

FM-UAD-PBM-12-04/RO

**PETUNJUK PRAKTIKUM
KIMIA ANALISIS INSTRUMEN**

PP/FAR/PAK/05/4



DI SUSUN OLEH:

Nina Salamah, M.Sc., Apt
Prof. Dr. Any Guntarti, M.Si., Apt
Dr. Hari Susanti, M.Si., Apt
Aprilia Kusbandari, M.Sc., Apt

**LABORATORIUM KIMIA ANALISIS
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
YOGYAKARTA
2016**

DAFTAR ISI

Jenis Praktikum	Halaman
Kata Pengantar	
Tata tertib praktikum	
Keamanan dan keselamatan Kerja laboratorium	
Ketentuan inhal	
Spektrofotometri	
Percobaan (I) Spektrofotometri Ultra Violet	
Percobaan (II) Spektrofotometri Sinar Tampak	
Percobaan (III) Spektrofluorimetrik	
Percobaan (IV) KLT/KLT Densitometri	
Percobaan (V) Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	
Percobaan (VII) Analisis Secara Elektrokimia	

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil Alamin, karena hanya dengan petunjuk dan ridhlo-Nya petunjuk praktikum instrument ini telah dapat kami susun.

Kami menyadari sepenuhnya bahwa petunjuk praktikum ini jauh dari sempurna, karena itu diperlukan kritik yang membangun untuk kesempurnaan buku petunjuk praktikum ini.

Buku petunjuk ini hanya sebagai pengantar mahasiswa dalam menjalankan praktikum, bukan merupakan pegangan pokok untuk mendalami teori tentang penggunaan instrumen, karena itu mahasiswa masih sangat perlu mendalami teori berbagai mata praktikum tersebut pada buku resmi yang tercantum dalam tiap daftar pustaka tiap mata praktikum.

Yogyakarta, Februari 2016

Team Penyusun Lab. Kimia Farmasi

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

TATA TERTIB LABORATORIUM KIMIA ANALITIK TATA TERTIB PRAKTIKUM DARING

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai Praktikan.

Berikut tata tertib Praktikum Analisis Instrumen 2021:

1. Praktikum diawali dengan proses asistensi oleh dosen pembimbing masing-masing pada minggu pertama perkuliahan (8-13 Maret 2021), dengan media sesuai kesepakatan dosen dan mahasiswa
2. Mahasiswa melakukan pretes dengan dosen pembimbing terhadap materi yang akan dipraktikkan pada 6 minggu setelah asistensi, dengan syarat membuat laporan sementara
3. Mahasiswa diperkenankan mengikuti praktikum (6 minggu berikutnya) secara daring apabila sudah lulus pretes dengan dosen pembimbing
4. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum pretes dan praktikum dimulai pada media daring yang sudah disepakati, keterlambatan lebih dari 15 menit sejak praktikum dimulai tanpa ada alasan yang dapat diterima, praktikan boleh mengikuti praktikum tapi tidak memperoleh nilai praktikum dan nilai laporan.
5. Pada saat pretes mahasiswa diwajibkan menyiapkan laporan sementara yang berisi judul praktikum, tujuan praktikum, dasar teori, mekanisme reaksi, metode analisa apa saja terkait sampel yang digunakan, cara kerja skematis (analisis kualitatif & kuantitatif, pembuatan larutan maupun yg lainnya, rancangan analisis termasuk perhitungan, dan daftar pustaka, semuanya ditulis tangan serta jurnal

dan buku yang relevan (pengumpulan laporan sementara sesuai kesepakatan mhs dan dosen pretesnya)

6. Pada saat praktikum praktikan wajib membawa: laporan sementara, jurnal dan buku yang relevan sebagai bahan diskusi dengan dosen secara online
7. Praktikan wajib mengisi daftar presensi (sesuai kesepakatan mhs dan dosen)
8. Praktikan pada saat praktikum disarankan aktif bertanya pada dosen jika ada hal yang belum dipahami terkait praktikumnya.
9. Praktikan membuat laporan praktikum dan mengumpulkan ke dosen maksimal 1 minggu setelah praktikum online dilakukan (format laporan : seperti laporan sementara pada point 5 di tambah analisis data hasil dan pembahasan serta kesimpulan)
Format Cover laporan bisa dilihat pada lampiran.

KEAMANAN & KESELAMATAN KERJA LABORATORIUM (PADA PRAKTIKUM OFFLINE)

1. Rencanakan percobaan yang akan dilakukan sebelum memulai praktikum.
2. Sediakanlah alat-alat yang akan dipakai di atas meja. Alat-alat yang tidak digunakan sebaiknya disimpan didalam almari supaya tidak mengganggu dalam bekerja
3. Gunakan perlatan kerja seperti masker, jas laboratorium untuk melindungi pakaian dan sepatu tertutup untuk melindungi kaki.
4. Zat yang akan dianalisis disimpan dalam tempat tertutup agar tidak kena kotoran yang mempersulit analisis
5. Dilarang memakai perhiasan yang dapat rusak karena bahan kimia.
6. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.
7. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia.
8. Hindari mengisap langsung uap bahan kimia, tetapi kipaslah uap tersebut dengan tangan ke muka anda
9. Dilarang mencicipi atau mencium bahan kimia kecuali ada perintah khusus.
10. Bahan kimia dapat bereaksi langsung dengan kulit menimbulkan iritasi (pedih atau gatal).
11. Baca label bahan Kimia sekurang-kurangnya dua kali untuk menghindari kesalahan.
12. Pindahkan sesuai dengan jumlah yang diperlukan, jangan menggunakan bahan Kimia secara berlebihan.

13. Jangan mengembalikan bahan kimia ke dalam botol semula untuk mencegah kontaminasi.
14. Biasakanlah mencuci tangan dengan sabun dan air bersih terutama setelah melakukan praktikum.
15. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
16. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
17. Dilarang menggunakan kontak lensa pada saat praktikum.
18. Jagalah kebersihan meja praktikum, apabila meja praktiukm basah segera keringkan dengan lap
19. Hindarkan dari api bahan-bahan yang mudah terbakar seperti eter, kloroform, dsb.
20. Hati-hati dalam menggunakan bahan-bahan yang adapat menimbulkan luka bakar, misalnya asam-asam pekat (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl), basa-basa kuat (KOH , $NaOH$, dan NH_4OH), dan oksidator kuat (air brom, iod, senyawa klor, permanganat)
21. Percobaan dengan penguapan menggunakan asam-asam kuat dan menghasilkan gas-gas beracun dilakukan di almari asam
22. Jangan memanaskan zat dalam gelas ukur/labu ukur
23. Menetralkan asam/basa
 - asam pada pakaian: dengan amonia encer
 - basa pada pakaian : dengan asam cuka encer, kemudian amonia encer
 - asam/basa pada meja/lantai: dicuci dengan air yang banyak
 - asam, basa, dan zat-zat yang merusak kulit: dicuci dengan air, kemudian diberi vaselin
24. Bila terjadi kecelakaan yang berkaitan dengan bahan kimia, laporkan segera pada dosen atau asisten jaga

KETENTUAN INHAL

Inhal adalah pengganti yang diadakan karena praktikan tidak mengikuti pretes/praktikum sesuai jadwal yang telah ditentukan.

- a. Permohonan inhal (pretes/praktikum) dapat diajukan oleh mahasiswa apabila:
 - 1) Mengalami kejadian tidak diinginkan (sakit, dll), dengan melampirkan surat keterangan dari dokter dan pihak berwenang;
 - 2) Mengikuti acara mendadak yang ditugaskan oleh Universitas atau Fakultas, dengan melampirkan surat undangan/bukti penugasan;
 - 3) Mengalami kegagalan dalam percobaan/praktikum.
 - 4) Inhal hanya diberikan 1 (satu) kali, kecuali ada alasan kuat yang mendukung permohonan inhal lebih dari yang dimaksud.
 - 5) Inhal praktikum maksimal 3 kali.
- b. Mengisi Form Surat Keterangan Inhal (Pretes/Praktikum) yang bisa diambil di laboran kemudian dimintakan tandatangan ke Koordinator Praktikum dengan melampirkan bukti pendukungnya.
- c. Surat inhal diisi dan dimintakan tandatangan ke koordinator paling lambat 4 hari sebelum pelaksanaan praktikum ataupun pretes.

Membayar biaya inhal sejumlah Rp. 25.000,00/mahasiswa, sedangkan untuk inhal pretes tidak dikenakan biaya.

TEKNIK KERJA LABORATORIUM

A. Teknik Analisis Kualitatif

1. *Reaksi pembentukan warna atau pembentukan endapan.* Jika tidak dinyatakan lain, ambil kira-kira 1 ml (20 tetes) larutan sampel, masukkan tabung reaksi (jika masih ada proses selanjutnya) atau druppel plat (jika tidak ada proses selanjutnya), tambahkan pereaksi secukupnya secara bertetes-tetes sampai terjadi perubahan warna. Jika pereaksi yang digunakan sudah cukup banyak (± 1 ml) tetapi tidak terjadi perubahan warna ataupun menghasilkan endapan, maka hasil reaksi dinyatakan negatif.
2. *Cara memanaskan zat dalam cawan porselin/erlenmeyer/gelas beker*



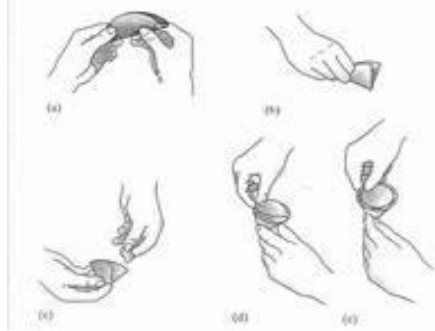
- ambillah kaki tiga dan letakkan kasa kawat di atasnya
- letakkan gelas kimia yang berisi larutan di atas kasa dan panaskan dengan pemanas spiritus

Gambar 1. Cara Memanaskan

3. *Cara memanaskan zat dalam tabung reaksi*
 - jepit tabung reaksi yang berisi larutan dengan penjepit kayu/besi,

- panaskan dengan nyala api spiritus, api pemanas hendaknya terletak pada bagian atas larutan
- goyangkan tabung reaksi agar pemanasan merata
- arahkan mulut tabung reaksi pada tempat yang aman agar percikannya tidak melukai orang lain maupun diri sendiri

4. Cara menyaring endapan



- gunakan kertas saring yang dibentuk seperti gambar disamping saringlah sedikit demi sedikit, kira-kira banyaknya larutan adalah

Gambar 2. Cara Menyaring

- sepertiga tinggi kertas

5. *Cara mencuci endapan pada kertas saring.* Arahkan aliran air dari sebuah botol pencuci pertama-tama di sekitar pinggir atas kertas saring menyusul gerakan spiral (memutar ke arah dalam) menuju endapan dan tiap pencucian kertas saring terisi antara separuh sampai dua pertiganya
6. *Cara reaksi kristal dengan mikroskop.* 1 tetes larutan *sampel pada objek glass, tambahkan 1 tetes pereaksi, tutup dengan deck glass.*

Tempatkan pada mikroskop, atur perbesaran hingga gambar kristal terlihat jelas.

B. Teknik Analisis Kuantitatif

1. Penimbangan

a. Neraca Analitik Digital

Neraca analitik merupakan alat yang digunakan dalam analisis untuk penentuan bobot suatu bahan. Pengukuran dengan neraca analitik digital memiliki ketelitian tinggi, skala kecil/mikro (biasanya hingga 4 desimal 0,0001 gram). Neraca ini dibedakan menjadi 4 berdasarkan ketelitiannya :

1. Timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg
2. Timbangan semi mikro dengan ketelitian 0,01 mg
3. Timbangan mikro dengan ketelitian 0,001 mg
4. Timbangan ultra mikro dengan ketelitian, 0,0001 mg



Gambar 3. Neraca Analitik Digital

b. Prosedur Pengoperasian

1. Disiapkan timbangan analitik dalam kondisi seimbang atau water pass (atur sekrup pada kaki neraca sehingga gelembung air diwater pass tepat berada di tengah).
2. Neraca dibersihkan dengan menggunakan kuas terutama piringan neraca dan seluruh timbangan
3. Tancapkan stop kontak pada stavolt.
4. Tekan tombol On (tunggu hingga muncul angka 0,0000 g)
5. Masukkan alas bahan (gelas arloji, kertas atau benda tipis).
6. Tutup kaca neraca analitik dan tekan tombol zero
7. Buka kaca dan masukkan bahan yang akan ditimbang
8. Tutup kaca dan tunggu hingga angka di layar monitor neraca analitik tidak berubah
9. Ambil bahan yang telah ditimbang kemudian matikan neraca (tekan tombol Off)
10. Lepaskan stop kontak dari stavolt
11. Bersihkan kembali ruang dalam neraca analitik dengan menggunakan kuas.

c. Pengontrolan Neraca

Timbangan / Neraca dikontrol dengan menggunakan anak timbangan yang sudah terpasang atau dengan dua anak

timbangan eksternal, misal 10 gr dan 100 gr. Timbangan/Neraca elektronik harus menunggu 30 menit untuk mengatur temperatur. Jika menggunakan timbangan yang sangat sensitif hanya dapat bekerja pada batas temperatur yang ditetapkan. Timbangan harus terhindar dari gerakan (angin) sebelum menimbang angka “nol” harus dicek dan jika perlu lakukan koreksi. Penyimpangan berat dicatat pada lembar / kartu kontrol, dimana pada lembar tersebut tercantum pula berapa kali timbangan harus dicek. Jika timbangan tidak dapat digunakan sama sekali maka timbangan harus diperbaiki.

d. Proses Pengukuran

Proses penimbangan menggunakan neraca digital perlu diperhatikan beberapa hal berikut :

1. Pastikan bahwa timbangan sudah menyala.
2. Pastikan timbangan menunjukkan angka ‘nol’ (jika tidak perlu di koreksi).
3. Letakkan benda yang massanya akan diukur pada piringan tempat benda.
4. Baca skala yang tertera pada display digital sesuai skala satuan timbangan tersebut.

5. Untuk pengukuran yang sensitivitasnya tinggi perlu menunggu 30 menit, karena hanya dapat bekerja pada batas temperatur yang ditetapkan.

e. Jenis Penimbangan



Penimbangan. Gunakan sendok untuk mengambil zat yang akan ditimbang. Pilih timbangan yang tepat sesuai kapasitasnya. Jangan menimbang zat melebihi kapasitas maksimal timbangan yang digunakan. Catat hasil timbangan. Perhatikan contoh perintah penimbangan berikut:

Gambar 4. Cara Menimbang

* *“Timbang dengan saksama...”* artinya: deviasi penimbangan tidak boleh lebih dari 0,1% dari jumlah yang ditimbang. Misalnya dengan pernyataan timbang seksama 500 mg, berarti batas kesalahan penimbangan tidak boleh lebih dari 0,5 mg. Oleh karena itu, penimbangan harus dilakukan dengan neraca analitik kepekaan minimal 0,5 mg. Penimbangan saksama dapat juga dinyatakan dengan menambahkan angka 0 dibelakang koma pada akhir bilangan bersangkutan. Misalnya, dengan pernyataan timbang 200.0 mg

* *“Timbang lebih kurang...”* artinya: jumlah yang harus ditimbang tidak boleh kurang dari 90% dan tidak boleh lebih dari 110% dari jumlah yang harus

a) **Menimbang Langsung**

Cara menimbang langsung

- berat botol timbang kosong = 10.2368 g

- berat botol timbang + zat = 10.8796 g -

→ berat zat = **0.6428 g**

b) **Menimbang tidak langsung**

Cara menimbang tidak langsung

- berat botol timbang + zat = 12.3456g

- berat botol timbang + sisa zat setelah dituang ke beaker glass = 11.6952

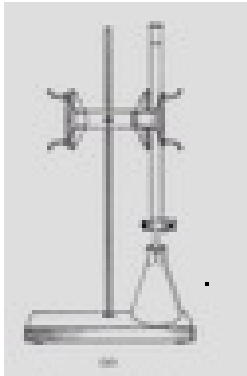
→ berat zat = **0.6504 g**

2. *Pengukuran.*

Pengukuran volume larutan bisa menggunakan gelas ukur, kecuali jika dinyatakan perintah *“ukur dengan saksama...”*, dimaksudkan bahwa pengukuran dilakukan dengan memakai pipet standar dan harus digunakan sedemikian rupa sehingga kesalahannya tidak melebihi batas yang ditetapkan. Penggunaan pipet dapat diganti dengan buret yang sesuai dan memenuhi standar. Pengukuran saksama dapat juga dinyatakan dengan menambahkan angka 0 di belakang angka koma

terakhir bilangan yang bersangkutan. Misalnya dengan pernyataan pipet 10,0 ml atau ukur 10,0 ml dimaksudkan bahwa pengukuran harus dilakukan dengan saksama.

3. Penggunaan buret



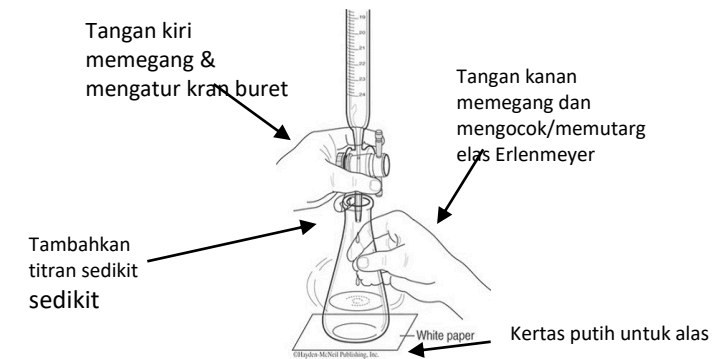
- Periksa terlebih dahulu apakah buret dalam kondisi baik (tidak pecah atau bocor), berikan sedikit saja vaselin pada kran agar pengaturan penetesannya mudah dilakukan.
- Bersihkan buret sebelum digunakan dengan air, bilaslah buret tersebut dengan sedikit zat kimia yang akan dimasukkan ke dalamnya.
- Pasang buret pada statif dan klem agar posisinya stabil seperti gambar
- Masukkan zat kimia yang akan digunakan ke dalam buret tersebut dengan menggunakan corong. Lakukan pengisian sampai seluruh bagian buret terisi (perhatikan bagian bawahnya!) dan tidak terdapat gelembung gas pada buret.

4. Pemilihan buret.

Lakukan titrasi orientasi terlebih dahulu menggunakan buret kapasitas 50,0 ml. Untuk selanjutnya, pada titrasi replikasi pemilihan buret harus berdasarkan ketentuan: Volume terukur yang teliti adalah sebanyak 30 – 70% dari kapasitas buret. Jadi, jika dari hasil orientasi didapat volume titrasi 10,0 ml, maka titrasi selanjutnya gantilah dengan buret kapasitas 25,0 ml

5. Cara titrasi.

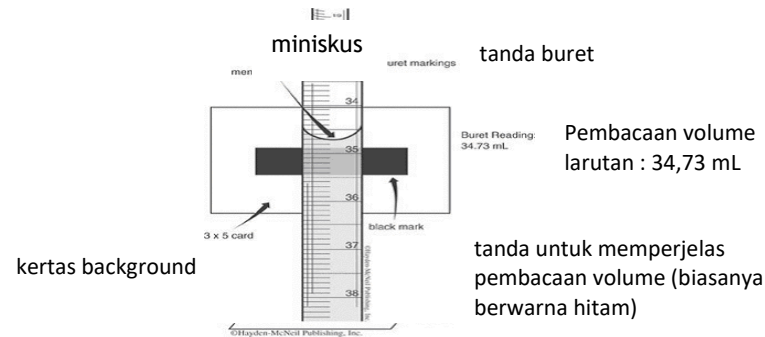
Zat yang akan dititrasi disebut sebagai **titrat** (ditampung dalam erlenmeyer), sedangkan larutan yang digunakan untuk menitrasi disebut sebagai **titran** (dimasukkan ke dalam buret). Posisi tangan pada saat titrasi ditunjukkan seperti gambar dibawah.



Gambar 5. Cara Titrasi

6. Pembacaan volume titrasi.

Mata harus sejajar miniskus, gunakan miniskus bawah untuk menentukan volume titrasi. Jangan lupa perhatikan skala buret, karena masing-masing kapasitas buret memiliki skala yang berbeda.



Gambar 6. Cara Membaca Buret

7. Penetapan dalam duplo.

Lakukan penetapan paling sedikit dua kali. Jika kesesuaian hasilnya lebih dari 0,4 hasil tersebut tidak dapat dirata-rata. Jika digunakan volume larutan sampel yang sama, maka pembacaan buret tidak boleh berselisih lebih dari 0,05 ml. Jika syarat-syarat ini tidak tercapai, maka harus dilakukan titrasi ulang sampai diperoleh selisih yang tidak lebih dari 0,05 ml.

8. Penulisan angka penting

Angka penting adalah semua digit dalam suatu bilangan (diperoleh dari pengukuran) yang bersifat pasti plus satu yang mengandung

suatu ketidakpastian (perkiraan). Penulisan angka hasil pengukuran, pada hakekatnya berkaitan dengan ketelitian alat yang dipakai. Cara penulisan angka penting mengikuti kaidah sebagai berikut :

- Secara umum, penulisan hasil pengukuran hanya terdapat satu angka yang harganya tak tentu (*uncertain*), yaitu angka terakhir. Contoh : penulisan hasil pembacaan buret makro dengan skala terkecil 0,1 ml seharusnya ditulis dua desimal, misalnya 12,65 ml. Angka 5 merupakan angka tidak pasti karena terletak antara 12,60-12,70 ml.
- Banyaknya desimal hasil penjumlahan atau pengurangan sama dengan faktor yang mengandung desimal paling sedikit.
- Banyaknya desimal hasil perkalian atau pembagian sama dengan satu angka lebih banyak daripada yang terdapat pada faktor yang mengandung desimal paling sedikit.
- Penulisan hasil akhir yang memerlukan pembulatan angka desimal, maka angka desimal 5 atau lebih dibulatkan ke atas, sedangkan angka desimal < 5 dibulatkan ke bawah

SPEKTROFOTOMETRI

A. PENDAHULUAN

Spektrofotometri dalam percobaan ini dibedakan atas dua mata praktikum. Pertama praktikum spektrofotometer sinar ultra violet dan ke dua spektrofotometer sinar tampak. Sinar ultra violet adalah sinar gelombang elektro magnetik yang berpanjang diantara 190 sampai 380 nm. Sedangkan sinar tampak sinar elektromagnetik mempunyai panjang gelombang antara 380 sampai 780 nm (Anonim, 1995). Adapun prinsip utama analisis spektrofotometri adalah dari suatu molekul obat yang mempunyai kromofor dan dapat menyerap sinar ultra violet atau sinar tampak karena adanya elektron dari molekul obat tersebut yang mudah tereksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi sesuai dengan tenaga yang diserap.

Apabila dua buah atom saling berikatan dan membentuk molekul maka akan terjadi tumpang tindih dua orbital dari kedua atom yang masing-masing mengandung satu elektron dan kemudian terbentuk orbital molekul. Ada 2 macam orbital molekul, yaitu:

1. Orbital ikatan yang energinya lebih rendah dibanding energi orbital atom semula.
2. Orbital anti ikatan yang energinya lebih tinggi dibanding energi orbital atom semula, yang telah menyerap tenaga atau pancaran sinar.

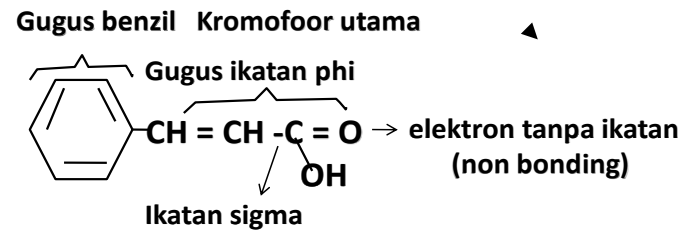
Pada keadaan azas (*ground state*) elektron yang berada pada orbital ikatan mempunyai spin yang arahnya berlawanan, sedangkan orbital anti ikatan kosong. Jika pada molekul yang dalam keadaan azas ini dikenakan suatu energi gelombang elektromagnetik maka akan terjadi penyerapan energi. Besarnya energi yang diserap adalah tepat sama dengan perbedaan antara energi anti ikatan dan energi ikatan. Akibat dari penyerapan energi tersebut (kemungkinan energi yang sesuai dengan gelombang elektromagnetik pada daerah sinar ultra violet dan tampak) maka salah satu elektron dari orbital ikatan berpindah ke orbital anti ikatan dan keadaan ini disebut keadaan **tereksitasi (*excited state*)**. Perpindahan elektron tersebut mungkin tidak diikuti dengan perubahan arah spin dan disebut tereksitasi **singlet**, mungkin juga diikuti dengan perubahan arah spin elektron dan keadaan ini disebut keadaan tereksitasi **triplet**.

Elektron dalam molekul obat/ senyawa kimia dapat dibedakan menjadi 3 yaitu:

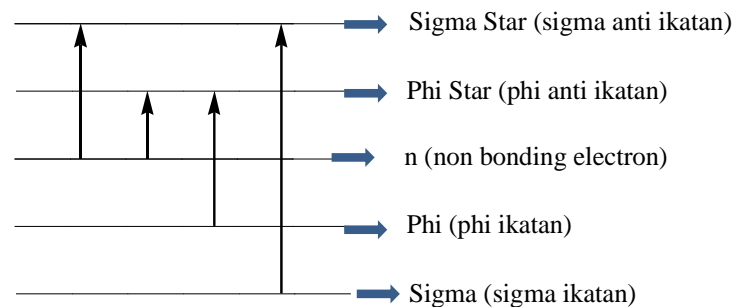
1. Elektron sigma, yaitu elektron yang menempati **ikatan sigma (σ)** atau ikatan tunggal. Ikatan sigma, adalah ikatan yang terjadi dari tumpang-tindihnya orbital atom dan membentuk ikatan tunggal. Distribusi rapat muatan di dalam orbital ikatan sigma adalah simetris di sekitar poros ikatan, sedangkan di dalam orbital sigma anti ikatan tidak simetris.
2. Elektron phi (π). Senyawa yang mempunyai **ikatan rangkap** berarti mempunyai dua macam orbital molekul yaitu orbital sigma dan orbital phi.

Orbital phi terjadi akibat tumpang tindihnya 2 buah orbital π dari atom-atom. Distribusi rapat muatan dalam orbital phi sedemikian rupa sehingga sepanjang poros ikatan antara kedua atom terdapat suatu daerah yang dinamakan bidang nodal (*nodal plane*), pada daerah ini rapat muatannya rendah, sedang daerah atas atau di bawah bidang nodal rapat muatannya tinggi dan maksimum.

3. Elektron bukan ikatan (*non bonding electron*). Elektron jenis ini memang tidak terlibat dalam pembentukan ikatan dalam molekul senyawa obat. Biasanya terdapat sebagai pasangan elektron sunyi (lone pair) di sekitar atom N, S, O dan halogen



Fenilpropenat



Gambar 1. Diagram tingkat energi orbital molekul

Jika suatu molekul obat menyerap sinar ultra violet atau tampak maka akan terjadi transisi (perpindahan elektron-elektron yang dimilikinya dari tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi). Dari sifat ini dapat dikembangkan menjadi metode analisis kuantitatif berdasarkan jumlah energi yang diserap sesuai dengan gugus atau kromofor yang dimiliki oleh suatu molekul senyawa obat. Hukum kuantitatif yang terkait sifat tersebut dikenal dengan hukum Lambert-Beer.

Menurut Hukum Lambert-Beer :

$$T = I / I_0 \quad \text{atau} \quad A = \log (I_0/I)$$

$$-\log (I / I_0) = a.b.c \quad \log (I_0 / I) = a.b.c$$

$$-\log T = a.b.c \quad A = a.b.c.$$

Keterangan T = transmittan, I = intensitas sinar yang diteruskan, A=: absorbansi, dan I_0 = intensitas sinar mula-mula

Seringkali a dinyatakan dalam ppm (mg zat/1 L larutan). Jika c dinyatakan dalam mol per liter, dan b dalam cm, maka a diganti dengan ϵ (koefisien ekstingsi molar, = molar extinction (absorptivitas) = absorptivitas molar) dan selanjutnya persamaan Lambert-Beers menjadi :

$$-\log T = \epsilon.b.c \quad \text{atau} \quad A = \epsilon.b.c$$

Simbul A : Absorbansi (= serapan),

ϵ : molar absorptivitas ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

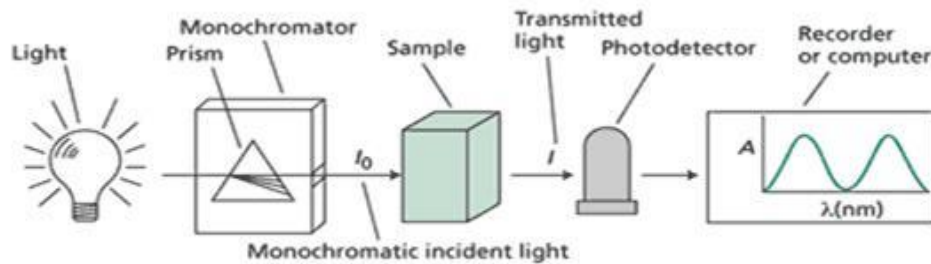
c : konsentrasi larutan (mol/L), dan

b : tebal sel \approx tebal kuvet \approx tebal larutan (cm) .

B. ALAT DAN CARA KERJA



Gambar 2. Alat spektrofotometer



Gambar 3. Jalannya sinar dan bagan optik spektrofotometer

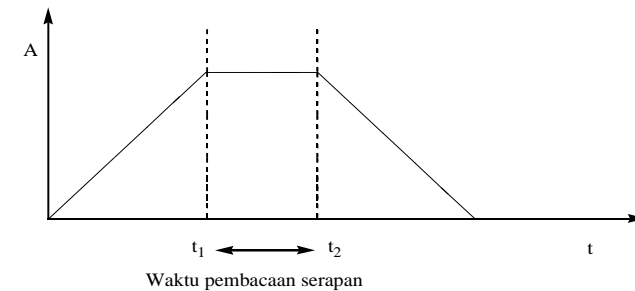
C. Cara Analisis Secara Spektrofotometri

Senyawa obat yang akan dianalisis secara spektrofotometri dapat dibedakan menjadi 2 yaitu yang harus direaksikan dengan suatu pereaksi, dan yang tidak harus direaksikan dengan suatu pereaksi tetapi cukup dilarutkan dalam pelarut yang cocok. Walaupun demikian, tahap-tahap yang dikerjakan adalah sama yaitu :

1. Mencari waktu operasi (*operating time*). Pada tahap ini dicari hubungan antara serapan dan waktu. Dari tahap ini diharapkan

diperoleh waktu yang pasti untuk pembacaan serapan dari larutan yang diperiksa, kecuali senyawa tersebut stabil (mantab), dalam larutan. Dimulai dari saat reaksi dilakukan sampai diperoleh waktu serapan yang stabil. Misalnya serapan larutan stabil dari t_1 sampai t_2 , maka berarti pembacaan serapan hanya diperbolehkan dalam waktu dari t_1 sampai t_2 , (lihat gambar 4).

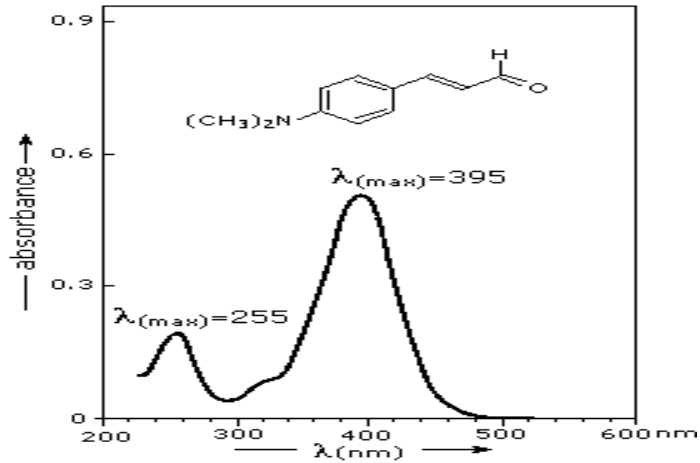
Pada pelaksanaan tahap ini digunakan panjang gelombang serapan maksimum seperti yang disebutkan dalam literatur.



Gambar 4. Kurva waktu operasi.

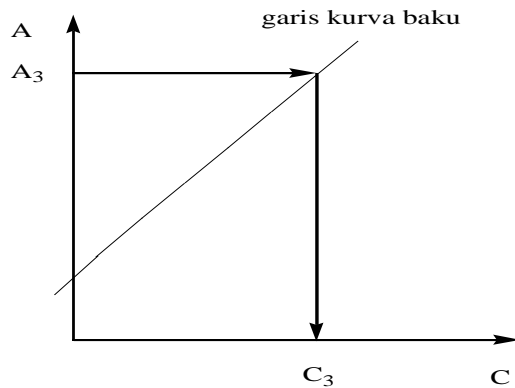
2. Panjang gelombang serapan maksimum, yaitu panjang gelombang ketika larutan cuplikan mempunyai serapan yang maksimum. Hal ini harus dilakukan walaupun dalam prosedur aslinya biasanya juga telah disebutkan. Caranya dengan membaca serapan larutan baku dan kemudian diubah panjang gelombang. Harus diingat bahwa setiap kali dilakukan perubahan panjang gelombang harus didahului larutan blangko yang serapannya diatur nol. Buat kurva hubungan panjang gelombang dengan serapan, cara ini bila alat tak ada perekamnya, Kalau ada akan terlihat pada gambar 5 **dengan serapan (spektrogram)**.

3.



Gambar 5. Kurva hubungan antara panjang gelombang

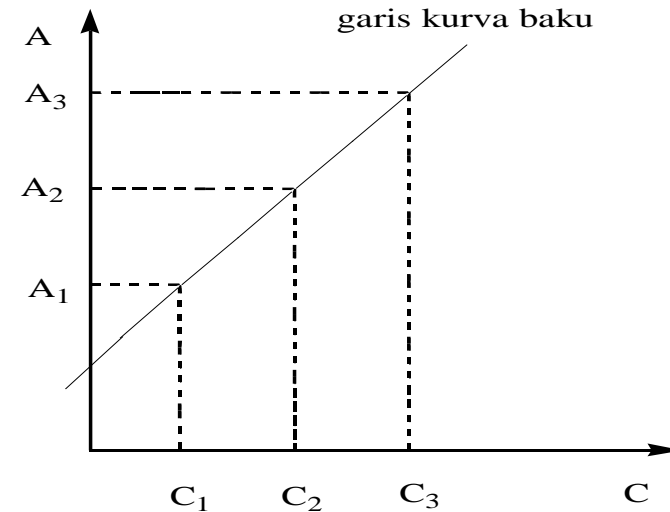
3. Kurva baku. Dibuat suatu seri larutan dan kemudian dibaca serapannya pada waktu operasi dan panjang gelombang yang dihasilkan dari percobaan tahap ke 1 dan 2. Buatlah kurvanya dan cari persamaan garis dan koefisien korelasinya dengan metoda kwadrat terkecil (*least square metode*).



Gambar 6. Kurva baku, berdasar persamaan $Y = bX \pm a$

4. Pengukuran serapan cuplikan. Larutan cuplikan dimasukkan ke dalam kuvet dan dibaca serapannya (A_u) yang terlebih dahulu dibaca serapan larutan blangko (A_s). Dari serapan yang terbaca dan jumlah cuplikan yang diketahui dapat dihitung kadar obat dalam cuplikan dengan menggunakan kurva baku atau persamaan garis regresi linier Kadar yang sebelumnya telah dipersiapkan.

5. Cara menghitung kadar



Gambar 7. Kurva interpolasi data penghitungan kadar obat.

Catatan: Kalau pembuatan garis lurus atas dasar persamaan regresi, titik potong tersebut tak selalu berimpit dengan garis regresi. (lihat gambar 13). Kadar (C_2) adalah kadar yang dihitung dengan cara interpolasi, dengan hasil pembacaan absorpsi sebesar A_2 . Karena A_2 terletak diantara titik kurva regresi yang terendah (A_1) dan titik kurva yang tertinggi (A_3).

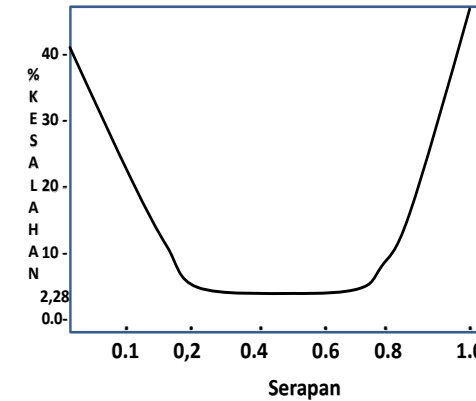
PERCOBAAN I SPEKTROFOTOMETRI ULTRA VIOLET

TUJUAN:

1. Menentukan pengaruh substituen terhadap panjang gelombang serapan maksimum.
2. Menentukan pengaruh pelarut terhadap panjang gelombang serapan maksimum.
3. Menentukan $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ suatu senyawa.
4. Menetapkan kadar campuran senyawa secara simultan.

CARA KERJA:

1. Buatlah larutan induk asam benzoat dalam air suling dengan konsentrasi 1 mg/ mL.
2. Buatlah larutan induk asam salisilat dalam air suling konsentrasi 1 mg/ mL.
3. Pipetlah masing-masing sebesar 1,0 mL, dan encerkan menjadi 10,0 mL dengan air suling.
4. Pipetlah larutan nomor 3, sebanyak 1,0 mL dan encerkan dengan air suling sampai 5,0 mL. Dan buatlah spektrogram (gambar 5) dari masing-masing larutan pada λ 200 nm sampai 320 nm. Amati, mengapa λ serapan maksimum berbeda? Perhatikan bahwa intensitas serapan tidak melebihi 0,8 dan tidak kurang dari 0,2, untuk analisis kuantitatif. (jika absorbansi lebih dari 0,8 maka larutan diencerkan lagi).



Gambar 8, Hubungan serapan dan kesalahan

5. Kerjakan seperti no 4, tetapi sebelum diencerkan dengan air suling tambah dulu dengan asam HCl 1,0 mL 0,1N, kemudian tambah air suling ad 5,0 mL amati spektrogramnya, pada λ 200 nm sampai 320 nm, bandingkan λ serapan maksimumnya dengan no 4.
6. Kerjakan dengan cara yang sama dengan no 4 tetapi sebelum diencerkan tambah dulu larutan NaOH 0,1N sebanyak 1,0 mL, dan encerkan dengan air suling sampai 5,0 mL. Amati spektrogramnya, pada λ 200 nm sampai 320 nm. Mengapa mereka mempunyai λ serapan maksimum yang berbeda?
7. Hitung masing-masing senyawa berapa harga serapan $E_{1\%}^{1\text{cm}}$. Dengan data yang anda dapat dari percobaan no 4 dan no 6. Baca serapan asam benzoat pada λ_2 (λ dari asam salisilat), dan serapan asam salisilat pada λ_1 (λ dari asam benzoat), kemudian hitung pula harga serapan $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ masing-masing senyawa

tersebut. Adakah kenaikan intensitas dan pergeseran lambda serapan maksimum.

8. Campurlah 1,0 mL asam benzoat dan 2,0 mL asam salisilat dari larutan no 3, ke dalam labu takar 10,0 mL, amatilah spektrogram campuran tersebut pada lambda 200 nm sampai 320 nm.

Kemudian carilah kadar masing-masing senyawa C_1 untuk asam benzoat dan C_2 untuk asam salisilat dengan rumus :

$$A_{T1} = K_1^{\lambda 1} C_1 + K_2^{\lambda 1} C_2$$

$$A_{T2} = K_1^{\lambda 2} C_1 + K_2^{\lambda 2} C_2$$

Keterangan :

- A_T : serapan total (jumlah) dapat dibaca dan dijumlahkan pada lambda masing-masing.
 $K_1^{\lambda 1}$: harga serapan ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) asam benzoat pada lambda serapan maksimumnya.
 $K_2^{\lambda 1}$: serapan asam salisilat $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ pada serapan maksimum asam benzoat.
 $K_1^{\lambda 2}$: harga serapan $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ asam benzoat pada lambda serapan maksimum asam salisilat.
 $K_2^{\lambda 2}$: serapan $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ asam salisilat pada lambda serapan maksimum asam salisilat.

Data yang dilaporkan adalah:

- Spektrogram masing-masing senyawa (benzoat dan salisilat)
- Kadar dari masing senyawa setelah dicampur dan dihitung kadarnya.

PERCOBAAN II SPEKTROFOTOMETRI SINAR TAMPAK

TUJUAN:

- Memahami tahapan analisis dengan spektrofotometri sinar tampak
- Menetapkan kadar sampel dengan cara mereaksikan senyawa agar diperoleh senyawa berwarna
- Menentukan kadar dengan persamaan regresi dan plot grafik

CARA KERJA:

- Penentuan *Operating time*

Pipetlah larutan asam salisilat 0,1 mg/mL sebanyak 3,0 mL kedalam labu takar 10,0 mL dan tambahkan $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ 1 % dalam HNO_3 1 % sebanyak 0,5 mL ad tanda dengan aquadest kemudian segera dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimal teoritis. Atur lama pembacaan selama 15 menit. (lihat nilai absorbandinya jika konsentrasi

- Penentuan Panjang Gelombang serapan Maksimum

Pipetlah larutan asam salisilat 0,1 mg/mL sebanyak 3,0 mL kedalam labu takar 10,0 mL dan tambahkan $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ 1 % dalam HNO_3 1 % sebanyak 0,5 mL ad tanda dengan aquadest. Diamkan sesuai operating time yang diperoleh dan baca spektra panjang gelombang pada rentang 800-400 nm.

3. Pembuatan kurva baku.

Buatlah larutan seri kadar asam salisilat dengan cara mengambil 1,0 ml, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 ml, 5,0 ml, 6,0 ml dan 7,0 ml sebesar dari larutan induk 0,1 mg/mL dan di ad kan sampai 10,0 ml. Kemudian tambahkan $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ 1 % dalam HNO_3 1 % sebanyak 0,5 mL ad tanda dengan aquadest. Diamkan sesuai operating time yang diperoleh dan baca pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh. (seri larutan boleh berbeda seri konsentrasinya yang penting serapanya masuk daam range antara 0,2 samapi 0,8)

4. Tentukan absorbansi larutan seri kadar dan buat persamaan kurva baku dengan syarat harga korelasi (r) percobaan lebih besar dari tabel ($\alpha = 0,05$).

Tetapkan persamaan regresinya. Buat tabel:

Contoh Tabel data hubungan kadar dan serapan

No.	Kadar/mL larutan asam salisilat	Serapan (hanya contoh)
1.	1,0 ad 10,0 mL	0,221
2.	2,0 mL	0.352
3.	3,0 mL	0,423
4.	4,0 mL	0,583
5.	5,0 mL	0,682
6.	6,0 mL	0,804

penambahan air ad 10,0mL dilakukan setelah larutan berwarna.

5. Preparasi sampel asam salisilat

Timbang seksama 10,0 mg sampel dan larutkan dalam 10 mL aquadest. pipet 1,0 mL ke dalam labu 10,0 mL dan tambahkan $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ 1 % dalam HNO_3 1 % sebanyak 0,5 mL ad tanda dengan aquadest. Diamkan sesuai operating time yang diperoleh dan baca pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh. Lakukan replikasi minimal 3 kali. Gambarkan persamaan regresi yang diperoleh pada keras grafik. Hitung kadar asam salisilat dalam sampel dengan persamaan regresi linier kurva baku yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, DekKes RI, Jakarta, 1979.
 Anonim, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, DekKes RI, Jakarta, 1995.

PERCOBAAN III

SPEKTROFLUOROMETRI

A. PENDAHULUAN

Prinsip dasar spektrofotometri adalah adanya sinar monokromatis penyebab promosi elektron pada senyawa organik atau atom, yang kemudian elektron kehilangan sebagian energi kinetiknya, dan ketika elektron kembali ke tingkat dasar memancarkan sinar dengan panjang gelombang yang lebih besar.

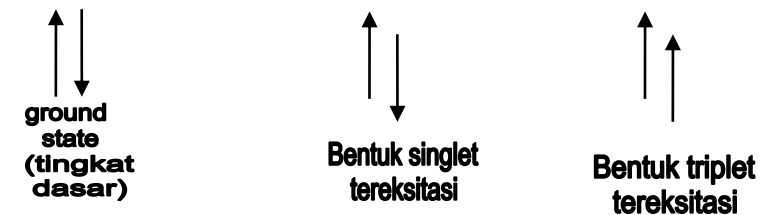
Sinar monokromatis penyebab promosi (eksitasi) elektron dinamakan **sinar eksitasi**. Sinar yang dipancarkan oleh elektron dari senyawa atau atom kembali ke tingkat dasar, dinamakan sinar **emisi** panjang gelombangnya sama dengan sinar **eksitasi**, atau **fluoresensi** bila sinarnya mempunyai **panjang gelombang yang lebih besar dari sinar eksitasi**.

Tetapi sebelum kembali ke tingkat dasar, karena banyaknya elektron yang mengalami eksitasi maka terjadi tumbukan antar elektron, **inter cross system, atau vibrasional internal** dengan sendirinya tenaga kinetik yang tadinya diserap oleh elektron untuk eksitasi akan berkurang. Proses tumbukan, atau mungkin vibrasi elektron selama dalam eksitasi diperlukan waktu, Dalam keadaan demikian maka elektron yang kembali ke tingkat dasar dapat memancarkan sinar yang dapat diamati intensitasnya dengan panjang gelombangnya lebih besar dari pada panjang gelombang sinar eksitasi.

Peristiwa terjadinya emisi sinar dari suatu senyawa berlangsung agak lambat bila dibandingkan dengan waktu kembalinya elektron karena

serapan, waktu yang diperlukan antara 10^{-10} sampai 10^{-9} detik. Ketika elektron pada kedudukan tereksitasi dan telah mengalami tumbukan, sehingga tenaga potensialnya menjadi lebih rendah, kedua jenis elektron tersebut dinamakan singlet (S_1 dan S_2).

Elektron ini masih mungkin terjadi *inter cross system*, yang menyebabkan energi menjadi berkurang dan elektron menjadi triplet (T_1 dan T_2) dengan energi terendah. Elektron selanjutnya dapat kembali lagi ke tingkat energi terendah atau dasar dengan memancarkan sinar yang dinamakan fosforisensi. Waktu **fosforisensi ini diatas 10^{-4} sampai 1 detik**. Peristiwa fosforisensi telah banyak dikenal, seperti pada radium, pada angka jam, dan jamur bambu, Peristiwa fluoresensi telah banyak digunakan untuk cat pada rambu lalu lintas.



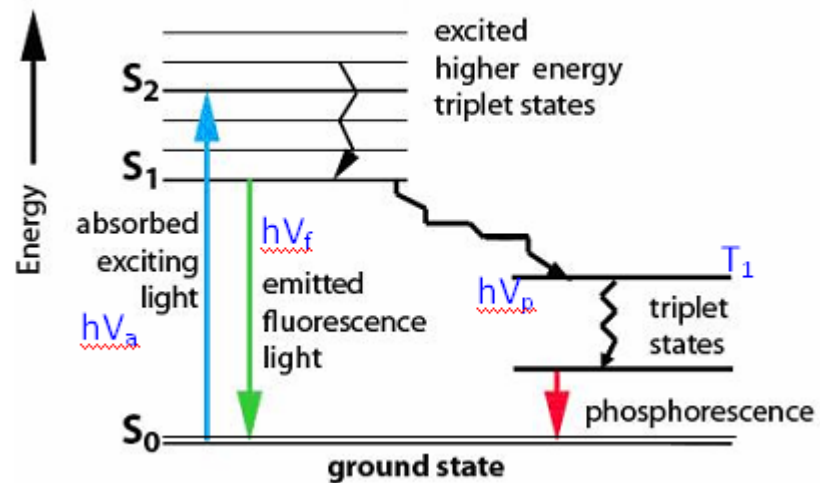
Gambar 9. Orbital elektron pada tingkat dasar dan yang tereksitasi.

Gambar 9 menunjukkan tipe orbital dari masing jenis elektron yang mengalami eksitasi.

Persyaratan utama senyawa yang bersifat fluoresen adalah coplanar dan mempunyai kromofor. Peristiwa diatas menggambarkan dalam senyawa berkromofor tidak planar dapat mengabsorpsi sinar yang digunakan untuk eksitasi elektron, tetapi tidak **terjadi fluoresensi ataupun fosforisensi** karena elektron terbatas, hanya terjadi emisi.

B. Teori

Senyawa koplanar berkromofor, bila mengabsorpsi sinar, akan terjadi eksitasi elektron sangat banyak (rapat) atau crowded.



Gambar 10. Perubahan energi elektron yang tereksitasi dan kembali ke tingkat dasar

Elektron tersebut saling bertumbukan secara vibrasional maupun intercross system sehingga tenaga kinetik elektron berkurang, akibatnya kembalinya ke tingkat dasar ground state lebih lambat 10^{-10} sampai 10^{-7} sekon, dengan tenaga yang lebih rendah.

Berdasar kelompok senyawa obat maka senyawa obat dikelompokkan menjadi:

Tabel 1. Kelompok obat yang dapat berfluoresensi langsung

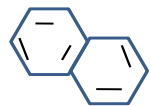
Nama obat	Lambda eksitasi (nm)	Lambda emisi (nm)	Kondisi	Sifat
Akridin	351	476	trifluoroasetat	Bagus
p-Aminosalisilat	300	405	pH 11	Bagus
Barbiturat	278	420	pH alkalis	0,1 $\mu\text{g/mL}$
Grisiofulvin	255	450	pH 7	Bagus
LSD	325	445	pH <6	Bagus
Morfin	285	350	pH alkali	Lemah
Kinin	350	450	pH asam	Bagus
As. salisilat	310	400	CHCl_3 - as. Asetat	Bagus
Trimetoprin	370	460	di lempeng KLT	Bagus
Salisilamida	270	350	lar. Netral	0,02
Yohimbin	270	365	pH 1	Cukup
Pamakuin	254	530	pH 1	Bagus
TTurunan purin	-	330	pH < 1	Bagus
			Asam	Cukup.

2, Tabel beberapa senyawa yang harus diubah dengan pereaksi agar berfluorosensi

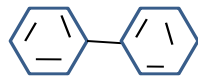
Nama Obat	$\lambda_{eks} + \lambda_{em}$	Metode perubahan/induksinya	.
Adrenalin	Di cari	Oksidasi jadi trihidroksi indol	Bagus
Klorokuin		Disinari dengan uv (fotokimia)	Bagus
Klortetrasiklin		Dipanaskan dalam alkali	Cukup
Gitoksigenin		Dipanaskan dengan asam kuat	Cukup
Heroin		Dipanaskan dengan asam kuat	Bagus
Hidrokortison		Dipanaskan dengan asam	Bagus
Imipramin		kuat+ETOH+Formaldehid dan asetil-aseton	

3. Beberapa kelompok senyawa dengan cara derivatisasi.

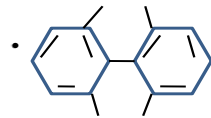
Pereaksi Derivatisasi	Senyawa yang diuji
4-Bromometil-7-metoksikumarin	Asam lemak
4-Kloro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol	N-metilkarbamat dan promoksfen
Dansilklorida	Barbiturat dan Hasis
O-Diasetil benzen	(hidantoin)
4-(Dikloro-s-triazinil)-1	Asam aminofosfonat



Koplanar



Tak planar



Karena substitusi
Dapat jadi planar

Contoh struktur kimia

Dari data tersebut kita dapat mencari cara analisis senyawa sejenis dengan cara langsung, dengan pereaksi atau dengan derivatisasi.

Molekul yang mempunyai elektron untuk mengemisikan sinar fluoresen akan proporsional dengan intensitas sinar fluoresensinya selama masih memenuhi batas hukum Lambert-Beer. Maka dirumuskan:

$$F = K'(P_0 - P)$$

F = intensitas fluoresensi yang proporsional dengan intensitas radiasi (P_0) yang diserap oleh molekul larutan dan P adalah intensitas sinar setelah medium sebesar b (tebal kuvet).

Bila dicari hubungan antara F dan kadar molekul larutan (c), maka berdasar hukum Beer dituliskan:

$$P/P_0 = 10^{-\epsilon bc}$$

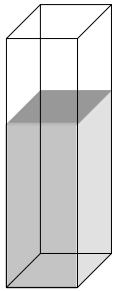
dengan ketentuan ϵ = adalah serapan molekuler b = tebal kuvet dan c = kadar larutan yang diuji.

Dalam pelaksanaan mencari kadar tidak harus menggunakan rumus tersebut tetapi digunakan cara kurva baku yang menyatakan hubungan kadar dan intensitas fluoresensi atau pendaran, (gambar 14)

C. INSTRUMENTASI DAN CARA KERJA.



Gambar 11. Spektrofluorometer,



gambar 12. Kuvet (dengan $\frac{3}{4}$ bagian)

Kuvet ini mempunyai empat sisi yang jernih, karena semua sisi untuk jalannya sinar, bila dipegang akan meninggalkan bekas pada sisi gelas, maka bila memegang pada sudut dibagian atas yang tidak ada cairannya. Isi kuvet harus betul-betul jernih, karena bila tidak, akan terjadi pantulan bila terkena sinar, lihat gambar

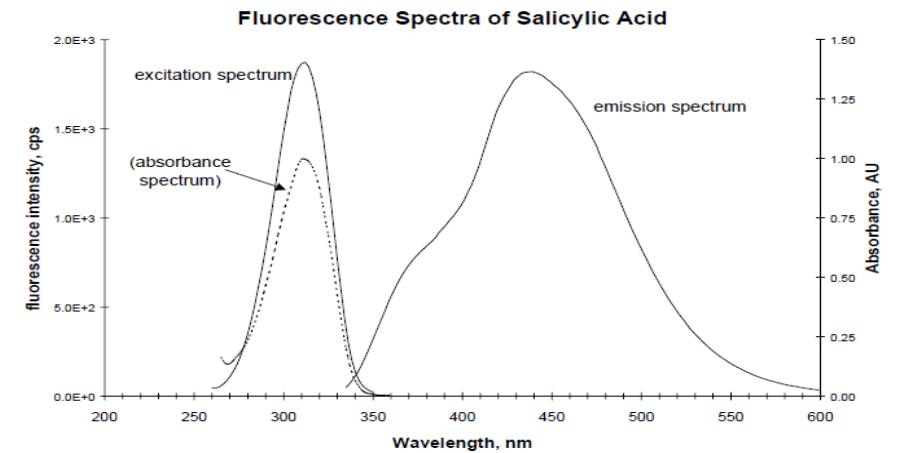


Figure 5. Fluorescence excitation and emission spectra (solid lines) and the absorbance spectrum (dotted line) of salicylic acid. The emitted fluorescence light is at longer wavelengths than the excitation light absorbed by the molecule. The fluorescence excitation and absorbance spectra have similar shapes.

Gambar 13. Spektrogram sinar eksitasi dan sinar emisi asam salisilat.

Cara Kerja :

PENETAPAN KADAR IBUPROFEN

1. LARUTAN STOK YANG DISEDIAKAN = 100 $\mu\text{G}/\text{mL}$ dalam NH_4OH
2. Buat larutan induk dengan konsentrasi 20 $\mu\text{G}/\text{mL}$
3. Buatlah larutan seri kurva baku dengan konsentrasi 0,2- 0,7 $\mu\text{G}/\text{mL}$ dengan cara memipet 100; 150; 200;250; 300;350 μL kemudian masukan dalam labu takar 10 mL tambahkan pelarut hingga tanda.
4. lakukan pencarian lamda eksitasi dan emisi dengan memasukan larutan seri dengan konsentrasi ditengah pada spektrofluorometer. (jangan lupa siapkan blanko). Gunakan lamda teoritis terlebih dahulu.
5. baca intensitas seri larutan kurva baku ibuprofen.

Preparasi sampel :

1. timbang 50,0 mg sampel, larutkan dengan pelarut dan di ad kan hingga 50 mL (Lakukan replikasi 3 kali)
2. ambilah 1 mL kemudian encerkan dengan pelarut ad 10, 0mL
3. Larutan di baca pada alat dengan menggunakan lamda emisi dan eksitasi yang sudah diperoleh.
- 4, lakukan pengenceran jika perlu !

Daftar Pustaka

- Anonim, 1986, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, London, The Pharma Press.
- Skoog, D. A, 1985, Principles of Instrumental Analysis
- Willard, H.H., Merrit, L.L, Jr., Dean. J.A, and Settle, Jr., F.A. Instrumetal Methods of Analysis.

KROMATOGRAFI

A. Pendahuluan

Kromatografi yang terdiri dari dua suku kata **chro mos** (zat warna) dan **graphos** (gambar), gambar zat warna ditemukan pertama kali oleh seorang botanis dari Rusia pada pemisahan zat kimia dari tanaman. Sebenarnya kromatografi merupakan alat pemisah yang berbeda dengan cara pemisahan yang berdasar kimia dan fisika atau pemisahan cair-cair.

Pemisahan yang terjadi kromatografi juga menggu- nakan dua fase yang tidak tercampur tetapi selalu dalam satu sistem yang bercampur, yang dinamakan fase gerak dan fase diam yang umumnya berupa zat padat atau zat cair yang didukung oleh zat padat.

Bila kita mempelajari sifat kimia fisika, tentang kelarutan suatu senyawa kimia dalam pelarut air maupun pelarut organik, senyawa tersebut terlihat mempunyai perbedaan kelarutan.

Agar senyawa dalam suatu campuran dapat terpisah, walaupun perbedaan sifat kimia dan fisika antara komponen dalam campuran hanya sedikit berbeda.

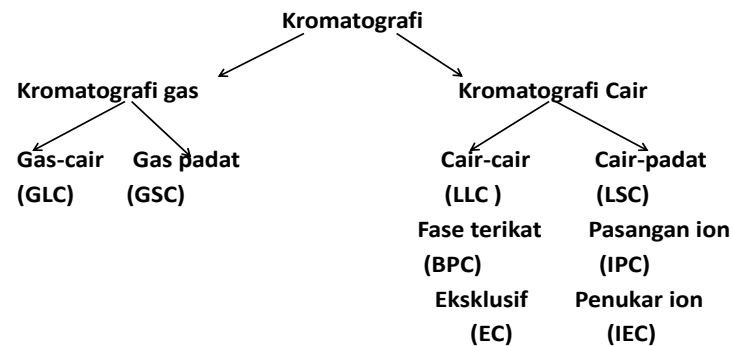
B. Teori

Dasar distribusi suatu senyawa (solut atau linarut), diantara kedua fase adalah hasil keseimbangan tenaga antara molekul linarut dan molekul masing-masing fase. Distribusi tersebut merupakan gambaran kekuatan tarikan atau penolakan molekul atau ion yang bersaing terhadap fase yang bersangkutan. Tenaga tersebut karena sifatnya yang polar

sehingga menimbulkan momen dipol secara tetap atau hanya memberi imbas, atau mereka terbagi karena ikatan London, atau kekuatan dispersi.

Seperti telah dijelaskan bahwa kromatografi adalah alat pemisahan campuran senyawa kimia, karena itu perlu diketahui teori dan mekanisme dari berbagai pemisahan.

Pembagian kromatografi sesuai dengan bagan yang digambarkan seperti berikut ini (gambar 17), walaupun bagan ini belum memberi penjelasan dengan lengkap maka mahasiswa wajib mencari penjelasan dipustaka.



Gambar 14. Bagan pembagian kromatografi

Dasar pemisahan

1. Pemisahan Adsorpsi

Peristiwa adsorpsi oleh fase diam terhadap fase gerak dan linarut selalu terjadi kompetitif. **Kemampuan fase diam** mengadsorpsi keduanya sangat tergantung pada **topografi gugus aktif** yang terdapat pada masing-masing komponen.

Fase diam dari silica yang mempunyai gugus hidoksil dari **silanol (Si-OH)** dapat terjadi interaksi dengan gugus pada linarut maupun pada fase gerak.

Peristiwa **adsorpsi** umumnya terjadi pada kromatografi padat cair (**liquid solid chromatography**, atau LSC, pada KLT). Dapat pula terjadi pada **Gas solid chromatography** atau **Kromatografi gas (KG)** yang berinteraksi antara fase diam dan linarutnya.

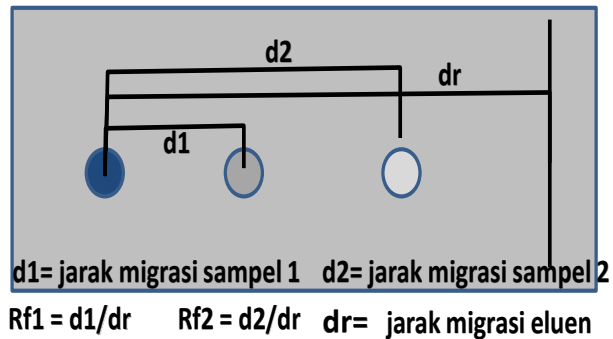
2. Pemisahan Cara Partisi

Pemisahan ini sangat erat kaitannya dengan kelarutan senyawa ke dalam pelarut. Dalam kromatografi didasarkan pada kelarutan linarut dalam fase diam maupun fase gerak, maka terdapat **istilah koefisien partisi**, yang peristiwanya akan mengembang menjadi **koefisien distribusi** yang umumnya berlaku pada kromatografi.

Koefisien partisi dapat **dinyatakan sebagai perbandingan kadar atau kelarutan linarut dalam fase diam dengan kadar atau kelarutan linarut dalam fase gerak**.

Sifat linarut dalam kromatografi dapat digambarkan dalam berbagai cara, pada kromatografi kolom dikenal dengan volume tambat atau V_R . V_R (**sesuai dengan jumlah volume fase gerak yang digunakan untuk membawa suatu linarut keluar dari kolom**).

Tetapi bila dinyatakan dengan t_R (waktu tambat) menyatakan waktu yang diperlukan fase gerak membawa linarut keluar dari kolom. Sedangkan waktu yang diperlukan untuk membawa linarut bergerak dari satu titik ke titik yang lain dalam KLT atau elektroforesis disebut R_f .



$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi sampel}}{\text{Jarak migrasi pelarut}} = \frac{d1}{dr}$$

Gambar 14. Bercak dan jarak migrasi pada KLT/Kr. Kertas

Satuan ini merupakan perbandingan jarak yang **ditempuh linarut** dengan **jarak yang ditempuh pelarut (fase gerak)** dalam waktu yang sama. Pada kromatografi partisi, terdapat bilangan partisi atau tetapan partisi dengan simbol k' (perbandingan kadar linarut dalam fase diam dibanding dengan kadar linarut dalam fase gerak). Gambar 18 tersebut dapat digunakan sebagai pedoman menghitung harga R_f masing-masing bercak baik pada KLT maupun Kr. Kertas.

Rumusny adalah: seperti $k' = C_s V_s / (C_m V_m)$.

Berbagai jenis kromatografi yang tertera pada gambar 17, sebagian akan dijelaskan dalam praktikum ataupun test praktikum, sehingga mahasiswa dapat membaca pustak yang ada sesuai topiknya.

PERCOBAAN IV (KLT-KT – DENSITOMETRI)

A. Pendahuluan

Pada era perkembangan teknik kromatografi saat ini pemakaian “*Thin Layer Chromatography Scanner*” yang lebih populer dengan nama **densitometer** makin banyak dipakai oleh para kromatografiwan secara luas.

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang pengujian kuantitatifnya berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada kromatografi lapis tipis (KLT). Interaksi tersebut ditentukan oleh absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) fluoresensi atau pemadamam fluoresensi dari radiasi semula. Densitometri lebih dititik beratkan pada analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil, berupa campuran yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Prinsip analisis kuantitatif dengan metode densitometri hampir sama dengan metode spektrofotometri. Penentuan kadar analit yang dikorelasikan dengan area noda pada KLT akan lebih terjamin kesahihannya dibanding metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), sebab area noda kromatogram diukur pada posisi diam atau “*Zig-Zag*” menyeluruh. Korelasi kadar analit pada noda kromatogram yang dirajah terhadap area tidak menunjukkan garis lurus, akan tetapi merupakan garis lengkung mendekati hiperbola.

B Teori dan Persamaan Kubelka - Munk

Kubelka - Munk telah berhasil secara teoritis menerangkan mengapa korelasi kadar analit yang dirajah terhadap area kromatogram tidak merupakan garis lurus. Menurut kedua kromatografi tersebut apabila radiasi elektromagnetik dengan intensitas semula (I) jatuh pada permukaan lapisan tipis yang tidak homogen dengan arah rambatan tegak lurus, maka sebagian dari radiasi elektromagnetik tersebut akan direfleksikan (I_s) dan sebagian diserap oleh analit lapisan tipis (I_o) dan sebagian diteruskan lagi (I_t).

$$I = I_o + I_s + I_t$$

Intensitas radiasi elektromagnetik yang direfleksikan tergantung pada koefisien permukaan lapis tipis (E), yang dinyatakan sebagai berikut :

$$I_s = I.E$$

Harga E sangat dipengaruhi oleh jenis lapisan tipis homogen, maka berlaku hukum Lambert Beer seperti pada spektrofotometri :

$$I_t = I_o \cdot e^{-k}$$

x adalah tebal medium lapis tipis dan k adalah koefisien absorpsi. Harga $e^{-k \cdot x}$ menyatakan berkurangnya intensitas radiasi elektromagnetik yang melewati medium. Harga tersebut dikenal juga sebagai kerapatan optik atau dinamakan juga sebagai "**optical density**" di medium yang dilalui radiasi elektromagnetik. Karena pada semua pelat KLT tidak memberikan homogenitas fase diam, karena ketidaksamaan partikel fase diamnya disamping terjadi penyerapan radiasi oleh partikel fase diam. Oleh sebab itulah pada metode spektrofotodensitometri disamping dikenal parameter k (koefisien penyerapan) dikenal juga parameter S (koefisien penghamburan) karena adanya parameter S inilah terjadi penurunan intensitas radiasi yang masuk ke medium lapis

tipis karena hilangnya intensitas radiasi (dihamburkan) oleh partikel-partikel fase diam.

Setiap jenis pelat KLT yang dipakai memberikan harga SX yang berbeda, demikian juga harga SX untuk setiap pelat KLT dari berbagai merk pabrik pembuatannya juga berbeda. Harga SX berkisar antara $SX = 0$ sampai $SX = 10$.

Pada spektrodensitometer yang modern telah dilengkapi pilihan operasional $SX = 0 - 3$ atau dilengkapi "*micro computer*" untuk melinierkan kurva Kubelka - Munk tanpa mempersoalkan SX lagi. Secara teoritis Kubelka-Munk mencari hubungan antara kerapatan optik dan serapan analit sebagai noda kromatogram terhadap hamburan radiasi, yang dinyatakan sebagai berikut :

$$-\frac{dI}{dx} = + (S + K) I + SJ$$

$$+\frac{dI}{dx} = - (S + K) I + SJ$$

keterangan

- I : intensitas radiasi elektromagnetik yang arahnya tegak lurus menuju permukaan lapisan tipis pelat KLT
- J : intensitas radiasi elektromagnetik yang arahnya tegak lurus meninggalkan permukaan lapisan tipis pelat KLT.
- S : faktor hamburan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis
- K : faktor penyerapan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis
- X : tebal lapisan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis.

Apabila yang ditentukan adalah pantulan radiasi elektromagnetik oleh noda analit pada KLT, pernyataan Kubelka-Munk menjadi :

$$\frac{(I - R)^2}{2R} = \frac{C}{S}$$

ϵ adalah absorpsi radiasi elektromagnetik oleh analit pada pelat KLT, **S** adalah faktor hamburan dan **C** adalah kadar analit. Sedangkan korelasi area analit dengan kadar dinyatakan sebagai kurva parabola.

$$A^2 = f(C)$$

Dan fungsi logaritma Brigs keduanya dinyatakan sebagai berikut :

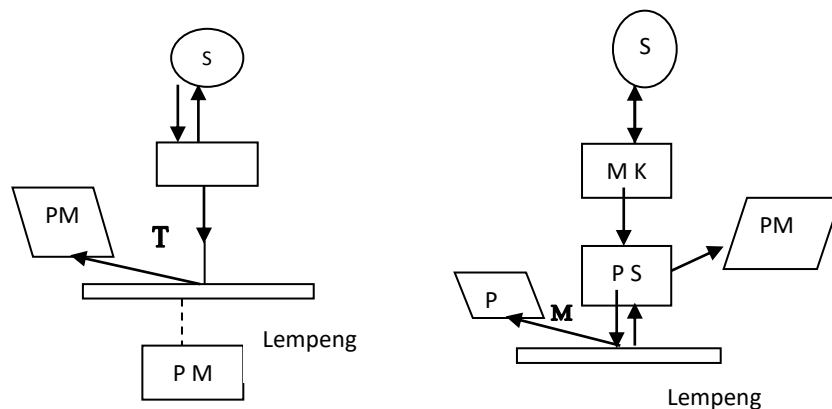
$$\text{Log } A = f(\text{log } C)$$

Adalah merupakan fungsi garis linier dimana **A** adalah area kromatogram analit pada penentuan refrakton (Mulja dan Suharman, 1995).

C. Instrumentasi

Ada berbagai pilihan prinsip penentuan area atau kadar dari analit yang ada pada pelat KLT yaitu : penentuan transmisi, pantulan (refleksi), fluoresensi dan pemadaman fluoresensi.

Penentuan pendar fluor dan pemadamam pendar fluor akan memberikan kepekaan seratus kali dibandingkan penentuan dengan radiasi UV atau sinar tampak. Pelayangan garis dasar (*base line drift*) dan fluktuasi garis dasar yang besar akan segera terjadi pada spektrofotodensitometer dengan sistem optik berkas tunggal (Mulja dan Suharman, 1995).



a)

b)

Gambar 15. Bagan konfigurasi densitometer a) cara sinar tunggal (Single beam) b), ganda (doble beam)

Keterangan gambar :

S : Sumber Sinar

Mk : monokromator

PM : Photo Multiplier

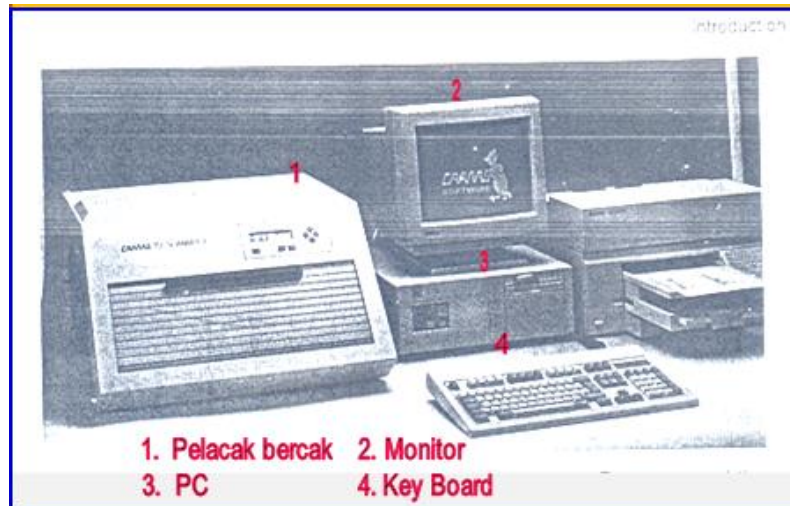
PS : Pemecah Sinar

T : Sinar yang diteruskan (Munson, 1991).

Semua densitometer mempunyai rancang bangun tertentu yang meliputi sumber cahaya, perangkat pemilih panjang gelombang, sistem pengumpul dan pemusat cahaya serta detektor. Selain itu diperlukan mekanisme gerak lempeng dibawah cahaya terpusat inti "memayar" lempeng. Skema sederhana dua jenis peralatan diperlihatkan oleh gambar 3 (a) dan (b). Dalam bagian ini, pemilih panjang gelombang adalah monokromator (MK) dan perangkat indera adalah tabung photomultiplier (PM). Bila tabung photomultiplier diletakkan dibawah lempeng, alat bekerja sebagai penerus (T), bila diletakkan diatas lempeng, alat bekerja sebagai pantulan (R). Konfigurasi bagi alat sinar tunggal diperlihatkan gambar 3 (a). Gambar 3 (b) menunjukkan alat sinar ganda yang menggunakan pemecah sinar (PS) untuk memusatkan panjang gelombang yang sama ke permukaan lempeng. Satu sinar meradiasi bagian lempeng yang mengandung analit (noda), yang lain memayar kebagian lempeng blangko untuk mengoreksi resonansi bawaan lempeng.

Konfigurasi ini perlu sepasang tabung photomultiplier berimbang untuk mendapatkan kemantapan sistem yang maksimum. Penggunaan monokromator penyaring lebih menguntungkan dan memudahkan perubahan panjang gelombang dari sistem grating, penyaringan

menghasilkan berkas sinar dengan sedikit jumlah panjang gelombang. Bila digunakan monokromator grating. Waktu pancaran lebih lambat dibandingkan dengan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* Karena dapat dihentikan sewaktu-waktu dengan panjang gelombang yang dikehendaki. Untuk teknik sidik pemantulan, tabung photomultiplier ditempatkan pada sudut 45° terhadap lempeng. Jenis sumber cahaya tergantung pada panjang gelombang cahaya yang digunakan yaitu : lampu hidrogen, raksa atau ksenon untuk pengukuran sinar UV dan lampu wolfram untuk panjang gelombang sinar tampak (Munson, 1991).



Gambar 16. Alat Kromatografi Camag

Sumber radiasi ada tiga macam tergantung rentang panjang gelombang dan prinsip penentuan. Pada umumnya spektrofotodensitometer memberikan rentang gelombang penentuan 200 – 630 nm. Lampu D_2 (Dueterium) dipakai untuk pengukuran pada daerah UV dan lampu tungstein untuk pengukuran pada daerah sinar tampak. Untuk penentuan pendar fluor dan pemadaman pendar fluor dipakai lampu busur Hg bertekanan tinggi. Sama seperti pada spektrofotometri, pada densitometri juga dilakukan penentuan transmisi atau absorpsi dan refleksi pada panjang gelombang maksimal.

Demikian juga pada penentuan pendar fluor dan pemadaman fluor harus dilakukan penentuan pada panjang gelombang dimana terjadi emisi atau intensitas relatif pendar fluor yang optimal. Monokromator dengan fungsi yang sama seperti pada spektrofotometer UV-VIS juga diperlukan pada densitometer. Biasanya dipakai monokromator kisi difraksi 1200 garis/mm. Detektor PMT (photomultiplier = Tabung penggandaan foton) merupakan detektor umum yang dipakai pada densitometer (Mulja dan Suharman, 1995).

D. Cara Kerja

Alat dan Bahan

Alat :

1. Glass ware
2. Seperangkat alat HPTLC
3. Pipa Kapiler
4. Chamber
5. Fan
6. Sinar UV 254

Bahan :

1. Larutan Standart Vitamin E
2. Larutan Standart Kurkumin
3. Etanol
4. Silika Gel G F₂₅₄
5. Kloroform
6. Toluena
7. Aseton

SAMPEL : KURKUMIN DAN VIT E

Penetapan kadar campuran vitamin E dan kurkumin

1. Penyiapan larutan standar
Buatlah larutan standar campuran kurkumin-vitamin E dari masing – masing larutan standar vitamin E dan kurkumin 1 mg/ ml dalam etanol dengan mengambil masing – masing larutan standar kurkumin dan vit E sebanyak : 0,5 ml ad 5 ml; 1,0 ml ad 5,0 ml; 1,5 ml ad 5,0 ml; 2,0 ml ad 5,0 ml; 2,5 ml ad 5 ml dengan mengencerkannya dalam etanol.
2. Totolkan larutan standar kurkumin, vitamin E dan campuran kurkumin-vitamin E, serta larutan sampel masing-masing sebanyak 5 mikroliter pada HPTLC plates silica gel 60F254.
3. Masukkan ke dalam chamber yang berisi fase gerak berupa campuran Kloroform+metanol (9:1) yang sebelumnya sudah dijenuhkan.
4. Elusi hingga 8 cm.
5. Ambil plate, keringkan dengan bantuan kipas angin.
6. Amati bercak yang terjadi di bawah sinar UV 254.
7. Scan bercak yang diperoleh pada 254nm. Setelah diperoleh kromatogram. Tentukan panjang gelombang maksimumnya.
8. Tentukan luas area di bawah kurva.

9. Buat persamaan regresi linier antara konsentrasi VS luas area di bawah kurva.
10. Tentukan kadar sampel berdasarkan persamaan tersebut.

**catatan : sampel sudah disediakan*

Catatan: Bila digunakan senyawa yang tertera dalam tabel ini gunakan prosedur yang sama tetapi dengan fase gerak yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1986, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, London, The Pharma Press.
- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Ed.IV, Jakarta, Dep.Kes. RI
- Higuchi, T., Brochmann, H., 1961, *Pharmaceutical Analysis*, Interscience Publish
- Sastrohamidjojo, 2005, *Kromatografi*, Liberty, Yogyakarta
- Sethi, 1997, *Quantitatif Analysis of Drugs in Pharmaceutical Foemulations*, Ed. III, CBS
- Sethi, 1996, *HPTLC*, CBS Publisher, New Delhi

PERCOBAAN V

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

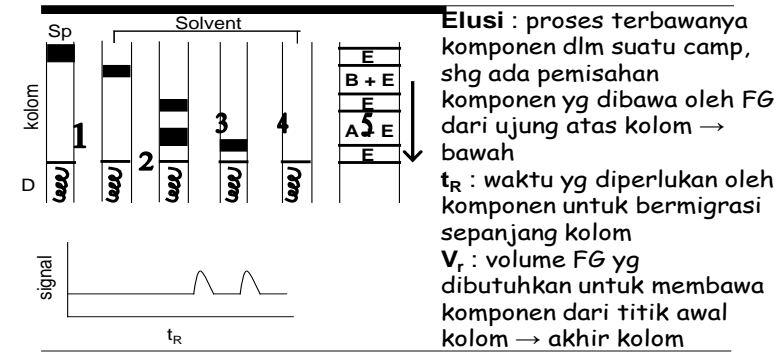
A. Pendahuluan

Kromatografi Kolom

Kromatografi Kolom merupakan jenis kromatografi dengan fasa diamnya dimasukkan ke dalam alat yang bentuknya seperti kolom, maka terdapat : (1) Pertama, kromatografi kolom terbuka, yang umumnya tidak untuk analisis hanya untuk pemisahan saja (percobaan VI). (2). Ke dua kromatografi kolom tertutup seperti pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau dengan nama lain *High Performance Liquid Chromatography*.

Dalam kromatografi kolom seperti gambar 28, dari sampel campuran kolom pertama, (sp), kemudian setelah diberi solven sebagai fase gerak, sp turun (2), kemudian sampel memisah menjadi dua pita (3). Kolom ke (4), pita tinggal satu dan pita yang bawah di no.3 sudah keluar dari kolom. Pada kolom lima (5) pita sudah habis. Sehingga kalau pita dipantau dengan detektor akan terlihat signal kromatogram dengan t_R -nya.

Elusi dalam kolom kromatografi



Gambar 17. Teori elusi pada kromatografi

Kecepatan keluarnya pita dari kolom sangat tergantung kelarutan analit dalam eluen. Lebih-lebih bila fase diam dalam kolom yang digunakan adalah C-18, merupakan fase diam yang non polar, Sehingga pemisahan seperti tidak dipengaruhi oleh sifat kimia dan hanya sifat fisika.

Ada dua teori yang dapat digunakan untuk menerangkan pemisahan :

B Teori

1. Plate/Lempeng :

Teori ini menyatakan tentang efisiensi kolom. Kolom dikatakan efisien apabila terjadi banyak bentuk keseimbangan. Secara matematis dapat dirumuskan :

$N = L / H$, dimana N = Jumlah lempeng, L = Panjang kolom, dan H = Efisiensi kolom

2. Teori Kinetik : teori dapat menerangkan adanya pelebaran kaki (lebar alas) kromatogram. Secara matematik dapat dirumuskan :

$$H = 16 L X (WbxtR)^2 \text{ atau } N = 16 L X (tRxWb)^2$$

Dimana Wb adalah lebar kaki (alas) kromatogram

Menurut **Van Deemter** ada 3 proses yang terjadi secara simultan yang mempengaruhi variabilitas laju migrasi komponen diantara fase gerak dan fase diam. Yaitu :

1. Difusi Eddy (Eddy Diffusion), merupakan difusi arus fase gerak yang ke segala arah, terutama pada fase gerak gas, sedangkan untuk fase gerak cair sedikit saja terjadi, disimbulkan dengan A
2. Difusi Longitudinal (**Longitudinal Diffusion**), difusi yang sejalan dengan arah aliran fase gerak, disimbul kan dengan B
3. Transfer Massa, ialah perpindahan mass analit yang terjadi sering tidak sinkron dengan arah alir fase gerak. disimbulkan dengan C.

Pada tebal lempeng teoritik (H) merupakan fungsi linier variabilitas laju migrasi komponen, yang dinamakan **Persamaan Van Deemter** :

$$H = A + B/u + C.u$$

Variabel Termodinamika pada pemisahan yang dapat mempengaruhi kualitas kolom diantaranya adalah :

1. Waktu Retensi (t_R)
2. Kapasitas kolom (k'), merupakan ratio jumlah mol komponen dalam fase diam terhadap jumlah mol komponen dalam fasa gerak. Dirumuskan :

$k' = t_R - t_M / t_M$, dimana t_M adalah waktu retensi fasa gerak yang tak mengalami penahanan fase diam

3. Faktor selektivitas (α)

Ratio koefisien Distribusi 2 komponen yang akan dipisahkan

$$\alpha = K_B / K_A$$

K_B / K_A = koef. Distribusi komp. B / A

Dimana : K_B = koef. Dist komp B yg teretensi kuat dalam kolom

K_A = koef. Dist komp A yg teretensi lemah dalam kolom

4. Resolusi Kolom, yang didefinisikan jarak antara kromatogram yang terdekat. Parameter ini dirumuskan :

$$R_s = Z / 0,5 W_A + 0,5 W_B = 2 Z / (W_A / W_B)$$

Disederhanakan :

$$R_s = 2 ((t_R)_B - (t_R)_A) / W_A + W_B$$

Dimana : Z jarak puncak A dan puncak B

W_A = lebar dasar (alas) kromatogram A

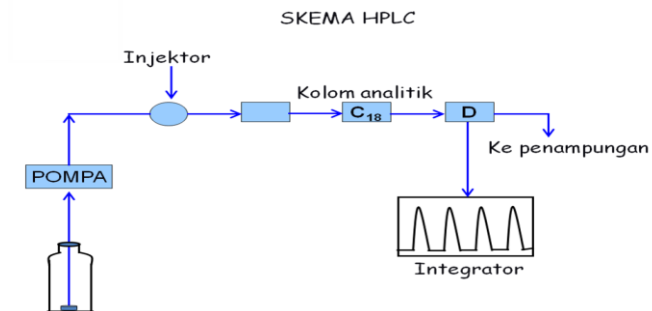
W_B = lebar dasar (alas) kromatogram B

Disarankan harga $R_s > 1,5$ agar mendapatkan daya pisah yang sempurna.

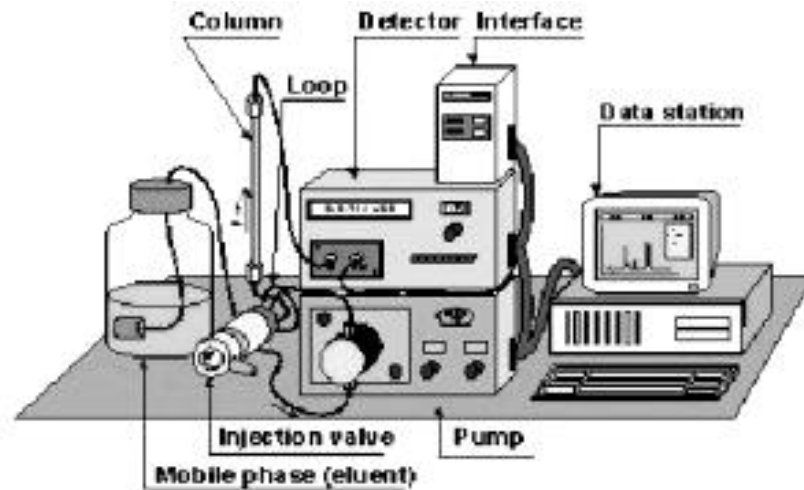
Hubungan R_s dengan parameter lain dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$R_s = \sqrt{N} / 4 \times (\alpha - 1) / \alpha \times k'_B / (1 + k'_B)$$

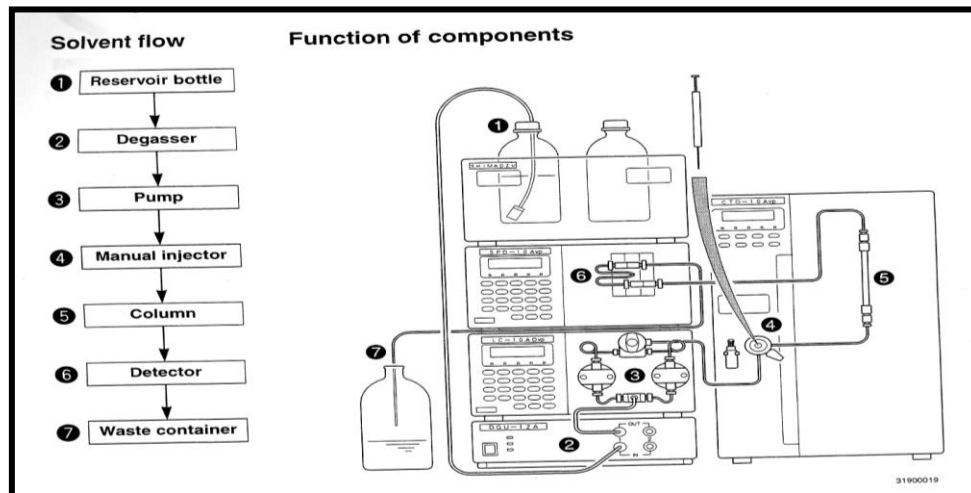
B. Alat dan Cara Kerja HPLC



Gambar 26. Bagan aliran eluen/fase gerak dan sampel serta perlengkapannya



Gambar 18 A. Skema Lay out KCKT dengan satu pompa



Gambar 18 B. Bagan KCKT *single pumps* dilengkapi dengan monitor dan kolektor hasil pemisahan

C. Alat dan Bahan

Alat :

1. Glass ware, penyaring milipore
2. Injector
3. Seperangkat instrument KCKT

Bahan :

- 1 Cafein
2. Parasetamol p.a
3. Aquabidest
4. Metanol p.a

D. Materi Praktikum Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

PERHATIAN : khusus HPLC seluruh alat percobaan yang dipakai tidak boleh dipinjam maupun meminjam dengan percobaan lain !

Cara Kerja

1. Buatlah larutan masing – masing larutan parasetamol dan kafein dengan kadar masing - masing $10 \mu\text{g/mL}$ dengan pelarut metanol kemudian saring dengan milipore $0,45\mu\text{m}$.
2. Buatlah kurva baku seri kadar dengan memipet masing – masing larutan parasetamol dan kafein kadar $10 \mu\text{g/mL}$ sebanyak $100 \mu\text{L}$ dengan micropipet kedalam labu takar $5,0 \text{ mL}$ ad dengan fase gerak (metanol – air (95:5)). Lakukan kembali tetapi dengan volume pemipetan sebanyak $200, 300, 400$ dan $500 \mu\text{L}$.
3. Injeksikan kedalam sistem kromatografi cair kinerja tinggi sebanyak $60 \mu\text{L}$. Tentukan *area under curve* larutan seri kadar dan buat

persamaan kurva bakunya dengan syarat harga korelasi (r) percobaan lebih besar daripada pada tabel ($\alpha = 0,05$).

4. Ambil larutan sampel sebanyak 100 μ L dengan mikropipet kedalam labu takar 5.0 mL ad kan dengan fase gerak sampai tanda. Lakukan replikasi minimal 3 kali.
5. Injeksikan kedalam sistem kromatografi cair kinerja tinggi sebanyak 60 μ L. hitung kadar parasetamol dan kafein dalam sampel dengan persamaan regresi linier kurva baku yang diperoleh.
6. Hitung pula, waktu retensi, k' , N dan R_s , menggunakan rumus yang berlaku

Urutan Injeksi :

1. pelarut
2. parasetamol induk
3. pelarut
4. kafein induk
5. pelarut
6. larutan seri kadar ke-1
7. larutan seri kadar ke- 2
8. larutan seri kadar ke-3
9. larutan seri kadar ke -4
10. larutan seri kadar ke-5
11. pelarut
12. larutan sampel ke – 1
13. larutan sampel ke – 2
14. larutan sampel ke – 3
15. pelarut

catatan :

Jumlah pengambilan (dalam ml harus dikonversi menjadi mg).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1986, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, London, The Pharma Press.
- Skoog, D.A, 1985, *Principles of Instrumental Analysis*
- Willard, Menill, Dean, Seatle, 1988, *Instrumental Methods of Analysis*, California

PERCOBAAN VI

ANALISIS SECARA ELEKTROKIMIA

A. PENDAHULUAN

Alat analisis elektrokimia dibedakan atas dasar metode pengukuran kuantitatifnya. Karena itu dibedakan menjadi:

1. **Potensimeter** berdasar atas perbedaan potensial kedua elektrode yang dinyatakan dalam milivolt atau mV.
2. **Voltameter** mempunyai prinsip yang sama tetapi elektrode yang digunakan agak berbeda.
3. **Amperemeter** berdasar timbulnya arus listrik yang dinyatakan dalam amper atau mili amper.
4. **Konduktometer** berdasar pada daya hantar listrik atau konduktivitas.

B. POTENSIMETER

Analisis dengan potensiometer mencakup dua hal.

Pertama mengukur secara langsung potensial elektrode yang berhubungan dengan kadar zat elektroaktif.

Kedua mengukur perubahan emf atau **electromotive force** karena penambahan titran pada sampel.

1. Sel Elektrokimia Tipe potensiometrik adalah merupakan pengindera aktivitas permukaan pada separo sel elektrokimia, menimbulkan potensial yang proporsional dengan logaritma aktivitas analit atau kadar analit.

2. Potensial diukur secara relatif terhadap elektrode referen (pembanding), yang juga berhubungan dengan larutan analit (sampel)
3. Pengukuran potensial dilakukan pada arus listrik sama dengan nol sehingga terhindar dari peristiwa elektrolisis agar tidak mengganggu keseimbangan antara sampel dan membran antar muka (pada elektrode).

4. Persamaan keseimbangan sel elektrokimia secara penuh adalah sebagai berikut.

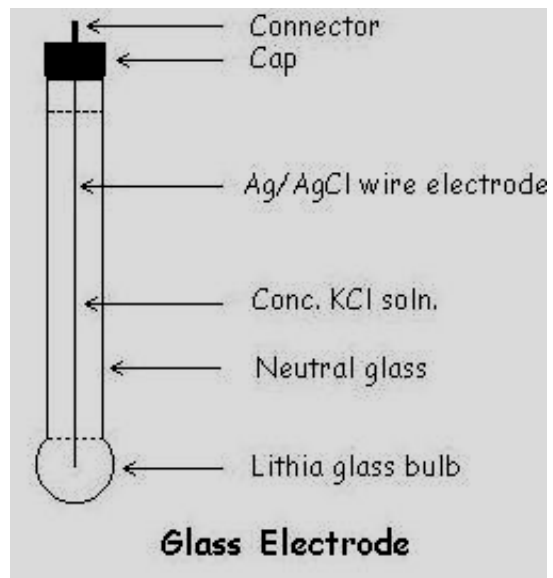
$$E_{\text{sel}} = E_{\text{ind}} + E_{\text{ref}} + E_j \quad (1)$$

E_{ref} dan E_j adalah potensial elektrode indikator, referen, dan potensial jembatan larutan.

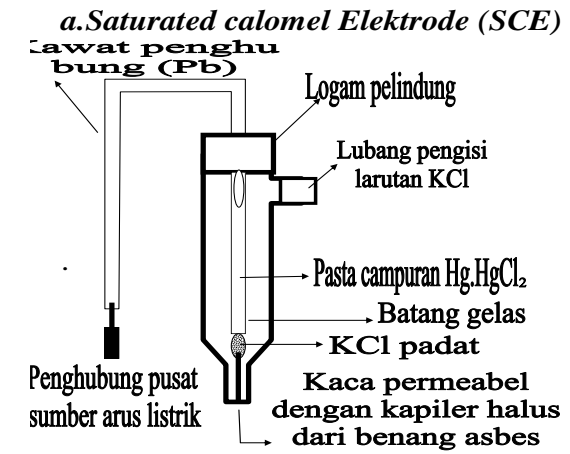
5. Dalam keadaan arus turun dalam sel, maka harga iR akan turun drastis (karena potensial yang bertahap tergantung pada arus yang timbul lewat tahanan dari larutan), Harga E_{ref} adalah tetap, demikian pula E_j dan dapat diabaikan.
8. Bila demikian elektrode indikator dapat memberikan keterangan tentang aktivitas ion-ion dalam larutan.
9. Elektrode referen terdiri dari elemen internal, larutan pengisi (KC1), yang berfungsi sebagai jembatan garam, dan yang terakhir adalah lapisan tipis yang dapat melewatkan larutan secara pelan sampai ke larutan garam
10. Dengan demikian terjadi hubungan cairan pada larutan sampel dan larutan dalam sel referen. Maka arus listrik atau beda potensial dapat dideteksi.

11. Sedangkan potensiometer, dan konduktometer lebih banyak digunakan untuk indikator pada tetraisi

C. Instrumentasi dan cara kerja



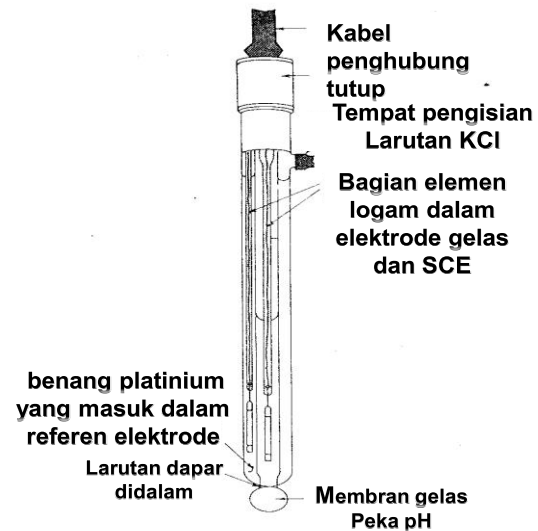
Gambar 19. Glass elektrode



Gambar 20. Elektrode kalomel



Gambar 21. pH meter atau potensiometer



Gambar 22. Elektrode gelas dan referen jadi satu

Elektrode Kalomel digunakan sebagai elektrode referen (pembanding) karena:

1. Mudah dipelihara dan mudah dipakai
2. Dapat digunakan untuk redok potesimetri, dapat untuk indikator titrasi asidi alkali metri.
3. Aliran Listrik yang lewat pasta campuran Hg/HgCl_2 atau H_2I_2 , gelas wool dan KCl padat dan lewat KCl jenuh (4,2 M), bila kurang dapat diganti.
4. Cepat mencapai keseimbangan bila dimasukkan dalam larutan uji. Bila suhu lebih besar dari 80°C , terjadi perubahan Hg I , menjadi HgII ion.

A. Pengukuran pH

Angka pH menyatakan tingkat dari keasaman suatu larutan pH menyatakan logaritma negatif kadar H^+ ion suatu larutan, **disebut juga power of hydrogen**. Karena itu pH dirumuskan sebagai berikut:

$$\text{pH} = -\log (\text{H}^+) \quad (2)$$

Aktivitas ion H^+ yang selaras dengan termodinamik dari ektromotifsel yang dirumuskan:

$$\text{paH} = \log a_{\text{H}^+} \quad (3)$$

Aktivitas dari produk kadar tersebut adalah suatu tetapan aktivitas yang di tuliskan $a_{\text{H}^+} = [\text{H}^+]$. Aktivitas ion tunggal tak dapat diukur secara langsung kecuali bila tetapan aktivitas ionik diketahui.

Kadar $[\text{H}^+]$ dan $f[\text{H}^+]$ sangat berguna untuk menyatakan keasaman suatu larutan dalam air rx merupakan tetapan aktivitas rata-rata.

Ketepatan Pengukuran pH

Ketepatan pengukuran (0,01 unit pH dan selisih suhu 2°C). pH meter adalah voltameter, yang ditambah beberapa perlengkapan. Tidak saja mengukur potensial melalui konversi pH dan sistem referen elektrode, tetapi mengalihkan perbedaan potensial yang diukur pada setiap suhu ke satuan pH. Karena susunan elektronik dari alat tersebut dibuat sesuai dengan fungsinya..

Cara operasional penguat (amplifier), tidak hanya sebagai voltameter dengan daya halang arus bolak-balik yang tinggi, tetapi mengatur kemantaban pengukuran secara otomatis memindahkan

dari beda potensial ke satuan pH sehingga mencapai ketelitian 0,01 satuan

Hubungan Potensial dan pH

Rumus untuk mengukur pH dikemukakan oleh Nernst.

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \log [H^{+}] \quad (4)$$

E° adalah potensial dasar untuk setiap elektrolit yang digunakan R = tetapan gas, T = Suhu mutlak (Kelvin), F = bilangan Faraday = 96845, coulomb/mol, dan n = jumlah elektron yang terlibat dalam proses tersebut

Untuk $n = 1$, maka faktor $RT/nF = 0,591$. ($25^{\circ} C$). Maka **Sorenson merumuskan:**

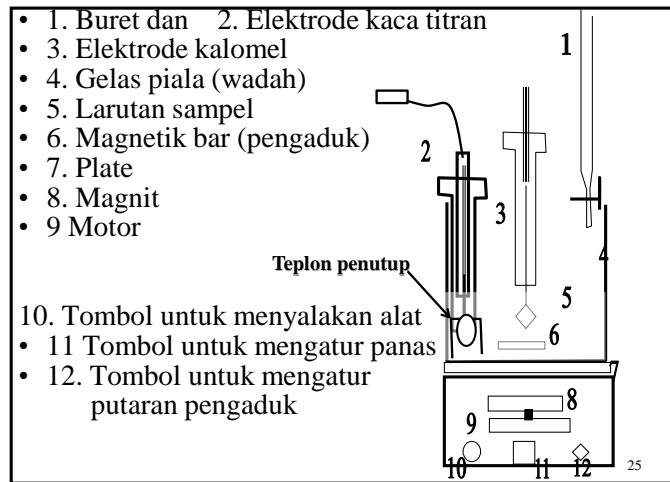
$$E = E^{\circ} - 0,591 \text{ pH} \quad (5)$$

Persamaan 4 dapat dikonversi bahwa tiap unit **pH = 59,1 mV** pada $25^{\circ} C$, untuk setiap elektrode yang mengikuti persamaan Nernst.

Cara Kerja:

1. Buat larutan baku NaOH, 0,1 N sebanyak 200,0 mL sebagai titran.
2. Pembakuan NaOH 0,1 N
buatlah larutan natrium biftalat untuk pembakuan titran dengan menimbang 100,0 mg natrium biftalat standar dan melarutkannya dalam aquadest dalam labu takar 100,0 ml.

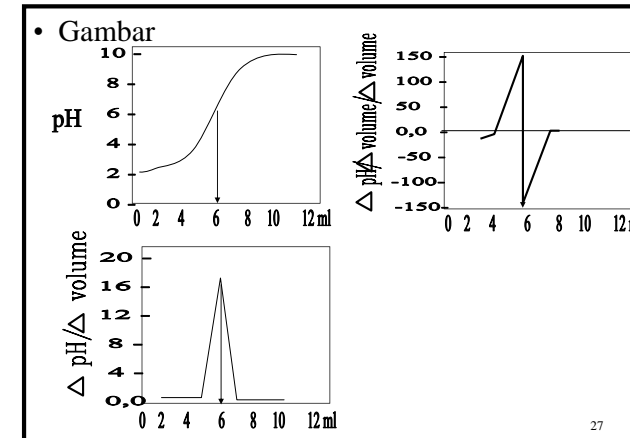
3. Buat larutan sampel sebanyak lebih kurang 100 mg larutkan dalam air suling sampai 100,0 mL.
4. Masukkan larutan sampel kedalam beker glas (4) dan kemudian elektrode campuran (gelas dan kalomel) no.3, dengan pelindung probe untuk melindungi gelas poruos terhadap benturan.
5. Isi buret dengan titran (oksidator),. Dan pasang sesuai gambar diatas, yang diklem pada statif.
6. Nyalakan alat potensio / pH meter, tunggu sampai 5 menit untuk pemanasan, pilih tombol pH atau tombol potensiometer sesuai kepentingan.
7. Nyalakan alat potensio/pH meter, tunggu sampai 5 menit untuk pemanasan, pilih tombol pH atau tombol potensiometer sesuai kepentingan.
8. Catat dulu pH atau potensial (mV) awal. Lakukan titrasi, setiap 0,5 ml volume titran dicatat dan perubahan pH atau potesial dicatat. Perubahan volume, pH, potensial (mV) dicatat.
9. Titrasi diteruskan sampai terjadi perubahan pH atau potensial yang sangat dratis, teruskan lagi titrasi.
10. Catat pH yang terbaca setiap penambahan 0,5 ml titran, Plot data yang diperoleh kedalam persamaan dimana "x" adalah volume titran dan "y" adalah log pH dan atau potensialnya yang terbaca pada alat. Data tersebut dibuat kurva hubungan antara perubahan volume dan pH/ potensial, sehingga dapat gambar seperti dibawah ini.



Gambar 23. Rangkaian titrasi potensio/pH metrik

11. Gambar pertama adalah hubungan langsung antara volume dan pH, dan gambar ke dua hubungan selisih pH dibagi volume, didapat angka yang melonjak tajam, demikian pula gambar ke tiga sehingga volume dapat ditemukan dengan jelas, dan tepat maupun teliti.
12. Perhitungan kadar sama seperti perhitungan titrasi.

Kurva titrasi pH metrik atau potensiometrik



Gambar 24. Hasil pembuatan kurva perubahan pH/atau potensial dan volume

Dengan menyimak gambar 26 tersebut jelas bahwa titik akhir titrasi tidak dapat dipantau langsung seperti pada titrasi menggunakan indikator. Walaupun agak memerlukan waktu tetapi dan volume titran lebih banyak, diharapkan hasilnya lebih teliti.

Cara tersebut dapat pula digunakan untuk titrasi potensiometrik terutama untuk melakukan titrasi bagi senyawa atau sediaan farmasi yang berwarna sehingga perubahan indikator tidak jelas. .

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1986, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, London, The Pharma Press
- Skoog, D.A, 1985, *Principles of Instrumental Analysis*
- Willard, H.H., Merrit, L.L, Jr., Dean, J.A, and Settle, JR.,F.A, Instrumental Methods of Analysis.

**JADWAL PRAKTIKUM INSTRUMEN TAHUN 2016/ 2017
(DARING)**

Materi :

P 1 : Spektro UV (asam Salisilat dan asam Benzoat)

P 2 : Spektro Vis (Asam salisilat)

P 3 ; Spektrofluoro (Ibuprofen)

P4 : Densitometri (kurkumin dan vitamin E)

P5 : HPLC (Kafein dan PCT)

P6 : Elektrokimia (pH metri dan potensiometri)

JADWAL

Minggu ke	Kegiatan
1	Asistensi (8-13 Maret 2021)
2	Pretes P 1 : Spektro UV (asam Salisilat dan asam Benzoat)
3	Pretes P 2 : Spektro Vis (Asam salisilat)
4	Pretes P 3 ; Spektrofluoro (Ibuprofen)
5	Pretes P4 : Densitometri (kurkumin dan vitamin E)
6	Pretes P5 : HPLC (Kafein dan PCT)
7	Pretes P6 : Elektrokimia (pH metri dan potensiometri)
8	Praktikum P 1 : Spektro UV (asam Salisilat dan asam Benzoat)
9	Praktikum P 2 : Spektro Vis (Asam salisilat)
10	Praktikum P 3 ; Spektrofluoro (Ibuprofen)
11	Praktikum P4 : Densitometri (kurkumin dan vitamin E)
12	Praktikum P5 : HPLC (Kafein dan PCT)
13	Praktikum P6 : Elektrokimia (pH metri dan potensiometri)
14	Responsi (Mengikuti jadwal UAS)

Praktikum dimulai jam 8.00-11.00 wib.

COVER LAPORAN PRAKTIKUM :

**LAPORAN RESMI
PRAKTIKUM ANALISIS INSTRUMEN
PERCOBAAN Minggu ke 1(Tuliskan Judul Percobaan)**



Di susun Oleh:

Nama :
Klas :
Golongan :
Kelompok :
Hari Praktikum :
Dosen pembimbing :

**LABORATORIUM KIMIA ANALISIS
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
YOGYAKARTA
2016**