

MODUL PRAKTIKUM ANALISIS INSTRUMENTAL

(FARP530)



Penyusun:

apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech.

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO YOGYAKARTA**

2024 / 2025

KATA PENGANTAR

Modul Praktikum Analisis Instrumental adalah petunjuk tata laksana mata kuliah Praktikum Analisis Instrumental (FARP530) yang harus dilaksanakan oleh mahasiswa semester 3 Program Studi S1 Farmasi Stikes Notokusumo Yogyakarta tahun ajaran 2024/2025. Panduan ini bukan merupakan referensi yang dapat dijadikan pustaka baku untuk sebuah makalah ataupun laporan, dengan demikian mahasiswa diharapkan untuk tetap mempelajari buku-buku referensi sekunder lain terkait keilmuan Analisis Instrumental guna menambah pengetahuan dan memperkuat pemahaman atas ilmu yang dipelajari dan praktikum yang dikerjakan.

Modul panduan Praktikum Analisis Instrumental ini merupakan pengembangan berbagai referensi yang tercantum dalam daftar pustaka, dalam rangka memberikan bekal keterampilan dan keilmuan yang relevan bagi mahasiswa S1 Farmasi Stikes Notokusumo Yogyakarta. Namun demikian, masih terdapat banyak kekurangan dan masih memerlukan berbagai penyempurnaan lebih lanjut. Untuk itu, berbagai hal yang belum terakomodir dalam modul ini, akan diatur kemudian dalam proses pembelajaran Praktikum Analisis Instrumental. Selain itu, sangat diharapkan kritik dan saran bagi kelengkapan dan perbaikan modul ini.

Sebagai penutup, penyusun mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah ikut membantu dalam mewujudkan modul praktikum ini.

Yogyakarta, September 2024

Penyusun
apt. Dian Purwita Sari, M.Biotech.

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	1
Daftar Isi	2
Tata Tertib Praktikum Analisis Instrumental	3
Format Laporan Praktikum	4
Petunjuk Umum Praktikum Analisis Instrumental	6
TEORI DASAR SPEKTROFOTOMETRI	7
Percobaan 1: Analisis Sulfadiazin dengan Metode Spektrofotometri Ultraviolet ...	12
Percobaan 2: Analisis Rivanol dan Asam Salisilat dengan Metode Spektrofotometri Visibel	14
Percobaan 3: Analisis Asetosal dan Asam Salisilat dengan Metode Spektrofotometri Ultraviolet Dua Lamda	17
TEORI DASAR KROMATOGRAFI	19
Percobaan 4: Analisis Rivanol, Riboflavin, Sulfadiazin, Asetosal, dan Asam Salisilat dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis	24
Percobaan 5: Analisis Rivanol dan Riboflavin dengan Metode Kromatografi Kolom	27
Daftar Pustaka	30

TATA TERTIB PRAKTIKUM ANALISIS INSTRUMENTAL

1. Setiap peserta harus hadir tepat pada waktu yang telah ditentukan. Apabila peserta terlambat lebih dari 15 (lima belas) menit dari waktu yang telah ditentukan, maka mahasiswa tidak diperkenankan mengikuti praktikum pada hari itu dan diwajibkan mengikuti praktikum pada hari lain (inhal untuk percobaan tersebut).
2. Selama mengikuti praktikum, peserta harus memakai sepatu (dilarang mengenakan sandal atau sepatu sandal) dan jas praktikum berwarna putih dan dikancingkan dengan rapi.
3. Peserta tidak diperkenankan memakai aksesoris berlebihan, nail art atau modifikasi tubuh lainnya yang beresiko menjadi sumber kontaminan dalam bekerja di Laboratorium Farmasi.
4. Setiap peserta wajib membuat laporan sementara sebelum mengikuti praktikum yang formatnya sudah ditentukan.
5. Setiap peserta wajib membuat catatan data praktikum dan ditandatangani dosen/asisten setelah selesai suatu acara praktikum.
6. Setiap peserta wajib membuat laporan akhir praktikum dan dikumpulkan sebelum mengikuti praktikum berikutnya.
7. Setiap peserta harus mengembalikan alat-alat yang telah dipakai dalam keadaan bersih dan kering. Sebelum meninggalkan ruang praktikum, peserta harus mengembalikan botol-botol bahan kimia yang telah ditutup rapat ke tempat semula.
8. Setiap peserta harus **menjaga kebersihan dan kerapihan laboratorium**, bekerja dengan tertib, tenang dan teratur. Selama mengikuti praktikum, peserta harus bersikap sopan, baik dalam berbicara maupun bergaul.
9. Setiap peserta harus melaksanakan semua mata praktikum dan mematuhi budaya Kesehatan dan Keselamatan Kerja (K3).
10. Dapatkan nasehat/keterangan dari dosen atau asisten mengenai segala sesuatu yang berkaitan dengan hal yang kurang jelas sebelum melakukan percobaan.
11. Semua mahasiswa tidak dibenarkan bekerja di dalam laboratorium tanpa kehadiran dosen/ asisten praktikum.
12. Mahasiswa yang sakit atau memiliki keperluan mendesak sehingga tidak dapat mengikuti praktikum pada hari yang telah terjadwal, diperbolehkan inhal (menunda praktikum) dengan mengirim surat ijin/permohonan praktikum inhal kepada dosen yang mengampu.
13. Apabila peserta praktikum melanggar hal-hal yang telah diatur di atas maka yang bersangkutan dapat dikeluarkan dari laboratorium dan tidak diperkenankan untuk melanjutkan praktikum pada hari itu. Kegiatan praktikum dinyatakan batal dan tidak diijinkan untuk inhal.
14. Hal-hal yang belum disebutkan di atas dan diperlukan untuk kelancaran praktikum akan diatur kemudian.

FORMAT LAPORAN SEMENTARA


Penyusunan laporan sementara mengikuti format sebagai berikut:

JUDUL PRAKTIKUM	
Nama mahasiswa :	
NIM :	
I. TUJUAN	
II. DASAR TEORI	
III. ALAT DAN BAHAN	
IV. PROSEDUR KERJA	
Keterangan: Prosedur kerja dituliskan secara skematis, berupa diagram alir.	
V. DATA DAN KALKULASI	
Keterangan: Uraikan rancangan kalkulasi untuk persiapan bahan. Siapkan tabel untuk mencatat data praktikum.	

FORMAT LAPORAN AKHIR

Penyusunan laporan akhir mengikuti format sebagai berikut:

Halaman sampul:

JUDUL PRAKTIKUM	
	
Nama mahasiswa	:
NIM	:
Tanggal praktikum	:
Kelompok	:
Dosen Pengampu	:
Asisten Pendamping	:
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI STIKES NOTOKUSUMO YOGYAKARTA 2024	

Halaman isi, memuat:

JUDUL PRAKTIKUM	
I. TUJUAN II. DASAR TEORI III. ALAT DAN BAHAN IV. PROSEDUR KERJA V. DATA DAN KALKULASI	} Merupakan laporan sementara yang telah mendapatkan acc.
VI. PEMBAHASAN Keterangan: Uraikan pembahasan tahap-tahap yang dilakukan dalam praktikum dan fungsinya. Uraikan pembahasan data hasil praktikum dengan merujuk pada konsep-konsep teoritis yang relevan.	
VII. KESIMPULAN Keterangan: rumuskan kesimpulan yang menjawab tujuan praktikum.	
VIII. DAFTAR PUSTAKA Keterangan: tuliskan semua daftar pustaka yang digunakan sebagai referensi dalam penyusunan laporan.	
Dosen Pengampu	Praktikan
ttd	ttd
Nama Dosen	Nama mahasiswa

PETUNJUK UMUM PRAKTIKUM ANALISIS INSTRUMENTAL

Dalam Mata Praktikum Analisis Instrumental akan dipelajari berbagai metode analisis kimia kuantitatif secara instrumental. Untuk itu hal yang perlu diperhatikan meliputi:

1. Penggunaan instrumen dan aksesorisnya secara seksama dan berhati-hati. Perhatikan SOP penggunaan alat dan harus didampingi asisten/laboran/dosen pengampu. Catat penggunaan pada logbook.
2. Pengukuran bahan (penimbangan, pengukuran volume) dilakukan secara seksama dan kuantitatif, dengan memperhatikan batas ketelitian 0,1%.
 - a) Penimbangan dilakukan dengan neraca analitik.
 - b) Untuk mengukur volume 200-1000 μL , gunakan mikropipet 1000 μL .
 - c) Untuk mengukur volume 50 - 200 μL , gunakan mikropipet 200 μL .
 - d) Untuk menakar pengenceran hingga volume tertentu, gunakan labu takar.

TEORI DASAR SPEKTROFOTOMETRI

Spektrofotometri adalah teknik analisis yang menggunakan cahaya untuk mengukur konsentrasi suatu bahan kimia. Dalam uraian ini, hanya dibatasi pada penggunaan cahaya di daerah ultraviolet (UV) yaitu antara panjang gelombang (λ) 200 - 400 nm yang memiliki energi setara dengan 72-150 kcal/mol, dan pada daerah sinar tampak (VIS, visible) yaitu antara panjang gelombang 400 - 800 nm yang memiliki energi setara dengan 36 - 72 kcal/mol.

Rentang energi pada kisaran tersebut seringkali berhubungan dengan perbedaan energi antara keadaan elektron beberapa molekul. Transisi elektron dalam suatu molekul dapat terjadi apabila molekul tersebut menyerap energi yang sesuai dengan besarnya energi untuk keperluan tersebut.

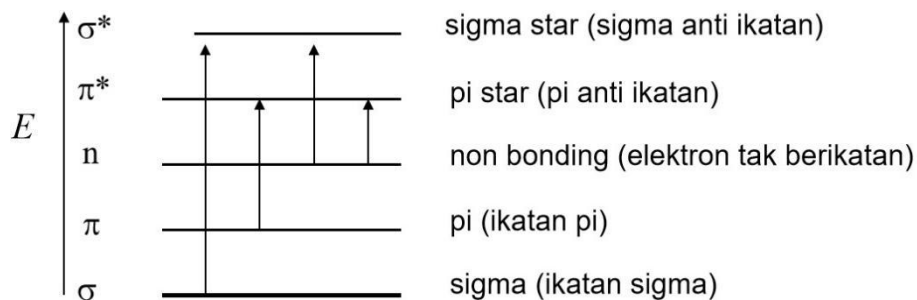
Sistem ikatan tunggal atau sistem sigma (σ)

Sistem ikatan tunggal (ikatan σ) cenderung menunjukkan transisi elektron dari orbital ikatan sigma ke orbital anti ikatan sigma ($\sigma \rightarrow \sigma^*$). Bila dalam molekul dengan ikatan sigma terdapat juga elektron non ikatan (non bonding, n), dapat pula terjadi transisi elektron non ikatan ke orbital anti ikatan sigma ($n \rightarrow \sigma^*$). Kedua transisi tersebut ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ dan $n \rightarrow \sigma^*$) secara khas terjadi atau teramati pada pita absorpsi di bawah 200 nm.

Sistem ikatan rangkap dua atau sistem pi (π)

Sistem ikatan rangkap dua atau sistem pi (π) dan elektron non ikatan apabila menyerap cahaya dengan energi yang sesuai dapat mengalami transisi elektron yang menghasilkan pita absorpsi di daerah UV-VIS. Transisi tersebut merupakan jenis transisi dari orbital ikatan pi ke orbital anti ikatan pi ($\pi \rightarrow \pi^*$) dan transisi dari elektron non ikatan ke orbital anti ikatan pi ($n \rightarrow \pi^*$).

Tipe transisi elektronik



Gambar 1. Diagram tingkat energi

Logam-logam transisi yang memiliki orbital d tidak terisi atau terisi sebagian biasanya menunjukkan pita absorpsi di daerah UV-Vis. Transisi yang menghasilkan pita tersebut sering

merupakan hasil dari perbedaan tingkat energi pada elektron d (logam yang bersangkutan) yang meningkat dari elektron-elektron atom donor yang terikat secara koordinasi. Karakteristik spektra logam transisi melibatkan transisi elektron antara tingkat energi yang berbeda-beda dari orbital d. Absorpsi melibatkan transisi elektron dari suatu orbital d yang memiliki energi rendah ke orbital d yang memiliki energi tinggi.

Tabel 1. Karakteristik transisi elektron

	Transisi	λ (nm)	log ϵ	Contoh
E	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 200	>3	hidrokarbon jenuh
	$n \rightarrow \sigma^*$	160~260	2~3	Alkena, alkuna, aromatik
	$\pi \rightarrow \pi^*$	200~500	~4	H ₂ O, CH ₃ OH, CH ₃ Cl CH ₃ NH ₂
	$n \rightarrow \pi^*$	250-600	1~2	Karbonil, nitro, nitrat, karboksil

catatan: transisi terlarang; $\sigma \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$

Sampel yang secara nyata mengabsorpsi di daerah Vis biasanya memiliki warna karena warna akan dihasilkan apabila suatu pita frekuensi tertentu diabsorpsi dari sinar putih. Panjang gelombang sesungguhnya dari transisi d-d tergantung pada logam yang terlibat (jumlah elektron d yang mula-mula ada), jumlah gugus pengkoordinasi, kekuatan (kebasaan) dari atom donor dan geometri dari gugus pengkoordinasi.

Molekul-molekul dengan kemampuan untuk menunjukkan transisi elektronik seperti di atas dinamakan memiliki kromofor (chromo: warna, phoros: pembentuk). Kromofor sering dikaitkan dengan gugus molekuler tertentu.

- Untuk mengamati transisi $\pi \rightarrow \pi^*$, molekul tersebut harus memiliki gugus molekuler yang terdiri dari ikatan rangkap seperti etilen, asetilen, karbonil dan senyawa azo.
- Untuk mengamati transisi $n \rightarrow \pi^*$, molekul harus memiliki ikatan rangkap dan elektron-elektron non ikatan seperti karbonil, gugus nitro dan gugus azo.
- Molekul yang menunjukkan transisi $n \rightarrow \sigma^*$ harus memiliki ikatan tunggal dan elektron-elektron non ikatan seperti alkohol, amida dan air.

Gugus lain yang dikenal dengan auksokrom (auxein: meningkat, chromo: warna) tidak menunjukkan absorpsi sendiri tetapi dapat mempengaruhi panjang gelombang atau intensitas suatu pita absorpsi dari suatu kromofor.

Pergeseran panjang gelombang dapat diklasifikasikan sebagai:

- Pergeseran bathokromik yaitu pergeseran merah atau pergeseran ke panjang gelombang (λ) yang lebih panjang.
- Pergeseran hipsokromik yaitu pergeseran biru atau pergeseran ke panjang gelombang (λ) yang lebih pendek.

Peningkatan intensitas absorpsi dinamakan efek hiperkromik, sedangkan penurunan intensitas absorpsi dinamakan dengan efek hipokromik.

Proses klasik untuk melakukan pengukuran secara fisik suatu absorpsi molekuler dari sinar UV atau Vis melibatkan pelewatan cahaya melalui sampel. Tenaga radiasi sinar datang (P_0) dan tenaga sinar yang diteruskan (P) sesudah melalui sampel berkaitan dengan definisi transmittan (T).

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Atau bila dirumuskan dengan absorban (A) maka:

$$A = -\log T$$

Ada hubungan antara energi yang dimiliki sinar dengan panjang gelombang sinar yang bersangkutan:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

E : tenaga radiasi cahaya

h : tetapan planck yang harganya $6,626 \times 10^{-34}$ joule.

c : kecepatan cahaya yang harganya $2,998 \times 10^8$ ms⁻¹

λ : panjang gelombang

Ada hubungan kuantitatif antara banyaknya sinar yang diserap bila sinar mengenai sampel (dalam larutan) dan konsentrasi dari zat penyerap. Hubungan tersebut dikenal dengan hukum Lambert-Beer.

$$A = \epsilon bc$$

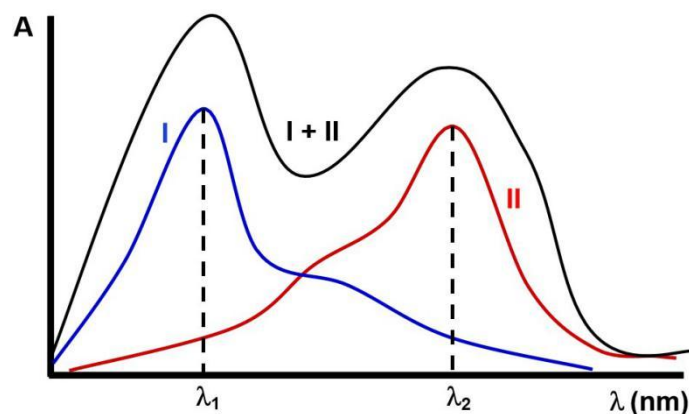
A : absorban

ϵ : koefisien ekstingsi molar (cm⁻¹M⁻¹)

b : tebal kuvet (cm)

c : konsentrasi (M)

Campuran 2 senyawa juga dapat ditetapkan kadarnya secara spektrofotometri. Sebagai contoh adalah penetapan kadar asetosal dan asam salisilat, masing-masing dapat ditetapkan dengan menggunakan serapan pada daerah ultraviolet. Campuran asam salisilat dan asetosal sering terjadi dalam sediaan karena peruraian asetosal, Berikut adalah spektra dari campuran 2 senyawa:



Gambar 2. Spektra dari asetosal dan asam salisilat

Spektra di atas merupakan spektra campuran dari asetosal (I, λ_1) dalam kloroform yang memberikan panjang gelombang maksimal di 278 nm dan asam salisilat (II, λ_2) yang

memberikan panjang gelombang maksimal di 308 nm. Dari spektra ini dapat digunakan untuk menurunkan persamaan di atas, yaitu:

$$A^{278} = A_{\text{asetosal}}^{278} + A_{\text{asam salisilat}}^{278}$$

$$A^{278} = \epsilon_{\text{asetosal}}^{278} \cdot b \cdot C_{\text{asetosal}} + \epsilon_{\text{asam salisilat}}^{278} \cdot b \cdot C_{\text{asam salisilat}}$$

$$A^{308} = A_{\text{asetosal}}^{308} + A_{\text{asam salisilat}}^{308}$$

$$A^{308} = \epsilon_{\text{asetosal}}^{308} \cdot b \cdot C_{\text{asetosal}} + \epsilon_{\text{asam salisilat}}^{308} \cdot b \cdot C_{\text{asam salisilat}}$$

Keterangan:

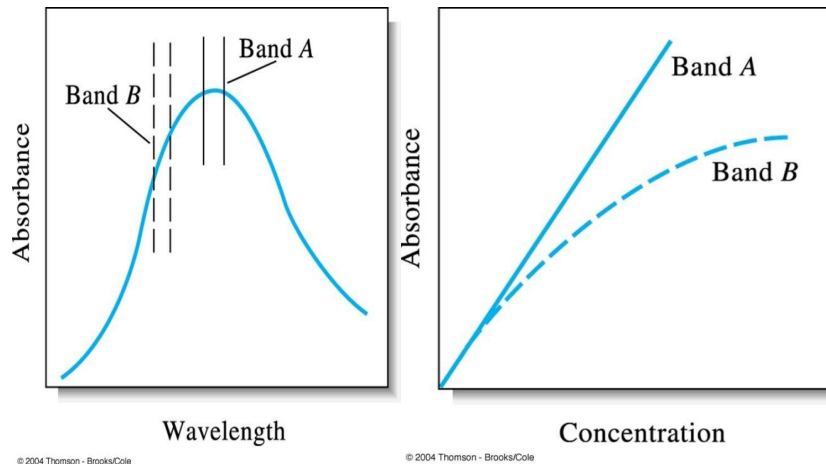
A_{278} dan A_{308} adalah absorbansi yang diamati dari suatu campuran pada panjang gelombang 278 nm dan 308 nm.

Bagian dari suatu molekul yang bertanggungjawab pada penyerapan cahaya dinamakan kromofor. Setiap benda yang menyerap sinar tampak akan nampak berwarna. Warna yang dapat dilihat dikatakan sebagai komplemen dari warna yang diserap.

Tabel berikut ini menunjukkan hubungan antara warna yang diamati, warna yang diserap dan panjang gelombangnya.

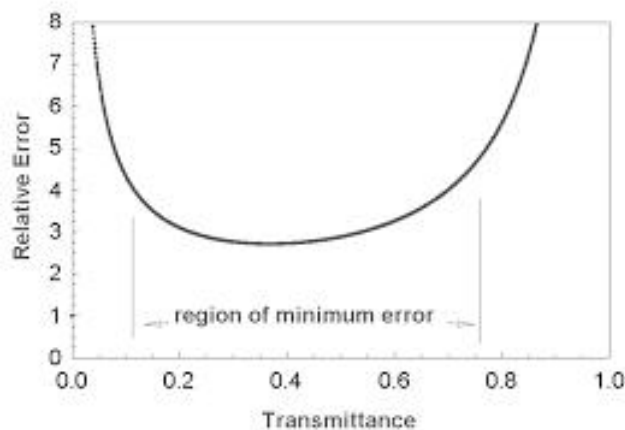
Panjang gelombang	Warna yang diserap	Warna yang diamati/komplemen
400-435 nm	Ungu (lembayung)	Hijau kekuningan
435-480 nm	Biru	Kuning
480-490 nm	Biru kehijauan	Oranye
490-500 nm	Hijau kebiruan	Merah
500-560 nm	Hijau	Merah anggur
560-580 nm	Hijau kekuningan	Ungu (lembayung)
580-595 nm	Kuning	Biru
595-610 nm	Oranye	Biru kekuningan
610-750 nm	Merah	Hijau kebiruan

Pada pengukuran absorban harus dilakukan pada panjang gelombang maksimal sebab pada panjang gelombang maksimal akan memberikan kepekaan (sensitivity) yang tinggi. Di samping itu, pada panjang gelombang maksimal memberikan kesalahan paling kecil. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Perbedaan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal (λ_{maks}) (Band A) dan tidak pada λ_{maks} (Band B). Pengukuran pada λ_{maks} akan memberikan garis linier (Band A). Pengukuran tidak pada λ_{maks} memberikan garis yang tidak linier (Band B).

Nilai pengukuran absorbansi sebaiknya antara 0,2 sampai 0,8 atau nilai transmisinya antara 15% sampai 65% sebab dalam rentang nilai tersebut kesalahan relatifnya (relative error) kecil seperti terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Grafik hubungan antara transmittansi dengan kesalahan relatif.

ALAT

Peralatan yang secara umum diperlukan pada spektrofotometri:

1. Spektrofotometer
2. Kuvet
3. Neraca Analitik
4. Mikropipet (1000 μL dan 200 μL).
5. Labu Takar (berbagai volume: 5 mL, 10 mL, 25 mL)
6. Pipet Volume 1 mL, 5 mL, 10 mL
7. Pipet ukur 5 mL, 10 mL
8. Pro pipet
9. Alat penunjang: gelas kimia, spatula gelas, spatula logam

PERCOBAAN 1

ANALISIS SULFADIAZIN DENGAN METODE SPEKTRIFOTOMETRI ULTRAVIOLET

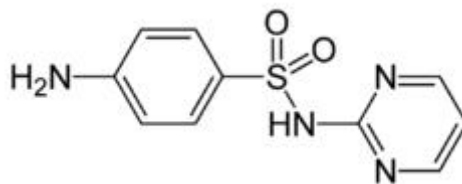
Tujuan

Menetapkan kadar sulfadiazin dengan metode spektrofotometri ultraviolet.

Informasi bahan

Sulfadiazine adalah suatu obat antibiotik untuk mengatasi sejumlah infeksi akibat bakteri. Obat yang masuk ke dalam kelompok antibiotik sulfonamida (sulfa) ini bekerja dengan cara membunuh bakteri atau menghentikan perkembangbiakannya. Sulfadiazine juga bisa digunakan sebagai kombinasi pengobatan untuk toksoplasmosis dan untuk mencegah kekambuhan penderita demam rematik. Formulasi sulfadiazine sediaan tunggal hanya terdapat dalam bentuk oral, topikal, dan parenteral. Terdapat juga kombinasi dengan antibiotik lain dalam bentuk suspensi dan sediaan topikal.

Untuk tujuan analisis kimia kualitatif dan kuantitatif, kandungan sulfadiazin dalam sediaan farmasi dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri ultra violet. Dalam pelarut etanol (p.a), sulfadiazin memiliki λ_{maks} 270 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 844$).



Gambar 5. Struktur molekul sulfadiazin

BAHAN:

Sulfadiazin

Etanol (p.a)

Prosedur Kerja

1. Buat larutan induk (Li) sulfadiazin dalam etanol (p.a).
Timbang 100 mg sulfadiazin, masukkan labu takar 100 mL, tambahkan etanol dan encerkan dengan etanol hingga tanda tera. Larutan ini dinamakan Larutan induk (Li) yang mengandung 1 mg sulfadiazin/mL atau 1 μg sulfadiazin/ μL .
2. Hubungkan spektrofotometer dengan sumber listrik, kemudian tekan tombol on. Biarkan 15 menit untuk conditioning.
3. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan sulfadiazin.
Pipet 100 μL Li (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, masukkan ke dalam labu takar 25 mL, encerkan dengan etanol sampai tanda tera (konsentrasi larutan ini adalah 0,1 mg/25 mL). Ke dalam kuvet masukkan larutan tersebut sebanyak 2/3 volume kuvet. Sebagai blangko, ke dalam kuvet yang lain masukkan etanol (p.a) sebanyak 2/3 volume kuvet. Tempatkan kedua kuvet

tersebut masing-masing pada tempat sampel dan blangko pada spektrofotometer.

Scanning dengan program survey scan pada λ 200 - 400 nm. Cetaklah (print) spektrum hasil scanning tersebut dan catat nilai λ_{maks} -nya.

4. Pembuatan seri larutan kurva baku.

Larutan yang diencerkan berikut ini memiliki kadar dan perkiraan absorban sbb.:

No	Ambil Li (μL)	Etanol yang ditambahkan (μL)	Kadar ($\text{mg}/25 \text{ mL}$)	Perkiraan absorban	Absorban yang terbaca
1.	50	24.950	0,05	0,169	
2.	100	24.900	0,10	0,338	
3.	150	24.850	0,15	0,507	
4.	200	24.800	0,20	0,679	
5.	250	24.750	0,25	0,844	

Ukur absorban seri larutan 1 sampai 5 terhadap blangko etanol pada λ_{maks} : nm yang diperoleh dari hasil scanning.

5. Dari hasil pengukuran absorban larutan sulfadiazin (0,05 sampai 0,25 mg/25 mL), buat grafik kurva baku pada kertas grafik. Grafik yang dibuat menyatakan hubungan antara kadar sulfadiazin (sebagai aksis, sumbu x) dan absorban (sebagai ordinat, sumbu y).
6. Dengan cara yang sama, ukur absorban larutan sampel yang mengandung sulfadiazin pada λ_{maks} seperti pada pengukuran absorban larutan baku sulfadiazin. Catat absorbansinya. Lakukan replikasi sebanyak 4 kali.
7. Dengan menggunakan grafik (no 5), hitung kadar sulfadiazin dalam larutan sampel dengan memplotkan absorban sampel pada grafik kurva baku.
8. Secara statistik, perhitungkan deviasi dari replikasi pengukuran sampel.

PERCOBAAN 2

ANALISIS RIVANOL DAN ASAM SALISILAT DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI VISIBEL

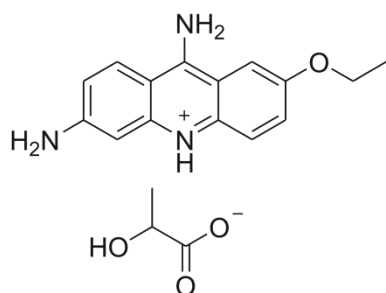
Tujuan

Menetapkan kadar rivanol dan asam salisilat dengan metode spektrofotometri visibel.

Informasi bahan

Rivanol memiliki sinonim nama: ethacridine lactate, acrolaktin, acrinol, ethodin. Rivanol adalah suatu antiseptik yang punya sifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan kuman). Biasanya lebih efektif pada kuman gram positif daripada gram negatif. Sifatnya tidak terlalu iritatif. Rivanol biasa digunakan untuk membersihkan dan mengompres luka maupun kulit.

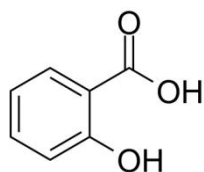
Untuk tujuan analisis kimia kualitatif dan kuantitatif, kandungan rivanol dalam sediaan farmasi dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri visibel. Dalam H_2SO_4 0,1N, rivanol memiliki λ_{maks} 269,5 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 1874$), λ_{maks} 364 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 296$) dan λ_{maks} 410 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 171$).



Gambar 6. Struktur molekul rivanol

Asam salisilat. Asam salisilat adalah obat yang digunakan untuk mengatasi masalah kulit yang disebabkan oleh penebalan dan pengerasan kulit, seperti mata ikan dan kutil di kulit tangan dan kaki. Asam salisilat juga bisa digunakan untuk membantu mengatasi dan mencegah munculnya jerawat. Asam salisilat bekerja dengan cara meningkatkan kelembapan kulit dan mempermudah proses pengelupasan sel kulit mati (keratolitik). Dalam mengatasi jerawat, asam salisilat bekerja dengan cara meredakan peradangan (bengkak dan merah).

Untuk tujuan analisis kimia kualitatif dan kuantitatif, kandungan asam salisilat dalam sediaan farmasi dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri visibel, dengan cara direaksikan terlebih dahulu dengan reagen untuk membentuk kompleks berwarna.



Gambar 7. Struktur molekul asam salisilat

BAHAN

Rivanol	HCl
H ₂ SO ₄	Metanol
Asam Salisilat	Aquades
FeCl ₃	

Prosedur Kerja

Percobaan 2.1. Penetapan kadar rivanol dalam pelarut H₂SO₄ 0,1N

1. Buat larutan H₂SO₄ 0,1 N dalam air sebanyak 500 mL.
Bila tersedia H₂SO₄ pekat (36 N), menggunakan pipet volum ambillah 1,39 mL H₂SO₄ pekat tersebut. Siapkan beker gelas 200 mL yang berisi 100 mL akuades. Masukkan asam sulfat pekat tersebut ke dalam beker gelas melalui dinding perlahan-lahan. Pindahkan ke dalam labu takar 500 mL, encerkan dengan akuades sampai tanda. Larutan H₂SO₄ ini memiliki normalitas kurang lebih 0,1N.
2. Buat Larutan induk (Li) Rivanol.
Timbang 100 mg Rivanol, masukkan ke dalam labu takar 100 mL, tambahkan H₂SO₄ 0,1N sampai tanda. Larutan Li ini mengandung 1 mg rivanol/mL atau 1 µg rivanol/µL.
3. Buat Larutan baku rivanol dalam H₂SO₄ 0,1N.
Pipetlah 750 µL Li (1 µg rivanol/µL), masukkan ke dalam labu takar 25 mL. Encerkan dengan H₂SO₄ 0,1 N hingga tanda tera. Larutan ini disebut dengan larutan baku rivanol yang mengandung 0,75 mg rivanol/25 mL.
4. Hubungkan spektrofotometer dengan sumber listrik, kemudian tekan tombol on. Biarkan 15 menit untuk conditioning.
5. Lakukan scanning (dengan program survey scan) pada λ antara 350-780 nm terhadap blangko (H₂SO₄ 0,1N). Cetaklah (print) spektrumnya, dan catat λmaks-nya.
6. Ukur absorban larutan baku tersebut di atas terhadap blangko H₂SO₄ 0,1N pada λmaks yang diperoleh dari tahap 5. Catatlah nilai absorbansnya.
7. Dengan cara yang sama, ukur absorban larutan sampel. Bila absorban sampel terlalu besar dibanding absorban baku, lakukan pengenceran (usahakan absorban sampel memiliki nilai sama dengan absorban baku ± 10%).
8. Hitung konsentrasi sampel dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi sampel} = \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban baku}} \times \text{Konsentrasi baku} \times \text{faktor pengenceran}$$

Percobaan 2.2. Penetapan kadar asam salisilat dengan reaksi kopling FeCl₃

1. Buat larutan HCl 1% dalam air sebanyak 100 mL.
2. Membuat larutan FeCl₃ 1% sebanyak 100 mL dalam HCl 1%.
3. Pembuatan larutan induk (Li) asam salisilat.

Ditimbang 20,0 mg asam salisilat sebagai baku. Dimasukkan dalam labu takar 50,0 ml, larutkan dalam 5,0 ml metanol. Ditambah aquadest sampai tanda.

4. Penentuan operating time.

a. Pembuatan blanko

Dipipet 1,0 ml metanol dimasukkan dalam labu takar 10 ml, ditambah aquadest sampai tanda (metanol-air). Dipipet 1,0 mL metanol-air dimasukkan dalam labu takar 10 mL, ditambah 1,0 mL FeCl₃ 1% dalam HCl 1%. Ditambah aquadest sampai tanda tera.

b. Dipipet 1,0 ml larutan induk ke dalam labu takar 10 ml. Ditambah 1,0 ml FeCl₃ 1% dalam HCl 1%, tambah aquadest sampai tanda. Diukur absorbansi setelah 1 menit, 2 menit, 3 menit sampai 20 menit, sampai didapat nilai absorbansi yang stabil.

5. Penetapan panjang gelombang maksimum.

Dipipet 1,0 ml larutan induk ke dalam labu takar 10 ml. Ditambah 1,0 ml FeCl₃ 1% dalam HCl 1%, tambah aquadest sampai tanda. Diamkan dalam durasi operating time yang telah diperoleh. Dengan menggunakan blanko, ukur transmittannya dengan panjang gelombang 400 nm sampai 600 nm.

6. Pembuatan kurva kalibrasi

Disiapkan 5 buah labu takar 10 ml. Dipipet larutan induk asam salisilat masing-masing 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 2,5 ml; ke dalam labu takar 10 ml sehingga didapatkan larutan seri standar dengan konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm. Ke dalam labu takar masing-masing labu takar ditambah 1,0 ml FeCl₃ 1% dalam HCl 1% kemudian tambah aquadest sampai tanda. Terhadap blanko, diukur absorbansi masing-masing dengan menggunakan data panjang gelombang maksimum dan operating time yang telah ditentukan.

No	Ambil Li (mL)	Adjust volume hingga (mL)	Kadar (ppm)	Absorbansi yang terbaca
1.	0,5	10,0	20	
2.	1,0	10,0	40	
3.	1,5	10,0	60	
4.	2,0	10,0	80	
5.	2,5	10,0	100	

Dengan data yang diperoleh, tentukan persamaan kurva kalibrasi. $y = bx + a$

7. Penetapan kadar sampel

Sejumlah sampel dengan volume tertentu yang diukur seksama dicampurkan dengan sejumlah tertentu FeCl₃ 1% dalam HCl 1% (1,0 mL setiap pengenceran hingga volume 10 mL), kemudian tambahkan aquadest hingga tanda tera. Terhadap blanko, diukur absorbansi masing-masing dengan menggunakan data panjang gelombang maksimum dan operating time yang telah ditentukan.

Apabila absorbansi hasil pengenceran tersebut belum masuk range 0,2-0,8 maka perkirakan pengenceran yang sesuai. Ulangi kembali pengukuran sampel dengan pengenceran yang disesuaikan.

Kalkulasi kadar sampel dengan kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

PERCOBAAN 3
ANALISIS ASETOSAL DAN ASAM SALISILAT
DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET DUA LAMDA

Tujuan

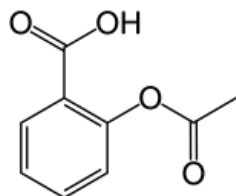
Menetapkan kadar campuran asetosal dan asam salisilat secara simultan dengan metode spektrofotometri ultraviolet.

Informasi bahan

Aspirin atau asam asetilsalisilat (asetosal) adalah sejenis obat turunan dari salisilat yang sering digunakan sebagai senyawa analgesik (penahan rasa sakit atau nyeri minor), antipiretik (penurun demam), dan anti-inflamasi (peradangan). Aspirin juga memiliki efek antikoagulan dan dapat digunakan dalam dosis rendah dalam tempo lama untuk mencegah serangan jantung. Kepopuleran penggunaan aspirin sebagai obat dimulai pada tahun 1918 ketika terjadi pandemik flu di berbagai wilayah dunia.

Asetosal mengalami hidrolisis menjadi asam asetat dan asam salisilat. Asetosal dapat mengalami transfer asil dengan nukleofil yang lain seperti senyawa amin dan group hidroksi. Dalam pH netral hidrolisis asetosal dipercepat oleh katalisis intramolekuler. Maka dalam sediaan maupun pada hasil metabolisme, asetosal sering berada dalam bentuk campuran dengan asam salisilat.

Untuk tujuan analisis kimia kuantitatif, kandungan campuran asetosal dan asam salisilat dalam sediaan farmasi dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri ultraviolet pada dua lamda.



Gambar 8. Struktur molekul asetosal

BAHAN:

Asetosal

Asam salisilat

Kloroform (p.a)

Prosedur Kerja

1. Buat larutan induk (Li) asetosal dan asam salisilat dalam kloroform.
Timbang masing-masing 100 mg asetosal dan asam salisilat, masukkan labu takar 100 mL, larutan dengan kloroform dan tambahkan kloroform sampai batas tanda. Larutan ini dinamakan larutan induk (Li) yang mengandung asetosal dan asam salisilat masing-masing sebesar 1 mg/mL atau 1 µg/µL.

2. Ambil 100 μL Li (atau sejumlah volume tertentu Li yang memberikan absorbansi pada kisaran absorbansi (0,2 - 0,8) masing-masing larutan induk, masukkan dalam labu takar 10 mL, tambahkan kloroform sampai batas tanda.
3. Scanning spektra absorbansi dari 200-400 nm, untuk menentukan panjang gelombang pembacaan λ_1 dan λ_2 . Bahan yang direkam spektranya, meliputi:
 - a) Blanko kloroform
 - b) Asetosal dalam kloroform
 - c) Asam salisilat dalam kloroform
 - d) Campuran asetosal dan asam salisilat dalam kloroform.
4. Menghitung absorbtivitas molar asetosal dan asam salisilat:
 - a) Ukur absorbansi baku asetosal pada λ_1 dan pada λ_2 .
 - b) Ukur absorbansi baku asam salisilat pada λ_1 dan pada λ_2 .

$$A_{\text{asetosal}}^{\lambda_1} = \epsilon_{\text{asetosal}}^{\lambda_1} \cdot b \cdot C_{\text{asetosal}}$$

$$A_{\text{asetosal}}^{\lambda_2} = \epsilon_{\text{asetosal}}^{\lambda_2} \cdot b \cdot C_{\text{asetosal}}$$

$$A_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_1} = \epsilon_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_1} \cdot b \cdot C_{\text{asam salisilat}}$$

$$A_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_2} = \epsilon_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_2} \cdot b \cdot C_{\text{asam salisilat}}$$

5. Untuk sampel, ambil sejumlah volume dan encerkan jika perlu lalu lakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang λ_1 dan λ_2 .
6. Buat persamaan dengan rumus di bawah ini

$$A^{\lambda_1} = A_{\text{asetosal}}^{\lambda_1} + A_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_1}$$

$$A^{\lambda_1} = \epsilon_{\text{asetosal}}^{\lambda_1} \cdot b \cdot C_{\text{asetosal}} + \epsilon_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_1} \cdot b \cdot C_{\text{asam salisilat}}$$

$$A^{\lambda_2} = A_{\text{asetosal}}^{\lambda_2} + A_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_2}$$

$$A^{\lambda_2} = \epsilon_{\text{asetosal}}^{\lambda_2} \cdot b \cdot C_{\text{asetosal}} + \epsilon_{\text{asam salisilat}}^{\lambda_2} \cdot b \cdot C_{\text{asam salisilat}}$$

TEORI DASAR KROMATOGRAFI

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Istilah kromatografi berasal dari kata "chroma" (warna) dan "graphein" (menuliskan). Prinsip pemisahan kromatografi yaitu adanya distribusi komponen-komponen dalam fasa diam dan fasa gerak berdasarkan perbedaan sifat fisik komponen yang akan dipisahkan. Kromatografi dapat digunakan untuk preparatif atau analisa kualitatif dan kuantitatif.

Sistem kromatografi terdiri dari dua bagian penting yaitu fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*, eluen), keduanya saling bersinggungan tetapi tidak saling campur. Fasa diam akan menahan komponen campuran sedangkan fasa gerak akan melarutkan komponen campuran. Pemisahan terjadi apabila terdapat perbedaan rasio distribusi masing-masing substansi antara dua fase tersebut. Perbedaan distribusi pada dua fase ini disebabkan oleh adanya perbedaan interaksi antara komponen-komponen dalam suatu campuran dengan fasa diam dan fasa geraknya. Interaksi ini adalah adsorpsi, partisi, penukar ion dan gel permiasi. Komponen yang interaksi dengan fasa diamnya lebih kuat dibanding dengan fasa geraknya maka komponen itu akan tertahan lebih lama di dalam fasa diam, begitupun sebaliknya. Fase diam dapat ditempatkan dalam kolom kecil yang terbuat dari bahan inert atau dilapiskan di atas penyangga.

Sampel yang akan dipisahkan komponen penyusunnya, dimasukkan ke dalam kolom atau lapisan berisi fase diam dan kemudian dibawa oleh fase gerak yang melaluinya. Masing-masing spesies akan berinteraksi dengan kedua fase tersebut berulang-ulang dari ujung atas (tempat awal sampel diletakkan) hingga ujung akhir. Apabila pemilihan kedua fasa tersebut dilakukan dengan benar, lambat laun komponen sampel akan terpisah berupa pita atau bercak komponen sampel dalam fasa gerak.

Persyaratan utama kromatografi adalah :

- 1) Ada fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam tidak boleh bereaksi dengan fasa gerak.
- 2) Komponen sampel (contoh) harus larut dalam fasa gerak dan berinteraksi dengan fasa tetap (diam).
- 3) Fasa gerak harus bisa mengalir melewati fasa diam, sedangkan fasa diam harus terikat kuat di posisinya.

Berdasarkan cara kontak antara fasa diam dan fasa gerak, dikenal kelompok kromatografi kolom dan kromatografi planar, sebagai berikut :

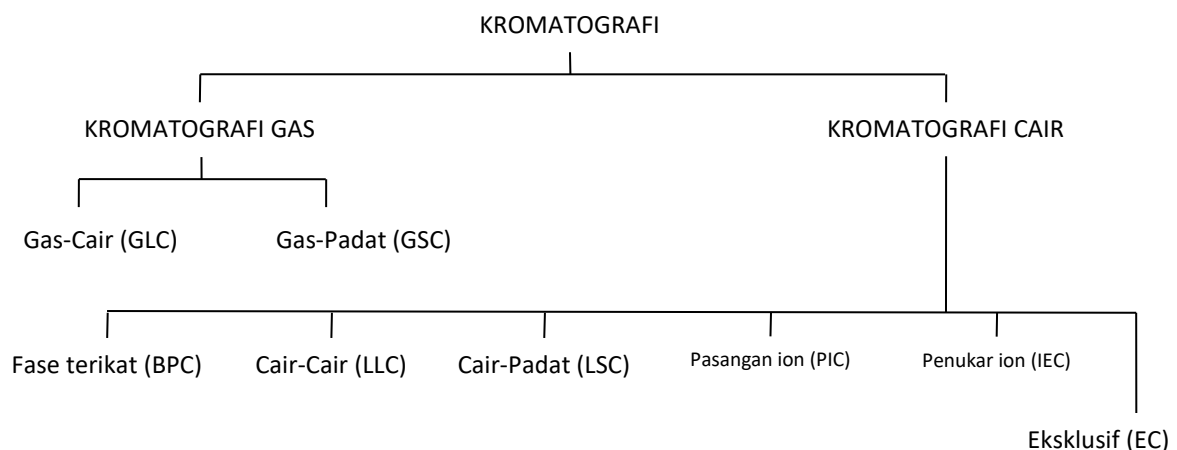
1. Kromatografi kolom : fasa diam ditahan dalam sebuah kolom sempit (terbuka di kedua ujungnya). Fasa gerak mengalir karena efek gravitasi atau tekanan. Fasa diam umumnya berupa padatan atau cairan. Fasa gerak umumnya berupa cairan atau gas dan dialirkan terus menerus. Hasil pemisahan adalah spesi yang keluar dari kolom.
2. Kromatografi planar : fasa diam didukung oleh (dilapiskan pada) plat datar atau lembaran. Fasa gerak bergerak berdasarkan aksi kapiler atau gaya gravitasi. Fasa diam umumnya adalah padatan, sedangkan fasa gerak umumnya adalah cairan. Fasa gerak dialirkan hanya sampai mendekati akhir bidang fasa diam. Hasil pemisahan berupa spot-spot pada lintasan (tract) yang dijalani oleh sampel.

Kromatografi dapat diklasifikasikan menurut jenis fase gerak:

- kromatografi gas (gas chromatography = GC)
- kromatografi cair (liquid chromatography = LC).

Fase diam yang digunakan dalam kromatografi mempunyai sifat yang bermacam-macam, sehingga dapat digunakan untuk dasar klasifikasi selanjutnya.

1. Padat. Padatan yang bersifat sebagai adsorben dapat digunakan sebagai fase diam dengan proses separasi yang terutama berdasarkan kekuatan interaksi fisik permukaan. Bila fase geraknya gas, disebut kromatografi kromatografi gas padat (gas solid chromatography) dan bila fase geraknya cair, disebut kromatografi cair padat (liquid solid chromatography).
2. Cair. Fasa diam cair yang dilapiskan pada penyangga padatan digunakan dalam kromatografi dengan proses separasi berdasarkan partisi antara dua cairan tak tercampur. Bila fase geraknya gas, disebut kromatografi kromatografi gas cair (gas liquid chromatography = GLC) dan bila fase geraknya cair, disebut kromatografi cair-cair (liquid-liquid chromatography = LLC).



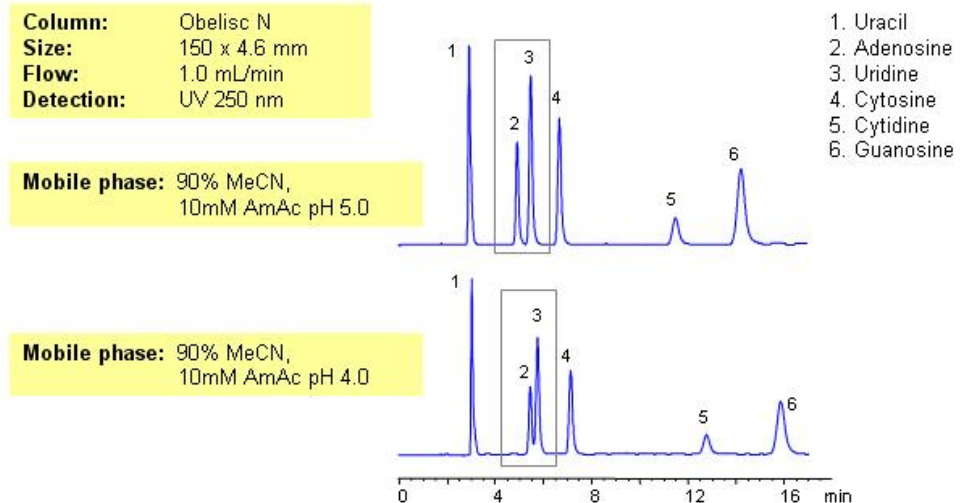
POLA ELUSI KROMATOGRAFI

Apabila sejumlah sampel yang dilarutkan dalam fase gerak, dituangkan pada puncak kolom, maka dengan segera sampel akan terdistribusi di antar kedua fase pada puncak kolom tersebut. Dengan tambahan fase gerak (eluen), solven yang mengandung sebagian dari sampel akan terdesak ke bagian kolom yang lebih bawah, dan akan terjadi distribusi baru antara fase gerak dan fase diam baru. Dalam waktu yang bersamaan, distribusi baru juga terjadi pada puncak kolom antara fase gerak baru dengan fase diam yang telah mengandung sebagian sampel. Karena solut hanya dapat bergerak dengan fase gerak, rata-rata kecepatan migrasi solut tergantung pada fraksi waktu pada saat solut berada dalam fase gerak. Apabila solut mengalami retensi pada fase diam, fraksi waktu ini akan lebih kecil bila dibandingkan terhadap solut yang tidak mengalami retensi. Perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing solut dalam suatu campuran menyebabkan terjadinya pemisahan campuran menjadi pita-pita solut sepanjang kolom. Isolasi masing-masing pita solut dapat dilakukan dengan mengalirkan fase gerak secukupnya untuk membawa pita tersebut sampai akhir kolom sehingga dapat ditampung.

Proses terbawanya solut dari puncak kolom sampai akhir kolom disebut elusi. Apabila detektor yang dapat memberi respon ditempatkan pada ujung akhir kolom, akan diperoleh signal yang digambarkan sebagai fungsi waktu. Plot ini disebut kromatogram. Oleh karena itu kromatogram dapat menunjukkan waktu yang diperlukan untuk elusi suatu pita solut. Waktu yang menunjukkan puncak signal disebut waktu retensi, t_R . Waktu retensi ini spesifik untuk setiap solut sehingga dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk uji kualitatif. Kromatogram juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif, yaitu dengan membandingkan luas puncak dari signal sampel yang dihasilkan oleh detektor dengan signal standar yang telah diketahui kadarnya.

EVALUASI HASIL PEMISAHAN

Kualitas pemisahan yang dihasilkan dari proses kromatografi dapat dilihat dari bentuk kromatogramnya. Idealnya, bentuk kromatogram adalah berupa kurva distribusi normal dengan lebar dasar puncak yang sempit. Masing-masing puncak kromatogram berdiri secara terpisah sehingga tidak ada area puncak yang overlapping (baseline separation). Contoh bentuk kromatogram seperti di bawah ini.



Gambar 9. Contoh kromatogram pemisahan asam nukleat, kromatogram atas menunjukkan kondisi pemisahan yang lebih baik dari pada kromatogram bawah, antara peak 2 (adenosine) dan 3 (uridine) akibat perubahan pH fase gerak.

Beberapa parameter yang dapat dipakai untuk evaluasi hasil pemisahan:

1. Faktor resolusi

Faktor resolusi merupakan parameter yang menggambarkan kemampuan suatu kolom dalam memisahkan dua solut. Resolusi dari dua pita solut yang saling berdekatan didefinisikan sebagai jarak antara kedua maksimum puncak pita tersebut dibagi rata-rata lebar dasar. Faktor resolusi dihitung dengan persamaan:

$$R_s = \frac{tr1 - tr2}{0,5(Wb1 + Wb2)}$$

Keterangan:

tr1 = waktu retensi pita pertama (yang keluar pertama)

tr2 = waktu retensi pita kedua (yang keluar belakangan)

Wb1 = lebar dasar pita pertama

Wb2 = lebar dasar pita kedua

Harga faktor resolusi yang bagus adalah lebih besar dari 1,75.

2. Faktor kapasitas

Faktor kapasitas merupakan besaran yang menyatakan kapasitas kolom menerima solut. Dihitung dengan persamaan:

Keterangan:

$$k' = \frac{tr - tm}{tm}$$

k' = faktor kapasitas

tr = waktu retensi

tm = waktu mati (waktu retensi pelarut)

3. Faktor selektifitas

Faktor selektifitas merupakan faktor yang berpengaruh pada daya pisah kromatografi. Juga disebut sebagai tambat relatif, merupakan rasio tambat antara dua solut yang berbeda setelah dielusi, dinyatakan dengan α .

$$\alpha = \frac{k'2}{k'1}$$

Makin besar harga α akan makin besar selisih waktu tambat solut kedua dengan waktu tambat solut pertama, berarti kedua solut tersebut dapat terpisah dengan baik. Keadaan tersebut menggambarkan kemampuan fase membedakan solut pertama dan kedua.

4. Jumlah lempeng efektif

Jumlah lempeng efektif adalah bilangan yang menyatakan jumlah peristiwa partisi yang dialami oleh solut pada setiap saat yang dibawa fase gerak dari inlet (masuknya solut) sampai outlet (keluarnya solut).

$$N_{eff} = \frac{L}{H}$$

Keterangan:

L = panjang kolom

H = HETP (high efficiency of theoretical plate)

PERCOBAAN 4

ANALISIS RIVANOL, RIBOFLAVIN, SULFADIAZIN, ASETOSAL DAN ASAM SALISILAT DENGAN METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

Tujuan

Menganalisis kandungan campuran dengan metode kromatografi lapis tipis.

Teori

Kromatografi planar dapat menggunakan beberapa jenis fase diam (stationary phase). Kromatografi kertas misalnya, fase diamnya berupa α -selulosa yang memiliki sifat sebagai ion-exchange yang lemah dan bersifat polar. Untuk keperluan pemisahan senyawa yang lipofil, fase diam ini dapat dimodifikasi dengan esterifikasi atau silicone treatment. Untuk pemisahan radiopharmaceuticals dapat dipakai fase diam berupa lapisan glass microfiber yang diimpregnasi dengan silica gel atau silicic acid yang banyak tersedia sebagai Instant Thin Layer Chromatography.

Dalam KLT, silika gel dipakai secara luas sebagai sorbent yang diikatkan pada plat gelas. Untuk meningkatkan daya adesi antara silika dengan gelas, sering ditambahkan bahan pengikat seperti kalsium sulfat. Biasanya elusi dilakukan dengan solven anhidrous sehingga perlu mengatur kadar air atau kelembabannya. Idealnya plat silika ini dipakai pada kadar air 11-12%. Sorbent silika ini dapat dimodifikasi untuk membentuk plate yang bersifat apolar dengan cara:

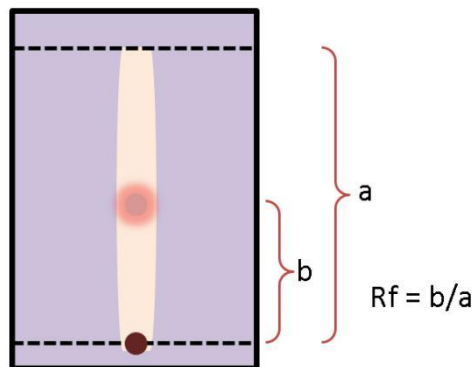
- 1) diimpregnasi dengan parafin liquid, minyak silikon atau lemak. Reverse Phase Chromatography ini dapat digunakan untuk identifikasi hormon steroid.
- 2) mengikatkan secara kimiawi rantai hidrokarbon (seperti monochlorosilane) pada silika gel. Plat ini lebih reproduksibel daripada cara pertama.

Reverse phase silica gel yang diimpregnasi dengan chiral selector (derivat proline) dan ion Cu merupakan sorbent yang paling populer untuk mengontrol kemurnian suatu senyawa misalnya pada campuran D,L Dopa dan D,L Penicillamine. Sorben alumina dapat digunakan untuk pemisahan vitamin larut lemak, alkaloid, dan beberapa antibiotik. Sorbent selulosa digunakan untuk pemisahan sulfonamida, asam nukleat, dan steroid sulfat.

Pemisahan akan optimal apabila ukuran dan lebar penotolan dibuat sekecil mungkin. Overload baik sampel maupun pelarut dapat menurunkan derajat pemisahan. Penotolan secara manual seringkali menyebabkan difusi dan double packing. Volume terkecil yang dapat diaplikasikan secara manual untuk memperoleh reproduksibilitas yang baik adalah 0,5 μ L. Bila volume sampel lebih dari 2-10 μ L, maka penotolan disarankan secara bertahap dengan menunggu totolan kering sebelum penotolan berikutnya. Berikut ini variasi jumlah sampel yang direkomendasikan untuk KLT dan disesuaikan berdasarkan tujuan analisis:

Tujuan	Diameter spot (mm)	Konsentrasi sampel (%)	Jumlah sampel (µg)
Densitometri	2 mm utk 0,5 µL	0,02-0,2	0,1-1 (HPTLC) 1-10 (TLC)
Identifikasi	3 mm utk 1 µL	0,1-1	1-20
Test kemurnian	4 mm utk 2 µL	5	100

Untuk tujuan identifikasi kualitatif, parameter yang diukur dari hasil elusi KLT adalah faktor retardasi (Rf). Rf diukur dengan membandingkan jarak yang ditempuh bercak senyawa terhadap jarak yang ditempuh eluen/solven/fase gerak.



Gambar 10. Hasil elusi pada plat KLT

Alat

Bejana elusi dan tutup
Lampu UV 254, 366
Pipa kapiler
Flakon
Pensil
Penggaris
Mikropipet

Bahan

Plat KLT Silica Gel GF254
Kertas saring
Rivanol
Riboflavin
Sulfadiazin
Asetosal
Asam salisilat

Prosedur Kerja

- Sistem Kromatografi yang akan digunakan:
Senyawa: rivanol, riboflavin, sulfadiazin, asetosal, asam salisilat
Fase Diam: Silika Gel GF254
Fase Gerak: kloroform - etanol - air 9:9:1
- Aktivasi plat KLT dengan cara memanaskan plat dalam oven pada suhu 105°C selama 2 jam.
- Buat 5 mL larutan standard zat yang akan diperiksa, dengan konsentrasi 0,5-2,0 µg/µL dalam pelarut yang cocok.
- Totolkan larutan standard dan larutan sampel masing-masing 1-2 µL pada plate yang telah diaktivasi. Penotolan dilakukan dengan pipa kapiler atau white/yellow tip mikropipet.

Jarak antar totolan minimal 1 cm dan jarak totolan dari tepi plat sekitar 1,5 cm. Tunggu totolan mengering.

5. Jenuhi bejana kromatografi dengan uap eluen yang sesuai. Caranya masukkan campuran eluen tersebut ke dalam bejana sedemikian sehingga ketinggian eluen 0,5 cm. Masukkan sepotong kertas saring dengan posisi bagian bawah tercelup eluen dan bagian atas menyentuh tutup bejana. Tutup bejana rapat-rapat, supaya bejana jenuh dengan uap solven, dan uap tidak keluar dari bejana. Tunggu hingga kertas saring dibasahi seluruhnya oleh eluen.
6. Masukkan plat ke dalam bejana yang telah jenuh. Posisikan dengan baik, jangan sampai totolan tercelup ke dalam eluen. Sandarkan plat pada posisi agak miring, tidak terlalu tegak, supaya stabil. Tunggu hingga eluen merambat sampai jarak 10 cm, atau hingga eluen mencapai 1 cm dari tepi atas plat.
7. Angkat plat dari dalam bejana, biarkan mengering pada suhu kamar. Lihat di bawah sinar UV 254 dan 366 nm. Amati bercak yang timbul.
8. Catat jarak rambat yang ditempuh oleh senyawa yang dianalisis. Hitung harga Rf, dan parameter resolusi (Rs).

Catatan data KLT:

Fase diam:

Fase gerak:

Jarak rambat fase gerak:

Volume penotolan sampel campuran:

Nama senyawa	Volume penotolan	Harga Rf	Parameter Rs
Rivanol			
Riboflavin			
Sulfadiazin			
Asetosal			
Asam salisilat			

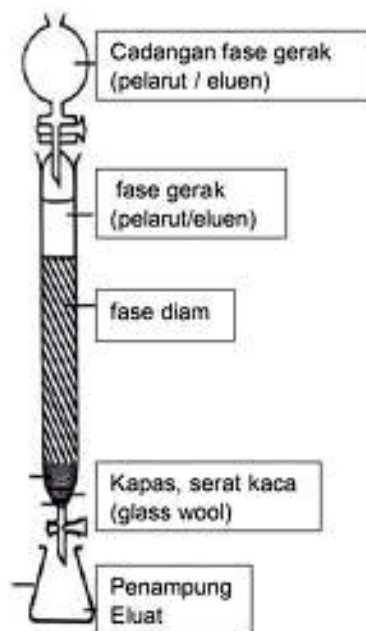
PERCOBAAN 5
ANALISIS RIVANOL DAN RIBOFLAVIN
DENGAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM

Tujuan

Memisahkan campuran bahan obat menjadi komponen-komponennya menggunakan kromatografi kolom.

Teori

Kromatografi Kolom merupakan Metode pemisahan yang di dasarkan pada pemisahan daya adsorpsi suatu adsorben terhadap suatu senyawa, baik pengotornya maupun hasil isolasinya. Seberapa jauh komponen itu dapat diserap absorben tergantung pada sifat fisika komponen tersebut. Prinsip kerja kromatografi kolom perbedaan daya serap dari masing-masing komponen, campuran yang akan diuji, dilarutkan dalam sedikit pelarut lalu di masukan lewat puncak kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat menyerap. Senyawa yang lebih polar akan terserap lebih kuat sehingga turun lebih lambat dari senyawa non polar terserap lebih lemah dan turun lebih cepat. Zat yang diserap dari larutan secara sempurna oleh bahan penyerap berupa pita sempit pada kolom. Pelarut lebih lanjut / dengan tanpa tekanan udara masing-masing zat akan bergerak turun dengan kecepatan khusus sehingga terjadi pemisahan dalam kolom.



Gambar 11. Susunan Kolom Kromatografi

Alat

Kolom kromatografi
Gelas beker

Bahan

Alumina
Rivanol

Corong
Erlenmeyer
Tabung reaksi
Pipet volume
Pipet ukur
Mikropipet

Riboflavin
Etanol
Air

Prosedur Kerja

1. Sistem kromatografi yang akan digunakan:
Senyawa: rivanol, riboflavin
Fase diam: alumina II
Fase gerak: etanol-air 9:1
2. Menyiapkan kolom
 - a) Siapkan kolom kaca yang akan digunakan. Berilah glass wool/kapas pada ujung bawah kolom agar butiran halus fase diam tersangga dan tidak jatuh keluar. Jangan lupa keran kolom ditutup.
 - b) Tuangkan cairan fase gerak sampai setengah tinggi kolom. Fase diam alumina ($\phi 125\mu\text{m}$) yang telah diaktivasi dimasukkan ke dalam kolom sampai tinggi yang dikehendaki, sambil sesekali kolom diketuk-ketuk agar fase diam dapat tertata dengan rapi dan gelembung udara yang terjerat dapat keluar.
 - c) Keluarkan cairan fase gerak dengan membuka keran kolom, sisakan cairan fase gerak hingga tepat di atas fase diam (jangan sampai kering).
3. Menyiapkan sediaan yang akan diuji.
 - a) Sediaan yang akan diuji dilarutkan dalam sedikit pelarut yang sesuai, kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang telah disiapkan di atas.
 - b) Buka keran hati-hati hingga analit terjerap ke dalam fase diam. Fase gerak dimasukkan hati-hati menggunakan pipet sedikit demi sedikit agar tidak merusak permukaan kolom fase diam.
 - c) Setelah semua analit masuk ke dalam fase diam dan merambat sampai 0,5 cm dari permukaan fase diam, selanjutnya masukkan fase gerak dalam volume yang lebih banyak lagi hingga seluruh analit keluar.
4. Mengukur kadar analit dengan spektrofotometer.
 - a) Tampung hasil elusi dalam tabung reaksi. Setiap 5 menit sekali tempat tampungan diganti. Periksa kadar analit tiap fraksi tersebut dengan menggunakan spektrofotometer yang telah dioptimasi terlebih dahulu.
 - b) Dengan membuat kurva baku hubungan konsentrasi standard yang sesuai versus absorbansi maka akan diperoleh konsentrasi analit yang terkandung dalam tiap fraksi eluat.
 - c) Hitung konsentrasi total tiap jenis analit yang diperiksa.
5. Evaluasi pemisahan dari sistem kromatografi yang digunakan

- a) Buat kurva hubungan antara nomor fraksi atau waktu (sebagai sumbu x) dan konsentrasi fraksi (sebagai sumbu y).
- b) Amati bentuk kurva yang dihasilkan. Titik puncak kurva menggambarkan waktu retensi analit.
- c) Lakukan perhitungan parameter pemisahannya. Berapa harga faktor resolusi dan jumlah plate teoritiknya?

Catatan data Kromatografi Kolom:

Fase diam:

Panjang kolom:

Diameter kolom:

Fase gerak:

Volume sampel:

Detektor: Spektrofotometer Uv Vis, panjang gelombang: nm.

Data konsentrasi analit tiap fraksi:

Fraksi ke	Volume	Konsentrasi

Data tiap analit:

Nama analit	Waktu retensi (menit)	Konsentrasi total (ppm)	Rs
Rivanol			
Riboflavin			

DAFTAR PUSTAKA

1. N. Feladita, A. Retnaningsih, P. Susanto, 2019. Determination of Salicylic Acid's Level in Acne Cream which Sold in Kemiling Using Spectrophotometry UV VIS. *Jurnal Analisis Farmasi*, 4 (2), 101-107.
2. M. Dolores et. Al., 2016, Development and Validation of an Alternate Stability indicating UV Spectrophotometric Analytical Method for Aspirin in Tablets, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(6):810-817.
<https://www.semanticscholar.org/paper/Development-and-Validation-of-an-Alternate-UV-for-Dolores-Morales-Hip%C3%B3lito/f014f6f2ed0cbd6424bd52c693722852d20a5b5e>
3. Hardjono Sastrohamidjojo. (2018). *Dasar-dasar Spektroskopi*. Yogyakarta : UGM Press.
4. Dwiwarso Rubiyanto. (2017). *Metode Kromatografi: Prinsip Dasar, Praktikum dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi*. Yogyakarta : Deepublish.
5. Kemendikbud. (2018). *Modul Diklat : Melaksanakan Analisis Secara Kromatografi Konvensional Mengikuti Prosedur*. Jakarta : Kemdikbud RI.
6. Tim Pembimbing Praktikum Kimia Analisis II. 2006. *Petunjuk Praktikum Kimia Analisis II. Bagian Kimia Farmasi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta.
7. E. Lukitaningsih. 2004. *Petunjuk Praktikum Kromatografi. Laboratorium KFA Instrumental, Bagian Kimia Farmasi*, Fakultas Farmasi UGM: Yogyakarta.