

ANALISIS INSTRUMEN: KROMATOGRAFI DAN ELEKTROFORESIS

Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc.

Prof. Dr. apt. Any Guntarti, M.Si.



Sanksi Pelanggaran Pasal 113
Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014
Tentang Hak Cipta

1. Setiap orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
3. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
4. Setiap orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

ANALISIS INSTRUMEN: KROMATOGRAFI DAN ELEKTROFORESIS

Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc.

Prof. Dr. apt. Any Guntarti, M.Si.



Analisis Instrumen: Kromatografi dan Elektroforesis

Copyright © 2023

Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc. & Prof. Dr. apt. Any Guntarti, M.Si.

ISBN: 978-xxx-xxxx-xx-x

e-ISBN: 978-xxx-xxxx-xx-x

16 x 24 cm, viii + 142 hlm

Cetakan Pertama, September 2023

Penulis: Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc. & Prof. Dr. apt. Any Guntarti, M.Si.

Editor: Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc.

Layout: Muhammad Yugi Agusta, S.Si.

Desain Cover: Muhammad Yugi Agusta, S.Si.

Diterbitkan oleh:

UAD PRESS

(Anggota IKAPI dan APPTI)

Alamat Penerbit:

Kampus II Universitas Ahmad Dahlan

Jl. Pramuka No. 46, Sidikan, Umbulharjo, Yogyakarta.

Telp. (0274) 563515, Phone (+62) 882 3949 9820

All right reserved. Semua hak cipta © dilindungi undang-undang. Tidak diperkenankan memproduksi ulang atau mengubah dalam bentuk apa pun melalui cara elektronik, mekanis, fotocopy, atau rekaman sebagian atau seluruh buku ini tanpa izin tertulis dari pemilik hak cipta.

KATA PENGANTAR

Assalammu'alaikum w.w.

Alhamdulillahirabbil'alamiin, puji dan syukur kami panjatkan kehadiran Allah SWT, sehingga kami dapat menyelesaikan bahan ajar Teknik Pemisahan Kromatografi dan Elektroforesis.

Buku ajar ini berisi tentang beberapa materi yaitu: Kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom sederhana, HPLC, kromatografi Gas dan Elektroforesis. Harapan besar semoga buku ajar ini bermanfaat untuk membantu mahasiswa lebih memahami teori pemisahan tentang kromatografi dan elektroforesis. Penyusunan buku ajar ini memang sangat jauh dari sempurna dan hanya sebagai pemancing mahasiswa untuk mencari materi lebih detailnya.

Dengan terbitnya buku ajar ini kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Muchlas, M.T. selaku rektor Universitas Ahmad Dahlan.
2. Dekan Fakultas Farmasi Dr. Apt. Iis Wahyuningsih, M.Si.
3. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah membantu terselesainya bahan ajar ini.

Wassalammu'alaikum w.w.

Yogyakarta, 28 September 2023

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
BAB 1 PEMISAHAN SENYAWA.....	1
A. Tujuan Pembelajaran	1
B. Pemisahan Senyawa Kimia Secara Klasik	1
C. Pemisahan Senyawa Kimia Cara Kromatografi	1
D. Soal Latihan.....	2
BAB 2 KROMATOGRAFI KERTAS	4
A. Tujuan Pembelajaran	4
B. Pendahuluan	4
C. Prinsip Metode Kromatografi Kertas	5
D. Komponen dalam Kromatografi Kertas.....	6
E. Soal Latihan.....	7
BAB 3 KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS.....	8
A. Tujuan Pembelajaran	8
B. Pendahuluan	8
C. Perhitungan R _f	13
D. Soal Latihan.....	15
BAB 4 PELACAKAN KROMATOGRAM	16
A. Tujuan Pembelajaran	16
B. Pendeteksian Cara Fisika dan Penyimpangan Data.....	16
C. Pendeteksian Cara Kimia dan Penyimpangan Data.....	17
D. Soal Latihan.....	19
BAB 5 KROMATOGRAFI KOLOM SEDERHANA	20
A. Tujuan Pembelajaran	20

B.	Prinsip Dasar Kromatografi Kolom Sederhana	20
C.	Soal Latihan.....	23
BAB 6	PEMISAHAN KROMATOGRAM EFISIENSI TINGGI	24
A.	Tujuan Pembelajaran	24
B.	Klasifikasi Sistem Kromatografi Kolom	24
C.	Fase Gerak	25
D.	Fase Gerak dan Fase Diam	26
E.	Cara Kerja Kromatografi Kolom.....	26
F.	Teori Pendukung.....	28
G.	Soal Latihan.....	31
BAB 7	FUNGSI KOMPONEN INSTRUMEN HPLC	32
A.	Tujuan Pembelajaran	32
B.	Instrumentasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC). 32	
C.	Komponen Instrumen Pendukung HPLC	33
D.	Reaksi Derivatasi pada HPLC	36
E.	Evaluasi Metode Analisis	42
F.	Soal Latihan.....	45
BAB 8	KROMATOGRAFI GAS	46
A.	Tujuan Pembelajaran	46
B.	Pendahuluan	46
C.	Gas Chromatography Mass Spectrofotometer (GCMS).....	50
D.	Prinsip Pemisahan Kromatografi Gas.....	53
E.	Soal Latihan.....	54
BAB 9	FUNGSI KROMATOGRAFI DAN APLIKASINYA	55
A.	Tujuan Pembelajaran	55
B.	Komponen Tangki Gas Pembawa.....	55
C.	Sistem Injeksi Sampel	55
D.	Detektor dalam Kromatografi Gas	57
E.	Soal Latihan.....	58
BAB 10	KROMATOGRAFI PENUKAR ION	59

A. Tujuan Pembelajaran	59
B. Prinsip Dasar Terjadinya Penukar Ion	59
C. Pemilihan Jenis Penukar Ion.....	59
D. Regenerasi Bahan Penukar Ion (Pencucian).....	60
E. Soal Latihan.....	60
BAB 11 TEORI ELEKTROFORESIS	61
A. Tujuan Pembelajaran	61
B. Pendahuluan	61
C. Larutan Bebas.....	63
D. Pengaruh pH dan pKa Migran	66
E. Jenis Elektroforesis.....	70
F. Teknik Penotolan	75
G. Penggunaan.....	76
H. Soal Latihan.....	77
BAB 12 ELEKTROFORESIS KAPILER.....	78
A. Tujuan Pembelajaran	78
B. Pendahuluan	78
C. Teori Dasar	79
D. Soal Latihan.....	95
BAB 13 APLIKASI ELEKTROFORESIS DALAM FARMASI.....	97
A. Tujuan Pembelajaran	97
B. Pendahuluan	97
C. Migrasi Sampel.....	98
D. Kapiler Elektroforesis.....	103
E. Soal Latihan.....	111
DAFTAR PUSTAKA	112
GLOSARIUM	114
HASIL SCANNING SIMILARITY.....	118
IDENTITAS PENULIS BUKU ANALISIS INSTRUMEN: KROMATOGRAFI DAN ELEKTROFORESIS.....	119

A. Identitas Diri Dr. Apt. Nina Salamah, M.Sc.	119
B. Identitas Diri Prof. apt. Any Guntarti, M.Si.	121

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1. Urutan kemampuan elusi fase gerak terhadap fase diam alumina atau silica gel.....	11
Tabel 6. 1. Pembagian Klasifikasi Sistem Kromatografi.....	26
Tabel 8. 1. Karakteristik penggunaan detektor.....	49
Tabel 9. 1. Tabel karakteristik beberapa jenis kolom.....	56
Tabel 9. 2. Lapisan fase diam umum untuk kolom kapiler.....	57
Tabel 10. 1. Jenis Resin dalam Kromatografi Penukar Ion.....	59
Tabel 12. 1. Bobot molekul dan mobilitas sampel.....	83
Tabel 12. 2. Beberapa faktor yang berpengaruh dan hasilnya.....	84
Tabel 12. 3. Tabel pengaruh tambahan lapisan pada dinding kapiler dan hasil.....	85
Tabel 12. 4. Data perhitungan kecepatan mobilitas elektroosmotik dan efektifitas mobilitas solut.....	87
Tabel 13. 1. Pengaruh kadar terhadap daya pisah dan bobot molekul.....	99
Tabel 13. 2. Pengaruh kadar akrilamid dengan dapar BIS daya pisah.....	100
Tabel 13. 3. Tabel zat warna terhadap protein dan kepekaannya.....	101

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. 1.	Bagan sistem kromatografi.	2
Gambar 3.1.	Proses elusi menggunakan KLT, (a) Awal elusi dan (b) Hasil elusi.	12
Gambar 3.2.	Penetapan nilai R_f : (a) senyawa 1 ($R_f = 0,45$); (b) senyawa 2 ($R_f = 0,8$); dan (c) senyawa 3 ($R_f = 0,9$).	14
Gambar 3.3.	Proses identifikasi campuran asam amino. (a) sebelum di semprotkan ninhidrin dan (b) setelah disemprotkan ninhidrin.	14
Gambar 4.1.	Alat densitometer.	16
Gambar 5.1.	Pemisahan sampel dengan kromatografi kolom.	20
Gambar 5.2.	Pengisian kolom kromatografi.	22
Gambar 6.1.	Proses Elusi Kromatografi Kolom.	27
Gambar 6.2.	Kurva Hubungan antara fase gerak, fase diam, gerakan partikel sampel, dan persamaan Van Deemter.	28
Gambar 7.1.	Skema rangkaian alat KCKT/HPLC (Skoog & West, 1980).	32
Gambar 7.2.	Pemisahan enantiomer dari (a) D dan L asam amino (b) D dan L-dopa menjadi Diastereoisomer dengan reagen marfeys. Dimana (a) 1. L-glutamin, 2. D-Glutamin, 3. Marfey-OH, 4. L-mentionin, 5. D-mentionin, 6. L-phenilalanin, 7. D-phenilalanin. (b) L, L-Dopa, M, Marfey-OH, D, D-Dopa. .	42
Gambar 8.1.	Bagan Kromatografi Gas (Wirasnita, 2010).	46
Gambar 8.2.	Gambar Jenis Kolom Kapiler.	48
Gambar 8.3.	Gambar Beberapa contoh kolom kapiler.	49
Gambar 8.4.	Gambar Instrumen GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrometer) (Wettasinghe dkk, 2001).	52
Gambar 8.5.	GCMS dengan contoh produk kromatogramnya.	53

Gambar 8.6.	Skema Kromatografi Gas.....	54
Gambar 9.1.	Contoh sistem injeksi sampel.	55
Gambar 10.1.	Gambaran prinsip dasar penukar ion Na^+ dengan SO_3^-	59
Gambar 10.2.	Mekanisme kromatografi penukar ion Na^+ dan NH_3^+	60
Gambar 11.1.	Alat Pokok Elektroforesis.....	62
Gambar 11.2.	Percobaan untuk menguji Osmose.....	65
Gambar 11.3.	Dua elektroforesis dari sampel sama. (a) Menempuh Jarak yang sama dengan waktu yang berbeda-beda dan (b) menempuh waktu yang sama dengan jarak yang berbeda-beda.....	69
Gambar 11.4.	Bagian-bagian dari lempeng elektroforesis.	70
Gambar 11.5.	Elektroforesis lempeng tegak.....	70
Gambar 11.6.	Perlengkapan elektroforesis.	71
Gambar 11.7.	Elektroforesis lempeng mendatar.....	71
Gambar 11.8.	Media elektroforesis dengan beda kerapatan.	72
Gambar 11.9.	Alat elektroforesis tabung.....	73
Gambar 11.10.	Cara penotolan sampel pada sumuran media.	76
Gambar 11.11.	Hasil rekaman Elektroforegram protein dan Markernya.....	77
Gambar 12.1.	Rangkaian alat elektroforesis kapiler.	79
Gambar 12.2.	Mekanisme pemisahan dan kromatogramnya.....	80
Gambar 12.3.	Muatan bilayer antara media dan sampel.....	81
Gambar 12.4.	Hubungan antara: (a) banyaknya muatan SiO_2 dengan (b) pH dan EOF.	82
Gambar 12.5.	Gerakan anion, kation, dan senyawa netral.	85
Gambar 12.6.	Elektroforegram senyawa ionik dan netral.	86
Gambar 12.7.	Elektroforesis yang lengkap.....	87
Gambar 12.8.	Elektroforegram ion-ion.	88
Gambar 12.9.	Kecepatan alir.	89
Gambar 12.10.	Penampang melintang pipa kapiler untuk elektroforesis.	89

Gambar 12.11. Mekanisme pemisahan pada analisis mikroba secara elektroforesis.....	90
Gambar 12. 12. Puncak mikroba teruji.....	90
Gambar 12. 13. Elektrogram untuk antibiotic cephalosporin dengan 30µg/mL.	91
Gambar 12. 14. Elektroforegram turunan sterol.....	92
Gambar 12. 15. Senyawa turunan sterol.....	93
Gambar 12. 16. Bentuk miceller.....	93
Gambar 12. 17. Arah Gerakan miceller bermuatan.	94
Gambar 12. 18. Struktur surfaktan dan elektroforegram.....	94
Gambar 12. 19. Kromatogram berbagai kation dalam dapar pH 6.0.....	95
Gambar 12. 20. Bentuk puncak karena pengaruh migrasi dapar.	95
Gambar 13. 1. Kecepatan migrasi karena pengaruh bobot molekul.....	98
Gambar 13. 2. Hasil percobaan DNA dan hasil uraiannya.....	99
Gambar 13. 3. Elektroforegram sampel karena pengaruh kadar media.....	99
Gambar 13. 4. Hubungan kecepatan migrasi dan BM.....	100
Gambar 13. 5. Hasil elektroforegram protein BSA (Bovine serum).....	101
Gambar 13. 6. Ikatan pewarna ethidium bromida dengan DNA.	102
Gambar 13. 7. Hasil pewarnaan elektroforegram dengan ethidium bromida yang di potret (UV).....	102
Gambar 13. 8. Pewarnaan dan hasilnya pada DNA.....	103
Gambar 13. 9. Pewarnaan dan cara reaksinya.	103
Gambar 13. 10. Perlengkapan elektroforesis kapiler.....	104
Gambar 13. 11. Migrasi ion menuju pH titik isoelektrik.....	104
Gambar 13. 12. Hasil analisis oligo DNA dengan EK IF.	105
Gambar 13. 13. Hasil analisis DNA atas pengaruh dapar.....	105
Gambar 13. 14. Elektroforegram fenilalanin.....	107
Gambar 13. 15. Elektroforegram turunan fenilalanin ecstasy.	107
Gambar 13. 16. Proses pembentukan turunan fenilalanin ecstasy.....	107

Gambar 13. 17. Kromatogram beberapa kation; (1) Amonium; (2) Kalium; (3) Kalsium; (4) Natrium; (5) Magnesium; dan (6) Zink. 108

Gambar 13. 18. Proses Benzil penisilin menjadi Semisintetis penisilin..... 108

Gambar 13. 19. Elektroforegram turunan penisilin. 108

Gambar 13. 20. Struktur senyawa dari (a) tetrasiklin dan (b) streptomisin. 109

Gambar 13. 21. Elektroforegram dari streptomisin dan tetrasiklin. 109

BAB 1

PEMISAHAN SENYAWA

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang pemisahan senyawa dengan cara klasik dan kromatografi serta parameternya.

B. Pemisahan Senyawa Kimia Secara Klasik

Dasar distribusi senyawa (zat terlarut atau alkali) antara dua fase yaitu hasil keseimbangan energi antara molekul linoleum dan molekul setiap fase. Distribusi yaitu daya tarik atau tolakan molekul atau ion yang bersaing untuk fase yang terlibat. Energi ini, karena sifat kutubnya, menimbulkan momen dipol konstan atau sekadar efek, atau dipecah oleh ikatan London, atau gaya dispersi. Seperti yang telah dijelaskan, kromatografi merupakan alat untuk memisahkan campuran senyawa-senyawa kimia, sehingga perlu diketahui teori dan mekanisme proses pemisahan yang berbeda-beda.

C. Pemisahan Senyawa Kimia Cara Kromatografi

Pemisahan terjadi pada kromatografi memakai dua fase yang tidak bercampur yang selalu berada dalam sistem campuran, yang dikenal sebagai fase gerak dan fase diam. Fase diam biasanya berupa padatan atau cairan yang didukung oleh padatan. Sederhananya, pemisahan kromatografi memiliki dasar yang sama dengan sifat magnetik besi - fase diam adalah magnet dan fase gerak adalah besi. Proses pemisahan dirancang seefektif mungkin sehingga efisiensinya mendekati 100%. Secara analitis, teknik pemisahan ini berguna untuk memisahkan sampel dengan rentang densitas yang sangat dekat.

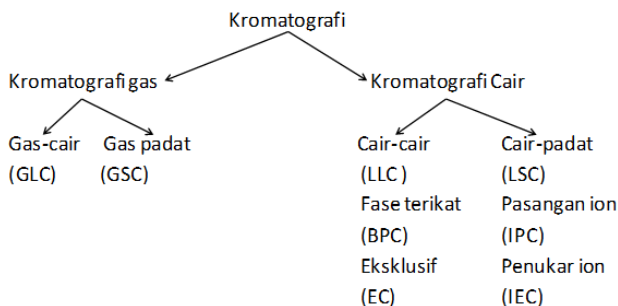
Secara garis besar, kromatografi dirancang sesuai dengan sifat fasa zat yaitu padat, cair dan gas. Cairan dan gas merupakan fase cair yang selalu bergerak atau mengalir sehingga perlakuan utama dalam teknik kromatografi ini adalah gerakan, sedangkan padatan sangat padat dengan molekul dan keras dan tetap sehingga dianggap statis. Dalam kasus luar biasa, desain kromatografi cair dapat dianggap diam dengan gas sebagai zat yang bergerak.

Tergantung dari sifat fase zatnya, kromatografi dirancang terdiri dari tiga bagian, yaitu kromatografi gas-cair(GLC), cair-cair, dan cair-padat. :

1. Gas-cair : sampel dapat berupa gas ataupun cair.
2. Cair-cair dan cair-padat : sampel dapat berupa cair.

Klasifikasi kromatografi berdasarkan caranya, kolom dan planar. Pemisahaan kolom, menggunakan alat yaitu kaca, kemudian diinjeksikan dengan fase diam sehingga pada prinsipnya sama dengan kolom yang dilalui fase gerak.

Pembagian kromatografi sesuai dengan bagan yang digambarkan seperti berikut pada Gambar 1.1, walaupun bagan ini belum memberi penjelasan dengan lengkap maka mahasiswa wajib mencari penjelasan di pustaka yang lain.



Gambar 1. 1. Bagan sistem kromatografi.

D. Soal Latihan

1. Jelaskan yang dimaksud mengenai sistem kromatografi?

2. Buatlah Bagan skema dan penjelasannya?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 2

KROMATOGRAFI KERTAS

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang pemisahan senyawa kimia dengan cara kromatografi kertas.

B. Pendahuluan

Dalam kromatografi, komponen dibagi menjadi dua fase, fase gerak dan fase diam. Perpindahan massa antara fase gerak dan fase diam terjadi ketika molekul campuran teradsorpsi pada permukaan partikel. Dalam kromatografi kertas menaik, kertas digantung di bagian atas labu sehingga terendam dalam pelarut di bagian bawah dan pelarut merangkak ke atas kertas dengan aksi kapiler. Dalam bentuk turun, kertas terpasang dengan kuat di dalam kartrid pelarut di bagian atas kotak dan pelarut turun dengan bantuan kapiler gravitasi. Setelah pelarut selesai bergerak sepanjang kertas, kertas dikeringkan dan pita komposisi senyawa yang diharapkan diperoleh dan dipelajari lebih lanjut.

Pemisahan berhasil ketika zat terlarut didapatkan pada campuran asli bergerak di sepanjang kertas dengan kecepatan berbeda untuk membentuk serangkaian titik diskrit. Jika senyawanya berwarna, bintik-bintik tentu saja bisa terlihat. Pemisahan dapat terjadi antara fase cair yang diadsorpsi oleh fase diam dan fase gerak. Dalam kromatografi partisi, fase gerak mengalir melalui fase diam cair yang diadsorpsi pada dukungan (Anonim, 2010).

Teknik kromatografi kertas diperkenalkan oleh Consden, Gordon dan Martin (1994), dengan menggunakan kertas saring sebagai pendukung fase diam. Kertas merupakan selulosa murni dengan afinitas terhadap air atau pelarut polar lainnya. Saat air diserap di atas kertas, ia membentuk lapisan tipis yang bisa dianggap sebagai kolom. Kertas bertindak sebagai penyangga

dan air bertindak sebagai fase diam teradsorpsi antara struktur berpori kertas. Cairan fase gerak, biasanya campuran pelarut organik dan air, akan mengalir bersama sampel di atas kertas dengan laju yang berbeda. Pemisahan terjadi berdasarkan pembagian masing-masing komponen antara fase diam dan fase gerak. Kromatografi kertas digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Sebagian besar senyawa yang dipisahkan sangat polar, misalnya asam amino, gula, dan pigmen alami (Yazid, 2005).

Dalam kromatografi kertas, proses menghilangkan asam mineral dari kertas disebut desalinasi. Larutan diteteskan ke kertas dengan menggunakan mikropipet dengan jarak 2-3 cm dari salah satu ujung kertas dalam bentuk garis horizontal. Setelah kertas mengering, kertas itu ditempatkan di dalam kotak yang sudah dibasahi dengan air atau pelarut yang sesuai. Saturasi dapat dilakukan 24 jam sebelum analisis. Gunting adalah teknik dimana cairan dibiarkan tenggelam ke dalam kertas karena gravitasi. Dalam teknik bottom-up, pelarut bergerak ke atas dengan aksi kapiler. Nilai R_f harus sama saat turun dan naik. Sedangkan metode ketiga disebut kromatografi kertas radial atau melingkar. Kondisi berikut harus diperhitungkan untuk mendapatkan nilai R_f yang dapat direproduksi. Suhu harus dikontrol dalam kisaran tidak lebih dari $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kertas harus didiamkan selama minimal 24 jam dengan media pelarut, untuk mencapai kesetimbangan sebelum pelarut dibiarkan menetes ke atas kertas. Lakukan pekerjaan paralel, R_f tidak boleh berbeda lebih dari 0,02 (Khopkar, 2008).

C. Prinsip Metode Kromatografi Kertas

Prinsip kromatografi kertas yaitu adsorpsi dan polarisasi, dimana adsorpsi berdasar pada panjang komponen campuran yang teradsorpsi pada permukaan fase diam serta pada kepolaran komponen penting karena komponen akan larut dan terbawa oleh pelarut jika memiliki kepolaran yang sama dan laju migrasi yang sama pada fase diam dan fase gerak (Yazid, 2005).

Atomiser sering digunakan sebagai reagen semprot ketika batas permukaan pelarut dan larutan kertas harus terlihat jelas. Atomiser yang baik lebih baik. Gas juga dapat digunakan sebagai penanda, untuk karbohidrat simbol R_g digunakan sebagai pengganti R_f. Setelah menandai titik batas di permukaan, analisis dapat dilakukan dengan kalorimetri atau spektroskopi jika sampelnya logam. Bahan yang terkandung dalam kertas dapat ditentukan langsung dengan melarutkan. Kromatografi kertas, selain digunakan untuk pemisahan dan analisis kuantitatif, juga sangat berguna untuk identifikasi. Hal ini dapat dilakukan, misalnya dengan membuat histogram antara R_{mα} dan jumlah kation dalam deret homolog (Khopkar, 2008).

Susunan serat kertas membentuk media berpori yang berfungsi sebagai tempat aliran fase gerak. Berbagai jenis kertas yang tersedia di pasaran adalah whatman 1, 2, 31 dan 3 MM, kertas asam asetil, kertas kieselgurh, kertas silikon dan kertas penukar ion juga digunakan. Kertas selulosa murni, kertas selulosa termodifikasi, dan kertas fiberglass juga tersedia. Zat hidrofobik dapat dipisahkan dalam dua jenis kertas terakhir. Kertas asam asetil atau kertas silikon dapat digunakan untuk zat hidrofobik, sedangkan kertas fiberglass dapat digunakan untuk reagen korosif. Saat memilih kertas, pertimbangan harus diberikan pada tingkat dan kecukupan pemisahan, difusivitas bintik, efek residu dan pembentukan komet, dan migrasi pelarut, khususnya untuk teknik descending (Khopkar, 2008).

D. Komponen dalam Kromatografi Kertas

1. Fase Diam

Kromatografi kertas yaitu kromatografi dasar dan salah satu alat pemisah yang sering digunakan untuk memisahkan dan meneliti komponen-komponen dalam suatu campuran. Sebenarnya kromatografi ini merupakan lanjutan KLT, sebab cara kerja, mekanisme pemisahan hampir sama dengan kromatografi lapis tipis. Kromatografi kertas hanya satu jenis fase diam ialah

selulosa yang bersifat polar. Kromatografi ini menggunakan mekanisme pemisahan secara partisi.

2. Fase gerak

Komponen fase gerak disebut BAW (Butanol, Air Asam Asetat). Banyak digunakan untuk memisahkan flavonoid. Fase gerak yang merupakan pelarut organik akan berkompetisi melarutkan sampel yang akan dianalisis. Kromatografi kertas dapat dipolarisasikan dengan impregnasi atau impregnasi, seperti dengan asetilasi, fosforilasi, formilasi. Atau dengan senyawa lipofilik seperti parafin, parafin, vaselin, undekan.

3. Pelaksanaan

Kromatografi digunakan pada pemisahan zat campuran menjadi komponen-komponennya. Semua bentuk kromatografi bekerja berdasarkan prinsip ini. Semua kromatografi memiliki fase diam (yang dapat berupa campuran padat atau cair-padat) dan fase gerak (yang dapat berupa cairan atau gas). Fase gerak melewati fase diam dan membawa serta komponen yang ada dalam campuran. Komponen yang berbeda bergerak dengan kecepatan yang berbeda. Kita akan membahasnya lebih lanjut.

4. Pendeteksian.

Deteksi yang digunakan dalam kromatografi kertas yaitu bisa langsung karena senyawanya berwarna. Sedangkan yang tidak berwarna menggunakan pereaksi semprot, atau diuapkan.

E. Soal Latihan

1. Bagaimana cara menyiapkan dan pelaksanaan kromatografi kertas?
2. Apakah keuntungan dan kerugian penggunaan kromatografi kertas?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 3

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang pemisahan senyawa kimia dengan cara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

B. Pendahuluan

Kromatografi lapis tipis (KLT), salah satu alat pemisah dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif (Moffat, 1986). Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesis, isolasi dari hewan percobaan, maupun dari tanaman dan mikroorganisme. Alat ini merupakan alat yang mudah penggunaannya, murah dan selektif, walaupun sekarang telah dikembangkan. Pengembangan KLT mengikuti perkembangan teknologi, karena alat pembuat lapisan tipis, jenis fase diam, alat penotol, dan alat pelacak bercak sudah dapat dilakukan secara otomatis.

1. Fase Diam yang digunakan untuk yang fase normal diantaranya:
 - a. Silica gel.

Silica gel yaitu silica yang dibebaskan dari H₂O, sedikit asam maka tahap ini lebih banyak digunakan. Untuk memperkuat lapisan pada dudukan, ditambahkan silika gel gipsum (kalsium sulfat) sehingga disebut silika gel G. Gelas tersebut digunakan sebagai penyangga lapisan tipis berukuran 20 x 20, 10 x 20 atau 5 x 10 cm. Penyangga lainnya berupa lembaran aluminium atau plastik dengan ukuran yang sama seperti di atas, biasanya buatan pabrik. Silica gel kadang-kadang ditambahkan ke senyawa fluoresen sehingga bila terkena sinar UV berfluoresensi atau bercahaya, sehingga disebut gel

silika GF254, yaitu gel silika dengan fluoresensi yang berpendar pada 254 nm.

b. Alumina (aluminium oksida).

Fase diam ini bersifat sedikit basa, lebih jarang digunakan, bila akan digunakan diaktifkan kembali dengan pemanasan. Alumina yang digunakan sebagai fase diam untuk KLT umumnya yang bebas air, sehingga mempunyai aktivitas penjerapan lebih tinggi.

c. Kiselguhr.

Sebenarnya merupakan asam silica yang amorf, berasal dari kerangka diatomeae, maka lebih dikenal dengan nama tanah diatome, kurang bersifat adsorptif dibanding silica.

d. Magnesium silicate.

Nama lain dalam perdagangan dikenal dengan floresil, hanya digunakan bila adsorben atau penjerap lain tidak dapat digunakan.

e. Cellulose.

Polaritasnya tinggi dapat digunakan sebagai pemisah secara partisi, baik dengan bentuk kertas maupun bentuk lempeng. Keduanya masih sering dipakai misalnya untuk pemisahan flavanoid. Ukuran partikel yang digunakan kira-kira 50 μm , maka elusinya lebih lambat, Fase diam ini sekarang sudah diganti bubuk selulosa yang dapat dilapiskan pada kaca seperti halnya fase diam yang lain. Penggunaan lebih efisien dan lebih banyak digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang polar, atau senyawa isomer.

2. Fase diam yang merupakan fase terbalik adalah:

a. Fase diam dari silica yang telah diubah.

Merupakan bahan dari silica yang dilapisi dengan senyawa non polar misalnya lemak, parafina, minyak silikon, karet, atau lilin. Dengan fase tersebut fase gerak air yang polar dapat digunakan sebagai eluen. Ukuran partikel yang digunakan kira-kira 50 μm , maka elusinya lebih lambat, Fase diam ini sekarang sudah diganti bubuk selulosa yang dapat dilapiskan pada kaca seperti halnya fase diam yang lain. Penggunaan lebih efisien dan lebih banyak digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang polar, atau senyawa isomer. Usaha melapisi silica gel dengan berbagai senyawa hidrokarbon yang berbeda-beda jumlah rantai C, adalah untuk menutup gugus hidroksil dan silica, sehingga dapat memberi daya pisah yang lebih bagus. Bahkan lempengnya dapat diproduksi besar-besaran oleh pabrik. Pelapis yang paling populer adalah C18 atau okta desil silan dengan kadar 10 sampai 12% b/b. Bila kadar lebih besar dari 12% akan rusak oleh eluen yang berisi air dengan jumlah lebih besar dari 10%. Biasanya sebagai fase gerak digunakan campuran metanol-air, asetonitril-air. Dengan cara ini dapat digunakan sebagai pembanding terhadap kromatografi cair kinerja tinggi, karena mempunyai hasil elusi yang hampir mirip. (Moffat 1986).

b. Resin.

Digunakan sebagai fase diam penukar ion KLT dengan fase diam penukar ion, yang dilapiskan pada pendukung. Sedangkan resinnya merupakan polimer dari stirendivenil yang mengalami kopolimerisasi. Sangat berguna untuk memisahkan senyawa berbobot molekul tinggi dan bersifat amfoter seperti asam amino, protein, enzim, nukleotida dan lain-lain. Sebagai fase gerak digunakan larutan asam kuat atau basa kuat. Fase diam yang telah dilapiskan pada lempeng penyangga dapat diubah sifatnya baik polaritas maupun daya retensi dan daya pisahnya dengan jalan impregnasi (pembabaceman) atau pelapisan.

3. Fase gerak.

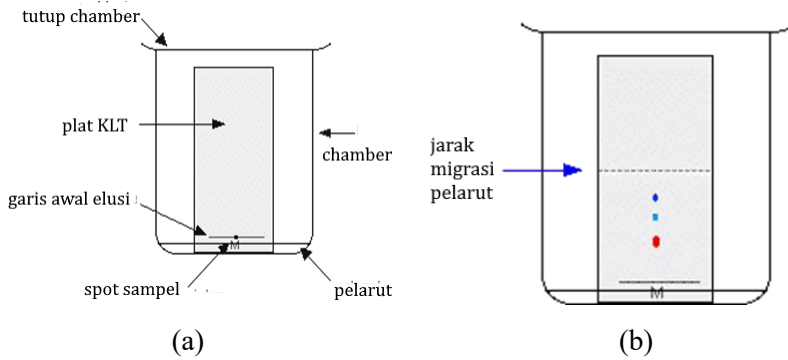
Pemilihan fase gerak baik tunggal maupun campuran tergantung pada absolut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Bila fase diam ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut seperti tertera dalam Tabel 3.1. (Perhatikan pula kemampuan elusi masing-masing fase gerak terhadap fase diam yang digunakan).

Tabel 3. 1. Urutan kemampuan elusi fase gerak terhadap fase diam alumina atau silica gel.

Nama Pelarut	ϵ	Pelarut	ϵ
Pentana	0,01	Aseton	0,56
Heksana	0,01	Etilasetat	0,58
Iso-oktana	0,01	Dietilamina	0,63
Dikloroheksana	0,04	Asetonitril	0,65
Toluen	0,29	Isopropilalkohol	0,82
Klorobutan	0,30	Etanol	0,88
Eter	0,40	Metanol	0,95
Kloroform	0,40	Asam asetat	Kuat
Metilenklorida	0,42	Air	Kuat
Tetrahidrofuran	0,45	Piridin	Kuat

4. Pelaksanaan dengan nilai R_f .

Kita akan mulai membahas hal yang sederhana untuk mencoba melihat bagaimana pewarna tertentu dalam kenyataannya merupakan sebuah campuran sederhana dari beberapa pewarna.



Gambar 3. 1. Proses elusi menggunakan KLT, (a) Awal elusi dan (b) Hasil elusi.

Pada Gambar 3.1.a. Garis pensil digambar di dekat bagian bawah piring dan setetes pelarut dari campuran pewarna diterapkan ke garis ini. Tanda diberikan pada garis pelat untuk menunjukkan posisi awal penurunan. Jika dilakukan dengan tinta, maka zat warna pada tinta akan bergerak seolah-olah sedang membentuk kromatogram. Ketika pelat campuran sudah kering, pelat ditempatkan dalam gelas kimia dengan penutup yang berisi pelarut dalam jumlah sedang. Perhatikan bahwa batas pelarut berada di bawah garis tempat noda berada.

Alasan dari menutup gelas kimia adalah untuk memastikan bagian dalam gelas kimia ini bersifat jenuh dengan uap pelarut. Untuk mencapai kondisi ini, kertas saring yang direndam pelarut biasanya ditempatkan dalam gelas kimia. Kondisi jenuh dalam gelas kimia dengan uap air mencegah penguapan pelarut. Karena pelarut bergerak perlahan pada lempengan, komponen campuran pewarna yang berbeda akan bergerak dengan kecepatan berbeda dan muncul sebagai gumpalan warna berbeda.

Gambar 3.1.b. menunjukkan lempengan setelah pelarut bergerak setengah dari lempengan. Pelarut dapat mencapai sampai pada bagian atas dari

lempengan. Ini akan memberikan pemisahan maksimal dari komponen-komponen yang berwarna untuk kombinasi tertentu.

C. Perhitungan R_f

Berapa banyak warna berbeda yang terbentuk dari campuran tersebut, Anda dapat berhenti di pembahasan sebelumnya. Namun, pengukuran sering diambil dari pelat untuk membantu identifikasi senyawa yang terjadi. Pengukuran ini didasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh titik warna yang sesuai. Ketika pelarut mendekati bagian atas pelat, pelat dikeluarkan dari gelas kimia dan posisi pelarut ditandai dengan garis sebelum penguapan.

Nilai R_f untuk setiap warna dihitung dengan rumus sebagai berikut:

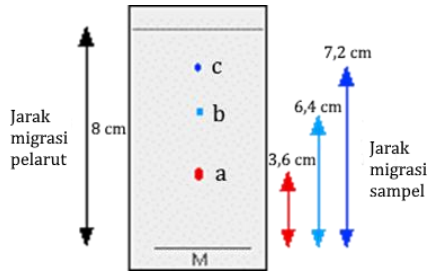
$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Contoh:

Suatu komponen bergerak sepanjang 2,4 cm dari garis awal, sementara pelarut berjarak 8,0 cm, sehingga nilai R_f untuk komponen tersebut menjadi:

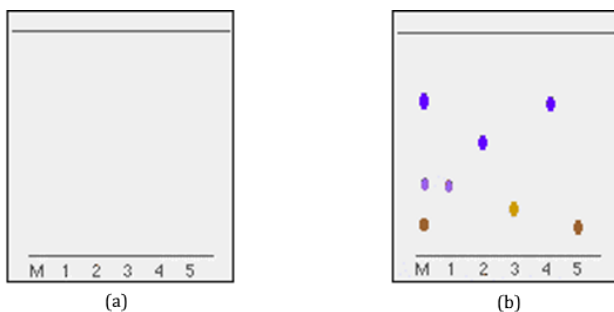
$$R_f = \frac{2,4 \text{ cm}}{8,0 \text{ cm}} = 0,3$$

Pengukuran berlangsung sebagai berikut:



Gambar 3. 2. Penetapan nilai R_f : (a) senyawa 1 ($R_f = 0,45$); (b) senyawa 2 ($R_f = 0,8$); dan (c) senyawa 3 ($R_f = 0,9$).

Nilai R_f ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, komposisi pelarut, dan sebagainya. Pengamatan KLT kadang kala memerlukan suatu pereaksi yang disemprotkan pada plat KLT agar spot dapat teramati secara visual. Aplikasi KLT dalam identifikasi campuran asam amino akan mengalami proses pemisahan asam amino tidak dapat diamati secara visual. Oleh karena itu, pengamatan asam amino tersebut dapat dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi yang menimbulkan warna sehingga dapat diamati secara visual. Salah satu pereaksi yang disemprotkan dalam identifikasi asam amino pada plat KLT yaitu pereaksi ninhidrin. Hasil pengamatan KLT seperti Gambar 3.3.



Gambar 3. 3. Proses identifikasi campuran asam amino. (a) sebelum di semprotkan ninhidrin dan (b) setelah disemprotkan ninhidrin.

Ket: M (sampel campuran asam amino); 1 (standar asam amino 1); 2 (standar asam amino 2); 3 (standar asam amino 3); 4 (standar asam amino 4); dan 5 (standar asam amino 5).

Sampel M merupakan campuran asam amino 1, 4, dan 5. Hal ini dikarenakan spot pada sampel M memiliki Rf yang sama dengan asam amino standar tersebut.

D. Soal Latihan

1. Tuliskan langkah-langkah menggunakan kromatografi kolom sederhana ?
2. Apakah perbedaan dan persamaan dengan kromatografi planar?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 4

PELACAKAN KROMATOGRAM

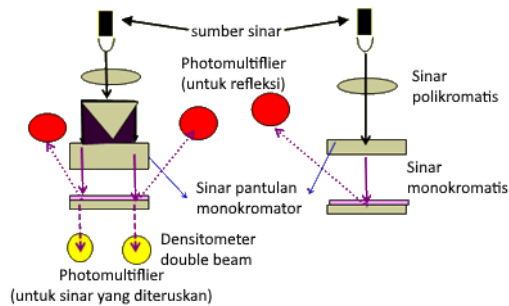
A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang pelacakan kromatogram dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), KCKT (Kromatografi Cair kinerja Tinggi) dan KGC (Kromatografi Gas Cair).

B. Pendeteksian Cara Fisika dan Penyimpangan Data

Penentuan kadar analit yang dikorelasikan dengan area noda pada KLT akan lebih terjamin kesahihannya dibanding metode KCKT (Kromatografi Cair kinerja Tinggi) atau KGC (Kromatografi Gas Cair). sebab area noda kromatogram diukur pada **posisi lurus atau "Zig-zag" menyeluruh**.

Korelasi kadar analit pada noda kromatogram yang dirajah terhadap area tidak menunjukkan garis lurus, akan tetapi merupakan garis lengkung mendekati parabola.



Gambar 4. 1. Alat densitometer.

Photomultiplier dapat meningkatkan kekuatan beda potensial sehingga dapat menggerakkan integrator. Integrator sistem komputer dapat langsung menghitung luas puncak atau tinggi puncak secara otomatis. Perhatikan juga nomor urut, posisi gambar dalam urutan Y atau waktu retensi.

C. Pendeteksian Cara Kimia dan Penyimpangan Data

Teknik penggunaannya: Pengukuran sinar yang diserap dan diteruskan (hanya untuk KLT dengan pendukung gelas). Sinar yang diserap dan dipantulkan atau sinar yang dipendarkan.

1. *Scanning* pengujian kuantitatif ada 2 cara :

a. Cara memanjang

Sinar dilewatkan pada tengah bercak, sehingga bercak hanya dideteksi sepanjang garis tengahnya sepanjang sumbu Y (Y1 sampai Y2). Hasilnya baik bila bercak berbentuk bulat semetris.

b. Sistem zig-zag

Sistem ini diprogram berjalan memanjang sumbu Y tetapi berbelok -belok sampai garis tepi bercak pada garis X, sehingga bergerak dari Y1 – Y2, dan X1 – X2. Preparasi kromatogram untuk uji kuantitatif dengan spektrofotometer. Susunan optik densitometer ini tidak banyak berbeda dengan spektrofotometer tetapi pada densitometer digunakan alat khusus *reflection photomultiplier*, sebagai pengganti **photomultiplier pada spektrofotometer**.

2. Uji kuantitatif kromatogram dengan densitometer.

Densitometri diutamakan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil yang merupakan hasil pemisahan dengan KLT. S. Levi dan Reisfeld telah mengangkat metode densitometrik ke tingkat analisis kuantitatif ultramikro. Keduanya telah berhasil meneliti testosteron dalam cairan biologis pada rentang kadar (1 – 250) ng, LSD dengan kadar (2 – 150) ng, dan kholesterol (4 – 150) ng dengan pengukuran pendaran pada noda (kromatogram) KLT.

Metoda analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektro magnetik dengan analit yang merupakan noda pada KLT. Uji kualitatif dan kuantitatif dengan sistem absorpsi sinar atau emisi sinar (flouresensi). Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT secara: Absorpsi, Transmisi dan Pantulan (refleksi) pendar fluor/pemadaman pendar fluor.

Pada umumnya spektrofotodensitometer memberikan rentang gelombang penentuan 200 – 630 nm. Lampu D2 (Deuterium) dipakai untuk pengukuran pada daerah ultra violet dan lampu tungstein pengukuran pada daerah sinar tampak. Untuk penentuan pendar fluor dan pemadaman pendar fluor dipakai lampu busur Hg bertekanan tinggi.

3. Persamaan Kubelka-Munk

Korelasi kadar analit yang dirajah terhadap area kromatogram tidak merupakan garis lurus. Bila REM (Radiasi Elektro Magnetik) dengan intensitas semula (I_0) jatuh pada permukaan lapisan tipis yang tidak homogen dengan arah rambatan tegak lurus, maka sebagian dari REM tersebut akan: direfleksikan (I_s), diserap oleh analit lapisan tipis (I) dan diteruskan (I_t).

Rumus matematikanya:

$$I = I_0 + I_s + I_t$$

D. Soal Latihan

1. Bagaimana langkah-langkah untuk menggunakan densitometer?
2. Ada berapa macam teknik scanning?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 5

KROMATOGRAFI KOLOM SEDERHANA

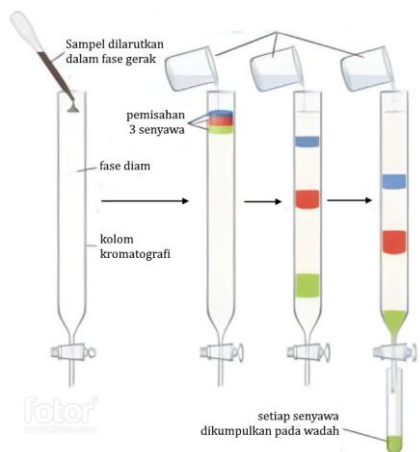
A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami terkait kromatografi kolom sederhana.

B. Prinsip Dasar Kromatografi Kolom Sederhana

Kromatografi, terdiri dari dua suku kata *chromos* (pewarna dan *graphos* (foto), gambar pewarna pertama kali ditemukan oleh seorang ahli botani Rusia dalam proses pemisahan zat kimia dari tanaman. Secara garis besar kromatografi yaitu alat pemisah yang berbeda dengan cara pemisahan yang berdasar sifat kimia dan sifat fisika atau pemisahan cair-cair.

Pemisahan yang terjadi kromatografi juga menggunakan 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.



Gambar 5. 1. Pemisahan sampel dengan kromatografi kolom.

Pada dasarnya kromatografi kolom sama dengan kromatografi planar. Hanya fase diamnya dimasukkan dalam tempat yang berbentuk kolom.

Diameter kolom 1 – 2 cm, dengan panjang kolom bervariasi. Bila kita mempelajari sifat kimia fisika, tentang kelarutan suatu senyawa kimia dalam pelarut air maupun pelarut organik, senyawa tersebut terlihat mempunyai perbedaan kelarutan. Sebagai contoh Gambar 5.1., dalam corong pisah terdapat dua fase air dibagian atas dan kloroform dibagian bawah.

Bila terdapat senyawa yang larut dalam air sebagian, tetapi sebagian besar larut dalam kloroform maka bila senyawa yang terlarut dalam air tersebut disaring atau diekstraksi dengan kloroform akan diperlukan waktu tertentu mengocoknya agar semua senyawa yang terlarut dalam air berpindah ke pelarut kloroform. Kromatografi yang dibicarakan dalam bab ini dibedakan menjadi kelompok yang berdasar atas proses pemisahannya yaitu:

1. Kromatografi adsorpsi
2. Kromatografi partisi
3. Kromatografi pasangan ion
4. Kromatografi penukar ion
5. Kromatografi eksklusi
6. Kromatografi afinitas

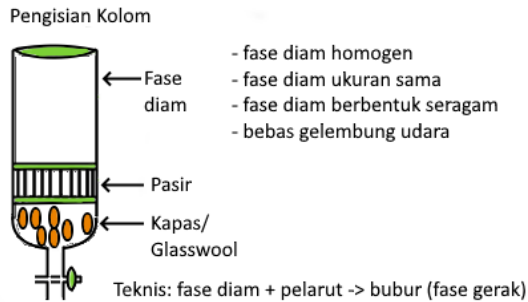
Pembagian di atas didasarkan pada jenis fasa yaitu cair dan gas sedangkan pada bagian kedua seperti pertukaran ion dan eksklusi dan pasangan ion hanya terjadi pada salah satu fasa diam. Willard menjelaskan bahwa kromatografi penukar ion dan kromatografi berpemilik adalah kromatografi berdasarkan interaksi antara cairan dan fase diam. Seperti pembagian kromatografi berdasarkan pemisahannya, kromatografi sebenarnya dapat dibagi menjadi 2, yaitu: Adsorpsi dan partisi dapat terjadi pada kromatografi gas dan kromatografi cair

1. Cara pemisahan dengan kromatografi kolom sederhana

Cara pemisahan berdasarkan atas sifat fase diam yang digunakan dan fase gerak. Senyawa terpisah berdasarkan kecepatan gaya gravitasi bumi. Ukuran fase diam biasanya relatif lebih besar, sekitar 250 mikrometer.

2. Kemasan kolom sederhana

Kemasan kolom sederhana bisa dilihat pada Gambar 5.2. dibawah ini:



Gambar 5. 2. Pengisian kolom kromatografi.

Peristiwa adsorpsi isotermik digolongkan di beberapa tipe yaitu:

- Tipe konkaf, tipe ini bisa terjadi apabila dalam keadaan semula linier tidak kuat pada interaksinya, tetapi dapat menjadi lebih kuat yang pada akhirnya akan terikat lama oleh fase diam sehingga dapat disimpulkan $K < 1$.
- Tipe normal (linier), tipe ini merupakan ikatan yang bisa terjadi pada keadaan sctiap saat panggah atau tetap. Sehingga bisa disimpulkan berupa garis lurus dan $K = 1$.
- Tipe konveks, yaitu tipe adsorpsi dalam keadaan semula terikat oleh kiiat dengan fese diam, tetapi semakin lama semakin lemah sehingga dapat disimpulkan bentuk kurvanya menjadi konveks atau disimpulkan harga $K > 1$.

3. Teknik aplikasi kromatografi kolom sederhana

Teknik aplikasi kromatografi kolom sederhana biasanya digunakan untuk analisis preparatif, dan pemisahan awal sebelum menggunakan tehnik kromatografi lainnya. Ada 3 metode untuk mengisi fase diam pada kolom sederhana, yaitu: Metode kering. Pada metode kering, kolom diisi dengan fase diam kering, diikuti dengan penambahan fase gerak yang disiramkan pada kolom sampai benar-benar basah. Metode basah. Pada metode basah, bubur (*slurry*) disiapkan dengan mencampurkan eluen pada serbuk fase diam dan dimasukkan secara hati-hati pada kolom. Dalam langkah ini harus benar-benar hati-hati supaya tidak ada gelembung udara. Larutan senyawa organik dipipet di bagian atas fase diam, kemudian eluen dituangkan pelan-pelan melewati kolom. Yang ketiga adalah metode campuran, yaitu fase diam dan fase gerak dicampurkan diluar kemudian baru dimasukkan ke dalam kolom.

C. Soal Latihan

1. Apakah perbedaan dan persamaan dengan kromatografi planar?
2. Tuliskan langkah-langkah menggunakan kromatografi kolom sederhana?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 6

PEMISAHAN KROMATOGRAM EFISIENSI TINGGI

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang pemisahan kromatografi efisiensi tinggi.

B. Klasifikasi Sistem Kromatografi Kolom

Kromatografi, terdiri dari dua suku kata *chromos* (pewarna dan *graphos* (foto), gambar pewarna pertama kali ditemukan oleh seorang ahli botani Rusia dalam proses pemisahan zat kimia dari tanaman. Padahal, kromatografi adalah alat pemisahan yang berbeda dari kimia. dan metode pemisahan berbasis fisik atau pemisahan cair-cair dari suatu padatan atau cairan yang didukung oleh suatu padatan.

Bila kita mempelajari sifat kimia fisika, tentang kelarutan suatu senyawa kimia dalam pelarut air maupun pelarut organik, senyawa tersebut terlihat mempunyai perbedaan kelarutan. Sebagai contoh dalam corong pisah terdapat dua fase air dibagian atas dan kloroform dibagian bawah. Bila terdapat senyawa yang larut dalam air sebagian, tetapi sebagian besar larut dalam kloroform maka bila senyawa yang terlarut dalam air tersebut disari atau diekstraksi dengan kloroform akan diperlukan waktu tertentu mengocoknya agar semua senyawa yang terlarut dalam air berpindah ke pelarut kloroform.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau High performance Liquid Chromatography (HPLC) adalah tehnik pemisahan dan analisis berdasarkan partisi analit dalam fase diam padat atau cair dan fasa gerak cair bertekanan tinggi yang dihubungkan dengan system pendeteksi analit. Secara sederhana, dapat dikatakan dalam instrument KCKT terdapat dua system utama, yaitu system pemisah dan system pendeteksi (Kartasasmita, 1997)

KCKT memisahkan komponen dari satu campuran dan mengidentifikasi dengan menggunakan waktu retensi (t_R) serta menentukan kadar masing-masing komponen dengan menggunakan tinggi puncak atau luas area yang dibandingkan dengan standar. Untuk merancang prosedur pemisahan dengan metode HPLC harus dilakukan pemilihan jenis kolom, fasa diam, dan fasa gerak yang sesuai dengan senyawa yang dianalisis (Snyder et al., 1997)

Semua proses pemisahan yang terjadi dalam KCKT disebabkan oleh perbedaan distribusi solute (sampel) dalam fasa diam dan fasa gerak. Jika interaksi solute dengan fasa diam lemah maka solute akan mudah terbawa keluar oleh fasa gerak. Apabila solute diinjeksikan dalam system KCKT dan aliran fasa gerak dihentikan, amka akan terjadi kesetimbangan solute dalam fasa diam dan fasa gerak. Perbandingan (ratio) anantara konsentrasi solute dalam fasa diam dan konsentrasi solute dalam fasa gerak pada saat kesetimbangan disebut koefisien partisi, secara matematis dapat dituliskan sebagai berikut:

$$K_p = C_s/C_m.$$

K_p = Koefisien partisi.

C_s = konsentrasi solute dalam fasa diam.

C_m = konsentrasi solute pada fasa gerak (Skoog and West, 1980).

Bila senyawa sebagai sampel dimasukkan dalam sistem kromatografi, maka linarut akan segera menebar kebagian-bagian fase diam maupun fase gerak. Pada saat fase gerak berhenti. sampel akan terbagi kedalam dua fase yang mempunyai perbandingan tertentu. Harga ini akan tergantung kekuatan interaksi antara sampel dengan fase diam dan sampel dengan fase gerak.

C. Fase Gerak

Kromatografi kolom adalah salah satu metode yang digunakan untuk pemurnian senyawa dari campuran dengan memakai kolom. Kromatografi kolom termasuk kromatografi preparatif. Berdasarkan klasifikasinya ada

kromatografi kolom sederhana dan efisiensi tinggi. Tabel 6.1. merupakan klasifikasi sistem kromatografi.

Tabel 6. 1. Pembagian Klasifikasi Sistem Kromatografi.

Umum	Teknik Spesifik	Fase Diam	Keseimbangan
1. K. Cair (LC)	LLC	Cair pada padatan	Partisi
	LSC	Padatan	Adsorbsi
	IEC	Resin	Tukar Ion
2. K. Gas (GC)	GLC	Cair pada padatan	Partisi
	GSC	Padatan	Adsorbsi
	Gas terikat	Padatan	P/A

D. Fase Gerak dan Fase Diam

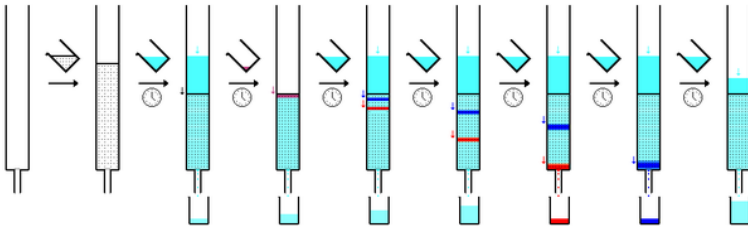
Fase gerak atau fase eluen adalah campuran cairan murni. Eluat dipilih sehingga faktor retensi senyawa adalah antara 0,2 dan 0,3 untuk meminimalkan waktu dan jumlah eluat yang melewati kolom. Jenis eluen yang digunakan dalam kromatografi kolom dipilih sehingga senyawa yang berbeda dapat dipisahkan secara efisien. Eluen yang digunakan dapat diperiksa terlebih dahulu dengan kromatografi lapis tipis. Setelah dianggap cocok, eluen yang sama digunakan untuk mengelusi komponen dalam kolom.

Fase diam yang dipakai dalam kromatografi kolom yaitu suatu adsorben padat. Biasanya berupa silika gel atau alumina. Dahulu juga sering digunakan bubuk selulosa. Fase diam berbentuk serbuk *microporous* untuk meningkatkan luas permukaan.

E. Cara Kerja Kromatografi Kolom

Komponen tunggal ditahan pada fase diam berupa adsorben karena telah terikat. Ketika eluen dialirkan, maka senyawa akan melakukan migrasi, terbawa oleh eluen sesuai dengan kesesuaian kepolaran. Masing-masing

senyawa dalam komponen mempunyai kecepatan yang berbeda-beda dalam melewati kolom. Selama proses berlangsung, akan didapatkan beberapa fraksi. Masing-masing fraksi kemungkinan mengandung senyawa yang berbeda. Untuk mengujinya, fraksi hasil kromatografi kolom dapat diamati menggunakan KLT. Fraksi dengan R_f yang mirip, kemungkinan mengandung senyawa yang sama. Fraksi dapat diamati lebih lanjut menggunakan spektroskopi. Seluruh proses kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 6.1. berikut:



Gambar 6. 1. Proses Elusi Kromatografi Kolom.

F. Teori Pendukung

Untuk menerangkan proses pemisahan dalam kromatografi ada 2 macam, yaitu:

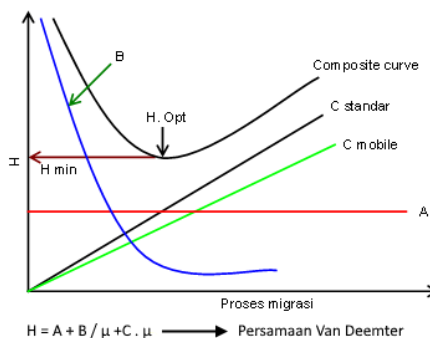
1. Teori Lempeng (*Plate Theory*)

Teori ini pertama dikemukakan oleh Martin & Synge (1941) yang menekankan pada efisiensi kolom. Apabila jumlah kesetimbangan makin besar. Efisiensi $\gg \rightarrow$ menambah jumlah lempeng (N). Dimana tebal lempeng teoritik $\rightarrow H$. Jadi $N \& H \rightarrow$ menyatakan efisiensi. Secara matematis : $N = L / H$.

Kelemahan teori: tidak mampu mengidentifikasi variabel-variabel yang mempengaruhi pelebaran pita kromatogram

2. Teori Kinetik (*Kinetics Theory*)

Teori ini menyempurnakan kelemahan teori Plate yang menekankan pada teori laju/*rate theory*. Pada teori ini partikel komponen bermigrasi diantara FG & FD. Migrasi sangat tidak teratur sehingga energi thermal akan menyebabkan gerakan partikelnya random yang menyerupai distribusi simetrik Gauss. Hubungan antara fase gerak, fase diam dan gerakan partikel sampel dapat digambarkan pada Gambar 6.2. dibawah ini.



Gambar 6. 2. Kurva Hubungan antara fase gerak, fase diam, gerakan partikel sampel, dan persamaan Van Deemter.

Parameter Pemisahan

1. Waktu retensi (t_R)

Sifat tambat suatu linarut digambarkan melalui jenis distribusi linarut diantara fase gerak dan fase diam tersebut. Volume fase gerak yang diperlukan untuk mengangkut cairan melalui fase padat, baik dalam kolom atau pada pelat tipis, dari awal hingga akhir elusi (menuju detektor, dalam kromatografi gas dan kromatografi cair) disebut volume jangkar. Retensi ini dinyatakan sebagai VR (volume perpindahan) atau t_k (waktu tunda). Kedua istilah tersebut berlaku untuk kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC).

2. Kapasitas kolom

Istilah di atas lebih dikenal dengan kapasitansi atau k^* . Angka ini menunjukkan kemampuan fasa untuk menahan sampel/komponen, yang sangat penting dalam kromatografi kolom. Menurut definisi, indeks ini adalah rasio jumlah molekul/komponen sampel dalam fase diam terhadap jumlah molekul/komponen sampel dalam fase gerak, yang diformulasikan sebagai:

$$k' = n_s/n_m = (C_s \times V_s)/(C_m \times V_m).$$

Dimana $C_s/C_m \dots K$ (koefisien partisi), maka :

$$k' = V_s/V_m \times K$$

Jika diubah dalam parameter t_R maka :

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

3. Selektivitas Kolom (α)

Merupakan ratio antara sampel/komponen yang terikat lebih kuat didalam kolom dengan sampel/komponen yang terikat lemah dalam kolom. Dua kromatogram yang berdekatan yang memiliki kurva Gauss identik, $W_A = W_B = W$. Dengan memperhatikan hubungan antara jumlah lempenh teoritik N , waktu retensi t_R , dan lebar dasar puncak kromatogram W (yaitu

$N = 16 (tR/W)^2$, dapat dituliskan dalam bentuk $W = 4 (tR)B / \text{akar } N$, yang menyatakan tR sehingga resolusi dapat dinyatakan sebagai:

Harga α menggambarkan kemampuan pemisahan suatu kolom. Secara matematis dituliskan:

$$\alpha = KB / KA$$

Dimana:

KB = koefisien distribusi komponen B yg teretensi kuat dalam kolom

KA = koefisien distribusi komponen A yg teretensi lemah dalam kolom

Ada hubungan dengan k'

$$\alpha = KB' / KA' = tRB - t_m / tRA - t_m$$

4. Resolusi kolom (R_s)

Pemisahan diantara 2 puncak dinyatakan dengan R_s (resolusi). Interaksi zat terlarut ditentukan oleh zat terlarut dan fasa gerak. Bila dua puncak mempunyai tR , sedangkan lebar dasar puncak (B) maka resolusinya:

$$R_s = \Delta Z / 0,5 WA + 0,5 WB = 2 \Delta Z / (WA + WB)$$

Apabila ΔZ , WA dan WB dalam satuan waktu, maka persamaan tersebut dapat dikonversikan:

$$R_s = 2 [(tRB) - (tRA)] / WA + WB$$

Dimana:

ΔZ = jarak puncak A & puncak B

WA = lebar dasar kromatogram A

WB = lebar dasar kromatogram B

Bila daya pisah 2 puncak lebih besar atau sama dengan 1,5 maka terjadi pemisahan sempurna secara kromatografi. Jadi semakin besar harga R_s , maka 2 senyawa tersebut akan semakin terpisah. Salah satu cara meningkatkan daya pisah adalah dengan memperbaiki efisiensi kolom. Apabila proses pemisahan kromatogram A dan kromatogram B mentoleransi error eksperimental sebesar 5% dan diasumsikan bahwa kedua kromatogram berbentuk kurva Gauss yang identik dengan variabilitas sebesar α , maka $WA = WB$ setara 4α . Selanjutnya

apabila kromatogram A secara signifikan terpisah dari kromatogram B sekurang-kurangnya pada delta Z setara 6α , maka resolusi minimum untuk menyatakan bahwa 2 kromatogram terpisah secara signifikan adalah R_s setara 1,5 (Narsito, 1997).

5. Jumlah lempeng (N) atau efisiensi kolom

Efisiensi kolom sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, terutama koefisien partisi, yang konstan dan tidak terpengaruh oleh konten sampel. Dengan demikian, puncak simetris dijelaskan dalam kurva untuk hasil elisitasi. Karena elusi fase gerak ke dalam sampel pada awalnya hanya membawa sedikit sampel, yang meningkat setelah mencapai maksimum, kemudian menurun lagi hingga fase gerak bebas dari sampel. Bentuk puncak tergantung pada rasio sampel terhadap fase gerak. Jika sampel bergerak sedikit dengan fase gerak, diperoleh puncak yang sempit. Di sisi lain, jika sampel terikat lebih kuat oleh fasa diam, diperoleh puncak yang lebar.

G. Soal Latihan

1. Bagaimana fase diam yang digunakan untuk sistem kromatografi ini?
2. Sebutkan 2 teori pendukung untuk kromatografi efisiensi tinggi?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 7

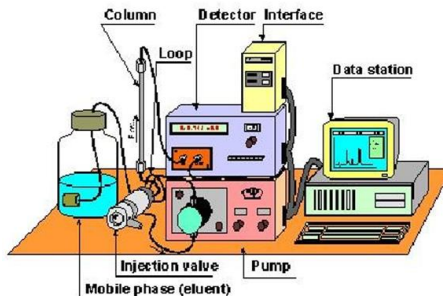
FUNGSI KOMPONEN INSTRUMEN HPLC

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami fungsi komponen pada instrumen HPLC.

B. Instrumentasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC/KCKT adalah kromatografi cair yang menggunakan fasa diam padat dengan ukuran partikel kecil (5-10 μm) dengan tekanan yang tinggi (300 – 3000 psi) untuk mengalirkan fasa gerak secara konstan. HPLC/KCKT cocok digunakan untuk memisahkan dan menghitung konsentrasi dari campuran senyawa yang konsentrasinya kecil, tekanan uapnya rendah dan thermolabil. Skema rangkaian HPLC/KCKT dapat dilihat seperti pada Gambar 7.1.



Gambar 7. 1. Skema rangkaian alat KCKT/HPLC (Skoog & West, 1980).

Solven atau fasa gerak diambil dari reservoir oleh pompa melalui filter, masuk ke katup rotary injection, kemudian mengalir ke sampel loop. Jika sampel disuntikkan melalui microsyringe, maka solven akan membawa solut masuk ke dalam kolom. Setelah komponen sampel mengalami pemisahan dalam kolom, selanjutnya bersama fasa gerak mengalir masuk ke detektor dan akhirnya kepenampungan. Sinyal yang muncul dalam detektor dikirim ke

integrator. Data yang diperoleh kemudian diolah sesuai keperluan pengguna (Poole dan Poole, 1991).

C. Komponen Instrumen Pendukung HPLC

Komponen instrumen pendukung HPLC:

1. Komponen reservoir fase gerak.

Dalam peralatan HPLC yang sudah modern, reservoir fasa gerak terdiri satu atau lebih reservoir, kadang terdapat alat degasser untuk menghilangkan gas terlarut seperti oksigen dan nitrogen. Jika tidak dihilangkan, gas-gas ini dapat membentuk gelembung udara masuk ke dalam kolom dan detektor. Gelembung udara ini dapat menyebabkan pelebaran pita dan mengganggu respon detektor. Disamping harus bebas dari gas, solven harus disaring terlebih dahulu dengan kertas millipore agar bebas dari partikel-partikel halus (Scoot, kk, 1996).

Pemisahan yang menggunakan satu jenis solven dengan konsentrasi konstan disebut elusi isokratik. Jika elusi menggunakan lebih dari satu macam solven dengan polaritas berbeda dan perbandingannya diubah selama proses pemisahan berlangsung, maka elusi ini dinamakan elusi gradien.

Pemisahan seringkali dilakukan dengan elusi gradien untuk meningkatkan efisiensi pemisahan. Pemisahan secara gradien memiliki beberapa keuntungan dibandingkan elusi isokratik yaitu : retensi senyawa dapat dikontrol dan dapat mencegah terjadinya gangguan/perubahan sifat kolom yang disebabkan karena adanya material yang tidak terelusi secara sempurna dengan program isokratik; dapat memaksimalkan sensitivitas deteksi karena dengan program gradien harga k' dapat diturunkan dan bentuk pita dapat diperbaiki menjadi lebih runcing dan sempit; sampel yang dapat diuji lebih besar dari program isokratik tanpa menimbulkan efek broadening atau pelebaran pita (Snyder, dkk., 1997).

Fasa gerak yang digunakan dalam KCKT dapat berupa air, larutan buffer encer, campuran organik, pelarut organik ataupun campuran pelarut

organik. Fasa gerak yang baik adalah yang mudah melarutkan cuplikan (Poole dan Schuette, 1986).

2. Pompa.

Pompa hendaknya memiliki kriteria tekanan yang dihasilkan lebih dari 6000 psi, tidak mengeluarkan pusa getaran, kecepatan alir 0,001-10 ml/menit, reproduksi aliran 0,5%, serta terbuat dari bahan yang resisten secara kimiawi misalnya teflon dan stainless steel. Pada umumnya pompa dirancang untuk mendorong pelarut (fasa gerak) melalui kolom yang berisi kemasan padat dan rapat. Karena tekanan balik kolom terhadap aliran fasa gerak tinggi, maka pompa yang digunakan juga harus mampu bekerja pada tekanan tinggi (Snyder, dkk., 1997).

3. Peredam pulsa fasa gerak.

- a. Ada beberapa detektor sensitive terhadap variasi kec. Alir fasa gerak → ex: indeks refraksi, elektrokimia & konduktometer.
- b. Peredam aliran dengan gas yang ditekan.

4. Sistem injeksi sampel.

Sistem injeksi sampel ini harus mempunyai reproduksi sampel yang dimasukkan ke dalam kolom dengan baik karena menentukan presisi perhitungan dalam kromatografi. Sampel yang dimasukkan dengan tekanan tinggi ke dalam kolom sedapat mungkin merupakan pita sampel tipis sehingga pelebaran pita pada proses ini dapat diabaikan.

Dalam HPLC cuplikan tidak perlu diuapkan seperti halnya pada kromatografi gas. Yang perlu diperhatikan adalah konsentrasi cuplikan yang diinjeksikan harus ada dalam daerah linier detektor. Jumlah sampel perlu diperhatikan untuk menghindari broadening karena jumlah analit yang terlalu banyak atau volume yang terlalu besar (volume over loading). Volume over loading dapat terjadi bila kelarutan analit dalam solvenya jauh lebih besar

dari kelarutannya di dalam fasa gerak. Larutan sampel yang diinjeksikan akan masuk ke loop untuk bercampur dengan fasa gerak, selanjutnya dibawa oleh fasa gerak masuk ke dalam kolom. Bila kelarutan sampel dalam fasa gerak rendah maka volume fasa gerak yang dibutuhkan sangat besar sehingga dapat terjadi pelebaran pita. Bila volume larutan sampel yang diinjeksikan telah sedemikian kecil tetapi masih dijumpai pelebaran pita maka ada kemungkinan kelebihan masa sampel, hingga melampaui kapasitas kolom bahkan dapat juga terjadi kejenuhan kolom oleh sampel. Berat maksimal per jenis senyawa dalam sampel yang diijinkan untuk diinjeksikan (W_{maks}) adalah:

$$W_{maks} = 50 \frac{1 + k'^2}{k'} d_c$$

Dimana d_c = diameter internal kolom

Adanya over loading sampel akan menyebabkan resolusi menurun, jumlah lempeng teoritik menurun dan waktu retensi juga menurun sehingga secara kualitas pemisahannya menurun (Snyder, dkk., 1997).

5. Kolom kromatografi

Kolom kromatografi merupakan jantungnya kromatografi. Berhasil tidaknya analisa tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi operasinya. Kolom dapat dikelompokkan menjadi dua macam. Pertama, kolom analitik yang pada umumnya kolom ini mempunyai diameter dalam maksimum 8 mm dan panjang kolom maksimum 30 cm. Kedua, kolom preparatif. Kolom ini pada umumnya mempunyai diameter dalam minimum 8 mm dengan panjang kolom 25 – 100 cm. Lapisan luar kadang dilapisi logam sehingga dapat menahan tekanan sampai 6000 psi. Sambungan pada akhir dan permulaan kolom tidak boleh memiliki kantong-kantong yang menyebabkan fasa gerak stagnan (Snyder, dkk., 1997).

6. Detektor

Detektor digunakan untuk mendeteksi dan mengukur adanya komponen cuplikan yang melewati kolom. Detektor harus mempunyai sensitivitas yang tinggi dan respon yang linier, sehingga volume internal yang diperlukan kecil. Hal ini untuk menghindari pelebaran pita kromatogram. Dalam pemisahan bernagai senyawa ada kemungkinan digunakan gabungan berbagai detektor. Detektor yang biasa digunakan antara lain spektrofotometer UV-VIS, elektro kimia, refraktometer, spektrofluorometer.

Pemisahan komponen didasarkan pada waktu retensi yaitu waktu yang dibutuhkan untuk mengalirkan solut dari permulaan kolom sampai detektor. Solut yang berinteraksi makin kuat dengan fasa diam akan memiliki waktu retensi yang besar, begitu juga sebaliknya. Waktu retensi tiap senyawa adalah khas sehingga dapat digunakan sebagai parameter kualitatif. Untuk kepentingan analisa kuantitatif, diperlukan data yang berupa luas puncak atau tinggi puncak kromatogram, karena luas puncak atau tinggi puncak ditentukan oleh konsentrasi solut (Snyder dan Kirkland, 1979).

D. Reaksi Derivatasi pada HPLC

Saat melakukan analisis HPLC, kemungkinan banyak senyawa yang tidak dapat dianalisis dengan mudah karena detektor yang digunakan tidak sesuai dengan senyawa yang dianalisis. Hal ini karena senyawa memberikan absorbansi pada panjang gelombang di luar rentang UV-VIS, atau karena senyawa yang ditentukan dengan detektor spektrofluorometer tidak menghasilkan fluoresensi. Derivatasi HPLC bertujuan untuk mengatasi masalah tersebut dengan cara mereaksikan senyawa yang dianalisis dengan zat tertentu sehingga terjadi pergeseran arah merah yang maksimal. Atau dengan membiarkan senyawa yang dianalisa bereaksi dengan zat tertentu, sehingga menghasilkan zat yang berfluoresensi. (Smith, 1988).

Teknik derivatisasi ini dapat dilaksanakan sebelum dan sesudah kolom (pra atau pasca kolom), tetapi sebelum detektor. Dalam hal ini, yang perlu

diperhatikan adalah zat yang dipakai untuk derivatisasi harus memberikan reaksi yang cepat dan stabil serta dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran. Dalam beberapa kasus, reagen derivatisasi dapat dicampur dengan fasa gerak, tetapi metoda ini jarang sekali digunakan karena akan menghasilkan reaksi sedikit (Smith, 1988).

Beberapa kriteria reaksi derivatisasi pada pra kolom antara lain: kecepatan reaksi derivatisasi tidak tergantung pada pemisahan kromatografi, reaksinya dapat lambat, suhu tinggi dapat digunakan, eluen untuk pemisahan tidak sama dengan reaksi untuk derivatisasi. Sedangkan kriteria derivatisasi pasca kolom antara lain: pemisahan tidak tergantung pada reaksi derivatisasi dan sampel yang dipisahkan masih dalam bentuk senyawa aslinya, reaksi harus cepat karena pereaksi yang ditambahkan dalam eluen terletak antara reagen yang ditambahkan (setelah kolom) dengan detektor, tidak ada komponen eluen yang berinteraksi dengan pereaksi derivatisasi, senyawa yang tidak diderivatisasi dideteksi sebelum reagen derivatisasi ditambahkan agar tidak mengubah kromatogram (Smith, 1988).

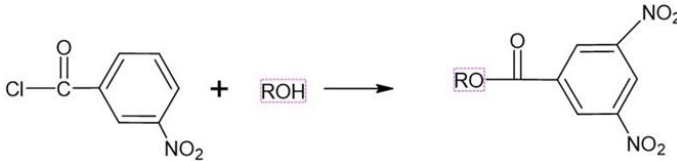
Reaksi derivatisasi pada HPLC digunakan antara lain untuk:

1. Menaikkan sensitivitas deteksi UV-Vis

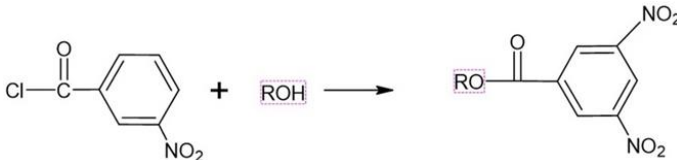
Jika senyawa utama yang dianalisa dalam HPLC adalah senyawa-senyawa seperti alkohol, amina, asam karboksilat dan karbonil yang hanya mempunyai kromophor yang lemah, akibatnya akan sulit atau bahkan tidak bisa terdeteksi oleh detektor UV-Vis. Dengan menggunakan detektor indeks refraksi untuk analisisnya, maka senyawa-senyawa ini akan terdeteksi, tetapi dengan sensitivitas yang sangat rendah. Derivatisasi disini digunakan untuk menghasilkan kromophor. Dengan ditamhakkannya reagen derivatisasi maka akan terbentuk gugus fungsional yang menyebabkan detektor spektrofotometer UV-VIS atau detektor spektrofluorometer menjadi sangat sensitif terhadap senyawa tersebut. Beberapa reaksi derivatisasi dapat digunakan untuk analisa substitusi cincin aromatik sehingga menghasilkan gugus kromophor, misalnya nitrofenil (William dan Fleming, 1980).

Reaksi pra-kolom

Alkohol alifatik diubah menjadi ester 3,5-dinitrobenzoat menggunakan reagen 3,5-dinitrobenzoil klorida. Reaksinya adalah :

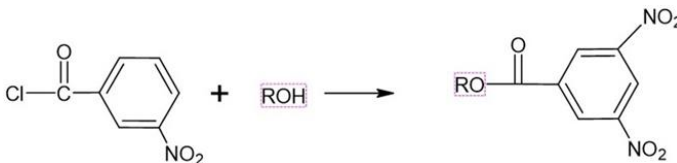


Amina-amina akan bereaksi dengan 2,4-dinitrofluorobenzen dengan asam yang aktif seperti N-suksinimidil-p-nitrofenilasetat. Reaksinya adalah :



Reaksi pasca-kolom

Derivatisasi pasca-kolom, dapat untuk mendeteksi asam-asam amino dengan reaksi ninhidrin yang memberi warna lembayung Ruhemann's. Reaksi ini dikatalisis oleh adanya sianida. Selain ninhidrin, dapat juga menggunakan OPA (o-phthaldialdehida), tetapi reagen OPA ini lebih sering digunakan dengan detektor spektrofлуorometer. Contoh reaksi asam amino dengan reagen ninhidrin yang memberikan warna lembayung Ruhemann's adalah:



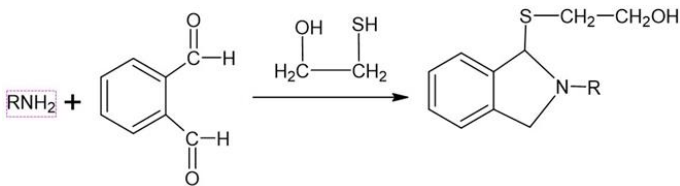
2. Menaikkan sensitivitas deteksi fluoresensi

Kombinasi dalam derivatisasi ini sudah biasa digunakan, seperti misalnya produk-produk yang menghasilkan selektivitas dan sensitivitas

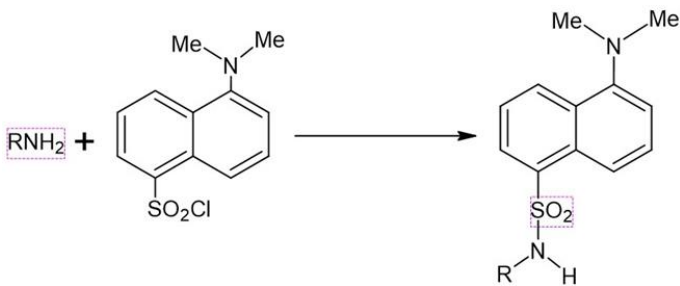
dengan sedikit interferensi dari komponenyang tidak reaktif dalam sampel (Lingaman dan Underberg, 1990).

Reaksi pra-kolom

Untuk menaikkan sensitivitas deteksi amina dan amino dengan detektor spektrofluorometer secara pra-kolom dapat menggunakan reagen OPA, reaksinya adalah:



Dalam beberapa hal, produk derivatisasi dapat tidak stabil dan mungkin terdekomposisi dalam kolom. Dansil klorida dapat digunakan untuk reagen amina, dan memberikan reaksi yang cepat dan spesifik dengan amin primer. Reagen ini dapat pula digunakan untuk derivatisasi pasca-kolom tetapi relatif lebih mahal. Reaksinya adalah:

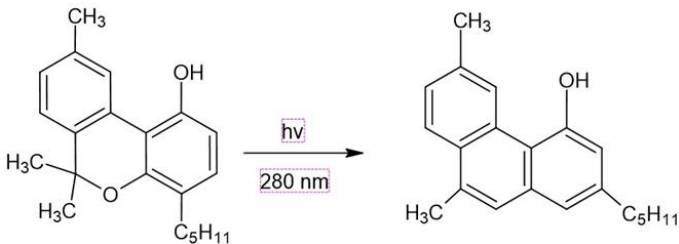


Reaksi pasca-kolom

Reaksi derivatisasi pasca-kolom dengan OPA sudah sering digunakan untuk meningkatkan sensitivitas asam-asam amino dan amina, sedangkan reagen lainnya jarang digunakan.

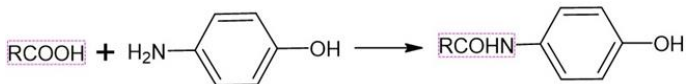
Metode tidak langsung, digunakan untuk mendeteksi karbohidrat. Karbohidrat akan dioksidasi oleh garam Cerium (IV) menjadi Cerium (III) yang berfluoresensi. Sedangkan dengan tetrahidrocannabinol akan menjadi

fenanthrene yang berfluoresensi. Reaksi ini terjadi karena adanya radiasi sinar (foton). Reaksinya adalah:



3. Mempertinggi deteksi elektrokimia

Dalam reaksi elektrokimia dapat digunakan derivat nitro aromatik. Dengan menggunakan gugus fenolik didapatkan hasil yang lebih baik. Reaksi asam karboksilat dengan p-aminofenol akan menghasilkan amidofenol. Reaksinya adalah:



Gugus aktif elektrokimia dibentuk dalam dua tahap. Tahap pertama membentuk gugus nitrofenil sedangkan tahap kedua membentuk amina aromatik yang kemudian akan dideteksi oleh detektor. Dengan kedua tahap ini akan menghasilkan selektivitas yang tinggi dengan syarat pada tahap pertama mempunyai sensitivitas yang baik (Smith, 1988).

4. Reaksi untuk mempertinggi pemisahan

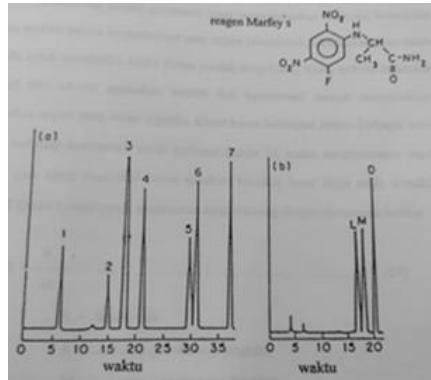
Dalam analisis HPLC, kadang-kadang didapat hasil pemisahan yang kurang baik. Dengan reaksi asam dan amina dapat menghasilkan polaritas dan ionisasi sehingga akan memperbaiki pemisahan. Bentuk khelat yang stabil seperti dithiokarbamat, 8-hidroksiquinilon atau dithizone dapat digunakan untuk mempertinggi daya pisah. Bentuk khelat dapat terjadi pada reaksi pra-kolom atau reagen khelat atau reagen khelat berikatan dengan fasa gerak. Pada reaksi derivatisasi pasca-kolom ditambahkan piridilazo resorcinol (PAR).

Untuk memisahkan ion-ion logam digunakan kromatografi penukar ion yang dilakukan sebelum derivatisasi (You, dkk., 1979)

5. Pemisahan dari komponen khiral

Karena perbedaan enantiomer dari obat dan peptida seringkali memberikan aktifitas biologis yang berbeda. Kedua enantiomer itu dapat dipisahkan dalam sistem pemisahan khiral yang mana eluen khiral yang mana eluen khiral atau fase diam menghasilkan bentuk asimetrik. Eluen khiral jarang digunakan karena gugus asimetrik jumlahnya sedikit, disamping itu harganya mahal serta sedikit yang menggunakannya sebagai fasa gerak. Prosedur lain dengan kolom yang berisi partikel padatan yang telah ditambah dengan modifikasi khiral untuk fasa gerak yang akan berikatan dengan analit khiral. Sekarang telah digunakan *Chiral stationary phases* (CSP) yang diikat dengan silika atau selulose (You, dkk., 1979).

Kedua enantiomer dapat diubah kebentuk diastereoisomer oleh reagen khiral dan diastereoisomer itu dapat dipisahkan dari komponen khiral. Derivatisasi untuk pemisahan khiral, biasanya dilakukan untuk memisahkan enansiomer D dan L maka hasilnya akan berupa D,D dan D,L-diastereoisomer, kedua kromatogram ini dapat berbeda. Pemisahan dapat diperbaiki jika pusat khiral dalam keadaan tetap atau pusat khiral diproteksi sedemikian rupa dalam derivatisasi. Reaksi dengan reagen Marfey yaitu 1-fluoro-2,4 dinitrofenil-5-L-alanin amide (FPAA) dengan amina lain atau asam amino akan menghasilkan pusat khiral, dan kromofor. Prinsip untuk menutup/proteksi pusat khiral digunakan reagen pasangan ion khiral, dimana akan dihasilkan diastereoisomer yang efektif dalam eluen. Contoh pemisahan khiral seperti yang disajikan pada Gambar II.5 (Smith, 1988).



Gambar 7. 2. Pemisahan enantiomer dari (a) D dan L asam amino (b) D dan L-dopa menjadi Diastereoisomer dengan reagen marfeys. Dimana (a) 1. L- glutamin, 2. D-Glutamin, 3. Marfey-OH, 4. L-mentionin, 5. D-mentionin, 6. L-phenilalanin, 7. D-phenilalanin. (b) L, L-Dopa, M, Marfey-OH, D, D-Dopa.

E. Evaluasi Metode Analisis

Metode analisis perlu dievaluasi untuk mengetahui kualitas dan kelayakan metode sehingga data yang dihasilkan dapat dipercaya kebenarannya. Ada beberapa parameter untuk mengevaluasi suatu metode analisis yaitu sensitivitas, spesivisitas, ketepatan, ketelitian dan linearitas respon.

Sensitivitas adalah parameter yang menggambarkan besarnya kenaikan respon analitik karena bertambahnya satu satuan konsentrasi, atau kemampuan suatumetode untuk mendeteksi analit dalam jumlah yang kecil. Suatu metode dikatakan sensitif bila adanya perubahan sedikit dari konsentrasi sampel menyebabkan perubahan respon yang besar. Apabila dibuat kurva hubungan respon (sebagai sumbu y) terhadap konsentrasi analit (sebagai sumbu x), maka sensitivitasnya dapat dilihat pada harga slope dari kurva tersebut. Semakin besar slope maka semakin sensitif. Dalam kromatografi, sensitivitas dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$S = \frac{A}{M}$$

Dimana: S = Sensitivitas

A = Luas area puncak kromatogram

M = Konsentrasi analit yang diperiksa

(Synder dan Kirkland, 1979)

Konsentrasi minimum analit yang masih dapat dideteksi dan memberikan respon yang signifikan ($p = 0,05$) dapat dibedakan dari variabilitas pengukuran blangko pereaksi dengan probabilitas 95% disebut sebagai batas deteksi (limit of detection). Makin rendah batas deteksi suatu metode analisis, maka makin tinggi kepekaan metode itu. Dalam menentukan LOD, sering digunakan asumsi bahwa sinyal dari konsentrasi minimum tersebut besarnya 3x dari sinyal (noise) yang dike luarkan detektor. Dengan persamaan regresi linier: $y = (a \pm s_a) + (b \pm s_b) x$, maka secara matematis untuk menghitung LOD menggunakan rumus (Miller dan Miller, 1984):

$$LOD = \frac{(a \pm 3s_{y/x}) - (a \pm s_a)}{(b \pm s_b)}$$

Dimana, y = respon analitik

x = konsentrasi analit

a = intersep persamaan regresi linier

s_a = Simpangan dari intersep

b = slope persamaan regresi linier

s_b = simpangan dari slope

$$s_{y/x} = \frac{[\sum_I (A_I - A)^2]^{1/2}}{n - 2}$$

Spesivitas adalah kemampuan untuk mendeteksi secara spesifik senyawa yang dianalisis. Adanya kontaminan tidak akan mengganggu respon analitnya. Suatu metode yang mempunyai spesifikasi yang rendah akan mengakibatkan kekeliruan positif (positif false) dalam analisis kualitatif.

Dalam analisis kualitatif, kurang spesifikasinya suatu metode analisis akan menghasilkan data analisis yang cenderung lebih tinggi dari harga sebenarnya (Noegrohati, 1998).

Ketepatan adalah ukuran kualitas hasil analisis yang menggambarkan keadaan penyimpangan data analisis dari harga sesungguhnya. Secara internasional dikenal tiga cara yang umum digunakan untuk evaluasi ketepatan metode analisis yaitu uji pungut ulang (recovery test), uji relatif terhadap ketepatan metode baku, uji terhadap bahan rujukan baku (standard Reference Material / SMR). Uji pungut ulang pada prinsipnya dilakukan dengan mengerjakan analisis contoh suatu obyek yang diperkaya dengan sejumlah kuantitatif analit yang akan ditetapkan. Berat total analit yang diperoleh dari analisis contoh yang diperkaya dikurangi berat analit dalam contoh yang tidak diperkaya, dibandingkan terhadap jumlah analit yang ditambahkan. Jika tidak ada kesalahan sistematis dalam analisis, nilai yang diperoleh dalam pengujian tidak akan berbeda secara signifikan dari 100%. Kerugian utama dari backtesting adalah kemungkinan perbedaan antara kondisi analit yang ditambahkan dan keadaan analit di latar belakang. Dalam matriks, analit dapat berada dalam bentuk terkonjugasi, sedangkan analit yang ditambahkan berada dalam keadaan bebas. Nilai pemulihan 100% tidak selalu menjamin bahwa semua analit dalam matriks benar-benar tercermin dalam data analit. Oleh karena itu, tes ini biasanya hanya digunakan sebagai tes pendahuluan untuk menilai keakuratan metode. (Noegrohati, 1997).

Ketelitian adalah suatu ukuran kualitas hasil analisis yang menggambarkan keadaan sebaran data hasil analisis dari sekitar harga rata-ratanya atau menggambarkan variabilitas hasil analisis. Metode yang mempunyai ketelitian yang tinggi akan memberikan hasil yang mirip bila dilakukan replikasi (pengamatan berulang). Parameter ini dapat dihitung dengan rumus standard deviasi (sd) dan koefisien variasi (CV) seperti pada persamaan (32) dan (33).

Linearitas adalah parameter yang menggambarkan kisaran konsentrasi analit yang bila dianalisis masih memberikan sinyal yang besarnya proporsional terhadap perubahan konsentrasi analit. Metode yang baik adalah metode yang memiliki kisaran linearitas yang lebar.

$$Sd = \sqrt{\frac{(X_i - X)^2}{(n - 1)}}$$

Dimana, X_i = Hasil penetapan

X = Harga rata-rata

n = Jumlah pengulangan

$$CV = \frac{Sd}{X} \times 100\%$$

F. Soal Latihan

1. Terangkan masing-masing fungsi dari instrumen HPLC?
2. Bagaiman alur sinyal masuk detektor?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 8

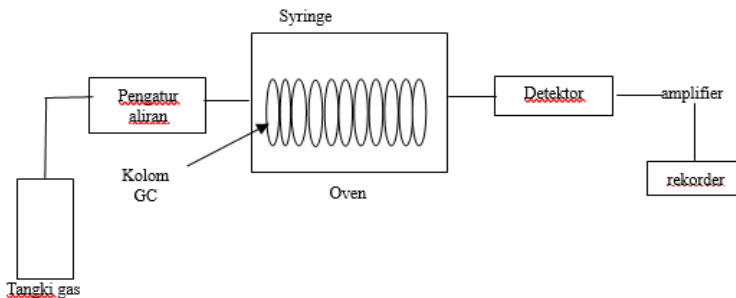
KROMATOGRAFI GAS

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami kromatografi gas.

B. Pendahuluan

Pada tahun 1952, James dan Martin adalah yang pertama memperkenalkan teknik kromatografi gas (Sparkman, 2011). Kromatografi gas merupakan salah satu Teknik kromatografi yang hanya dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap. Kriteria yang dibutuhkan adalah dapat menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan (Drozd, 1985). Seperangkat instrument kromatografi gas disajikan pada Gambar 8.1.



Gambar 8. 1. Bagan Kromatografi Gas (Wirasnita, 2010).

Penggunaan kromatografi dibedakan antara dua metode penggunaan. Pertama, kromatografi gas sebagai alat pemisahan. Penggunaan ini memerlukan perubahan senyawa sampel menjadi senyawa volatil. Kedua, kromatografi gas sebagai pelengkap untuk hasil analisis yang sempurna, dalam hal ini waktu dan volume retensi digunakan untuk identifikasi senyawa, dan luas serta bobot peak sebagai informasi kuantitatifnya (Skoog, 1998).

Penerapan metode Kromatografi Gas adalah untuk analisis senyawa yang stabil terhadap suhu tinggi, sehingga solute tidak mengalami kerusakan susunan molekul proses pemanasan (Nugraha, 2018).

Dasar pemisahan kromatografi gas adalah dispersi sampel pada fase diam sementara gas dalam fase gerak mengelusi fase diam. Modus aksi GC adalah bahwa fase gerak adalah gas yang mengalir di bawah tekanan dalam pipa yang dipanaskan dan dilapisi dengan fase diam cair atau dienkapsulasi dengan fase diam cair yang dilapisi pada pendukung padat. Analit dimasukkan ke dalam kepala kolom melalui lubang semprot yang dipanaskan. Suhu oven dipertahankan atau diprogram untuk meningkat secara bertahap. Begitu berada di dalam kolom, terjadi pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen dalam fase diam (Sparkman, 2011).

Bagian dasar dari suatu kromatografi gas adalah:

1. Tangki gas pembawa

Gas pembawa merupakan gas inert dan memiliki kemurnian yang tinggi seperti helium, nitrogen, dan hidrogen. Penggunaan jenis gas tergantung dari jenis detektor yang digunakan. Fase gerak adalah sebuah pengatur berupa gas pembawa, yang biasanya berupa gas yang memiliki kemurnian tinggi seperti Helium (He), Hidrogen (H), atau campuran Argon (Ag) dan Metana (Rohman dan Gandjar, 2007).

Pemilihan gas pembawa bergantung pada jenis detektor yang digunakannya, helium (He) adalah tipe gas pembawa yang umum digunakan karena memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik dibandingkan jenis lainnya. Syarat gas pembawa diantaranya dapat meminimumkan difusi, murni, dan mudah diperoleh (Rohman dan Gandjar, 2007).

2. Sistem injeksi sampel (syringe)

Analit melalui suatu portal injeksi yang dipanaskan. Suhu oven dijaga atau deprogram agar meningkat secara bertahap. Ketika sudah berada dalam kolom, terjadi proses pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada lamanya waktu relative yang dibutuhkan oleh komponen-komponen tersebut di fase diam (Sparkman, 2011).

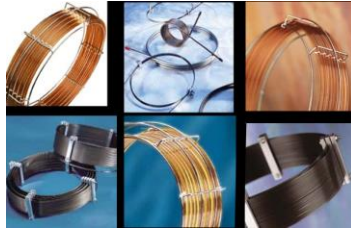
3. Kolom Kromatografi

Kolom merupakan komponen penting dalam GC dimana merupakan tempat terjadinya proses pemisahan suatu campuran (Rohman dan Gandjar, 2007). Fase gerak gas akan membawa solute dari ujung kolom sampai ke detektor. Fase diam yang ada di kolom kromatografi merupakan bagian mikros lapisan polimer yang mendukung gas murni, didalam bagian sistem (Muntaha, 2013).

Jenis kolom dalam kromatografi gas ada 2, yaitu kolom packing dan kolom kapiler. Kolom packing fase diamnya ada yang padat dan cair. Sedangkan kolom kapiler ada beberapa jenis. Gambar 8.2 adalah jenis kolom kapiler. Karakteristik dari kolom kromatografi gas tertera pada Tabel 8.1.



Gambar 8. 2. Gambar Jenis Kolom Kapiler.



Gambar 8. 3. Gambar Beberapa contoh kolom kapiler.

4. Detektor

Detektor yang sering digunakan pada kromatografi gas adalah flame ionization (FID), thermal conductivity (TCD), electron capture (ECD), hingga mass spectrometry (MS) (Skoog, 1998).

Prinsip pengoperasian detektor TCD adalah benda panas melepaskan panas dengan laju yang bergantung pada komposisi media di sekitarnya. Sebagian besar detektor konduktivitas termal berisi kawat logam yang dipanaskan dengan listrik yang tersuspensi dalam aliran gas. Biasanya diukur dengan rangkaian jembatan Wheatstone.

Sedangkan pada FID prinsipnya bahwa hantar listrik suatu gas berbanding lurus dengan konsentrasi zarah bermuatan dalam gas. Sejumlah besar detektor dalam kromatografi gas diklasifikasikan sebagai Ionization Detectors. Jenis ionization detector diantaranya :

- a. Flame Ionization Detector (F.I.D.)
- b. Electron Capture Detector (E.C.D.)
- c. Thermionic Spesific Detector N, P spesific (T.S.D.)
- d. Photo Ionization Detector (P.I.D.)

Tabel 8. 1. Karakteristik penggunaan detektor.

Detektor GC		
Tipe	Aplikasi Sampel	Tipe Batas Deteksi
Flame Ionization Detector (FID)	Hidrokarbon	0,2 pg/s

Thermal Conductivity Detector (TCD)	Detektor universal	500 pg/mL
Electron Capture Deterctor (ECD)	Senyawa terhalogenasi	5 pg/s
Mass Spectrometer Detector (MSD)	Dapat diatur untuk semua senyawa	0,25 – 100 pg
Nitrogen-phosporous (NPD)	Senyawa N, P	0,1 pg/s (P) 1 pg/s (N)
Electrolytic Conductivity Detector (ELCD)	Senyawa mengandung halogen, S, atau N	0,5 pg Cl/s 2 pg S/s 4 pg N/s
Photoionization Detector (PID)	Senyawa terionisasi oleh UV	2 pg/C/s
Flame Photometric Detector (FPD)	Senyawa S, P	100 – 100 pg (S) 1 – 10 pg (P)
Fourier Transform Infra Red (FTIR)	Senyawa organik	0,2 – 40 ng

C. Gas Chromatography Mass Spectrofotometer (GCMS)

Dasar pemisahan kromatografi gas adalah dispersi sampel pada fase diam sementara gas dalam fase gerak mengelusi fase diam. Cara kerja kromatografi gas adalah fase gerak gas mengalir di bawah tekanan melalui pipa yang dipanaskan dan ditutup dengan fase diam cair atau diisi dengan fase diam cair yang dilapisi pada pendukung padat. Analit dimuat ke kepala kolom melalui port injeksi yang dipanaskan. Suhu oven dipertahankan atau diprogram untuk meningkat secara bertahap. Begitu berada di dalam kolom, terjadi pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen dalam fase diam (Sparkman, 2011).

Kromatografi Gas (GC) menggunakan prinsip pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi dan perbedaan titik didih (atau tekanan uap) dari komponen penyusunnya (Rohman dan Ganjar, 2007). Dapat

digunakan sebagai pengidentifikasi suatu senyawa yang terdapat pada campuran gas dan juga menentukan konsentrasi suatu senyawa dalam fase gas. Sedangkan Spektrometri Massa (MS) merupakan metode yang menentukan berat molekul dengan membandingkan massa terhadap muatan dari ion yang muatannya diketahui dengan mengukur jari-jari orbit melingkar dalam medan magnetik seragam. Perpaduan metode ini menghasilkan data yang lebih akurat dalam identifikasi senyawa yang dilengkapi dengan struktur molekulnya.

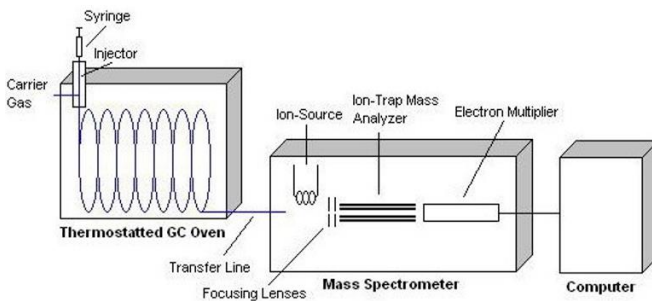
Fase gerak adalah sebuah pengatur berupa gas pembawa, yang biasanya berupa gas yang memiliki kemurnian tinggi seperti Helium (He), Hidrogen (H), atau campuran Argon (Ag) dan Metana (Rohman dan Gandjar, 2007). Pemilihan gas pembawa bergantung pada jenis detektor yang digunakannya, helium (He) adalah tipe gas pembawa yang umum digunakan karena memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik dibandingkan jenis lainnya (Rohman dan Gandjar, 2007). Fase diam merupakan bagian mikros lapisan polimer yang mendukung gas murni, didalam bagian sistem yang disebut kolom (Muntaha, 2013). Kolom merupakan komponen penting dalam GC dimana merupakan tempat terjadinya proses pemisahan suatu campuran (Rohman dan Gandjar, 2007). Fase gerak gas akan membawa solute dari ujung kolom sampai ke detektor. Detektor dalam GC merupakan suatu sensor elektronik yang mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen didalamnya menjadi sinyal elektronik (Rohman dan Gandjar, 2007). Penggunaan suhu yang bertahap meningkat ($50 - 350^{\circ}\text{C}$) bertujuan menjamin solute akan menguap dan cepat terelusi (Guntarti dkk., 2016).

Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS) merupakan salah satu metode untuk memisahkan senyawa organik yang bersifat volatil dalam campuran kompleks (Rohman dan Gandjar, 2007), menggabungkan dua metode analisis senyawa yaitu Kromatografi Gas (GC) untuk menganalisis jenis senyawa secara kualitatif dan Spektrometri Massa (MS) untuk menganalisis kuantitatif struktur berat molekul senyawa analit.

Penerapan metode Kromatografi Gas adalah untuk analisis senyawa yang stabil terhadap suhu tinggi, sehingga solute tidak mengalami kerusakan susunan molekul proses pemanasan (Nugraha, 2018). Prinsip kerja GCMS merupakan jenis kromatografi yang digunakan untuk pemisahan senyawa organik dan penganalisa dalam campuran kompleks yang bersifat volatil (Rohman dan Gandjar, 2007). Oleh karena itu, sampel untuk analisis berupa lemak yang diamati dalam bentuk asam lemaknya diderivatisasi kebentuk metil esternya (Rohman dkk., 2012). Gambar 4 merupakan bagian dari GCMS.

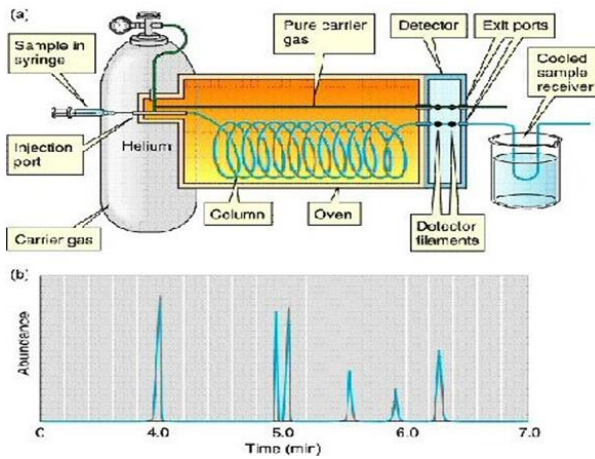
Metode pemisahan senyawa organik didasarkan pada sifat dan komposisi asam lemak yang dapat dipisahkan dengan kromatografi gas sedangkan setiap komponen dapat ditentukan berdasarkan berat molekulnya dengan spektrometri massa (Sumarno, 1995). GC-MS dapat digunakan untuk menentukan komposisi asam lemak (Hermanto, 2008). Hal ini dapat dilakukan dengan mengubah asam lemak menjadi turunan esternya (Janusz, 2003).

Kromatografi gas yang digabungkan dengan spektrometer massa (GC-MS) akan menghasilkan kombinasi yang baik karena mampu memberikan analiti yang keluar dari kolom melalui identifikasi m/z -nya.



Gambar 8. 4. Gambar Instrumen GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrometer) (Wettasinghe dkk, 2001).

Pada berbagai penelitian sudah banyak dilakukan analisis dengan menggunakan GCMS, Wettasinghe dkk., (2001) telah menganalisis lemak ayam, babi dan sapi melalui kandungan senyawa alkoholnya menggunakan GCMS. Keuntungan GCMS adalah alat ini menawarkan sensitifitas yang tinggi, waktu analisis yang cepat, serta memiliki kapasitas tinggi (Guntarti dkk., 2016). Alat ini juga dapat dilengkapi dengan perangkat lunak kemometrika yang memungkinkan sebagai alat yang canggih untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.



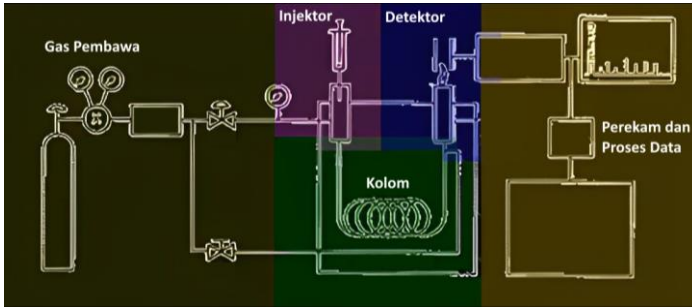
Gambar 8. 5. GCMS dengan contoh produk kromatogramnya.

D. Prinsip Pemisahan Kromatografi Gas

Penyebaran cuplikan antara 2 fase → fase diam & fase gerak

Aplikasi → senyawa mudah ↑

Pada Gambar 8.1. merupakan skema alur kromatografi secara sederhana.



Gambar 8. 6. Skema Kromatografi Gas.

Keuntungan dan Kelemahan

Keuntungan diantaranya Kolom secara kontinyu dijaga oleh FG/ gas, Sampel terpisah secara sempurna, Waktu relatif pendek, Sensitivitas tinggi, Sampel sedikit. Mudah

Kelemahan Komponen yang tertahan kuat dalam fase diam → sulit dipisahkan diatasi dengan suhu kolom \uparrow , Personal tertentu dan mahal.

E. Soal Latihan

1. Buatlah rangkaian sistem kromatografi gas?
2. Apakah kelemahan dan keuntungannya?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 9

FUNGSI KROMATOGRAFI DAN APLIKASINYA

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang fungsi kromatografi gas serta pengaplikasiannya.

B. Komponen Tangki Gas Pembawa

Gas pembawa secara umum merupakan gas H₂ (Hidrogen) atau He (Helium) atau N₂ (Nitrogen) dengan beberapa syarat, yakni: Lambam, meminimumkan difusi, mudah didapat, merupakan gas murni, dan cocok dengan detektor (sesuai dengan persamaan Van Deemter.

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu$$

C. Sistem Injeksi Sampel


Diperkenalkan sebagai sumbat uap dengan ukuran yang sesuai. Injeksi yang lambat atau sampel yang terlalu besar menyebabkan penyebaran pita dan resolusi yang buruk. Gambar 9.1. merupakan contoh sistem injeksi sampel diantaranya adalah Microsyringe/autosampler/gas-tight syringe.



Gambar 9. 1. Contoh sistem injeksi sampel.

Minimum 2 jam, 25°C di atas suhu maksimum kolom yang digunakan. Aliran gas pembawa lambat (5 – 10 ml/menit) dan Jangan disambung ke detector. Ada beberapa jenis kolom seperti pada Tabel 9.1.

Tabel 9. 1. Tabel karakteristik beberapa jenis kolom.

Karakteristik	Tipe Kolom			
	FSOT	WCOT	SCOT	Packed
Panjang (m)	10 – 100	10 – 100	10 – 100	1 - 6
Efisiensi (Plat/m)	0,1 – 0,3; 0,53*	0,25 – 0,75	0,5	2 – 4
Ukruan Sampel	2000 – 4000	1000 – 4000	600 – 1200	500 – 1000
Tekanan Relatif	Rendah	Rendah	Rendah	Tinggi
Kecepatan Relatif	Cepat	Cepat	Cepat	Lambat
Fleksibilitas	Ya	Tidak	Tidak	Tidak
Inert terhadap bahan kimia	Baik 			Kurang Baik

*Kolom besar

D. Detektor dalam Kromatografi Gas

DHB (Detektor Hantar Bahang) → TCD (Thermal Conductivity Detektor). Peka terhadap laju aliran gas pembawa. Semakin besar jumlah maka yang terjadi yaitu tumbukan molekul dengan kawat pijar per waktu → semakin besar pelepasan bahang.

Nama lain Katarometer → Claesson (1946)

Detektor konduktivitas termal didasarkan pada prinsip bahwa benda panas dapat melepaskan panas dengan laju yang bergantung pada komposisi media di sekitarnya. Sebagian besar detektor konduktivitas termal berisi kawat logam yang dipanaskan dengan listrik yang tersuspensi dalam aliran gas. Resistansi yang biasa ditempatkan diukur dengan rangkaian jembatan Wheatstone.

Tabel 9. 2. Lapisan fase diam umum untuk kolom kapiler.

Komposisi	Polaritas	Aplikasi	Batas Suhu
100% dimetil polisisiloksan	Nonpolar	Fenol, hidrokarbon, amina, senyawa sulfur, pestisida, PCB	-60°C to 325°C
100% dimetil polisisiloksan (cair)	Nonpolar	Turunan asam amino, minyak esensial	0°C to 280°C
5% difenil, 95% dimetil polisisiloksan	Langsung	Asam lemak, metil ester, alkaloid, obat, senyawa halogen	-60°C to 325°C
14% sianopropil fenil polisisiloksan	Langsung	Obat, steroid, pestisida	-20°C to 280°C
50% fenil, 50% metil polisisiloksan	Langsung	Obat, steroid, pestisida, glikol	60°C to 240°C

50% sianopropilmetil, 50% fenilmetil polisiloksan	Langsung	Asam lemak, metil ester, alditol asetat	60°C to 240°C
50% trifluoropropil polisiloksan	Langsung	Senyawa halogen, aromatis	45°C to 240°C
Polietilen glikol – modifikasi TPA	Polar	Asam, alcohol, aldehid, akrilat, nitril, keton	60°C to 240°C
Polietilen glikol	Polar	Asam bebas, alcohol, eter, minyak esensial, glikol, pelarut	60°C to 220°C

DPN (Detektor Pengionan Nyala) → FID (Flame Ionization Detector)

Menunjukkan bahwa hantar listrik suatu gas berbanding lurus dengan konsentrasi zarah yang memiliki muatan dalam gas.

E. Soal Latihan

1. Sebutkan bagian dan fungsi dari setiap instrumen kromatografi gas?
2. Detektor apa saja yang digunakan?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 10

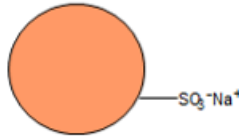
KROMATOLOGRAFI PENUKAR ION

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat memahami tentang kromatografi penukar ion.

B. Prinsip Dasar Terjadinya Penukar Ion

Pemisahan dalam kromatografi penukar ion didasarkan pada kompetisi senyawa ionik yang berbeda dari sampel untuk situs aktif pada resin penukar ion (pengepakan kolom). Seperti yang dicontohkan oleh Gambar 10.1.



Gambar 10. 1. Gambaran prinsip dasar penukar ion Na^+ dengan SO_3^- .

C. Pemilihan Jenis Penukar Ion

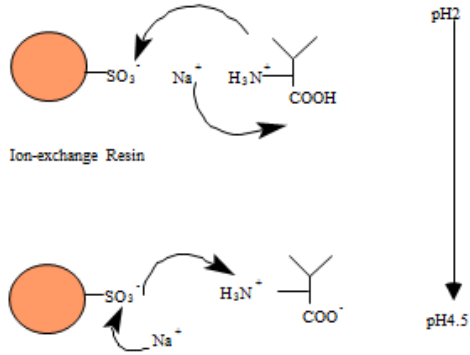
Pada Tabel 10.1. terdapat beberapa jenis resin untuk kromatografi penukar ion.

Tabel 10. 1. Jenis resin dalam kromatografi penukar ion.

Jenis Penukar		Grup Fungsional Penukar	Penamaan
Kation	Asam kuat	Asam sulfonat ($-\text{SO}_3^- \text{H}^+$)	Dowex 50; Amberlite IR 120
	Asam lemah	Asam karboksilat ($-\text{CO}_2^- \text{H}^+$)	Amberlite IRC 50
Anion	Basa kuat	Ion Amonium kuarternar ($-\text{NR}_3^+ \text{OH}^-$)	Dowex 1; Amberlite IRA 400
	Basa lemah	Grup Amina ($-\text{NH}_3^+ \text{OH}^-$)	Dowex 3; Amberlite IR 45

D. Regenerasi Bahan Penukar Ion (Pencucian)

Gambar 10.2 menunjukkan mekanisme dari kromatografi penukar ion (resin NaSO_3) dengan salah satu asam amino.



Gambar 10. 2. Mekanisme kromatografi penukar ion Na^+ dan NH_3^+ .

E. Soal Latihan

1. Bagaimana proses mekanisme ion exchange kromatografi?
2. Sebutkan fase diam yang digunakan?

Penilaian masing-masing jawaban mendapatkan 50 poin. Total 100 poin.

BAB 11

TEORI ELEKTROFORESIS

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat menjelaskan tentang elektroforesis dalam analisis kimia farmasi.

B. Pendahuluan

1. Definisi

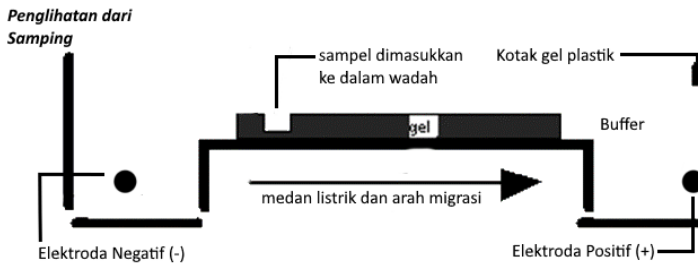
Pergerakan zat terlarut bermuatan pada media cair/padat serta dalam medan listrik. Banyaknya senyawa yang ada dalam bentuk molekul yang mudah terionisasi seperti, asam amino, protein, nukleotida, dan asam nukleat .

Senyawa atau partikel bermuatan dalam medan listrik, bermuatan negatif (-) akan bergerak menuju anoda (+), bermuatan (+) akan bergerak menuju katoda (-) Elektroforesis untuk memisahkan campuran senyawa yang berbeda dengan menggunakan teknik analisis dan pemisahan yang dibahas.

Pemisahan tergantung pada :

- a. Struktur kimia
 - b. pH
 - c. Gugus fungsional
 - d. Berat molekul (BM)
2. Analisis ini berguna pada informatif tentang data:
- a. Senyawa metabolit ataupun senyawa pada biokimia yang memiliki Berat Molekul besar.
 - b. Tidak memerlukan jumlah yang besar, dan pemurnian tinggi.
 - c. Dapat menggunakan sampel secara langsung tanpa adanya pemisahan, contohnya pada menggunakan urin, dan cairan limpa.

- d. Senyawa dengan bersifat polar, bermuatan, atau memiliki sifat zwitter ion.
3. Elektroforesis dapat digunakan untuk mengetahui :
- a. Nasib perjalanan obat yang diberikan pada pasien atau diberikan pada binatang percobaan.
 - b. Dengan menggunakan analisis elektroforesis perjalanan obat dapat dideteksi atau dilacak
 - c. Alat yang memakai tenaga 100 volt/cm secara bertingkat, dapat digunakan untuk memisahkan beberapa senyawa dalam 15 menit.
 - d. Pemisahan dapat dilakukan dengan cara mengatur pH yang berkisar pada rentang 2 sampai dengan 12.
 - e. Untuk analisis kualitatif, asalkan analisis kuantitatif asal ada detektor (densitometer).



Gambar 11. 1. Alat Pokok Elektroforesis.

Pada Gambar 11.1, Kedua ujungnya menerima elektroda negatif dan positif, kemudian menerima arus searah di bawah pengaruh medan listrik, kemudian protein akan bebas bergerak ke kutub yang berlawanan dengan muatannya.

Gerak merupakan lintasan (batas), sehingga disebut gerak batas, karena suatu peristiwa yang terjadi pada suatu larutan disebut larutan bebas. Gerak

juga dipengaruhi oleh berat jenis molekul, yang tentunya sesuai dengan berat molekul. Diusulkan oleh Tellius dalam penggunaan pertamanya sekitar tahun 1930 untuk memisahkan protein dalam buffer yang ditempatkan dalam tabung berbentuk U.

4. Metode yang lain disebut *zon electrophoresis*

Sampel yang telah disiapkan diwarnai pada alas datar atau pada kertas basah dengan larutan penyangga, kemudian kedua ujung kertas menerima arus DC tegangan tinggi. Karena pengaruh medan listrik, titik-titik akan bergerak menuju elektroda positif dan negatif (Lehninger, 1988 dan Conway 1977).

Menurut Bio-rad (1983), berdasarkan pada peralatan dan teknik pengembangan alat elektroforesis dibedakan menjadi *slab electrophoresis* yaitu menggunakan lempeng sebagai fase diam, dan *tub electrophoresis* menggunakan bahan fase diam yang diletakkan dalam tabung. Kemudian dikarenakan terjadi gerakan mendatar dan vertikal dibedakan menjadi *electrophoresis vertical* dan *horizontal*.

C. Larutan Bebas

Elektroforesis yang ada pada larutan bebas atau *moving boundary electrophoresis*, migrasi ion mempunyai kecepatan dasar, maka :

$$U_0 = \frac{V_0}{X} \dots\dots\dots (1)$$

V_0 merupakan kecepatan migrasi dalam larutan yang paling encer dalam medan listrik, dan X merupakan Besarnya. Maka :

$$X = \frac{E}{f_1} \dots\dots\dots (2)$$

E yaitu medan listrik pada satuan yaitu volt, f adalah panjang larutan dalam satuan cm, dan U_0 pada satuan cm/detik. Maka V_0 pada satuan $cm^2 \text{ detik}^{-1} \text{ volt}^{-1}$. Maka :

$$U_0 = \frac{Q}{A\eta\pi r^2} \quad (3)$$

U_0 adalah mobiltas ion dalam larutan, Q adalah muatan partikel, r adalah radius efektif partikel, η adalah viskositas. Harga Q dapat diganti dengan Z dan E , yang masing-masing valensi dan jumlah elektron, dirumuskan:

$$U_0 = \frac{Z.E}{A\eta r^2} \quad (4)$$

Para pengarang untuk menuliskan mobilitas partikel pada elektroforesis kertas sebagai berikut:

$$U_0 = \frac{Q}{A\eta r^2} \quad (5)$$

Bila pada kekuatan medan X maka pada kekuatan menjadi F_x , maka :

$$F_x = Q.X \quad (6)$$

F_x dinyatakan dalam kecepatan total. Maka menurut Hukum Stockes:

$$F_x = 6\pi r\eta V_0 \quad (7)$$

dengan digabungkan rumus 6, rumus 7, dan berdasarkan persamaan pertama (1):

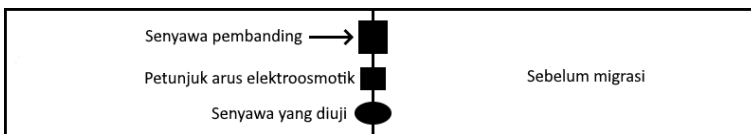
$$U_0 = \frac{Q}{6\pi r\eta} \quad (8)$$

Kenyataan pada hukum stockes hanya efektif pada ukuran partikel 1300 \AA dan tidak berlaku dalam molekul yang mendekati ukuran molekul air.

1. Pengaruh kadar ion medium.

Ketika kandungan ion meningkat dari 0 menjadi 0,01 m. Diskon hingga 20%. Ketika kandungan ion meningkat dari 0 menjadi 0,1 m. Mobilitas ion divalen akan berkurang hingga 36%. Media elektroforesis biasanya berupa kertas, bubuk kaca atau bubuk lainnya, silika gel, selulosa asetat yang sering menghasilkan muatan permukaan negatif. Ketika ruang bawah tanah bermuatan positif, ia bergerak menuju katoda.

Akibatnya, semua area (spot), termasuk material netral, juga akan bermigrasi di bawah proses elektroosmosis. Jumlah elektroforesis sangat bervariasi tergantung pada sifat pembawa, pH elektrolit sehingga jarak yang ditempuh dapat diukur. , lihat Gambar 11.2. berikut.



Gambar 11. 2. Percobaan untuk menguji Osmose.

2. Elektroosmosis dan mobilitas relatif.

Ketika elektroforesis sedang berlangsung dan tegangan diterapkan, diamati bahwa ada migrasi partikel ionik baik dalam larutan maupun pada pelat atau kertas yang digunakan sebagai pendukung. Gerakan ini dikenal sebagai arus osmotik atau efek elektroosmotik. Efek ini cukup signifikan jika sel atau media elektroforesis berpori dan terdapat elektrolit .

Larutan atau media akan menyesuaikan dan bahkan dapat membentuk pengisi. Larutan akan bergerak menuju elektroda dengan muatan berlawanan.

Mobilitas standarnya adalah MA dan mobilitas pereaksi yaitu MB, maka jarak tempuh (perjalanan) masing-masing senyawa adalah a dan b (Jarak dinyatakan dalam cm dan waktu t dalam detik). Oleh karena itu, pergerakan relatif sebenarnya adalah $MB/MA = B/A$. Metode ini hanya untuk diskriminasi, bila digunakan biasanya diukur secara langsung untuk setiap jarak yang ditempuh sampel yang diuji relatif terhadap senyawa pembanding.

$$\begin{aligned} & \text{Harga MA} \\ & = \frac{a}{t} \dots\dots\dots(9) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Harga MB} \\ & = \frac{b}{t} \dots\dots\dots (10) \end{aligned}$$

D. Pengaruh pH dan pKa Migran

Dalam mobilitas basa, pengaruh pH dan pKa yang terjadi pada saat derajat disosiasi terjadi di suasana asam atau basa lemah direpresentasikan dengan notasi persamaan ionisasi sebagai berikut:



$$\begin{aligned} & \alpha \\ & = \frac{[B^-]}{[HB] + [B^-]} \dots\dots\dots (12) \end{aligned}$$

Nilai Ka tetap, tetapi a (konstanta disosiasi) berubah dengan pH sehingga persamaan harganya adalah:

$$\begin{aligned} & Ka \\ & = \frac{[H^+][B^-]}{[HB]} \dots\dots\dots (13) \end{aligned}$$

[HB], [H⁺], dan [B⁻], adalah kandungan ion/komposisi ion, hb adalah senyawa netral yang tidak terpengaruh pada medan listrik, jadi hanya B- saja terpengaruh, dan H⁺ tidak terpengaruh karena kecil. Dalam Persamaan 13, Ka memiliki nilai tetap, dalam analisis elektroforesis. Adanya senyawa netral HB. Kecuali untuk keperluan analitis untuk menghitung pengaruh pH terhadap derajat ionisasi. Oleh karena itu, senyawa tersebut harus diubah menjadi semua ion B-, sehingga diperlukan optimasi pH.

Analit rendah (sulit). PH harus diubah sehingga bentuk ion B- dimaksimalkan. Butuh waktu untuk menyelesaikan proses disosiasi. Jika disosiasi tidak tertinggal di perangkat, titik dengan ekor kuantisasi akan muncul

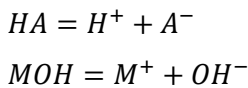
$$pH = pKa + \log \frac{[B^-]}{[HB]} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{U}{\mu - U} \dots\dots\dots (14)$$

Persamaan 14 berlaku untuk asam monoprotik lemah (valensi 1), perbedaan mobilitas dinyatakan dengan $-\mu$, nilai ini adalah jarak yang ditempuh. Maka dirumus berikut yang berkaitan erat dengan pH suatu larutan :

$$pH = pKa + \log [\mu - U] \dots\dots\dots (15)$$

Rumus 15 dikembangkan, dan bentuk mobilitas sebagai perubahan pH dan perubahan ionisasi asam monoprotik dengan menggunakan profilnya sebagai berikut:

Profil peruraian asam monoprotik



Jika asam lemah maka pH akan mempengaruhi dekomposisi, jika asam kuat maka pH tidak akan mempengaruhi dekomposisi. Hasil H⁺ kemudian akan menunjukkan berapa banyak asam yang akan dipecah.

Base lemah akan profil yang sama, tetapi semakin kecil pH semakin besar harga U Harga disosiasi, persamaan dapat dilihat pada rumus 15 yang dinyatakan pada rumus 16.

$$\alpha = U/\mu \dots\dots\dots (16)$$

Untuk mendapatkan pH optimal pada pemisahan berbagai senyawa dirumuskan :

$$pH_{OPT} = \frac{pKa_1 + pKa_2}{2} - \log \frac{\frac{U_1}{U_2} - \left[\frac{Ka_1}{Ka_2}\right]^{1/2}}{1 - \left\{\frac{U_1 Ka_1}{U_2 Ka_2}\right\}^{1/2}} \dots\dots\dots (17)$$

Harga log pada rumus 20 dapat diabaikan maka rumus menjadi:

$$pH_{opt} = \frac{pKa_1 + pKa_2}{2} \dots\dots\dots (18)$$

Persamaan rumus untuk basa dan asam lainnya, mencari pemisahan yang baik, didorong oleh pK dari zat yang bergerak lebih lambat. Perpindahan pH setiap 0,1 unit akan mempengaruhi rasio mobilitas antara 0,6 dan 1,5. Kemudian pH optimal untuk pemisahan dapat dilihat langsung dari gambar di atas. Dengan ketentuan sebagai berikut : medium atau suporting tidak mempengaruhi,

Untuk mendapatkan pH yang optimun pada pemisahan berbagai senyawa dirumuskan :

$$[H^+] = \sqrt{Ka_1 Ka_2} \dots\dots\dots (19)$$

Jika rasio mobilitas lebih besar dari angka ini, maka pH diatur sehingga senyawa dapat terionisasi penuh. Jika asam atau basa memiliki valensi 2, maka :

$$pH = \frac{pKa_1 + pKa_2}{2} \dots\dots\dots (20)$$

Proses ionisasi, dan harga mobilitas asam Divalen yaitu : presentase ionisasi

$$= 100 \left(\frac{u}{U}\right) = 50 \frac{D\sqrt{(B+2)}}{D + \frac{D}{B+1}} \dots\dots\dots (21)$$

Keterangan Harga B = Ka₁/Ka₂

$$D = \frac{[H^+]}{\sqrt{[Ka_1Ka_2]}} \dots\dots\dots (22)$$

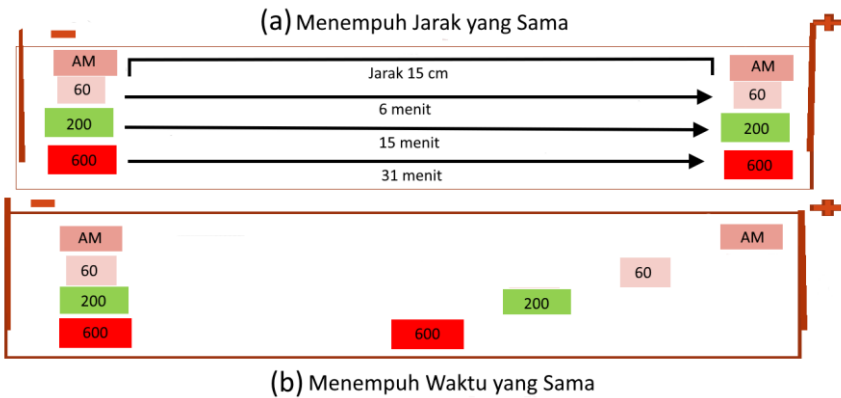
Conway (1977), dan Thornburg, bahwa bobot molekul (W), mempunyai pengaruh sekitar 20 % dirumuskan:

$$\frac{100 MA}{Z} \dots\dots\dots$$

$$= \frac{800}{\sqrt{W}} \quad (23)$$

MA merupakan mobilitas relatif terhadap pembeding amaran, dan z merupakan valensi migran. 100 MA dapat diganti AM, dengan menyatakan harga mobilitas migran.

Ketika menguji pengaruh massa molekul pada pemisahan senyawa yang berbeda, ditemukan bahwa untuk menempuh jarak 15 cm, senyawa normal/komparatif membutuhkan waktu 6, 15 dan 31 menit untuk senyawa dengan massa molekul 60, 200 dan 600 dalton. Menurut percobaan yang dilakukan pada analisis peptida dengan fase diam poliakrilamida, dapat dilihat pada Gambar 11.3.

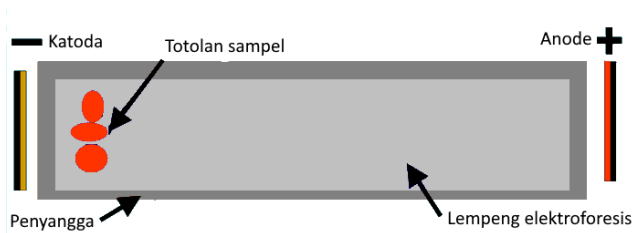


Gambar 11. 3. Dua elektroforesis dari sampel sama. (a) Menempuh Jarak yang sama dengan waktu yang berbeda-beda dan (b) menempuh waktu yang sama dengan jarak yang berbeda-beda.

Ternyata pemisahan lebih bergantung pada berat molekul daripada muatannya. Studi kasar, untuk memisahkan turunan n-alkylamine dalam kondisi larutan asam format 0,75M; Level potensial pH adalah 2.100 V/cm selama 17 menit. Nonylamine bermigrasi sepanjang jarak 12 cm relatif terhadap decylamine. Keduanya memiliki perbedaan berat molekul sebesar 9%. Itu belum dapat digunakan sebagai instruksi dekomposisi, tetapi dapat digunakan sebagai parameter. Pemisahan dapat ditingkatkan dengan memberikan waktu yang lebih lama maka akan terlihat perbedaan propagasi atau kecepatan perjalanan.

E. Jenis Elektroforesis

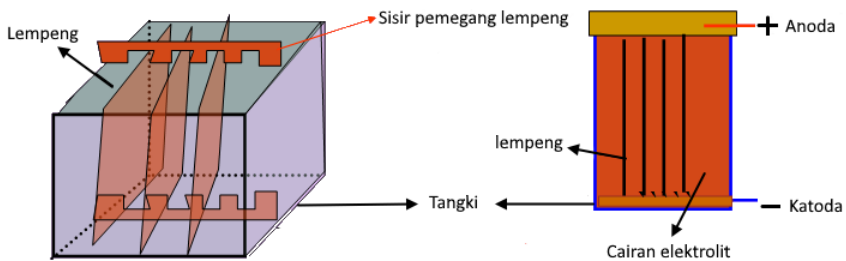
Secara garis besar lempeng elektroforesis memiliki bagian-bagian seperti Gambar 11.4.



Gambar 11. 4. Bagian-bagian dari lempeng elektroforesis.

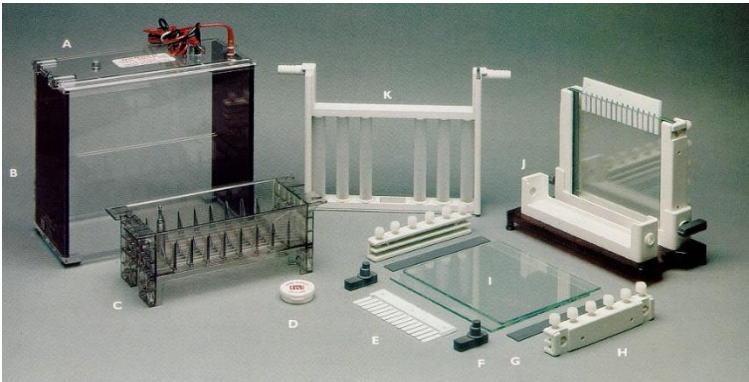
Dibawah ini merupakan beberapa jenis elektroforesis

1. Lempeng tegak



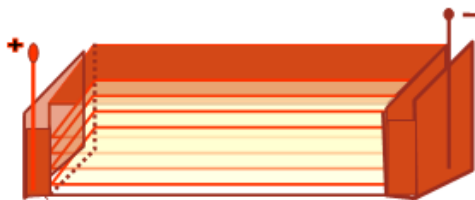
Gambar 11. 5. Elektroforesis lempeng tegak.

Elektroforesis dua arah seperti TLC digunakan pada campuran yang kompleks yaitu , asam amino dari proteolisis selama ukurannya persegi, menganalisis hanya satu jenis ion (muatan positif atau negatif) untuk memfasilitasi arah pergerakan ion. Bentuk umum elektroforesis vertikal dapat dilihat pada Gambar 11.5. dan 11.6. Untuk meningkatkan pemisahan dalam elektroforesis lapis tipis (ELT), Anda dapat mengubah pH untuk menggantikan media buffer. Berbeda dengan TLC yang dimodifikasi, eluennya adalah polar atau nonpolar. Pada Gambar 11.6. adalah cara penempatan/penandaan sampel pada stand elektroforesis di bagian atas rak, karena sampel akan terpisah searah dengan kecepatan elektroforesis.



Gambar 11. 6. Perlengkapan elektroforesis.

2. Lempeng Mendatar



Gambar 11. 7. Elektroforesis lempeng mendatar.

Elektroforesis jenis ini merupakan metode pemisahan horizontal, selama jenis protein/senyawa yang dianalisis sama, maka pH elektrolit tidak diubah. Pelat elektroforesis dipakai untuk elektroforesis bertingkat. Dengan

cara ini mobilitas setiap bongkahan bervariasi dalam kecepatan. Elektroforesis pelat horizontal mirip dengan elektroforesis vertikal dan elektroda dapat dipertukarkan. Alat ini dapat dipakai pada berbagai jenis ketebalan lembaran karena sisir penyangga berbeda dalam kerapatan, seperti

pada Gambar 11.8.



Gambar 11. 8. Media elektroforesis dengan beda kerapatan.

Sedangkan alat elektroforesis horizontal dapat dilihat pada Gambar 11.7. Elektroforesis pelat horizontal Pada alat ini, lapisan fasa diam diletakkan mendatar dan ditumpuk dari atas ke bawah sehingga dapat digunakan tiga sampai empat lapisan.

Dengan elektroforesis ini, sejumlah besar senyawa dapat dipisahkan. Tinggi meniskus sekitar 50 cm atau bahkan lebih tinggi untuk pemisahan yang lebih lengkap. Elektroforesis juga dapat digunakan untuk menyiapkan, memisahkan sampel dalam jumlah besar, menggunakan beberapa tabung.

Bahkan jika itu membutuhkan waktu lama. Maka, percobaan dapat dilakukan dengan pendinginan, atau dengan mensirkulasikan air dingin, atau dengan menyemprot. Ukuran alatnya bervariasi, sehingga pelat yang digunakan disesuaikan dengan tangki.

3. Elektroforesis Tabung

Elektroforesis ini mirip dengan kromatografi kolom tetapi sampelnya miring. Operator elektroforesis dalam tabung atau intraseluler dapat digunakan untuk beberapa tabung sekaligus. U-tube (migration-limited) elektroforesis tabung dengan tangki dapat dipisahkan menggunakan

puluhan tabung sekaligus, asalkan jenis protein atau senyawa yang dianalisis sama



Gambar 11. 9. Alat elektroforesis tabung.

Elektroforesis dapat digunakan untuk analisis kuantitatif, kualitatif dan modulasi Elektroforesis jenis ini dapat digunakan untuk preparasi.

4. Elektroforesis dengan Kertas

Jenis elektroforesis ini pertama kali ditemukan, tetapi masih digunakan sampai sekarang. Selain menggunakan kertas, metode elektroforesis ini biasanya menggunakan lapisan selulosa asetat untuk memisahkan protein. Berbagai bentuk elektroforesis kertas ditunjukkan pada Gambar 11.10. Lapisan tipis telah diganti dengan kertas. Jenis elektroforesis berbentuk U awalnya digunakan untuk menguji mobilitas ion, juga dikenal sebagai batas migrasi. Sampel yang ditandai bergaris akan lebih banyak jumlahnya.

Selain media kertas, karena kurang sempurnanya pemisahan dimodifikasi beberapa jenis media, yakni:

a. Media kertas (sebagai fase diam), mempunyai keuntungan:

1. Bahannya mudah didapat, tidak perlu persiapan khusus, cukup dipotong sesuai ukuran, kertas yang digunakan adalah whatman nomor.1, untuk kromatografi. Ada atribut utama antara lain:
2. Memiliki kapasitas adsorpsi yang tinggi, yang dapat dikurangi dengan menggunakan buffer yang lebih basa dengan peningkatan voltase. Namun pH harus diperhitungkan, karena sangat mempengaruhi mobilitas ion
3. Karena sifat kimia dan strukturnya dapat menyebabkan timbulnya elektroosmosis tidak rata.
4. Kertas memiliki porositas yang tinggi, sehingga dapat menyebabkan difusi molekul untuk senyawa dengan berat molekul rendah. Hal ini dapat diatasi dengan menaikkan tegangan. Selain itu untuk mengecilkan pori-pori kertas bisa diubah.

2. Selulosa asetat

Pada awalnya selulosa asetat digunakan untuk pengganti kertas, pada kenyataan bisa lebih praktis dan murah, serta dengan alat yang dikembangkan cara menyiapkan lebih mudah, sehingga lebih banyak digunakan karena:

- 1) Kemampuan pemisahan yang kuat dan umur simpan yang pendek, karena pori-pori kecil dan homogen, senyawa makromolekul dan mikromolekul terpisah dengan cepat.
- 2) Biaya yang dipakai lebih murah dan dengan ukuran pendek bisa memisahkan dengan baik.
- 3) Pada perdagangan sudah tersedia.
- 4) Gugus hidroksilnya lebih sedikit, sehingga hidrofilitasnya lebih sedikit daripada kertas, sehingga interaksi yang terjadi antara penggerak dan penyangga berkurang.

5) Dapat dipakai untuk immonoelektroforesis, serta sampel juga mudah dipisahkan dari selulose asetat.

c. Media Pati

Pati dicampur dengan larutan garam yang digunakan, campuran tersebut dipanaskan hingga menjadi gel sambil diaduk agar tidak ada gas yang tersisa. Kemudian dioleskan pada selembar kaca seolah membentuk lapisan tipis.

d. Media Agar

Tersedia secara umum, penggunaan cukup, cara pembuatannya sama dengan penambahan pada pati. Lebih baik memakai yang sudah jadi karena lebih homogen sejak diproduksi.

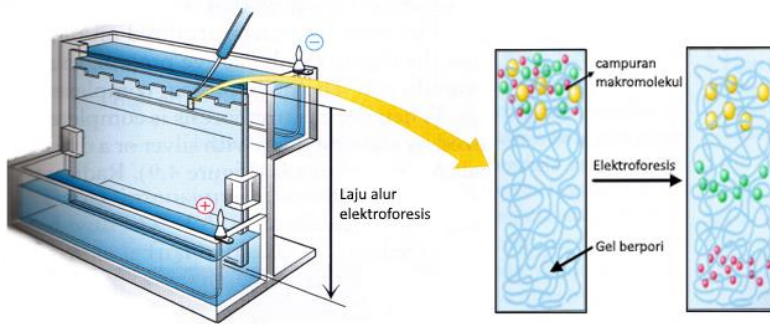
e. Media poliakrilamid

Umumnya untuk pemisahan senyawa yang makromolekul, hal ini dikarenakan pori-pori dapat disiapkan dengan ukuran tertentu.

Memberikan pemisahan secara cepat dan adsorpsi yang rendah dan elektroosmosis. Itu tidak menyerap sinar UV, memfasilitasi dosis UV. Migran dapat direaksikan dengan reagen warna dan diperiksa dengan pemindai TLC

F. Teknik Penotolan

Penotolan sampel dapat menggunakan dengan instrumen secara otomatis atau manual. Jika metode manual dapat digunakan model. Penotolan dapat dilakukan pada area tengah/tepi. Pada penotolan, alat penotol tidak boleh menyentuh bahan pendukung hal ini untuk mengatasi tida adanya lubang. (Lihat pada aplikator penotolan KLT), sebagai contoh penotoloan terlihat pada Gambar 11.11.



Gambar 11. 10. Cara penotolan sampel pada sumuran media.

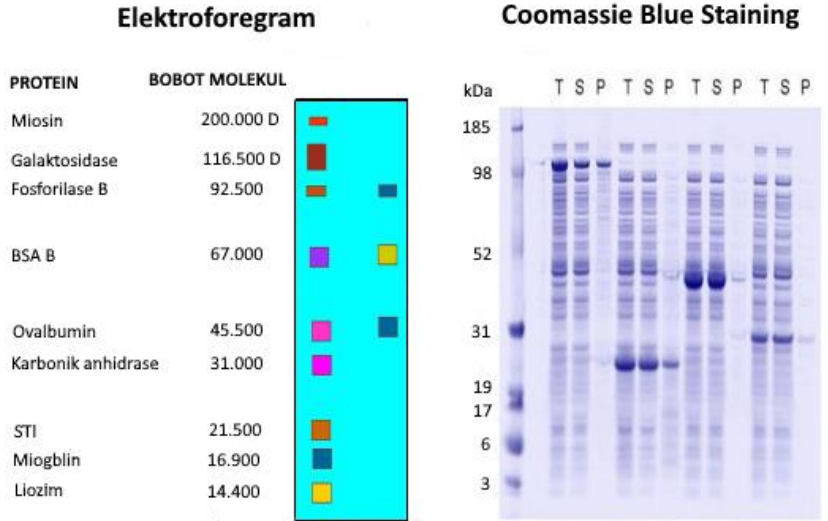
G. Penggunaan

Elektroforesis selain pemisahan dalam uji kualitatif dapat digunakan untuk memisahkan dan memurnikan sediaan serta hasil pemisahan beberapa protein dengan elektroforesis. Berat molekul protein myosin 200.000 Galactosidase 116.250 Enzim fosforilase 92.500 .

Media trinitroselulosa 25 μm 25 μm tris -192 μm glisin, pH 8,3/20% (vn) metanol. Dilakukan pada suhu kamar, 60 v, 0.25 a (25 v/cm) 3 jam (Bio-Rad, 1983, dengan Gambar 14 menunjukkan dengan jelas urutan berat molekul. Semakin jauh dari pusat, semakin kecil jejaknya. Seperti pada Persamaan 26. Kestabilan senyawa bergantung pada massa molekul dan valensi senyawa. Dengan data tersebut dapat dilacak menurut rumus tersebut sediaan 15% gel

Ini lebih mudah bila pembanding digunakan, jangan dipusingkan dengan alat trans-blot) dengan formulasi berbeda. Tetapi dasar-dasarnya harus diketahui untuk menafsirkan data lebih dekat dengan kebenaran. Gel trinitroselulosa pada 15% dalam fase diam dalam 25 nm triglisin pada 192 nm, pH 8,3/20% (vn) metanol. Dilakukan pada suhu kamar, 60v, 0,25 a (25 v/cm) 3 jam (bio-rad, 1983, dengan peralatan trans-blot). Dari slide 49. Terlihat jelas bahwa urutan berat molekul lebih jauh dari titik pusat karena lebih kecil.

Mobilitas suatu senyawa bergantung pada berat molekul dan valensi senyawa tersebut.



Gambar 11. 11. Hasil rekaman Elektroforegram protein dan Markernya.

Dengan data tersebut dapat dilacak sesuai dengan rumusnya. Lebih mudah menggunakan senyawa pembanding (pelacak) tanpa beban formulasi yang berbeda. Tetapi dasar-dasarnya harus diketahui untuk menafsirkan data lebih dekat dengan kebenaran.

H. Soal Latihan

1. Apakah bedanya migrasi yang terjadi pada KLT dan elektroforesis?
2. Apakah faktor yang dominan dalam mempengaruhi migrasi sampel?
3. Apakah pengaruh kepekatan larutan elektrolit?
4. Apakah pengaruh kadar media, dan medan listrik?
5. Apakah pentingnya pH dalam proses elektroforesis?
6. Bagaimana mencari pH optimum dari senyawa poliprotonik yang dianalisis dengan elektroforesis?
7. Jelaskan beberapa metode analisis dengan elektroforesis.

BAB 12

ELEKTROFORESIS KAPILER

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat menjelaskan tentang elektroforesis kapiler dalam analisis kimia farmasi.

B. Pendahuluan

Elektroforosis kapiler mempunyai dasar yang sama dengan elektroforesis, hanya elektroforesis ini tidak dilakukan dalam lempeng atau tabung yang besar tetapi dalam tabung kapiler. Pipa kapiler yang digunakan berdiameter 25 -100 μm dengan panjang 100 cm. Gerakkan dari setiap senyawa mempunyai kecepatan yang berbeda karena daya tarik ke kutup pasangan yang muatannya berlawanan, karena itu mereka dapat terpisah. Pemisahan ini berjalan dalam medium cair dan tidak pada medium padat yang basah oleh larutan dapar ketika kita mempelajari elektroforesis.

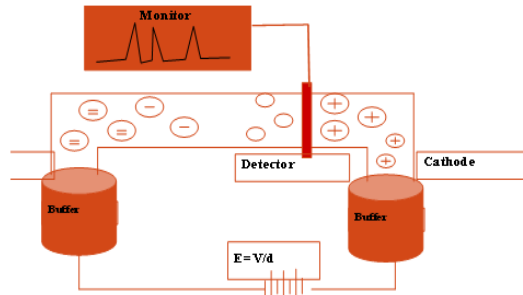
Sejarah

1. Tahun 1979, Mikkers dkk, menggunakan tabung teplon yang sempit dengan perbedaan voltase yang tinggi.
2. Tahun 1981 Jorgeson menggunakan tabung kapiler dari gelas yang terbuka, sehingga dinamakan HPCE High Performance Capillary Electrophoresis
3. Tahun 1984, Terabe dkk, kombinasi antara mode kromatografi dan micellar electronic chromatography. Gerakan ion dipengaruhi oleh medan listrik dan pengaruh fase diam yang berupa Silica Gel, sehingga merupakan micesellar electronic chromatography.

Berdasar perkembangan ilmu dan teknologi serta penelitian yang tak pernah berhenti, maka elektroforesis kapiler dibedakan atas dasar mekanisme pemisahan dan kinetiknya (metode), yaitu:

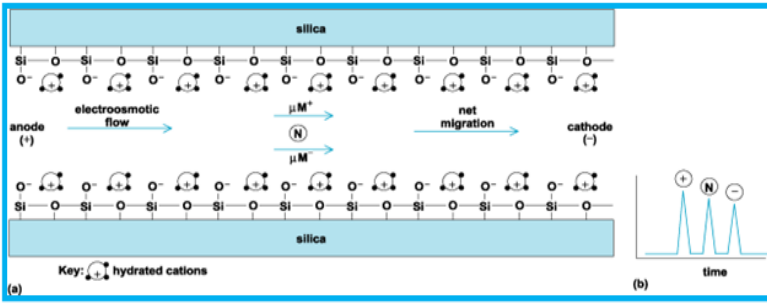
1. Sistem kontinu (Proses kinetik)
 - a. Capillary zone electrophoresis (CZE)
 - b. Capillary gel electrophoresis (CGE)
 - c. Micellar electrokinetic chromatography capillary (MEKC)
 - d. Capillary isoelectric focusing (CIEF)
2. Sistem diskontinu, Capillary Isotachopheresis (CITP), ion dibedakan menjadi dua, yaitu:
 - a. dengan mobilitas tinggi
 - b. ion dengan mobilitas rendah

C. Teori Dasar



Gambar 12. 1. Rangkaian alat elektroforesis kapiler.

Pemisahan atas dasar perbedaan daya tarik medan listrik dan ion yang jumlah muatan dan BM berbeda, senyawa bermuatan positif tertarik pada katode, sedangkan anion tertarik anode.



Gambar 12. 2. Mekanisme pemisahan dan kromatogramnya.

Terjadilah tarik-menarik secara elektrostatis antara dinding kaca (SiO⁻ dengan ion +), yang dinamakan Zeta potensial (ζ), yang harganya makin kecil bila makin jauh dari dinding kapiler.

1. Molekul senyawa kimia yang dapat dipisahkan dengan elektroforesis kapiler.
 - a. Protein
 - b. Peptide
 - c. Asam amino
 - d. Asam nukleat (DNA dan RNA)
 - e. Ion anorganik
 - f. Basa organik
 - g. Asam organik
 - h. Seluruh sel (mikroba)
 - i. juga dianalisis dengan elektroforesis gel slab

2. Rumus Kecepatan Migrasi

$$v = \mu_{ep}E = \mu_{ep} \frac{V}{L} \dots\dots\dots (23)$$

Keterangan:

v = Kecepatan migrasi senyawa bermuatan dalam medan listrik
 cm/sekon = (cm sec⁻¹)

μ_{ep} = mobilitas elektroforesis (cm² V⁻¹ sec⁻¹)

E = Kekuatan medan listrik ($V\text{ cm}^{-1}$)

V = voltase (V) yang diberikan

L = Panjang kapiler (cm)

Electrohoretic mobility:

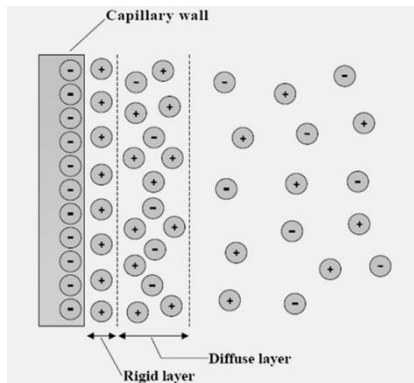
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \dots\dots\dots (24)$$

Ketentuan:

- q = muatan pada ion
- η = viskositas hambatan
- r = radius ion

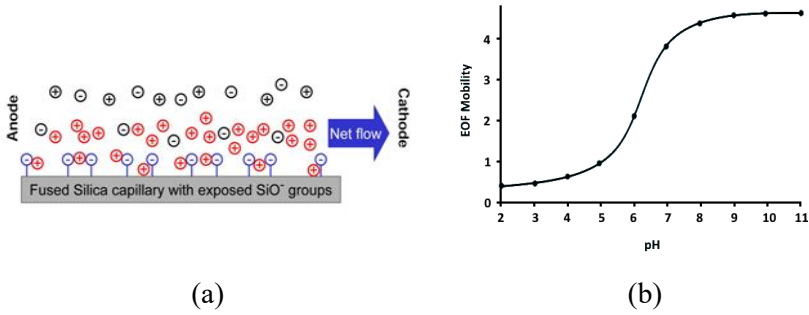
Frictional retarding forces (faktor

3. Pengaruh muatan dinding kapiler



Gambar 12. 3. Muatan bilayer antara media dan sampel.

Distribusi muatan pada permukaan yang berupa bilayer, sehingga menimbulkan zeta potensial.



Gambar 12. 4. Hubungan antara: (a) banyaknya muatan SiO₂ dengan (b) pH dan EOF.

EOF (*electro-osmosis flow*), ternyata makin tinggi bila pH makin besar. Faktor mobilitas Elektroosmosis, adalah tetapan dielektrika, viskositas dapar, dan pH dapar. Mengatur pH dapat yang rendah maka muatan dalam kapiler berkurang dan mobilitas ion senyawa akan makin rendah (Gambar 12.4). Mobilitas electroosmosis dirumuskan:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_o \epsilon \zeta}{4\pi\eta} \dots\dots\dots (25)$$

$$v = \mu_{eo} E = \left(\frac{\epsilon_o \epsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) E \dots\dots\dots (26)$$

$$N = \frac{\mu V l}{2DL} \dots\dots\dots (27)$$

Keterangan:

- v = Mobilitas elektroosmosis
- ε = Tetapan dielektrik
- ε_o = Tetapan dielektrik (hampa)
- ζ = Zeta potensial
- η = Viskositas
- E = Medan listrik
- l = Panjang efektif
- L = Panjang total

D = Koefisien difusi

Persamaan efisiensi diatas dengan perbedaan voltase yang tinggi akan didapat harga N besar karena solut hanya memerlukan waktu pendek dalam kapiler, dan medan listrik yang kuat diperlukan waktu pendek untuk difusi. Solut yang kecil akan mempunyai mobilitas tinggi (Cl^- , Br^- SO_4^{2-}) dan menghasilkan N yang kecil karena kecepatan (mobilitas) dalam kapiler tinggi maka waktu difusi jadi pendek, tetapi molekul yang besar (protein) menghasilkan lempeng teoritis yang besar karena mempunyai tetapan difusi yang rendah, sehingga menunjukkan dispersi (difusi) yang rendah dan menaikkan efisiensi.

Molekul kecil → Difusi cepat, Mobilitas tinggi

Molekul besar → Difusi lambat, Mobilitas rendah

Tabel 12. 1. Bobot molekul dan mobilitas sampel.

Nama Solut	MW	Mobility ($10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$)	Koefisien Difusi ($10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$)
Hati kuda (Myoglobin)	13900	0,65	1,0
Quinin sulfat	747	4,0	7,0

Karena hubungan yang langsung tetapi berlawanan antara mobilitas dan difusi, efisiensi pemisahan yang tinggi terjadi karena perbedaan BM atau Mol wt. Efisiensi pemisahan pada CE disebabkan oleh efisiensi dan oleh selektivitas.

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \dots\dots\dots (28)$$

dimana: $\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$ dan $\bar{\mu} = \frac{\mu_2 + \mu_1}{2}$

Resolusi dalam Kapiller Elektroforesis Harga R akan kecil apabila kecepatan elektroforetik dan elektroosmotik sama tetapi berlawanan arah. Harga R akan

besar bila N besar dan $\Delta\mu$ harganya besar Atau dengan mengubah lama waktu analisis dan mengurangi kecepatan gerakan sampel. (mengu rangi beda potensial).

Tabel 12. 2. Beberapa faktor yang berpengaruh dan hasilnya.

Variabel	Hasil	Catatan
Medan Elektrik	Perubahan proporsional dalam EOF	Pemanasan Joule dapat terjadi
Buffer pH	EOF menurun pada pH rendah, meningkat pada pH tinggi	Metode terbaik untuk mengontrol EOF, tetapi dapat mengubah muatan analit
Kekuatan ion	Mengurangi Z dan EOF dengan meningkatnya konsentrasi buffer	Kekuatan ionik tinggi berarti arus tinggi dan pemanasan Joule
Pengubah organik	Mengurang Z dan EOF dengan meningkatnya pengubah	Efek kompleks

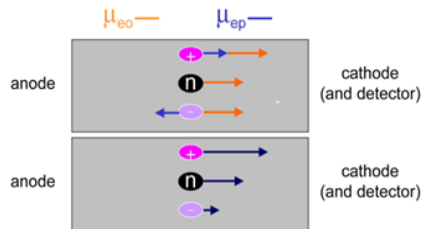
Mengkombinasikan dua faktor yang berpengaruh pada kecepatan migrasi suatu ion (juga dapat diberikan pada senyawa netral tetapi dengan $\mu_{ep} = 0$): Pada $pH > 2$, kation bergerak ke katode karena muatan positif dari keduanya μ_{ep} dan μ_{eo} . Pada $pH > 2$, anion bergerak ke anode karena muatan negatif dari μ_{ep} , tetapi dapat tertarik kearah lain oleh muatan positif μ_{eo} (bila EOF cukup kuat). Pada $pH > 2$, senyawa netral bergerak ke katode karena hanya oleh kekuatan μ_{eo} . (bila EOF cukup kuat).

$$v = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) \frac{V}{L} \dots\dots\dots (29)$$

Tabel 12. 3. Tabel pengaruh tambahan lapisan pada dinding kapiler dan hasil.

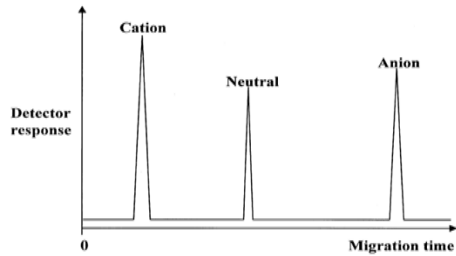
Variabel	Hasil	Catatan
Surfaktan	Teradsorpsi ke dinding kapiler melalui interaksi hidrofobik atau ionic	Surfaktan anionik meningkatkan EOF, Surfaktan kationik menurunkan EOF
Polimer hidrofilik netral	Menyerap ke dinding kapiler melalui interaksi hidrofobik	Mengurangi EOF dengan melindungi muatan permukaan, juga meningkatkan viskositas
Lapisan kovalen	Terikat secara kimiawi ke dinding kapiler	Banyak kemungkinan
Suhu	Mengubah viskositas	Mudah dikendalikan

Catatan: netral semua keluar bersama-sama dalam pemisahan dasar CE saja. Representasi bergambar dari efek gabungan dalam kapiler, ketika EO lebih cepat dari EP (kasus umum):



Gambar 12. 5. Gerakan anion, kation, dan senyawa netral

Detektor ditempatkan dekat katode dalam semua kondisi semua bentuk senyawa (bermutan atau netral) digerakkan oleh kekuatan EOF, Detektor mirip dengan detektor pada kromatografi cair (LC), seperti absorpsi, UV fluoresensi, dan MS, Detektor sensitif diperlukan untuk konsentrasi yang lebih kecil dalam elektroferogram CE Kondisi umum tergambar:



Gambar 12. 6. Elektroforegram senyawa ionik dan netral.

3. Elektroforesis Kapiler (CE):

Misalnya pada zona elektroforesis, digunakan pendukung tubular terbuka sempit atau kapiler.

a. Tipe 25 – 75 mm I.D

Kapiler dari borosilikat yang sempit untuk menghilangkan panas (+Joule) yang dalam sistem lebih efisien.

b. Mengurangi pelebaran puncak

Didapat medan listrik yang lebih kuat untuk digunakan.

c. Migrasi lebih cepat

d. Mengurangi waktu analisis

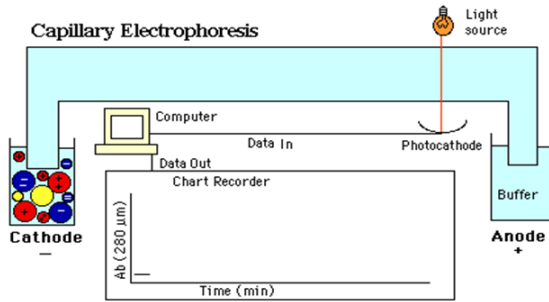
1) Mudah dijadikan rangkaian otomatis

2) Analit sangat kecil ukurannya (dalam nL)

3) Tidak ada partikel tidak ada jalur berkali lipat

4) Banyak jenis deketktor yang dapat digunakan.

5) Seperti fluoresensi atau absorpsi UV-Vis yang umum digunakan, dapat juga digunakan MS.



Gambar 12. 7. Elektroforesis yang lengkap.

Perhitungan kecepatan mobilitas elektorosmotik dan efektifitas mobilitas solut (analit).

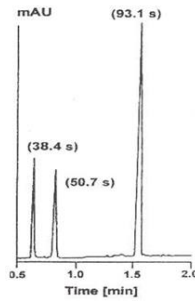
$$\text{Kation} = \mu_a = \frac{LL}{Vt} = \frac{50 \cdot (58,5)}{25000 \cdot 38,4} = 3,05 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Netral} = \mu_a = \frac{LL}{Vt} = \frac{50 \cdot (58,5)}{25000 \cdot 50,7} = 2,31 \cdot 10^{-3}$$

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} = 3,05 \cdot 10^{-3} - 2,31 \cdot 10^{-4} = 7,40 \cdot 10^{-4}$$

Tabel 12. 4. Data perhitungan kecepatan mobilitas elektroosmotik dan efektifitas mobilitas solut.

Solut	Waktu migrasi (s)	μ_a (cm ² /Vs)	μ_e (cm ² /Vs)
Kation	38,4	$3,05 \times 10^{-3}$	$7,40 \times 10^{-4}$
Netral	50,7	$2,31 \times 10^{-3}$	$2,31 \times 10^{-3}$
Anion	93,1	$1,26 \times 10^{-3}$	$-1,05 \times 10^{-3}$



Gambar 12. 8. Elektroforegram ion-ion.

Catatan Siswa:

Mobilitas efektif (m_e) dapat diekstraksi dari mobilitas semu yang mengukur EOF menggunakan penanda netral yang bergerak dengan kecepatan sama dengan EOF. Contoh penanda netral termasuk DMSO, mesitylene oksida, dan aseton.

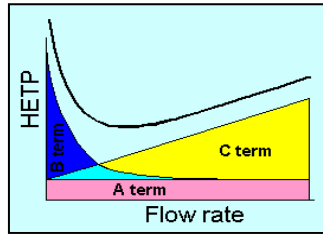
Tujuan analisis dengan CE untuk mendapatkan efisiensi yang sangat tinggi, perlu diulangi mainan Van Deemter yang berhunungan dengan HETP yang berhubungan dengan kecepatan fase gerak gas atau cairan.

$$H = \frac{A + B}{u + Cu} \dots\dots\dots (30)$$

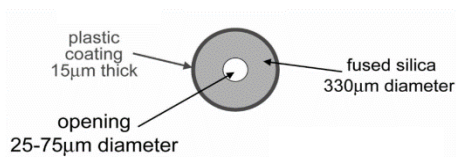
Keterangan:

- a. Keterangan A, B, C tetapan yang tergantung pada harga H , pada H yang lebih rendah akan didapat efisiensi pemecahan yang tinggi, tak ada harga A (multipath) atau difusi Eddy pipa terbuka. Tak ada harga C (perpindahan massa) karena taka fasa diam (fase diam).
- b. Hanya tetapan B (difusi longitudinal) yang masih ada sehingga rumus:

$$H = \frac{B}{u} \dots\dots\dots (31)$$



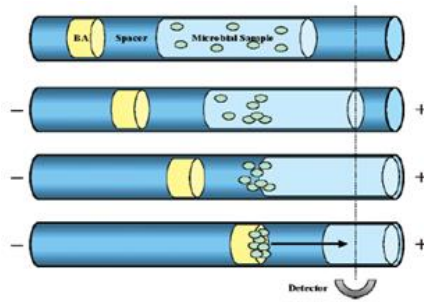
Gambar 12. 9. Kecepatan alir



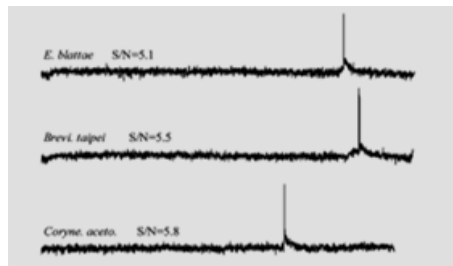
Gambar 12. 10. Penampang melintang pipa kapiler untuk elektroforesis.

4. Aplikasi Elektroforesis Kapiler

Aplikasi-Aplikasi (dalam analisis kimia) sangat luas. Seperti CE telah dipelajari secara intensif dalam industri farmasi sebagai alternatif untuk LC dalam berbagai kondisi bahan analit. Contoh lain: mendeteksi bakteri/mikroba sebagai kontaminan dengan cepat menggunakan CE. Metode yang sekarang digunakan memerlukan waktu beberapa hari. Dilakukan inokulasi (USP) diperlukan sampel mikroba/bakteri untuk ditanam dalam medium pertumbuhan selama beberapa hari. Pada saat perlu diamati pertumbuhan bagaimana pertumbuhannya dibawah mikroskop, dengan pengukuran turbidimetri. Pada hal mikroba kontaminan dapat dibiarkan tumbuh diudara terbuka bersama sampel. Teknik ELISA, PCR, hibridisasi dapat dilakukan untuk setiap mikroba.



Gambar 12. 11. Mekanisme pemisahan pada analisis mikroba secara elektroforesis.



Gambar 12. 12. Puncak mikroba teruji.

Deteksi sel tunggal dari berbagai bakteri terlihat pada gambar 12.12.

Mengapa CE merupakan pendekatan analitis yang baik untuk masalah ini?

Dikarenakan waktu analisis cepat (<10 mnt) dan mudah diminiaturkan.

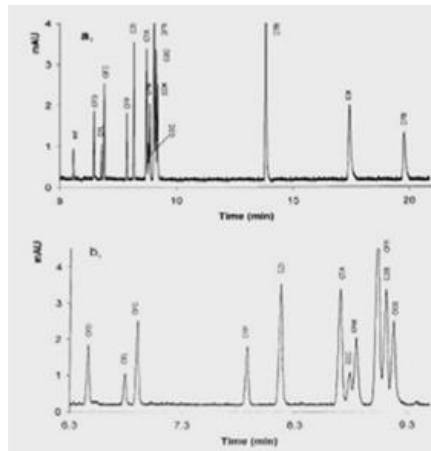
- Ekstrak sampel disuntikkan pada tempat pertama (1).
- Dapar/bufer yang berupa surfaktan bermuatan positif (kationik) ditempat yang ke (2).
- Blocking agent” (BA) untuk membuat mikroba beragregasi dan terbawa melewati detektor.
- Pipa urutan ke II, diberi beda tegangan (voltase) terjadilah pengelompokan mikroba.
- Setelah beberapa saat BA akan bergerak menuju anode dan membawa kumpulan mikroba melewati sinar (turbiditas) atau absorpsi.

- f. Dengan cara tersebut jumlah mikroba diketahui, dan jenis kontaminan dapat dibandingkan dengan mikroba pembanding.

5. Capillary Zone Electrophoresis (CZE) atau Free-Solution CE

FSCE adalah dasar yang sederhana yang telah didiskusikan terlebih dahulu.

- a. Mekanisme pemisahan berdasar atas perbedaan radius ion dari analit.
- b. Dasar utama yang menjadi syarat CZE adalah homogenitas dari larutan dan kestabilan kekuatan medan listrik sepanjang pipa kapiler
- c. Pemisahan terjadi karena pengontrolan pH, yang dapat mempengaruhi derajat disosiasi gugus asam dari solut dan protonisasi dari gugus basa dari tiap solute.



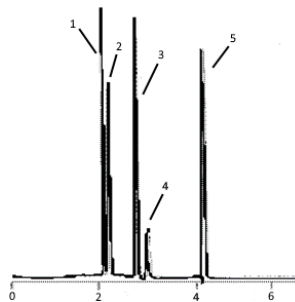
Gambar 12. 13. Elektrogram untuk antibiotic cephakosporin dengan 30 μ g/mL.

Mengadaptasi traditional gel electrophoresis kedalam capillary menggunakan polymers dalam larutan untuk membedakan ukuran partikel yang dapat digantikan bahan yang gel lain. Analit yang diuji mempunyai rasio yang sama antara muatan dan ukuran partikel (massa) ternyata dapat dipisahkan atas

perbedaan ukuran partikel. Teknik semacam ini dipraktekkan pada SDS-Gel untuk analisis protein untuk mengetahui bobot molekul (molecular weight analysis) dan juga DNA dan genotype secara bergantian.

6. Capillary Electrochromatography (CEC)

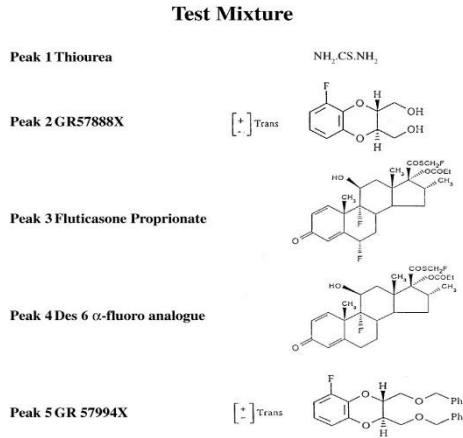
CEC merupakan metode pemisahan yang berkombinasi. CEC digabungkan dengan pemisahan yang berefisiensi dari CZE dengan HPLC terpilih. Lebih banyak menggunakan medan listrik dari pada tekanan hidrolis untuk mendapatkan fase gerak yang dapat melarutkan sampel menuju detektor. Pada proses ini sangat sedikit terjadi tekanan balik, sehingga dimungkinkan untuk menggunakan kapiler berlubang dengan diameter kecil, dengan mendapat kan efisiensi yang sangat tinggi. Hal ini sangat berguna untuk menganalisis senyawa agak pekat yang kemudian dipisahkan dengan CZE, Contoh pemisahan beberapa senyawa pada ODS sebagai fase diam pada pH = 8:



Gambar 12. 14. Elektroforegram turunan sterol.

Campuran yang di analisis dengan CEC adalah:

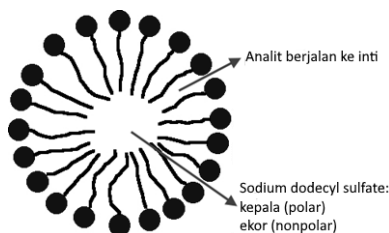
- Thiourea senyawa netral sebagai indikator/marker terjadinya aliran elektroosmotik.
- Dua senyawa dengan beda polaritas (no.2 dan no.5).
- Dua senyawa yang hampir mirip (no.3 dan no.4) untuk uji kemampuan pemisahan.



Gambar 12. 15. Senyawa turunan sterol.

Electrokinetic Chromatography (EKC) adalah sejenis teknis elektroforesis yang kemudian setelah *electrokinetic phenomena*, dengan terjadinya elektroosmosis, elektroforesis, dan kromatografi. Sebagai contoh adalah cyclodextrin yang ternyata dapat menggambarkan EKC. Mereka terjadi perbedaan interaksi antara enantiomers cyclodextrins sehingga dapat terjadi pemisahan senyawa chiral.

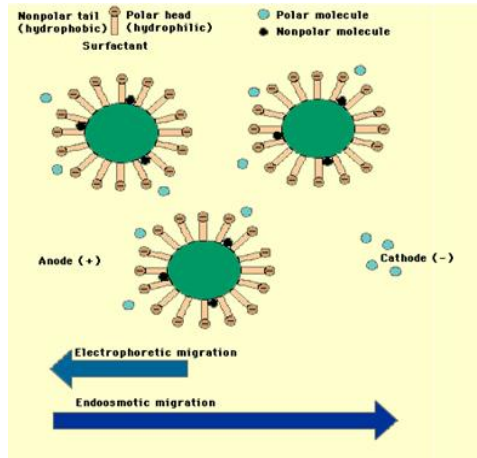
Analisis dan pemisahan antara senyawa enantiomer ini sangat penting bagi industri farmasi, karena aktivitas obat sangat dipengaruhi oleh struktur kimia baik yang memutar kekiri atau kekanan sehingga dapat diketahui jenis campuran tersebut.



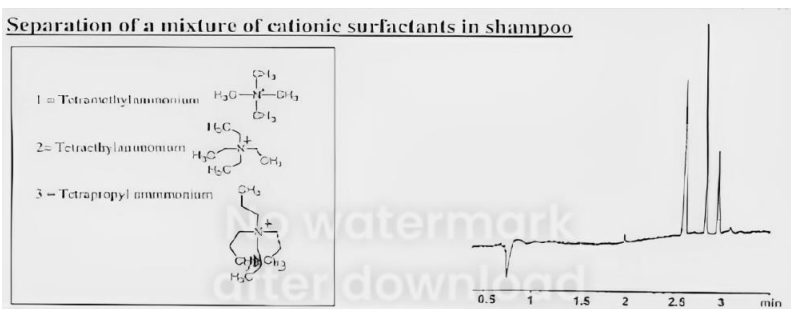
Gambar 12. 16. Bentuk miceller.

7. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

Pada MEKC surfaktan adalah *surface active agents*, seperti sabun atau detergen sintetik dengan bagian polar dan non-polar. Pada kadar rendah surfaktan terdistribusi merata. Dalam kadar tinggi surfaktan membentuk micelles. Molekul yang bersifat hidrofobik akan berada dalam daerah hidrophobic pada micellesurfaktan. Gerakan misell tergantung muatan dan radius misell.



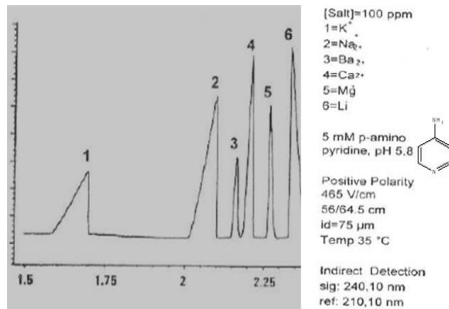
Gambar 12. 17. Arah Gerakan miceller bermuatan.



Gambar 12. 18. Struktur surfaktan dan elektroforegram.

Bila molekul kurang hidrofobik akan lebih lemah berpartisipasi kedalam misell bersifat hidrofobik. Molekul kecil yang polar dalam elektrolit akan

bergerak lebih cepat dari molekul yang berada dalam misel dari surfaktan. Bila tegangan (volatase) menyebabkan terjadinya muatan negatif pada misell surfaktan maka misell sufaktan akan bergerak lambat dibanding gerakan yang disebabkan indosmotik, dengan pengertian itu pemilihan surfaktan sangat penting agar dapat menjadikan muatannya positif.



Gambar 12. 19. Kromatogram berbagai kation dalam dapar pH 6.0.



Gambar 12. 20. Bentuk puncak karena pengaruh migrasi dapar.

D. Soal Latihan

1. Apakah perbedaan pokok antara elektroforesis dan Elektroforesis Kapiler?
2. Faktor apa saja yang berpengaruh pada mobilitas analit?
3. Apa yang dinamakan elektrokromatografi?
4. Bila untuk analisis obat, alat mana yang lebih baik digunakan?
5. Sebut jenis detektor pada analisis elektroforesis kapiler.

6. Dapatkah senyawa mikromolekul diuji dengan elektroforesis kapiler?
Jelaskan.

BAB 13

APLIKASI ELEKTROFORESIS DALAM FARMASI

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa dapat menjelaskan tentang perbedaan aplikasi elektroforesis maupun elektroforesis kapiler dalam analisis kimia farmasi.

B. Pendahuluan

Sediaan farmasi yang diproduksi di pabrik farmasi tidak hanya obat mikromolekul tetapi juga obat makromolekul. Senyawa makromolekul khususnya senyawa biokimia juga perlu mengetahui cara menganalisisnya. Analisis yang paling umum digunakan adalah elektroforesis. Terlepas dari perkembangan teknologi, senyawa ini dapat dianalisis dengan HPLC.

Faktor yang menyebabkan pemisahan:

1. Muatan molekul
2. Bobot molekul
3. Bentuk molekul
4. Molekul dipengaruhi oleh medan listrik

$$V = (EQ) / f$$

V = Molecule velocity

E = Electric field strength

Q = Molecular charge

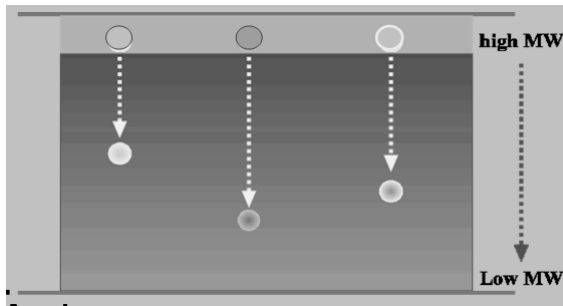
f = Friction coefficient of molecule

Tingginya hasil pemisahan sangat bergantung pada berbagai faktor seperti formulasi. Beberapa contoh aplikasi elektroforesis adalah analisis karbohidrat, analisis anion/ion logam anorganik, pembuatan profil DNA, penentuan protein.

1. Keuntungan:
 - a. Cepat
 - b. Sampel yang dibutuhkan berjumlah sedikit
 - c. Relatif murah
 - d. Otomatis
2. Kekurangan
 - a. Tidak dapat mengidentifikasi spesi netral (Kecuali yang osmosis)
 - b. Pemanasan pada Joule
 - c. Tidak dapat membedakan bentuk

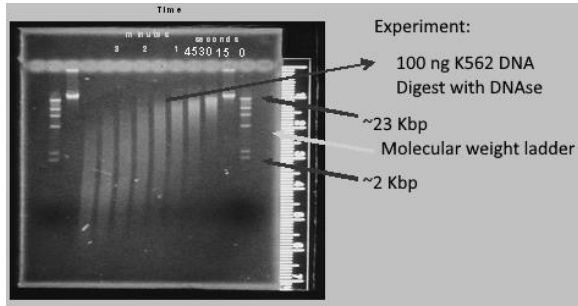
C. Migrasi Sampel

1. Pengaruh bobot molekul sampel:



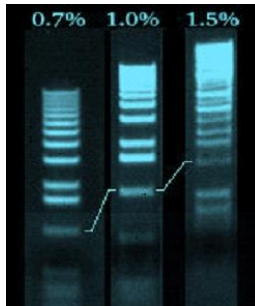
Gambar 13. 1. Kecepatan migrasi karena pengaruh bobot molekul.

Beberapa solusi yang direkomendasikan untuk elektroforesis DNA adalah: TAE (Tris-asetat-EDTA) dan TBE (Tris-borat-EDTA). Fragmen DNA akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda dalam dua buffer tergantung pada kekuatan ionik. Buffer tidak hanya digunakan untuk menjaga pH, tetapi juga menyediakan ion yang berkontribusi terhadap konduktivitas listrik. Ketika buffer 10 kali lebih kuat dari larutan stok digunakan, suhu dapat meningkat selama pelelehan pelat elektroforesis gel.



Gambar 13. 2. Hasil percobaan DNA dan hasil uraiannya.

2. Pengaruh kadar media (agarose)



Gambar 13. 3. Elektroforegram sampel karena pengaruh kadar media.

Dalam praktek pemisahan DNA dipengaruhi oleh ketebalan fase diam (media elektroforesis) maupun BM dari sampel. Gambar 13.2. mengalami peruraian ternyata migrasi lebih cepat dibanding dengan sebelum peruraian. Gambar 13.3. menunjukkan agarose (media elektroforesis) yang kadar tinggi memperlambat migrasi, kemampuan daya pisah media juga dipengaruhi oleh kadar media tabel berikut.

Tabel 13. 1. Pengaruh kadar terhadap daya pisah dan bobot molekul.

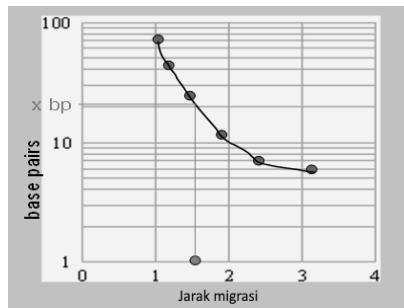
Agarose (%)	Rentang pemisahan DNA linier (dalam kilobase)
0,3	60 – 5
0,6	20 – 1
0,7	10 – 0,8
0,9	7 – 0,5

1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2,0	3 – 0,1

Tabel 13. 2. Pengaruh kadar akrilamid dengan dapar BIS daya pisah.

% akrilamid (w/v) with BIS 1:20	Rentang efektif dari pemisahan - bp
3,5	1000 – 2000
5,0	80 – 500
8,0	60 – 400
12,0	40 – 200
15,0	25 – 150
20,0	6 – 100

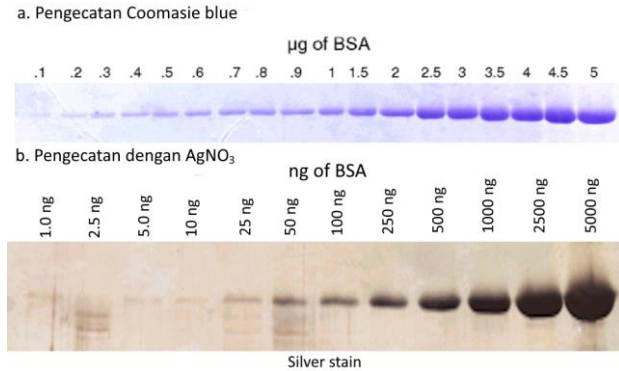
Ada hubungan linier antara kecepatan migration setiap fragmen DNA dan logaritma dari ukuran molekul (in basepairs).



Gambar 13. 4. Hubungan kecepatan migrasi dan BM.

Molekul besar bergerak lebih lambat karena gesekan yang lebih besar, seperti yang ditunjukkan oleh kurva pada Gambar 13.4. Gel yang dimodifikasi: Gel ini mengalami denaturasi polimerisasi, terutama yang kompatibel dengan asam nukleat seperti urea atau formamida. DNA terdenaturasi akan bermigrasi melalui gel poliakrilamida yang tidak bereaksi (independen) atau interkalasi.

3. Pewarnaan Sampel



Gambar 13. 5. Hasil elektroforegram protein BSA (Bovine serum).

Dari Gambar 13.5. terlihat bahwa perwarna perak nitrat (AgNO₃) lebih peka terhadap pewarnaan protein. Tabel 13.3. merupakan beberapa zat pewarna dan kepekaannya.

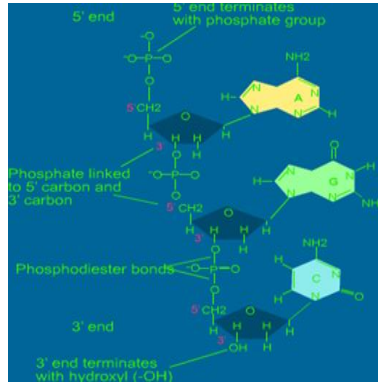
Tabel 13. 3. Tabel zat warna terhadap protein dan kepekaannya.

Stain	Batas Deteksi	Deskripsi
Ponceau S	1 – 2 µg	Reversible
Amido black	1 – 2 µg	Permanen; low background
Coomassie Blue	1,5 µg	Permanen; high background
India Ink	100 ng	Permanen
Silver stain	10 ng	Permanen
Colloidal gold	3 ng	permanen

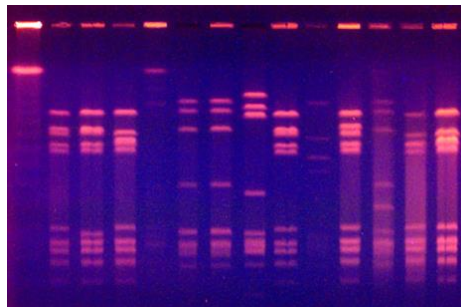
DNA mempunyai muatan negatif (karena kerangka fosfate) DNA akan tertarik pada muatan positif baik dari elektrode maupun dapar, sebaliknya akan ditolak oleh muatan negatif.

a. Pewarna Ethidium Bromide

Senyawa dengan gugus planar dapat berinterkalasi di antara basa DNA. Sifat ini menghasilkan sifat fluoresensi yang meningkat dibandingkan dengan senyawa dalam keadaan bebas (dalam larutan). Radiasi UV pada 254 nm diserap oleh DNA dan ditransmisikan ke pewarna terikat, dan dapat memancarkan warna pada 590 nm (merah-oranye) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 13.7, menunjukkan warna yang berbeda.



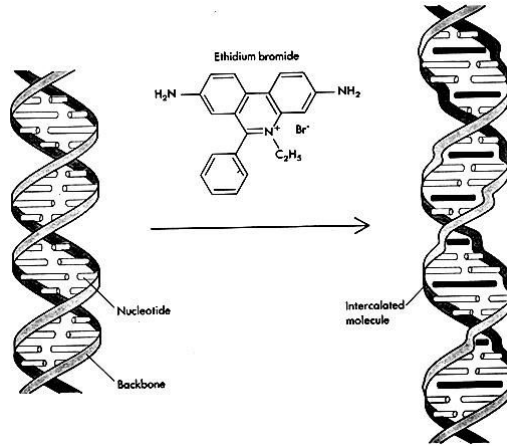
Gambar 13. 6. Ikatan pewarna ethidium bromida dengan DNA.



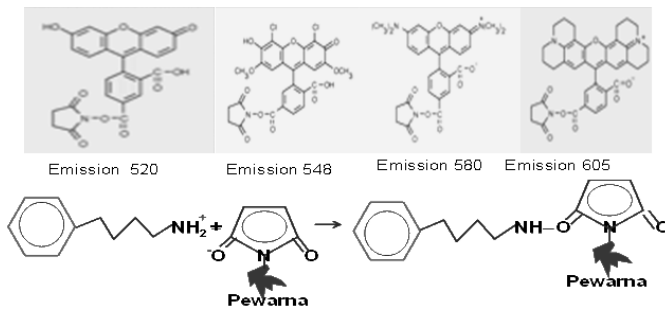
Gambar 13. 7. Hasil pewarnaan elektroforegram dengan ethidium bromida yang di potret (UV).

Zat warna dapat ber-intercalating DNA (post-PCR = polymeric chain reaction), sehingga zat warna dapat diberikan sebelum dilakukan peruraian atau dalam saat 'TGCATCTACGATGTAATCG5' CGTAGCTG3'. Linker, pewarna, dll., dapat ditambahkan ke ujung 5'

primer tanpa mengganggu reaksi. Basa individu juga dapat diberi tanda enzim proses interkalasi proses pelabelan kovalen.



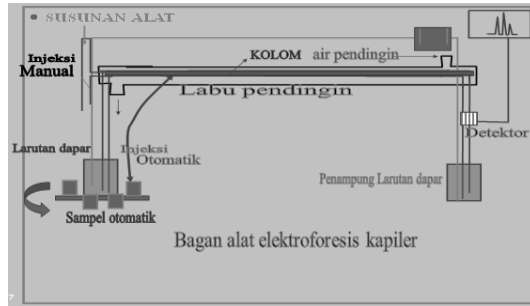
Gambar 13. 8. Pewarnaan dan hasilnya pada DNA.



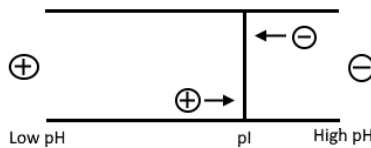
Gambar 13. 9. Pewarnaan dan cara reaksinya.

D. Kapiler Elektroforesis

1. Susunan alat



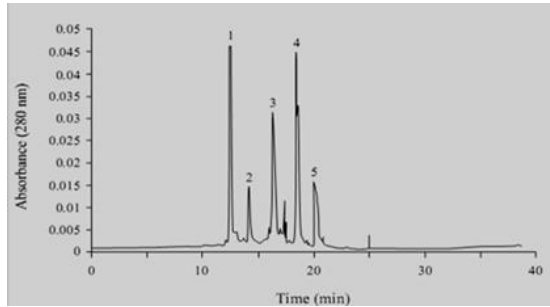
Gambar 13. 10. Perlengkapan elektroforesis kapiler.



Gambar 13. 11. Migrasi ion menuju pH titik isoelektrik.

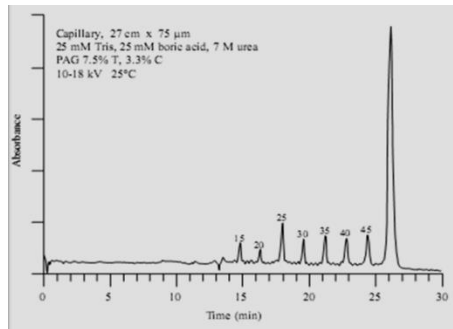
Perpindahan (pergerakan) cairan pada pipa kapiler akan terus berlangsung sepanjang larutan memiliki muatan atau diberi muatan, apabila kondisi sudah menjadi netral maka cairan akan berhenti bergerak pada pH titik isoelektrik (PI).

Penggunaan elektroforesis kapiler metode (Isoelectric focusing) yaitu berguna untuk menentukan pI dari protein, terutama dalam memisahkan immunoglobulin, variasi hemoglobin dan menentukan posisi translational modifikasi dari protein rekombinan, separasi campuran protein dapat dilihat pada gambar dibawah:



Gambar 13. 12. Hasil analisis oligo DNA dengan EK IF.

Pemisahan oligonukleotida dan sekuen produk DNA melibatkan agar poliakrilamid, Gambar 13.13. menunjukkan hasil separasi.



Gambar 13. 13. Hasil analisis DNA atas pengaruh dapar.

2. Teknik Injeksi:

- a. Hidrostatik (dengan tekanan cairan.

$$V_{INJ} = \frac{\rho \pi g h t_{INJ}}{8 \eta L}$$

Keterangan:

ρ = Bobot jenis

V = Volume

h = Selisih tinggi air

g = Gaya gravitasi

η = Viskositas

t = Lamanya penyuntikan

Hydrodynamic Injection, dirumuskan:

$$V_C = \frac{\Delta P \pi d^4 t}{128 \eta L_t}$$

Keterangan:

V_C = Volum injeksi terukur

P = Perbedaan/selisih tekanan

d = Diameter kolom

t = Waktu injeksi

η = Viskositas

- b. Electrokinetic injection, menggunakan perbedaan tegangan antara kedua ujung kapiler

$$Q_i = V_{app} \left(\frac{k_b}{k_a} \right) t \pi r^2 C_i$$

Keterangan:

Q = mol analit

V_{app} = kecepatan

T = waktu injeksi

k_b/k_a = rasio konduktivitas (buffer pemisahan dan sampel)

r = jari-jari kapiler

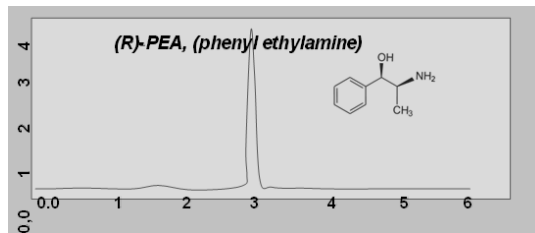
C_i = Konsentrasi molar analit

3. Capillary Isoelectric Focusing (CIEF)

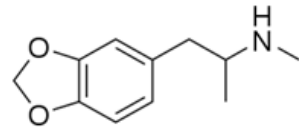
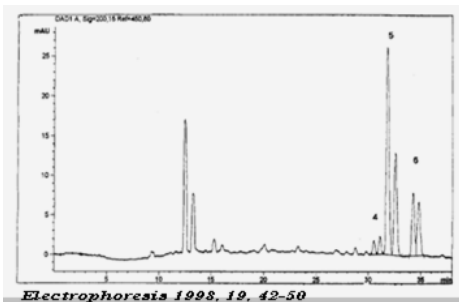
CIEF memungkinkan molekul amfoter, seperti protein, dipisahkan dengan elektroforesis dalam gradien pH yang dihasilkan antara katoda dan anoda. Zat terlarut akan bermigrasi ke titik di mana muatan bersihnya nol. Pada titik isoelektrik (pI) zat terlarut, migrasi berhenti, dan sampel difokuskan ke zona sempit. Dalam CIEF, setelah zat terlarut terfokus pada pI, zona

dimobilisasi melewati detektor dengan tekanan atau cara kimia. Teknik ini umumnya digunakan dalam karakterisasi protein untuk menentukan titik isoelektrik protein.

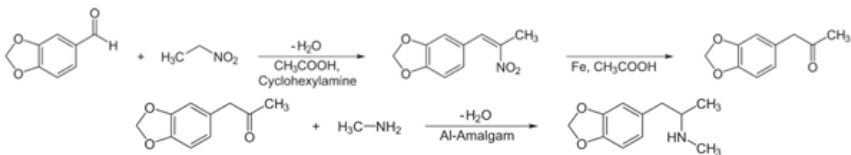
Elektroforegram dari sampel cairan oral yang dibubuhi 10 ng/mL (R)-PEA, digunakan sebagai standar internal (IS), diperoleh dalam kondisi optimal: kapiler leburan-silika 375 μm o.d., μm i.d., panjang total 40,2 cm (panjang efektif 32,8 cm); 50 mM penyangga fosfat, pH 4,5; 0,2% HS--CD (b/v); tegangan yang diberikan, 20 kV; suhu: 20 $^{\circ}\text{C}$, deteksi UV pada 200 nm.



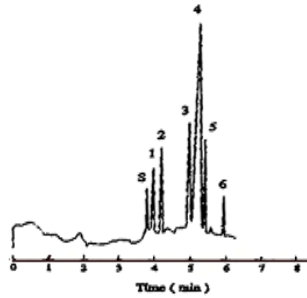
Gambar 13.14. Elektroforegram fenilalanin.



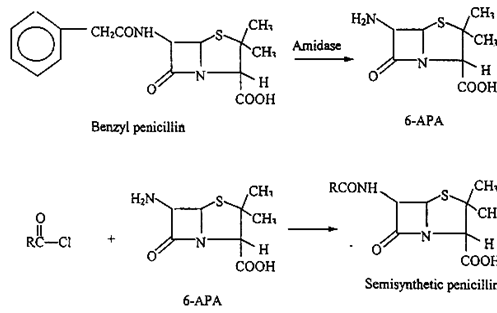
Gambar 13.15. Elektroforegram turunan fenilalanin ecstasy.



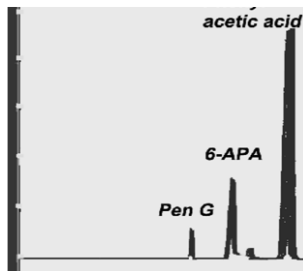
Gambar 13.16. Proses pembentukan turunan fenilalanin ecstasy.



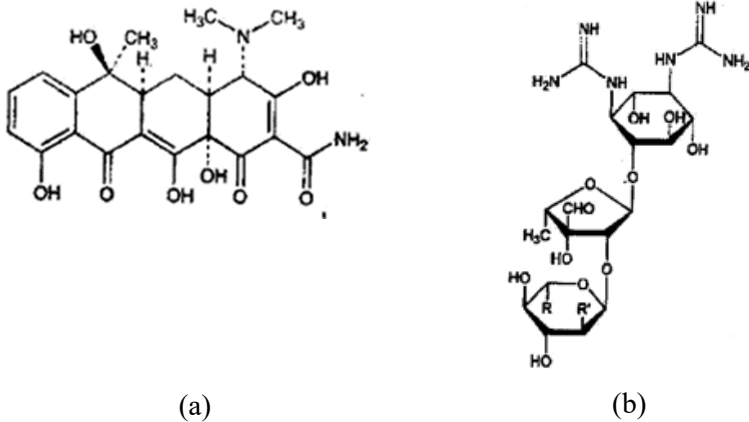
Gambar 13. 17. Kromatogram beberapa kation; (1) Amonium; (2) Kalium; (3) Kalsium; (4) Natrium; (5) Magnesium; dan (6) Zink.



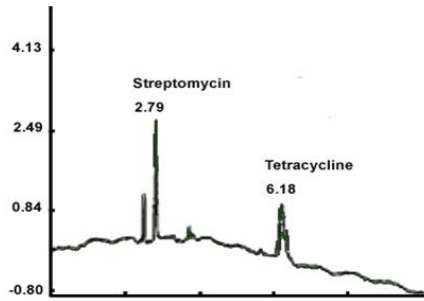
Gambar 13. 18. Proses Benzil penisilin menjadi Semisintetis penisilin.



Gambar 13. 19. Elektroforegram turunan penisilin.



Gambar 13. 20. Struktur senyawa dari (a) tetrasiklin dan (b) streptomisin.



Gambar 13. 21. Elektroforegram dari streptomisin dan tetrasiklin.

Metode Elektroforesis lebih menguntungkan dari pada HPLC, karena tidak memerlukan eluen yang banyak, dan larutan dapar hanya sedikit. Banyak tipe lain yang dapat digunakan, yaitu:

1. Micell Electroforesis

Senyawa yang dapat dianalisis dengan cara ini antara lain: morfin, kanabinol, barbiturat, benzodiazepin, antibiotik, dan vitamin.

Waktu retensi dirumuskan:

$$k' = P_{mw}V[(S) - CMC]$$

Keterangan:

k'= waktu retensi

P_{mw} = koefisien partisi

S = kadar surfaktan

CMC = medium

2. Open Tubular Capillary Electrophoresis atau Capillary Zone Electrophoresis (CZE).

Pergerakan analit berpita, terbuka karena di tengah kapiler hanya terdapat cairan netral, dan di dinding tepinya terdapat fasa medium elektrofilik, hasilnya tidak bagus karena elektrolit. konduktivitas yang tidak sempurna

3. Capillary Isotachophoresis

Dalam kapiler disuntikkan back ground electrophoresis (bge) dengan kecepatan mbge yang jauh lebih besar dari kecepatan migrasi sampel yang ionik (mS). Setelah sampel disuntikkan dan diberi arus listrik, maka akan terjadi migrasi bersama.

4. Capillary isoelectric focusing (CIF)

Sebelum terjadi pemisahan analit dikumpulkan dulu, kemudian dengan memberikan arus listrik terjadilah perbedaan potensial, sehingga terjadi pengelompokan ion positif dan negatif.

E. Soal Latihan

1. Bagaimana beda parameter mobilitas sampel pada elektroforesis dan elektroforesis kapiler?
2. Bagaimana pengaruh media terhadap mobilitas protein?
3. Senyawa apa saja yang dapat dianalisis dengan elektroforesis?
4. Bagaimana pengaruh zat pewarna pada sampel?
5. Terangkan perbedaan cara analisis dengan elektroforesis dan elektroforesis kapiler.
6. Jenis detektor yang cocok untuk analisis pisin dan turunnya dengan EK?

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. (1997). Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Pangan Edisi 1. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Anonim. (2007). Capillary Electrokinetic Separations. Pennsylvania: Villanova University.
- Butler, John M. & McCord, Bruce R. (2006). Capillary Electrophoresis Instrumentation: Theory and Application. Washington: AAFS Workshop #6.
- Darwis, A.A. & Sukara, E. (1990). Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim. Bogor: PAU-Bioteknologi IPB.
- Hachuła, U., Anikiel, S. & Sajewicz, M. Application of Densitometry and Spectrophotometry for Determination of Gallic Acid in Tea after Chromatographic Separation. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 18, 290–293. <https://doi.org/10.1556/JPC.18.2005.4.7>
- Huang, C. J., Wang, T. K., Chung, S. C., & Chen, C. Y. (2005). Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 38(1), 82–88. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.1.082>.
- Johnson, Edward L. & Stevenson, Robert. (1991). Dasar Kromatografi Cair. Bandung: Penerbit ITB.
- Karadeniz, Feryal., Burdurlu, Hande S., Koca, Nuray., and Soyer, Yesim. (2005). Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29: 297-303.
- Mordacq, John C. & Ellington, Roberta W. (1994). Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) of Blood Proteins. Victoria: Association for Biology Laboratory Education (ABLE).

- Katz, Elena D. (1996). *High Performance Liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Melvin, Maureen. (1987). *Electrophoresis (Analytical Chemistry by Open Learning)*. Manchester: John Wiley & Sons, Inc.
- Poole, C.F. & Poole, S.K. (1991). *Chromatography Today, 5th Edition*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Salam, A. (1987). *Elektroforesis pada Selulosa Asetat dan Gel Pati*. Yogyakarta: PAU-Bioteknologi UGM.
- Sastrohamidjojo, Hardjono. (1991). *Kromatografi*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Snyder, Lloyd R., Kirkland Joseph. J., & Glajch, Joseph L. (1997). *Practical HPLC Method Development, 2nd Edition*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Vanhoenacker, Gerd. (2004). *Capillary Electrophoresis Analysis of Ions and Small Molecules*. Kortrijk: Research Institute for Chromatography.

GLOSARIUM

Adsorpsi	: Proses atau kemampuan suatu bahan untuk memegang atau mengonsentrasikan gas, cairan, atau zat terlarut pada permukaannya secara adhesif; penjerapan
Anion	: Yang bermuatan negatif
Anoda	: bagian yang bermuatan positif dan bertugas untuk menarik elektron negatif dari katode; elektrode positif
Anorganik	: mengenai atau terdiri atas benda selain manusia, tumbuhan, dan hewan; mengenai benda tidak hidup
Bioaktif	: memiliki efek pada organisme hidup
Blangko	: Kosong (belum diisi)
Dapar	: Penyangga
Deskriptif	: bersifat deskripsi; bersifat menggambarkan apa adanya
Detektor	: alat untuk mencatat yang bekerja secara otomatis
Deviasi	: Penyimpangan
Difusi	: pencampuran gas atau zat cair di luar daya mekanik
Disosiasi	: pemecahan molekul dalam proses kimia yang menghasilkan satu atau lebih molekul lain
Dispersi	: pergerakan untuk perpindahan individual, terutama untuk mendiami lingkungan baru
Eksperimental	: bersangkutan dengan percobaan
Elektrolit	: senyawa yang larutannya merupakan penghantar arus listrik
Emisi	: pemancaran cahaya, panas, atau elektron dari suatu permukaan benda padat atau cair; pemancaran

Hidrolisis	: pemecahan senyawa kimia melalui penambahan air
Hipotesis	: sesuatu yang dianggap benar untuk alasan atau pengutaraan pendapat (teori, proposisi, dan sebagainya) meskipun kebenarannya masih harus dibuktikan; anggapan dasar
Homogen	: terdiri atas jenis, macam, sifat, watak, dan sebagainya yang sama;
Impurity	: tidak bercampur dengan unsur lain
Indikator	: Indikator sesuatu yang dapat memberikan (menjadi) petunjuk atau keterangan
Kalibrasi	: tanda-tanda yang menyatakan pembagian skala
Katalis	: zat yang dapat mempercepat atau memperlambat reaksi yang pada akhir reaksi dilepaskan kembali dalam bentuk semula
Kation	: Yang bermuatan positif
Keseimbangan	: setimbang, keseimbangan,
Konstanta	: tetapan
Korelasi	: hubungan timbal balik atau sebab-akibat
Kualitatif	: berdasarkan mutu
Kuantitatif	: berdasarkan jumlah
Makro	: berkaitan dengan jumlah yang banyak atau ukuran yang besar
Mikro	: berkaitan dengan jumlah yang banyak atau ukuran yang kecil
Molaritas	: konsentrasi larutan yang dinyatakan dalam banyaknya mol zat terlarut per desimeter kubik larutan; kemolaran
Monokromator	: alat untuk mendapatkan satu jenis panjang gelombang dari cahaya

Neraca	: alat untuk mengukur berat (terutama yang berukuran kecil),
Netralisasi	: menjadikan tidak terikat (bebas)
Organik	: berkaitan dg zat yang berasal dari makhluk hidup (hewan atau tumbuhan, seperti minyak dan batu bara)
Organoleptis	: berhubungan dengan pengindraan suatu produk makanan yang meliputi rasa, warna, bau, dan sentuhan
Partikel	: unsur butir (dasar) benda atau bagian benda yang sangat kecil dan berdimensi;
Presisi	: ketepatan, ketelitian
Radiasi	: pemancaran dan perambatan gelombang yang membawa tenaga melalui ruang atau zantara, misalnya pemancaran dan perambatan gelombang elektromagnetik, gelombang bunyi, gelombang lenting; penyinaran
Reagensia	: zat kimia yang gunanya untuk menimbulkan reaksi kimiawi yang telah ditentukan, biasa dipakai untuk mengetes darah
Reaktan	: pereaksi (kimia) seperti yang tertera dalam suatu persamaan reaksi
Reduksi	: pengurangan
Replikasi	: proses, cara meniru; penduplikatan
Saksama	: teliti, cermat, tepat, benar
Saliva	: Saliva atau air liur adalah cairan biologis yang ditemukan di rongga mulut dan memiliki banyak fungsi penting
Selektif	: dengan melalui seleksi atau penyaringan; secara dipilih

Sensitif : cepat menerima rangsangan; peka
Spesifik : khusus, khas
Variansi : besaran yang menunjukkan besarnya penyebaran data pada suatu kelompok data

HASIL SCANNING SIMILARITY

IDENTITAS PENULIS BUKU ANALISIS INSTRUMEN: KROMATOGRAFI DAN ELEKTROFORESIS

A. Identitas Diri Dr. Apt. Nina Salamah, M.Sc.

Nama Lengkap : Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc
Jenis Kelamin : Perempuan
Jabatan Fungsional : Lektor
NIY : 60090574
NIDN : 0623037801
Tempat dan Tanggal Lahir : Bogor, 23 Maret 1978
E-mail : nina.salamah@pharm.uad.ac.id
Nomor HP : 081229772463
Alamat Kantor : Fakultas Farmasi UAD Kampus 3
Yogyakarta
Nomor Telepon : 08129772463
SCOPUS ID : 57199730183
Web of Science Researcher ID : -
Sinta ID : 259879
H-Indeks Scopus : 3
H-Indeks Google Scholar : 8

Biodata singkat dan Foto



Dr. apt. Nina Salamah, M.Sc. Lulus S1 di Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada tahun 2001, lulus S2 Program Studi ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada tahun 2009, dan lulus S3 di Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada tahun 2022. Saat ini adalah dosen tetap di Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta sekaligus

ketua Pusat Studi Halal Center UAD. Mengampu mata kuliah Kimia Analisis, Kromatografi, Kimia Farmasi dasar dan Elusidasi Struktur. Aktif melakukan penellitian, pengabdian serta publikasi ilmiah dalam jurnal. Menjadi pemakalah seminar ilmiah sebanyak 16 kali dalam 5 tahun terakhir. Memiliki beberapa Hak Keayaan Intelektual (HKI) Paten, Paten Sederhana dan Hak Cipta.

B. Identitas Diri Prof. apt. Any Guntarti, M.Si.

Nama Lengkap : Prof. Dr. apt. Any Guntarti, M.Si
Jenis Kelamin : Perempuan
Jabatan Fungsional : Guru besar
NIY : 60960149
NIDN : 0502106302
Tempat dan Tanggal Lahir : Yogyakarta, 02 Oktober 1963
E-mail : any.guntarti@pharm.uad.ac.id
Nomor HP : 085868696923
Alamat Kantor : Fakultas Farmasi UAD Kampus 3
Yogyakarta
Nomor Telepon : 085868696923
SCOPUS ID : 56786400300
Web of Science Researcher ID : -
Sinta ID : 6032913
H-Indeks Scopus : 6
H-Indeks Google Scholar : 10

Biodata singkat dan Foto



Prof. Dr. apt. Any Guntarti, M.Sc. Lulus S1 di Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada tahun 1987, lulus S2 Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada tahun 2000, dan lulus S3 di Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada tahun 2017. Pada tahun 2001 dikukuhkan menjadi guru besar Bidang Ilmu Kimia farmasi. Aktif melakukan penelitian sejak 2012 dan berpengalaman dalam menulis dan mempublikasi karya ilmiah dalam jurnal. Pernah menjadi Narasumber dosen ahli Analisis dengan Gravimetri di Universitas Jendral Achmad Yani Yogyakarta. Menjadi pemakalah seminar nasional dan internasional dan sebagai narasumber dalam beberapa webinar ilmiah.