



RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER

MATA KULIAH : ANALISIS INSTRUMENTAL

Disusun oleh :

apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech.

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA
TAHUN AKADEMIK 2024/2025**

1	RENCANA PEMBELAJARAN SEMESTER (RPS) PROGRAM STUDI : S 1 FARMASI INSTITUSI : SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTUKUSMO YOGYAKARTA TAHUN AKADEMIK : 2024/2025	
2	Nama Mata Kuliah	Analisis Instrumental
3	Kode	FARF505
4	Semester	III (gasal)
5	Beban kredit	2 sks
6	Dosen pengampu	apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech. apt. Desi Novita Revianawati, M.Farm. Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si
7	Deskripsi mata kuliah	Matakuliah Analisis Instrumental merupakan pembelajaran teoritis mengenai metode-metode analisis kimia yang difasilitasi oleh instrumen/peralatan, meliputi spektrofotometri infra merah, UV, Vis, Kolorimetri, Fluorometri dan metode kromatografi kolom, lapis tipis, gas. Mata kuliah ini penting dalam membekali pengetahuan tentang analisis obat secara kimia dalam bidang kefarmasian.
8	Capaian Pembelajaran	<p>CPL – Prodi (Capaian Pembelajaran Lulusan Program Studi) yang Dibebankan Pada Mata Kuliah</p> <ol style="list-style-type: none"> Berkontribusi dalam peningkatan mutu kehidupan bermasyarakat, berbangsa, bernegara, dan kemajuan peradaban berdasarkan Pancasila (CP.S.03) Menunjukkan sikap bertanggungjawab atas pekerjaan di bidang keahliannya secara mandiri (CP.S.08) Mampu menunjukkan kinerja bermutu dan terukur (CP.KU.02) Mampu melakukan proses evaluasi diri terhadap kelompok kerja yang berada di bawah tanggung jawabnya, dan mampu mengelola pembelajaran secara mandiri (CP.KU.08) Mampu menerapkan prinsip cara distribusi obat (CDOB) yang baik disertai penjaminan mutu dalam pemasaran perbekalan farmasi (CP.KK.06) Menguasai konsep teoritis berbagai ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kefarmasian, riset, dan pengembangan diri (CP.P.09) <p>CPMK (Capaian Pembelajaran Mata Kuliah)</p> <ol style="list-style-type: none"> Memahami dan mampu menjelaskan prinsip analisis kimia dengan spektrofotometri infra merah, UV Vis, fluorometri. Memahami dan mampu menjelaskan prinsip analisis kimia dengan kromatografi kolom, lapis tipis, gas baik konvensional maupun kinerja tinggi. Memahami dan mampu menjelaskan prinsip analisis dengan metode elektroforesis. Menguasai keilmuan pendukung yang cukup untuk melanjutkan ke mata kuliah berikutnya yaitu Analisis Obat.
9	Bahan kajian	<ol style="list-style-type: none"> Spektrofotometri Infra Merah Spektrofotometri UV - Vis Spektrofluorometri Kromatografi kolom konvensional dan kinerja tinggi Kromatografi lapis tipis konvensional dan kinerja tinggi Kromatografi gas kinerja tinggi.

		7. Elektroforesis
10	Pustaka/ Literatur	<p>1. Hardjono Sastrohamidjojo. (2018). <i>Dasar-dasar Spektroskopi</i>. Yogyakarta : UGM Press.</p> <p>2. Dwiwarso Rubiyanto. (2017). <i>Metode Kromatografi: Prinsip Dasar, Praktikum dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi</i>. Yogyakarta : Deepublish.</p> <p>3. Lesty Wulandari. (2011). <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>. Jember : Taman Kampus Presindo.</p> <p>4. Kemendikbud. (2018). <i>Modul Diklat : Melaksanakan Analisis Secara Kromatografi Konvensional Mengikuti Prosedur</i>. Jakarta : Kemdikbud RI.</p> <p>5. Meri Susanti Dachriyanus. <i>Kromatografi Cair Kinerja Tinggi</i>. Padang : LPTIK Unand.</p>

Acara Pembelajaran

Kelas A: Jumat, jam 08.00 - 09.40

Kelas B: Selasa, jam 10.00 - 11.40

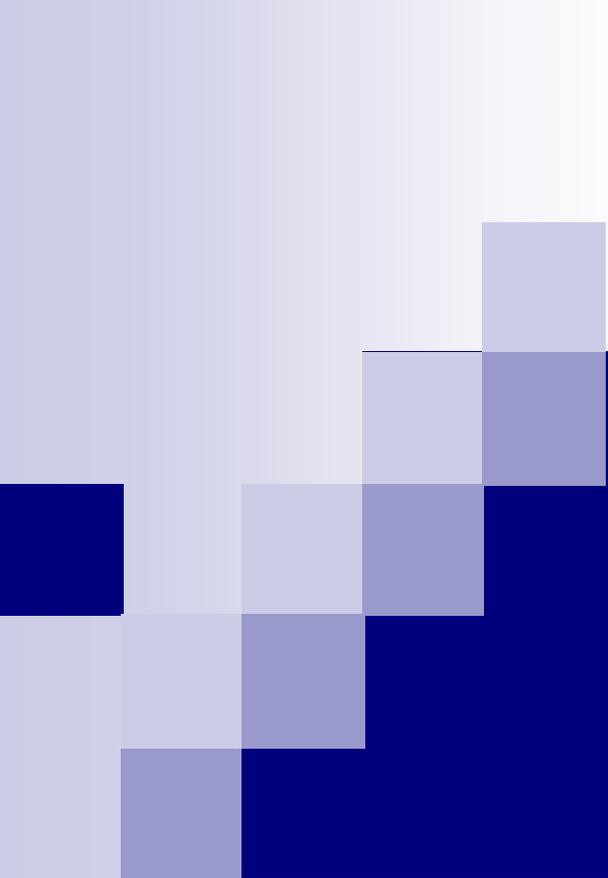
Minggu Ke-	Kemampuan Akhir Yang Diharapkan	Bahan Kajian	Strategi/ Metoda Pembelajaran	Alokasi Waktu	Kriteria (Indikator Capaian)	Instrumen Penilaian	Bobot Penilaian	Dosen Pengampu
10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 Kelas A Jumat 13 Sept 24 Kelas B Selasa 10 Sept 24	Mahasiswa mampu memahami gambaran pembelajaran dalam mata kuliah Analisis Instrumental dan konsep analisis kimia instrumental secara umum.	Pengantar kuliah: Kontrak belajar. Overview gambaran konten materi pembelajaran. Metode belajar. Penugasan.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang konsep analisis instrumental secara umum melalui metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech.
2 Kelas A Jumat 20 Sept 24 Kelas B Selasa 17 Sept 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang jenis analisis instrumen yang ada.	Pengantar analisis instrumental. Kualitatif: MS, NMR, Infra merah, UV Vis. Kuantitatif: AAS, UV Vis, Kromatografi.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan jenis analisis instrumen yang ada melalui metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech.

3 Kelas A Jumat 27 Sept 24 Kelas B Selasa 24 Sept 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri UV.	Pendahuluan spektrofotometri. Spektra panjang gelombang elektromagnetik, prinsip dasar spektrofotometri, transmittan dan absorbansi, hukum Lambert Beer.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri UV dengan metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech.
4 Kelas A Jumat 4 Okt 24 Kelas B Selasa 1 Okt 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri Vis.	Spektrofotometri UV-Vis 1. Kromofor, auxokrom. 2. Transisi elektron 3. Pergeseran serapan panjang gelombang (batho, hipso, hiper, hipokromik). 4. Efek pelarut, pemilihan pelarut. 5. λ maks, λ shoulder. Error pembacaan.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri Vis melalui metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Desi Novita Revianawati, M.Farm.
5 Kelas A Jumat 11 Okt 24 Kelas B Selasa 8 Okt 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri Vis dengan cara pemberian warna.	Spektrofotometri UV-Vis 1. Kurva baku dan cara menentukan kurva baku (Least Square Method, dan kalkulasi melalui excel, membuat grafik kurva baku). 2. Pengukuran kadar campuran/multikomponen dengan spektrofotometri. 3. Spektrofotometri Vis 2 (Kolorimetri).	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri Vis dengan cara pemberian warna melalui metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Desi Novita Revianawati, M.Farm.

6 Kelas A Jumat 18 Okt 24 Kelas B Selasa 15 Okt 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang konsep dan interpretasi hasil spektrofotometri infra merah.	Spektrofotometri Infra Merah. Intepretasi spektra infra merah. Analisis kualitatif dan kuantitatif dengan Spektro IR.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang konsep dan intepretasi hasil spektrofotometri infra merah melalui metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Desi Novita Revianawati, M.Farm.
7 Kelas A Jumat 25 Okt 24 Kelas B Selasa 22 Okt 24	Mahasiswa mampu mencari literatur, melakukan studi mandiri, dan menganalisa literatur/jurnal tentang analisis kimia dengan metode spektrofotometri.	TUGAS Studi literatur: Analisis obat dengan metode spektrofotometri. Mahasiswa dibagi kelompok.	Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang contoh aplikasi metode spektrofotometri pada analisis kimia dalam literatur jurnal melalui metode ujian tulis UTS secara tepat	Soal UTS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	apt. Desi Novita Revianawati, M.Farm.
8	UJIAN TENGAH SEMESTER							
9 Kelas A Jumat 8 Nov 24 Kelas B Selasa 5 Nov 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri.	Spektrofluorometri.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan konsep analisis senyawa kimia dengan spektrofotometri melalui metode ujian tulis UAS secara tepat	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si
10 Kelas A Jumat 15 Nov 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang konsep dasar analisis kimia dengan metode kromatografi.	Pengantar kromatografi. Komponen dan faktor analitik dalam kromatografi: Fase diam, fase gerak. Lempeng efektif. Berbagai perhitungan.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan konsep dasar analisis kimia dengan metode kromatografi melalui metode ujian tulis UAS secara tepat	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si

Kelas B Selasa 12 Nov 24								
11 Kelas A Jumat 22 Nov 24 Kelas B Selasa 19 Nov 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang komponen dan faktor-faktor analitik dalam metode kromatografi.	Kromatografi kolom: Konvensional dan Kinerja Tinggi (HPLC)	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan komponen dan faktor-faktor analitik dalam metode kromatografi melalui metode ujian tulis UAS secara tepat	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si
12 Kelas A Jumat 29 Nov 24 Kelas B Selasa 26 Nov 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang metode kromatografi kolom konvensional dan kinerja tinggi.	Kromatografi lapis tipis: Konvensional dan Kinerja Tinggi.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan metode kromatografi kolom konvensional dan kinerja tinggi melalui metode ujian tulis UAS secara tepat	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si
13 Kelas A Jumat 6 Des 24 Kelas B Selasa 3 Des 24	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan tentang metode kromatografi lapis tipis konvensional dan kinerja tinggi.	Kromatografi gas.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan kromatografi lapis tipis konvensional dan kinerja tinggi melalui metode ujian tulis UAS secara tepat	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si
14 Kelas A Jumat 13 Des	Mahasiswa mampu memahami dan menjelaskan prinsip dasar kromatografi gas.	Elektroforesis.	Ceramah, Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip dasar kromatografi gas melalui metode ujian tulis	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si

24					UAS secara tepat			
Kelas B Selasa 10 Des 24								
15	Mahasiswa mampu mencari literatur, melakukan studi mandiri, dan menganalisa literatur/jurnal tentang analisis kimia dengan metode kromatografi.	TUGAS Studi literatur: Analisis obat dengan metode kromatografi atau elektroforesis. Mahasiswa dibagi kelompok.	Diskusi dan Penugasan	2 x 50 menit	Pengetahuan: Mahasiswa mampu menjelaskan tentang contoh aplikasi metode kromatografi pada analisis kimia dalam literatur jurnal melalui metode ujian tulis UAS secara tepat	Soal UAS Penilaian tugas/diskusi	7,1 %	Dr. Rofiq Sunaryanto, M.Si
Kelas A Jumat 20 Des 24								
Kelas B Selasa 17 Des 24								
16	UJIAN AKHIR SEMESTER							



Spektrofotometri Fluoresensi Sinar Visibel

Kimia Analisis Instrumental

TEORI

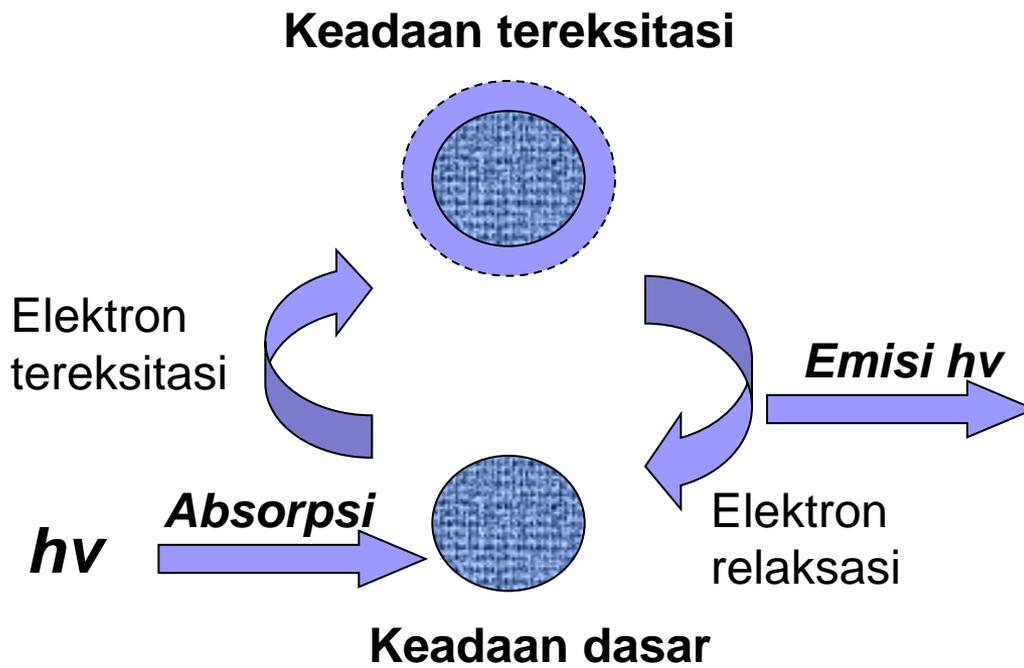
■ Dasar analisis :

- Pemancaran/emisi sinar visibel oleh molekul yang **mempunyai gugus kromofor** setelah menyerap/absorpsi sinar visibel
- Interaksi REM(radiasi elektromagnetik)-materi :
 - Absorpsi, diikuti emisi
- Pemancaran :
 - Fluoresensi
 - Fosforesensi

Definisi

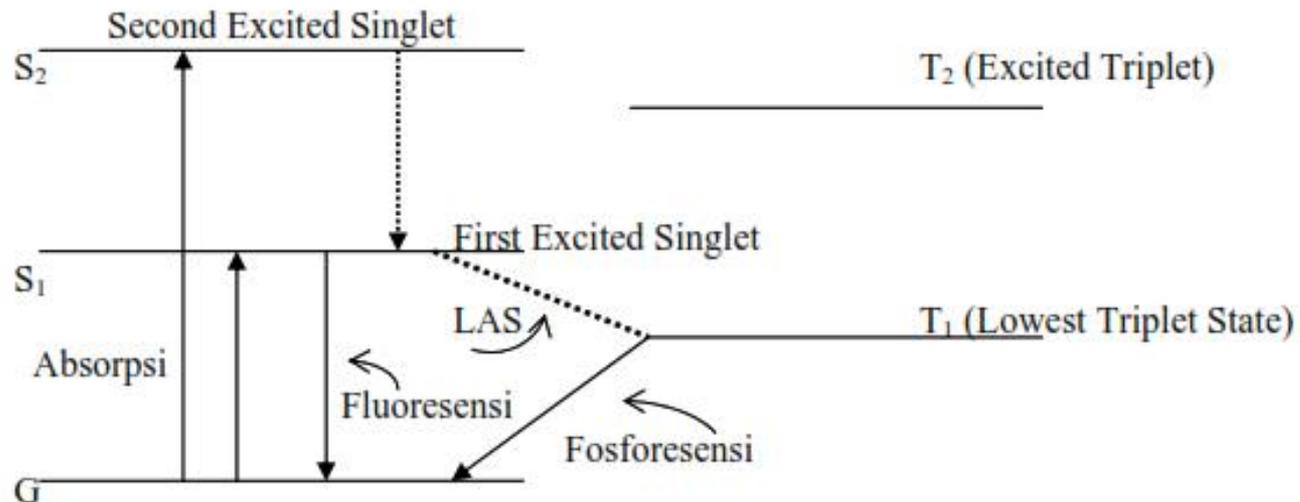
Spektrofotometri fluoresensi merupakan suatu prosedur yang menggunakan pengukuran **intensitas cahaya fluoresensi** yang dipancarkan oleh **zat uji** dibandingkan dengan yang dipancarkan oleh **suatu baku tertentu**.

Energi yang diserap oleh molekul untuk transisi elektronik ke **level energi yang lebih tinggi** (first excited singlet) harus dilepaskan kembali pada waktu kembali ke **level energi terendah** (ground singlet). Energi yang dilepaskan ini dapat berupa panas dan untuk beberapa molekul tertentu sebagian dari energi yang diserap **dipancarkan kembali berupa cahaya (fluoresensi)**.



Apabila terjadi transisi dari "first excited singlet" ke "lowest triplet state" (intersystem crossing), maka elektronik state disebut **fosforesensi**.

Diagram transisi energi dari eksitasi, fluoresensi dan fosforesensi



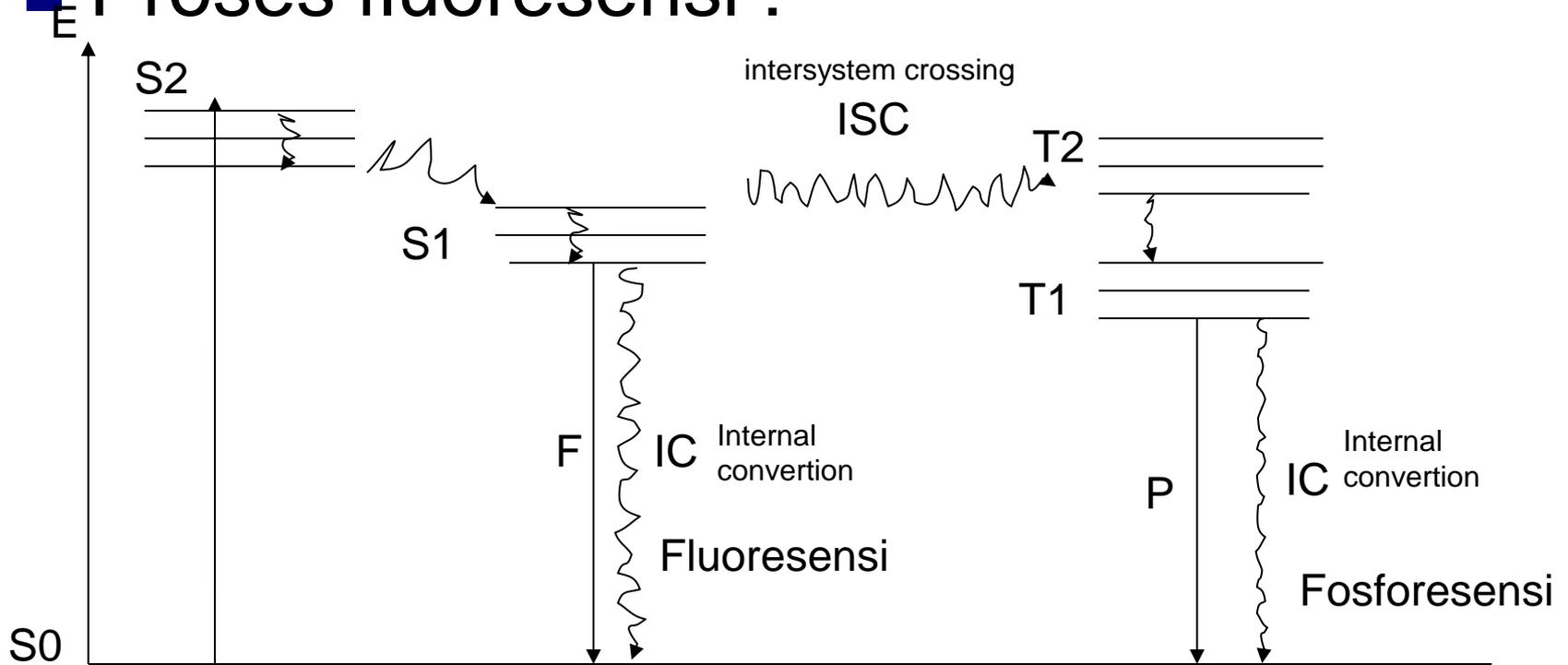
Ket: G = Ground Singlet
S₁ = First Excited Singlet
S₂ = Second Excited Singlet
T₁ = Lowest Triplet State
T₂ = Excited Triplet

LAS = Lintas Antar Sistem
(Intersystem Crossing)

- 
- Jenis spektroskopi fluoresensi :
 - Sinar **Visibel/tampak** : molekuler
 - **Sinar-X** : atomik → XRF (Xray Fluorescence)

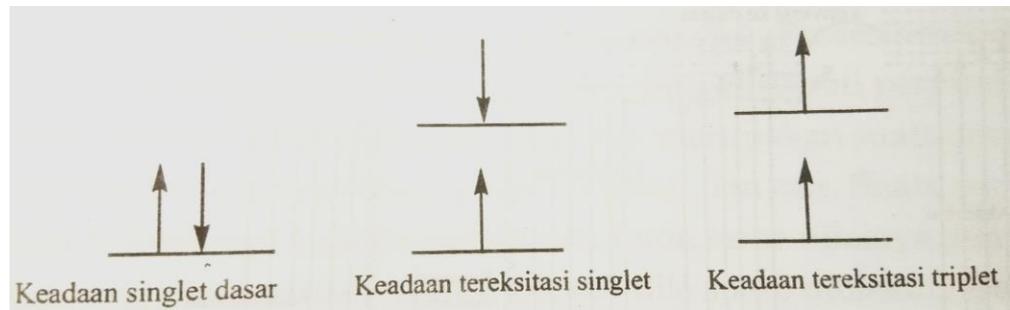
TEORI

■ Proses fluoresensi :



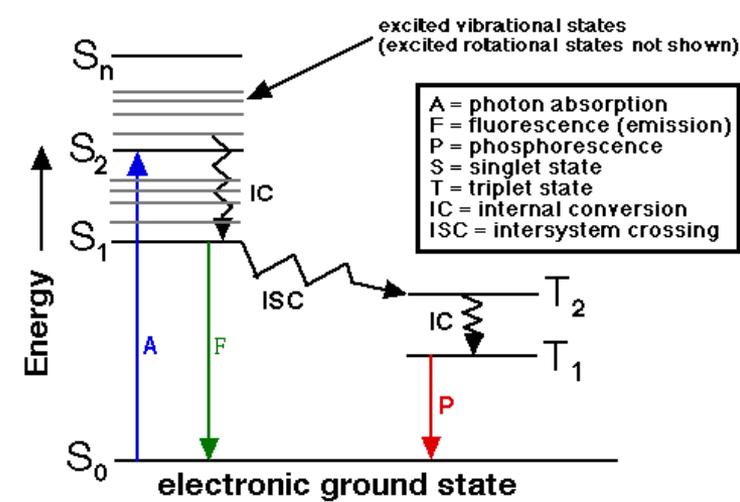
■ Untuk molekul dwiatomik :

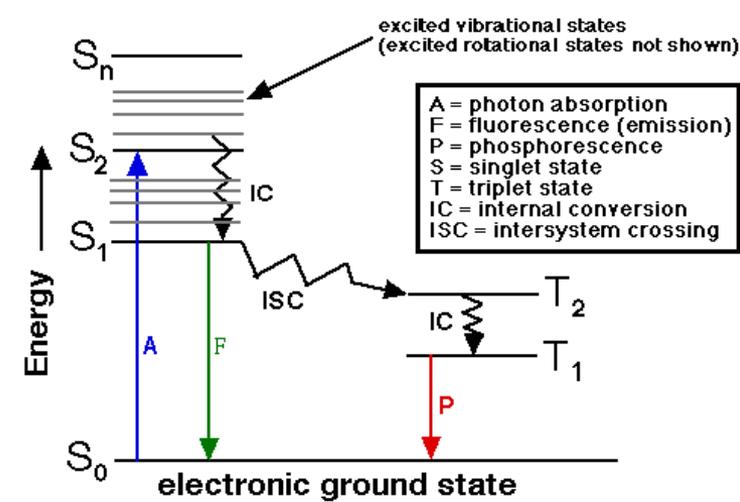
- S: tingkat singlet : mempunyai **elektron berpasangan (spin electron masih berlawanan arah)**
- T : tingkat triplet : terkesitasi, spin berubah dari berlawanan arah menjadi searah.
- So : tingkat dasar yang merupakan tingkat singlet
- Tingkat energi $S > T$



■ Fluoresensi

- Pada saat molekul mengabsorpsi sinar visibel, elektron ikatan tereksitasi dari S_0 ke S_2
- Elektron dalam S_2 bervibrasi dari 2 ke S_1 .
- Elektron dalam S_1 kembali ke S_0 sambil emisi radiasi → Fluoresensi
- Ada sebagian elektron yang tidak mengemisikan radiasi, namun mengalami *internal conversion (IC)*/ pembalikan internal → *nonradiative/radiationless* : melepas panas
- Beberapa dimiliki oleh tanaman dan hewan laut yang bersinar lenih terang saat diberikan cahaya





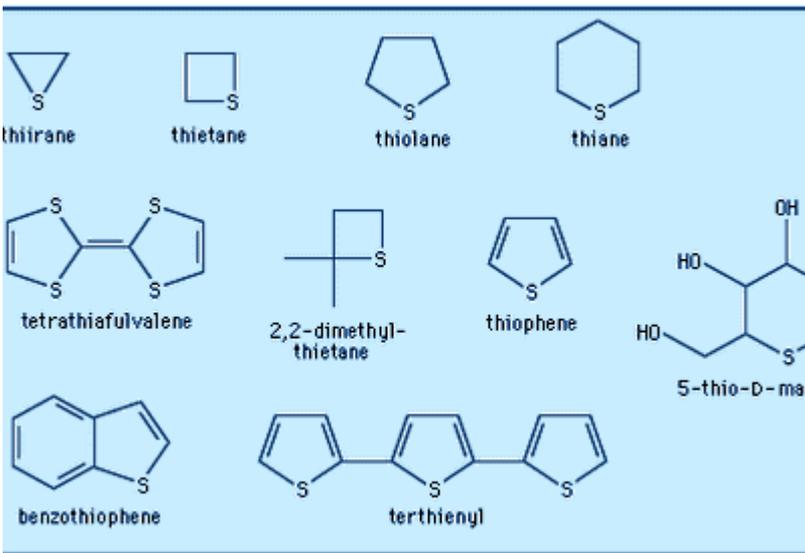
■ Fosforesensi :

- Pada saat molekul mengabsorpsi sinar visibel, elektron ikatan tereksitasi dari S_0 ke S_2
- Elektron dalam S_2 bervibrasi dari S_2 ke S_1 .
- Elektron dalam S_1 mengalami intersystem crossing (ISC) : penyilangan antar sistem → pembalikan spin elektron → menempatkan elektron pada T_2
- Elektron pada T_2 : relaksasi vibrasi ke T_1
- Elektron pada T_1 → relaksasi ke S_0 sambil emisi radiasi → Fosforesensi
- Ada sebagian yang mengalami radiationless/nonradiative

■ Fosforesensi

- waktu pemancaran lebih lama
- Cahaya benda akan terpendar setelah beberapa detik terkena sumber Cahaya. (aplikasi jam tangan, rambu lalu lintas, binatang/tumbuhan laut)

Supaya terjadi fluoresensi, harus terjadi peresapan cahaya yang kuat oleh suatu molekul. Hal ini dapat terjadi pada **senyawa aromatic**, senyawa **heterosiklik** dan molekul dengan **system konjugasi**. Senyawa dengan transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$, mempunyai kemungkinan yang lebih besar untuk berfluoresensi daripada transisi $n \rightarrow \pi^*$.



97 Encyclopaedia Britannica, Inc.

heterosiklik



3,5-Octadiene
(Conjugated)



2,5-Octadiene
(Non-Conjugated)



1,3-Cyclohexadiene
(Conjugated)



1,4-Cyclohexadiene
(Non-Conjugated)

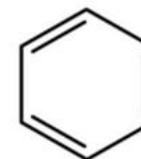
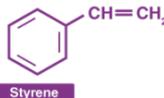
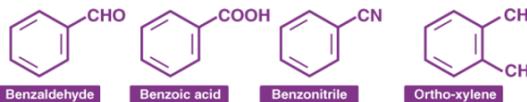
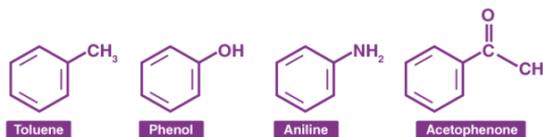


1,3-Butadiene
(Conjugated)

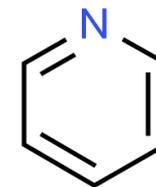


1,4-Pentadiene
(Non-Conjugated)

system konjugasi

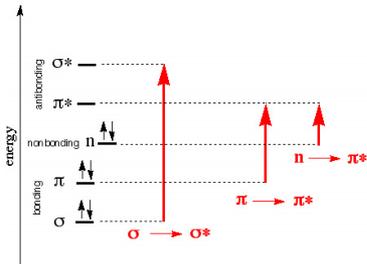


Benzene
berfluorosensi



Piridin
tidak berfluorosensi

senyawa aromatic



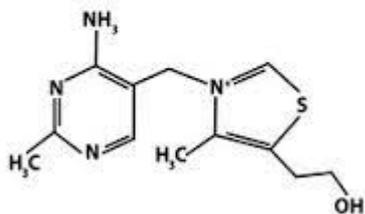
Contoh senyawa yang ber-fluoresensi

Senyawa	pH	Panjang gelombang, nm		Konsentrasi minimum (ppm)
		Eksitasi	Fluoresensi	
Asam p-amino-salisilat	11	300	405	0,004
Sianokobalamin	7	275	305	0,003
Kinina	1	250, 350	450	0,002
Reserpina	1	300	375	0,008
Kloropromazina	11	350	480	0,1

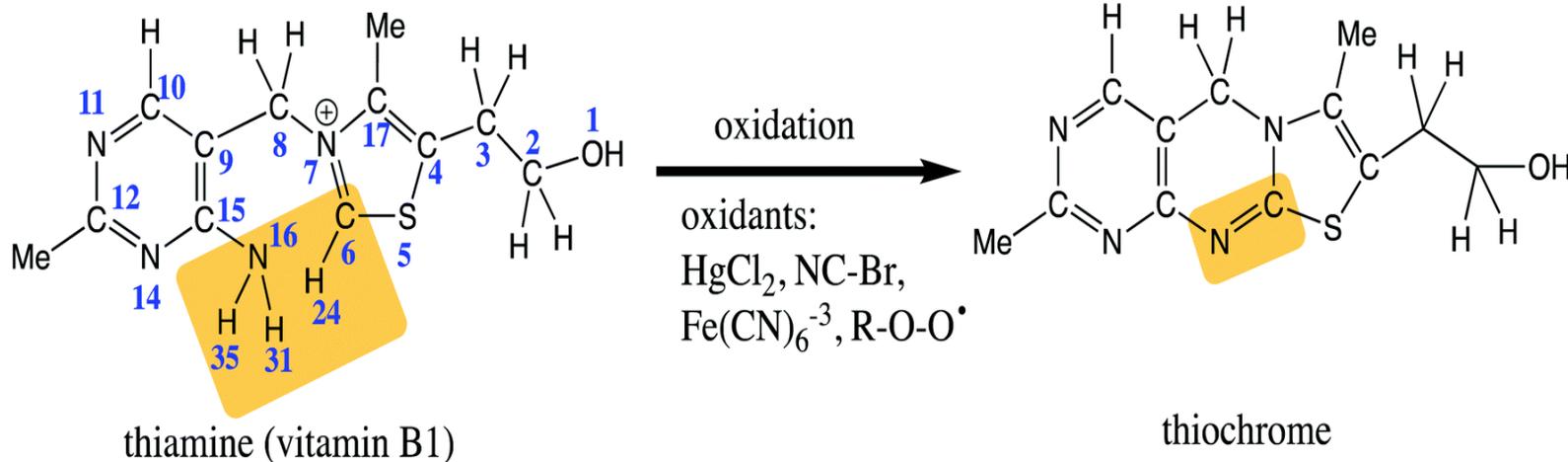
Dengan suatu pereaksi tertentu, **senyawa yang tidak berfluoresensi dapat diubah menjadi senyawa yang berfluoresensi**. Metode ini penting baik untuk senyawa organik maupun anorganik, dan banyak senyawa anorganik membentuk kompleks yang mudah berfluoresensi dengan pereaksi organik. Misalnya, kepekan pada penetapan S_0 dapat dipertinggi sampai $0,002 \mu\text{g}$ dengan menggunakan **2,3-diaminonaftalena** sebagai pembentuk kompleks. **Vitamin B1** dalam sediaan Farmasi atau makanan dapat ditetapkan secara spektrofotometri setelah **dioksidasi menjadi tiokrom** yang mudah berfluoresensi.

Vitamin B1

Thiamine



While thiamine is visible in the UV range, its relatively common wavelength for absorbance ($\lambda_{\text{max}} = 242 \text{ nm}$) and low extinction coefficient do not lend to specific or sensitive analyses. Hence, most commonly, thiamine is converted to thiochrome prior to measurement. This product of oxidation is highly **fluorescent with excitation and emission wavelengths of 360 nm and 450 nm**, respectively.



Aplikasi analisis menggunakan instrument Spectrofluorometry

Pharmacy:

Possible direct or indirect analysis drugs such as:

- vitamins (vitamin A -vitamin B2 -vitamin B6 -vitamin B12 -vitamin E -folic acid)
- catecholamines (dopamine-norepinephrine)
- Other drugs (quinine-salicylic acid–morphine-barbiturates –lysergic acid diethylamide (LSD))
- to measure the amount of impurities present in the sample.

Pada larutan dengan konsentrasi tinggi, sebagian besar cahaya diserap lapisan larutan yang paling dulu kontak dengan radiasi eksitasi, sehingga **fluoresensi hanya terjadi pada bagian yang menyerap cahaya tersebut**. Dengan demikian, pada analisis kuantitatif harus digunakan **larutan yang encer** supaya dapat memenuhi persamaan fluoresensi:

$$F = 2,3I_0Qabc \quad \text{atau} \quad F = kc$$

Keterangan:

F = fluoresensi

k = konstan = $2,3I_0abc$

I_0 = intensitas sumber cahaya

Q = efisiensi fluoresensi

a = daya serap

b = tebal larutan

c = konsentrasi

Efisiensi Fluoresensi (Φ)

$$\Phi = \frac{R_f}{R_e} \qquad 0 < \Phi < 1$$

R_f : jumlah molekul **yang memancarkan fluoresensi**

R_e : jumlah molekul **yang tereksitasi setelah menyerap radiasi**

$$R_e = R_n + R_f$$

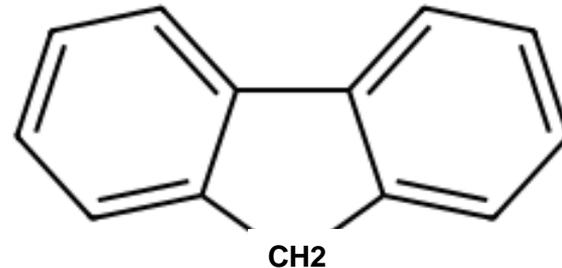
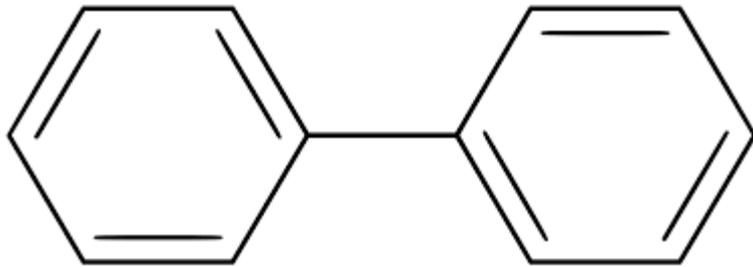
R_n = jumlah molekul yang radiationless

Faktor yang mempengaruhi Flourosensi :

- Struktur
- Konsentrasi
- Suhu
- pH
- Pelarut
- Pengaruh oksigen terlarut
- Pengaruh pemadaman sendiri (self quenching) & penyerapan sendiri

Pengaruh **struktur** terhadap fluoresensi

Fluoresensi dapat terjadi dengan baik jika molekul2 struktur yang kaku (rigid)



Lebih rigid lebih sulit bergerak maka Φ lebih tinggi

Φ = efisiensi fluoresensi

$$\Phi = \frac{R_f}{R_e}$$

■ Pengaruh struktur :

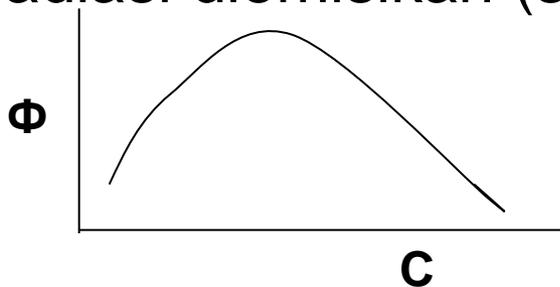
□ Struktur rigid(kaku) → sulit bergerak → Φ tinggi

■ Pengaruh konsentrasi (C):

□ C rendah → R_e rendah → R_f rendah → Φ rendah

□ C tinggi → R_e tinggi → R_f tinggi → Φ besar

□ C terlalu tinggi → R_e tinggi → molekul lain menyerap radiasi diemisikan (self absorption) → Φ rendah



Φ = efisiensi fluoresensi

$$\Phi = \frac{R_f}{R_e}$$

■ Pengaruh suhu :

- Kenaikkan suhu → meningkatkan gerakan molekul → molekul deaktif (energi molekul eksitasi dilepas ke pelarut/konversi keluar besar) → R_f rendah → Φ rendah

■ Pengaruh pelarut :

- Viskositas tinggi → gerakan molekul lambat → R_f tinggi → Φ tinggi
- Pelarut makin polar → intensitas fluoresensi (R_f) makin besar → Φ tinggi.

■ Pengaruh pH :

- pH mempengaruhi kestabilan molekul kompleks → mempengaruhi R_e dan R_f tergantung senyawanya.

Terkait dengan bentuk **terionisasi atau tidak**. Fenol dalam suasana asam bentuk molekul utuh (panjang gel 285-365), sementara dalam suasana basa akan terionisasi (Panjang gel 310-400)

❑ Pengaruh oksigen terlarut

Adanya gas oksigen akan **memperkecil intensitas fluoresensi** yang disebabkan terjadinya **oksidasi senyawa** karena pengaruh Cahaya. Pengurangan intensitas fluoresensi disebut pemadaman sendiri atau **quenching**. Molekul oksigen bersifat paramagnetic, dan molekul yang bersifat seperti ini dapat mempengaruhi kemungkinan terjadinya fluoresensi dan sebaliknya memperbesar **kebolehjadian fosforesensi**.

❑ Pemadaman sendiri (self quenching) dan penyerapan sendiri

Disebabkan oleh **tabrakan² antar molekul** zat itu sendiri yang menyebabkan **energi yang akan dilepas sebagai fluoresensi ditransfer ke molekul lain** sehingga intensitas fluoresensi berkurang.

Oksigen merupakan contoh pemadaman bagi senyawa **poliaromatis hidrokarbon**, maka oksigen harus dihilangkan sebelum dilakukan analisis.

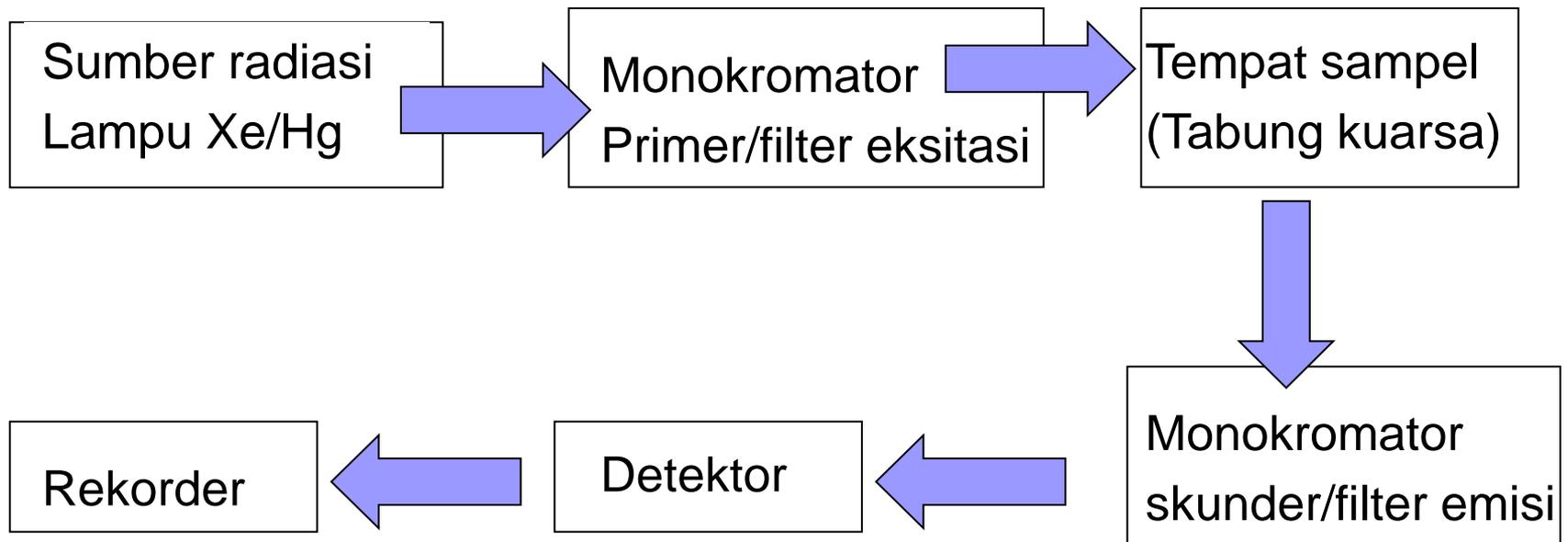
Penyerapan sendiri terjadi jika panjang gelombang fluoresensi **bertumpang tindih dengan puncak serapan senyawa** yang bersangkutan, shg **intensitas fluoresensi berkurang** pada saat berkas sinar melalui larutan sampel.

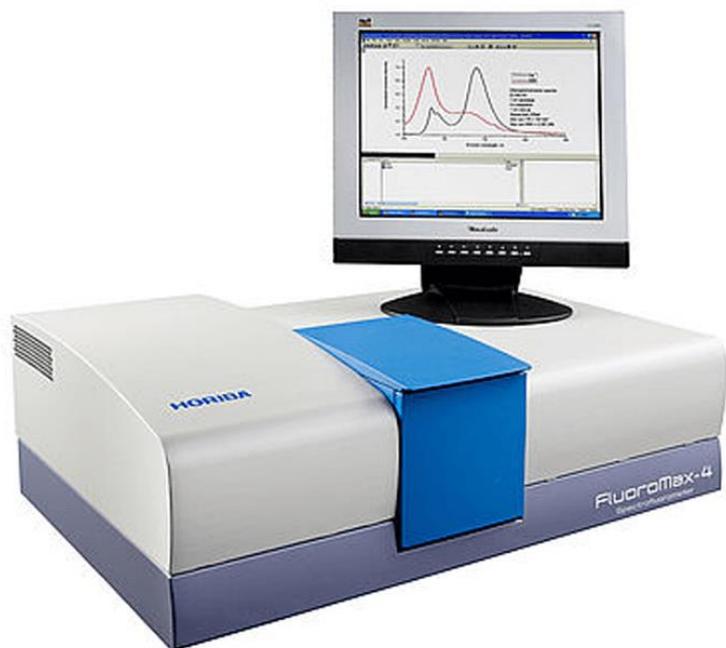
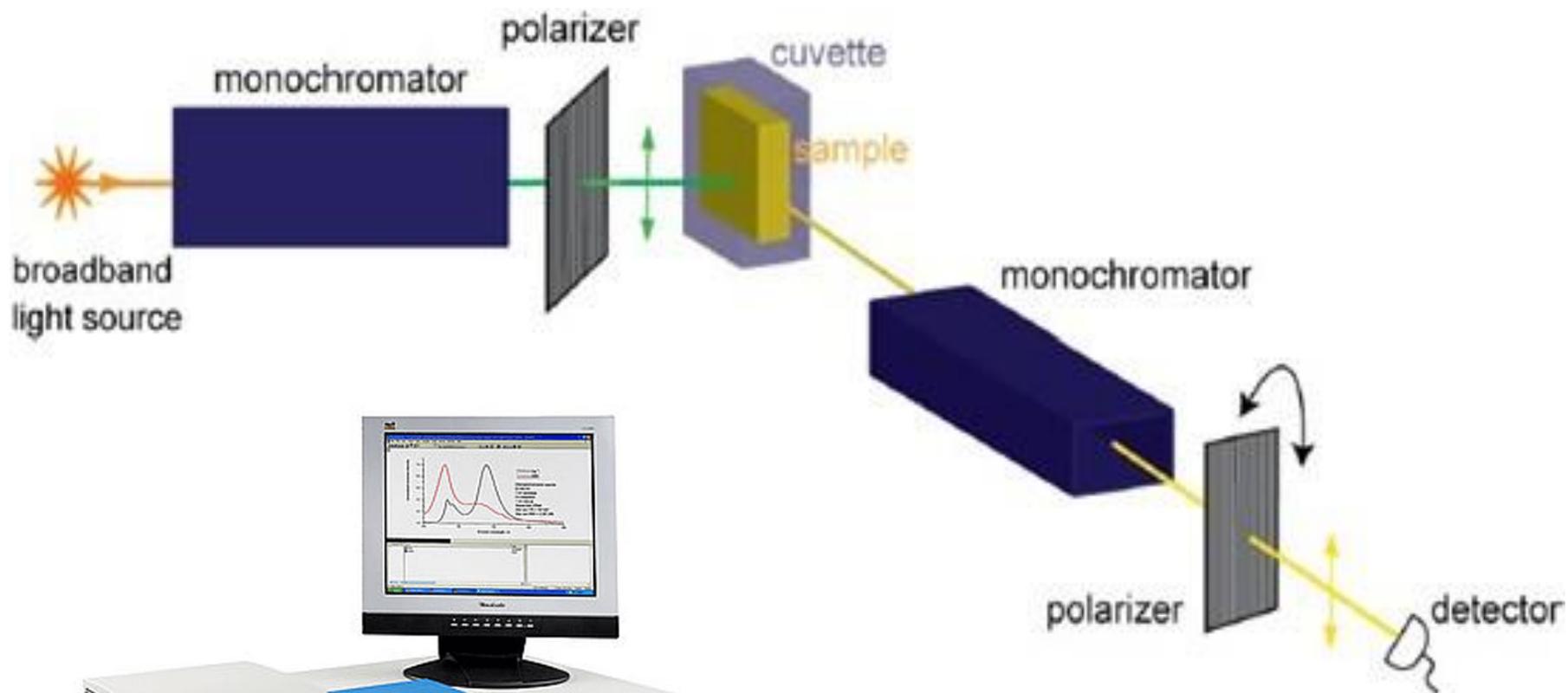
■ Quenching (Q):

- Penurunan intensitas fluoresensi atau bahkan pemadaman
- Jenis :
 - Q-konsentrasi : **absorpsi radiasi eksitasi** maupun fluoresensi **oleh larutan**
 - Self-Q : **absorpsi radiasi fluoresensi oleh molekul lain** (pada konsentrasi tinggi)
 - Q-kimia : oleh **perubahan struktur kimia**

Instrumentasi

■ Susunan alat





Analisis kuantitatif

■ Dasar :

- Intensitas fluoresensi sebanding dengan konsentrasi
- Mengikuti **hukum Lambert-Beer** :

$$F = k C$$

F : intensitas fluoresensi

k : konstanta

C : konsentrasi

■ Teknik analisis :

□ Langsung :

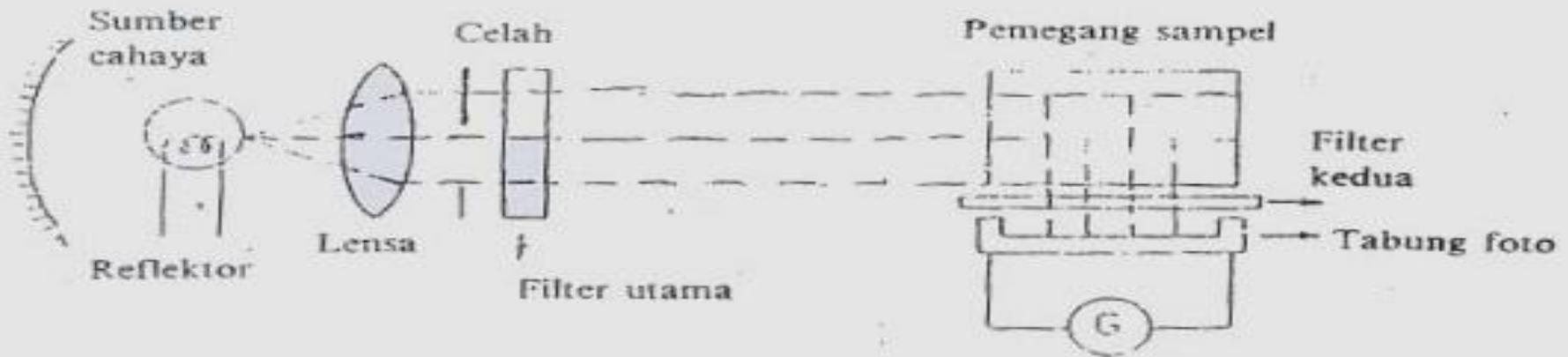
- Reaksi antara analit dengan pengompleks membentuk molekul kompleks penyerap radiasi dan menghasilkan fluoresensi
- **Intensitas fluoresensi** sebanding dengan **konsentrasi senyawa kompleks**
- Biasanya untuk analit kation
- Untuk standar tunggal, kurva standar, maupun adisi standar

Kelebihan fluorometer dan fosforimeter dalam analisis kuantitatif:

- Metode ini **selektif dan tidak terjadi interferensi spektral**. Interferensi ini bila timbul dapat diatasi dengan **pemilihan panjang gelombang yang tepat** baik pada eksitasi maupun pemendarannya.
- Metode ini **sensitif**. Pada fosforimeter, resolusi waktunya cukup besar, karena panjangnya waktu hidup. Hal ini juga mengeliminasi penghamburan sampel.

Prosedur analisis

Prosedur analisis, yaitu mula-mula **dibuat kurva kalibrasi** (grafik **hubungan fluoresensi dengan konsentrasi**). Tahap selanjutnya adalah **mengukur intensitas fluoresensi dari zat yang diperiksa, lalu membaca konsentrasi dari kurva kalibrasi tersebut**. Selama pengukuran, kondisi percobaan harus dijaga supaya tetap konstan. Pengotoran dapat menurunkan efisiensi dari fluoresensi sehingga mengurangi sensitifitas (quenching). **Analisa campuran dilakukan dengan memilih radiasi eksitasi pada panjang gelombang yang berbeda dimana masing-masing komponen campuran tersebut**. Bila tidak mungkin, pengukuran dilakukan pada panjang gelombang yang berbeda dimana masing-masing komponen campuran tersebut berfluoresensi.



Sumber Radiasi

Banyak terdapat sumber radiasi. Lampu merkuri relatif stabil dan memancarkan energi terutama pada panjang gelombang diskret. Lampu tungsten memberikan energi kontinyu di daerah tampak. Lampu pancar xenon bertekanan tinggi seringkali digunakan pada spektrofotometer karena alat tersebut merupakan sebuah sumber

Monokromator

Sepasang filter atau monokromator untuk menyeleksi panjang gelombang eksitasi dan emisi.

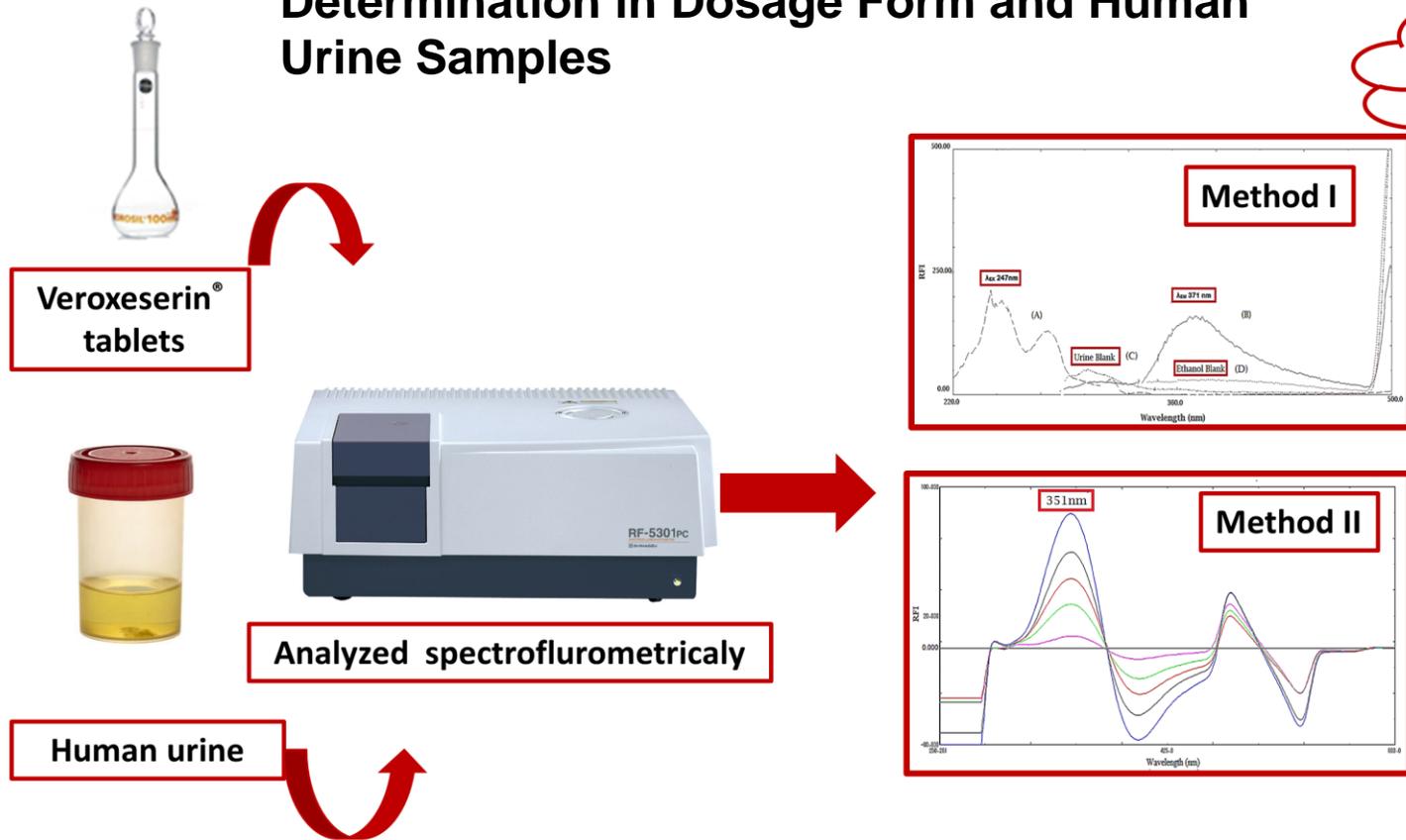
Sampel (dalam kuvet)

Sel spesimen yang digunakan dalam pengukuran fluoresensi dapat berupa tabung bulat atau sel empat persegi panjang (kuvet), sama seperti yang digunakan pada spektrofotometri resapan.

Detektor

Seperti pada spektrofotometri, detektor yang biasa digunakan adalah **'fotomultiplier tube'** atau **'thermocouple'**. Pada umumnya, detektor ditempatkan di atas sebuah poros

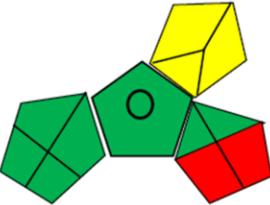
Development and Greenness Evaluation of Spectrofluorometric Methods for Flibanserin Determination in Dosage Form and Human Urine Samples



Method I & Method II are Green Methods



NEMI approach



GAPI approach

<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/21/4932>

Penentuan kadar kinin sulfat menggunakan spektrofлуорometri

Spektrofлуорometri untuk mengukur kadar Kinin Sulfat

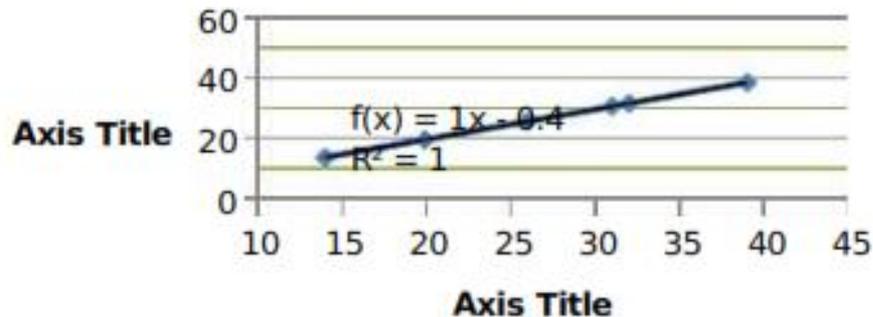
Persiapan dan langkah kerja:

- Disiapkan larutan standard kinin yaitu 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 ppm dengan pengenceran dari larutan stok dengan 0,1 N H₂SO₄
- Larutan kinin sulfat 1 µg/ml dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian ditempatkan ke dalam ruang pengukuran pada spektrofлуорometer.
- Besar intensitas fluororesensi maksimum untuk monokromator eksitasi dari literatur dimasukkan pada alat spektrofлуорometer.
- Besar intensitas fluororesensi maksimum monokromator emisi dari literatur dimasukkan pada alat spektrofлуорometer.
- Dilakukan pengukuran intensitas fluororesensi (pada monokromator eksitasi) untuk blanko (asam sulfat 0,1 N).
- Dilakukan pengukuran intensitas fluororesensi (pada monokromator eksitasi) untuk masing-masing larutan yang diencerkan.
- Dilakukan pengukuran intensitas fluororesensi (pada monokromator eksitasi) untuk sampel.

Bahan	Intensitas pada $\lambda=450$ nm	Intensitas Bahan-Blanko pada $\lambda=450$ nm
Blanko	0,4	-
Sampel	31	30,6
0,1 ppm	14	13,6
0,15 ppm	19,9	19,5
0,2 ppm	26	25,6
0,25 ppm	32	31,6
0,3 ppm	39	38,6

Panjang gelombang (λ) eksitasi : 350 nm
 Panjang gelombang(λ) emisi : 300-400 nm
 Panjang Gelombang (λ) max : 450 nm
 Alat : Shimadzu Data Recorder DR-3

Grafik Hubungan

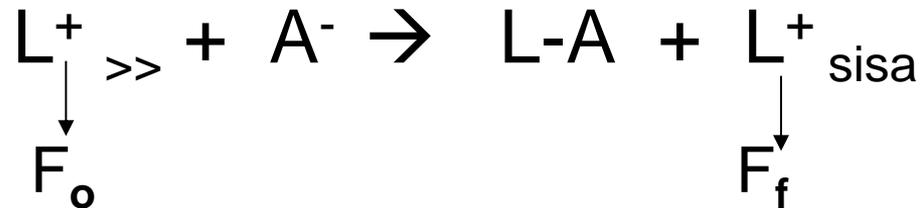


Jika dari pengukuran I sample pada λ 450nm adalah 30,6, maka konsentrasi sample nya adalah sebesar 4,6ppm. (I dimasukkan ke dalam persamaan regresi tersebut.

$$I = 124,2 C + 0,94$$

■ Teknik tidak langsung :

- Tergantung pada diminution/quenching → fluoresensi dari pengompleks
- Intensitas terukur sebanding dengan molekul yang mengalami quenching
- Biasanya untuk anion
- Contoh :



- Intensitas analit →

$$F_x = F_o - F_f$$

■ Contoh :

1. Larutan standar yang mengandung Al(III) 5 mg/L yang membentuk kompleks dengan oksin, memberikan intensitas fluoresensi 0,45. Berapa konsentrasi larutan yang memberikan intensitas 0,85
2. Larutan standar yang mengandung ion Co(II) 2 mg/L yang telah dikomplekskan, memberikan intensitas 0,36. Jika 5 ml larutan standar tersebut ditambahkan ke dalam 5 ml larutan sampel memberikan intensitas 0,42. Tentukan konsentrasi ion Co(II) dalam sampel. (addisi standar)

Contoh soal : teknik tak langsung

Diberikan data pada analisis ion F dalam sampel air :

- Jika 10 ml sampel air direaksikan dengan 10 ml pengompleks dan diencerkan menjadi 50 ml, memberikan intensitas 43. Hitung konsentrasi ion F dalam sampel air tersebut

V.std 10 mg/L (ml)	V pengom pleks (ml)	V. air (ml)	Inten sitas
0	10	40	85
2,5	10	37,5	70
5	10	35	56
7,5	10	32,5	38
10	10	30	24
12,5	10	27,5	16

KROMATOGRAFI

Buku acuan: Kimia Farmasi Analisis
Oleh: Prof.Dr.Ibnu Gholib Ganjar, DEA,Apt
Abdul Rohman, M.Si,Apt

Dasar-dasar Kromatografi

Defenisi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan berdasarkan **interaksi suatu senyawa** pada **dua fase yang berbeda** (**fase gerak** dan **fase diam**) ketika senyawa melewati suatu **medium penyokong**.

Prinsip
kromatografi

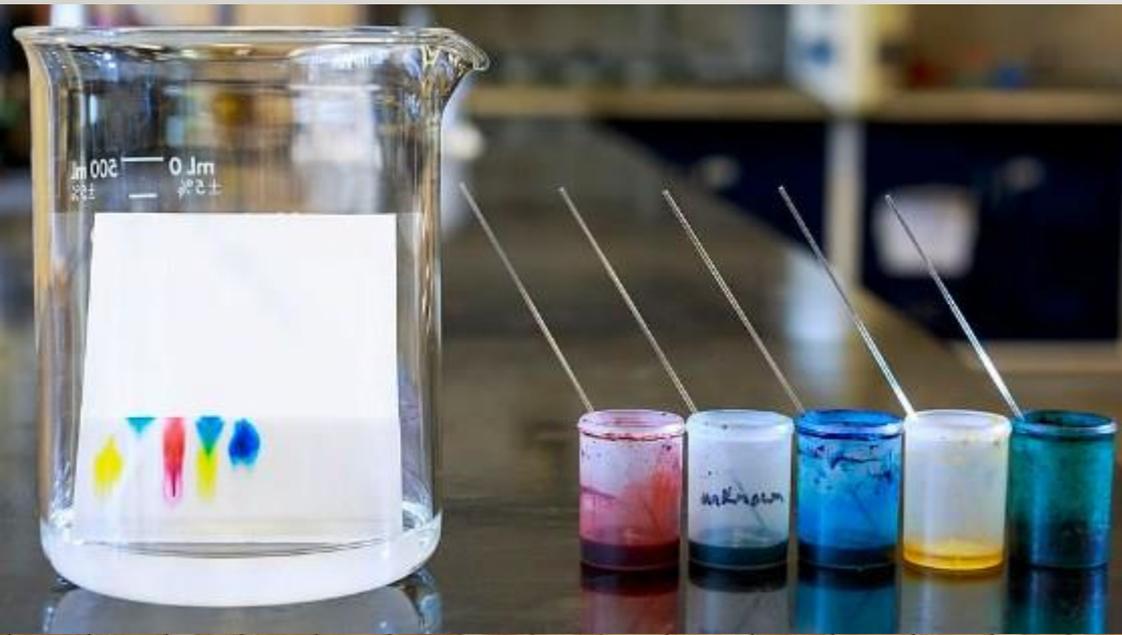
Komponen:

fase gerak: suatu pelarut yang mengalir melalui medium penyokong.

Fase diam: suatu lapisan atau selubung yang melapisi medium penyokong yang berinteraksi dengan analit

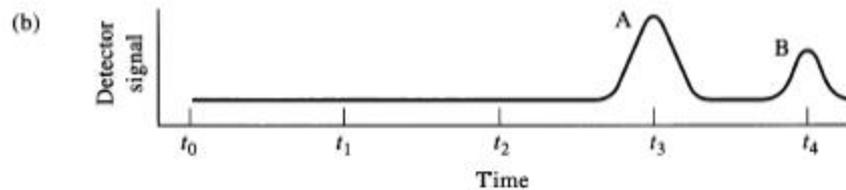
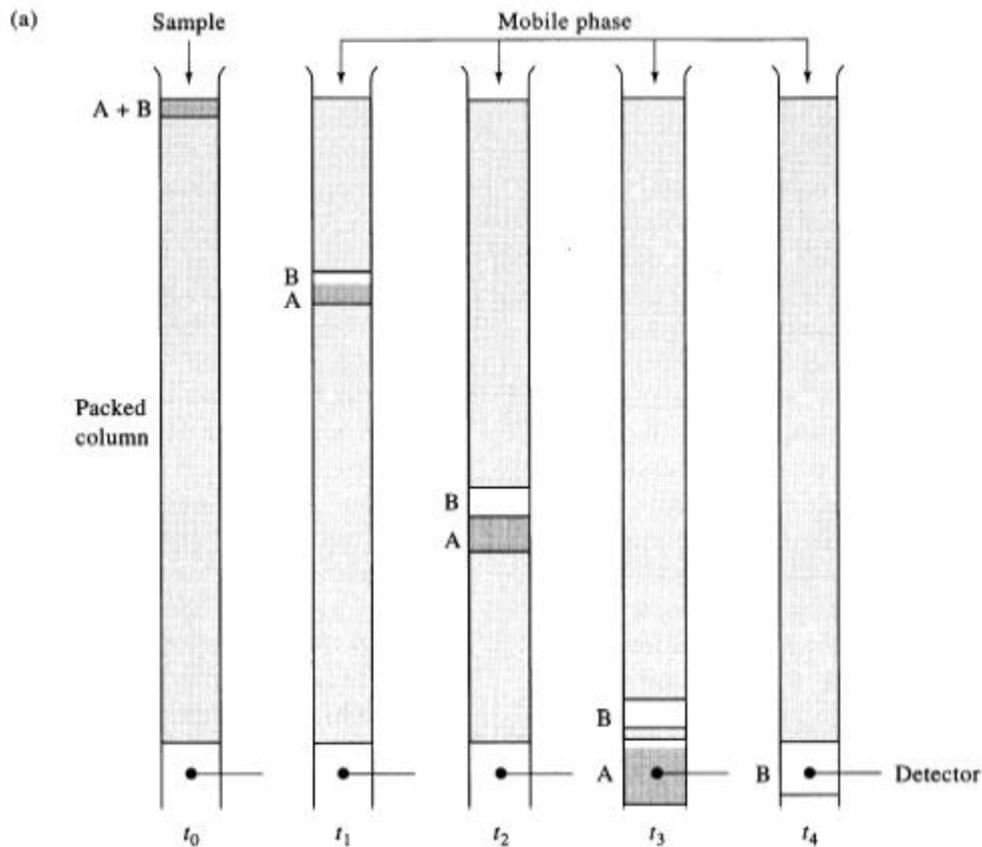
Medium penyokong: suatu permukaan padatan dimana fase diam terikat atau terlapisi.

Overveiw
video



KLT/TLC





Analit yang berinteraksi lebih kuat dengan fase diam akan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk melewati sistem dibandingkan dengan analit yang memiliki interaksi yang lebih lemah.

Interaksi-interaksi ini umumnya merupakan interaksi kimia, namun dalam beberapa kasus merupakan interaksi fisik.

Kromatogram dari detektor

Jenis-jenis kromatografi: - kromatografi dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis fase gerak, fase diam, dan material pendukung

TABLE 26-1 Classification of Column Chromatographic Methods

General Classification	Specific Method	Stationary Phase	Type of Equilibrium
Liquid chromatography (LC) (mobile phase: liquid)	Liquid-liquid, or partition	Liquid adsorbed on a solid	Partition between immiscible liquids
	Liquid-bonded phase	Organic species bonded to a solid surface	Partition between liquid and bonded surface
	Liquid-solid, or adsorption	Solid	Adsorption
	Ion exchange Size exclusion	Ion-exchange resin Liquid in interstices of a polymeric solid	Ion exchange Partition/sieving
Gas chromatography (GC) (mobile phase: gas)	Gas-liquid	Liquid adsorbed on a solid	Partition between gas and liquid
	Gas-bonded phase	Organic species bonded to a solid surface	Partition between liquid and bonded surface
	Gas-solid	Solid	Adsorption
Supercritical-fluid chromatography (SFC) (mobile phase: supercritical fluid)		Organic species bonded to a solid surface	Partition between supercritical fluid and bonded surface

Jenis Kromatografi

1.) pembagian utama dari teknik kromatografi **didasari dari jenis fase gerak** yang digunakan pada sistem:

Jenis Kromatografi

Kromatografi gas (GC)

Kromatografi cair (LC)

gas

cair

Jenis Fase gerak

2.) pembagian lebih lanjut dapat dilakukan berdasarkan **jenis fase diam** yang digunakan dalam sistem :

Kromatografi Gas

Metode kromatografi gas

kromatografi Gas-padat

Kromatografi Gas-cair

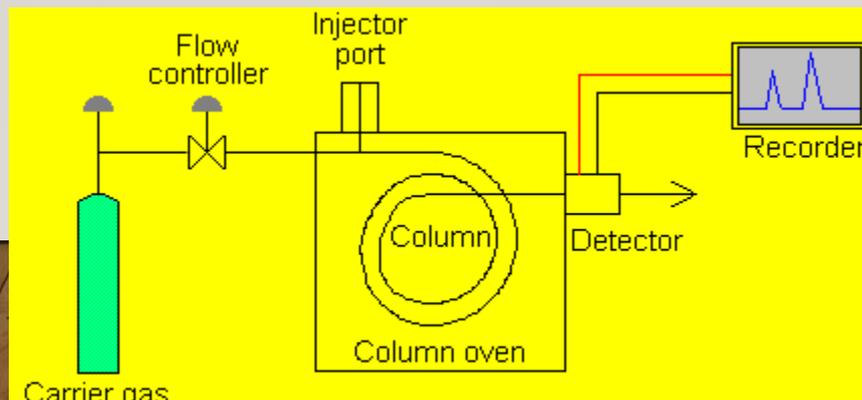
kromatografi gas-fase terikat

jenis fase diam

material padat yang tidak terderivatisasi

material terlapisi cairan

material terderivatisasi secara kimia



Jenis Kromatografi

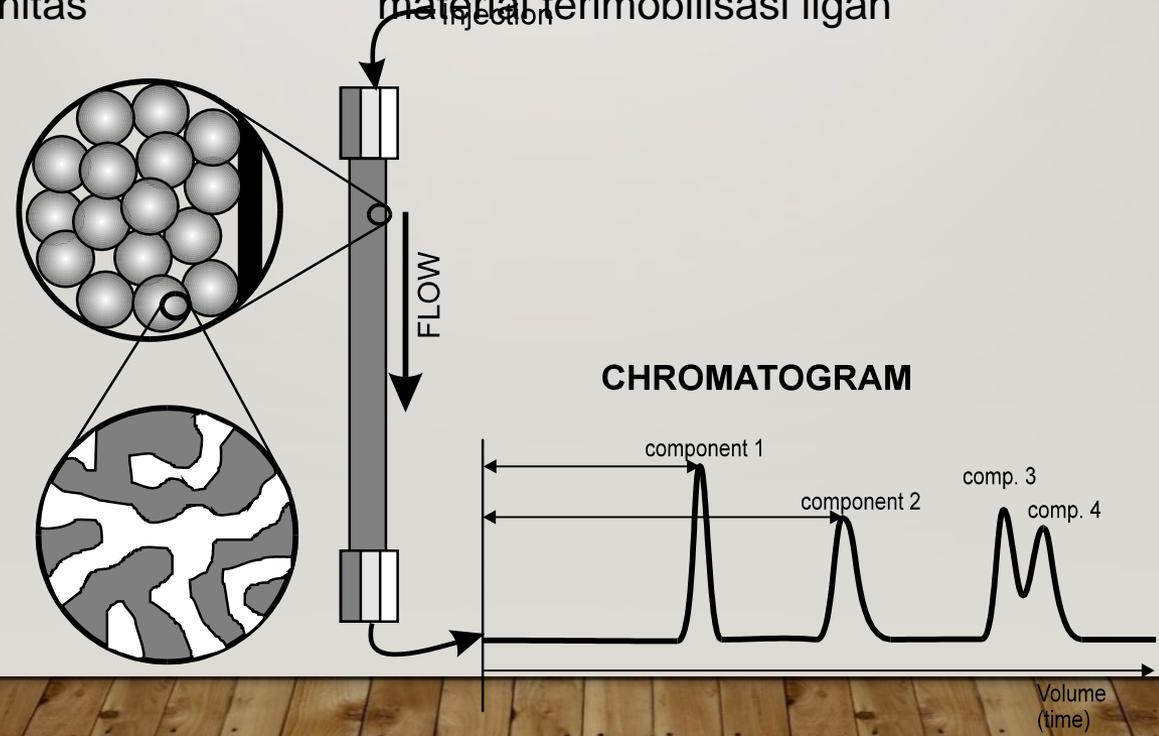
Kromatografi Cair

Nama metode kromatografi cair

- kromatografi adsorpsi
- Kromatografi partisi
- Kromatografi penukar ion
- kromatografi eksklusi ukuran
- kromatografi afinitas

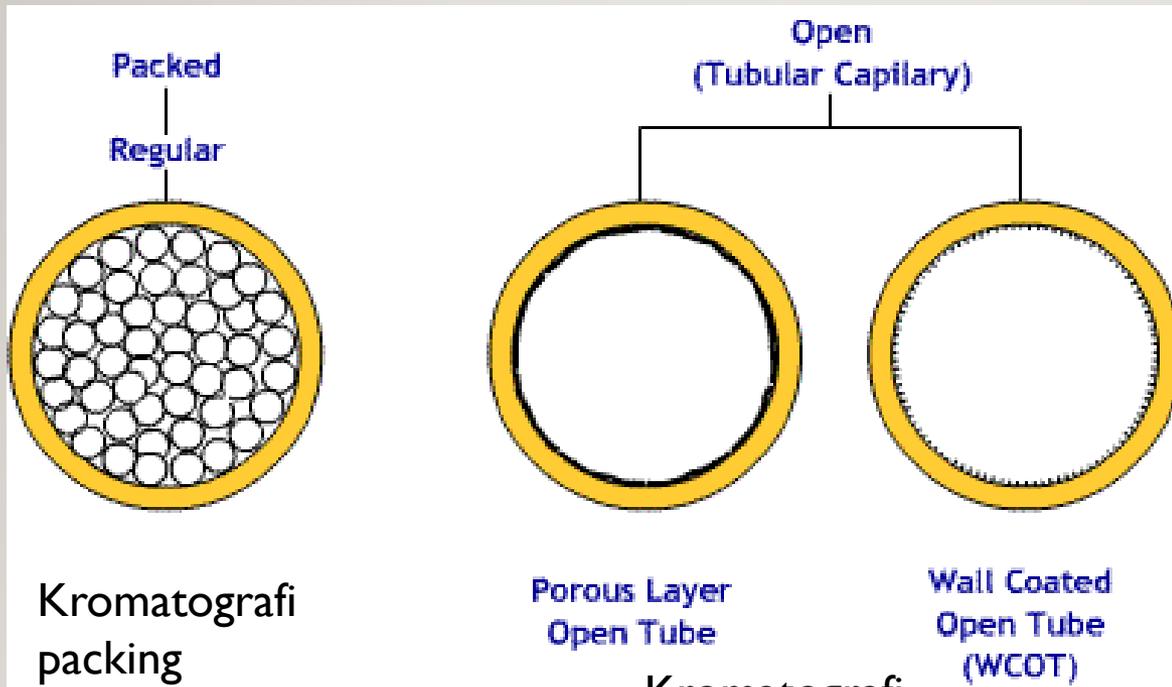
Type of Stationary Phase

- material padat tak terderivatisasi
- material terderivatisasi atau terlapisi cairan
- material memiliki muatan tetap
- material berpori
- material terimobilisasi ligan



3.) teknik kromatografi juga dapat diklasifikasikan berdasarkan **material pendukung** yang digunakan dalam sistem:

kromatografi **packing (kolom padat)**
kromatografi **tabung terbuka (kapiler)**
Kromatografi **alas terbuka (planar)**



Kromatografi Alas terbuka/Planar

KLASIFIKASI LAIN KROMATOGRAFI DILIHAT CARA APLIKASINYA

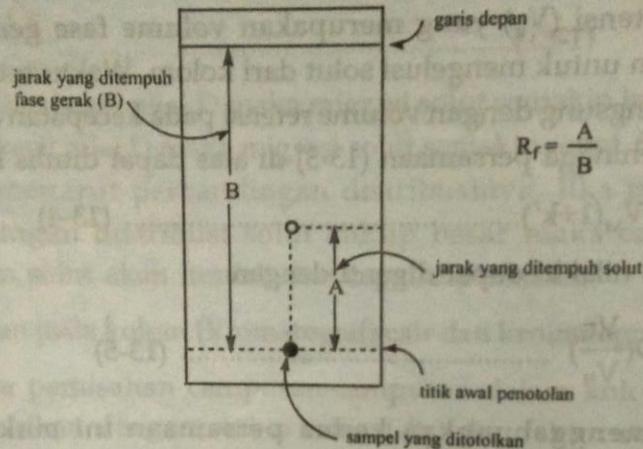
Teknik	Fase diam	Fase gerak	Bentuk	Mekanisme sorpsi yang utama
Kromatografi kertas	Kertas (selulosa)	Cair	Planar	Partisi (adsorpsi, pertukaran ion, eksklusi)
Kromatografi lapis tipis (KLT)	Silika, selulosa, resin penukar ion, padatan yang porusnya dikendalikan	Cair	Planar	Partisi (adsorpsi, pertukaran ion, eksklusi)
<i>Kromatografi gas</i> Kromatografi gas-cair (KGC)	Cair	Gas	Kolom	Partisi
Kromatografi gas-padat (KGP)	Padat	Gas	kolom	Adsorpsi
<i>Kromatografi cair</i> Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)	Padatan atau fase terikat	Cair	Kolom	Partisi yang dimodifikasi
<i>Kromatografi cair</i> Kromatografi eksklusi ukuran	Padatan dengan porositas yang dikendalikan	Cair	Kolom	Eksklusi
<i>Kromatografi cair</i> Kromatografi penukar ion	Resin penukar ion atau fase terikat	Cair	Kolom	Pertukaran ion
<i>Kromatografi cair</i> Kromatografi kiral	Pemilih kiral padat	cair	Kolom	Adsorpsi secara selektif

Pemisahan pada kromatografi planar (kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis)

Kromatografi planar dihentikan sebelum semua fasa gerak melewati batas permukaan fasa diam. Solut pada kedua kromatografi ini dikarakterisasi dengan jarak migrasi solute terhadap ujung fase geraknya. Waktu retardasi solute (R_f) didefinisikan sebagai:

$$R_f = \frac{1}{1+k'} \dots\dots\dots (13-8)$$

Gambaran untuk menghitung nilai R_f terdapat dalam gambar 13.1 berikut ini:



Gambar 13.1.
Bagaimana harga R_f diukur dan dihitung.
(sumber: Gritter *et al*, 1991)

Nilai R_f dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana dalam persamaan (13-9):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}} \dots\dots\dots (13-9)$$

INTERAKSI FASA DIAM DAN FASA GERAK YANG TERJADI DALAM PROSES KROMATOGRAFI

Proses Sorpsi

Proses **pemindahan solute dari fasa gerak ke fasa diam**. Kebalikannya proses desorpsi. Proses sorpsi dan desorpsi terjadi secara terus menerus selama proses pemisahan terjadi, karena proses kromatografi terjadi dalam keadaan kesetimbangan dinamis. Solut akan terdistribus di antara 2 fasa yang bersesuaian dengan perbandingan distribusinya (D) untuk menjaga kesetimbangan. $D=C_s/C_m$

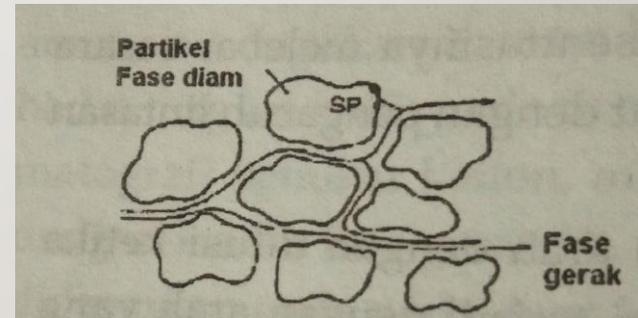
- Sorpsi =
1. Adsorpsi : **Penyerapan pada permukaan saja** dengan interaksi elektrostatis seperti ikatan hidrogen, penarikan dipol, penarikan induksi oleh dipol. Silika gel (gugus Si-O-Si dan Si-OH) gugus ini bersifat asam dan dapat membentuk ikatan hidrogen dengan solute yang agak polar sampai sangat polar.
 2. Partisi : Analog dengan proses ekstraksi, **dimana fasa diam cair diikatkan pada padatan lapis tipis yang inert**.
 3. Pertukaran ion : Solute pada fasa gerak dapat bertukar dengan ion-ion yang bermuatan sama yang terikat dengan fasa diam (resin penukar ion (kation/anion)).
 4. Eksklusi: Pemisahan berdasarkan **ukuran partikel** dari fasa diam yang di packing (prinsipnya porositas fasa diam). **(pemisahan didasarkan struktur dan ukuran molekul)** mirip penyaringan.

Profil puncak dan pelebaran puncak

Puncak yang ideal dalam kromatogram adalah puncak yang sempit, tajam, dan simetri. Namun demikian banyak terjadi puncak yang melebar, adapun beberapa factor penyebabnya adalah sbb:

1. Sorpsi dan desorpsi terus menerus antara fasa diam dan fasa gerak secara inheren akan menghasilkan profil konsentrasi Gaussian yang akan melebar karena solute bermigrasi lebih lanjut.

2. Perjalanan solute melalui partikel fase diam yang berbeda sehingga menyebabkan profil konsentrasinya melebar secara simetris.



3. Spesies solute menyebar ke segala arah dengan difusi Ketika bereada di fasa gerak. Difusi bisa searah dan berlawanan arah dengan aliran fasa gerak (longitudinal atau axial) sehingga terjadi pelebara pita.

4. Desorpsi yang lambat dapat juga mengakibatkan puncak yang asimetris.

5. Adanya variasi rasio distribusi solute dengan total konsentrasinya.

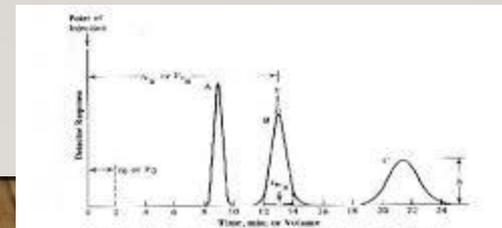
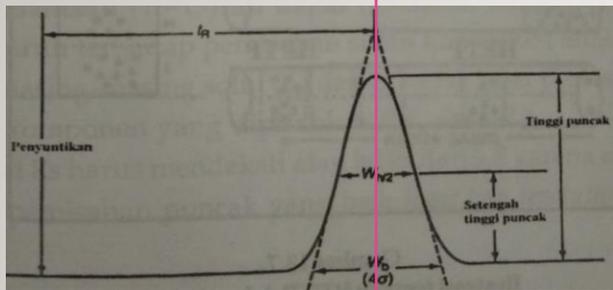
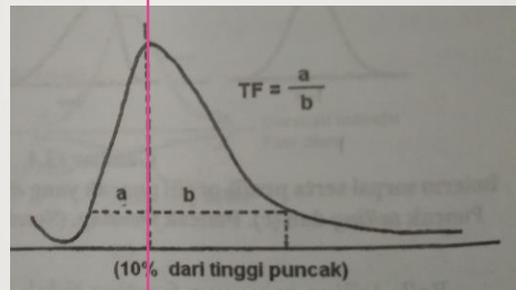


FIGURE 21.2. Classification of the chromatogram peaks of Figure 21.1. t_m is time the solvent to traverse the column; t_r is retention time of solute; $t_{1/2}$ is peak duration; h is peak height. Each can also be given in terms of volume rather than time. t_m , t_r , $t_{1/2}$, and h are V_m , V_r , W , and H .

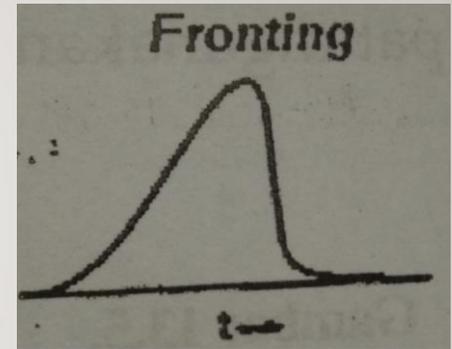
t_m , t_o = Waktu migrasi . t_r = waktu retensi . h = tinggi puncak
 W , W = lebar puncak . random fluctuations



Puncak simetri

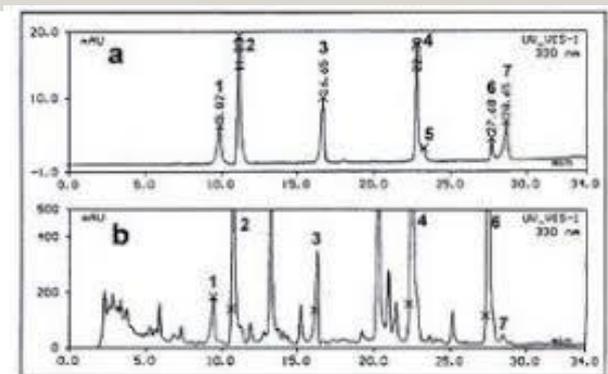
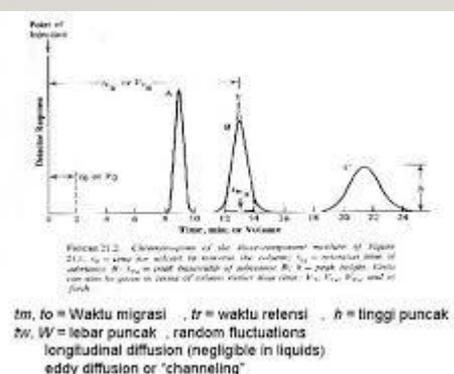


Puncak asimetri

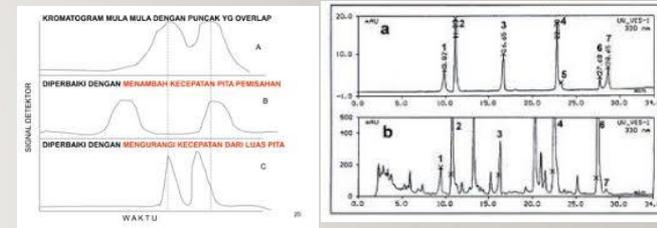


Terjadinya puncak yang asimetris disebabkan oleh:

1. Ukuran sample yang terlalu pekat untuk dianalisis. Rawan terjadi tailing (ekor melebar).
2. Interaksi yang terlalu kuat antara solute dengan fasa diam sehingga sulit untuk terelusi, sehingga terjadi tailing.
3. Adanya kontaminan dalam dalam sample yang dapat muncul terlebih dahulu sehingga menimbulkan puncak mendahului (fronting) (melebar/condong kedepan).



Efisiensi kolom



Ada 2 parameter untuk menilai kualitas pemisahan:

1. Efisiensi : Ukuran banyaknya pelebaran puncak masing2 puncak solute.
2. Resolusi : tingkat pemisahan puncak-puncak yang berdekatan.

Efisiensi berkaitan dengan jumlah lempeng (plate number) atau N , dan jumlah lempeng berkaitan dengan waktu retensi t_R . Hubungan ini disajikan dalam persamaan sebagai berikut:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2$$

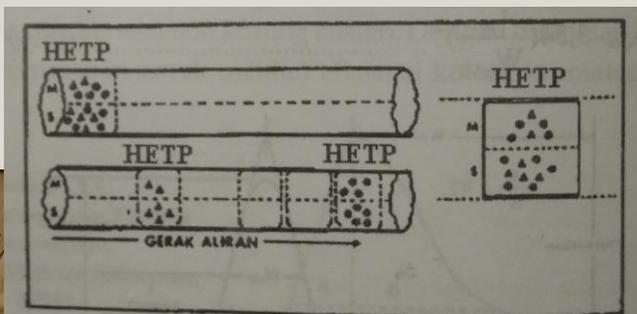
N : jumlah lempeng, t_R : waktu retensi, σ (sigma) standar deviasi lebar puncak.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \dots \dots$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

Dalam prakteknya lebih mudah mengukur lebar puncak (W_b) dan lebar setengah puncak $W_b/2$

Pemisahan kolom juga tergantung pada **tinggi lempeng (H)** atau juga disebut tinggi setara plate teori (**HETP= Height Equivalent Theoretical Plate**).

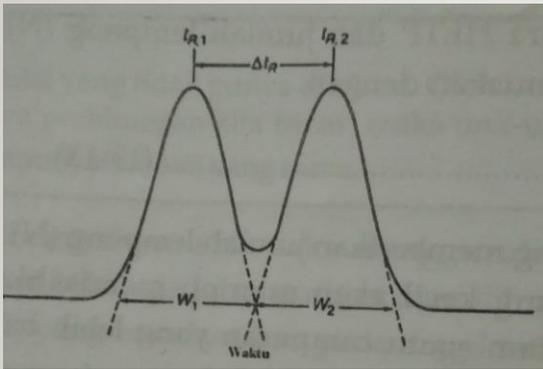


Hubungan antara H dan N adalah ;
 $H = L/N$ dimana N jumlah lempeng, dan
 L panjang kolom

Semakin kecil H maka semakin efisien dalam pemisahan

Resolusi Kromatogram

Resolusi kromatogram didefinisikan sebagai perbedaan antara waktu retensi 2 puncak yang paling berdekatan ($\Delta t_R = t_{R2} - t_{R1}$) dibagi dengan rata-rata lebar puncak $(W_1 + W_2)/2$



$$R_s = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)} \dots$$

W = lebar puncak
T = waktu retensi
R_s = resolusi.

Pengukuran resolusi 2 puncak yang berdekatan

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\sqrt{\frac{L}{H}} \right) \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{1 + k'} \right] \dots$$

Yang mana:

R : Resolusi

N : bilangan lempeng

α : selektifitas

k' : faktor retensi

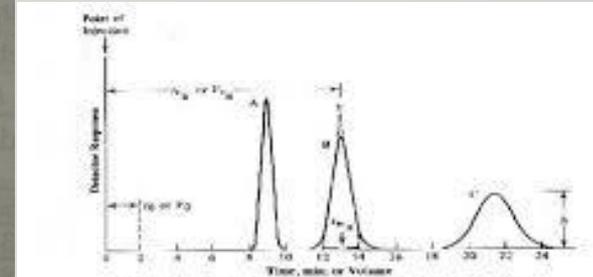
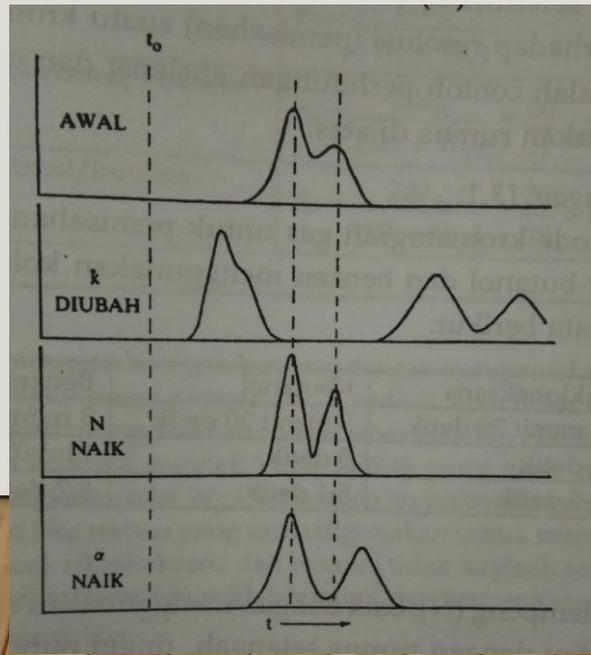
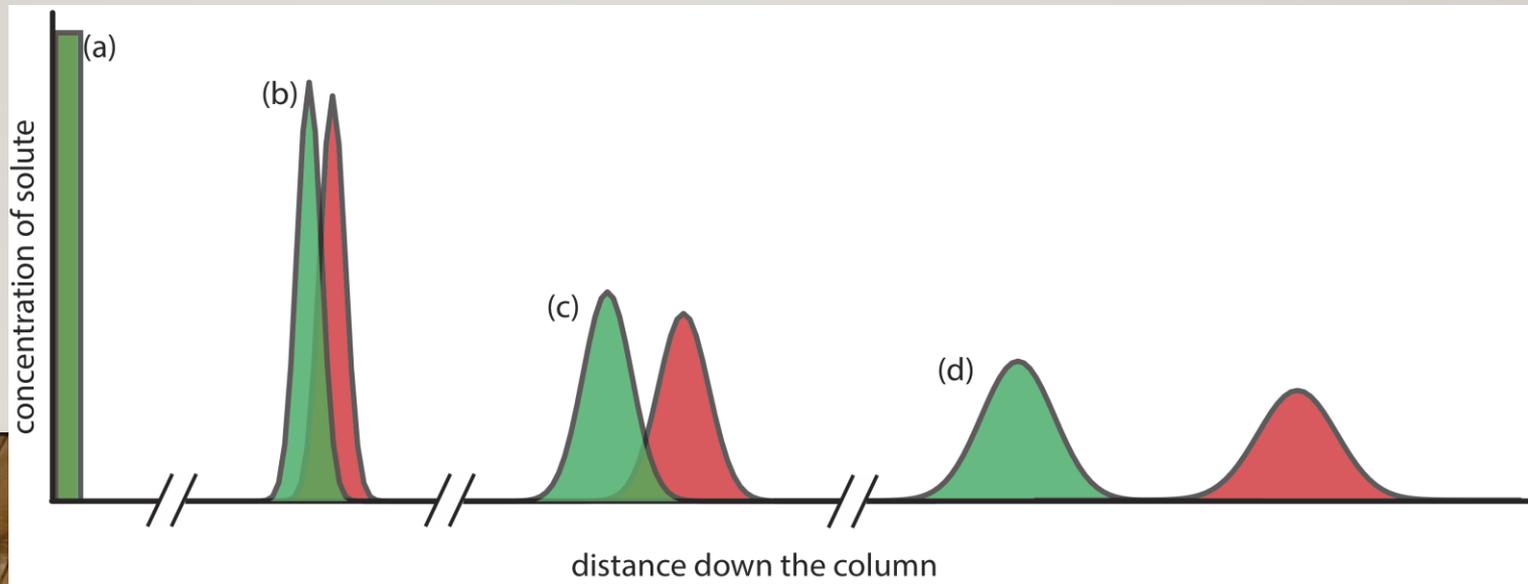
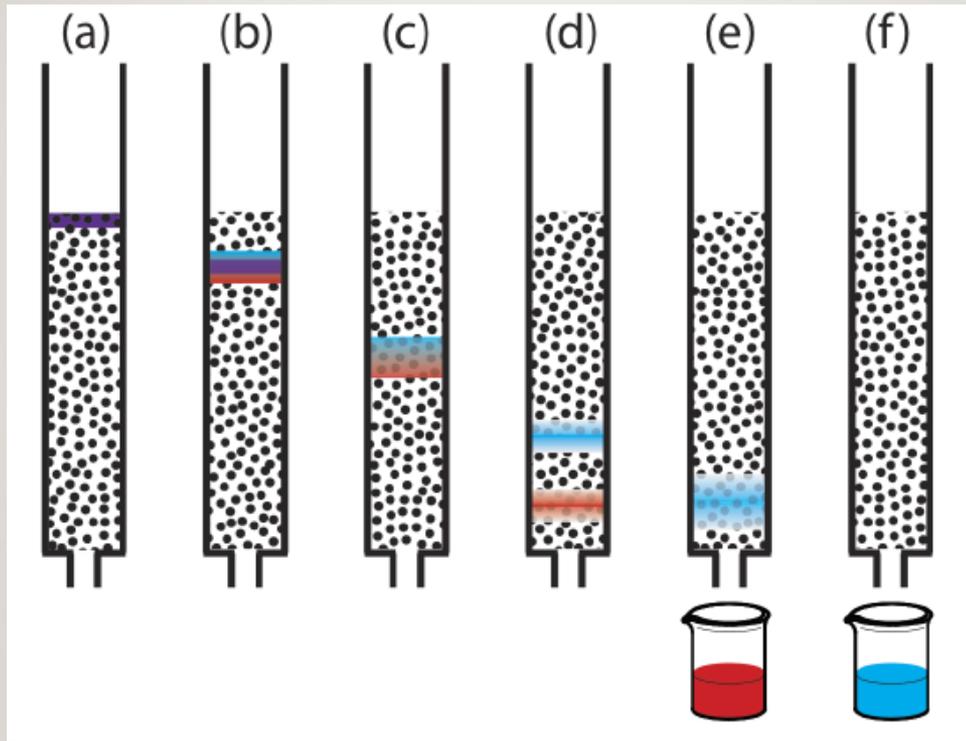


FIGURE 21.2. Chromatogram of the three-component mixture of Figure 21.1. t_0 is time for solvent to travel the column; t_0 is retention time of adsorbent B; t_{R1} is peak retention of adsorbent A; t_{R2} is peak retention of adsorbent C. Each component is given its own set of values for k' , α , N , H , and L .

t_m , t_0 = Waktu migrasi ; t_r = waktu retensi ; h = tinggi puncak
 W , W' = lebar puncak ; random fluctuations
longitudinal diffusion (negligible in liquids)
eddy diffusion or "channeling"



Contoh perhitungan 13.1:

Suatu metode kromatografi gas untuk pemisahan campuran sikloheksana, t-butanol dan benzen menggunakan kolom kapiler memberikan data berikut:

Parameter	Sikloheksana	t-butanol	Benzena
t_R	3 menit 20 detik	3 menit 30 detik	3 menit 45 detik
W_b	8 detik	9 detik	11 detik
$W_{h/2}$	4,6 detik	5,1 detik	6,2 detik

Hitunglah:

- Bilangan lempeng (N), baik dengan menggunakan rumus lebar puncak atau dengan rumus setengah tinggi puncak.
- Tinggi setara lempeng teoritis (H).
- Resolusi antara 2 pasang solut yang berdekatan

Jawab:

(a)	Bilangan lempeng:	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$	$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$
	sikloheksana	$N = 16 \left(\frac{200}{8} \right)^2$ = 10.000	$N = 5,54 \left(\frac{200}{4,6} \right)^2$ = 10.473
	t-butanol	$N = 16 \left(\frac{210}{9} \right)^2$ = 8711	$N = 5,54 \left(\frac{210}{5,1} \right)^2$ = 9393
	Benzena	$N = 16 \left(\frac{225}{11} \right)^2$ = 6694	$N = 5,54 \left(\frac{225}{6,2} \right)^2$ = 7296

(b)	Tinggi lempeng	$H = \frac{10.000}{N}$	
	sikloheksana	H = 1,0 mm	H = 0,95 mm
	t-butanol	H = 1,15 mm	H = 1,06 mm
	Benzena	H = 1,49 mm	H = 1,37 mm
(c)	Resolusi	$R_s = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)}$	
	Sikloheksana/t-butanol	$R_s = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)} = \frac{20}{17} = 1,2$	
	t-butanol/benzena	$R_s = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)} = \frac{30}{20} = 1,5$	

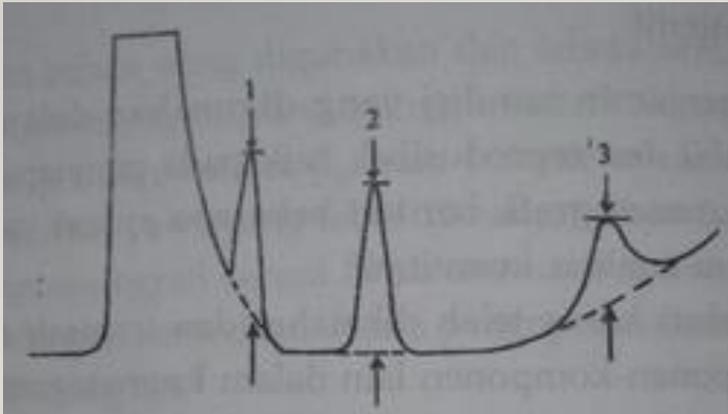
Analisis kualitatif dan kuantitatif

Analisis kualitatif:

1. Dengan cara membandingkan data retensi solute yang dicari dengan retensi bakustandar (yang sudah diketahui) pada kondisi yang sama.
2. Dengan cara spiking. Manambahkan sampel yang mengandung senyawa tertentu yang dicari dengan senyawa standar yang sudah diketahui. Diamati perubahan setelah penambahan standar pada sample.
3. Menggabungkan alat kromatografi dengan spectrometer massa (HPLC-MS_

Analisis kuantitatif:

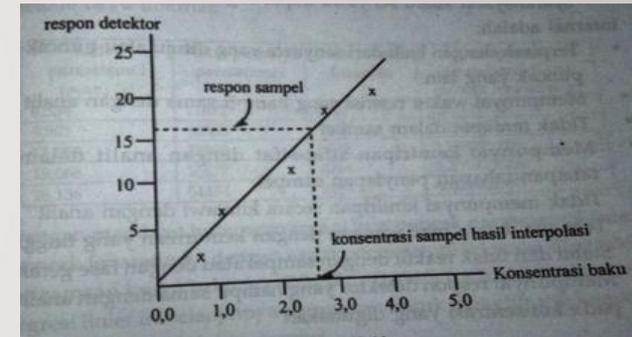
1. Perhitungan tinggi puncak. (pengukuran garis dasar ke puncak maksimum)
2. Perhitungan luas puncak. Mengukur luas sebagai hasil kali tinggi puncak dan lebar pada setengah tinggi ($W_{1/2}$).



Analisis kuantifikasi:

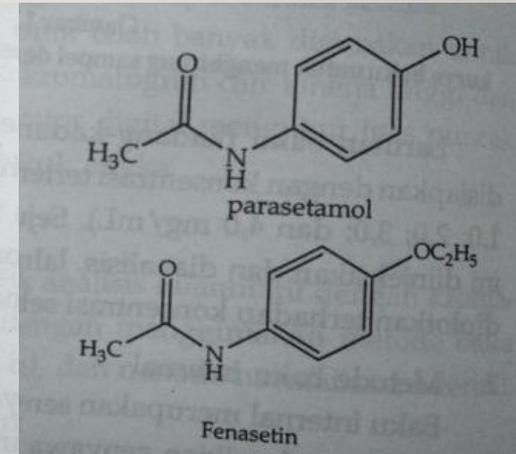
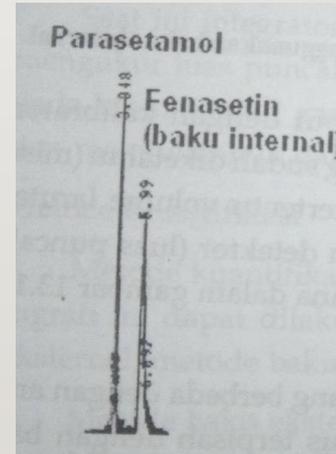
1. Metode baku eksternal :

Penentuan konsentrasi senyawa target dalam suatu sample dengan menggunakan plot kalibrasi menggunakan baku eksternal.



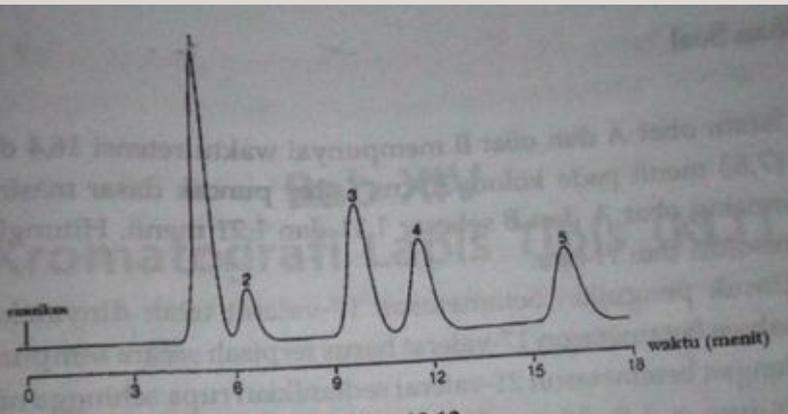
2. Metode baku internal :

Penentuan konsentrasi senyawa target dalam suatu sample dengan menggunakan senyawa yang berbeda dengan analit tapi memiliki kemiripan. Misal penentuan kadar parasetamol menggunakan baku internal fenasetin.



3. Normalisasi internal :

Jumlah relative analit dalam suatu multikomponen yang dibutuhkan. Biasanya digunakan persen atau fraksi



Komponen	Luas puncak terukur	Persen relatif
1	167,8	35,9
2	31,63	6,8
3	108,3	23,2
4	80,63	17,3
5	78,38	16,8
Total	466,94	100

Latihan Soal

1. Suatu obat A dan obat B mempunyai waktu retensi 16,4 dan 17,63 menit pada kolom 30 cm. Lebar puncak dasar masing-masing obat A dan B sebesar 1,11 dan 1,21 menit. Hitunglah resolusi dan H-nya.
2. Untuk pengujian betametason 17-valerat telah dinyatakan bahwa betametason 17-valerat harus terpisah secara sempurna dengan betametason 21-valerat sedemikian rupa sehingga nilai R_s -nya $> 1,0$. Mana diantara kolom ODS berikut yang memenuhi spesifikasi?

Kolom ODS	t_R betameta-son 17-valerat (menit)	t_R betameta-son 21-valerat (menit)	Lebar dasar betameta-son 17-valerat (menit)	Lebar dasar betameta-son 21-valerat (menit)
1	9,5	8,5	0,4	0,5
2	9,3	8,6	0,4	0,4

3. Suatu prosedur operasional baku menyatakan bahwa suatu kolom harus mempunyai efisiensi > 30.000 lempeng/m. Manakah kolom dengan panjang 15 cm berikut yang memenuhi spesifikasi?

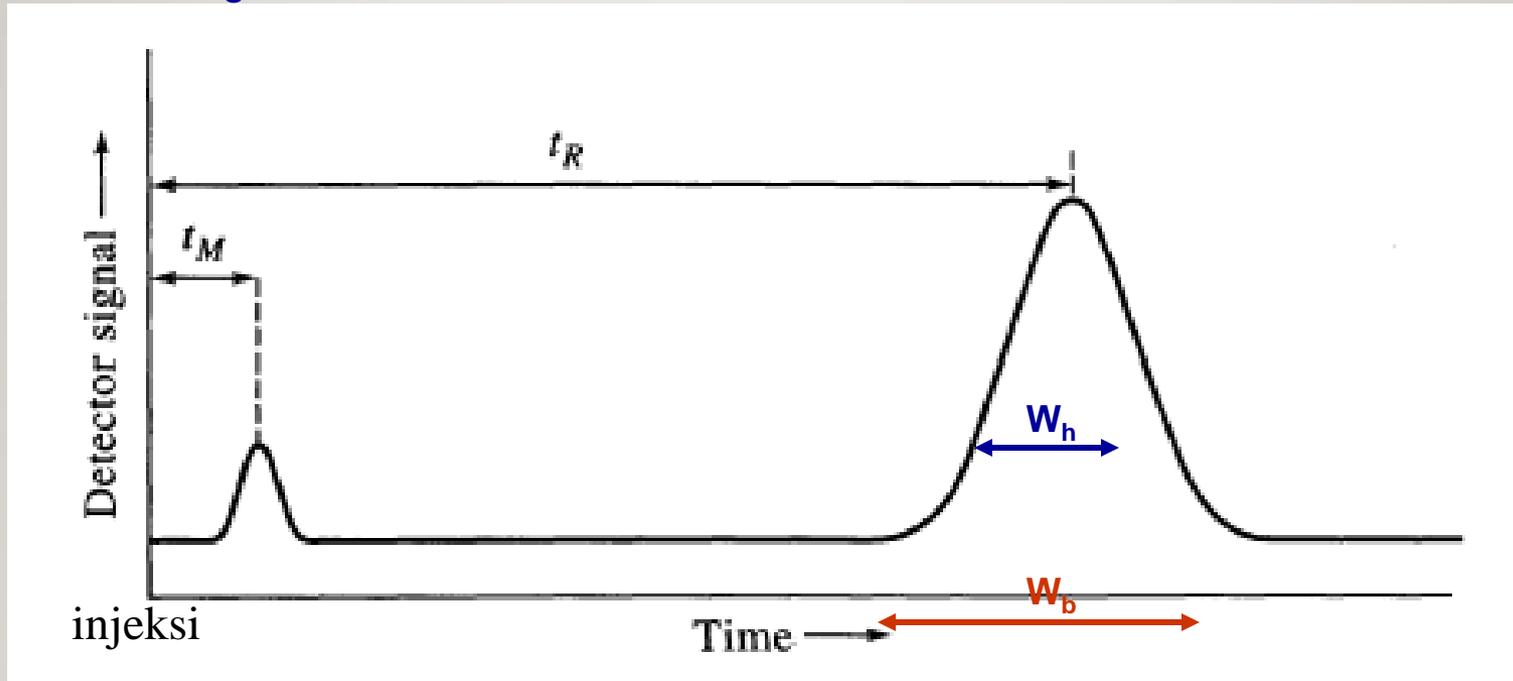
Kolom	t_R analit (menit)	$W_{1/2}$ (menit)
1	6,4	0,2
2	5,6	0,2
3	10,6	0,6

SILAHKAN
DIKERJAKAN
DIRUMAH
SEBAGAI TUGAS.
Jawaban ditulis
tangan dan
dikumpulkan
dengan diupload

Teori kromatografi

1.) jenis respons yang didapat dari kromatografi (misalnya: sebuah kromatogram):

kromatogram- konsentrasi versus aktu elusi



dimana:

t_R = waktu retensi

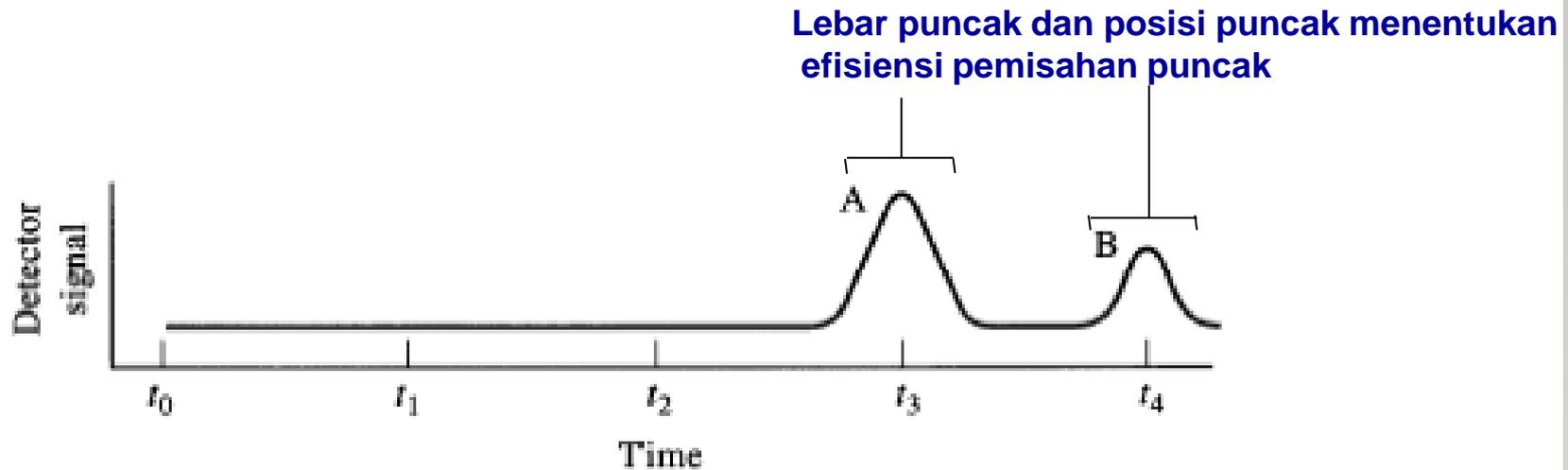
t_M = waktu kosong

W_b = lebar baseline puncak dalam satuan waktu

W_h = lebar setengah tinggi puncak dalam satuan waktu

Catatan: pemisahan analit pada kromatografi bergantung pada dua faktor:

- (a) beda waktu retensi tiap analit (misalnya: beda waktu atau volume elusi analit)
- (b) ketajaman puncak dari analit (misalnya, efisiensi sistem pemisahan yang bagus)



kurva yang sama juga bisa dibuat dengan mengganti waktu dengan volume elusi. Jika volume yang digunakan, volume fase gerak yang digunakan untuk mengelusi suatu puncak keluar dari kolom disebut sebagai volume retensi (V_R) dan jumlah fase gerak yang digunakan untuk mengelusi komponen yang tidak tertahan oleh fase diam disebut volume kosong (V_M).

2.) Retensi zat terlarut:

waktu retensi atau volume retensi analit pada kromatografi berhubungan secara langsung dengan kuat interaksi zat terlarut dengan fase diam dan fase gerak.

Retensi pada suatu kolom berhubungan dengan faktor berikut:

- ukuran kolom
- laju gerak fase diam

$$\text{average migration rate } \bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad \text{column length}$$

Faktor kapasitas (k'): secara lebih universal merupakan ukuran retensi yang ditentukan dari t_R atau V_R .

$$k' = (t_R - t_M)/t_M$$

atau

$$k' = (V_R - V_M)/V_M$$

faktor kapasitas sangat berguna untuk membandingkan hasil yang diperoleh dari berbagai sistem karena faktor kapasitas ini tidak bergantung pada panjang kolom dan laju alir.

nilai faktor kapasitas sangat berguna dalam memahami mekanisme retensi analit mengingat definisi dasar dari k' adalah:

$$k' = \frac{\text{mol } A_{\text{fase diam}}}{\text{Mol } A_{\text{fase gerak}}}$$

k' berhubungan langsung dengan kekuatan interaksi antara analit dengan fase diam dan fase gerak.

Mol $A_{\text{fase diam}}$ dan mol $A_{\text{fase gerak}}$ menunjukkan jumlah analit yang terdapat pada tiap fase pada saat kesetimbangan.

kesetimbangan tercapai pada puncak dari suatu puncak kromatogram.

Ketika k' bernilai # 1,0; pemisahan jelek
Ketika k' bernilai > 30, pemisahan terlalu lambat
Ketika k' bernilai = 2-10, pemisahan optimum

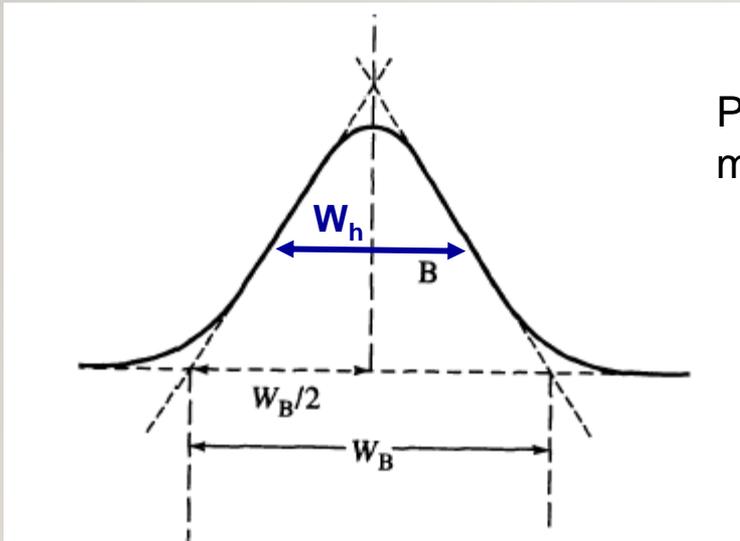
3.) efisiensi:

efisiensi berhubungan dengan lebar puncak dari analit.

- suatu sistem yang efisien akan menghasilkan puncak yang langsing
- puncak yang langsing → beda interaksi yang kecil dalam pemisahan dua zat terlarut

efisiensi secara teoritis berhubungan dengan berbagai proses kinetik yang terlibat dalam proses retensi dan perpindahan analit dalam kolom.

- menunjukkan lebar atau standart deviasi (σ) dari masing-masing puncak



Penentuan σ dari lebar puncak, dengan mengasumsikan bahwa puncak ternormalisasi :

$$W_b = 4\sigma$$

$$W_h = 2.354\sigma$$

Bergantung pada banyaknya waktu yang analit habiskan dalam kolom (k' atau t_R)

Jumlah lapisan teoritis (N): menunjukkan perbandingan efisiensi suatu sistem untuk analit-analit yang memiliki waktu retensi yang berbeda.

$$N = (t_R/\sigma)^2$$

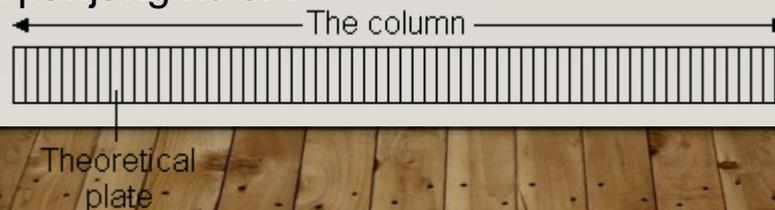
atau untuk puncak ternormalisasi

$$N = 16 (t_R/W_b)^2$$

$$N = 5.54 (t_R/W_h)^2$$

Semakin besar nilai N suatu kolom, semakin bagus pemisahan yang dilakukan pada dua senyawa.

- semakin bagus kemampuannya dalam memisahkan analit-analit yang memiliki beda retensi yang kecil.
- N bergantung pada retensi zat terlarut.
- N bergantung pada panjang kolom



Tinggi lapisan atau tinggi ekuivalen suatu lapisan teoritik (H atau HETP): menunjukkan perbandingan kolom-kolom yang memiliki panjang yang berbeda:

$$H = L/N$$

dimana: L = panjang kolom

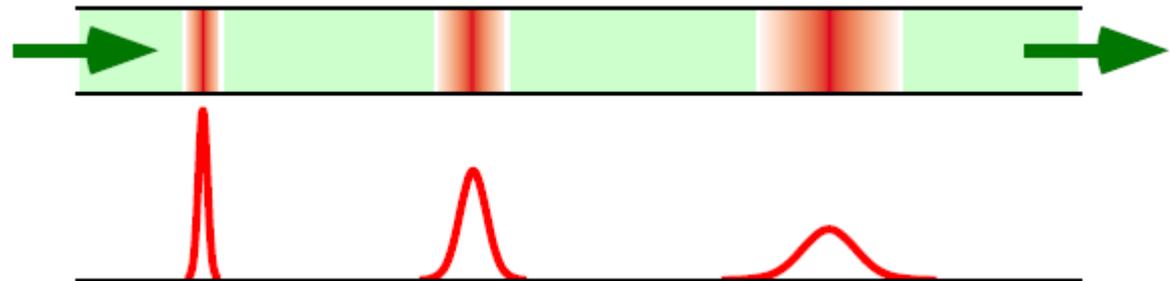
N = jumlah lapisan lapisan teoritis untuk kolom tertentu

Catatan: H secara sederhana menunjukkan panjang dari satu lapisan teoritik.

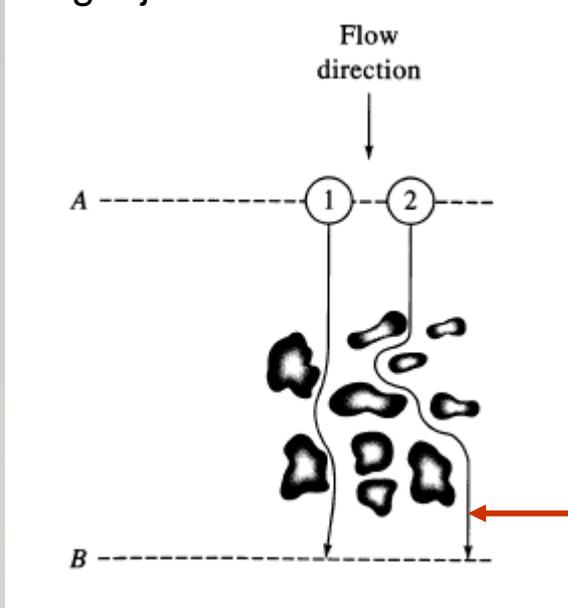
H dapat juga digunakan untuk menghubungkan berbagai parameter kromatografi (misalnya: laju alir, ukuran partikel, dll) dengan proses kinetik yang menghasilkan pelebaran puncak:

Mengapa puncak dapat mengalami pelebaran?

- Difusi Eddy
- Transfer massa fase gerak
- Transfer massa fase gerak stagnan
- Transfer massa fase diam
- difusi longitudinal

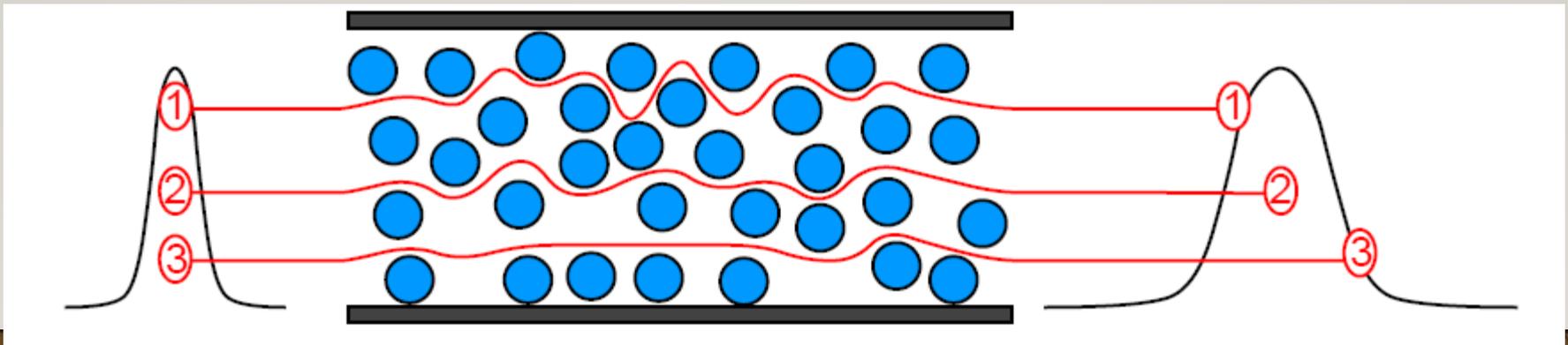


a.) difusi *Eddy*– suatu proses yang menyebabkan pelebaran puncak akibat keberadaan berbagai jalur alir dalam suatu kolom paking.

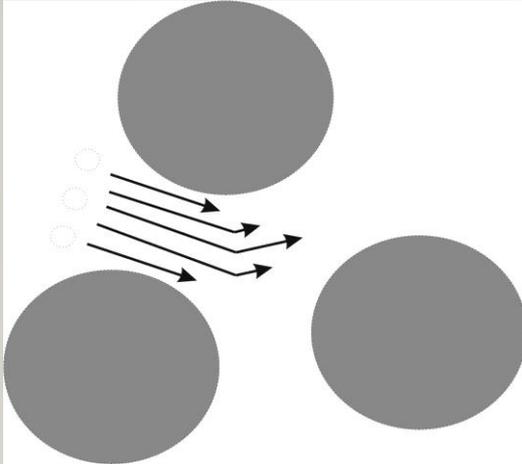


Ketika analit berpindah melewati suatu kolom, masing-masing zat terlarut akan sampai lebih cepat dibandingkan yang lain akibat perbedaan jalur yang ditempuh

Jalur yang lebih panjang tiba diujung kolom setelah (1)



b.) transfer massa fase gerak– suatu proses pelebaran puncak yang disebabkan oleh perbedaan profil aliran di dalam kolom atau di antara partikel penyokong di dalam kolom.

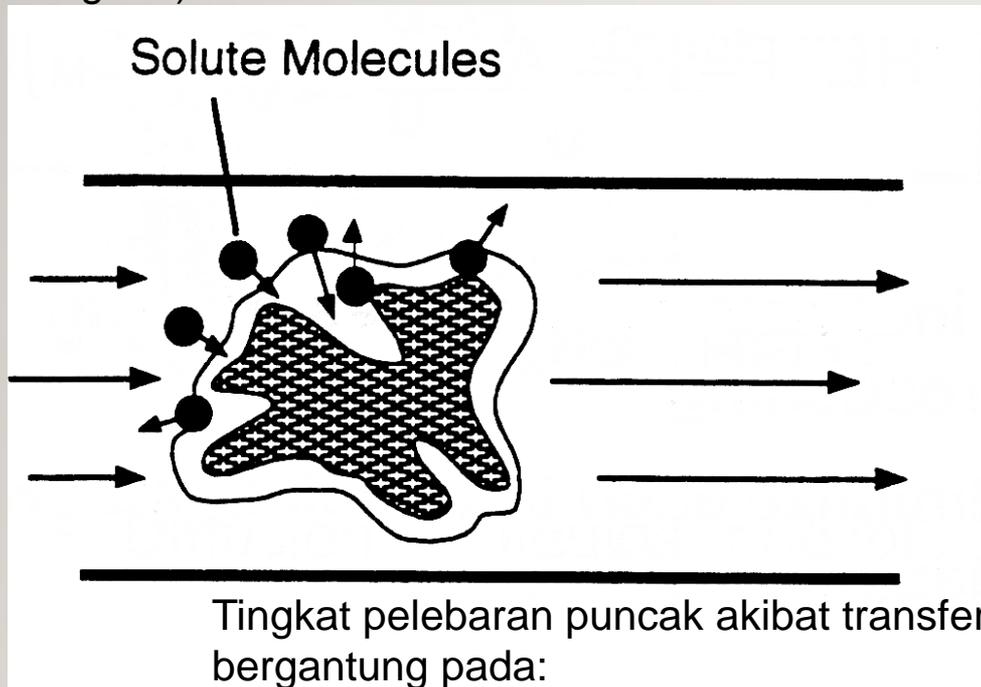


Analit di bagian tengah kolom akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan bagian pinggir sehingga mengakibatkan pelebaran puncak.

Derajat pelebaran akibat difusi eddy dan transfer massa fase gerak bergantung pada:

- 1) ukuran material penyokong
- 2) laju difusi analit

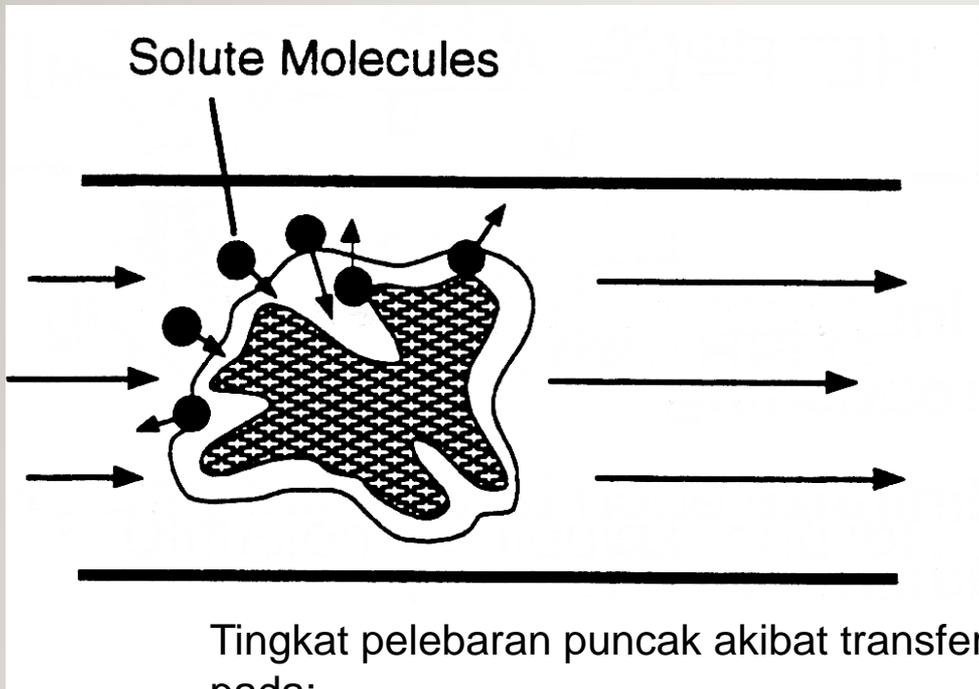
c.) *transfer massa fase gerak stagnan*– pelebaran puncak akibat perbedaan laju difusi dari molekul analit yang berada antara fase gerak dibagian luar pori material penyokong (fase gerak yang mengalir) ke fase gerak yang ada di dalam pori material penyokong (fase gerak stagnan).



ketika berada di fase gerak stagnan, analit ini akan menghabiskan waktu yang lebih lama di dalam kolom dibandingkan dengan analit yang berada pada fase gerak mengalir.

- 1) ukuran, bentuk, dan struktur pori pada material penyokong
- 2) difusi dan retensi analit
- 3) laju alir analit melalui kolom

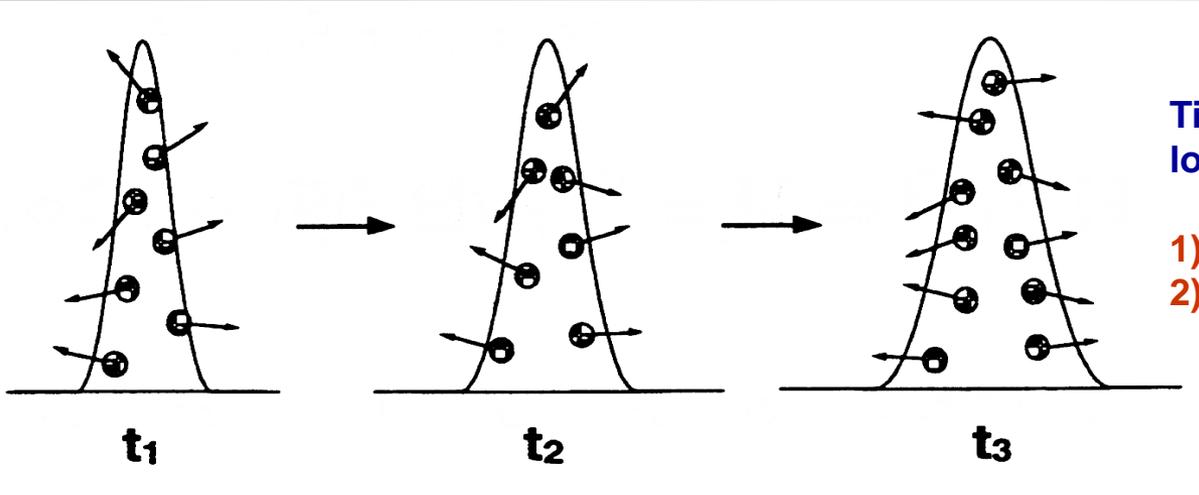
d.) *transfer massa fase diam*– pelebaran puncak akibat pergerakan zat terlarut antara fase gerak stagnan dan fase diam.



Waktu kesetimbangan yang berbeda2 untuk tiap zat terlarut pada fase diam mengakibatkan terjadinya perbedaan waktu retensi dari tiap molekul sehingga mengakibatkan pelebaran puncak.

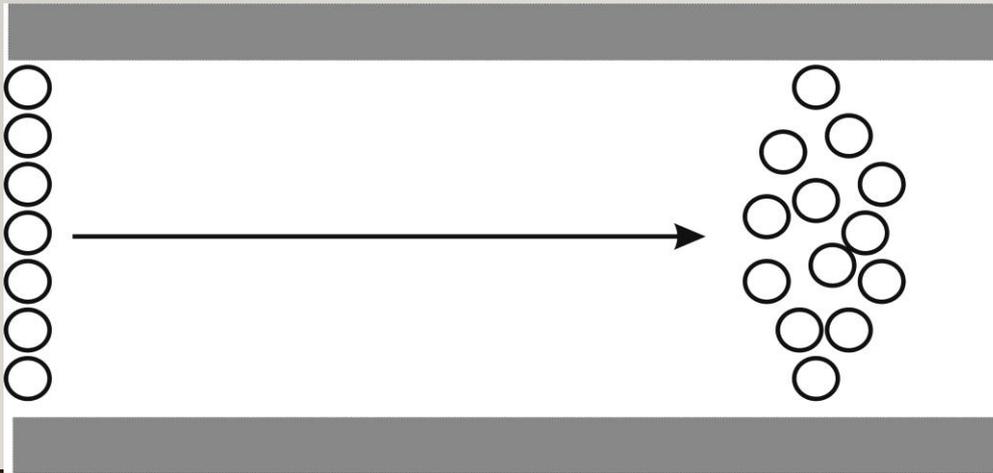
- 1) retensi dan difusi zat terlarut
- 2) laju alir zat terlarut melalui kolom
- 3) interaksi kinetik antara zat terlarut dan fase diam

e.) *difusi longitudinal*– pelebaran puncak akibat difusi zat terlarut searah atau berlawanan arah dengan arah aliran fase diam.



Tingkat pelebaran akibat difusi longitudinal bergantung pada:

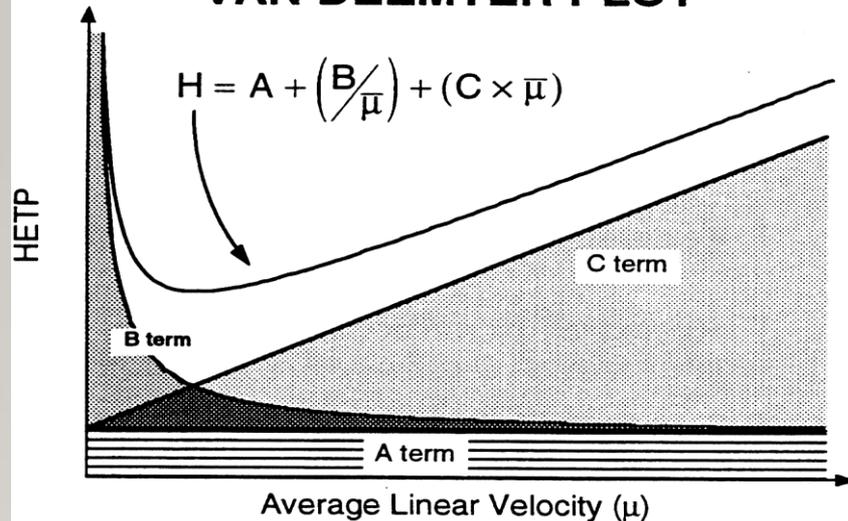
- 1) Difusi zat terlarut
- 2) Laju alir zat terlarut melalui kolom



Persamaan Van Deemter: persamaan yang menunjukkan hubungan antara laju alir (kecepatan linier fase gerak) dengan H:

$$H = A + B/\mu + C\mu$$

VAN DEEMTER PLOT



μ = kecepatan linier (laju alir x V_m/L)

H = total tinggi lapisan pada kolom

A = konstanta difusi eddy dan transfer massa fase gerak

B = konstanta difusi longitudinal

C = konstanta transfer massa fase gerak stagnan dan transfer massa fase diam

persamaan ini dapat digunakan untuk memprediksi efek apa yang mempengaruhi keseluruhan sistem kromatografi

Number of theoretical plates (N)

$$(N) = 5.54 (t_R/W_b)^2$$

peak width (W_b)

$$H = L/N$$

4.) Ukuran Pemisahan Analit

Faktor pemisahan (α) – merupakan parameter yang digunakan untuk menggambarkan seberapa baik pemisahan dua analit yang dipisahkan dalam suatu sistem kromatografi. :

$$\alpha = k'_2/k'_1 \quad k' = (t_R - t_M)/t_M$$

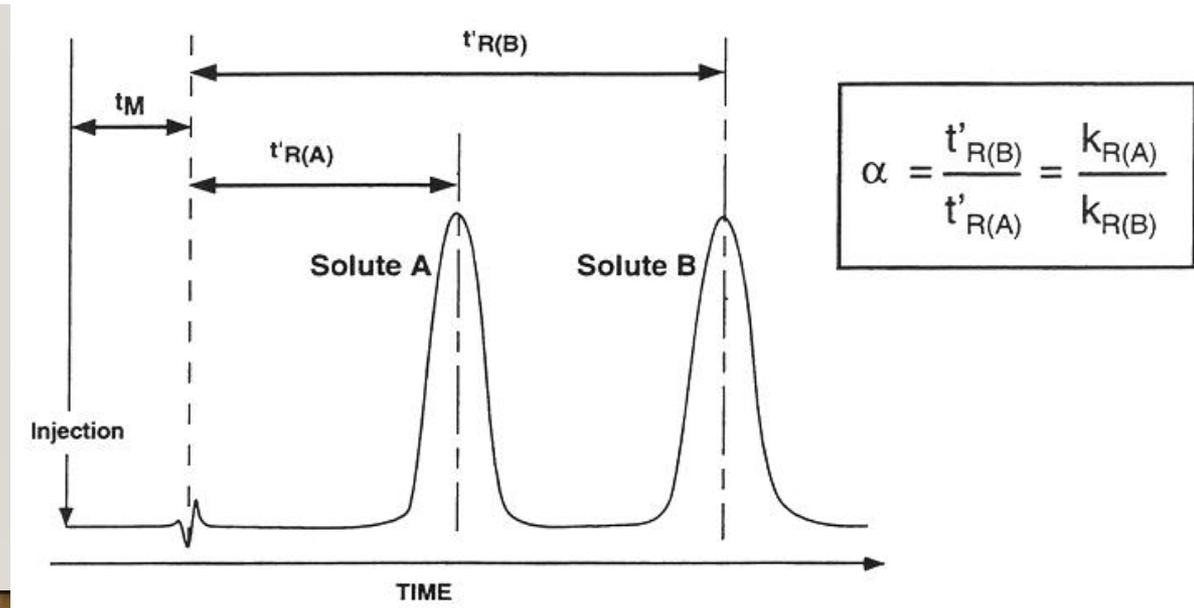
dimana:

k'_1 = faktor kapasitas analit pertama

k'_2 = faktor kapasitas analit kedua

dimana $k'_2 > k'_1$

Nilai $\alpha > 1$ biasanya menunjukkan pemisahan yang bagus.



*Parameter ini tidak mempertimbangkan efek efisiensi kolom atau lebar puncak.
Hanya mempertimbangkan retensi analit*

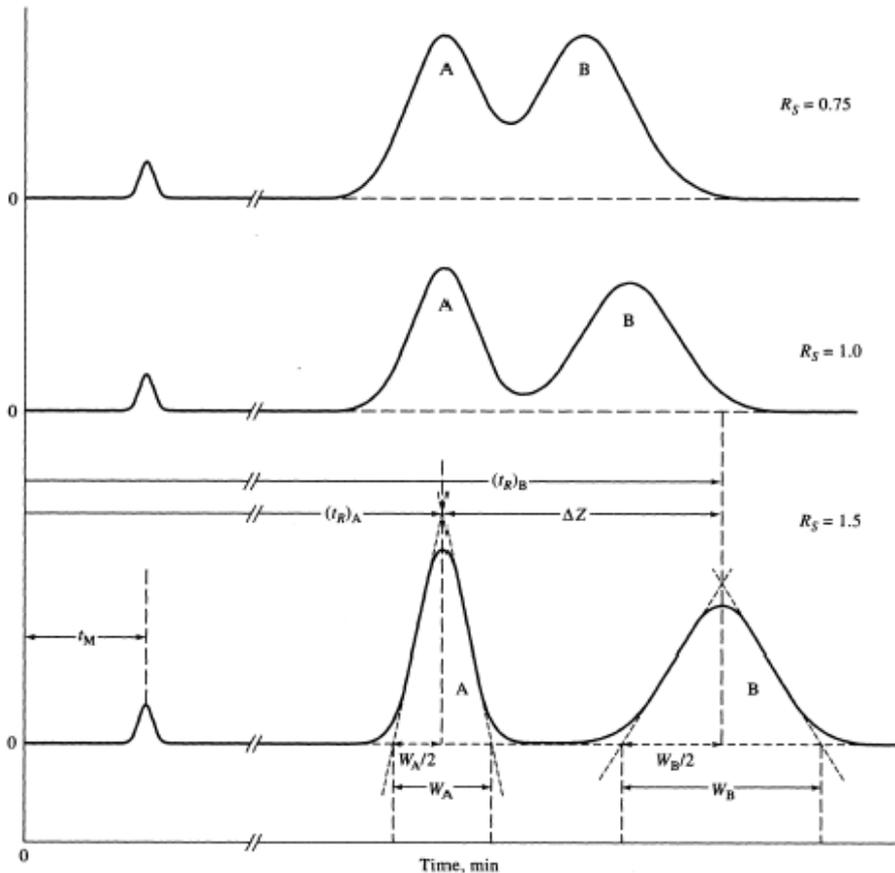
Resolusi (R_s) – resolusi antara dua puncak merupakan ukuran kedua untuk menunjukkan seberapa baik pemisahan yang dilakukan :

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(W_{b2} + W_{b1})/2}$$

dimana

t_{r1} , W_{b1} = waktu retensi dan lebar dasar untuk analit pertama

t_{r2} , W_{b2} = waktu retensi dan lebar dasar untuk analit



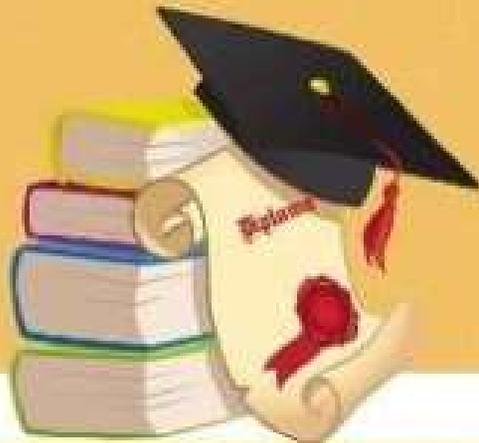
$R_s > 1.5$ menunjukkan pemisahan total dari dua puncak analit → kasus ideal.

$R_s > 1.0$ biasanya dianggap cukup untuk sebagian besar pemisahan

KROMATOGRAFI KOLOM

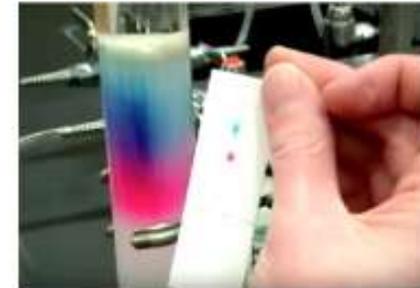
Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak. Salah satu fase disebut fase diam/stationer yang bertugas menahan gerakan komponen, sedangkan fase

yang kedua disebut fase gerak yang bertugas menggerakkan komponen diantara fase diam. Secara teoritis dapat dikatakan bahwa komponen seolah-olah terbagi (terdistribusi) dalam dua fase yang selalu berada dalam suatu kesetimbangan kimia yang dinamis.

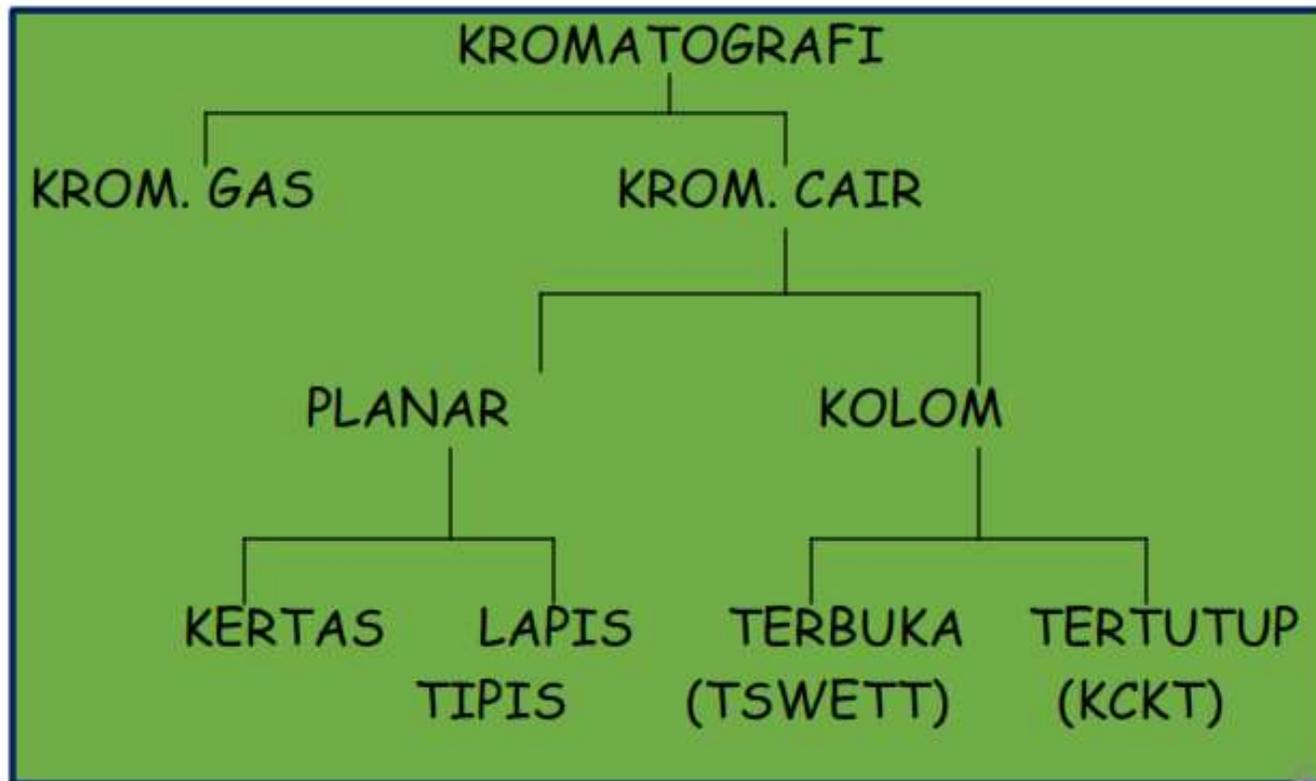


1. **Kromatografi kolom (CC) adalah salah satu metode yang paling berguna untuk pemisahan dan pemurnian padatan dan cairan.**
2. **Merupakan teknik pemisahan menggunakan padat-cair di mana fase diam adalah padatan dan fase gerak adalah cairan.**
3. **Prinsip dasar kromatografi kolom adalah adsorpsi, di mana campuran komponen terlarut dalam fase gerak dimasukkan ke dalam kolom dan komponen bergerak tergantung pada afinitas relatifnya terhadap fase diam.**
4. **Pemilihan pelarut tergantung pada karakteristik kelarutan campuran. Pelarut juga harus memiliki titik didih yang cukup rendah untuk memungkinkan pemulihan siap bahan yang dielusi. Dalam CC, fase gerak yang berbeda (dalam urutan polaritas yang meningkat) dapat digunakan, misalnya, petroleum eter, heksana, kloroform, dan etil asetat. Namun, polaritas fase diam dan fase gerak merupakan faktor terpenting dalam kromatografi adsorpsi. Hal ini ditemukan sangat berguna dalam pemisahan campuran senyawa, proses pemurnian, isolasi konstituen aktif, dan pemisahan diastereomer (Gaudencio dan Pereira, 2015).**

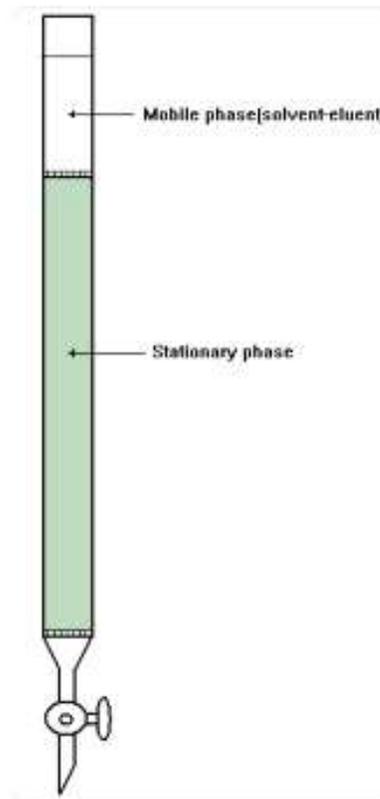
- Untuk memahami penggunaan teknik pemisahan ini, kita dapat menggunakan eksperimen contoh. TLC, memisahkan dan menganalisis berbagai komponen obat analgetik.
- Teknik TLC berguna dalam menentukan jenis dan jumlah bahan dalam campuran, bahan, kromatografi kolom dapat digunakan.
- Kolom kromatografi dapat memisahkan dan mengumpulkan senyawa secara terpisah.
- Kolom Kromatografi (KK) dapat digunakan untuk memisahkan bahan awal dari produk yang teroksidasi misalnya: fluorene menjadi flourenone dan TLC akan digunakan untuk memantau efektivitas pemisahan ini.



KLASIFIKASI KROMATOGRAFI



KROMATOGRAFI KONVENSIONAL (KROMATOGRAFI KOLOM TERBUKA)



Kromatografi kolom adalah
Teknik kromatografi
yang menempatkan fase diam
pada kolom untuk
memisahkan komponen-
komponen dalam campuran

Column Chromatography

Termasuk kromatografi cair preparatif

- Kolom : bentuknya mirip buret, dibuat dari bahan gelas, polymer, logam. Ukuran bervariasi diameter dan panjang. Minimal panjang kolom 10 kali diameternya.

Fase diam :

- Perbandingan berat (fase diam: sampel= 30:1 dapat ditingkatkan 50 : 1 untk sampel yg sukar dipisahkan)
- Ukuran partikel 63-250 μm , yg <63 μm fase gerak perlu ditekan atau dihisap
- Biasa digunakan : silika gel, alumina
- Fase gerak : eluen / solven



PENYIAPAN SAMPEL

Pemilihan fase gerak : - Penelusuran pustaka

- Mencoba-coba dengan KLT

Mengemas kolom (packing)

- Cara basah
- Cara kering

Preparasi sampel (penyiapan sampel)

- Sampel dilarutkan,kmd dituang pd bag atas kolom.
- Sampel dilarutkan, kmd dihomogenkan dg fase diam (1:3) dikeringkan. Diratakan selapis diatas fase diam.

PRINSIP KERJA KROMATOGRAFI KOLOM

Didasarkan pada adsorpsi komponen2 campuran dengan afinitas berbeda terhadap permukaan fase diam.

Adsorben bertindak sebagai fase diam dan fase gerak adalah cairan yang mengalir membawa komponen campuran sepanjang kolom.

Sampel yang mempunyai afinitas besar terhadap Adsorben akan secara selektif tertahan dan afinitasnya paling kecil akan mengikuti aliran pelarut.

Alat kromatografi kolom

Tabung kaca dengan ukuran sesuai kebutuhan, umumnya Panjang 10 x diameter tabung, dilengkapi kran pada salah satu ujungnya

Adsorben merupakan bahan yang tidak larut dalam fasa gerak, memiliki ukuran partikel yang seragam, dan ditempatkan dalam tabung kaca tersebut. Umumnya digunakan SiO_2 dan Al_2O_3

Wadah sebagai penampung hasil pemurnian kromatografi

KROMATOGRAFI KOLOM GRAVITASI

Dalam kromatografi kolom gravitasi, eluen bergerak berdasarkan gaya gravitasi atau perkolasi.

PENGEMASAN KOLOM CARA BASA

Cara Basah

Adsorben dicampur dengan pelarut, kemudian campuran dimasukkan ke dalam kolom.

Keuntungan dari metode ini adalah gelembung udara dapat dihilangkan dari kolom.

Contoh pengerjaan :

Kolom diisi dengan pelarut non polar seperti heksana kira-kira setengah dari tinggi kolom gelas.

- Ditimbang sebanyak 8 gram alumina dalam gelas piala sementara erlenmeyer 125 diisi 15 ml heksana. Dengan perlahan serbuk alumina ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk. Gunakan pipet pasteur untuk membuat bubur, kemudian dengan cepat bubur tersebut dipipet dan dimasukkan ke dalam kolom.

PENGEMASAN KOLOM CARA BASA

Tempatkan erlenmeyer di bawah kolom kemudian buka screw clamp dan biarkan pelarut mengalir.

Teruskan penambahan bubuk alumina sampai habis, jangan lupa penambahan pelarut heksana terus dilakukan dan pelarut heksan yang keluar dapat ditampung dan digunakan kembali untuk packing/menambah lagi alumina ke dalam kolom.

Jika packing sudah selesai, screw clamp ditutup, tinggi cairan minimal sma dengan tinggi alumina. Kadang-kadang pasir juga ditmbahkan pda puncak kolom untuk mencegah dari gangguan saat pelarut baru ditambahkan.

Pengemasan Kolom cara Kering

A. Cara Kering

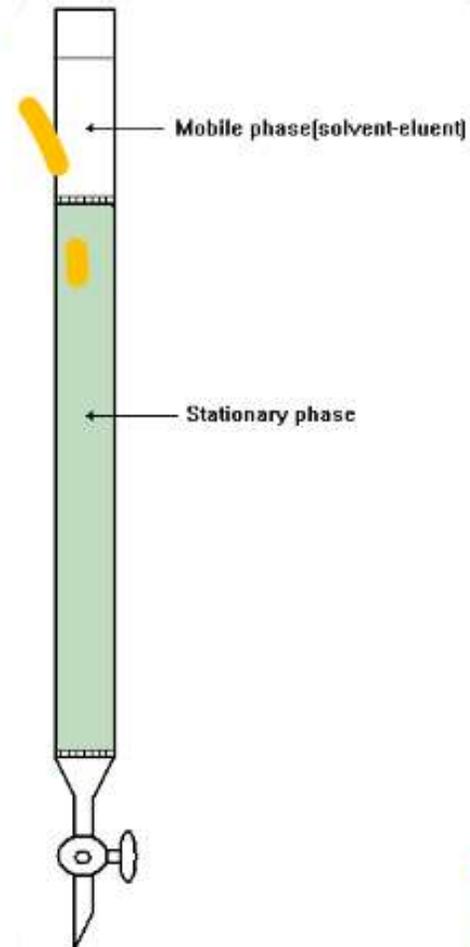
Metode ini lebih mudah tapi dapat menimbulkan adanya gelembung udara dalam kolom. Gelembung udara ini harus dihindari, karena akan mengurangi resolusi dari pemisahan.

Contoh pengerjaan :

1. Bagian dasar dari kolom diisi dengan glass woll secukupnya. Pinch clamp ditutup dan kolom diisi dengan pelarut.
2. Masukkan 8 gram alumina ke dalam kolom gelas yang berisi pelarut dan biarkan pelarut mengalir. Pinch clamp ditutup jika packing sudah selesai dan tinggi pelarut minimal sama dengan tinggi alumina. Demikian juga hindari agar kolom tidak kering.
3. Perbandingan antara volume total kolom (cair+padat) dengan diameter kolom yang optimal agar diperoleh pemisahan yang baik. Secara umum, hanya dapat dinyatakan bahwa kemasan kolom yang panjang akan memberikan tingkat pemisahan yang tinggi dan kolom yang lebar adalah baik untuk memisahkan komponen-komponen dalam jumlah besar.
4. Jenis fase diam yang digunakan adalah silika gel dan alumina.

Liquid column chromatography

- Fase diam yang berada di dalam kolom (tabung) berada dalam suatu tabung yang terbuat dari kaca atau polimer
- Dengan adanya aliran FG, maka gaya gravitasi akan bekerja bila kolom pada posisi tegak.
- Jika diperlukan tekanan positif dari atas atau perlu adanya vacuum dari bawah, maka kolom dapat pada posisi horizontal.
- Dinding yang bening akan membuat proses pemisahan dapat diamati secara visual Untuk senyawa bewarna) atau menggunakan sinar UV
-



Cara Penggunaan Kromatografi Kolom

1. Sampel yang dilarutkan dalam sedikit pelarut, dituangkan melalui atas kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam adsorben (bahan penyerap).
2. Komponen dalam sampel diadsorbsi dari larutan secara kuantitatif oleh bahan penyerap berupa pita sempit pada permukaan atas kolom.
3. Dengan penambahan pelarut secara terus menerus, masing-masing komponen akan bergerak turun melalui kolom dan akan terbentuk pita yang setiap zona berisi satu macam komponen.
4. Setiap zona yang keluar kolom dapat ditampung dengan sempurna sebelum zona yang lain keluar kolom.

Fasa Diam

Fasa diam atau *adsorben* (penjerap): berupa zat padat.

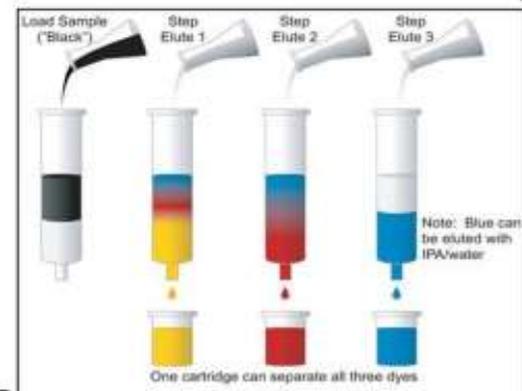
Fasa diam yang paling umum : silika gel (SiO_2), Alumina (Al_2O_3) , serbuk selulosa. Kromatografi kolom dapat juga menggunakan teknik kromatografi pertukaran ion, kromatografi fase terbalik, kromatografi pertukaran ion.

Fase Diam berbentuk :

- serbuk halus atau gel, mikropori untuk peningkatan luas permukaan.
- Perlu diperhitungkan rasio antara berat fasa diam dan berat kering campuran analit yang dapat diaplikasikan ke dalam kolom.
- Untuk kolom silika, rasio berada antara 20:1 hingga 100:1, bergantung pada kedekatan jarak elusi antar komponen analit.
- *Ukuran partikel fasa diam pada kromatografi kolom dipercepat biasanya lebih halus daripada kromatografi kolom gravitasi. Misalnya, silika gel untuk kromatografi dipercepat berukuran antara (40 – 63 μm), sementara untuk kromatografi gravitasi antara (63 – 200 μm)*

Fase Diam (Stationery Phase)

- Seperti TLC, alumina dan silika adalah dua fase stasioner paling populer di kromatografi Kolom.
- Secara umum tahap-tahap ini bekerja secara partisi.
- Sampel yang lebih polar akan dipertahankan pada fase diam lebih lama. Dengan demikian senyawa paling polar akan mengelusi dari kolom pertama, diikuti oleh masing-masing senyawa dalam rangka meningkatkan polaritas.



Fase Diam

- Meskipun interaksi antara fase mobile dan stasioner didasarkan pada hal yang sama.
- Prinsip untuk KK dan TLC, Karena arah dari aliran pelarut dalam TLC bergerak naik sedangkan dalam KK pelarut mengalir turun, tampak bahwa urutan adalah "terbalik".
- Dalam TLC molekul yang lebih polar akan memiliki nilai R_f yang lebih rendah tetapi dalam KK akan dipertahankan lebih lama di kolom.
- Dalam mempertimbangkan polaritas fase diam dan polaritas senyawa dipisahkan ketika proses elusi terjadi

Fase Diam

- Fase diam untuk CC terdiri dalam berbagai ukuran, aktivitas, dan variasi asam.
- Untuk alumina dan silika. Jenis fase diam yang dipilih ditentukan secara eksperimen, atau sering berdasarkan hasil dari percobaan TLC sebelumnya.
- Jenis adsorben, ukuran dari kolom, polaritas fase gerak serta laju elusi semua mempengaruhi pemisahan.
- Kondisi ini dapat dimanipulasi untuk mendapatkan pemisahan terbaik untuk senyawa campuran.

Ukuran Partikel Fase Diam

Diameter kolom (cm)	Silika gel (gram)	Sampel (gram)	Perbandingan sampel:silika gel	Tujuan KVC
14	150-170	10 - 20	1:7,5 - 1:17	Fraksinasi pertama
10	80	3 - 5	1:14 - 1:25	Fraksinasi kedua
7	40	1 - 2	1:20 - 1:40	Fraksinasi kedua atau pemurnian

Fase Gerak

- *Fasa gerak* atau *eluen* dapat berupa pelarut murni atau campuran pelarut. Pemilihan dilakukan sedemikian rupa sehingga nilai faktor retensi senyawa yang diinginkan berada pada kisaran 0,2 - 0,8 untuk meminimalkan waktu dan jumlah eluen yang diperlukan selama kromatografi.
- Eluen dapat dipilih berdasarkan daya pisahnya sehingga senyawa yang berbeda dapat dipisahkan secara efektif.
- Optimasi eluen dilakukan melalui uji pendahuluan berskala kecil, biasanya menggunakan lempeng KLT dengan fasa gerak yang sama namun ukuran yang diperkecil.

Fase Gerak

- Laju alir dapat dibuat optimum untuk masing-masing pemisahan.
- Semakin cepat laju alir eluen akan meminimalkan waktu yang dibutuhkan untuk melalui kolom sehingga meminimalkan difusi, menghasilkan pemisahan yang lebih baik. Namun, laju aliran maksimum perlu dibatasi karena analit memerlukan waktu tertentu untuk berada pada kesetimbangan antara fasa diam-fasa gerak,
- Kolom laboratorium sederhana bekerja dengan prinsip aliran grafitasi. Laju aliran kolom semacam ini dapat dinaikkan dengan menambah eluen baru di bagian atas fasa diam, atau diturunkan dengan mengatur keran di bagian bawah.
- Laju aliran yang lebih cepat dapat diperoleh dengan menggunakan pompa atau gas bertekanan (misalnya: udaranitrogen, atau argon) untuk menekan pelarut melalui kolom (kromatografi kolom kilat)



Fase Gerak berupa campuran dari dua atau lebih FG berikut:

- Polaritas pelarut yang dilewatkan melalui kolom mempengaruhi tingkat pemisahan di mana senyawa bergerak melalui kolom.
- Pelarut polar dapat lebih efektif digunakan untuk molekul polar campuran untuk fase diam polar pada permukaan adsorben dan juga akan lebih baik meloloskan konstituen polar.
- Akibatnya, pelarut yang sangat polar akan bergerak bersama molekul yang sangat polar dengan cepat melalui kolom. Jika pelarut terlalu polar, gerakan menjadi terlalu cepat, dan sedikit atau tidak ada pemisahan komponen campuran akan dihasilkan.

Fase Gerak berupa campuran dari dua atau lebih FG berikut:

- Jika pelarut tidak cukup polar, tidak ada senyawa yang akan terelusi dari kolom. Pilihan yang tepat dari jenis pelarut sangat penting untuk keberhasilan penerapan kromatografi kolom sebagai teknik pemisahan.
- Thin-Layer Chromatography (TLC) umumnya digunakan untuk menentukan sistem pemisahan kolom kromatografi. Seringkali serangkaian sistem pelarut semakin polar digunakan untuk mengelusi kolom. Pelarut yang kurang polar pertama kali digunakan untuk mengelusi senyawa yang kurang polar. Setelah senyawa yang kurang-polar berada di luar kolom, pelarut yang lebih-polar ditambahkan ke kolom untuk mengelusi senyawa yang lebih polar.

Solvent (Pelarut)

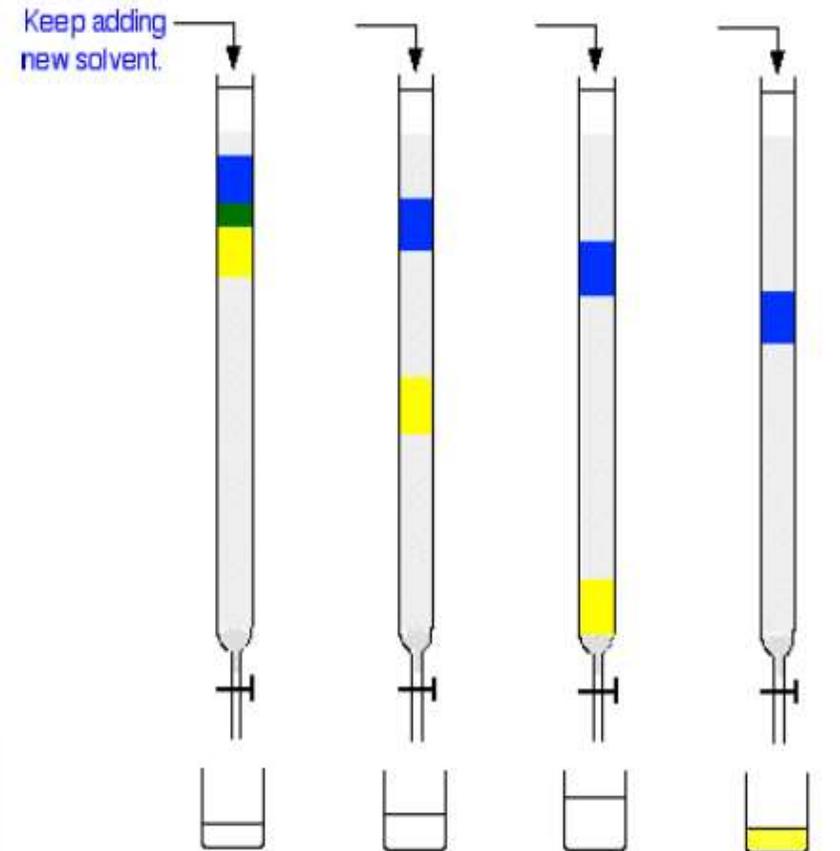
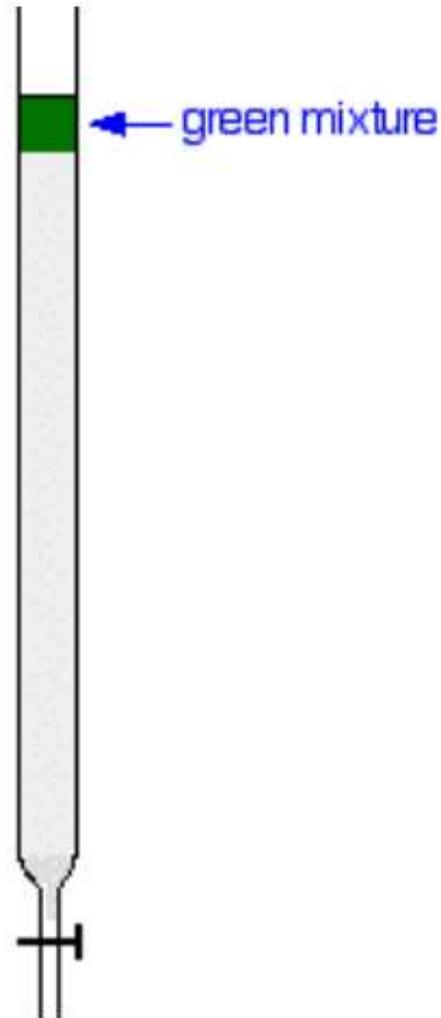
- Sistem pelarut untuk digunakan sebagai fase gerak dalam KK dapat ditentukan dari orintasi TLC sebelumnya.
- Menggunakan eksperimen, literatur, atau eksperimental.
- Pemisahan akan dimulai dengan menggunakan nonpolar atau pelarut polaritas rendah agar memungkinkan senyawa untuk menyerap ke fase diam.
- Polaritas pelarut harus diubah secara bertahap.
- Pada skala besar pencampuran dua pelarut dapat menyebabkan panas dan memecahkan kolom

- Beberapa kombinasi pelarut yang khas adalah ligroin-diklorometana, heksana-etil asetat dan hexane-toluene. Seringkali digunakan dan pelarut ini sangat baik dalam memisahkan sebagian besar senyawa.
- Pelarut seperti metanol dan air biasanya tidak digunakan karena mereka dapat merusak integritas fase diam dengan menyebabkan silika gel terlarut.

Cara Pemisahan

- Buat larutan jenuh dari campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai
- Buka kran penutup untuk membiarkan pelarut yang sudah berada dalam kolom mengering sehingga material terpadatkan rata pada bagian atas,
- Kemudian tambahkan larutan secara hati-hati dari bagian atas kolom. Lalu buka kran kembali sehingga campuran berwarna akan diserap pada bagian atas material terpadatkan, sehingga akan tampak seperti :

- Tambahkan pelarut baru melalui bagian atas kolom, cegah sedapat mungkin jangan sampai merusak material terpadatkan dalam kolom.
- Buka kran, supaya pelarut dapat mengalir melalui kolom, kumpulkan dalam satu gelas kimia atau labu dibawah kolom.
- Karena pelarut mengalir kontinyu, tetap tambahkan pelarut baru dari bagian atas kolom sehingga kolom tidak pernah kering.



Change the beaker once the yellow starts to drop through.



Proses Pemisahaan Dalam Kolom

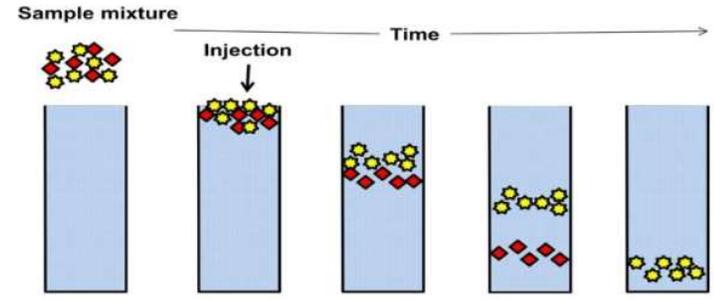


Figure 28.3: Separation of two molecules on a column.



Jenis Kromatografi Kolom

- Kromatografi Kolom Gravitasi
- Kromatografi Kolom Cair Vakum (KCV)
- Kromatografi Kolom Tekan (KKT)

**KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

***HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY (HPLC)***

SKEMA HPLC



Injektor

Kolom analitik

C₁₈

D

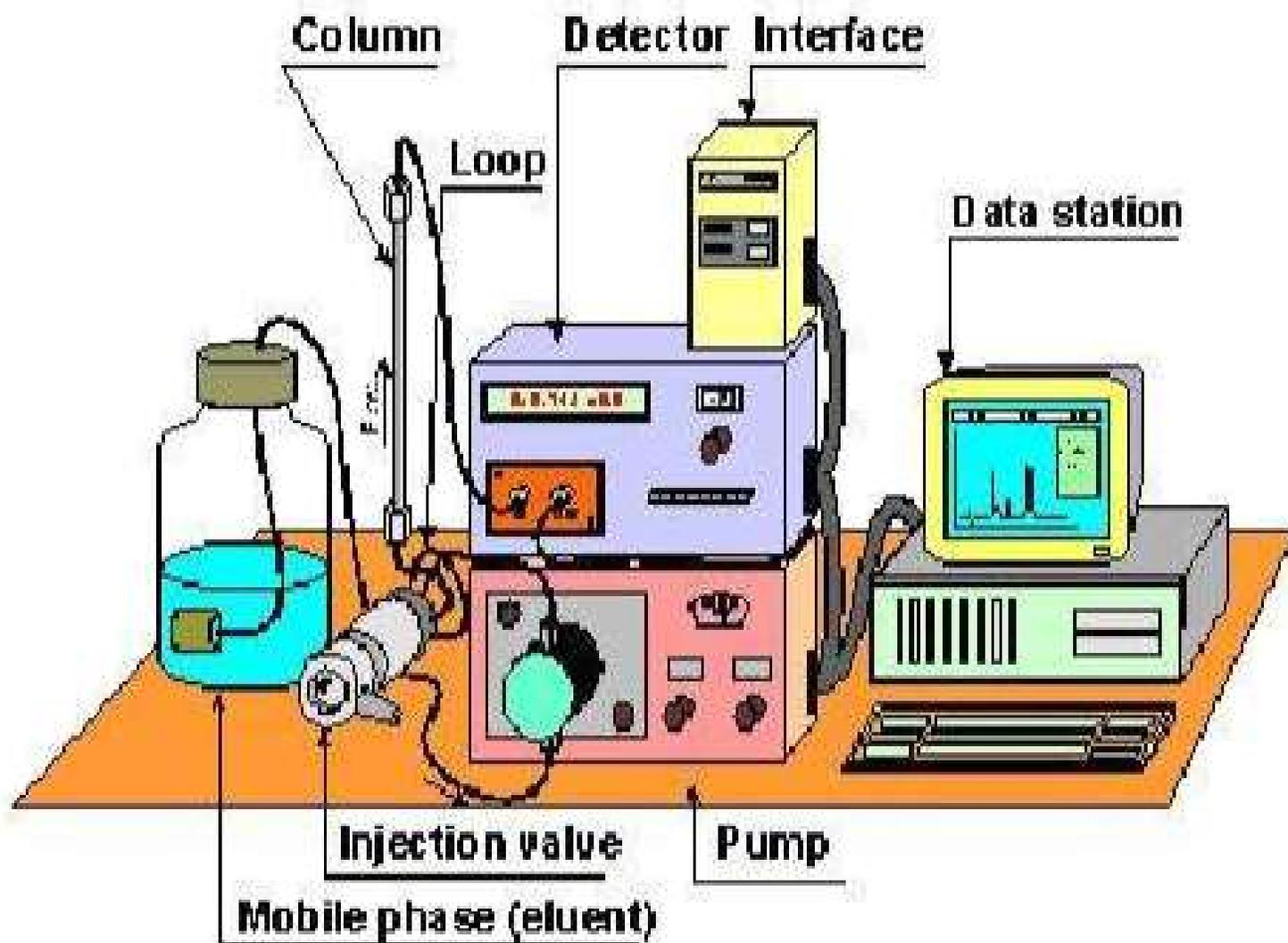
Ke penampungan

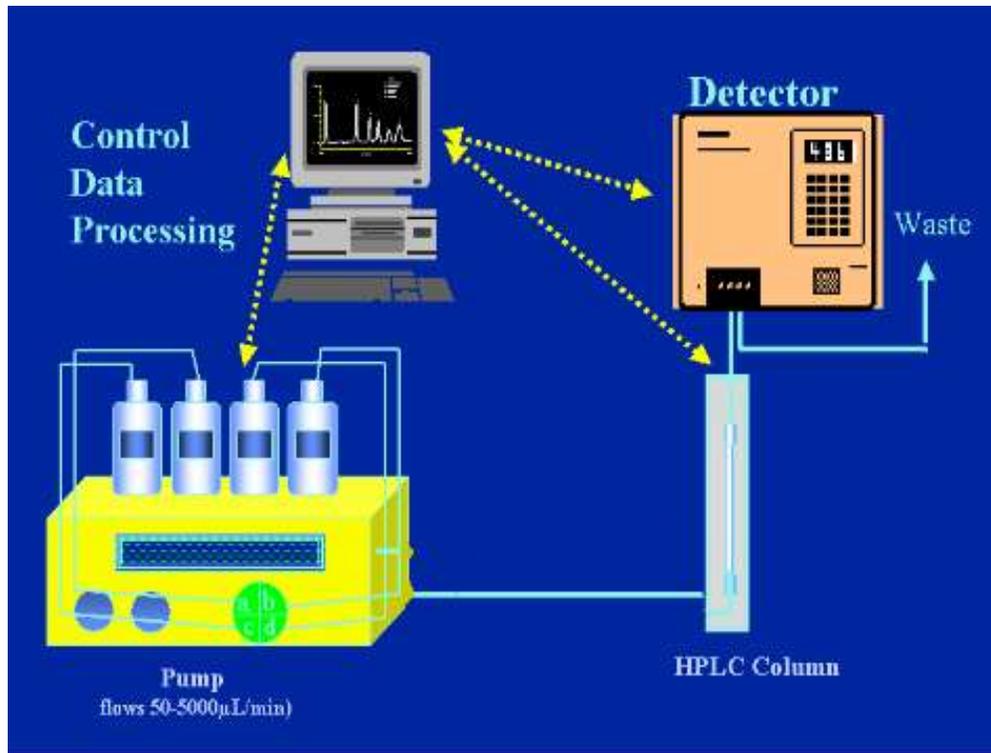
POMPA



Integrator







1. Reservoir Fase Gerak



Bisa lebih dari 1



dari gelas / stainless steel



Daya tampung 1- 2 L

Dilengkapi degasser (menghilangkan gas terlarut) → gas NO_2 & O_2 → membuat gelembung-gelembung di dalam kolom & detektor



- Pelebaran pita analit
- Respon detektor terganggu



- Degassing → pompa vakum dihubungkan reservoir & diaduk / dipanaskan
 - ◇ Solven disaring dengan kertas Millipore
 - ◇ Pemisahan dengan 1 jenis FG dengan konsentrasi konstan → Elusi Isokratik
 - ◇ Bila dengan 1 atau lebih FG yang polaritasnya berbeda → Elusi Gradien
 - ◇ Digunakan FG segar → mendapatkan hasil yang reproduibilitas optimum dalam pemisahan

5. Kolom Kromatografi

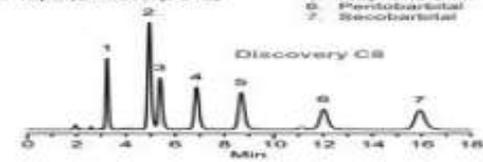
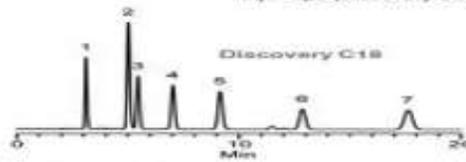
- ⊗ Bentuk tabung, permukaan dalam rata
- ⊗ Dari gelas / stainless steel
- ⊗ Lapisan luar kadang dilapisi logam → menahan tekanan ad 6000 psi, rx kimia dari FG
- ⊗ Sambungan kolom → tidak menyebabkan FG stagnant
- ⊗ Panjang kolom (10 – 30) cm
- ⊗ Analisis pemisahan cepat (3 – 8) cm
- ⊗ Internal diameter (4 – 5)mm
- ⊗ Partikel diameter (3 – 5) μm
- ⊗ Guard kolom → sebelum kolom analitik



Barbiturates

Column: 15cm x 4.6mm columns, 5µm particles
 Mobile Phase: 55:45 Water-MeOH
 Flow Rate: 1.0ml/min
 Det.: UV at 214nm
 Temp.: ambient
 Inj.: 5µL (Discovery CE) or 10µL (Discovery C18)

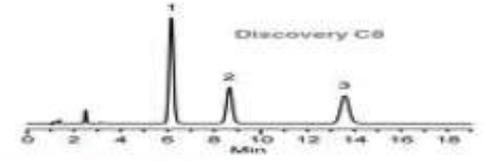
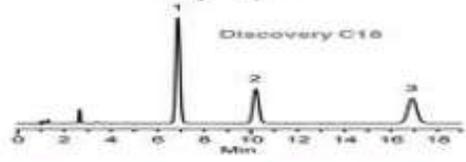
Sample: 1µg/mL of each
 1. Barbitol
 2. Aprobarbital
 3. Phenobarbital
 4. Butobarbital
 5. Mesopropobarbital
 6. Pentobarbital
 7. Secobarbital



Anticonvulsants

Column: 15cm x 4.6mm columns, 5µm particles
 Mobile Phase: 70:30 Water-CH₃CN
 Flow Rate: 2.0ml/min
 Det.: UV at 254nm
 Temp.: 20°C
 Inj.: 10µL

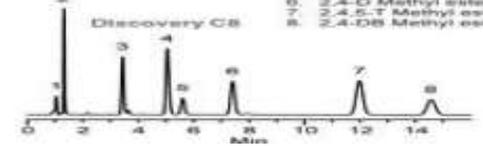
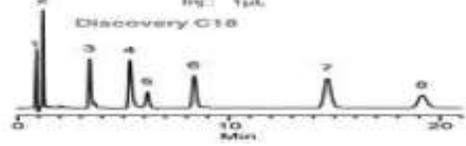
Sample: 1. Clonazepam
 2. Clorazepate
 3. Diazepam



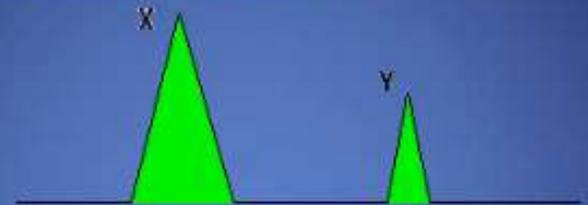
Athanoic / Aryloxyethanoic Acid Using Isocratic Elution

Column: 15cm x 4.6mm columns, 5µm particles
 Mobile Phase: 60:40 25mM Potassium Phosphate (pH 2.5):CH₃CN
 Flow Rate: 2.0ml/min
 Det.: UV at 214nm
 Temp.: 20°C
 Inj.: 1µL

Sample: 1. Solvent
 2. Dalapon
 3. 2,4-D
 4. 2,4-DG
 5. 2,4,5-T
 6. 2,4,5-T Methyl ester
 7. 2,4,5-T Methyl ester
 8. 2,4-DG Methyl ester



Profil kromatogram



Dalam gambar, area di bawah puncak Y < dibanding dengan area dibawah puncak X. Hal ini mungkin disebabkan :

- a. Karena Y lebih sedikit dari X
- b. Y mengabsorpsi sinar UV pada panjang gelombang lebih sedikit dibanding dengan X.

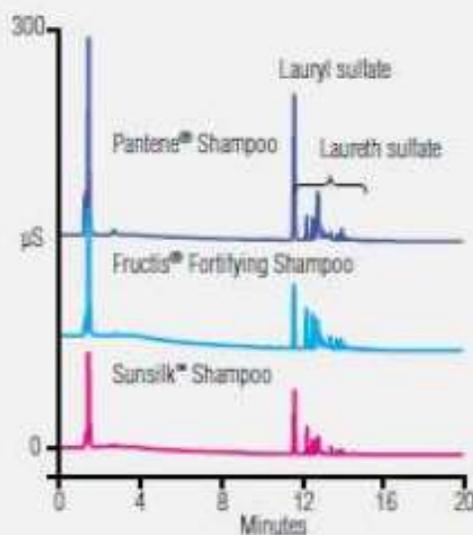
Fase Balik/Reverse Phase HPLC

Silika dimodifikasi menjadi non polar berupa atom karbon 8 atau 18. Sebagai contoh, pelarut polar digunakan berupa campuran air dan alkohol seperti metanol.

Senyawa-senyawa non polar dalam campuran akan bereaksi dengan gugus hidrokarbon karena adanya dispersi gaya van der Waals. Molekul-molekul polar akan bergerak lebih cepat melalui kolom.

Fase balik HPLC adalah bentuk yang biasa digunakan dalam HPLC.

Hasil Analisis dengan menggunakan HPLC



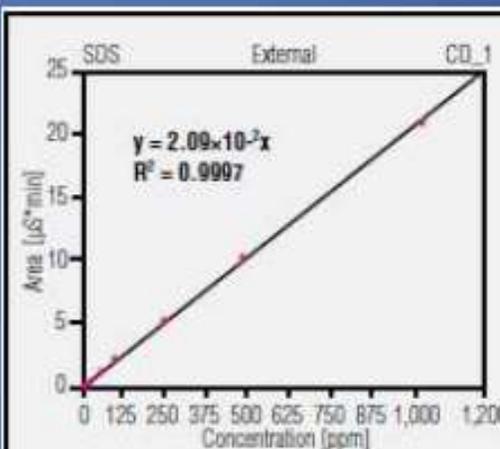
Column: Acclaim PA2, 5 µm
 Dimensions: 4.6 × 150 mm
 Mobile Phase: (A) Acetonitrile
 (B) Borate buffer (6.2 g boric acid in DI water, adjust to pH 8.3 with 50% NaOH aqueous solution)

Gradient:	Time (min)	A	B
	-12	0	100
	0	0	100
	15	70	30
	20	70	30

Temperature: 30 °C
 Flow Rate: 1 mL/min
 Inj. Volume: 10 µL
 Instrument: ICS-3000 Chromatographic System
 Detection: Suppressed conductivity (AMMS III 4 mm suppressor, chemical mode at 1.5 mL/min with 30 mN sulfuric acid)

Sample: A shampoo sample suspended in H₂O and alcohol (50:50 w/v), sonicated for 60 min, then filtered through a 0.45-µm membrane filter.

24249



Column: Acclaim PA2, 5 µm
 Dimensions: 4.6 × 150 mm
 Mobile Phase: Acetonitrile/Borate buffer (6.2 g boric acid in DI water, adjust to pH 8.3 with 50% NaOH aqueous solution) v/v 40/60

Temperature: 30 °C
 Flow Rate: 1 mL/min
 Inj. Volume: 25 µL
 Instrument: ICS-3000 Chromatographic System
 Detection: Suppressed conductivity (AMMS III 4 mm suppressor, chemical mode at 1.5 mL/min with 20 mN sulfuric acid)

Sample: Dodecyl sulfate (0.09 to 1000 ppm)

24245

Figure 7. Linearity under isocratic conditions. Dynamic range — 0.1 to 1000 ppm.

TUGAS TELAHAH JURNAL TERKAIT INSTRUMENTASI KIMIA.

Tugas telaah jurnal:

Dibuat 10 kelompok (sudah disusun seperti pada kelompok semester 2 kimia analisis), masing2 kelompok menelaah jurnal yang berkaitan dengan penggunaan instrumentasi kimia (spektrofotometri UV-Vis, Spectrofluorometri, FTIR, HPLC, GC, elektroforesis, dan pemisahan menggunakan kolom kromatografi atau KLT). Jurnal sudah tersedia dan sudah dibagi per kelompok.

Dikumpulkan pada pertemuan ke-15 (kuliah terakhir).

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS



KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KROMATOGRAFI KOLOM TERBUKA)

PADA KROMATOGRAFI LAPISAN TIPIS, TERDAPAT LAPISAN TIPIS (TEBAL 0.1-2 MM) YANG TERDIRI ATAS BAHAN PADAT YANG DILAPISKAN KEPADA PERMUKAAN PENYANGGA DATAR (PLAT), YANG BIASANYA TERBUAT DARI KACA, TETAPI DAPAT PULA TERBUAT DARI PLAT POLIMER (PLASTIK) ATAU LOGAM

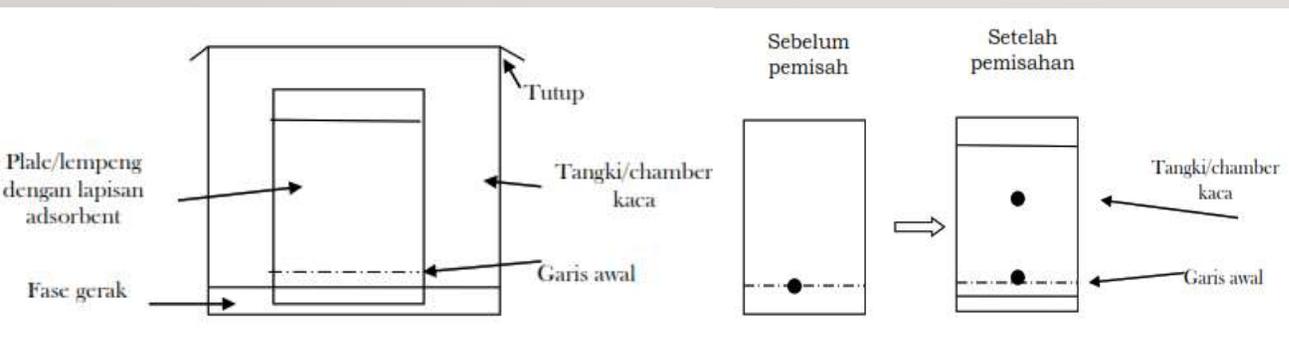
DIKEMBANGKAN TAHUN 1938 OLEH ISMAILOFF DAN SCHRAIBER

PRINSIP

- Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi **planar**, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. KLT merupakan metode pemisahan campuran analit dengan mengelusi analit melalui suatu **lempeng kromatografi** lalu melihat komponen/analit yang terpisah dengan penyemprotan atau pengecatan
- Pada proses pemisahan dengan kromatografi lapis tipis, terjadi hubungan kesetimbangan antara fase diam dan fasa gerak, dimana ada interaksi antara permukaan fase diam dengan gugus fungsi senyawa organik yang akan diidentifikasi yang telah berinteraksi dengan fasa geraknya
- Kesetimbangan ini dipengaruhi oleh 3 faktor, yaitu : **kepolaran fase diam, kepolaran fase gerak, serta kepolaran dan ukuran molekul.**

APA BEDANYA DENGAN KROMATOGRAFI KERTAS?

- Pada dasarnya kromatografi lapis tipis (KLT atau TLC = Thin layer Chromatography) sangat mirip dengan kromatografi kertas, terutama pada cara melakukannya. Perbedaan nyata terlihat pada media pemisahannya, yakni digunakan **lapisan tipis adsorben halus** yang tersangga pada papan kaca, aluminium atau plastic sebagai pengganti kertas. Lapisan tipis adsorben ini pada proses pemisahan berlaku sebagai fasa diam.



APA KELEBIHAN DAN KEKURANGANNYA DIBANDING KROMATOGRAFI KERTAS?



FAKTOR FAKTOR YANG MEMENGARUHI GERAKAN MEDIA DALAM KLT

- **Struktur kimia dan senyawa** yang dipisahkan
- Sifat dari penyerap dan **derajat aktifitasnya**
- **Suhu dan kesetimbangan**
- **Pelarut dan derajat kemurnian** fase bergerak
- **Derajat kejenuhan**

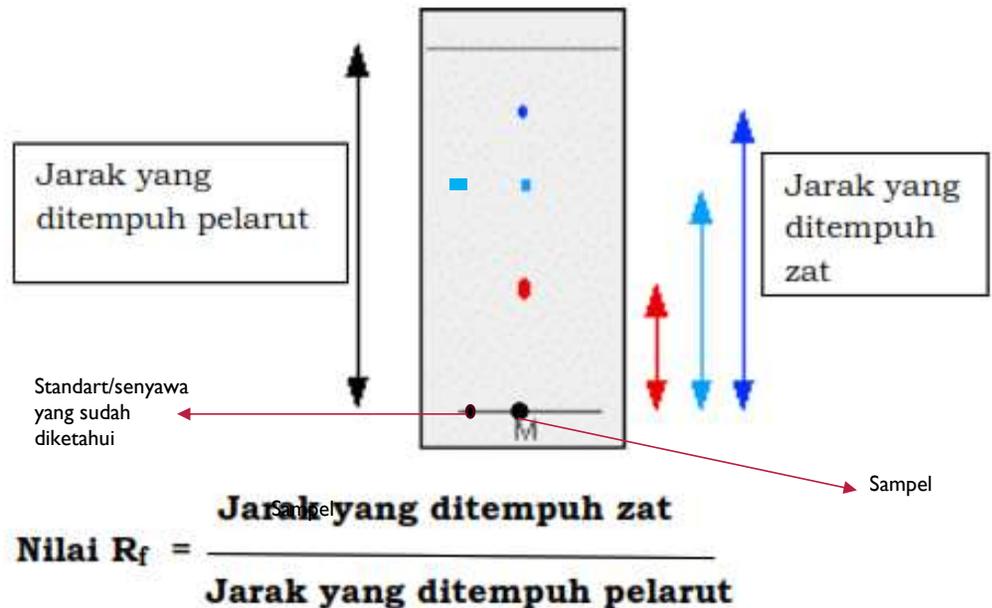
Waktu Faktor Retardasi (RF)

Faktor retardasi (Retardation faktor= R_f) merupakan faktor yang digunakan untuk dapat menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT. Nilai R_f menyatakan posisi noda pada fase diam setelah mengalami elusi

Pada KLT, identifikasi senyawa dapat dilakukan dengan menghitung harga R_f (**R_f pembanding vs R_f sampel**). Faktor retardasi didefinisikan sebagai fraksi analit dalam fase gerak suatu sistem kromatografi. Pada kromatografi planar, R_f didefinisikan sebagai rasio jarak yang ditempuh noda terhadap jarak yang ditempuh pelarut.

Harga R_f dipengaruhi oleh :

1. **Struktur kimia** dari senyawa yang sedang dipisahkan
2. **Sifat penyerap dan derajat aktivitasnya**
3. **Tebal dan kerataan** dari lapisan penyerap
4. **Pelarut** (dan derajat kemurniannya) fasa bergerak
5. **Derajat kejenuhan** dalam uap
6. **Suhu**
7. **Kesetimbangan**



KUIS

Kode Komponen	Jarak Komponen
IBU	13 cm
CAF	5 cm
PAR	10 cm
ASP	14 cm
X1	5 cm
X2	10 cm

Perhatikan data hasil pemisahan komponen obat menggunakan kromatoplat **sepanjang 17 cm yang dibatas 1 cm pada kedua ujungnya** sebagai tanda untuk penotolan sampel dan batas pelarut pada tabel di atas!

Nilai Rf yang tepat berdasarkan data tersebut adalah ...

- a. Rf X1 0,33 dan Rf X2 0,67
- b. Rf X1 0,38 dan Rf X2 0,77
- c. Rf X1 0,36 dan Rf X2 0,71
- d. Rf X1 0,31 dan Rf X2 0,63
- e. Rf X1 0,29 dan Rf X2 0,59





Perhatikan gambar berikut;

Keterangan (dari kiri ke kanan)

*IBU : Baku **ibuprofen** 100ppm*

*CAF : Baku **kafein** 100ppm*

U : Sampel Obat Sakit Kepala

*PAR : Baku **parasetamol** 100ppm*

*ASP : Baku **aspirin** 100ppm*

Pernyataan yang tepat berkaitan dengan gambar tersebut adalah

- Sampel mengandung parasetamol dan kafein dalam jumlah sama
- Sampel sama sekali tidak mengandung ibuprofen dan aspirin
- Sampel mengandung parasetamol dan kafein dalam jumlah berbeda
- Sampel mengandung parasetamol sebanyak 100 ppm
- Sampel mengandung kafein sebanyak 100 ppm

SYARAT PLAT KLT

Syarat plat yang baik:

- Harus bersifat inert
- Terbuat dari kaca, aluminium, dan plastik
- Pemilihan berdasarkan temperatur operasi
- dan jenis pelarut

Fasa Diam (adsorben/lapisan penyerap)

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penyerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya.

Fase diam yang biasa digunakan

- Silika gel
- Alumina
- Magnesium Trisilikat
- Kalsium Sulfat (K_2SO_4)
- Kieselghur
- Selulosa

Sifat-sifat dasar beberapa adsorben untuk TLC

Adsorben	Keasaman	Aktivitas	Efek Pemisahan	Senyawa Yang Dapat Dipisahkan
Silika gel	Asam	Aktif	Adsorbsi + Partisi	Hampir semua zat
Alumina	Basis	Aktif	Adsorbsi + Partisi	Steroid, senyawa bersifat basis
Magnesium Trisilikat	-	Lemah	Adsorbsi	Karetonoid, toko ferol
Kalsium Sulfat (K_2SO_4)	-	Lemah	Adsorbsi	Asam lemak, gliserida
Kieselghur	Netral	Inaktif	Partisi	Gula, farmasetika

BAGAIMANA MEMBUAT FASE DIAM?

- ❑ PENYERAP DITUANGKAN DIATAS PERMUKAAN PLAT YANG KONDISI BENTUKNYA BAIK, BIASANYA DIGUNAKAN PLAT KACA / ALUMINIUM.
- ❑ UKURAN YANG DIGUNAKAN TERGANTUNG PADA JENIS DARI PEMISAHAN YANG AKAN DILAKUKAN DAN JENIS DARI BEJANA KROMATOGRAFI. SERINGKALI BENTUK PLAT KACA / ALUMINIUM DIJUAL DENGAN UKURAN 20 X 5 CM ATAU 20 X 20 CM, DUA UKURAN INI DIANGGAP SEBAGAI “STANDARD”.

- ❑ HAL YANG PENTING PENTING YAITU BAHWA PERMUKAAN DARI PLAT HARUS RATA.
- ❑ PLAT -PLAT KACA / ALUMINIUM SEBELUM DIPAKAI DICUCI TERLEBIH DAHULU DENGAN AIR DAN DETERGENT KEMUDIAN DIKERINGKAN. TERAKHIR, DAPAT DICUCI DENGAN ASETON, TETAPI HAL INI TIDAK MESTI DILAKUKAN
- ❑ SATU HAL YANG PERLU DIPERHATIKAN JANGAN MENYENTUH PERMUKAAN DARI PLAT YANG BERSIH DENGAN JARI TANGAN KARENA BEKAS JARI TANGAN YANG MENEMPEL AKAN MERUBAH TEBAL DARI PERMUKAAN PENYERAP PADA PLAT.

DO YOU KNOW HOW TO MAKE AN ADSORBER?

- ❖ bahan penyerap dicampur dengan air sampai menjadi bubur, biasanya dengan perbandingan x gram penyerap dan 2x ml air.
- ❖ Bubur diaduk sampai rata dan dituangkan diatas plat dengan berbagai cara.
- ❖ Tebal lapisan merupakan faktor yang paling penting dalam kromatografi lapisan tipis. Tebal standard adalah 250 micron (250×10^{-6} meter)
- ❖ Lapisan-lapisan yang lebih tebal (0.5 - 2.0 mm) digunakan untuk pemisahan-pemisahan yang sifatnya besar, dengan menggunakan penyerap hingga 250 mg untuk plat dengan ukuran 20 x 20 cm.
- ❖ Kalau lebih tebal dapat mengelupas.

[See Video](#)

GAMBAR PLAT PENDUKUNG

Plat Kertas



Plat kaca



MUDAH BUKAN MEMBUATNYA?

DI BAWAH INI SUDAH ADA YANG SIAP PAKAI

Penyerap	Medium bubur penyerap	Perbandingan, gram dalam ml
Silika gel	Metilena klorida : methanol (2:2, v/v)	35 gr dalam 100 ml
Serbuk selulosa	Metilena klorida : methanol (50:50, v/v)	50 gr dalam 100 ml
Alumina	Metilena klorida : methanol (70:30, v/v)	60 gr dalam 100 ml

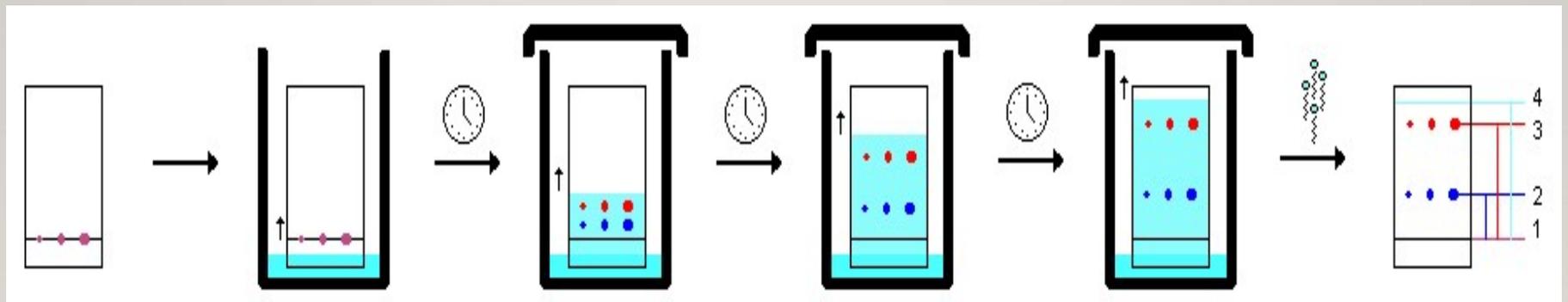
BERIKUT INI DAFTAR DAFTAR SENYAWA BESERTA FASE DIAM YANG COCOK UNTUK PEMISAHAN

Zat padat	Digunakan untuk memisahkan
Silika	Asam- asam amino, alkaloid, gula, asam-asam lemak, lipida, minyak esensial, anion, dan kation organik, sterol, terpenoid.
Alumina	Alkaloid, zat warna, fenol, steroid, vitamin-vitamin, karoten, asam-asam amino
Kieselguhr	Gula, oligosakarida, asam- asam lemak, trigliserida, asam -asam amino, steroid.
Bubuk selulosa	Asam-asam amino, alkaloid, nukleotida
Pati	Asam-asam amino
Sephadex	Asam-asam amino, protein

MEKANISME PEMISAHAN

- ❖ Potong plat sesuai ukuran. Biasanya untuk satu spot menggunakan plat selebar 1 cm.
- ❖ Buat garis dasar (base line) di bagian bawah, sekitar 0,5 cm dari ujung bawah plat, dan garis akhir di bagian atas.
- ❖ Bubuhkan zat yang akan dipisahkan tepat di atas base line. (jika zat itu padat, larutkan dulu ya!)
- ❖ Siapkan fase bergerak dalam wadah (gunakan chamber!)
- ❖ Tempatkan plat pada chamber berisi eluen. Base line jangan sampai tercelup oleh eluen.
- ❖ Chamber jangan lupa ditutup ya!
- ❖ Tunggu eluen sampai bermigrasi sampai mencapai garis akhir! Dari sini telah tampak pemisahan yang terjadi
- ❖ Setelah eluen mencapai garis akhir, angkat plat dengan pinset,
- ❖ Keringkan dan ukur jarak spot. (kalau spot tidak kelihatan, semprot dengan pewarna tertentu!)

GAMBARAN SINGKAT MEKANISME PEMISAHAN



See video

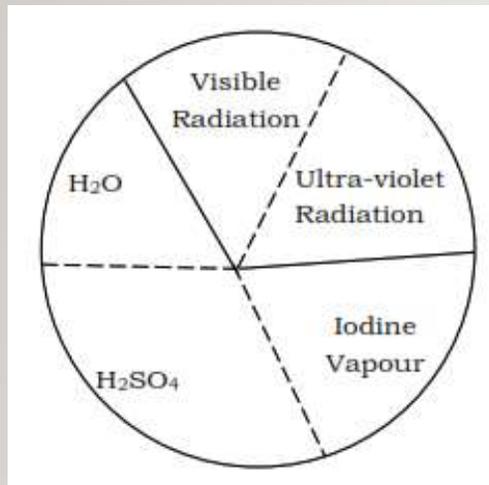
FASE GERAK

- Petroleum eter
- Petroleum dietileter
- Metanol
- Etil asetat
- Kloroform CHCl_3 / 119,38
- Asetonitril
- Benzena C_6H_6 / 78,11
- Karbon tetraklorida CCl_4 / 153,82

Bagaimana mendapatkan komposisi fase gerak (eluen) yang baik untuk KLT????

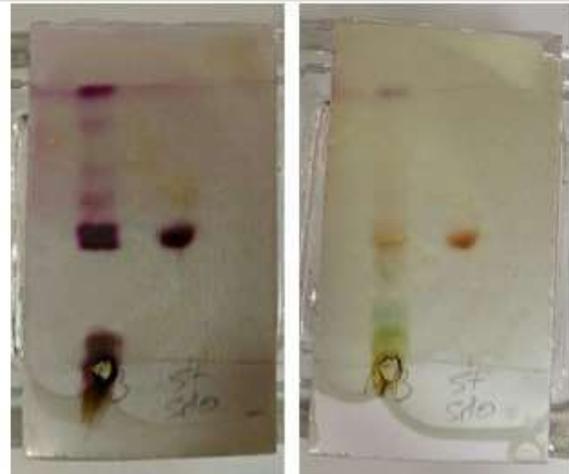
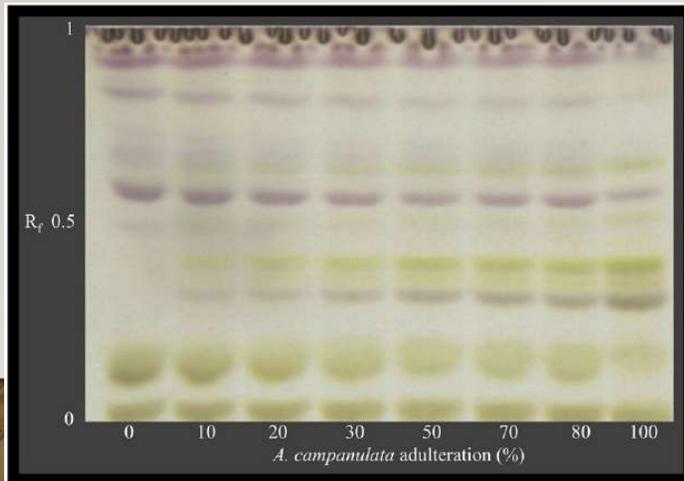
1. Cari di pustaka (jika ada)
2. Jika tidak ada, cari yang sifatnya mirip
3. Jika tidak ada yang mirip lakukan percobaan
 - a. Lakukan eluasi dengan fase gerak paling non polar
 - b. Lakukan kenaikan kepolaran secara gradien
 - c. Evaluasi hasil, dan tentukan komposisi yang paling baik

PEWARNAAN/VISUALISASI BERCAK (SPOT) KLT



Visualisasi :

- Non destruktif (UV, uap iodine)
- Destruktif (H₂SO₄, kalium dikromat 5% dalam asam sulfat 40%.)



TLC plate of hexane extract sprayed with vanillin-sulphuric acid reagen

Agen-agen visualisasi destruktif

Sampel	Pelarut (Reagen)	Prosedur	Hasil
Alcohol	Ammonium Cerik Nitrat	Larutkan reagen (6 g) dalam 100 cm ³ HNO ₃ 4 M Keringkan plat selama 5 min pada suhu 105 °C. dinginkan sebelum penyemprotan	Poli alcohol menunjukkan spot berwarna coklat pada dasar kuning
Alcohol (asam empedu dan steroid)	Vanilin Asam Sulfat	Larutkan 3 g vanillin dalam 100 cm ³ ethanol. Tambahkan 0,5 cm ³ asam sulfat kons, dikocok dengan stirrer. Semprotkan dan panaskan pada suhu 120 °C	Alcohol yang lebih tinggi dan keton memberikan warna spot biru-hijau
Aldehyd dan keton	2,4/dinitro-phenylhydrazine	Larutkan 0,4 g reagent dalam 100 cm ³ HCL 2 M	Spot kuning/merah
Alkaloid	Kobalt (II) thiosianat	Larutkan 3g ammonium thiosianat dan 1 g kobalt (II) klorida di dalam 20 cm ³ air	Spot biru pada dasar putih/pink
Alkalodi (Antihistamin, siklohexylamin, lactam)	Dragendorff (modif. Munir) Modifikasi	Larutkan 1,7g bismuth subnitrat dan 20g asam tartaric dalam 80 cm ³ air – Larutan (a) Larutkan 16g kalium iodide didalam 40 cm ³ air-lar. (b). semprotkan reagen yang disiapkan oleh campuran lar. (a) dan lar (b) dengan volume sama. Ambil 5ml dari larutan ini dan campur dengan larutan dari 10 g asam tartaric dalam 50 cm ³ air.	Macam-macam warna
Asam amino (juga kelompok amina)	Ninhydrin	Larutkan 0,20g ninhidrin dalam 100 cm ³ butan-1-ol- Larutan (a) Larutan asam asetat akuatik 10%- Larutan (b). semprotkan campuran larutan (a) dan (b) (95:5). Panaskan	Spot pink-merah pada latar belakang putih

Amina	Alizarin	pada suhu 100 °C Larutkan 0,10g alizarin dalam 100 cm ³ ethanol	Alipatik amina dan amino alcohol memberikan spot ungu pada latar belakang kuning pucat
Barbiturat	s-Diphenylkarbazon	Larutkan 0,10g s-diphenylkarbazin dalam 100 cm ³ ethanol 95%	Spot ungu
Karbohidrat	p-anisaldehyd	Larutkan 1 cm ³ p-anisaldehyd dan 1 cm ³ H ₂ SO ₄ kons. Dalam 18 cm ³ ethanol. Semprot dan panaskan pada suhu 110 °C.	Gula phenylhidrazon memberikan warna spot hijau-kuning
Asam –asam karboksilat	p-anisidin-asam ptalat	Larutkan 1,23 g p-anisidin dan 1,66g asam ptalat dalam 100 cm ³ methanol	Aldoheksosa hijau, pentose merah-ungu, methylpentosa kuning/hijau, asam uronat coklat
Ester dan amida	Bromocresol hijau	Larutkan 0,04g reagent dalam 100 cm ³ ethanol. Tambahkan NaOH 1M hingga muncul warna biru	Spot kuning pada latar belakang hijau
Lemak	Hydroxylami/Besi nitrat	Larutkan 1g hydroksilamin hidroklorid dalam 9 cm ³ air –lar. (a). larutkan 2g natrium hidroksida dalam 8 cm ³ air-Lar.(b). Larutkan 4g besi nitrat dalam 60 cm ³ air dan 40 cm ³ asam asetat – Lar. (c). semprot dengan campuran satu volume lar. (a) dan satu volume lar.(b). keringkan pada suhu 110 °C selama 10 min. semprot dengan campuran 45 1 cm ³ larutan (c) dan 61 cm ³ HCL kons.	Spot berwarna

Lemak	Rhodamin B	Larutkan 0,05g rhodamin B dalam ethanol-Lar (a) Hydrogen peroksida 3% -Lar. (b) KOH 10 M-Lar.(C). semprot plat dengan larutan (A). amati dengan mata langsung dan dengan pengamatan radiasu UV. Semprot dengan lar. (C) untuk memperjelas warna	Fluorescens merah cerah Trigliserida menghasilkan spot putih cerah pada latar belakang pink-merah
Phospolipid	Rhodamin B	Semprot deng lar. (a) dan kemudian dengan lar. (c).	Phospolipid mengandung cholin memberikan warna oranye
Pestisida	Dragendorff's reagent	Larutan bismuth nitrat 17% dalam asam asetat akuatis 20%-lar.(s). kalium iodide aquatic 40%-lar.(b). Air - lar. (c). semprot dengan lar (a): (b) (c) : 4: 1: 14.	Pestisida berklor memberikan bermacam warna
Phenol	Diphenylamine:zinc	Larut 0,5g diphenylamine dan 0,5g zinc klorida dalam aseton 100 cm ³ . semprot dan panaskan pada 200 °C selama 5 menit .	Organoposfat dan triyain memberikan warna spot hijau
Steroid	Brilliant hijau	Larutkan 0,5g brilliant hijau dalam 100 cm ³ propanon. Semprot dan plat diekspos pada uap bromine.	Spot bermacam-macam warna pada latar belakang pink
	Ammonium vanadat: anisidin	Jenuhkan air dengan ammonium vanadat-lar. (a). Larutkan 0,5g p-anisidin dalam 2 cm ³ H ₃ PO ₄ kons., encerkan dengan 100 cm ³ ethanol kemudian saring-lar. (b). semprot dengan lar. (a), sementara plat masih basah, semprot dengan lar. (b). panaskan pada suhu 80 °C .	Bermacam-macam warna

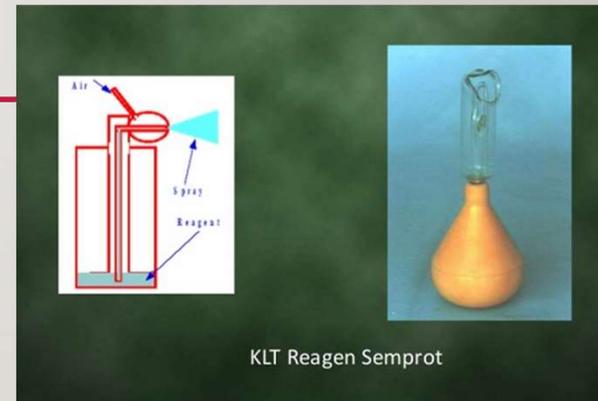
PENAMPAK BERCAK KIMIA

BERDASARKAN SIFATNYA

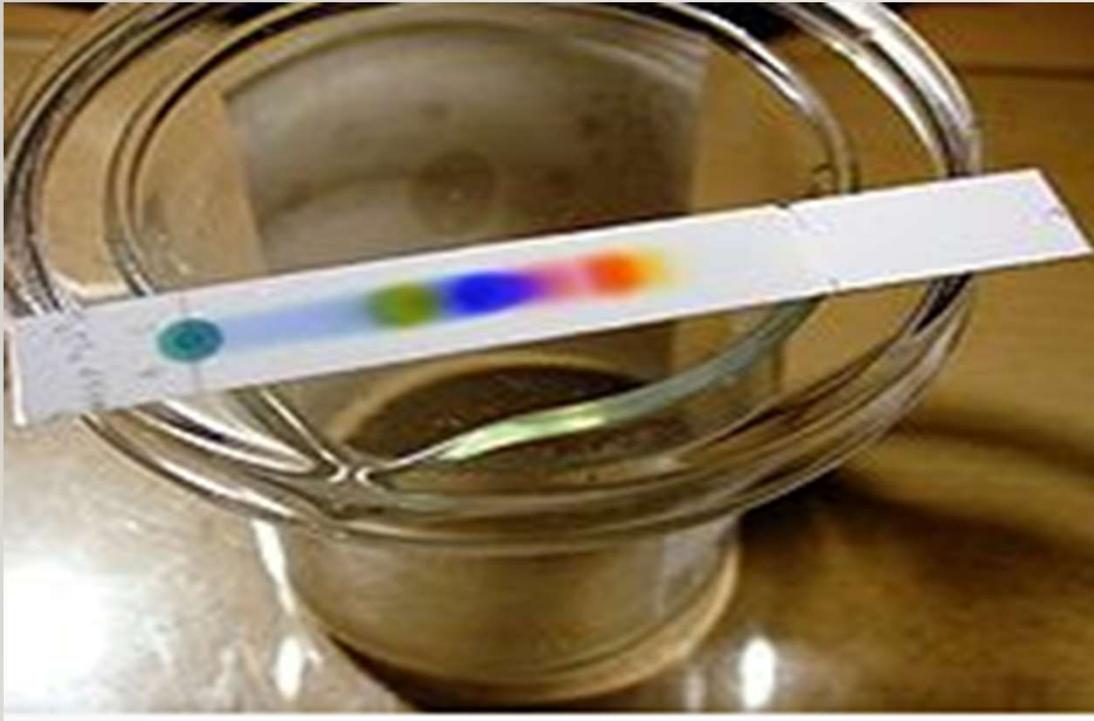
- PERMANEN : ASAM SULFAT PEKAT DAN NINHIDRIN
- SEMENTARA : UAP IODIUM

BERDASARKAN SPESIFIKASINYA

- SPESIFIK : NINHIDRIN UNTUK ZAT DENGAN ATOM N (PROTEIN, ALKALOID, DLL)
- UMUM : UAP IODIUM, ASAM SULFAT PEKAT (HAMPIR SEMUA ZA

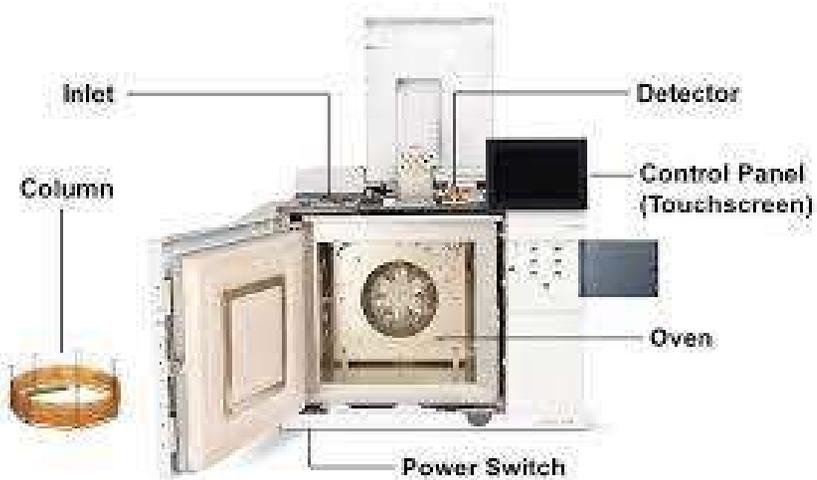
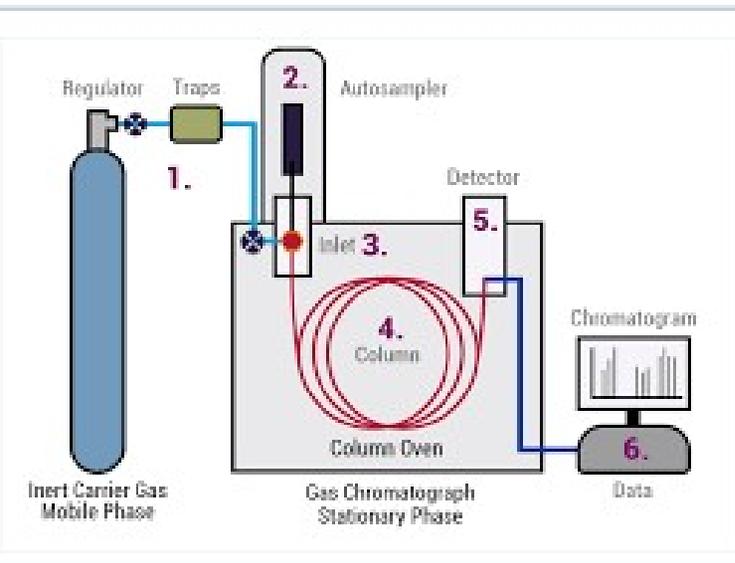


INI SALAH SATU CONTOH KROMATOGRAM KROMATOGRAFI



SELAMAT BELAJAR

KROMATOGRAFI GAS



- Merupakan metode yg dinamis untuk pemisahaan dan deteksi untuk **senyawa yg mudah menguap** (volatile) dalam suatu campuran.
- Telah banyak digunakan dlm bidang industri, lingkungan, farmasi, **minyak**, kimia klinik, forensik, makanan dll.
- Untuk pemisahaan dinamis dan identifikasi semua jenis senyawa organik yg **mudah menguap**.
- Analisis **kualitatif dan kuantitatif senyawa** dalam suatu campuran.
- Bersifat **desktrusif dan non destruktif** tergantung detektor yg digunakan.
- Untuk analisis sampel padat, cair dan gas, dimana untuk **sampel padat harus dilarutkan sebelum diinjeksikan** (syringe).

Prinsip Kromatografi Gas



- Pemisahaan solut yg mudah menguap (volatile)
- Solute stabil terhadap panas.
- Solute bermigrasi melalui kolom (fase diam) tergantung dr kecepatan distribusi.
- Solut akan terelusi karena ada peningkatan titik didih di kolom, kecuali ada interaksi antara solut dan fase diam.
- Fase gerak berupa gas akan mengelusi solut dr ujung kolom sampai kedetektor.
- Suhu yang digunakan kisaran $50 - 350^{\circ}\text{C}$

Jenis Kromatografi Gas



- **Kromatografi gas-cair (KGC)**

Fase diam yg digunakan : cairan yg diikatkan pd suatu bahan sehingga solut akan terlarut dlm fase diam

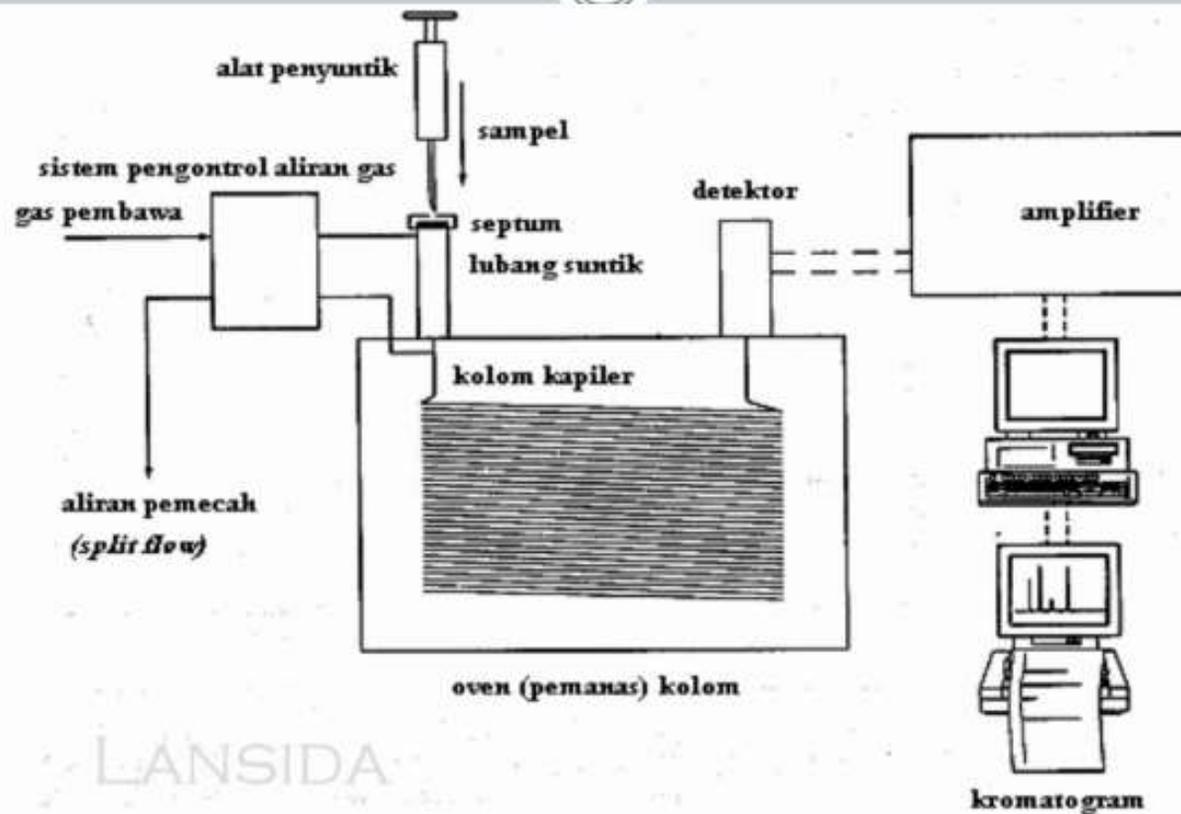
Mekanisme : partisi

- **Kromatografi gas-padat (KGP)**

Fase diam padatan (kadang2 polimerik).

Mekanismenya adsorpsi.

Sistem Kromatografi Gas



LANSIDA

Fase Gerak



- Fase gerak = gas pembawa
- Fase gerak tidak berpengaruh pada selektifitas
- Bersifat tdk reaktif, murni/kering (detektor error), dpt disimpan dlm tangki tekanan tinggi (hidrogen : merah dan nitrogen: abu2)
- Gas pembawa : hidrogen, nitrogen, helium atau camp argon dan metana.
- Pemilihan fase gerak tergantung penggunaan detektor



- Helium : gas pembawa yg sering digunakan krn meberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik (mengurangi pelebaran pita).
- Kecepatan alir gas 50 – 70 mL/menit (d: 6mm)
- Kecepatan alir gas 25 – 30 mL/menit (d: 3 mm)
- Kecepatan alir gas 0,2 – 2 mL/menit (kolom kapiler)
- Kecepatan alir gas berbanding lurus dgn penampang kolom (4:2)
- Penggunaan kolom dgn diameter yg kecil menghemat penggunaan fase gerak



- Kecepatan alir pd kapiler sangat rendah, maka ditambahkan gas tambahan pd kebanyakan detektor
- Dimana gasnya ditambakna setelah solut mau mencapai detektor.
- Gas tambahan berupa helium
- Gas nitrogen efisien dgn kecepatan ± 10 mL/menit
- Gas helium efisien pd kecepatan alir ± 40 mL/menit

Fase gerak dan Detektor



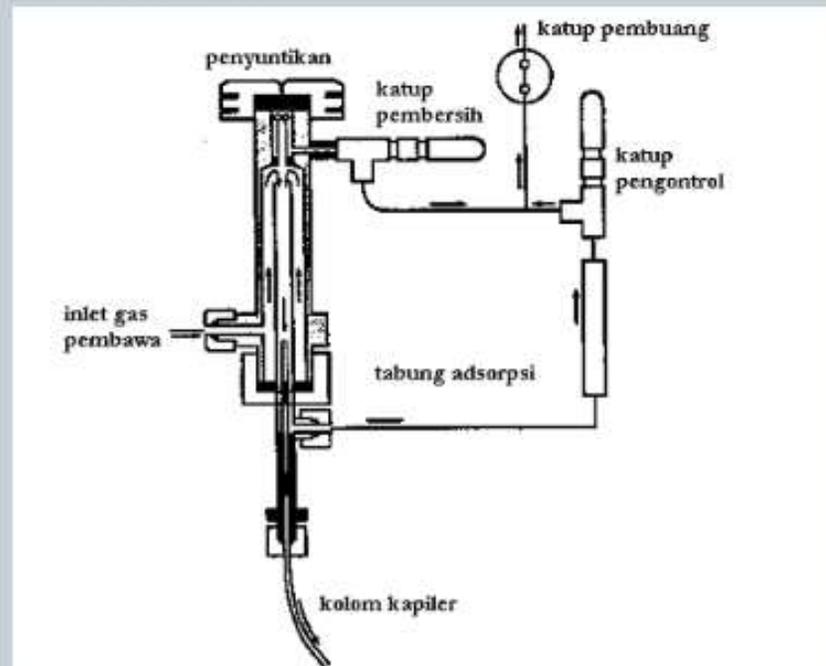
Gas Pembawa	Detektor
Hidrogen	Hantar Panas
Helium	Hantar Panas Ionisasi nyala Fotometri nyala Termoionik
Nitrogen	Ionisasi nyala Tangkap elektron Fotometri nyala Termoionik
Argon	Ionisasi nyala
Argon + metana 5 %	Tangkap elektron
Karbon dioksida	Hantar panas

Injektor/Inlet



- Fungsinya: mengantarkan sampel ke dalam aliran gas pembawa (fase gerak).
- Penyuntikan sampel bisa dilakukan manual dan autosampler (tergantung jumlah sampel)
- Sampel di dalam microsyringe disuntikan ke dlm lubang yg ditutup septum (karet yg tahan panas)
- Inlet hrs dipanaskan tersendiri dan tingginya 10 – 15°C dari suhu kolom maksimum (agar sampel menguap seluruhnya).

- Pada kolom kapiler yg diinjeksikan sampel hanya sedikit hanya 0,01 ul.



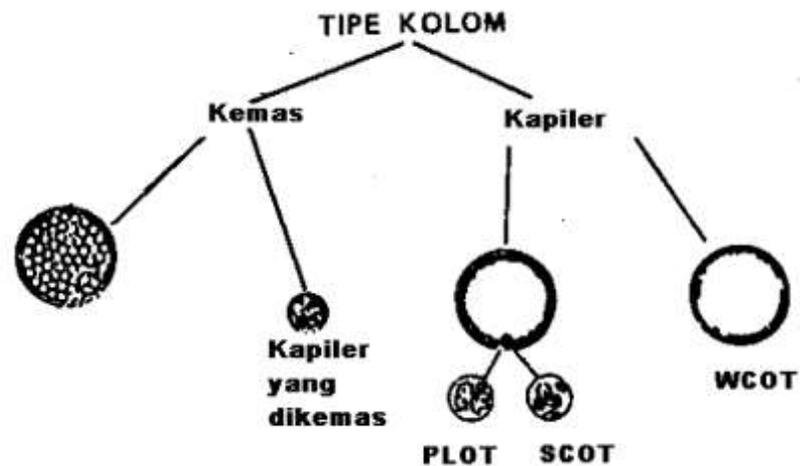
Preparasi Sampel

- Sampel yang ideal dalam kromatografi gas adalah sampel yang hanya mengandung senyawa yang akan dipisahkan dalam kolom, dan dalam banyak hal juga pelarut yang mudah menguap yang melarutkan sampel tersebut. Sampel padat harus dilarutkan dan **dapat larut dalam pelarut organik**, serta dapat **menguap**.
- Konsentrasi sampel biasanya 1-10%.
- Pelarut sample yang umum digunakan : hidrokarbon bertitik didih rendah, etil eter, alcohol, dan keton. Pelarut harus memiliki sifat berbeda dengan sampel yang dianalisis.

KOLOM GC

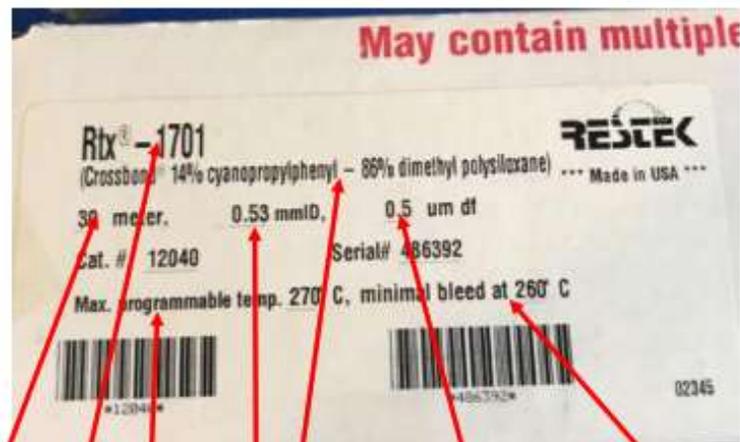
- Tempat pemisahan krn tdpt fase diam
- Merupakan Komponen sentral
- Ada 2 jenis kolom (Kolom kemas (*packing coloum*) dan kolom Kapiler (*Capillary coloum*)
- Kolom Kemas tdr dr fase cair (tabung relatif besar d: 1-3 mm).
- Kolom Kapiler: diameter kecil (0,02 – 0,2 mm) dan dinding kapiler utk penyangga fase diam cair.

Penampang Kolom Kemasan dan kolom Kapiler



Tabel 16.2. Perbandingan kolom kemas dan kolom kapiler

Parameter	Kolom kemas	Kolom kapiler
Tabung	Baja tahan karat (<i>stainless steel</i>).	Silika (SiO_2) dengan kemurnian yang sangat tinggi (kandungan logam < 1 ppm).
Panjang	1-5 m	5-60 m
diameter dalam	2-4 mm	0,10-0,53 mm
Jumlah lempeng/meter	1000	5000
Total lempeng	5000	300.000
Tebal lapisan film	10 mikron	0,05-1 mikron
Resolusi	Rendah	Tinggi
Kec. alir (mL/menit)	10-60	0,5-1,5
Kapasitas	10 μg /puncak	< 100 ng/puncak



May contain multiple

Rtx-1701

(Crossbonded 14% cyanopropylphenyl - 86% dimethyl polysiloxane) ... Made in USA ...

RESEK

30 meter

0.53 mm ID

0.5 um df

Cat. # 12040

Serial# 486392

Max. programmable temp. 270 C, minimal bleed at 260 C



02045

- Pajang Kolom
- Jenis fase & Konsentrasi
- Suhu max Program
- diameter
- Jenis Pendukung
- Ketebalan Lapisan
- Suhu minimal Kolom

- Semakin sempit diameter kolom maka efisiensi pemisahan kolom semakin besar/puncak kromatogram yg dihasilkan semakin tajam.
- **Kolom kemas** : terbuat dari gelas atau logam yang tahan karat atau dari tembaga dan aluminium. Panjang kolom jenis ini adalah 1–5 meter dengan diameter dalam 1-4 mm.

Efisiensi kolom akan meningkat dengan semakin bertambah halusanya partikel fase diam ini. Semakin kecil diameter partikel fase diam, maka efisiensinya akan meningkat.

Ukuran partikel fase diam biasanya berkisar antara 60–80 mesh (250- 170 μm).

Untuk KGC dipakai lapisan tipis pada padatan pendukung dengan ketebalan 1-10 μm , dan maksimum fase diam cair yang terdapat pada padatan pendukung adalah 10%

- **Kolom kapiler:** kolom ini berbeda dengan kolom kemas, dalam hal adanya rongga pada bagian dalam kolom yang menyerupai pipa (tube). Oleh karena itu kolom kapiler juga disebut "Open tubular columns". Fase diam melekat mengelilingi dinding dalam kolom. Ada empat macam jenis lapisan pada kolom kapiler ini, yaitu:
 - *WCOT (Wall Coated Open Tube)*
 - *SCOT (Support Coated Open Tube);*
 - *PLOT (Porous Layer Open Tube);*
 - *FSOT (Fused Silica Open Tube).*

- Kolom kapiler sangat banyak dipakai atau lebih disukai oleh para ilmuwan. Salah satu sebabnya antara lain kemampuan kolom kapiler memberikan harga jumlah pelat teori yang sangat besar (> 300.000 pelat).
- Banyak macam bahan kimia yang dipakai sebagai fase diam antara lain: squalen, DEGS (Dietilglukol suksinat), OV-17 (phenil methyl silicone oil). Semakin tipis lapisan penyalut sebagai fase diam, maka semakin tinggi suhu operasionalnya. Untuk lapisan salut < 1 μm , suhu operasional dapat mencapai 460°C, sementara itu suhu minimalnya dapat mencapai - 60°C.

- Fase diam yang dipakai pada kolom kapiler dapat bersifat non polar, polar, atau semi polar.
- Fase diam non polar yang paling banyak digunakan adalah metil polisiloksan (HP-1; DB-1; SE-30; CPSIL-5) dan fenil 5%-metilpolisiloksan 95% (HP-5; DB-5; SE-52; CPSIL-8).
- Fase diam semi polar adalah seperti fenil 50%-metilpolisiloksan 50% (HP-17; DB-17; CPSIL-19),
- Fase diam yang polar adalah seperti polietilen glikol (HP-20M; DBWAX; CP-WAX; Carbowax-20M).
- Jenis fase diam akan menentukan urutan elusi komponen-komponen dalam campuran.. Contoh fase diam, kegunaan untuk analisis golongan senyawa, polaritas, dan suhu maksimum operasi yang diizinkan diringkas pada tabel dibawah ini :

Jenis Fase Diam dan Penggunaannya

Fase diam	Polaritas	Golongan sampel	Suhu maksimum
Squalen	non polar	hidrokarbon	125°C
Apiezon L	non polar	Hidrokarbon, ester, eter	300°C
Metil silikon	non polar	Steroid, pestisida, alkaloida, ester	300°C
Dionil ptalat	semi polar	Semua jenis	17°C
Dietilenglikolsuksinat	polar	Ester	200°C
Carbowax 20M	polar	Alkohol, amina aromatik, keton	250°C

Suhu Kolom

GC didasarkan pada 2 sifat senyawa yang dipisahkan yaitu :

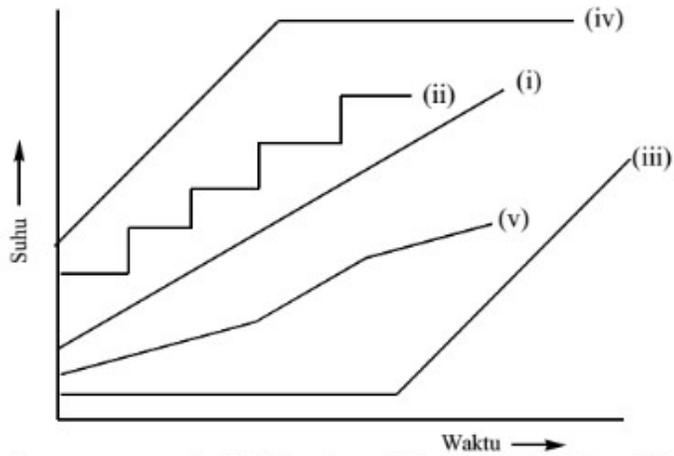
- a. kelarutan senyawa dalam cairan tertentu,
- b. tekanan uapnya atau keatsiriannya (titik didih senyawa).

Karena tekanan uap berbanding langsung dengan suhu, maka suhu merupakan faktor yang utama pada GC. Walaupun suhu kolom dapat berkisar antara $-100-400\text{ }^{\circ}\text{C}$, dalam prakteknya beberapa pembatas harus diperhatikan.

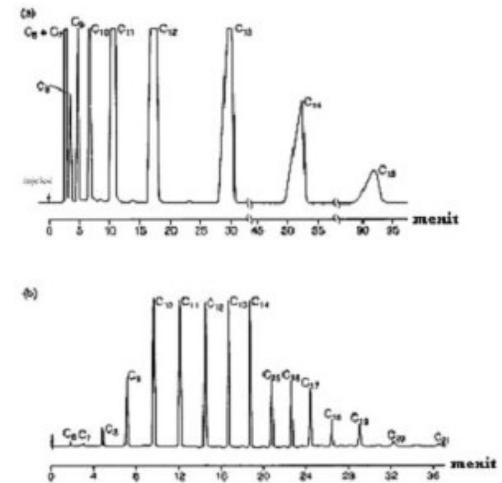
Suhu pemakaian kolom yang mengandung fase diam ini dibatasi juga oleh kestabilannya. Beberapa fase diam jika digunakan suhu yang terlalu tinggi akan terurai secara perlahan-lahan. Suhu minimum dan maksimum berbagai jenis fase diam yang dianjurkan terdapat dalam tabel dibawah ini :

Fase diam	Suhu minimum (°C)	Suhu maksimum (°C)
Apiezon L	50	255
Metil silikon	0 (untuk gom 100)	300-3500
Fenil/metil silikon	0	300
Carbowax (polietilen glikol)	10-30	225
Sianosilikon	0	275
Alkil ftalat	20	225
Dexsil	50	450

- Pemisahan pada KG dapat dilakukan pada suhu tetap yang biasanya disebut dengan pemisahan isothermal dan dapat dilakukan dengan menggunakan suhu yang berubah secara terkendali yang disebut dengan pemisahan suhu terprogram.



Gambar 16.4. Lima jenis pemrograman suhu (i) linier dengan laju yang kita inginkan. (ii) bertahap, yang diikuti peningkatan suhu secara linier. (iv) linier diikuti dengan isothermal. (v) multilinier.



Gambar 16.5. Pemisahan seri *n*-alkana yang dilakukan pada suhu isothermal (gambar a) dan pada suhu terprogram (pada gambar b); kolom: Apiezon 3%; kecepatan alir fase gerak (Helium): 10 ml/menit.

Regenerasi Kolom

Setelah kolom dipakai dalam jangka waktu sekian lama, kemungkinan yang paling sering terjadi adalah penyumbatan kolom. Hal ini sering terjadi pada kolom kapiler. Akibat dari hal tersebut maka kinerja kolom akan menurun, khususnya untuk kolom yang fase diamnya adalah fase terikat. Apabila terjadi penyumbatan pada kolom kapiler atau menurunnya kinerja kolom, maka perlu dilakukan regenerasi untuk meremajakan atau mengembalikan kinerja kolom pada kondisi semula

Cara Regenerasi Kolom

- **Pemotongan kolom**

Pemotongan kolom biasanya dilakukan jika terjadi penyumbatan pada ujung depan kolom (terutama kolom kapiler). Komponen-komponen sampel yang tidak dapat diatsirikan (diuapkan) sering menyumbat kolom pada ujung depannya. Salah satu tanda adanya penyumbatan pada kolom adalah adanya puncak kromatogram yang melebar atau berekor. Pengatasan masalah ini yang umum dilakukan adalah dengan cara memotong kolom kapiler tersebut sepanjang 50 cm dari ujung depannya. Biasanya pemotongan dikerjakan dengan memakai pemotong intan yang ujungnya sangat tajam (pensil intan)



- **Pengkondisian (*Conditioning*)**

untuk memelihara kolom agar waktu hidup (life time)-nya cukup lama. Pengkondisian dilakukan lebih kurang 30 menit sebelum dan sesudah analisis, tergantung pada kontaminasinya. Oleh karena itu, dapat saja dilakukan pengkondisian lebih dari 30 menit. Suhu yang dipakai pada saat pengkondisian sebaiknya terprogram dengan kenaikan $5^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ sampai suhu operasional

- **Pencucian kolom**

untuk kolom fase terikat sebaiknya dilakukan pencucian dengan memakai tangki (tabung) pencuci yang dilakukan di luar oven.

Yang terbaik untuk dipakai sebagai larutan pencuci adalah pentana yang dapat dipakai sebagai larutan pencuci semua jenis kolom.

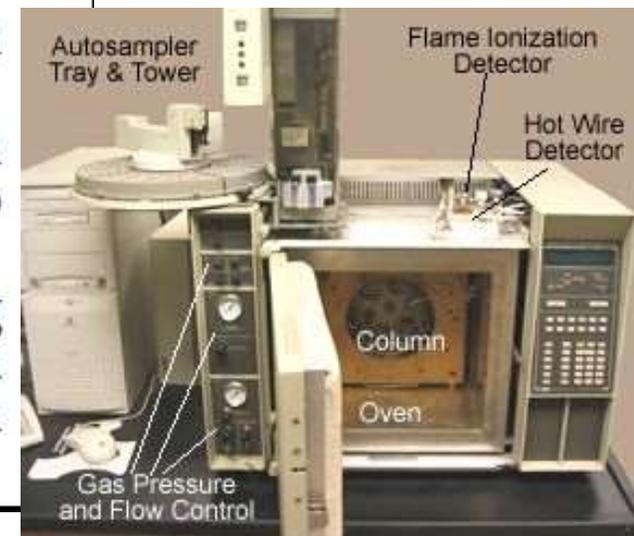
Untuk mencuci material pengotor yang lebih polar dapat juga dipakai metilen klorida atau metanol.

Setelah proses pencucian maka diusahakan semua cairan pencuci keluar dari kolom.

Pada saat instalasi kembali, kolom yang telah dicuci jangan dihubungkan langsung dengan detektor

DETEKTOR GC

- Detektor merupakan perangkat yang diletakkan pada ujung kolom tempat keluar fase gerak (gas pembawa) yang membawa komponen hasil pemisahan.
- suatu sensor elektronik yang berfungsi mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen di dalamnya menjadi sinyal elektronik.
- Kromatogram yang merupakan hasil pemisahan fisik
- komponen-komponen oleh KG disajikan oleh detektor sebagai deretan luas puncak terhadap waktu
- Akan tetapi apabila kromatografi gas digabung dengan instrumen yang multipleks misalnya GC/FT-IR/MS, kromatogram akan disajikan dalam bentuk lain.

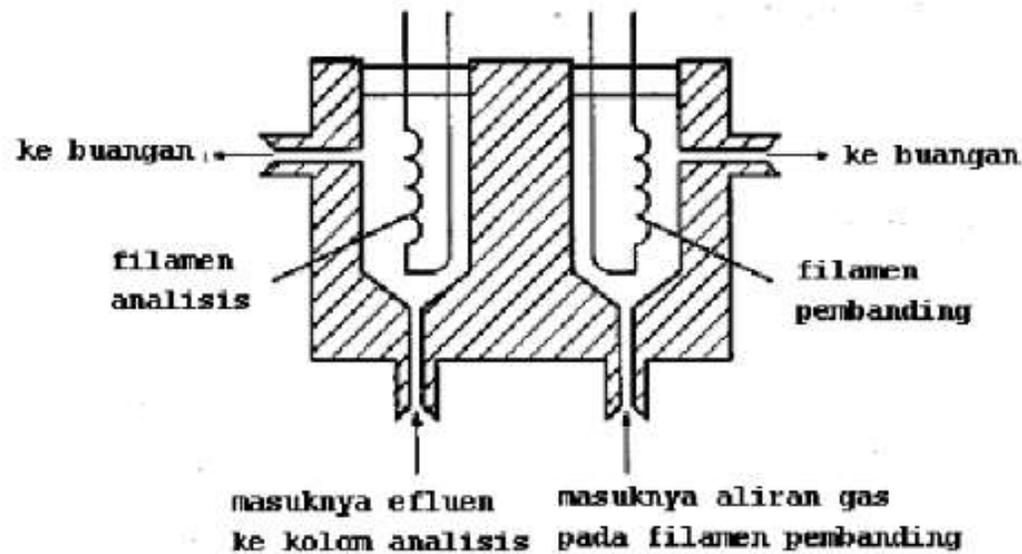


Jenis detektor	Jenis sampel	Batas deteksi	Kecepatan alir (mL/menit)		
			Gas pembawa	H ₂	Udara
Hantar panas	Senyawa umum	5-100 ng	15-30	-	-
Ionisasi nyala	Hidrokarbon	10-100 pg	20-60	30-40	200-500
Penangkap elektron	Halogen organik, pestisida	0,05-1 pg	30-60	-	-
Nitrogen-fosfor	Senyawa nitrogen organik dan Fosfat organik	0,1-10 g	20-40	1-5	70-100
Fotometri nyala (393 nm)	Senyawa-senyawa sulfur	10-100 pg	20-40	50-70	60-80
Fotometri nyala (526 nm)	Senyawa-senyawa fosfor	1-10 pg	20-40	120-170	100-150
Fotoionisasi	Senyawa-senyawa yang terionisasi dengan UV	2 pg C/detik	30-40	-	-
Konduktivitas elektrolitik	Halogen, N, S	0,5 pg Cl 2 pg S 4 pg N	20-40	80	-
<i>Fourier Transform</i> -inframerah (FT-IR)	Senyawa-senyawa organik	1000 pg	3-10	-	-
Selektif massa	Sesuai untuk senyawa apapun	10 pg-10 ng	0,5-30	-	-
Emisi atom	Sesuai untuk elemen apapun	0,1-20 pg	60-70	-	-

Detektor hantar panas

(*Thermal Conductivity Detektor=TCD*)

- Detektor ini didasarkan bahwa panas dihantarkan dari benda yang suhunya tinggi ke benda lain di sekelilingnya yang suhunya lebih rendah.
- Kecepatan penghantaran panas ini tergantung susunan gas yang mengelilinginya.
- Gas BM rendah mempunyai daya hantar lebih tinggi.
- Jika ada komponen/senyawa yang dibawa fase gerak masuk kedalam detektor, karena BM senyawa biasanya tinggi maka daya hantar menjadi turun.

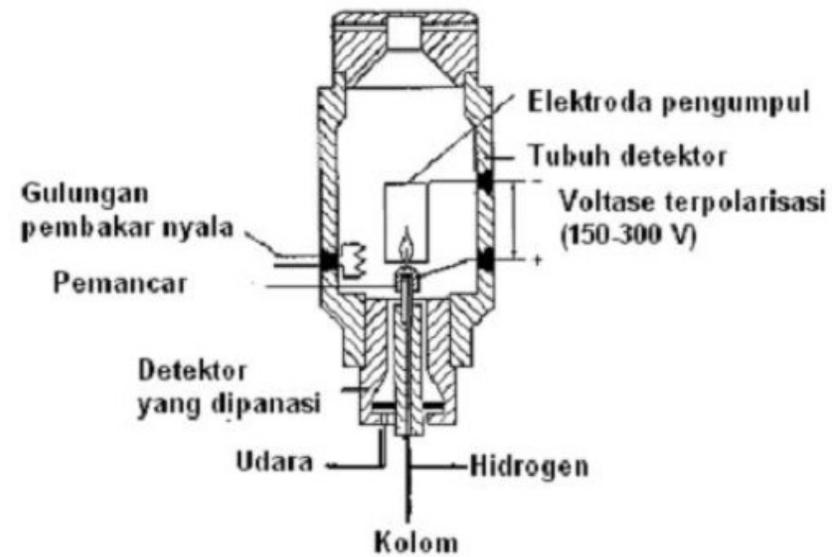


Detektor ini memberi keuntungan bahwa komponen yang dideteksi tidak rusak, sehingga memungkinkan komponen dikumpulkan untuk analisis lebih lanjut.

Detektor hantar panas termasuk detektor konsentrasi, yakni semua molekul yang melewatinya diukur jumlahnya dan tidak tergantung pada laju aliran fase gerak.

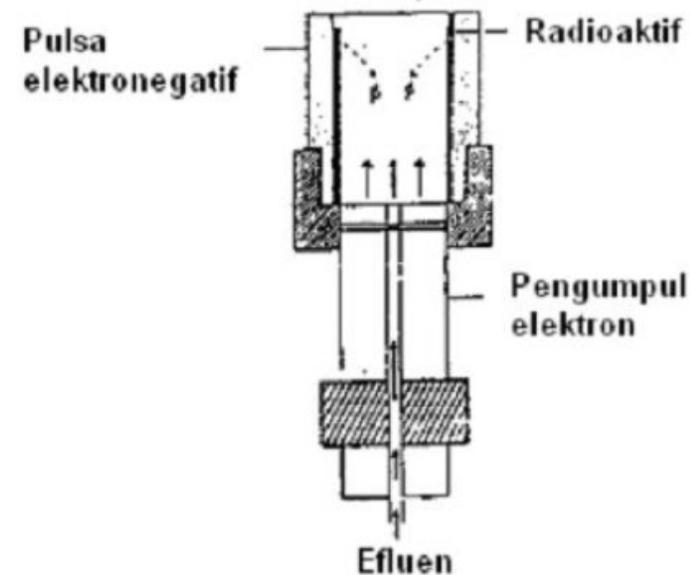
Detektor Ionisasi Nyala (*Flame Ionization Detektor = FID*)

- senyawa organik bila dibakar akan terurai menjadi pecahan sederhana bermuatan positif, biasanya terdiri atas satu karbon (C^+).
- Pecahan ini meningkatkan daya hantar di sekitar nyala, tempat yang telah dipasang elektroda, dan peningkatan daya hantar ini dapat diukur dengan mudah dan direkam. Dengan demikian, gas efluen dari kolom dialirkan ke dalam nyala hidrogen yang terbakar di udara
- Detektor ionisasi nyala (FID) ini mengukur jumlah atom karbon, dan bukan jumlah
- molekul seperti pada TCD



Detektor tangkap elektron (Elektron Capture Detektor= ECD)

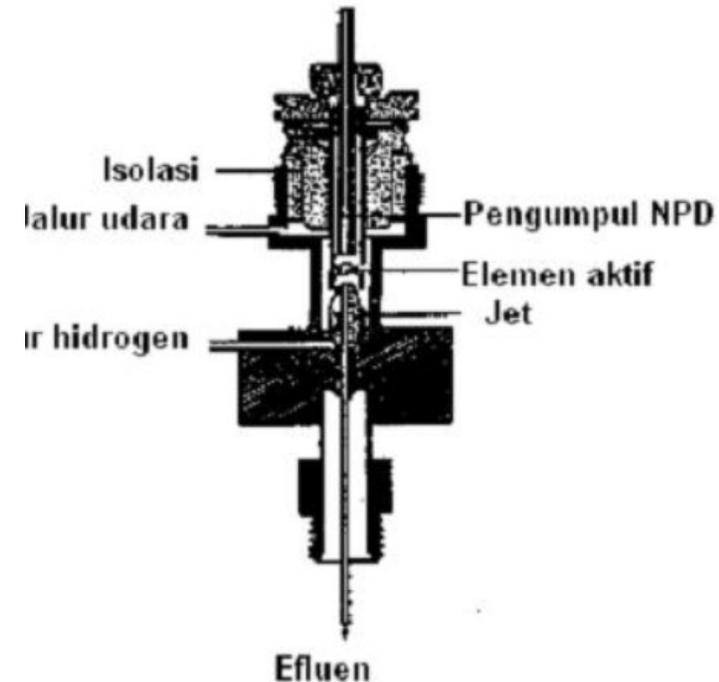
- Detektor ini dilengkapi dengan sumber radio aktif yaitu tritium (${}^3\text{H}$) atau ${}^{63}\text{Ni}$ yang ditempatkan diantara dua elektroda.
- Tegangan listrik yang dipasang antara katoda dan anoda tidak terlalu tinggi (2-100 volt).
- Prinsip Kerja: penangkapan elektron oleh senyawa yang mempunyai afinitas terhadap elektron bebas, yaitu senyawa yang mempunyai unsur-unsur elektronegatif.



Detektor nitrogen-fosfor

(*Nitrogen Phosphorous Detektor* =NPD)

- Prinsip Kerja NPD = FID
- NPD sangat selektif terhadap nitrogen dan fosfor karena adanya elemen aktif diatas aliran kapiler yang terbakar oleh plasma (1600 °C)
- NPD sangat baik dalam analisis dibidang farmasi dan klinik disamping itu sangat baik pula untuk mendukung analisis mengenai dampak lingkungan
- Gas pengelusi yang baik adalah helium dengan laju aliran yang umum dipakai 30 ml/menit



Detektor fotometri nyala

- Prinsip kerja: senyawa yang mengandung sulfur atau fosfor dibakar dalam nyala hidrogen-oksigen, maka akan terbentuk spesies-spesies yang tereksitasi yang akan runtuh (*decay*) dan menghasilkan suatu emisi kemiluminesen yang spesifik yang dapat diukur pada panjang gelombang tertentu.
- Untuk yang mengandung atom S (393 nm), sementara yang mengandung fosfor panjang gelombang 526 nm

Detektor konduktivitas elektrolitik

- Detektor yang spesifik untuk mendeteksi senyawa yang mengandung atom sulfur, nitrogen, dan halogen.
- Detektor ini tersusun atas tungku (*furnace*) yang mampu memberikan suhu paling kecil 100 °C.
- Efluen dari kolom KG akan memasuki tungku lalu dipirolisiskan dalam suatu udara yang kaya hidrogen atau oksigen.
- Hasil-hasil dari pirolisis ini selanjutnya dicampur dengan pelarut yang sesuai dan menghasilkan suatu larutan yang bersifat konduktif

Detektor foto-ionisasi

- suatu senyawa menyerap energi foton dari suatu lampu UV, maka senyawa tersebut akan terionisasi
- Detektor ini dapat digunakan untuk deteksi senyawa-senyawa aromatis, keton, aldehid, ester, amin, senyawa-senyawa sulfur organik, senyawa-senyawa anorganik seperti hidrogen sulfida, HI, HCl, klorin, iodium, dan fosfin.
- Keuntungan lain detektor ini adalah bahwa pelarut-pelarut umum yang sering digunakan seperti metanol, kloroform, metilen klorida, karbon tetraklorida, dan asetonitril tidak memberikan atau sedikit memberikan tanggapan (respon), jika digunakan lampu UV yang mempunyai potensial ionisasi 12 eV.

Detektor spektrometer massa

- Spektrometer massa jika digunakan sebagai detektor maka akan mampu memberikan informasi data struktur kimia senyawa yang tidak diketahui.
- Dengan menggunakan spektrometer massa untuk memonitor ion tunggal atau beberapa ion yang karakteristik dalam analit, maka batas deteksi ion-ion ini akan ditingkatkan

APLIKASI GC

1. Aplikasi dalam pemeriksaan kebersihan

Kromatografi gas digunakan untuk mengecek apakah ada polutan udara atau yang berasal dari air seperti **senyawa organik yang mudah menguap, hidrokarbon aromatik polisiklik, benzena, toluena, benzo dll; residu organoklorin, pestisida organofosfat pada tanaman; bahan tambahan makanan seperti asam benzoat; cairan tubuh dan jaringan dan bahan biologis lainnya Analisis asam amino, asam lemak, vitamin, dll.**

2. Aplikasi dalam pemeriksaan kesehatan

Kromatografi gas digunakan untuk **Analisis cairan biologis seperti cairan tubuh dan jaringan: asam lemak, trigliserida, vitamin, gula, dll.**

3. Aplikasi dalam analisis obat

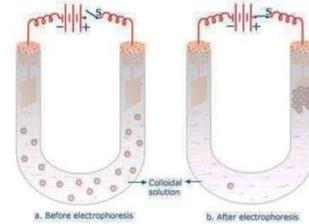
Kromatografi gas digunakan untuk pemeriksaan **Obat antiepilepsi, komponen volatil dalam obat paten Cina, dan penentuan alkaloid.**

SELAMAT BELAJAR

ELEKTROFORESIS

Pengertian

- Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik.



Elektroforesis merupakan salah satu teknik analisis DNA, RNA, protein, karbohidrat dan lain-lain yang berdasarkan pada Bobot Molekul menggunakan muatan listrik.

1. Elektroforesis Kertas

Elektroforesis kertas merupakan jenis elektroforesis yang terdiri dari kertas sebagai fase diam dan partikel bermuatan yang terlarut sebagai fase gerak, terutama ion-ion kompleks

2. Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel merupakan elektroforesis yang menggunakan gel sebagai fase diam untuk memisahkan molekul-molekul.

Elektroforesis Gel dibagi menjadi 3:

1. Elektroforesis Gel Agarosa
2. Elektroforesis Gel Poliakrilamid
3. **Elektroforesis Gel Poliakrilamid-SDS (SDS-PAGE)**

Fungsi Elektroforesis

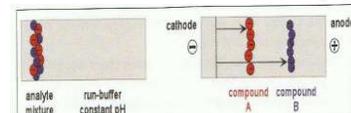
- Menyediakan informasi mengenai ukuran, konfirmasi dan muatan dari protein dan asam nukleat.
- Sebagai metode pemisahan yang dapat digunakan untuk menentukan komponen dari protein atau asam nukleat setiap individu.
- Pada bidang kepolisian teknik metode in digunakan untuk pemeriksaan DNA karakteristik khusus misalnya sidik jari.
- Dalam bidang molekuler, elektroforesis merupakan salah satu cara untuk memvisualisasikan keberadaan DNA.

Prinsip

- Medan listrik dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan.
- Kecepatan gerak molekul tersebut tergantung pada muatan terhadap massanya serta tergantung pula pada bentuk molekulnya. Pergerakan ini dapat dijelaskan dengan gaya Lorentz

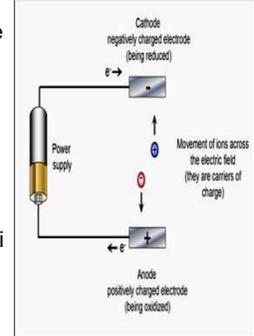
$$\vec{F}_e = q\vec{E}$$

F = gaya Lorentz,
q = muatan objek,
E = medan listrik



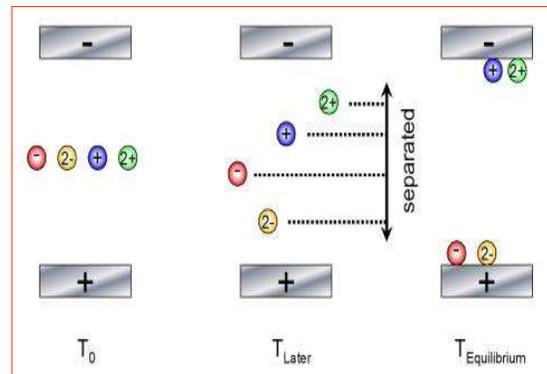
- Media yang digunakan adalah larutan buffer.
- Senyawa bermuatan positif (kation) akan bergerak ke katoda sedangkan senyawa bermuatan negatif akan bergerak ke anoda.
- Kecepatan gerakannya dipengaruhi oleh kondisi lingkungan di sekitar molekul diantaranya pH, hambatan fisik dan ukuran pori fase diam.
- Untuk Pemisahan : ion anorganik, logam kation, protein, DNA, karbohidrat dan sampel-sampel biomedik lainnya.
- partikel bermuatan akan bergerak menuju elektroda yang memiliki muatan yang berlawanan. Anoda (elektroda '+') menarik anion (ion negative), dan Katoda (elektroda '-') menarik kation (ion positif).

- Pemisahan memerlukan fase gerak → buffer.
- Buffer yang biasa digunakan adalah:
 - TBE = Tris borate EDTA
 - TAE = Tris acetate EDTA
- Tidak hanya menyediakan kondisi pH yang sesuai tetapi juga menyediakan ion untuk membantu konduktivitas



Pada kondisi ini beberapa hal yang perlu menjadi perhatian :

- Suatu proses pemisahan molekul lebih baik dihentikan ketika proses tersebut belum mencapai **titik kesetimbangannya**.
- ketika medan listrik dimatikan (power supply mati) maka molekul yang telah terpisah akan menyebar lagi sehingga pemisahan tidak stabil.
- → untuk itu pemisahan tidak dilakukan di dalam larutan akan tetapi menggunakan suatu **matrix**
- matrix akan menahan sampel tidak menyebar lagi dan memberikan '**frictional effect**' yang berpengaruh terhadap kecepatan migrasi sampel



- fase diam / matrix yang biasa digunakan adalah gel.
- Macam gel yang biasa digunakan dalam elektroforesis
 - poliakrilamid
 - agarosa
- Perambatannya:
 - Vertikal
 - horizontal



ad. 1 poliakrilamid (Raymond and Weintraub, 1959)

- ukuran pori-pori dapat dibuat bervariasi untuk memberikan efek penyaringan
- biasa digunakan untuk memisahkan protein
- konsentrasi yang biasa digunakan : 3.5 -20% → dapat memisahkan molekul sebesar 5 – 200 kd
- lebih fleksibel dan memberikan hasil pemisahan yang lebih tajam
- lebih sulit disiapkan karena O₂ menghambat polimerasinya.

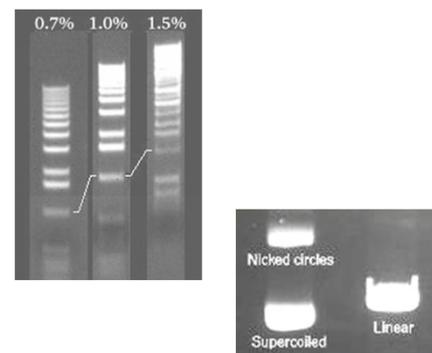
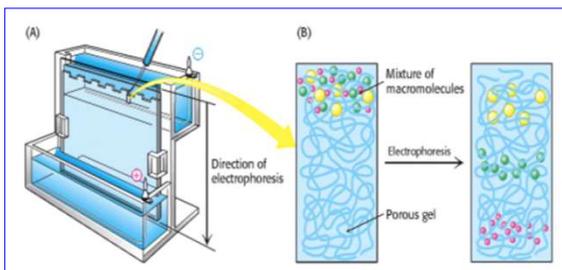
ad. 2 agarosa

- diperoleh dari ekstraksi rumput laut
- bersifat mudah patah dan mudah hancur
- mempunyai pori yang besar (lbh besar dr akrilamid)
- digunakan untuk memisahkan molekul yang besar 200-50000 bp
- penyiapan lebih mudah dibanding dgn poliakrilamid, tetapi resolusinya lebih rendah → hasil pemisahan kurang tajam
- konsentrasi yang digunakan berkisar 0.5 – 2%

Beberapa faktor mempengaruhi kecepatan migrasi dari molekul protein

1. Ukuran molekul protein
 - Migrasi molekul protein berukuran besar lebih lambat daripada migrasi molekul berukuran kecil.
2. Konsentrasi gel
 - Migrasi molekul protein pada gel berkonsentrasi rendah lebih cepat daripada migrasi molekul protein yang sama pada gel berkonsentrasi tinggi.
3. Bufer (penyangga) dapat berperan sebagai penstabil medium pendukung dan dapat mempengaruhi kecepatan gerak senyawa karena ion sebagai pembawa protein yang bermuatan.

4. Medium penyangga
 - Medium pendukung ideal untuk elektroforesis adalah bahan kimia inert yang bersifat relatif stabil, mudah ditangani dan mempunyai daya serap yang baik, sebagai migrasi elektron atau penyaringan berdasarkan ukuran molekul seperti gel poliakrilamid
5. Kekuatan voltase
 - Voltase yang dipakai rendah (100-500) V, kecepatan migrasi molekul sebanding dengan tingginya voltase yang digunakan.
 - Voltase yang dipakai tinggi (500-10000) V, mobilitas molekul meningkat secara lebih tajam dan digunakan untuk memisahkan senyawa dengan BM rendah serta jenis arus yang dipakai selalu harus searah (bukan bolak balik).
6. Temperatur medium saat proses elektroforesis berlangsung. Jika temperatur tinggi akan mempercepat proses bermigrasinya protein dan sebaliknya jika temperatur rendah akan mengurangi kekuatan bermigrasinya protein.



Konsentrasi gel harus disesuaikan dengan ukuran sampel yang akan dipisahkan.

Acrylamide	Range of separation of Polypeptides (length in amino acids)
8%	25-200 kDa (225-1800 a.a.)
10%	15-100 kDa (135-900 a.a.)
12.5%	10-70 kDa (90-630 a.a.)
15%	6-60 kDa (55-550 a.a.)
20%	4-40 kDa (36-360)

The velocity of migration (v) of a protein (or any molecule) in an electric field depends on :

- the electric field strength (E),
- the net charge on the protein (z),
- the frictional coefficient (f).

$$v = \frac{Ez}{f}$$

The frictional coefficient f depends on :

- both the **mass** and **shape** of the migrating molecule and the **viscosity** (η) of the medium.
- For a sphere of radius r ,

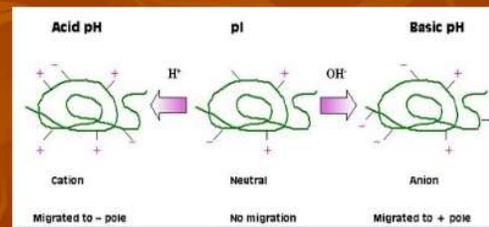
$$f = 6\pi\eta r$$

SDS-PAGE

- Pemisahan protein berdasarkan massa dan muatan keseluruhan protein tsbt
- untuk penentuan BM protein → protein harus mempunyai muatan yang sama
- digunakan **SDS = sodium dodecyl sulfate / laurel sulfate**
- SDS terikat pada protein dgn ikatan hidrofobik sesuai dgn ukuran (besar kecilnya) molekul protein tersebut
- SDS akan memberi **muatan negative** pada semua kondisi pH kecuali pada kondisi yg sangat asam
- Elektroforesis dilakukan dibawah kondisi denaturasi
- Murah
- reproduksibel
- metode cepat untuk kuantitasi, membandingkan dan mengkarakterisasi protein

Principles of Separation :

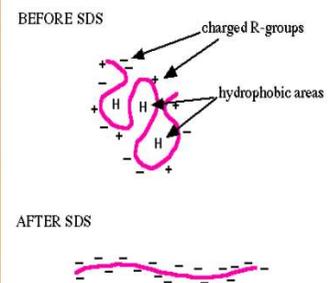
1. Charge on the Proteins



- At the pI of a specific protein, the protein molecule carries no net charge and does not migrate in an electric field.
- At pH above the pI, the protein has a net negative charge and migrates towards the anode.
- At pH below the pI, the protein obtains a net positive charge on its surface and migrates towards the cathode.

SDS

- If we want to separate many different protein molecules of a variety of shapes and sizes, we first want to get them to be linear so that the proteins no longer have any secondary, tertiary or quaternary structure (i.e. we want them to have the same linear shape).



- **Analogy:**

Consider two proteins that are each 500 amino acids long but one is shaped like a closed umbrella while the other one looks like an open umbrella. If you tried to run down the street with both of these molecules under your arms, which one would be more likely to slow you down, even though they weigh exactly the same? This analogy helps point out that not only the mass but also the shape of an object will determine how well it can move through an environment. So we need a way to convert all proteins to the same shape - we use SDS.

Fungsi sds

- SDS (juga disebut Lauril Sulfat) adalah suatu deterjen anionik, yang apabila dilarutkan, molekulnya memiliki muatan negatif dalam range pH yang luas (kecuali terlalu asam).
- Suatu rantai polipeptida dapat berikatan dengan sejumlah tertentu SDS sesuai ukuran molekul (*molecular mass*).
- Muatan negatif SDS akan **menghancurkan sebagian besar struktur kompleks protein** dan secara kuat tertarik ke arah anoda (+) apabila ditempatkan pada suatu medan listrik

Cell

↓
Incubated with SDS

↓
membranes will be dissolved, the proteins will be solubilized, all the proteins will be covered with many negative charges

- ↓
- all proteins contain only primary structure
 - all proteins have a large negative charge which means they will all migrate towards the positive pole when placed in an electric field

SDS

- Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) is an anionic detergent that denatures proteins by wrapping the hydrophobic tail around the polypeptide backbone.
- For almost all proteins, SDS binds at a ratio of approximately 1.4 g SDS per gram of protein, thus conferring a net negative charge to the polypeptide in proportion to its length.
- The SDS also disrupts hydrogen bonds, blocks hydrophobic interactions, and substantially unfolds the protein molecules, minimizing differences in molecular form by eliminating the tertiary and secondary structures.

PAGE

- If the proteins are denatured and put into an electric field, they will all move towards the positive pole at the same rate, with no separation by size. So we need to put the proteins into an environment that will allow different sized proteins to move at different rates. The environment of choice is polyacrylamide, which is a polymer of acrylamide monomers. When this polymer is formed, it turns into a gel and we will use electricity to pull the proteins through the gel so the entire process is called polyacrylamide gel electrophoresis (**PAGE**).

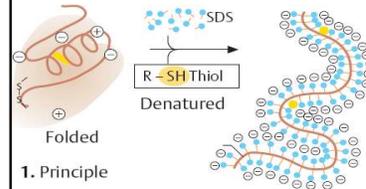
Elektroforesis protein

- Metode yang paling umum digunakan untuk memisahkan protein adalah dengan cara elektroforesis menggunakan **discontinuous polyacrylamide gel** sebagai **medium penyangga (buffer)** dan **sodium dodecyl sulphate (SDS)** untuk mendenaturasi protein.
- Metode ini disebut **Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**.
- Metode ini juga disebut "Laemmli Method" sesuai dengan nama penemunya yaitu U.K. Laemmli, yang menggunakan metode SDS-PAGE pertama kali.

SDS digunakan terutama untuk tujuan:

- Penentuan ukuran protein
- Penentuan kemurnian protein
- Kwantitasi protein
- Analisis jumlah dan ukuran sub unit

Protein native + β merkaptotanol ditambah SDS kemudian dipanaskan



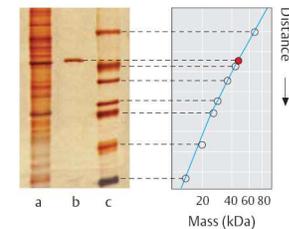
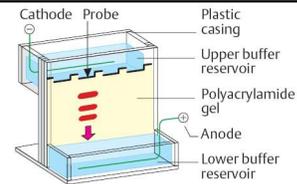
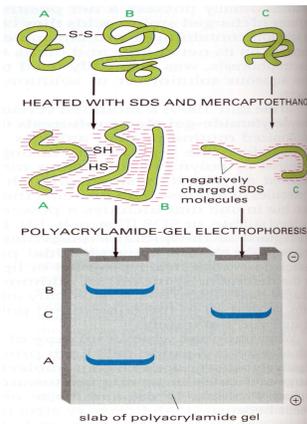
1. Principle

β merkaptotanol akan membantu denaturasi protein dengan mereduksi seluruh ikatan disulfide. Kompleks SDS-protein akan bergerak dalam medan listrik dipengaruhi oleh BM

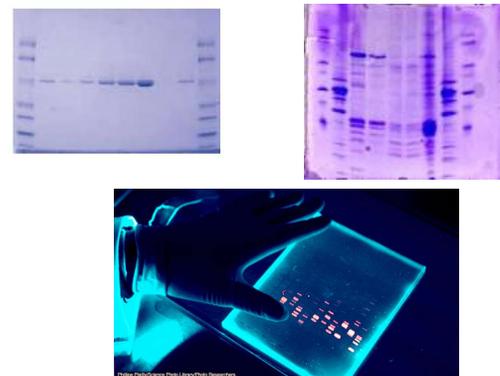
- SDS digunakan untuk melarutkan dan mendenaturasi protein.
- merkaptotanol untuk memecah ikatan disulfide.
- Glycerol (urean atau sukrosa) untuk menambah densiti larutan sampel.
- Bufer untuk menjamin nilai pH
- Bromfenol blue & untuk melacak pergerakan protein

karena itu rasio antara berat molekul dgn muatan menjadi konstan \rightarrow protein migrasi sesuai dengan massanya \rightarrow menuju anoda \rightarrow Dapat dibedakan massa dari protein tersebut

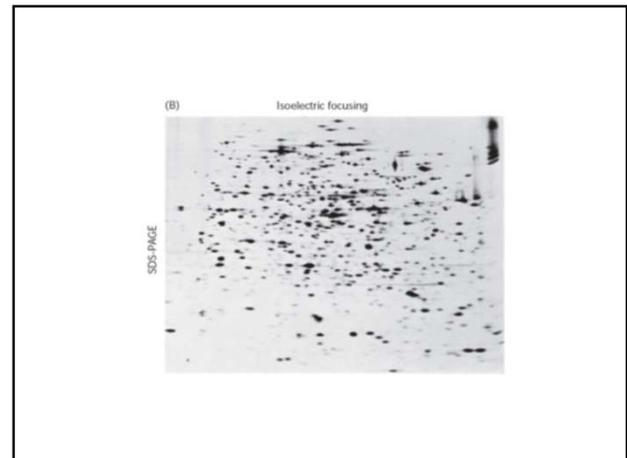
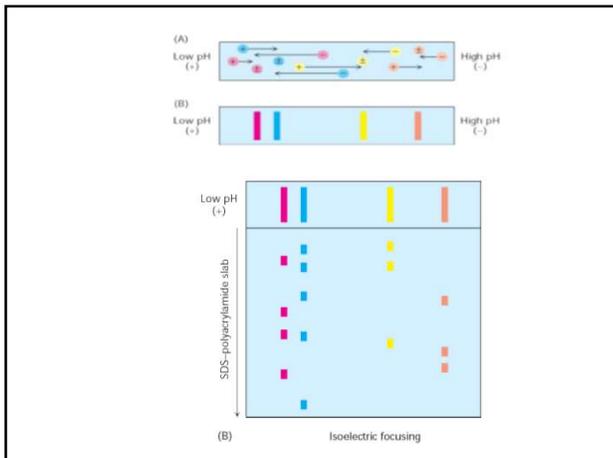
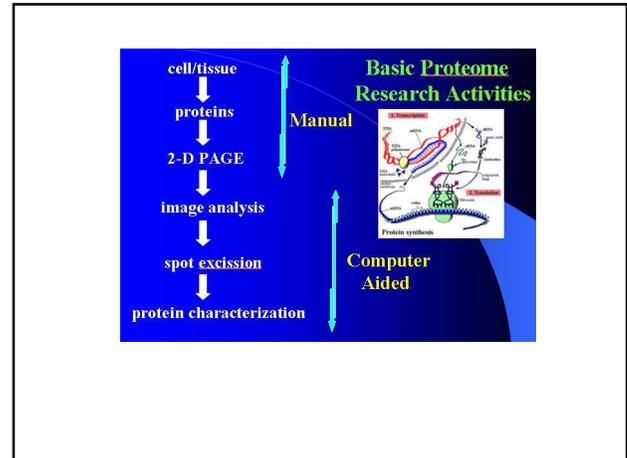
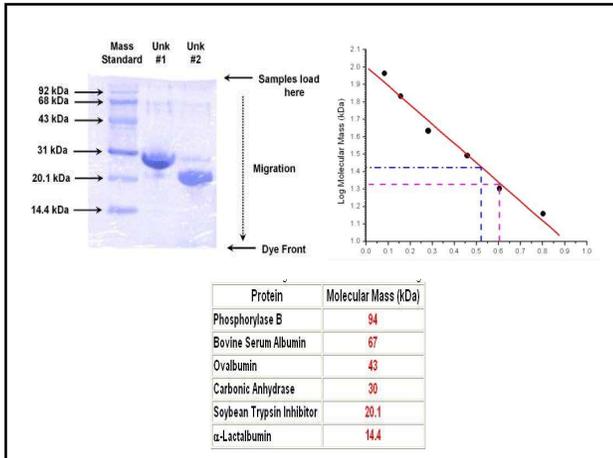
Protein dalam kondisi terdenaturasi



- Ketika kita memisahkan sampel dengan gel elektroforesis \rightarrow tidak tahu kapan berhenti \rightarrow perlu penanda untuk mengetahui kapan harus menghentikan elektroforesisnya.
- Pewarna \rightarrow molekul kecil, dapat menyerap sinar tampak, mempunyai muatan yang sama dengan sampel yang dipisahkan. \rightarrow migrasi lebih cepat dari sampel \rightarrow **bromphenol blue**
- **Visualisasi hasil pemisahan elektroforesis**
Untuk DNA dan RNA \rightarrow ethidium bromide
 \rightarrow **silver staining**
- Untuk protein \rightarrow **Coomassie Brilliant Blue**



Kompleks DNA -EtBr \rightarrow cahaya flouresensi \rightarrow uv



KELEBIHAN DAN KEKURANGAN ELEKTROFORESIS

- ▶ **KELEBIHAN** : Metode pemisahan elektroforesis cukup dengan peralatan sederhana, digunakan untuk memisahkan suatu sampel molekul besar seperti protein, asam nukleat, asam amino dan karbohidrat, dan dalam proses pengerjaan yang mudah dan sederhana.
- ▶ **KEKURANGAN** : Memiliki keterbatasan dalam hal yang efisiensi yang rendah, waktu pemisahan yang relative lama, dan berlaku untuk senyawa yang berwarna saja. Factor penyebabnya biasanya karena kuat arus searah yang relative rendah, kecepatan pemisahan tergantung pada penamabahan tegangan listrik yang searah. Selain itu tegangan listrik yang searah dapat menyebabkan noda hasil pemisahan menjadi tidak jelas akibat kerusakan noda oleh panas yang dihasilkan tegangan listrik searah yang tinggi sehingga noda-noda hasil pemisahan elektroforesis menjadi tidak terlalu jelas memisah.



SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA

SK. Menkes RI No. 12/Kep/Diknakes/II/90 Tgl 3 Februari 1990

SK Kemenristekdikti No. 739/KPT/I/2019 Tgl 20 Agustus 2019

Jl. Bener No. 26 Tegalrejo Yogyakarta-Indonesia Kode Pos 55243 Telp. (0274) 587402, 587208

Website : www.stikes-notokusumo.ac.id e-mail : info@stikes-notokusumo.ac.id

ISI PRESENSI MAHASISWA FARMASI 2024 GANJIL

Mata kuliah : FARF505 - Analisis Instrumental

Nama Kelas : 2A-FR

No	NIM	NAMA	TATAP MUKA									
			7 Okt 2024	11 Okt 2024	5 Nov 2024	12 Nov 2024	22 Nov 2024	26 Nov 2024	6 Des 2024	13 Des 2024	20 Des 2024	
Peserta Reguler												
1	F52023309	ADELIA DWI YANTI	H	H	A	H	H	H	H	H	A	H
2	F52023311	ALFIYYAH MEI RAMADHANI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
3	F52023312	ALIYA FAUZIA SHOLICHAH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
4	F52023313	AMELIA BRENDA SAGITA PUTRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
5	F52023314	ANGEL ADELINE LYSTIN BATEE	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
6	F52023315	ANGELINA NGURA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
7	F52023316	APRILIA DAMAYANTI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
8	F52023317	ARIFAH NOVITA SARI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
9	F52023318	CINTYA ZUNIKE PRASETYA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
10	F52023320	DEFTA WIDYANINGRUM	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
11	F52023321	DENANDITA NUR ARSALIA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
12	F52023322	DESMALIA SAFITRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
13	F52023323	DESSY SURYANINGSIH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
14	F52023324	DESVENIA MANTIARA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
15	F52023325	EFRILIA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
16	F52023326	ELISABETH ERIYANI MEDHO	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
17	F52023327	FADYA AMALIA NURAZIZAH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
18	F52023329	GABRIELA ADVENTY	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
19	F52023330	I PUTU AGUS PUTRA MAHARDIKA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
20	F52023331	JESSY ALLAISYA FATIHA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
21	F52023332	JINGGA DEVA MALIKA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
22	F52023333	KARINA TRISNAWATI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
23	F52023334	LATA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
24	F52023336	MAR'ATUS SHOLIKAH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
25	F52023337	MARCHELIN WIDYA ARUM ARTHAREYNA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
26	F52023338	MARIANA IPA BERAONA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
27	F52023339	NABILA ZALSA NURSYAFRANI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
28	F52023340	NAISYAAZNI PUTRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
29	F52023341	NAOMI SIHURA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
30	F52023343	NOVITA INDAH SAPITRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H



SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA

SK. Menkes RI No. 12/Kep/Diknakes/II/90 Tgl 3 Februari 1990

SK Kemenristekdikti No. 739/KPT/I/2019 Tgl 20 Agustus 2019

Jl. Bener No. 26 Tegalrejo Yogyakarta-Indonesia Kode Pos 55243 Telp. (0274) 587402, 587208

Website : www.stikes-notokusumo.ac.id e-mail : info@stikes-notokusumo.ac.id

ISI PRESENSI MAHASISWA FARMASI 2024 GANJIL

Mata kuliah : FARF505 - Analisis Instrumental

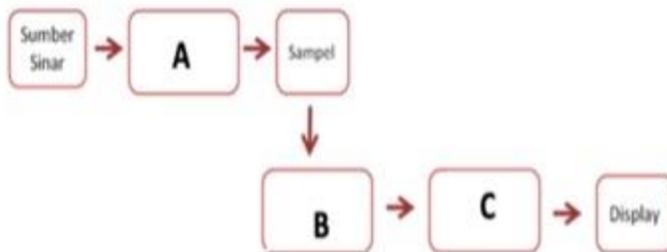
Nama Kelas : 2A-FR

No	NIM	NAMA	TATAP MUKA									
			7 Okt 2024	11 Okt 2024	5 Nov 2024	12 Nov 2024	22 Nov 2024	26 Nov 2024	6 Des 2024	13 Des 2024	20 Des 2024	
Peserta Reguler												
31	F52023345	PETRONELA FEBRYANTI ADUK	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
32	F52023347	RATU ADIYANTA PUSPITA PUTRI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
33	F52023348	REIFA ANGELA OKTAVIA	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
34	F52023349	RESTY DIAN PANGESTI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
35	F52023350	RIANI NUR AFIFAH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
36	F52023351	SALMA SAFANAH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
37	F52023352	SASKYA KARAMMAN	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
38	F52023353	SELFINA DHINI ADRIANI	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
Paraf Ketua Kelas												
Paraf Dosen												

	SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA
	UJIAN AKHIR SEMESTER GASAL (I) TA 2024/2025 PROGRAM STUDI S-1 FARMASI
	Mata Kuliah : ANALISIS INSTRUMENTASI Dosen : Dr.Rofiq Sunaryanto,M.Si Hari/Tanggal : , Januari 2025 Waktu : 120 menit Tingkat/semester : I / gasal

Soal pilihan ganda.

Nilai masing-masing nomor 2.



Skema alat Spektrofourometri

1. Bagian alat spektrofourometer yang di tanda huruf A, B, dan C adalah
 - a. A = Monokromator Eksitasi ; B = Monokromator Emisi; C = Detektor
 - b. A = Monokromator Emisi ; B = Detektor; C = Monokromator Eksitasi
 - c. A = Monokromator Emisi ; B = Monokromator Eksitasi ; C = Detektor
 - d. A = Detektor ; B = Monokromator Eksitasi ; C = Monokromator Emisi

2. Radiasi yang diukur pada spektrofourometri adalah
 - a. Radiasi yang diserap
 - b. Radiasi yang ditransmisikan
 - c. Radiasi yang diemisikan
 - d. Radiasi yang dipantulkan

3. Parameter kuantitatif pada spektrofourometri adalah
 - a. Panjang gelombang eksitasi
 - b. Panjang gelombang emisi
 - c. Absorbansi
 - d. Intensitas fluoresensi

4. Materi yang dikenai radiasi pada spektrofotometri adalah
 - a. Atom bebas
 - b. Elektron
 - c. Proton
 - d. Neutron

5. Fungsi monokromator pertama pada spektrofotometri adalah
 - a. Menyeleksi sinar polikromatis dari sinar monokromatis
 - b. Menyeleksi sinar atau radiasi yang diemisikan
 - c. Menyeleksi sinar atau radiasi yang diabsorpsi
 - d. Menyeleksi sinar atau radiasi yang ditransmisikan

6. Prinsip pemisahan dalam kromatografi?
 - a. Senyawa dipisahkan berdasarkan suhu
 - b. Senyawa dipisahkan berdasarkan ukuran molekulnya
 - c. Senyawa dapat dipisahkan menggunakan kromatografi berdasarkan perbedaan kecepatan pergerakan senyawa dalam fase gerak dan fase diam.
 - d. Senyawa dipisahkan berdasarkan warna

7. Apa peran fase diam dalam kromatografi?
 - a. Fase diam berperan sebagai pemisah dalam kromatografi.
 - b. Fase diam berperan sebagai pengencer dalam kromatografi.
 - c. Fase diam berperan sebagai perekat dalam kromatografi.
 - d. Fase diam berperan sebagai penghasil warna dalam kromatografi.

8. Apa yang dimaksud dengan fase diam polar dalam kromatografi?
 - a. Fase diam polar menggunakan logam berat
 - b. Fase diam polar dalam kromatografi mengacu pada penggunaan fase diam yang memiliki sifat polar, seperti silika atau alumina.
 - c. Fase diam polar menggunakan karbon aktif
 - d. Fase diam polar menggunakan senyawa kompleks

9. Apa yang dimaksud dengan elusi dalam kromatografi?
 - a. Elusi dalam kromatografi adalah proses pengukuran konsentrasi senyawa dalam fase diam
 - b. Elusi dalam kromatografi adalah proses pembakaran senyawa dalam fase diam
 - c. Elusi dalam kromatografi adalah proses pemisahan senyawa menggunakan pelarut/fase gerak yang dilewatkan dalam fase diam.
 - d. Elusi dalam kromatografi adalah proses pencampuran senyawa dari fase diam

10. manakah dibawah ini yang **bukan** merupakan bahan zat padat untuk fase diam?
- Silika
 - Aluminium
 - bubuk selulose
 - kieselguhr
11. Berikut ini yang merupakan keuntungan menggunakan kromatografi kolom untuk pemisahan adalah ...
- Membutuhkan sampel yang sangat banyak dan mahal
 - Tidak selektif untuk senyawa organik
 - Murah dan sederhana
 - Pemisahannya sangat lama
12. Komponen utama yang selalu ada dalam kromatografi adalah ...
- fasa diam dan fasa gerak
 - fasa cairan dan padatan
 - fasa padatan dan gas
 - fasa diam dan fasa cair
13. Suatu kromatografi menggunakan fasa diam berupa **cair** dan fasa gerak berupa **gas**, maka kromatografi tersebut tergolong
- Kromatografi cair - cair (KCC)
 - Kromatografi cair padat (KCP)
 - Kromatografi gas - cair (KGC)
 - Kromatografi gas - padat (KGP)
14. Mekanisme pemisahan untuk kromatografi lapis tipis (KLT) adalah ...
- partisi
 - adsorpsi
 - pertukaran ion
 - eksklusi
15. Prinsip pemisahan kromatografi lapis tipis adalah
- Prinsip kromatografi lapis tipis adalah pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak pada lapisan tipis kromatografi.
 - Prinsip kromatografi lapis tipis adalah pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan suhu
 - Prinsip kromatografi lapis tipis adalah pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan warna

- d. Prinsip kromatografi lapis tipis adalah pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekul
16. Salah satu jenis kromatografi yang pemisahannya bekerja berdasarkan ukuran molekul zat terlarut adalah...
- kromatografi partisi
 - kromatografi adsorpsi
 - kromatografi eksklusi
 - kromatografi penukar ion
17. Proses pengembangan sampel merupakan proses
- proses perlakuan sampel dengan fasa gerak sehingga komponen yang dikehendaki terpisah
 - proses interaksi sampel dengan fasa diam
 - proses perlakuan fasa gerak dan fasa diam
 - proses perlakuan sampel dengan fasa diam sehingga komponen yang dikehendaki lepas
18. Dalam kromatografi fasa gerak (eluen) dibuat **bervariasi kepolaran**, misalnya dari fasa gerak non polar menjadi semakin polar. Maka kromatografi tersebut termasuk kromatografi
- elusi
 - elusi gradien
 - elusi isokratik
 - pergeseran
19. Salah satu jenis kromatografi dengan fasa diam berupa padatan resin dan fasa gerak berupa cairan adalah kromatografi ...
- eksklusi
 - penukar ion
 - adsorpsi
 - partisi
20. Apabila dalam suatu kromatografi, **fasa diamnya berupa cairan (di-coating dalam padatan)**, maka dalam proses pemisahannya termasuk dalam kromatografi ...
- adsorpsi
 - partisi
 - penukar ion
 - eksklusi
21. Komponen yang menjadi "Body of Method" (fungsi pemisahan) dalam HPLC adalah
- Pompa
 - Injektor
 - Kolom

d. Detektor

22. Jelaskan metode kromatografi gas secara singkat.

- a. Metode kromatografi gas adalah teknik pemisahan komponen campuran berdasarkan perbedaan warna antara fase diam dan fase gerak dalam kolom kromatografi gas.
- b. Metode kromatografi gas adalah teknik pemisahan komponen campuran berdasarkan perbedaan viskositas antara fase diam dan fase gerak dalam kolom kromatografi gas.
- c. Metode kromatografi gas adalah teknik pemisahan komponen campuran berdasarkan perbedaan distribusi antara fase diam dan fase gerak dalam kolom kromatografi gas.
- d. Metode kromatografi gas adalah teknik pemisahan komponen campuran berdasarkan perbedaan kekeruhan antara fase diam dan fase gerak dalam kolom kromatografi gas.

23. Jelaskan perbedaan antara kromatografi lapis tipis dan kromatografi gas.

- a. Kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam gas dan fase gerak padat, sedangkan kromatografi gas menggunakan fase diam padat dan fase gerak cair.
- b. Kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam padat dan fase gerak gas, sedangkan kromatografi gas menggunakan fase diam cair dan fase gerak padat.
- c. Kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam padat dan fase gerak cair, sedangkan kromatografi gas menggunakan fase diam padat dan fase gerak gas.
- d. Kromatografi lapis tipis menggunakan fase gerak padat dan fase diam gas, sedangkan kromatografi gas menggunakan fase diam cair dan fase gerak padat.

24. *time of retention (t_R)* atau waktu retensi adalah waktu yang diperlukan oleh analit dari awal pemisahan hingga akhir terjadinya pemisahan, Semakin lama analit berinteraksi dengan fase diam maka...?

- a. semakin lama analit keluar dari sistem, maka t_R semakin kecil
- b. semakin lama analit keluar dari sistem, maka t_R semakin besar
- c. semakin cepat analit keluar dari sistem maka t_R semakin besar
- d. semakin cepat analit keluar dari sistem maka t_R sama

25. Apa perbedaan antara kromatografi lapis tipis dengan metode kromatografi kolom?

- a. Kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom menggunakan fase diam berbahan kimia yang berbeda
- b. Kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom memiliki prinsip pemisahan yang sama
- c. Perbedaan utama antara kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom adalah dalam cara pemisahan senyawa. Kromatografi lapis tipis menggunakan plat datar sebagai fase diam, sedangkan kromatografi kolom menggunakan kolom sebagai fase diam.
- d. Kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam berbentuk kolom, sedangkan kromatografi kolom menggunakan plat datar sebagai fase diam

26. Bagaimana cara menghitung Rf value dalam kromatografi lapis tipis?
- Rf value dihitung dengan rumus: $Rf = \text{volume sampel} / \text{volume pelarut}$
 - Rf value dihitung dengan rumus: $Rf = \text{suhu sampel} / \text{suhu pelarut}$
 - Rf value dihitung dengan rumus: $Rf = \text{berat sampel} / \text{berat pelarut}$
 - Rf value dihitung dengan rumus: $Rf = \text{jarak yang ditempuh oleh sampel} / \text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}$
27. HPLC dengan sistem fase terbalik (Reverse Phase) artinya menggunakan fase gerak (Mobile phase) yang bersifat
- non polar
 - polar
 - campuran
 - organik
28. Beberapa syarat fase gerak dalam kromatografi harus...kecuali
- Murni, tidak terdapat kontaminan
 - Tidak bereaksi dengan wadah
 - Melarutkan sampel
 - Memiliki viskositas tinggi
29. Untuk tujuan kualitatif pada kromatografi planar(KLT & kertas) digunakan sebagai parameter kualitatifnya.
- faktor retardasi (RF)
 - waktu retensi
 - waktu mati
 - selektivitas
30. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dikenal juga dengan istilah High Performance Liquid Chromatography (HPLC). KCKT merupakan perangkat peralatan yang penting dalam perkembangan dunia analisis bahan baku maupun bahan pencemar. Berikut ini bukan kelebihan KCKT adalah
- mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
 - dapat terjadi dekomposisi dengan baik
 - kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi
 - dapat digunakan bermacam macam detektor
31. Berikut ini merupakan urutan komponen dalam proses kerja HPLC/ KCKT yang benar adalah:

- a. Reservoir – pump – pencampuran gradien - column – injector – detector – recorder
 - b. Reservoir – pump – pencampuran gradien - injector – column –detector – recorder
 - c. Reservoir – pump – pencampuran gradien - column – detector - injector – recorder
 - d. Reservoir – column – pencampuran gradien - pump – injector – detector – recorder
32. Pada elektrolisis, senyawa bermuatan negatif akan bergerak ke....
- a. Anoda (+)
 - b. Katoda (+)
 - c. Anoda (-)
 - d. Katoda (-)
33. Pada jarak yang sama, mana yang akan mencapai kutub positif paling pertama? (Diketahui nilai bobot molekul)
- a. 60
 - b. 100
 - c. 200
 - d. 600
34. Dalam proses elektroforesis terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi laju pergerakan dari molekul DNA yaitu
- a. Ukuran molekul DNA
 - b. Konsentrasi Gel dan Bentuk molekul
 - c. A dan B benar
 - d. A dan B salah
35. Faktor yang mempengaruhi elektroforesis adalah
- a. Sampel
 - b. Larutan buffer dan medan listrik
 - c. Sampel dan larutan buffer
 - d. Sampel, medan listrik dan larutan buffer

Soal assay (nilai masing-masing nomor 5)

- 1. Dalam pengukuran menggunakan spektrofotometri fluoresensi sangat dipengaruhi faktor-faktor fluoresensi senyawa yang dianalisis salah satunya efisiensi fluoresensi. Jelaskan hubungan antara

antara struktur molekul(rigid&tidak rigid), kenaikan dan penurunan konsentrasi, suhu, viscositas terhadap efisiensi fluoresensi (Φ).

2. Jelaskan prinsip kerja dari
 - a. Kromatografi penukar ion
 - b. Kromatografi adsorpsi
 - c. Kromatografi ekslusi
3. Suatu obat A dan obat B mempunyai waktu retensi 16,4 dan 17,63 menit pada kolom 30 cm. Lebar puncak dasar masing-masing obat A dan B sebesar 1,11 dan 1,21 menit. Hitunglah resolusi dan H-nya.
4. Dalam analisis menggunakan HPLC, kromatogram yang ideal adalah diperoleh puncak yang sempit dan simetris. Namun adakalanya terjadi puncak yang lebar dan tidak simetris (lebar puncak bagian kanan dan kiri tidak sama). Jelaskan kemungkinan penyebab terjadinya puncak yang asimetris.
5. Untuk melakukan pemisahan atau purifikasi suatu campuran menggunakan kromatografi kolom terbuka, hal apa saja yang harus diperhatikan? Jelaskan
6. Syarat apa saja yang harus dipenuhi suatu sampel yang akan dianalisis menggunakan kromatografi gas?