yang sama dengan jarak waktu setelah tetes yang pertama kering dan berikutnya baru teteskan cuplikan yang kedua dan seterusnya. Noda sebaiknya dibiarkan kering dalam udara, tetapi bila mungkin dapat dikeringkan dengan menggunakan kipas angin. Dalam pengeringan jangan menggunakan udara panas, terutama jika larutan bersifat asam, karena dapat menyebabkan kertas menjadi hitam.

Ada beberapa cara pembuatan noda yaitu dengan menggunakan pipa kapiler dengan diameter yang sama, dimana cara ini sering digunakan. Sedangkan cara yang lain dapat menggunakan alat penyuntik.

Kedudukan dari permukaan pelarut yang terdapat pada kertas - harus selalu diberi tanda segera setelah lembaran kertas diambil dan kemudian dikeringkan dengan cara digantungkan. Penandaan dapat menggunakan pensil pada sisi samping kertas.

## 2) Deteksi Daerah-daerah Noda

Keberhasilan dari pemisahan kromatografi tergantung pada proses deteksi.

Senyawa-senyawa yang berwarna akan terlihat sebagai noda-noda berwarna yang terpisah pada akhir pengembangan. Untuk senyawa-senyawa tidak berwarna memerlukan deteksi secara kimia dan fisika. Sering menjadi pekerjaan rutin bahwa kromatogram-kromatogram diuji di bawah sinar ultra violet sebelum dan sesudah setiap metoda dikerjakan.

Cara mendeteksi noda yaitu dengan cara penyemprotan. Penyemprotan dilakukan perlahan-lahan dari samping kiri ke samping kanan dan dari atas ke bawah. Pelarut yang digunakan untuk penyemprotan harus tidak menguap. Penguapan yang cepat dari kertas diperlukan untuk mencegah terjadinya difusi dari noda-noda yang terpisah.

Pelarut yang digunakan adalah etanol, propanol, n-butanol atau kloroform atau campurannya. Penyemprotan kertas harus dilakukan dalam lemari asam dan selesai penyemprotan, alat harus dibersihkan untuk mencegah lobang penyemprot menjadi tidak lancar (tersumbat).

Pereaksi yang digunakan untuk mendeteksi asam-asam amino biasanya ninhidrin (indanatrion hidrat). Pada suhu kamar pereaksi akan memberikan warna pada asam-asam amino kira-kira setelah 24 jam. Tetapi pada perpanasan suhu 100°C warna akan timbul setelah kira-kira 4 menit.

Di dalam teknik pencelupan, larutan pereaksi dimasukkan dalam tempat bejana dan lembaran atau potongan kertas dicelupkan di dalamnya. Pelarut yang lebih mudah menguap dapat digunakan, sampai dapat mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk pengeringan, dan mengurangi bahaya difusi dari noda-noda selama pengeringan. Pelarut lain yang sering digunakan adalah aseton

### **b. Kromatografi Kolom**

Metode pemisahan kromatografi kolom memerlukan bahan kimia yang cukup banyak sebagai fasa diam dan fasa bergerak bergantung pada ukuran kolom gelas. Untuk melakukan pemisahan campuran dengan metode kromatografi kolom diperlukan waktu yang cukup lama, bisa berjam-jam hanya untuk memisahkan satu campuran.

Selain itu, hasil pemisahan kurang jelas artinya kadang-kadang sukar mendapatkan pemisahan secara sempurna karena pita komponen yang satu bertumpang tindih dengan komponen lainnya. Masalah waktu yang lama disebabkan laju alir fasa gerak hanya dipengaruhi oleh gaya gravitasi bumi, ukuran diameter partikel yang cukup besar membuat luas permukaan fasa diam relatif kecil, sehingga tempat untuk berinteraksi antara komponen-komponen dengan fasa diam menjadi terbatas. Apabila ukuran diameter partikel diperkecil supaya luas permukaan fasa diam bertambah menyebabkan semakin lambatnya aliran fasa gerak atau fasa gerak tidak mengalir sama sekali. Selain itu fasa diam yang sudah terpakai tidak dapat digunakan lagi untuk pemisahan campuran yang lain karena sukar meregenerasi fasa diam. Ditinjau dari mekanismenya kromatografi kolom merupakan kromatografi serapan atau adsorbsi. Khromatografi didasarkan pada retensi suatu zat terlarut oleh adsorpsi permukaan.

## 1) Kromatografi Kolom Adsorpsi

Contoh yang termasuk kromatografi kolom adalah kromatografi kolom adsorpsi (kromatografi terbuka/konvensional). Kromatografi kolom terbuka adalah kromatografi kolom sederhana yang pengaliran pelarut pembilasnya dengan gaya gravitasi, dapat dilakukan di setiap laboratorium analisis dengan alat sederhana (sekarang kolom kapiler sering disebut kolom terbuka).

Prinsip yang mendasari kromatografi kolom adsorpsi ialah bahwa komponen -komponen dalam zat contoh yang harus diperiksa mempunyai afinitas yang berbeda-beda terhadap adsorben dalam kolom. Sehingga dengan adanya perbedaan daya serap dari masing-masing komponen, campuran yang akan diuji kemudian dilarutkan dalam sedikit pelarut lalu dimasukan lewat puncak kolom dan dibiarkan mengalir kedalam zat menyerap. Senyawa yang lebih polar akan terserap lebih kuat sehingga turun lebih lambat dari senyawa non polar yang terserap lebih lemah dan akan turun lebih cepat. Zat yang diserap dari larutan secara sempurna oleh bahan penyerap akan

membentuk pita sempit pada kolom. Selanjutnya pelarut dengan tanpa tekanan udara dari masing-masing zat akan bergerak turun dengan kecepatan khusus sehingga terjadi pemisahan dalam kolom.

Substrat padat (adsorben) bertindak sebagai fase diam yang sifatnya tidak larut dalam fase cair. Fase bergeraknya adalah cairan (pelarut) yang mengalir membawa komponen campuran sepanjang kolom.

Pemisahan tergantung pada kesetimbangan yang terbentuk pada bidang antarmuka di antara butiran-butiran adsorben dan fase bergerak serta kelarutan relatif komponen pada fase bergeraknya. Antara molekul-molekul komponen dan pelarut terjadi kompetisi untuk teradsorpsi pada permukaan adsorben sehingga menimbulkan proses dinamis. Keduanya secara bergantian tertahan beberapa saat di permukaan adsorben dan masuk kembali pada fase bergerak. Pada saat teradsorpsi komponen dipaksa untuk berpindah oleh aliran fase bergerak yang ditambahkan secara kontinyu. Akibatnya hanya komponen yang mempunyai afinitas lebih besar terhadap adsorben akan secara selektif tertahan. Komponen dengan afinitas paling kecil akan bergerak lebih cepat mengikuti aliran pelarut.

Faktor yang mempengaruhi kecepatan gerak zat:

- a) Daya serap adsorben
- b) Sifat pelarut
- c) Suhu sistem kromatografi.

Kecepatan turunnya sampel dipengaruhi oleh :

- a) Tekanan didalam kolom semakin besar semakin cepat
- b) Panjang adsorben, makin panjang makin cepat turunnya senyawa
- c) Ukuran partikel adsorben
- d) Rongga udara dalam adsorben
- e) Jika ada rongga udara dalam adsorben maka jalannya senyawa akan terganggu.

Pemisahan kromatografi kolom adsorpsi didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda-beda terhadap permukaan fase diam. Kromatografi kolom adsorpsi termasuk pada cara pemisahan cair-padat. Kromatografi cair-padat juga disebut Kromatografi Adsorpsi, metode ini banyak digunakan untuk analisis biokimia dan organik.

Teknik pelaksanaannya dilakukan dengan kolom. Sebagai fasa diam di dalam kolom dapat dipilih silika gel atau alumina.

Untuk memisahkan campuran, kolom yang telah dipilih sesuai campuran diisi dengan bahan penyerap seperti alumina dalam keadaan kering atau dibuat seperti bubur dengan pelarut. Pengisian dilakukan dengan bantuan batang pengaduk untuk memanfaatkan adsorben dan gelas wool pada dasar kolom. Pengisian harus dilakukan secara hat-hati dan sepadat mungkin agar rata sehingga terhindar dari gelembung-gelembung udara. Untuk membantu homogenitas biasanya kolom setelah diisi divibrasi dengan cara diketuk-ketuk.

Sejumlah cuplikan yang dilarutkan dalam sedikit pelarut, dituangkan melalui sebelah atas kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam adsorben. Komponen-komponen dalam campuran diadsorpsi dari larutan secara kuantitatif oleh bahan penyerap berupa pita sempit pada permukaan atas kolom. Dengan penambahan pelarut secara terus-menerus, masing-masing komponen akan bergerak turun melalui kolom dan pada bagian atas kolom akan terjadi kesetimbangan baru antara bahan penyerap, komponen campuran dan eluen.

Kesetimbangan dikatakan tetap apabila suatu komponen yang satu dengan yang lainnya bergerak ke bagian bawah kolom dengan

waktu atau kecepatan berbeda-beda sehingga terjadi pemisahan. Jika kolom cukup panjang dan semua parameter pemisahan betul-betul terpilih seperti diameter kolom, adsorben, pelarut dan kecepatan alirannya, maka akan terbentuk pita-pita (zona-zona) yang setiap zona berisi satu macam komponen. Setiap zona yang keluar dari kolom dapat ditampung dengan sempurna sebelum zona yang lain keluar dari kolom.

## 2) Kromatografi Kolom Partisi

Kromatografi kolom partisi termasuk dalam kromatografi kolom yang disebut juga kromatografi kolom tertutup, yaitu termasuk kromatografi kolom canggih dengan menggunakan fase diam padat, cair yang disangga oleh butir padar atau cairan yang melapisi permukaan dalam kolom kapiler, sedangkan fase geraknya dapat berupa gas atau cair yang dipaksakan mengalir melalui kolom dengan tekanan tinggi. Senyawa dalam sampel mengalami antaraksi berulang-ulang (partisi) di antara fase gerak dan fase diam dan secara berangsur-angsur dipisahkan membentuk pita dalam fase gerak. Komponen campuran yang sitahan paling lemah terbilas lebih dulu dan yang ditahan paling kuat terbilas paling akhir.

Teknik pemisahan kromatografi kolom partisi sangat mirip dengan kromatografi kolom adsorpsi. Perbedaannya terletak pada sifat dari penyerap yang digunakan. Pada kromatografi kolom partisi penyerapnya berupa materi padat berpori seperti kieselguhr, selulosa atau silika gel yang permukaannya dilapisi zat cair (biasanya air). Dalam hal ini zat padat hanya berperan sebagai penyangga (penyokong) dan zat cair sebagai fase diamnya. Fase diam zat cair umumnya diadsorbsikan pada penyangga padat yang sejauh mungkin inert terhadap senyawa-senyawa yang akan dipisahkan. Zat padat yang penyokong harus penyerap dan menahan fase diam serta harus membuat permukaannya seluas mungkin untuk

mengalirnya fase bergerak. Penyangga pada umumnya bersifat polar dan fase diam lebih polar dari pada fase bergerak. Dalam kromatografi partisi fase bergeraknya dapat berupa zat cair dan gas yang mengalir membawa komponen-komponen campuran sepanjang kolom. Jika fase bergeraknya dari zat cair, akan diperoleh kromatografi partisi cair-cair. Teknik ini banyak digunakan untuk pemisahan senyawa-senyawa organik maupun anorganik (Yazid, 2005).

Pengisian fasa diam ke dalam kolom dapat dilakukan dengan cara kering dan cara basah.

**a) Metode Kering,**

Pada metode kering, kolom diisi dengan fasa diam kering, diikuti dengan penambahan fasa gerak yang disiramkan pada kolom sampai benar-benar basah. Cara kering yaitu silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah diberi kapas atau *glass wool* kemudian ditambahkan cairan pengelusi.

Selapis pasir diletakkan didasar kolom, kemudian fase gerak dimasukkan lapis demi lapis sambil ditekan dengan karet atau alat penekan lain. Selain ditekan dapat juga dibantu dengan dihisap, sehingga dihasilkan packing fase diam yang mampat. Diatas fase diam diletakkan kertas saring dan diatasnya lagi selapis pasir.

Pada posisi keran terbuka fase gerak dituangkan dan dibiarkan mengalir keluar. Packing kolom disimpan dengan mempertahankan selapis fase gerak berada diatas lapisan pasir.

**b) Metode basah**

Pada cara basah fasa diam dibuat bubur dulu dengan pelarut yang akan digunakan untuk fasa gerak, baru kemudian dimasukkan kedalam kolom. Fasa gerak dalam kromatografi kolom dapat berupa pelarut tunggal atau campuran beberapa pelarut dengan komposisi tertentu. Pelarut dapat polar atau non polar dengan berat molekul kecil lebih cepat meninggalkan fasa diam.

Pada metode basah, bubur (slurry) disiapkan dengan mencampurkan eluen pada serbuk fasa diam dan dimasukkan secara hati-hati pada kolom. Dalam langkah ini harus benar-benar hati-hati supaya tidak ada gelembung udara. Larutan senyawa organik dipipet di bagian atas fasa diam. Kemudian eluen dituangkan pelan-pelan melewati kolom.

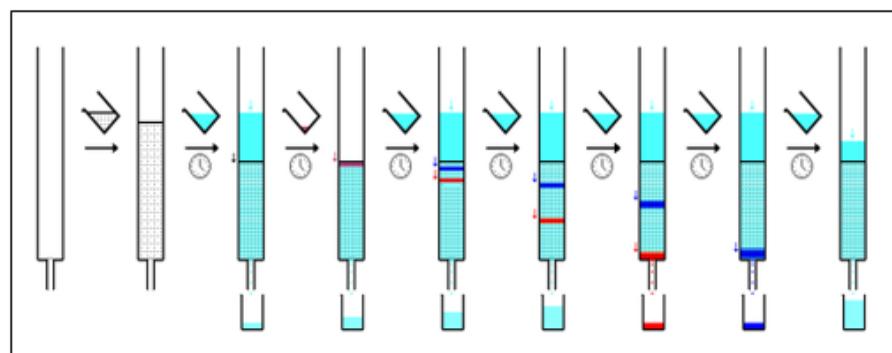
Cara basah lebih mudah untuk memperoleh packing/ pengemasan kolom yang memberikan pemisahan yang baik.

### **Cara basah:**

Kedalam ujung kolom kromatografi (tempat keluarnya fasa diam) diatas keran diletakkan gelas wool, tidak perlu ditekan kuat. Diatasnya ditaburkan pasir sehingga membentuk lapisan tebal  $\pm 1$  cm. Selanjutnya dimasukkan petroleum eter sambil mencoba kecepatan menetes fasa gerak dengan memutar keran. Di dalam beker gelas dibuat bubur fasa diam dengan petroleum eter. Dengan bantuan batang pengaduk bubur dimasukkan kedalam kolom berisi petroleum eter. Sambil diketuk-ketuk butir-butir fasa diam akan turun dan tersusun rapi didalam kolom. Bila kolom penuh dengan petroleum eter keran dibuka untuk menurunkan permukaannya dan petroleum eter yang keluar dapat digunakan lagi untuk membuat bubur fasa diam. Packing dihentikan sampai panjang kolom yang

dikehendaki. Selapis pasir diletakkan pada packing kolom untuk melindungi kolom. Kolom dijaga untuk tidak kering, maka diatas lapisan pasir harus selalu ada selapis fase gerak. Pada proses packing ini dinding luar kolom gelas disemprot dengan aseton. Penyemprotan dimaksudkan untuk mendinginkan kolom sehingga menghambat terbentuknya gelembung udara. Adapun untuk kolom yang diameternya kecil fase diam kering dapat ditaburkan sedikit demi sedikit kedalam kolom yang berisi petroleum eter. Kolom ini digunakan setelah disimpan semalam. Silika gel yang digunakan pada cara basah terlebih dahulu disuspensikan dengan cairan pengelusi yang akan digunakan, kemudian dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom secara kontinyu sedikit demi sedikit hingga masuk semua, sambil kran kolom dibuka. Eluen dialirkan hingga silika gel mapat, setelah silika gel mapat eluen dibiarkan mengalir sampai batas adsorben kemudian kran ditutup dan sampel dimasukkan yang terlebih dahulu dilarutkan dalam eluen sampai diperoleh kelarutan yang spesifik. Kemudian sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom sedikit demi sedikit hingga masuk semua, dan kran dibuka dan diatur tetesannya, serta cairan pengelusi ditambahkan. Tetesan yang keluar ditampung sebagai fraksi-fraksi.

Seluruh proses kromatografi kolom adalah sbb :



Gambar 14. Rangkaian Proses Kromatografi Kolom.  
Sumber :<http://4.bp.blogspot.com/-/kromatografi+kolom.PNG>

Langkah proses Pemisahan kromatografi dengan metode kolom sebagai berikut :

- **Menyiapkan Sampel dan Standar untuk Kromatografi Kolom**

Pemisahan kromatografi kolom adsorpsi didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda-beda terhadap permukaan fase diam. Kromatografi kolom adsorpsi termasuk pada cara pemisahan cair-padat. Kromatografi cair-padat juga disebut Kromatografi Adsorpsi, metode ini banyak digunakan untuk analisis biokimia dan organik. Teknik pelaksanaannya dilakukan dengan kolom. Sebagai fasa diam di dalam kolom dapat dipilih silika gel atau alumina.

- Sampel dipersiapkan sama dengan preparasi sampel untuk kromatografi kertas, yaitu bila sampel padat diekstaksi terlebih dahulu dengan pelarut organik.
- Penyiapan pelarut atau pemilihan dari pelarut tergantung dari sifat kelarutannya.

Tetapi lebih baik untuk memilih suatu pelarut yang tidak tergantung pada kekuatan elusi, sehingga zat-zat elusi yang lebih kuat dapat dicoba. "Kekuatan" dari zat elusi adalah daya penyerapan pada penyerap dalam kolom. Biasanya untuk penyerap-penyerap yang polar seperti alumina dan silika gel, maka kekuatan penyerapan naik dengan kenaikan polaritas dari zat yang diserap.

Menurut TRAPPE, kekuatan elusi dari deret-deret pelarut untuk senyawwa-senyawa dengan menggunakan silika gel akan *diturunkan* dalam urutan sebagai berikut : **Air murni < metanol < etanol < propanol < aseton < etil-**

**asetat < dietileter < kloroform < rnetilena klorida < benzena < toluena < trikloroetilena < karbon tetraklorida < sikloheksana < heksana.**

Kekuatan dari pelarut-pelarut yang berbeda menurut WILLIAMS, pada karbon aktif dalam kolom untuk asam-asam amino dan sakarid diturunkan dalam urutan: **etil asetat < dietil eter < propanol < aseton < etanol < rnetanol < air murni.**

Urutan ini adalah dari kenaikan polaritas atau penurunan panjang rantai dari homolog. Sedangkan untuk alumina dan silika gel urutannya adalah sebaliknya. Kemurnian dari pelarut-pelarut harus setinggi mungkin.

- **Penyiapan penyerap**

Penyerap yang sering digunakan adalah alumina. Kadang-kadang dihubungkan dengan luas permukaan spesifik dari zat padat, yaitu luas permukaan yang diukur dalam meter persegi tiap gram, dalam hal karbon, silika gel dan alumina dapat dibuat menjadi aktif dengan memiliki permukaan spesifik beratus-ratus meter persegi. Sedangkan seperti kalsium, karbonat dan kalsium hidroksida, mempunyai permukaan spesifik yang mempunyai ukuran dalam puluhan meter persegi atau kurang sampai dikategorikan relatif tak aktif.

Banyak zat-zat padat yang telah digunakan sebagai penyerap, diantaranya adalah sebagai berikut :

Zat padat	Digunakan untuk memisahkan
Alumina/magnesia	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sterol-sterol, zat warna, vitamin-vitamin, ester-ester, alkaloid-alkaloid, senyawa-senyawa anorganik.</li></ul>

Silika gel	• sterol-sterol, asam-asam amino.
Karbon	• Peptida-peptida, karbohidrat-karbohidrat, asam-asam amino
Magnesium silikat	• Sterol-sterol, ester-ester, gliserida-gliserida, alkaloida-alkaloida
Magnesium karbonat	• Porphirin, Karotenoida-karotenoid
Kalsium hidroksida	• Karotenoida-karotenoida, xantofil
Kalsium karbonat	• Enzim-enzim, protein-protein, polinukleotida-polinukleotida
Kalsium fosfat	• Sterol-sterol
Aluminium silikat	• Enzim-enzim • Klorofil- Klorofil

*Sumber : Hardjono Kromatografi, 1991*

Banyak penyerap seperti alumina, silika gel, karbon aktif dan magnesium silikat dapat diperoleh diperdagangan. Penyerap tersebut sering memerlukan aktivasi sebelum dipakai, hal ini dapat dilakukan dengan pemanasan dan mungkin dengan pengurangan tekanan. Suhu optimum untuk aktivasi aluminium biasanya sekitar 400°C dan waktu pemanasan cukup selama 4 jam. Untuk kebanyakan zat-zat padat, pemanasan pada suhu 200°C selama 2 jam.

Zat-zat aktif yang digunakan sebagai penyerap dalam kromatografi kolom sering merupakan katalisator yang baik; ini merupakan bahaya yang perlu mendapat perhatian. Alumina sering menimbulkan perubahan-perubahan kimia dan menimbulkan reaksi-reaksi misal dapat menyebabkan kondensasi dari aldehida-aldehida dan keton-keton, sehingga bila hal ini terjadi, maka harus menggunakan alumina yang bersifat netral. Silika gel dapat menyebabkan isomerisasi dari berbagai senyawa-senyawa seperti terpen dan sterol.

Fasa tetap harus disokong dalam beberapa cara, yaitu fasa tetap zat cair disokong pada zat padat yang bersifat inert terhadap senyawa-senyawa yang akan dipisahkan. Zat padat

yang menyokong ini ditempatkan dalam kolom seperti pada kromatografi serapan. Kenyataan sangat kecil sekali perbedaan antara dua macam jenis kromatografi ini. Zat yang menyokong harus penyerap dan menahan fasa tetap dan harus membuat luas permukaannya menjadi seluas mungkin untuk fasa yang mengalir. Ia harus stabil, mudah diisikan dalam kolom bila menyerap fasa tetap zat cair dan harus tidak merintangi aliran pelarut. Fasa bergerak dalam kromatografi partisi dapat berupa zat cair atau gas.

- **Persiapan Peralatan**

Kolom dan alat-alat lain yang digunakan untuk kromatografi partisi adalah sama seperti yang digunakan dalam kromatografi serapan. Tabung-tabung yang digunakan di laboratorium panjangnya antara 25-50 cm dengan diameter hingga 4 cm. Tabung kromatografi yang dipasang tegak lurus, diisi dengan diam yang dapat memisahkan senyawa dengan metode adsorpsi, partisi atau penukaran ion. Kolom yang digunakan untuk keperluan pemisahan sampel berukuran diameter dalam sekitar 10-20 mm dan panjang kolom kurang lebih 150-300 mm yang diisi dengan fase diam yang diperlukan. Aliran pelarut yang melalui kolom partisi mempunyai tendensi agak lambat tetapi dapat dipercepat dengan menggunakan tekanan udara di atas kolom seperti halnya pada kolom serapan.

- **Cara Memasukkan Penyerap**

Pengisian penyerap dalam kolom adalah pertama mencampur penyokong dengan fasa tetap diaduk dengan sejumlah fasa bergerak yang digunakan. Bubur ini kemudian dituangkan sedikit demi sedikit dalam tabung yang mengandung sedikit zat cair yang sama. Setiap pemasukan bubur ke dalam tabung disertai dengan penekanan dengan batang gelas yang ujungnya datar sedikit lebih kecil daripada diameter tabung. Kelebihan

dari pelarut dapat dibiarkan hingga lepas melalui kolom atau diambil dengan pipet. Berhasilnya pemisahan tergantung pada kekompakan pengisian dan keteraturan pita-pita kromatografi.

- **Cara Memasukan Cuplikan**

Pemasukan cuplikan adalah menggunakan pipet seperti dilakukan pada kolom serapan. Mula-mula melarutkan cuplikan dalam sejumlah fasa bergerak dan mencampurkan dengan sejumlah zat padat penyokong hingga diperoleh bubuk yang kering. Bubuk ini kemudian diletakkan di atas kolom dan sedikit fasa bergerak ditambahkan.

- **Elusi**

Teknik elusi yang digunakan dalam kolom partisi adalah sama seperti yang di gunakan dalam kolom serapan. Jika fasa tetap adalah berair, maka fasa bergerak yang digunakan zat cair organik atau campuran. Jika penyokong yang digunakan tak suka air, maka fasa tetap berupa zat organik dan fasa bergerak berair adalah menjadi mungkin. Ini dikenal sebagai kromatografi “fasa berbalik” dan telah digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sangat larut dalam pelarut-pelarut organik.

Pola kecepatan arus elutor pada tiap irisan kolom yang dipilih di sembarang tempat sudah tentu sedapat mungkin harus sama. Fasa diam berupa adsorben yang tidak larut dalam fasa gerak, ukuran partikel fasa diam harus seragam. Adanya pengotor dalam fasa diam dapat menyebabkan adsorpsi tidak reversible. Sebagai fasa diam digunakan alumina, silica gel, arang, bauksit, kalsium karbonat, magnesium karbonat, pati, talk, selulose, gula.

Keseragaman ini dapat dicapai dengan memilih adsorben yang ukuran butir-butirnya sama (diayak) dan dengan cara penyaratan yang baik. Makin kecil ukuran butir adsorben, makin cepat keseimbangan adsorpsi akan tercapai, dan makin besar pula kecepatan elusi yang boleh dipergunakan. Tetapi dilain pihak, makin kecil butir adsorben, makin besar hambatan bagi cairan yang harus mengalir melalui kolom. Apabila kecepatan lintas bagi cairan elutor terlalu kecil, dapat dipergunakan pompa vakum yang menimbulkan tekanan rendah dalam ruang di bawah kolom sehingga cairan dapat mengalir lebih cepat melalui kolom.

Fase gerak dimasukkan kedalam kolom dengan cara dituangkan sedikit demi sedikit atau dialirkan dari bejana yang diletakkan diatas kolom sehingga fase gerak mengalir dengan sendirinya. Cara yang praktis adalah dengan memasukkan kedalam corong pisah, ujung corong pisah dimasukkan kedalam kolom dan ujung lain tertutup, sedangkan keran terbuka. Fase gerak akan keluar dengan sendirinya sesuai dengan keluarnya fase gerak dari kolom.

Dibedakan dua jenis cara elusi yaitu :

- **Elusi isokratik** yaitu selama proses elusi menggunakan fase gerak dengan polaritas tetap.
- **Elusi gradien** (bertahap) yaitu selama proses elusi menggunakan fase gerak berubah-ubah polaritasnya. Untuk membuat polaritas berubah-ubah maka komposisi fase gerak berubah. Pada umumnya dimulai fase gerak non polar kemudian berubah ke pelarut yang polar. Perubahan ini dapat diprogramkan sesuai dengan pemisahan yang diinginkan. Diagram pemisahan dua komponen pada kromatografi kolom, elusi dihentikan jika sudah tidak ada lagi sampel yang dapat dibawa keluar lagi oleh fase gerak,

bila digunakan elusi gradien sudah sampai pada fase gerak yang paling polar. Mendeteksi komponen yang dipisahkan kromatografi kolom yang konvensional tidak dilengkapi detektor, namun sekarang dapat digunakan dengan mengalirkan *eluate* (eluen) pada detektor untuk mendeteksi komponen.

### c. Kromatografi Lapis Tipis

Langkah proses Pemisahan kromatografi dengan metode lapis tipis sebagai berikut:

#### 1) Menyiapkan Sampel dan Standar untuk Kromatografi Lapis Tipis

- a) Sampel dipersiapkan sama seperti preparasi sampel untuk kromatografi kertas, yaitu sampel padat dilarutkan dengan pelarut organik atau diekstraksi.
- b) Membuat plat kromatografi, yaitu untuk membentangkan penyerap dalam palisan tipis yang berguna sebagai penyokong yang inert. Penyerap padat berbentuk bubuk halus dibuat menjadi bubur (*slurry*) dengan air (kurang umum dengan zat cair organik yang mudah menguap) dan dibentangkan di atas plat gelas. Pembuatan lapisan tipis di atas kaca ada beberapa cara yaitu dengan jalan menyemprotkan atau pencelupan, di samping dikerjakan dengan tangan dapat juga dengan mesin. Plat yang telah dilapisi dipanaskan atau diaktifkan dengan jalan memanaskan pada suhu kira-kira 100°C selama beberapa waktu lamanya. Larutan cuplikan dalam pelarut yang mudah menguap diletakkan di atas lapisan dengan menggunakan pipet atau alat penyuntik.

Waktu rata-rata untuk kromatografi lapisan tipis dengan panjang 10 cm pada silika gel adalah sekitar 20 - 30 menit (tergantung dari sifat fasa bergerak), sedangkan pemisahan yang sama dengan

memerlukan waktu dua jam. Untuk pemisahan-pemisahan secara kualitatif pada plat yang kecil memerlukan waktu sekitar 5 menit.

Hasil pemisahan yang baik ternyata bahwa penyerap dalam kromatografi lapisan tipis mempunyai kapasitas yang lebih besar bila dibandingkan dengan kertas. Keuntungan dari sistem serapan ialah dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofobi, seperti lipida-lipida dan hidrokarbon.

## 2) Membuat Lapisan Tipis

Pada dasarnya ada empat cara yang digunakan dalam pembuatan lapisan tipis, yaitu pembentangan, penuangan, penyemprotan dan pencelupan.

- a) Metoda pembentangan dan penyernprotan dapat dikerjakan dengan tangan atau dengan alat. Banyak pemakai yang tak menggunakan metoda penuangan secara mekanik. Jika penyerap sangat halus dan partikel-partikelnya homogen, dan jika tak menggunakan pengikat, maka bubur dapat dituangkan di atas plat dan dibiarkan hingga melapisinya.
- b) Pembuatan dengan penuangan biasanya menggunakan jenis alumina, dan pembuatan buburnya tidak menggunakan air, melainkan menggunakan cairan yang mudah menguap seperti etanol (atau campuran etanol-air) atau etil asetat.
- c) Pencelupan. Plat-plat yang kecil, seperti gelas mikroskop, dapat dilapisi dengan pencelupan dalam bubur dari penyerap dalam kloroform atau zat cair mudah menguap yang lain. Sekali lagi lebal lapisan yang pasti tidak diketahui dan kemungkinan lapisan tak dapat dibuat dengan baik, meskipun demikian metoda ini cukup memuaskan untuk membuat sejumlah dari plat-plat untuk pemisahan secara kualitatif dengan cepat. Setelah pembentangan plat dibiarkan kering selama kira-kira 5 -10 menit, ini bila dibuat dengan bubur yang berair, selanjutnya dipanaskan dan di"aktif"kan dengan pemanasan pada suhu kira-kira 100°C selama 30 menit. Plat-plat yang dibuat dengan

zat-zat cair organik yang mudah menguap tak perlu pemanasan lebih lanjut. Penyentuhan dengan jari-jari akan merusak lapisan dan melepaskan partikel-partikel dari permukaan.

### 3) Menetapkan Fasa Gerak dan Pelarut

Pada kromatografi, komponen-komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda.

Pemilihan fasa gerak tergantung pada faktor-faktor seperti dalam pemisahan dalam kromatografi kolom serapan. Sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin, karena dapat mengurangi serapan dari setiap komponen dari campuran pelarut. Jika komponen-komponen yang mempunyai sifat polar tinggi (terutama air) dalam campuran akan merubah sistem menjadi sistem partisi.

Campuran yang baik memberikan fasa-fasa bergerak yang mempunyai kekuatan bergerak sedang, tetapi sebaiknya tidak mencampur lebih dari dua komponen, karena campuran yang lebih kompleks cepat mengalami perubahan-perubahan fasa terhadap perubahan suhu. Kemurnian dari pelarut adalah lebih penting

dalarn lapisan tipis daripada bentuk-bentuk kromatografi lain, karena digunakan sejumlah materi yang sedikit.

#### 4. Proses Hasil Pemisahan dan Pengukuran sesuai Prosedur

##### a. Kromatografi Kertas

Hasil pemisahan dianalisis berdasarkan harga atau nilai faktor retardasi ( $R_f$ ) pada masing-masing noda, bercak atau spot yang dihasilkan pada pelarut yang sama. Apabila diperoleh jarak noda yang sama dengan sampel standar, berarti sampel yang dianalisis sama dengan sampel standar. Perhitungan niali  $R_f$  dilakukan dengan cara membagi jarak yang ditempuh zat terlarut dengan jarak yang ditempuh pelarut.

Mengidentifikasi noda-noda dalam kertas menggunakan harga  $R_f$  (*Retordation factor*) yang didefinisikan sebagai:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa}}{\text{Jarak yang digerakan oleh pelarut}}$$

Ada beberapa faktor yang menentukan harga  $R_f$  yaitu :

1) Pelarut

Pelarut disebabkan pentingnya koefisien partisi, maka perubahan-perubahan yang sangat kecil dalam komposisi pelarut dapat menyebabkan perubahan-perubahan harga  $R_f$ .

2) Suhu.

Perubahan dalam suhu merubah koefisien partisi dan juga kecepatan aliran.

3) Ukuran dari bejana  
Volume dari bejana mempengaruhi homogenitas dari atmosfer, jadi mempengaruhi kecepatan penguapan dari komponen-komponen pelarut dari kertas. Jika bejana besar yang digunakan, ada kecenderungan perambatan lebih lama, seperti perubahan-perubahan komposisi pelarut sepanjang kertas, maka koefisien partisi akan berubah juga. Dua faktor yaitu penguapan dan komposisi mempengaruhi harga  $R_f$ .

4) Kertas

Pengaruh utama yaitu kertas pada harga-harga  $R_f$  yang terjadi dari perubahan ion dan serapan yang berbeda untuk macam-macam kertas. Kertas mempengaruhi kecepatan aliran dan akan mempengaruhi pada kesetimbangan partisi.

5) Sifat dari campuran.

Berbagai senyawa mengalami partisi di antara volume yang sama dari fasa tetap dan bergerak, sehingga akan mempengaruhi karakteristik dari kelarutan yang satu terhadap lainnya hingga terhadap harga  $R_f$ .

Untuk mengukur  $R_f$  perlu melokalisir permukaan pelarut. Harga  $R_f$  biasanya dinyatakan sebagai fraksi/bagian. Perbedaan dalam harga-harga  $R_f$  untuk dua senyawa yang dipisahkan tergantung pada besarnya noda-noda dan panjangnya aliran terlarut. Cara yang paling mudah dalam pengukuran  $R_f$  adalah dengan menggunakan penggaris. Ujung nol ditempatkan pada titik mula-mula dan ujung yang lain direntangkan ke arah permukaan pelarut dan harga  $R_f$  langsung dapat dibaca pada titik di mana angka penggaris tepat pada noda. Dalam penentuan  $R_f$  perlu mengukur dari pusat pita atau noda. Contoh hasil pemisahan suatu zat dengan menggunakan analisis kromatografi kertas seperti terlihat pada gambar.....



Gambar 15. Hasil pemisahan zat dengan kromatografi kertas  
Sumber : <http://kimiarif.blogspot.com/2013/08/praktikum-kimia-dasar-i-kromatografi.html>

### **b. Kromatografi Kolom**

Hasil pemisahan pada kromatografi kolom dipengaruhi oleh pemilihan terhadap fase yang digunakan. Fase diam (adsorbsi) harus berukuran partikel seragam, bersifat inert terhadap zat uji dan cukup aktif, sehingga memungkinkan perambatan zat uji. Adanya zat pengukur dapat menyebabkan adsorbsi tidak reversibel atau talling pada senyawa yang akan dipisahkan. Pemisahan yang lebih baik akan diperoleh dengan mengolah terlebih dahulu adsorben dengan suatu senyawa yang dapat teradsorbsi kuat sebagai dasar digunakan adorben yang polaritasnya dengan zat uji.

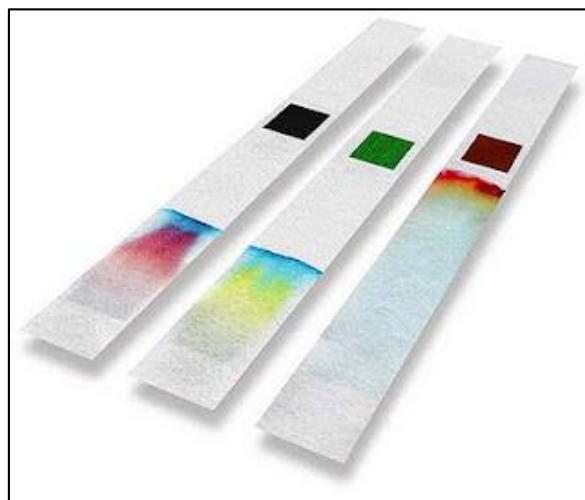
Analisis secara kuantitatif, komponen eluat yang diperoleh dapat diteruskan untuk ditetapkan kadarnya dengan cara titrasi ataupun spektfotometri, sedangkan analisis secara kualitatif, pergerakan komponen melalui kolom akan terjadi kesetimbangan baru antara bahan penyerap, komponen campuran dan eluen. Kesetimbangan dikatakan tetap bila suatu komponen yang satu dengan lainnya bergerak ke bagian bawah kolom denganwaktu atau kecepatan berbeda-beda sehingga terjadi pemisahan dengan terbentuk pita-pita (zona-zona) yang setiap zona berisi satu macam komponen eluat. Setiap zona yang keluar dari kolom dapat ditampung dengan sempurna sebelum zona yang lain keluar dari kolom.

### **c. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu metode kromatografi cair yang sering digunakan secara luas karena metode yang digunakan sederhana, prosedurnya cepat, dan tingkat keberhasilannya tinggi (Wewers et al., 2005). Suksesnya pemisahan secara kromatografi lapis tipis tergantung pada proses lokalisasi bercak. Untuk deteksi bercak

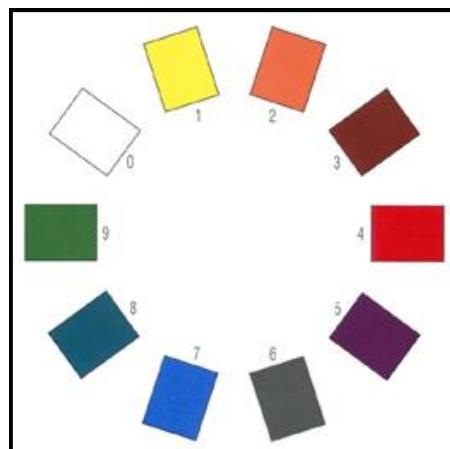
yang berwarna, maka dapat dipisahkan secara visual. Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna.

Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi menggunakan ultraviolet. KLT juga dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa bersifat hidrofobik seperti lipid dan hidrokarbon (Sastrohamidjojo, 2005). Hasil pemisahan dengan menggunakan KLT seperti terlihat pada gambar 16.



Gambar 16. Hasil Pemisahan Suatu Senyawa Dengan KLT  
Sumber : <http://www.generasibiologi.com/2016/02/kromatografi-lapis-tipis.html>

Setelah dilakukan elusi, maka plat akan menghasilkan bercak atau spot warna yang dapat diukur nilai  $R_f$ -nya. Untuk mendeteksi bercak-bercak tersebut dapat dilakukan dengan pengamatan secara langsung, menggunakan sinar UV, atau diberi pereaksi untuk membentuk warna. Macam-macam warna bercak pada plat dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Kode-Kode Warna-Warna Yang Terdapat Pada Bercak Plat Kromatogram (Hegge et al., 1991)

Sumber : <http://www.generasibiologi.com/2016/02/kromatografi-lapis-tipis.html>

Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi maka bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka bahan penyerapnya diberi indikator yang berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedang latar belakangnya akan kelihatan berfluoresensi.

Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak:

- 1) Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan untuk meningkatkan intensitas warna bercak.
- 2) Mengamati lempeng di bawah lampu ultra violet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 atau 366 untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam. Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluoresen yang tidak larut yang dimasukkan ke dalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi atau dapat pula dengan menyemprot lempeng dengan reagen fluorogenik

setelah dilakukan pengembangan. Adapun sinar UV366 dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa yang berfluorosensi secara alami (Schutle et al. 2005; Wall, 2008).

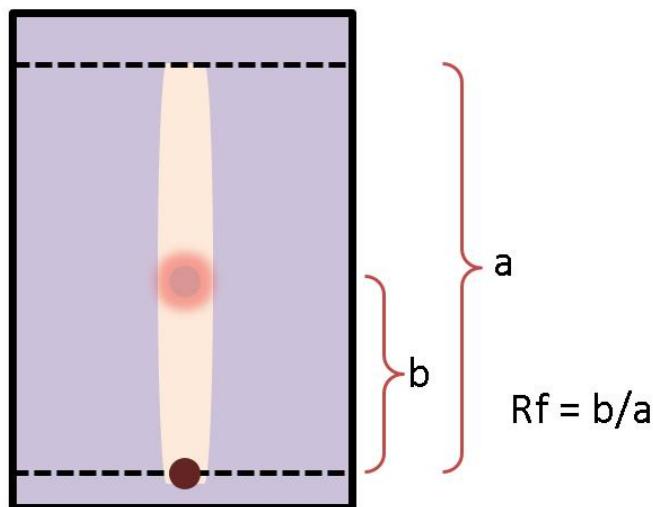
- 3) Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat diikuti pemanasan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklatan.
- 4) Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup
- 5) Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi dan 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).

### **Penetapan Harga Rf**

Faktor retensi (Rf) adalah jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen. Nilai Rf sangat karakteristik untuk senyawa tertentu pada eluen tertentu. Hal tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya perbedaan senyawa dalam sampel.

Senyawa yang mempunyai Rf lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal tersebut dikarenakan fasa diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fasa diam, sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah. Rf KLT yang bagus berkisar antara 0,2 - 0,8. Jika Rf terlalu tinggi, maka harus mengurangi kepolaran eluen, dan sebaliknya (Sastrohamidjojo , 1991).

**Harga Rf** merupakan parameter karakteristik kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis. Harga ini merupakan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa pada kromatogram dan pada kondisi konstan merupakan besaran karakteristik dan reproduksibel. Harga Rf didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal (b) dan jarak tepi muka pelarut dari titik awal (a).



Seperti halnya pada kertas harga  $R_f$  didefinisikan sebagai berikut:

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh palarut dari titik asal}}$$

Harga-harga  $R_f$  untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standard. Perlu diperhatikan bahwa harga-harga  $R_f$  yang diperoleh berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan, meskipun daftar dari harga-harga  $R_f$  untuk berbagai campuran dari pelarut dan penyerap dapat diperoleh.

Pengukuran lain yang sering dipakai adalah menggunakan pengertian  $R_x$  atau  $R_{std}$  yang didefinisikan sebagai berikut:

$$R_x \text{ atau } R_{std} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa yang tak diketahui}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa standard yang diketahui}}$$

Senyawa standar biasanya memiliki sifat-sifat kimia yang mirip dengan senyawa yang dipisahkan pada kromatogram.

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapisan tipis yang juga mempengaruhi harga  $R_f$  (Sastrohamidjoyo, 1991) adalah:

- 1) Struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan.
- 2) Sifat dari penyerap dan derajat aktifitasnya (biasanya aktifitas dicapai dengan pemanasan dalam oven, hal ini akan mengeringkan molekul-molekul air yang menempati pusat-pusat serapan dari penyerap). Perbedaan penyerap akan memberikan perbedaan yang besar terhadap harga  $R_f$  meskipun menggunakan fasa bergerak dan solute yang sama tetapi hasil akan dapat diulang dengan hasil yang sama, jika menggunakan penyerap yang sama, ukuran partikel tetap dan jika pengikat (kalau ada) dicampur hingga homogen.
- 3) Tebal dan kerataan dari lapisan penyerap, dalam prakteknya tebal lapisan tidak dapat dilihat pengaruhnya, tetapi perlu diusahakan tebal lapisan yang rata. Ketidakrataan akan menyebabkan aliran pelarut menjadi tak rata pula dalam daerah yang kecil dari plat.
- 4) Pelarut (dan derajat kemurniannya) sebagai fasa bergerak. Kemurnian dari pelarut yang digunakan sebagai fasa bergerak dalam kromatografi lapisan tipis adalah sangat penting dan bila campuran pelarut digunakan maka perbandingan yang dipakai harus betul-betul diperhatikan.
- 5) Derajat kejenuhan dan uap dalam bejana pengembangan yang digunakan.
- 6) Teknik percobaan. Arah pelarut bergerak di atas plat. (Metoda aliran penaikan yang hanya diperhatikan, karena cara ini yang paling umum meskipun teknik aliran penurunan dan mendatar juga digunakan).
- 7) Jumlah cuplikan yang digunakan. Penetesan cuplikan dalam jumlah yang berlebihan memberikan hasil penyebaran noda-noda dengan kemungkinan terbentuknya ekor dan efek tak kesetimbangan lainnya, hingga akan mengakibatkan kesalahan-kesalahan pada harga-harga  $R_f$ .
- 8) Suhu. Pemisahan-pemisahan sebaiknya dikerjakan pada suhu tetap, hal ini terutama untuk mencegah perubahan-perubahan dalam

komposisi pelarut yang disebabkan oleh penguapan atau perubahan-perubahan fasa.

- 9) Kesetimbangan.Ternyata bahwa kesetimbangan dalam lapisan tipis lebih penting dalam kromatografi kertas, hingga perlu mengusahakan atmosfer dalam bejana jenuh dengan uap pelarut. Suatu gejala bila atmosfer dalam bejana tidak jenuh dengan uap pelarut, bila digunakan pelarut campuran, akan terjadi pengembangan dengan permukaan pelarut yang berbentuk cekung dan fasa bergerak lebih cepat pada bagian tepi-tepi dan keadaan ini harus dicegah (Sastrohamidjoyo, 1991).

## 5. Penyimpanan kembali Peralatan dan Bahan sesuai Prosedur

Penyimpanan kembali peralatan dan bahan diperlukan ruang penyimpanan dan perlengkapan seperti lemari, rak dan laci yang ukurannya disesuaikan dengan luas ruangan yang tersedia.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam penyimpanan alat yaitu berdasarkan :

- a. Bahan dasar pembuatan alat
- b. Bobot alat
- c. Kepakaan alat terhadap lingkungan
- d. Pengaruh alat yang lain
- e. Kelengkapan perangkat alat dalam suatu set

Kerusakan pada alat dan bahan kimia dapat disebabkan oleh beberapa sumber. Faktor-faktor tersebut yaitu :

- a. Udara

Udara mengandung oksigen dan uap air (memiliki kelembaban). Kandungan ini memungkinkan alat dari besi menjadi berkarat dan membuat kusam logam lainnya seperti tembaga dan kuningan.

Usaha untuk menghindarkan barang tersebut terkena udara bebas seperti dengan cara mengecat, memoles, memvernisi serta melapisi

dengan khrom atau nikel. Kontak dengan udara bebas dapat menyebabkan bahan kimia bereaksi. Akibat reaksi bahan kimia dengan udara bebas seperti timbulnya zat baru, terjadinya endapan, gas dan panas. Dampaknya bahan kimia tersebut tidak berfungsi lagi serta dapat menimbulkan kecelakaan dan keracunan.

b. Air dan Asam – Basa

Alat laboratorium sebaiknya disimpan dalam keadaan kering dan bersih, jauh dari air, asam dan basa. Senyawa air, asam dan basa dapat menyebabkan kerusakan alat seperti berkarat, korosif dan berubah fungsinya. Bahan kimia yang bereaksi dengan zat kimia lainnya menyebabkan bahan tersebut tidak berfungsi lagi dan menimbulkan zat baru, gas, endapan, panas serta kemungkinan terjadinya ledakan.

c. Suhu

Suhu yang tinggi atau rendah dapat mengakibatkan :alat memuai atau mengkerut, memacu terjadinya oksidasi, merusak cat serta mengganggu fungsi alat elektronika.

d. Mekanis

Sebaiknya hindarkan alat dan bahan dari benturan, tarikan dan tekanan yang besar. gangguan mekanis dapat menyebabkan terjadinya kerusakan alat / bahan.

e. Cahaya

Secara umum alat dan bahan kimia sebaiknya dihindarkan dari sengatan matahari secara langsung. Penyimpanan bagi alat dan bahan yang dapat rusak jika terkena cahaya matahari langsung, sebaiknya disimpan dalam lemari tertutup. Bahan kimianya sebaiknya disimpan dalam botol yang berwarna gelap.

f. Api

Komponen yang menjadi penyebab kebakaran ada tiga, disebut sebagai segitiga api. Komponen tersebut yaitu adanya bahan bakar, adanya panas yang cukup tinggi, dan adanya oksigen. Oleh karenanya penyimpanan alat dan bahan laboratorium harus memperhatikan komponen yang dapat menimbulkan kebakaran tersebut.

Cara-cara penyimpanan alat dan bahan kimia :

- a. Alat berbentuk set, penyimpanannya harus dalam bentuk set yang tidak terpasang.
- b. Ada alat gelas yang harus disimpan berdiri, misalnya kolom, labu ukur, beaker glass.
- c. Alat yang memiliki bobot relatif berat, disimpan pada tempat yang tingginya tidak melebihi tinggi bahu.
- d. Penyimpanan alat perlu memperhatikan frekuensi pemakaian alat. Apabila alat itu sering dipakai maka alat tersebut disimpan pada tempat yang mudah diambil.
- e. Penyimpanan zat kimia harus diberi label dengan jelas dan dapat disusun menurut abjad atau berdasarkan tingkat bahaya.
- f. Zat kimia beracun harus disimpan dalam lemari terpisah dan terkunci, zat kimia yang mudah menguap harus disimpan di ruangan terpisah dengan ventilasi yang baik.

Penyimpanan kertas yang sering digunakan untuk kromatografi kertas adalah jenis kertas yang disediakan dapat bermacam-macam standard, bulatan dan gulungan atau dalam bentuk tertentu. Kertas harus disimpan di tempat jauh dari setiap sumber uap (terutama ammonia, yang mempunyai afinitas tinggi terhadap selulosa) dan jangan ditempatkan pada tempat yang mempunyai perubahan kelembaban yang tinggi (Sastrohamidjoyo, 1991).

## **B. Keterampilan yang diperlukan dalam Melakukan Analisis Kromatografi Konvensional**

Keterampilan yang diperlukan dalam Melaksanakan Analisis kromatografi antara lain adalah:

1. Mengenakan Alat pelindungdiri sesuai prosedur.
2. Mengoperasikan Alatkromatografisesuai denganpanduanpengoperasianalat.
3. Mengaplikasikan Standar dansampel ke sistem pemisahansesuaiprosedur.
4. Melakukan Proses pemisahan sesuai prosedur
5. Melakukan proses analisis hasil pemisahan dan pengukuran sesuaiprosedur.
6. Melakukan penyimpanan kembali semuaperalatan dan bahan sesuaiprosedur.

## **C. Sikap kerja yang diperlukan dalam Melakukan Analisis Kromatografi Konvensional**

Sikap kerja yang diperlukan dalam Melaksanakan Analisis kromatografi antara lain adalah:

1. Cermat dan teliti dalam Mengenakan Alat pelindung diri sesuai prosedur.
2. Cermat dan teliti dalam Mengoperasikan Alat kromatografi sesuai dengan panduan pengoperasian alat.
3. Cermat dan teliti dalam Mengaplikasikan Standar dan sampel ke system pemisahan sesuai prosedur.
4. Hati-hati, terampil, cermat, bersih dan taat asas dalam Melakukan Proses pemisahan sesuai prosedur
5. Cermat dan teliti Melakukan proses analisis hasil pemisahan dan pengukuran sesuaiprosedur.
6. Hati-hati, terampil, cermat dan bersih Melakukan penyimpanan kembali semua peralatan dan bahan sesuai prosedur.

## **BAB IV.**

### **MELAPORKAN HASIL ANALISIS**

#### **A. Pengetahuan yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan hasil analisis kromatografi konvensional**

##### **1. Pengolahan Data Hasil Analisis**

Pengolahan data merupakan bagian yang amat penting dalam kegiatan analisis, karena dengan pengolahan data hasil analisis data tersebut dapat diberi arti dan makna yang berguna bagi pengembangan produk yang dianalisis. Beberapa kegiatan yang perlu dilakukan dalam mengolah data, antara lain memeriksa data mentah dan membuatnya dalam bentuk tabel yang berguna, baik secara manual ataupun dengan menggunakan komputer. Setelah data disusun selanjutnya diolah sesuai dengan metode yang telah ditentukan.

Pengolahan data hasil analisis dapat dilakukan melalui beberapa langkah/kegiatan untuk memudahkan dalam pengolahan dan mencegah terjadinya kesalahan dalam pengolahan data. Beberapa langkah tersebut antara lain adalah:

- a. Pengumpulan data
- b. Tabulasi data
- c. Pengolahan data

##### **a. Pengumpulan data**

Tahap penting dalam pengumpuan data adalah memastikan bahwa data hasil penelitian sesuai dengan metode dan sampel yang dianalisis. Data atau keterangan yang telah dikumpulkan dalam buku catatan (record book) perlu dibaca sekali lagi dan diperbaiki jika masih terdapat hal-hal yang salah atau yang masih meragukan.

Beberapa hal perlu diperhatikan dalam mengumpulkan data, yaitu:

- 1) Apakah data sudah lengkap dan sempurna?
- 2) Apakah data sudah cukup jelas tulisannya untuk dapat dibaca?
- 3) Apakah semua catatan dapat dipahami?

Data harus lengkap sempurna dalam pengertian bahwa semua item dalam analisis telah tercatat sesuai dengan metode yang ditentukan. Jangan sampai terdapat item analisis yang tidak tercatat yang dapat mengakibatkan tidak dapat terolahnya data hasil analisis. Apabila terdapat item yang tidak tercatat harus disempurnakan, artinya apabila sudah dilaksanakan maka data harus dicari dan dicatat, namun apabila kegiatan belum dilakukan harus segera dilakukan dan hasilnya dicatat.

Data harus cukup jelas tulisannya untuk dapat dibaca artinya adalah bahwa segala tulisan dalam buku catatan harus jelas baik kalimat ataupun huruf serta angka. Kegiatan ini perlu sekali dikerjakan untuk menghilangkan keragu-raguan terhadap data yang dituliskan. Kegiatan ini juga dilakukan untuk memastikan kekonsistennan data hasil penelitian. Bila ditemukan ketidakkonsistennan maka carilah penyebab kesalahan tersebut, apakah ada kesalahan dalam mencatat, atau kesalahan dalam proses analisis.

### **b. Tabulasi data**

Tabulasi data merupakan proses mengorganisasi data agar lebih mudah dalam proses pengolahan data. Proses tabulasi dapat juga dilakukan sejak awal proses pengumpulan data hasil analisis untuk lebih memudahkan dan memastikan kebutuhan data terpenuhi sesuai metode yang ditentukan. Hal terpenting dalam proses tabulasi data adalah membuat tabel sesuai dengan metode analisis yang ditentukan. Tabel yang dibuat harus mampu memastikan bahwa tidak terjadi kesalahan antar sampel maupun metode yang telah ditetapkan.

Tabulasi data dapat dilakukan secara manual maupun komputerisasi. Proses tabulasi secara komputerisasi akan lebih memudahkan analis dalam mengolah data dibandingkan dengan cara manual.

### c. Pengolahan data

- 1) Pengolahan data merupakan tahap penting dalam kegiatan analisis, mengingat tanpa adanya pengolahan data, proses analisis yang dilakukan menjadi tidak berguna. Hasil analisis kromatografi yaitu berupa data hasil pengamatan dari semua informasi yang diperoleh dari data yang dikumpulkan dan dicatat ke dalam format atau tabel yang telah disiapkan. Informasi tersebut diantaranya meliputi kriteria:
  - a) Nama Sampel
  - b) Wujud warna yang ditampilkan
  - c) Jumlah komponen
  - d) Warna hasil pemisahan
  - e) Jarak Komponen
  - f) Jarak eluen
  - g) Perhitungan Rf
- 2) Hasil perhitungan Rf digunakan sebagai nilai perbandingan relatif antar sampel. Nilai Rf juga menyatakan derajat retensi suatu komponen dalam fase diam sehingga nilai Rf sering juga disebut faktor retensi. Perhitungan Rf dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditemui substansi}}{\text{Jarak yang dtempuh oleh pelarut}} \text{ atau } \frac{\text{Jarak komponen}}{\text{Jarak Eluen}}$$

- 3) Hasil perhitungan analisa kromatografi harus dapat dipertanggungjawabkan kebenarannya dan realibilitas perhitungan menggunakan statistik atau komputasi.
- 4) Hasil identifikasi dan perhitungan analisa komatografi dicatat setelah melakukan praktik selesai dan peralatan serta larutan pereaksi setelah disimpan.

## 2. Pelaporan Hasil Analisis

Hal penting dalam pelaporan hasil analisis adalah bagaimana mengolah data dan bagaimana melaporkannya. Hasil analisis kromatografi tidak akan ada artinya jika pengolahan datanya salah atau laporannya tidak dapat dimengerti oleh pihak pengguna.

Hal yang perlu diperhatikan dalam pelaporan hasil analisis adalah sebagai berikut :

- a. Hasil identifikasi dan perhitungan analisis kromatografi dari hasil pengolahan data dilaporkan dalam bentuk non verbal (tertulis) yaitu dilaporkan dengan cara menyampaikan hasilnya secara tertulis dalam bentuk laporan sesuai dengan format hasil identifikasi dan format atau tabel hasil perhitungan yang telah dicatat.
- b. Tata cara pelaporan yaitu adanya pembatasan, akurasi, presisi, metode yang digunakan, dapat dicopy atau tidak, dll.
- c. Pelaporan dilakukan peserta pelatihan setelah selesai hasil identifikasi dan perhitungan analisa kromatografi dicatat/dipindahkan ke dalam format.
- d. Laporan hasil pengolahan data diverifikasi oleh pengawas/instruktur/ widyaiswara, jika sudah tidak ada kesalahan atau koreksi yang harus diperbaiki, maka laporan harus ditanda tangan oleh verifikator (pengawas/instruktur/widyaiswara) atau pihak yang bertanggung jawab dalam pelaporan hasil analisis sesuai prosedur.

## B. Keterampilan yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan hasil analisis kromatografi konvensional

1. Mencatat hasil identifikasi dan perhitungan analisa kromatografi
2. Melaporkan hasil identifikasi dan perhitungan analisa kromatografi sesuai prosedur

### **C. Sikap kerja yang diperlukan dalam melaporkan kegiatan hasil analisis kromatografi konvensional**

Harus bersikap secara :

1. Teliti dan benar dalam mencatat hasil identifikasi dan perhitungan analisa kromatografi
2. Tepat dan benar dalam melaporkan hasil identifikasi dan perhitungan analisa kromatografi sesuai prosedur

## DAFTAR PUSTAKA

Day, A.R.,J.R., & Underwood A.L., 2002, *Analisis Kimia Kuantitatif*, Edisi enam, Erlangga, Jakarta.

<https://www.academia.edu/5087478/Kromatografi>, Diakses tgl 6 Juni 2019, jam 11.15

Hardjono Sastrohamidjojo, Dr., 1991, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, UGM, Yogyakarta.

J. Bassett - R.C. Denney – G.H. Jeffery – J. Mendham, 1994, Buku Ajar Vogel: *Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, Alih Bahasa : Dr. A. Hadyana Pudjaatmaka, Ir. L. Setiono, Penerbit Buku Kedokteran.

McNair & E.J.Bonelli, 1988, *Dasar Kromatografi Gas*, Penerbit ITB Bandung

Mulya Suryadarma, dkk. 2004, *Pengembangan Metode Analisis*, Airlangga Press, Surabaya.

Skoog, Doughlas, A and James J Leary, 1992, *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing, New York.

## DAFTAR PENYUSUN

No.	Nama	Profesi
1.	Ir. Dian Nurdiani, M.Si	1. Widya Iswara Kimia Analisis (PPPPTK Pertanian) 2. Asesor Kimia Analisis (PPPPTK Pertanian)

### DAFTAR EDITOR

No.	Nama	Profesi
1.	Murwaniati	Guru Kimia Analisis SMK Negeri 5 Surabaya