

GARIS BESAR POKOK PENGAJARAN

M.P. TEKNIK PEMISAHAN

4 SKS (2-2)

Tujuan Instruksional Umum

Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip dan membedakan berbagai teknik pemisahan meliputi ekstraksi, destilasi, kromatografi dan penggolongannya, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, , kromatografi pertukaran ion dan filtrasi gel serta menerapkan teknik pemisahan untuk memisahkan berbagai senyawa

Deskripsi Singkat

Mataajaran Teknik Pemisahan membahas prinsip pemisahan meliputi ekstraksi, destilasi, penggolongan kromatografi, kromatografi planar yaitukromatografi kertas dan lapis tipis, kromatografi kolom dengan mekanisme adsorpsi, partisi, pertukaran ion dan eksklusi, serta aplikasinkya

Instruktur/dosen

1. DR. Eti Rohaeti**
2. Ir.Elly Suradikusumah MS (K)
3. Wulan Tri Wahyuni SSi (K*/P)
4. Wina Y.Ssi MSi
5. Janti W. SSi
6. Asih Ssi

| Tujuan Instruksional Khusus: setelah mengikuti pokok bahasan, mahasiswa mampu | Pokok Bahasan & waktu | Subpokok Bahasan |
|---|--|---|
| Menjelaskan prinsip pemisahan, ekstraksi, destilasi, kromatografi serta contoh | Pendahuluan (1x100') | Prinsip umum Teknik pemisahan |
| Menjelaskan cara ekstraksi, destilasi, dan faktor yang perlu dipertimbangkan | Ekstraksi dan destilasi (1x100") | Ekstraksi padat-cair, ekstraksi cair-cair, destilasi |
| Menjelaskan prinsip kromatografi, menyebutkan dan membedakan golongan kromatografi serta contoh aplikasinya | Prinsip dan penggolongan kromatografi (1 x 100 `) | <ul style="list-style-type: none"> -Pengertian kromatografi -Sistem kromatografi (fasa diam, fasa gerak, eluen, elusi, kromatogram - Penggolongan kromatografi -Aplikasi kromatografi |
| Menjelaskan sistem kromatografi kertas dan identifikasinya | Kromatografi Kertas (1x 100 `) | <ul style="list-style-type: none"> -Sistem kromatografi planar -Penjenuhan ruang kromatografi -Deteksi/visualisasi kromatogram |

Menjelaskan sistem, menyebutkan dan membedakan adsorben, menyebutkan berbagai mekanisme yang mungkin terlibat pada KLT, menjelaskan cara pembuatan lapis tipis, cara identifikasi, membedakan KLT analitik dan KLT preparatif, menjelaskan tujuan KLT preparative, dan memberikan contoh aplikasi KLT untuk berbagai komponen.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
(2 x 100)

- Sistem kromatografi
- Penjenuhan Ruang kromatografi
- Adsorben dan modifikasinya
- Mekanisme
- Penyiapan Lapis Tipis
- KLT analitik & KLT preparatif serta pemantauannya
- Deteksi/visualisasi kromatogram
- KLT dua dimensi
- Aplikasi KLT

| | | |
|---|--|---|
| <p>Menjelaskan sistem kromatografi kolom dan membedakan mekanisme dan penerapan mekanisme., menjelaskan cara pengepakan kolom, menjelaskan gangguan yang dapat terjadi selama elusi, menjelaskan cara memantau hasil kromatografi</p> | <p>Kromatografi Kolom (1 x 100 `)</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Sistem kromatografi dan tekniknya - Mekanisme adsorpsi, partisi, filtrasi, dan pertukaran ion serta penerapannya - Pengepakan kolom - Sistem elusi dan gangguannya - Pemantauan hasil/eluat -Pengumpulan fraksi dan penentuan jumlah fraksi dengan cara Kromatografi kertas, KLT, atau spektrometri |
|---|--|---|

| | | |
|---|--|--|
| <p>Mahasiswa mampu menjelaskan pengertian partisi dan hubungannya dengan koefisien distribusi zat, menjelaskan penerapan partisi pada kolom dan kertas,</p> <p>Mahasiswa mampu menjelaskan sifat adsorben , sifat eluen, sistem elusi, menyebutkan sifat kromatografi zat, serta reaksi samping yang dapat terjadi ketika kromatografi., menyebutkan adsorben dan eluen yang bisa dipilih untuk golongan zat tertentu, serta menjelaskan contoh aplikasi kromatografi adsorpsi</p> | <p>Kromatografi partisi dan Adsorpsi (2 ½ x 100)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Pengertian dan contoh Partisi -Koefisien distribusi -Kromatografi partisi pada kertas -Jenis dan sifat adsorben - Jenis dan sifat eluen/pelarut -Sistem elusi - Faktor yang mempengaruhi kelakuan kromatografi zat - Reaksi samping pada kromatografi |
| <p>Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip eksklusi, memberikan contoh saringan molekul serta kegunaannya,</p> | <p>Kromatografi filtrasi / eksklusi (1 ½ x 100)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Eksklusi dan limit eksklusi - Saringan molekul dan jenisnya - Eluen dan sistem elusi - aplikasi kromatografi eksklusi |

| | | |
|--|--|--|
| <p>Mahasiswa mampu menjelaskan prinsip pemisahan zat dengan cara pertukaran ion, menyebutkan dan memilih jenis resin penukar ion, menjelaskan dan memilih sistem elusi, menjelaskan hal yang harus diperhatikan pada penyiapan kolom penukar ion, menjelaskan urutan keluarnya ion dari kolom.</p> | <p>Kromatografi pertukaran ion (3 x 100)</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Partikel bermuatan - Penukar anion dan penukar kation - Eluen dan sistem elusi - Kesetimbangan pertukaran ion - Penyiapan kolom - Kromatografi penukar kelat - aplikasi kromatografi pertukaran ion |
|--|--|--|

Pustaka:

1. Stahl, E. 1990. Thin Layer Chromatography. Springer Verlag, New York.
2. Lederer, E & Lederer M. 1978. Chromatography. Elsevier Public.Co. London.
3. Meloan CE.1999. Chemical Sperations. Principles, technique, and experiment. New York. John Willey & Sons.
4. Journal of Chromatography . 1995-2011

SATUAN ACARA PENGAJARAN

M.P.TEKNIK PEMISAH

Media pengajaran: LCD, Laptop/CPU, wireless.

| Minggu | Pokok Bahasan | Dosen | Minggu | Pokok Bahasan | Dosen |
|---------------|--|--------------|---------------|---|--------------|
| 1 | Pendahuluan & Kontrak Kuliah | ES/ER | 8 | Kromatografi partisi | ES/ER |
| 2 | Ekstraksi dan destilasi | ES/ER | 9 | Kromatografi adsorpsi | ES/ER |
| 3 | Prinsip dan penggolongan kromatografi | ES/ER | 10 | Kromatografi adsorpsi dan filtrasi gel | ES/ER |
| 4 | Kromatografi kertas | ES/ER | 11 | Kromatografi Filtrasi gel | ES/ER |
| 5 | Kromatografi lapis tipis | ES/ER | 12 | Kromatografi pertukaran ion | ES/ER |
| 6 | Kromatografi lapis tipis | ES/ER | 13 | Kromatografi pertukaran ion | ES/ER |
| 7 | Kromatografi kolom | ES/ER | 14 | Kromatografi pertukaran ion | ES/ER |

KEGIATAN AKADEMIK

- Kuliah
- Praktikum
 - ◆ Kehadiran 100%
 - ◆ Wajib mengganti waktu praktikum yang tidak dihadiri
 - ◆ Melapor pada Dosen praktikum untuk mengatur pengganti
 - ◆ Membuat rencana kerja dan laporan pada buku tulis
 - ◆ menyerahkan laporan pada minggu praktikum berikutnya
 - ◆ Penilaian: Kerja (K) Laporan (L), Quiz (q)
 - ◆ membawa alat dan sampel tertentu

- Ujian

UTS dan UAS bila syarat kehadiran dipenuhi

U.Praktikum : belum pasti diadakan

- Quiz materi kuliah, mendadak, pada jadwal kuliah

PENILAIAN

$$NA = 0,2UTS + 0,2 UAS + 0,2 QP + 0,2LP + 0,2KP$$

Bila ada Quiz materi kuliah:

15% dari nilai Quiz ditambahkan pada UTS/UAS

Bila ada ujian praktikum (bisa Lab/teori praktikum):

$$NA = 0,2UTS + 0,2 UAS + 0,1 QP + 0,15LP + 0,2KP + 0,15UP$$

HURUF MUTU (HM) $A \geq 75,0$


AB

$B \geq 65,0$

BC

$C \geq 55,0$

PENDAHULUAN

Penentuan kadar komponen  Kesalahan/eror

Sumber kesalahan: Sampling, pemisahan, dll

Pemisahan (Separasi)

Proses pengambilan senyawa yang diinginkan (senyawa target) dari senyawa lain dalam sampel, yang mungkin bereaksi serupa dengan senyawa target dan mengganggu analisis

Contoh

Menentukan adanya telur busuk dalam tepung telur Asam asetat


Telur Segar : asam asetat, asam propionat, asam butirat

Telur busuk : asam asetat, asam propionat, asam butirat

Asam laktat

Asam laktat menjadi **pembeda**

Asam laktat ditentukan dengan titrasi

asam asetat, asam propionat, asam butirat juga bereaksi dengan titran  Asam laktat dipisah dari 3 asam lainnya

Cara pemisahan

Sampel ditambah dietil eter  Asam laktat larut, asam lainnya tidak

 Hanya asam laktat yang bereaksi dengan titran

Tepung telur



Clean up

- Salah satu tahap perlakuan terhadap sampel sebelum pengukuran
- Membersihkan senyawa target dengan menghilangkan senyawa lain yang mengganggu

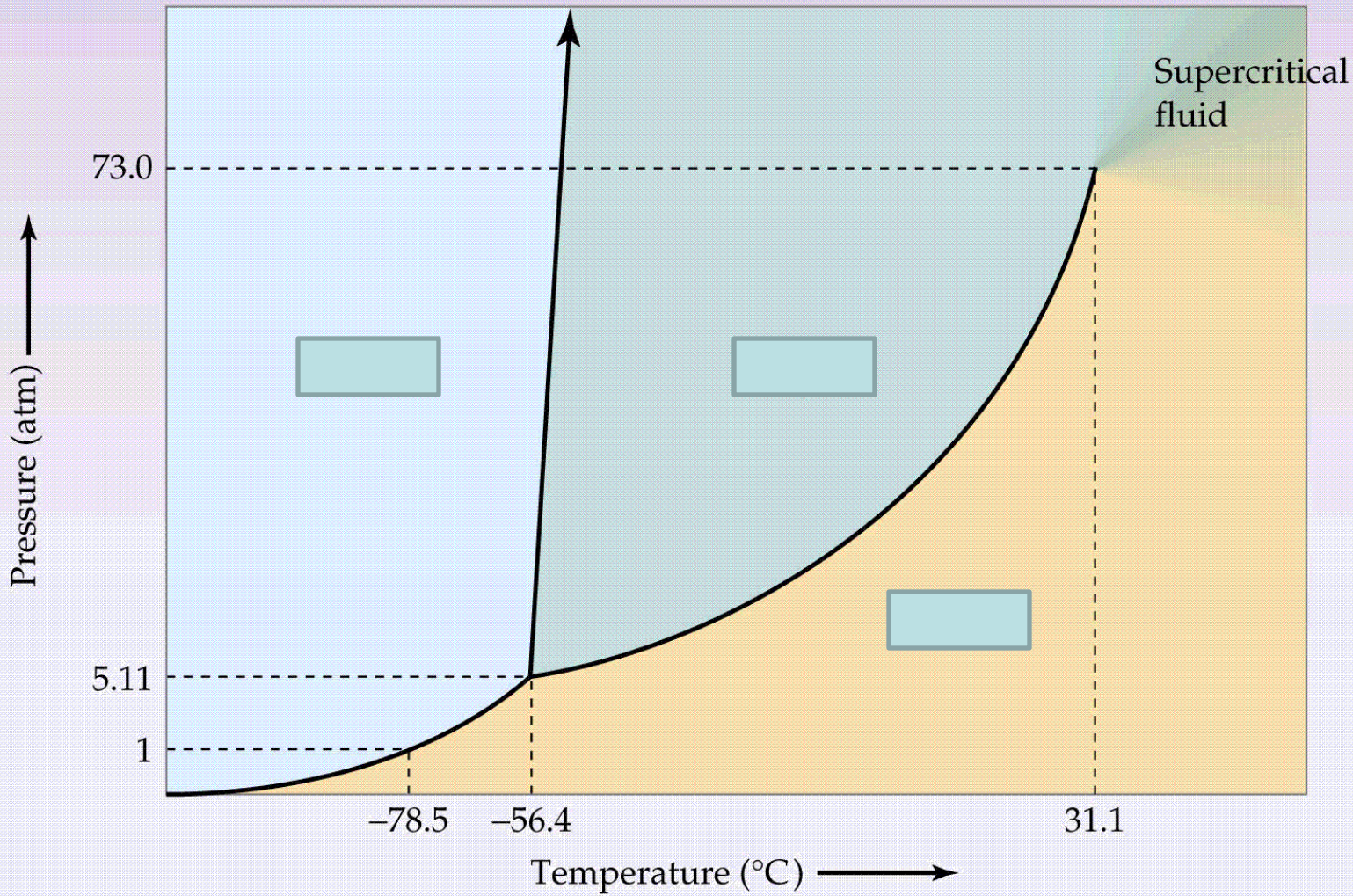
Contoh

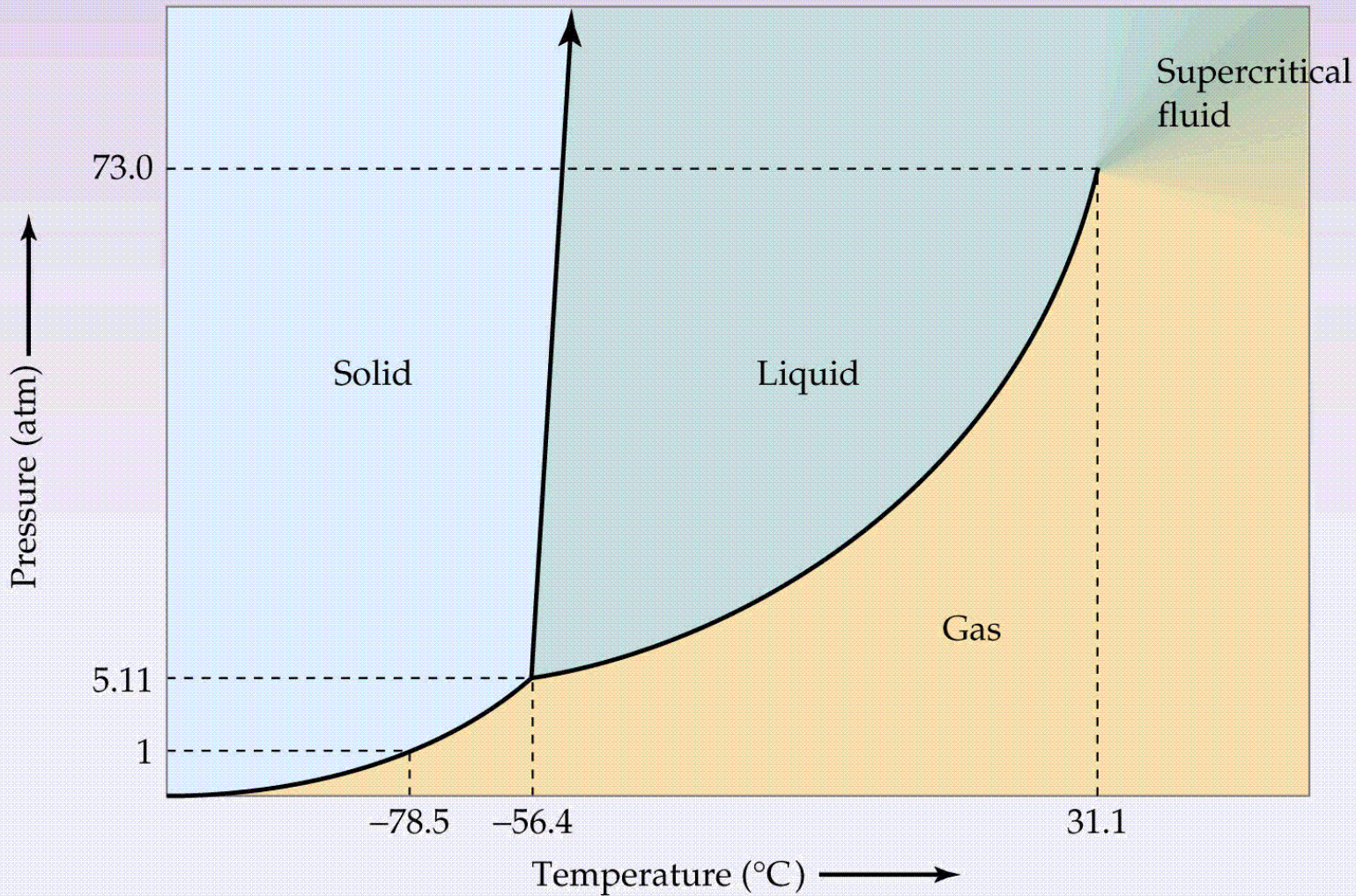
Penentuan pestisida dari sayuran/buah

- Pestisida diekstraksi dari sayuran
- lemak dan lilin ikut terekstraksi → Mengganggu analisis
- Lemak dan lilin dihilangkan/dikuradari ekstrak pestisida
- Dengan cara ekstraksi/kolom dsb → Ekstrak dibersihkan

Cara /Teknik Pemisahan

- 1, Pemisahan yang melibatkan perubahan f asa
- 2, Pemisahan yang melibatkan ekstraksi
- 3, Pemisahan yang melibatkan kromatografi
- 4, Pemisahan yang melibatkan resin penukar ion
- 5, Pemisahan yang melibatkan medan listrik
- 6, Pemisahan yang melibatkan membran
- 7, Pemisahan yang melibatkan berbagai sifat / teknik





Pemisahan yang melibatkan perubahan fasa

| Bahan | Perubahan fasa | Kondisi | Metode |
|--------|----------------|--------------|--|
| | Padat - gas | Tanpa vakum | Volatilisasi |
| | | Dengan vakum | Liofilisasi, Freeze dry |
| | | | |
| Sampel | Padat -Cair | Tanpa vakum | Zona leleh |
| | | | |
| | | | |
| | Cair - gas | Tanpa vakum | Distilasi(sederhana, azeotrop,ekdtraksi, ,steam, pelarut tak campur) |
| | | Dengan vakum | Distilasi vakum, distilasi molekular, sublimasi |

Volatilisasi

Volatilisasi : perubahan sebagian atau seluruh bagian cairan atau padatan menjadi gas

Cara:

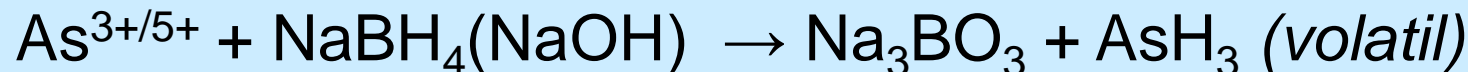
1. Pemanasan langsung
2. Menggunakan zat yang lebih kuat
asam kuat untuk menggeser asam lemah
basa kuat menggeserbasa lemah
3. oksidasi
4. reduksi

Contoh

- Penentuan Kadar air
- Penentuan Kadar Merkuri di lingkungan



- Penentuan Kadar As dan Se dalam pangan



EKSTRAKSI

Ekstraksi komponen:

Pengambilan komponen dari contoh asalnya (biasanya dengan menggunakan pelarut tertentu dan cara tertentu)

Faktor pertimbangan:

- Sifat komponen

- Kepolaran → Pemilihan pelarut

- Ketahanan terhadap suhu → Pemilihan cara (tanpa atau dengan pemanasan)

- Sifat pelarut

- Kepolaran → Komponen polar larut dalam pelarut polar

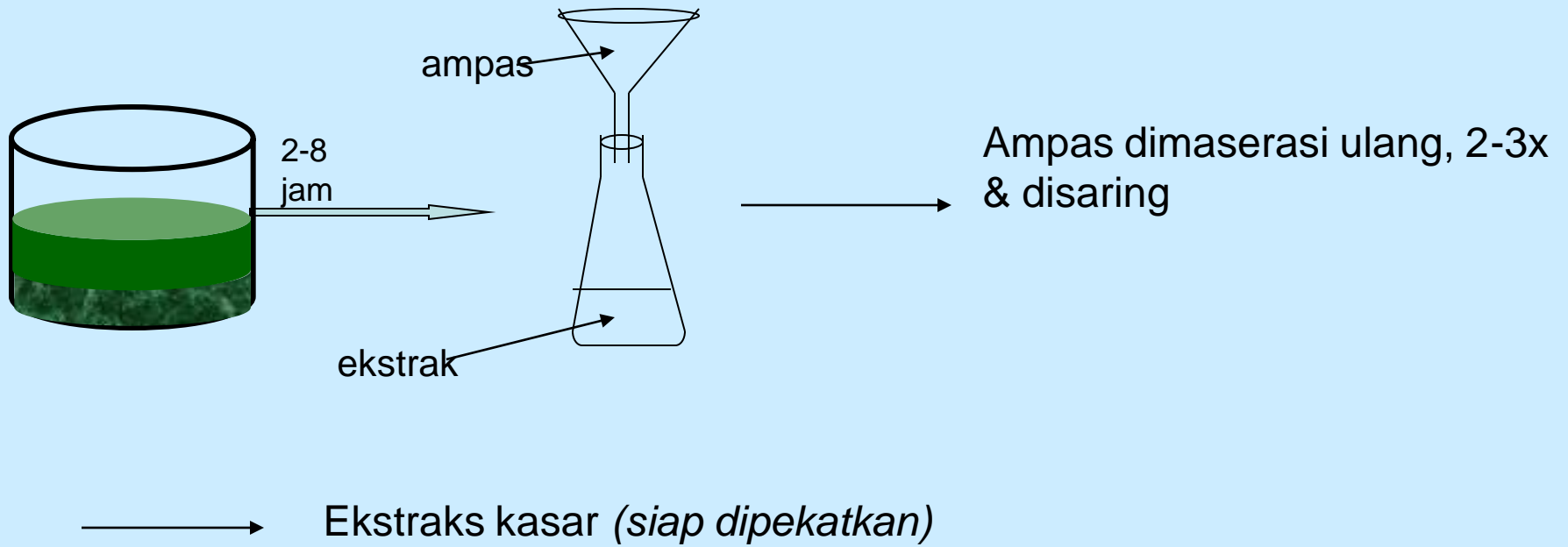
- Titik didih → suhu ekstraksi & waktu penguapan

- Daya melarutkan → Dipilih yang tinggi

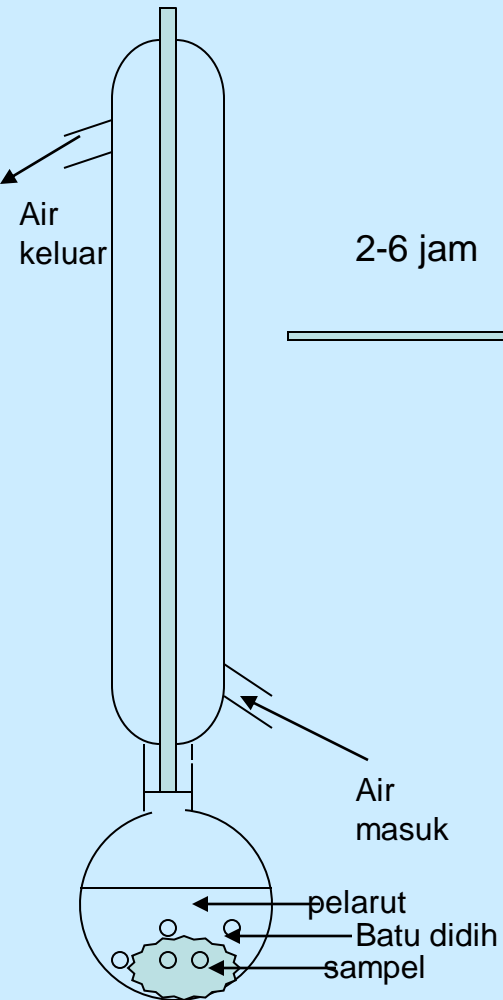
Cara ekstraksi

- Tanpa pemanasan
 - Untuk komponen yang tidak tahan dan yann tahan terhadap suhu tinggi
 - Cara: Maserasi (perendaman), sonikasi
- Dengan pemanasan
 - Untuk komponen yang tahan terhadap suhu tinggi
 - Cara: penggodogan (dengan atau tanpa refluks), sokslet
- Penyulingan (destilasi)
 - Untuk komponen yang mudah menguap (misal: minyak cengkeh)

▪ Maserasi



▪ Penggodogan (dengan refluks)

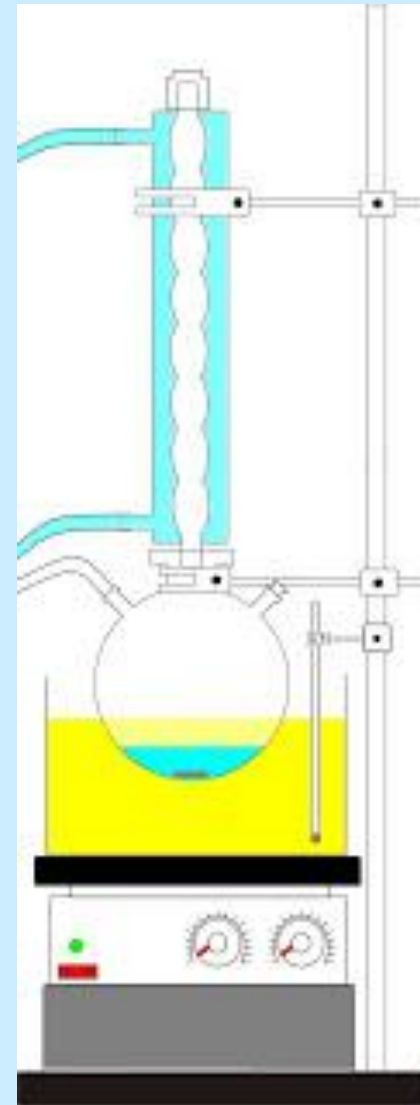


2-6 jam

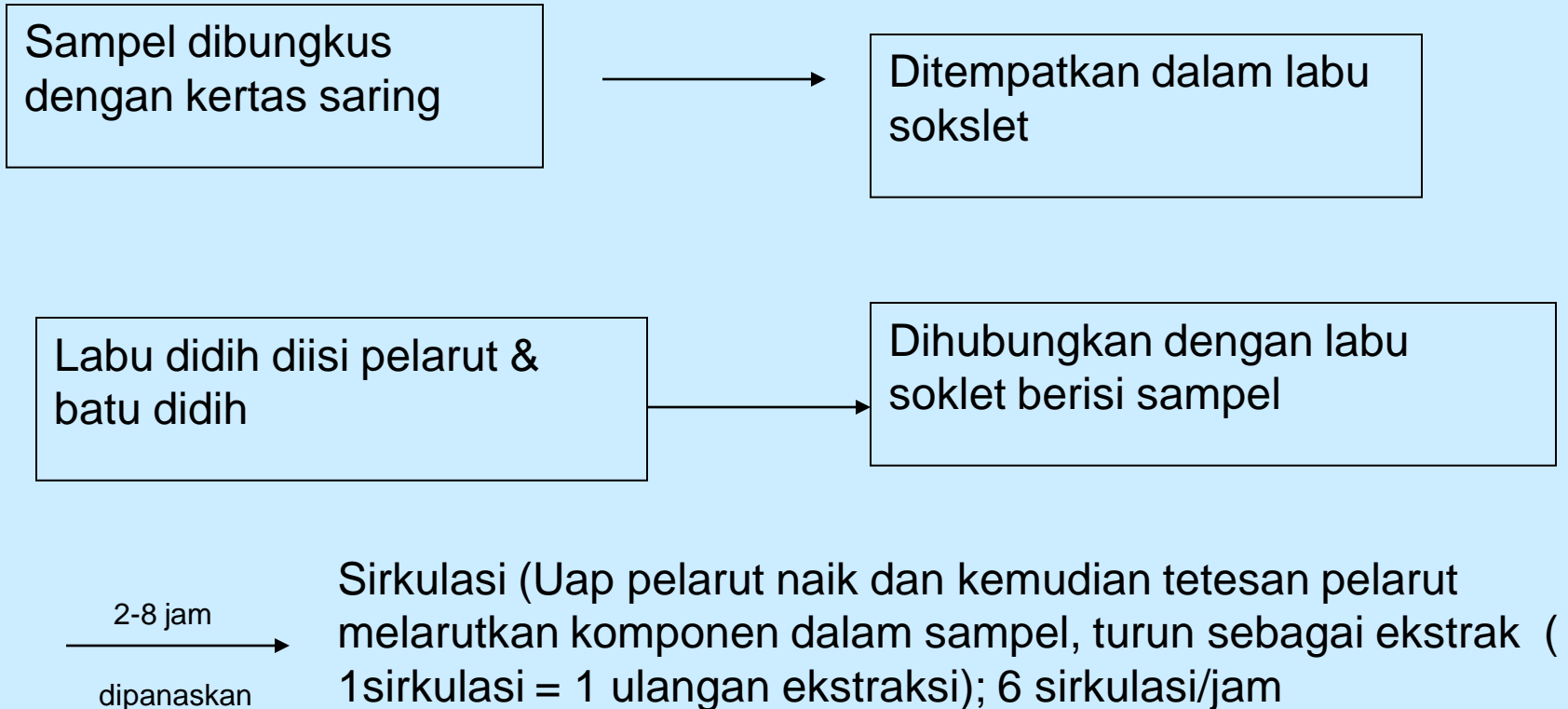
Disaring, ampas digodog ulang
, disaring dst

Ekstrak kasar siap dipekatkan

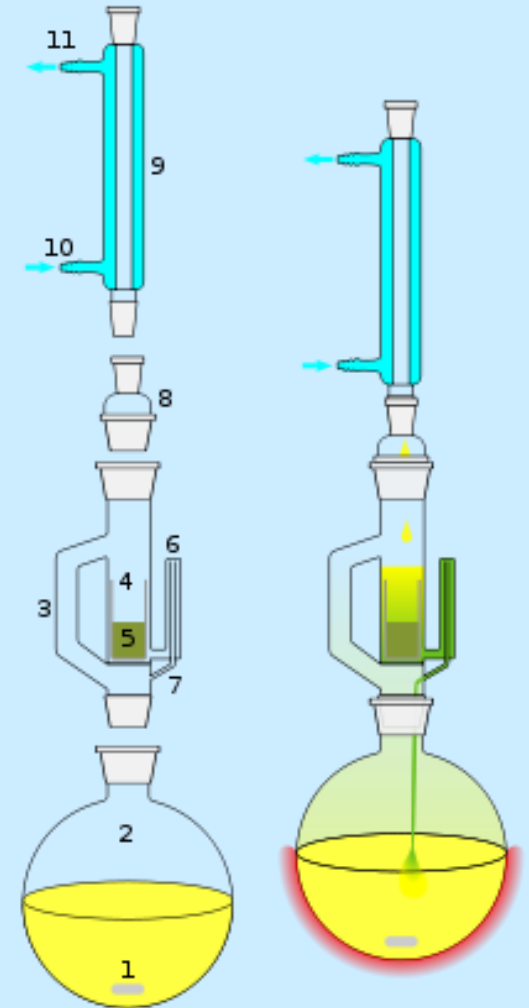
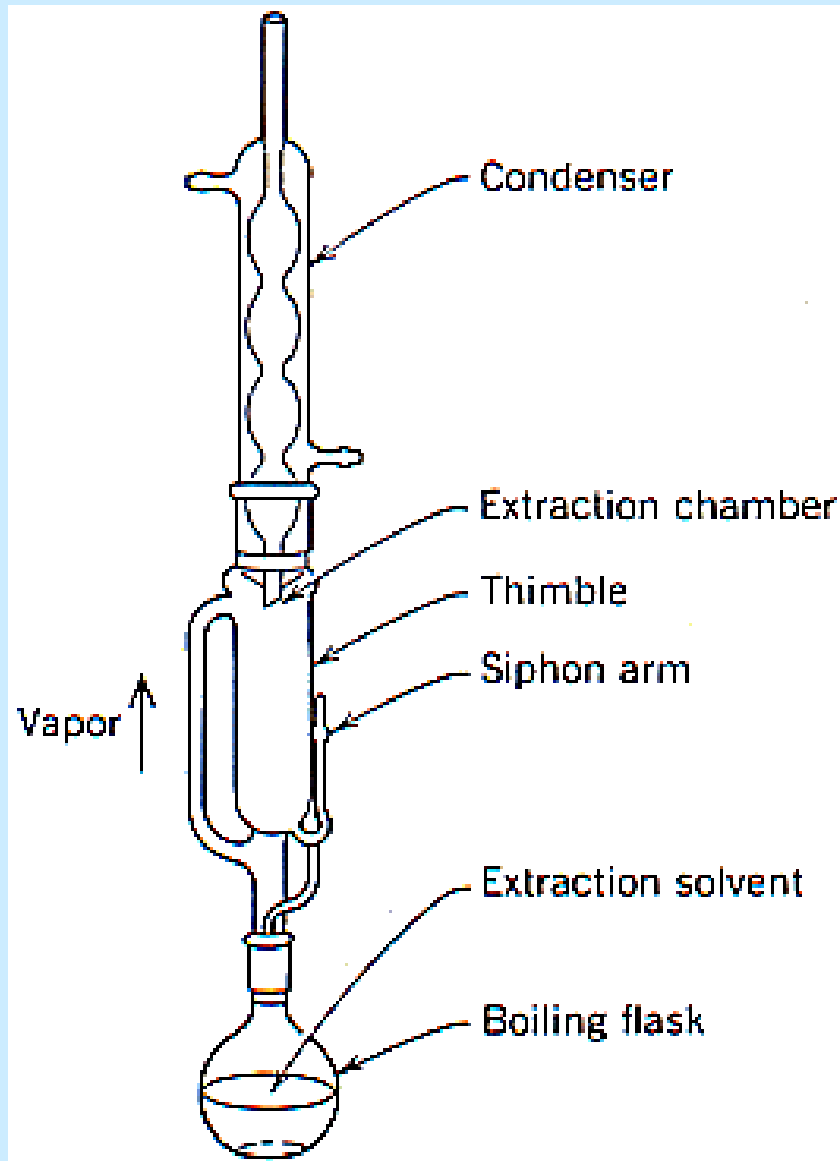
Refluks



▪ Soksletasi



Soksletasi



Perbandingan metode ekstraksi

| Sifat | Cara maserasi | Pendggodogan tanpa refluks | Penggodogan dengan refluks | Soskletasi |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| Suhu | Suhu ruang | $T > T$ ruang | $T > T$ ruang | $T > T$ ruang |
| komponen | Tahan panas & tidak tahan panas | Tahan panas | Tahan panas | Tahan panas |
| Kemungkinan rusaknya komponen | Sangat kecil | Mungkin ada | Mungkin ada | Mungkin ada |
| Penggunaan pelarut | Boros (3 ulangan = 3v) | Lebih boros dari maserasi (>>3v) | Sama dengan maserasi (3v) | Paling hemat (12 ulangan, v) |
| Kepekatan ekstrak kasar | encer | Lebih pekat dari hasil maserasi | Lebih pekat dari hasil maserasi | Paling pekat (ulangan banyak, pelarut sedikit) |
| Rendemen | sedikit | >maserasi | > maserasi | >>> maserasi |

▪ Pemekatan ekstrak

- Perlu dihindarkan rusaknya komponen → suhu tinggi dihindari
- Cara: penguapan biasa; rotavapor

Keuntungan penggunaan rotavapor dibanding penguapan biasa:

- Suhu rendah (adanya pompa vakum, tekanan udara rendah, TD larutan turun; pelarut menguap pada suhu \ll TD normal) → kemungkinan rusaknya komponen kecil sekali
- Penguapan cepat (labu didih berisi ekstrak berputar; luas permukaan bertambah; penguapan lebih cepat)
- Pelarut relatif murni diperoleh kembali (uap pelarut didinginkan di kondensor, mengembun, jatuh ke labu penampung)

Perhatikan: saat pemekatan dengan rotavapor, labu ekstrak harus tetap terendam dalam air pada wadah yang berthermostaat.



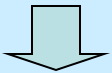
Rotary evaporator



Freeze Dryer

Ekstraksi Cair-cair

kocok



didiamkan



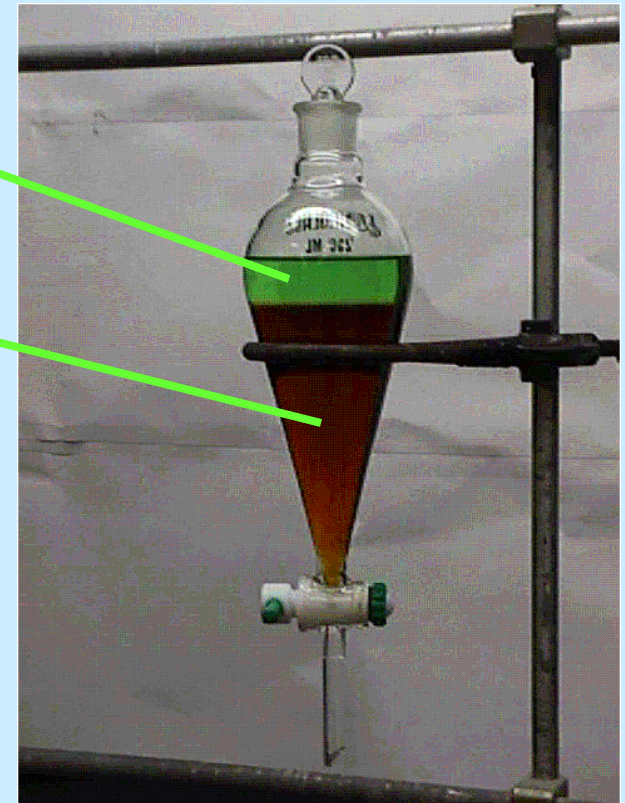
Cairan terpisah



Densitas tinggi/pekat
akan berada di bawah

Densitas rendah

Densitas tinggi



DISTILASI

DISTILASI

- Proses pembentukan uap dari suatu cairan dengan memanaskan cairan dalam suatu vessel kemudian mengembungkan uapnya dan menampung embunnya dalam vessel lain
- Cara paling mudah untuk memisahkan sejumlah besar senyawa tahan panas

Tekanan Uap

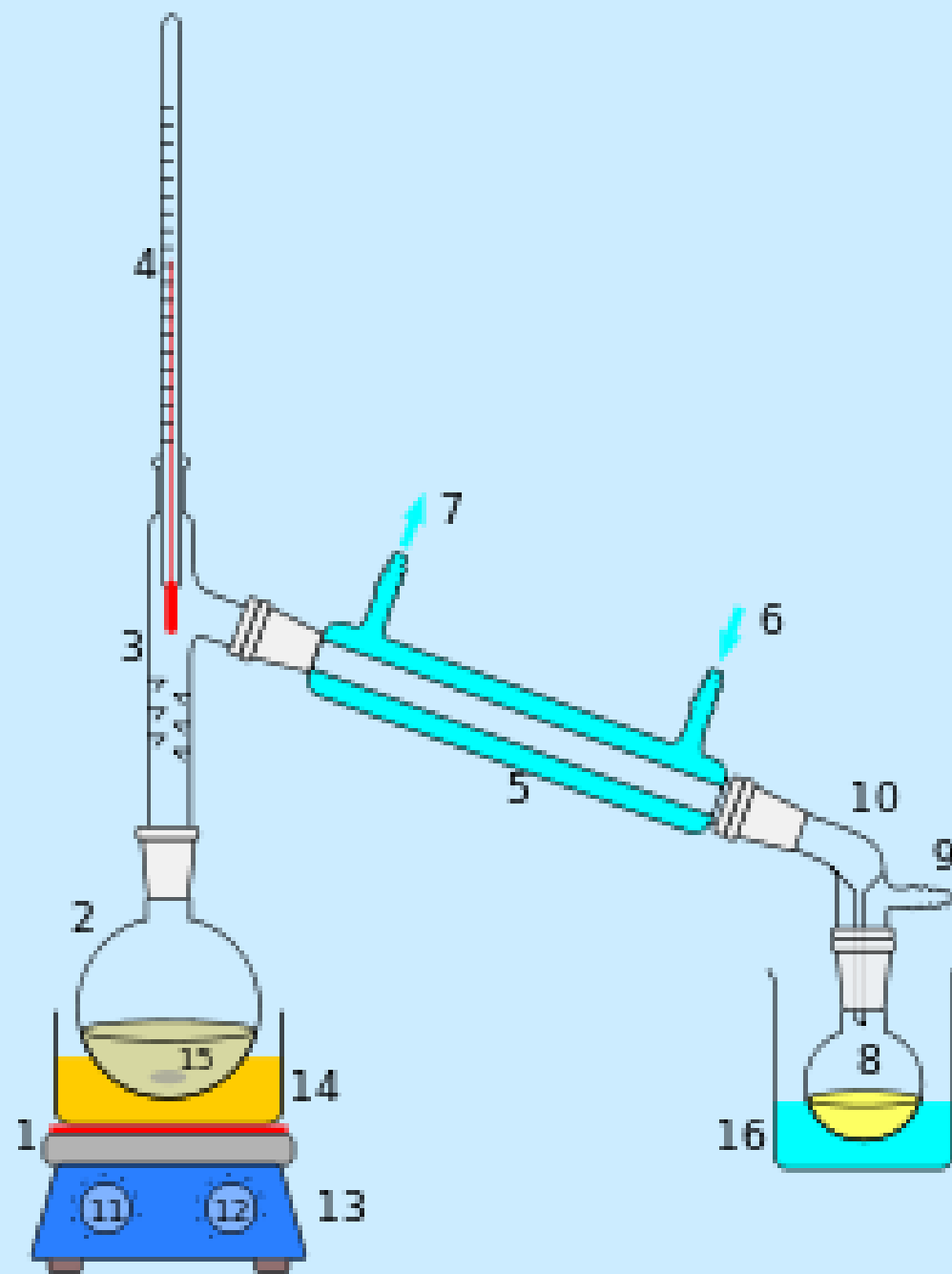
Molekul bergerak kontinu: dalam fasa gas bergerak ratusan mil/jam

→ jutaan tubrukan/ detk terjadi

antarmolekul

dengan suatu permukaan → tekanan

Pada cairan, molekul bergerak konstan beberapa molekul akan punya cukup energi untuk ke permukaan → lepas dari permukaan → menghasilkan tekanan uap (pada suhu ruang, air: 23 mmHg; etanol 63 mmHg, heksana 220 mmHg)



1: A heating device

2: Still pot

3: Still head

4: Thermometer/Boiling point temperature

5: Condenser

6: Cooling water in

7: Cooling water out

8: Distillate/receiving flask

9: Vacuum/gas inlet

10: Still receiver

11: Heat control

12: Stirrer speed control

13: Stirrer/heat plate

14: Heating (Oil/sand) bath

15: Stirring means e.g.(shown), [boiling chips](#) or mechanical stirrer

16: Cooling bath.

DISTILASI SEDERHANA

Bahan (cairan) dipanaskan → menguap → didinginkan →
diembunka → cairan → ditampung

Contoh

Pemisahan air dari garam dalam air laut

.Air laut (dalam wadah) dipanaskan → air menguap,

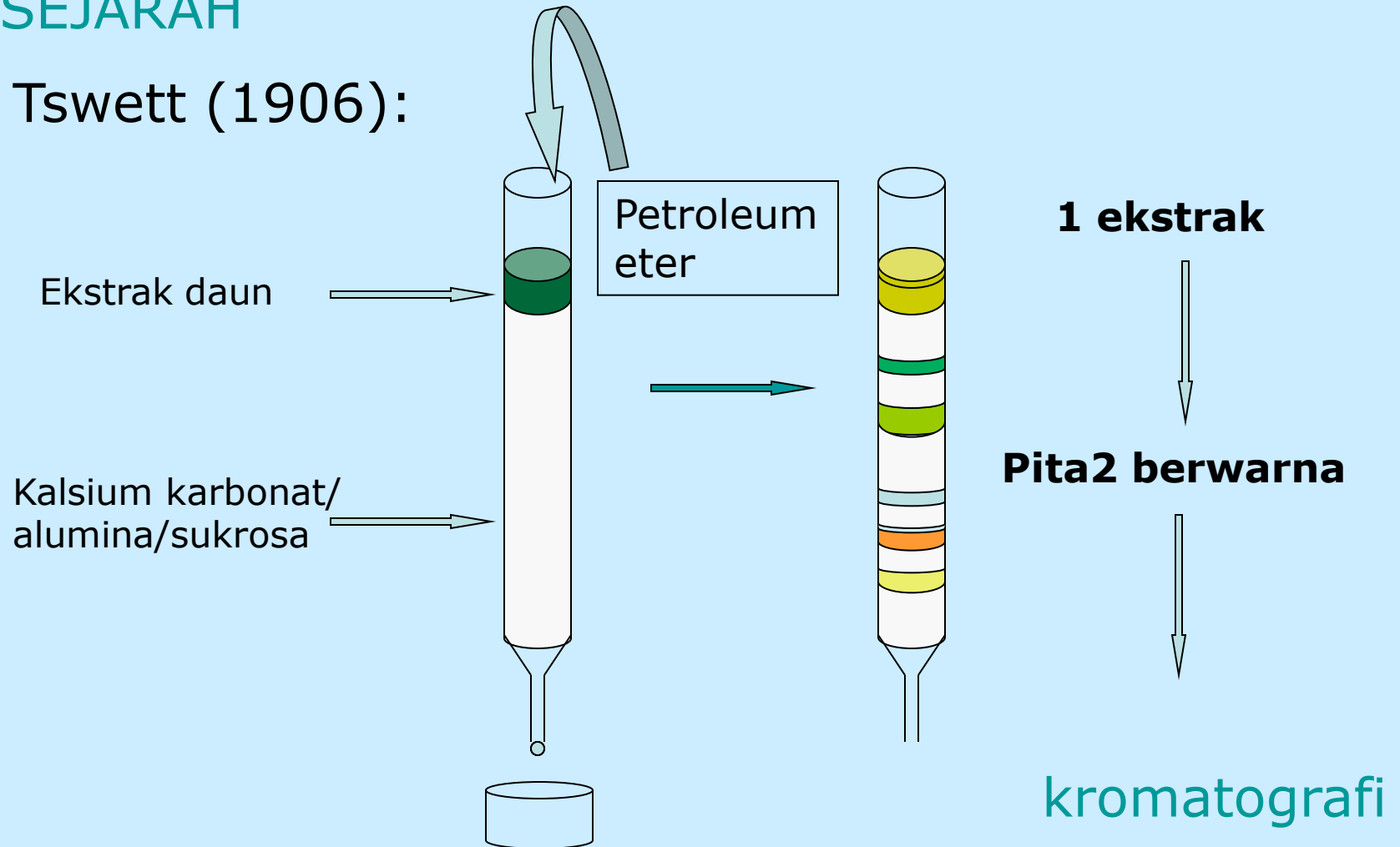
garam tidak menguap. → Uap air dilewatkan ke kondensor

→ mengembun (ditampung)

KROMATOGRAFI

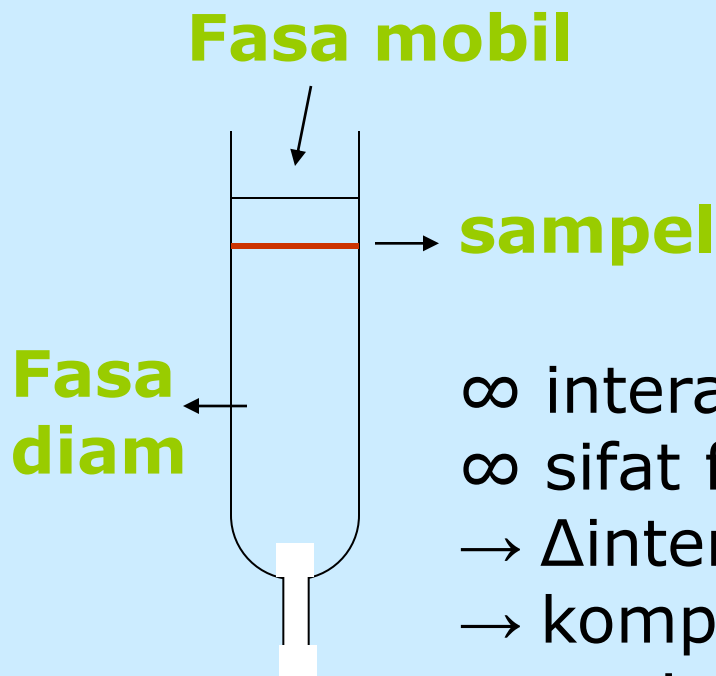
SEJARAH

Tswett (1906):



DEFINISI

Kromatografi: pemisahan komponen dalam contoh dengan distribusi komponen komponen pada dua fasa yang tidak saling bercampur (fasa diam dan fasa gerak)



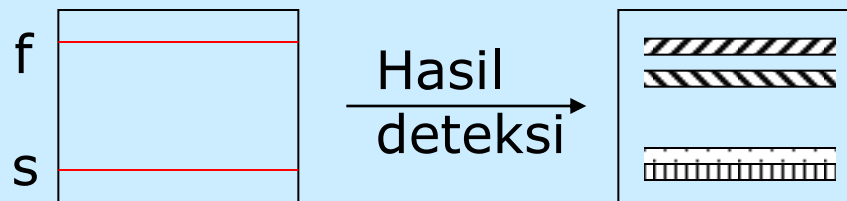
- ∞ interaksi dgn fasa diam dan fasa mobil
- ∞ sifat fisik & sifat kimia komponen
- Δ interaksi → Δ migrasi
- komponen terpisah ~
peningkatan interaksi dg fasa mobil

KROMATOGRAFI

- Pemisahan komponen
- Identifikasi → perlu standar
- Planar : kertas, KLT
 $r_f \sim$ identifikasi

KLT - analitik

- Preparatif → fraksinasi



Deteksi dgn UV → bisa langsung

Deteksi dgn pereaksi → hanya pd sebagian lapisan

Fraksi → keruk → larutkan → pekat

KLASIFIKASI KROMATOGRAFI

❖ Berdasar fasa mobil dan fasa diam

| Fasa diam | Fasa mobil | Kromatografi |
|-----------|------------|--------------|
| padat | cair | LSC |
| | gas | GSC |
| cair | cair | LLC |
| | gas | GLC |

❖ Berdasar interaksi

Kromatografi Adsorpsi

Kromatografi Partisi

Kromatografi Pertukaran ion

Kromatografi Permeasi/filtrasi → eksklusi

❖ Berdasar bentuk ruang penyangga

Kromatografi planar: K.Kertas; K.Lapis tipis

Kromatografi kolom: manual; HPLC, GC

TUJUAN ANALISIS

- Kualitatif → ~standar

Parameter: R_f (planar)
 t_R (kolom)

- Kuantitatif

Planar : densitometri, spektrometri
Kolom : luas kurva

KEGUNAAN

- Analitis → identifikasi komponen
- Preparatif → bagian dari isolasi & pemurnian komponen
- Pemilihan eluen untuk tahap kromatografi selanjutnya

▶ KROMATOGRAFI PLANAR

- Sistem kromatografi
- Penjenuhan ruang kromatografi
- Kromatografi kertas
- Deteksi kromatografi
- Kromatografi dua dimensi
- Kromatografi Lapis Tipis
- Aplikasi kromatografi planar

➤ SISTEM KROMATOGRAFI

- Fasa diam : kertas
lapis tipis
- Fasa gerak : tunggal, campuran
- Jarak start-front
- Waktu
- Parameter identifikasi : R_f

➤ PENJENUHAN RUANG KROMATOGRAFI

Ruang kromatografi: harus jenuh dengan uap eluen

Cara penjenuhan

- ◆ Ruang diisi eluen dan tertutup, selama 10-25 menit sebelum elusi
- ◆ selama elusi ruang tetap tertutup rapat

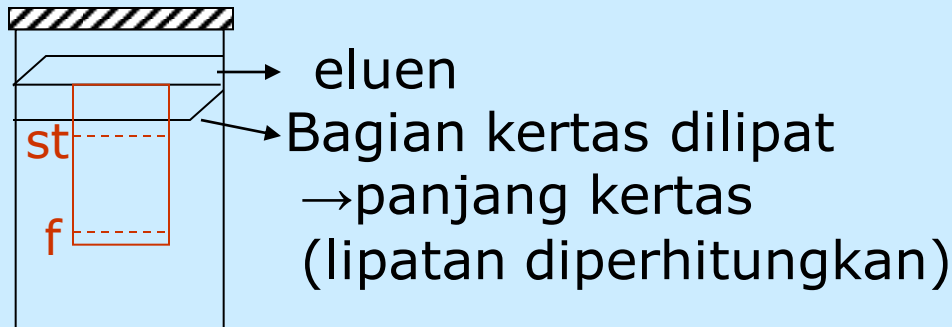
Tujuan penjenuhan

- ◆ Melancarkan gerak eluen dan komponen selama elusi

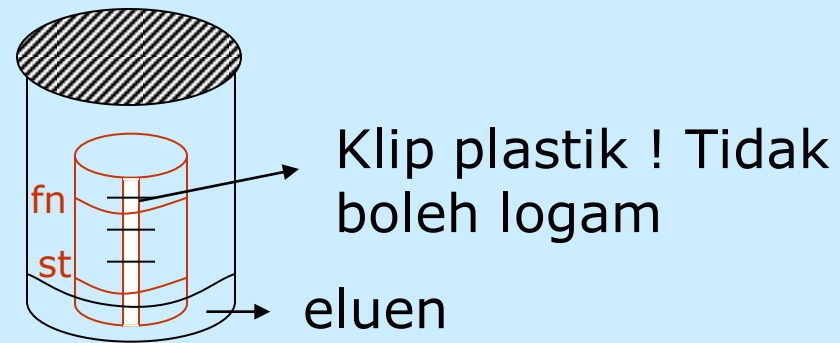
➤ KROMATOGRAFI KERTAS

- Mekanisme : adsorpsi (pd kertas)
Partisi (air pada kertas-eluen)
- Gravitasi?
- Arah : naik (ascending chr)
Turun (descending chr)

descending

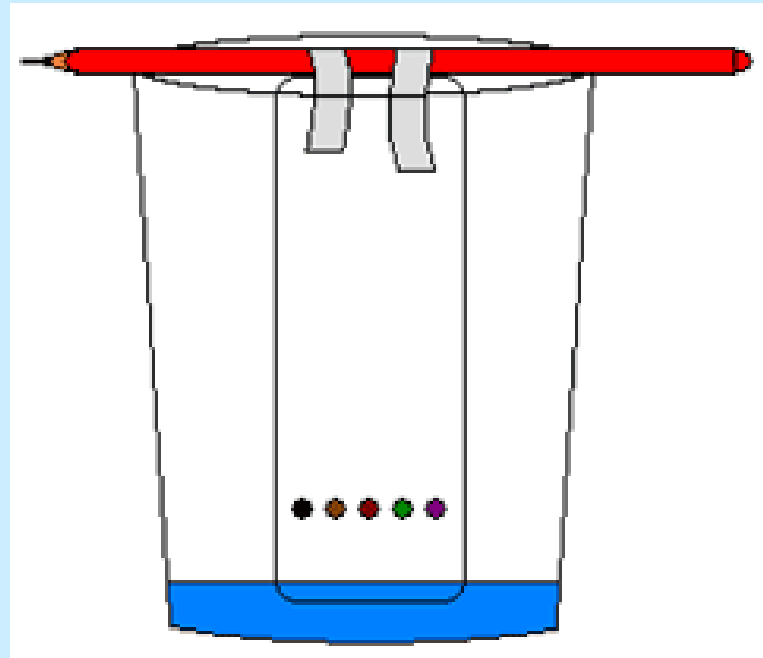
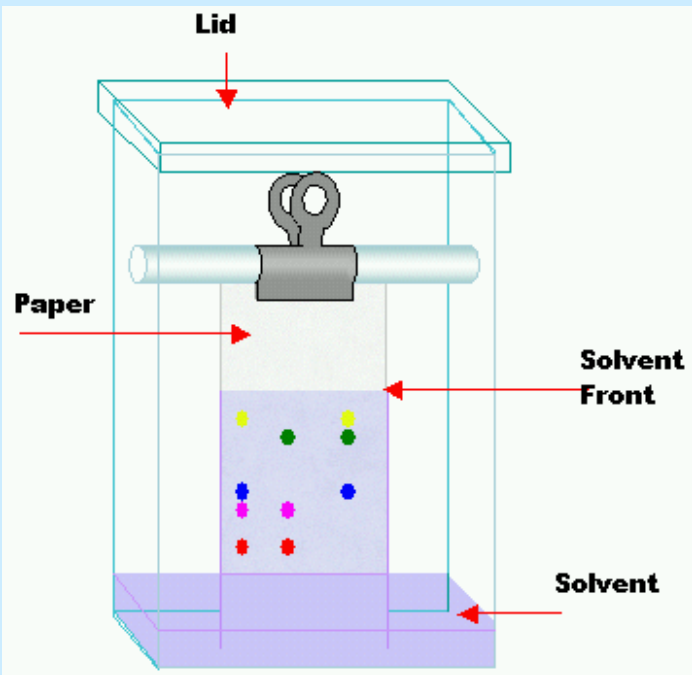


ascending



Benang berwarna?,
Benang putih

! Ukuran spot pada start : ≤ 3 mm





Pure cellulose grades Whatman.

A medium thickness paper (0.34 mm) for general chromatography and electrophoresis.

Flow rate is 130 mm/30 min.

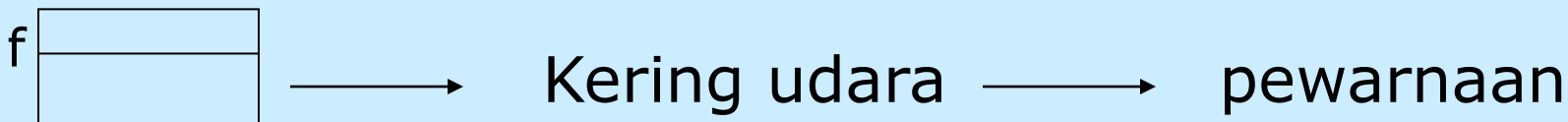
Grade 1 Chr: Thickness 0.18mm. Flow rate (water) 130mm/30min. for general analytical separations

Grade 2 Chr: Thickness 0.18mm. Flow rate 115mm/30 min. for higher resolution applications.
for optical or radiometric scanning.

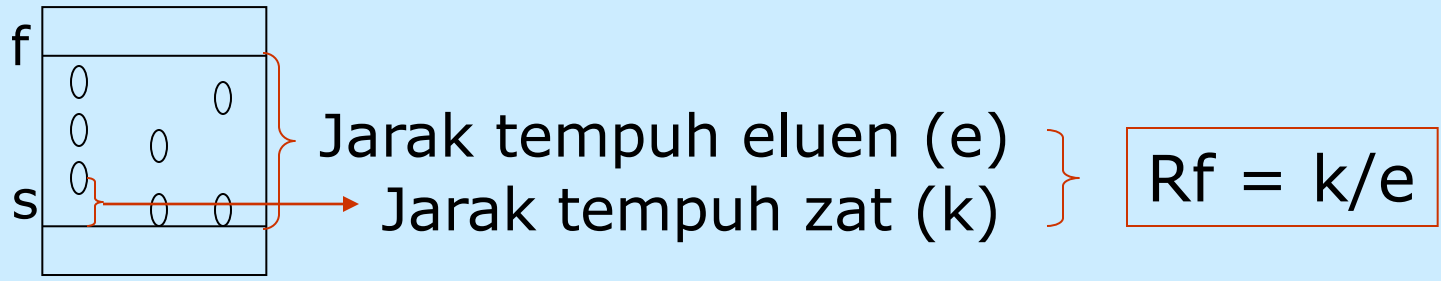
Grade 4 Chr: Thickness 0.21mm. Flow rate 180mm/30 min. Fastest thin paper.

Recommended for routine and/or repetitive chromatography when loadings are relatively low
dst

➤ DETEKSI KROMATOGRAFI

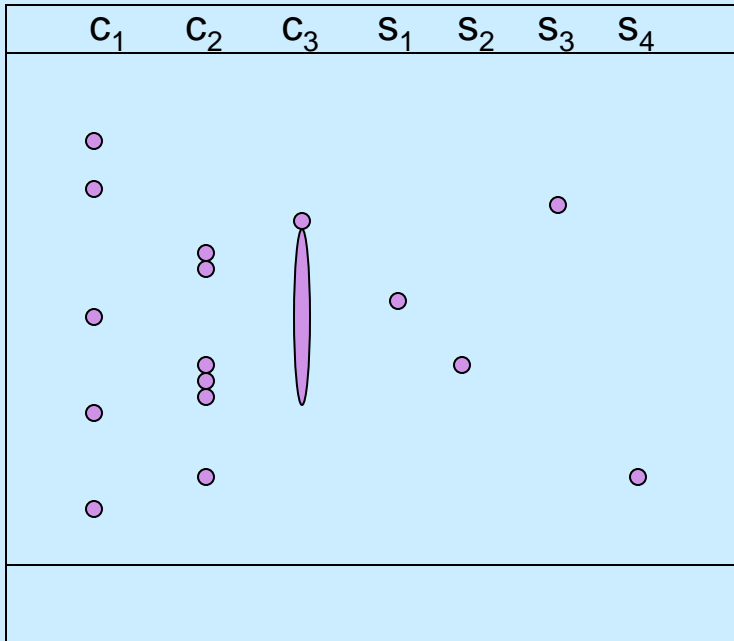


- Semprot (arah ke atas)
- Celup
- Diuapi
- Gabungan cara



Latihan

Tiga contoh yang merupakan campuran beberapa komponen dipisahkan dengan kromatografi kertas, dengan eluen metanol-kloroform (8:2) dan diperoleh kromatogram seperti tampak pada gambar.

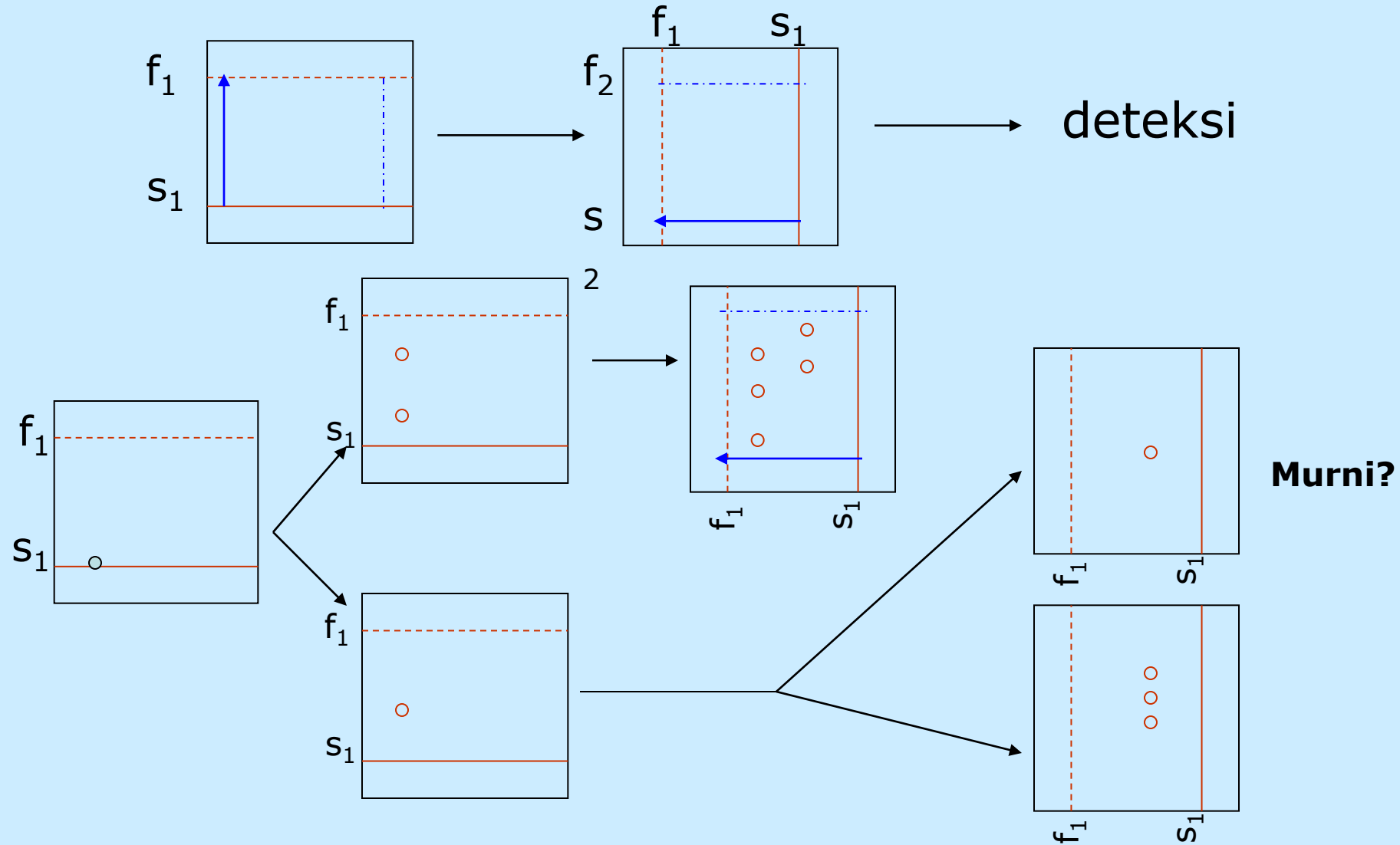


1. Apakah eluen yang digunakan bagus untuk ketiga contoh tersebut? Jelaskan
2. Jika eluen tersebut tidak cocok, apa yang harus anda lakukan? jelaskan
3. Jika jarak start-front 18 cm, berapakah R_f tiap komponen pada ketiga contoh
4. Bagaimanakah urutan kepolaran komponen dalam contoh? No 1 adalah spot terbawah dst. Jelaskan.
5. Jika eluennya diganti dengan kloroform-metanol (2:1), apakah urutan letak spot berubah? jelaskan

6. Menurut anda, mungkinkah yang dipisahkan adalah senyawa protein? jelaskan

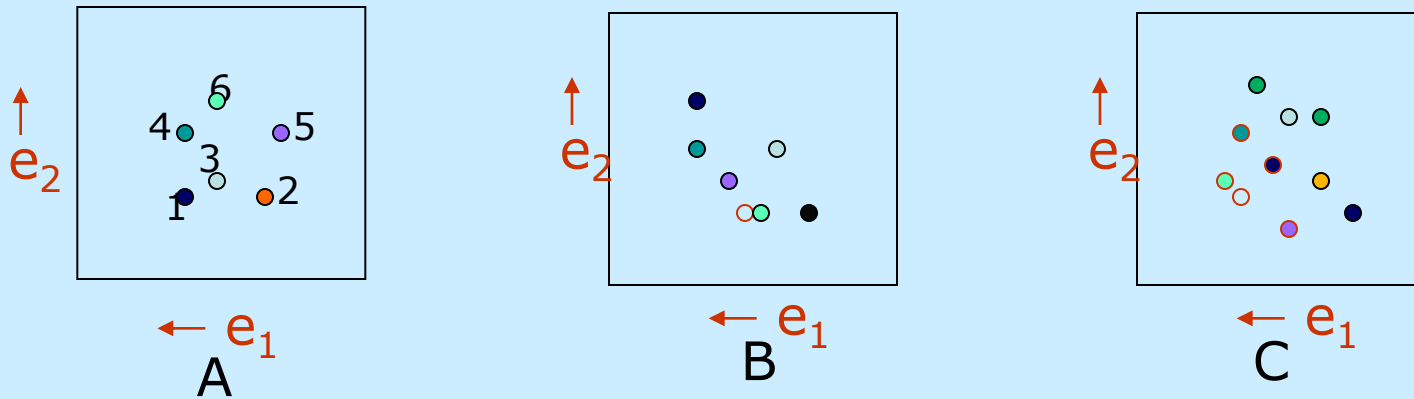
➤ KROMATOGRAFI KERTAS 2 ARAH (2 DIMENSI)

- ◆ Bila dengan satu dimensi, pemisahan kurang bagus
- ◆ Memeriksa tingkat kemurnian komponen/spot



Latihan:

Pada pemisahan komponen dalam 3 analat yaitu analat A, B dan C diperoleh kromatogram seperti tergambar.



- ❖ Berapa **jumlah spot** yang ada pada dimensi pertama?
- ❖ Bila sebagai eluen 1 digunakan metanol-air (2:1) untuk A, kloroform-metanol (1:1) untuk B dan heksana-toluena (1:1) untuk C, zat manakah yang paling polar dalam masing-masing analat? Zat manakah yang paling polar diantara analat A, B dan C?
- ❖ Untuk ketiga analat tersebut, bagaimana tingkat kepolaran eluen 2 dibandingkan eluen 1?

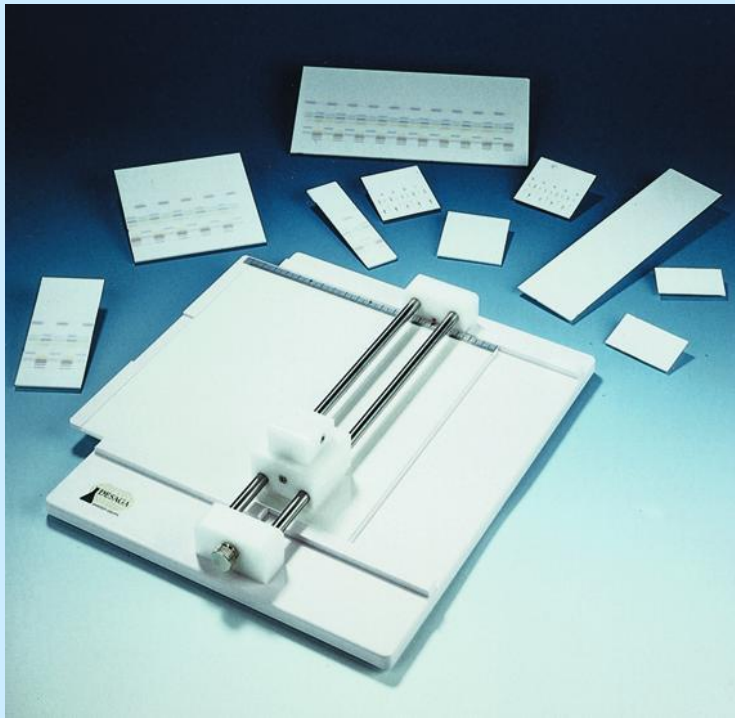
➤ KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

- ❖ Peralatan & teknik umum
- ❖ Adsoben
- ❖ KLT preparatif

❖ Peralatan & teknik umum

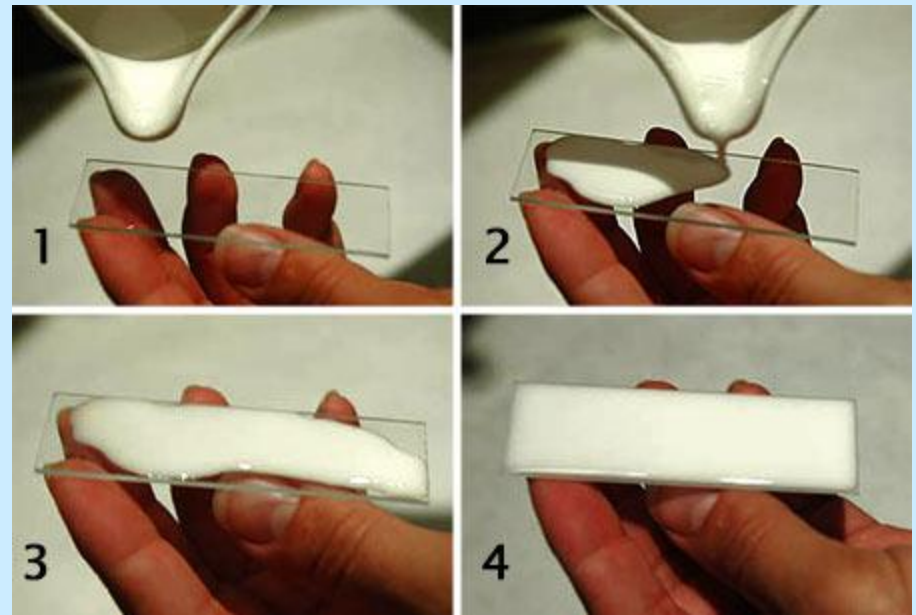
- Peralatan:**
- Tabung kromatografi (persegi, silinder)
 - Lempeng tipis (gelas/aluminium berlapis adsorben)





Pemotong pelat KLT

Ilustrasi pembuatan pelat KLT preparatif



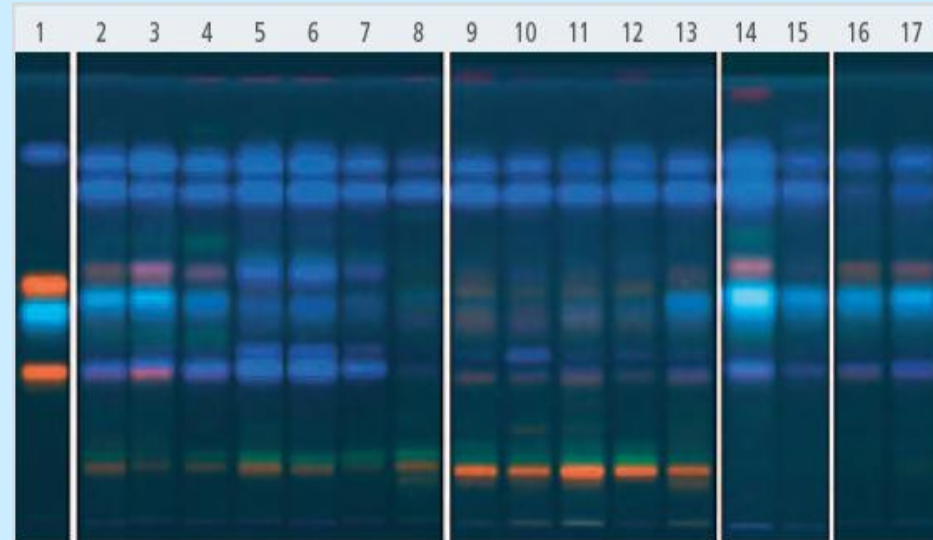
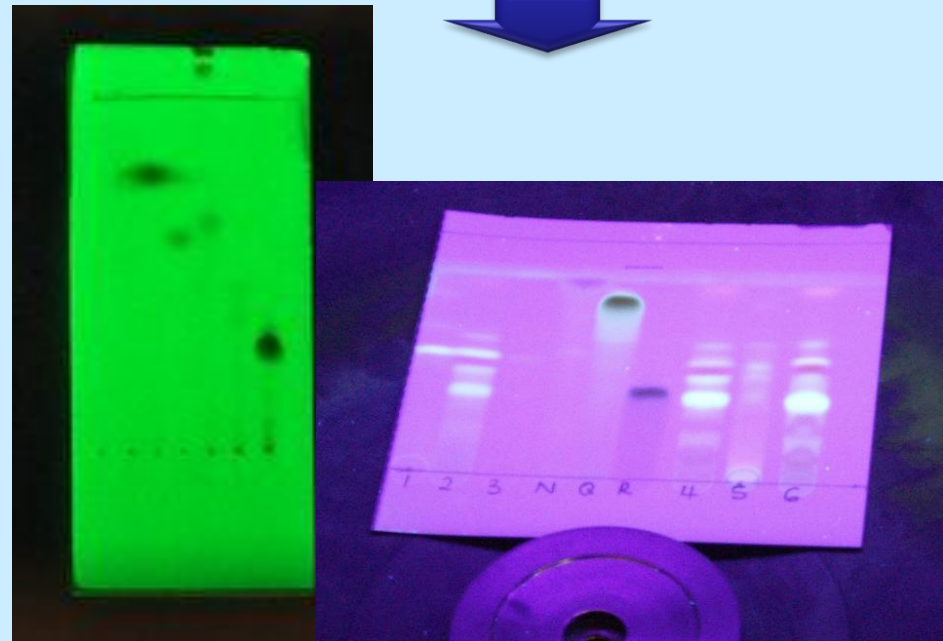
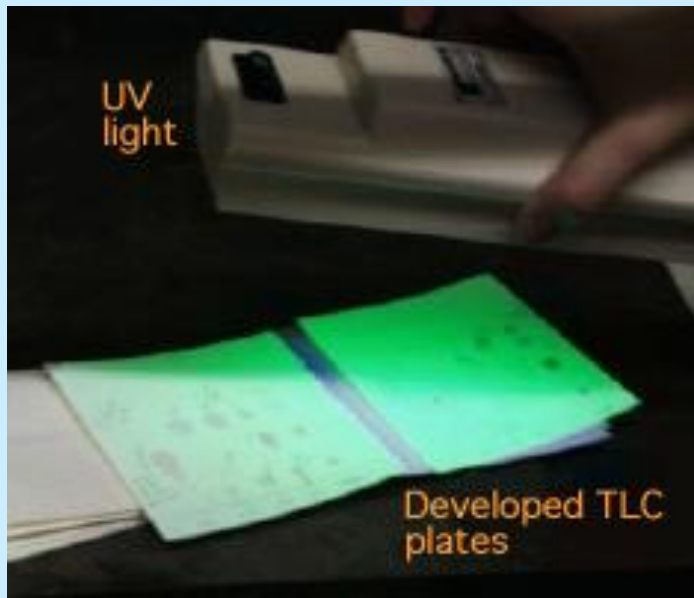
Teknik umum:

- seperti pada kromatografi kertas
- Hanya ascending (naik)
- alat deteksi (lampu uv, sprayer)

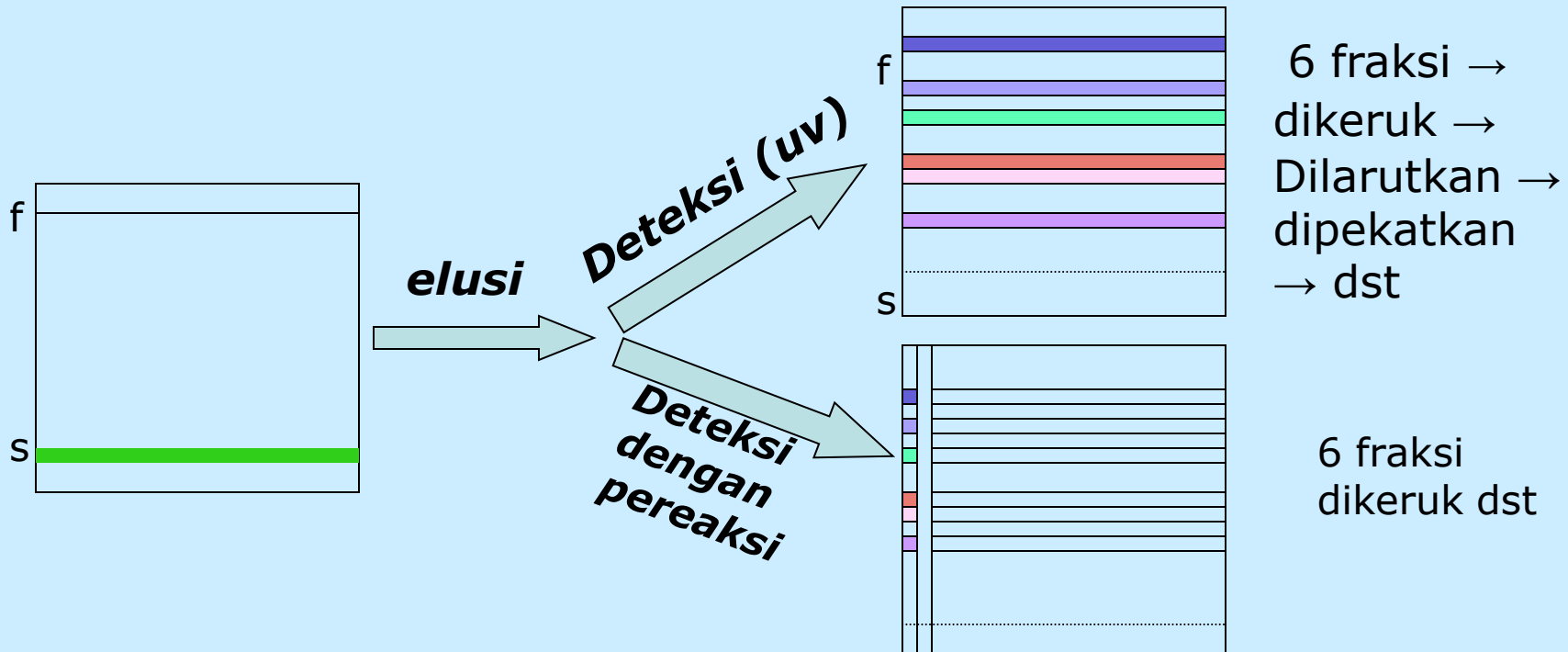
Tujuan:

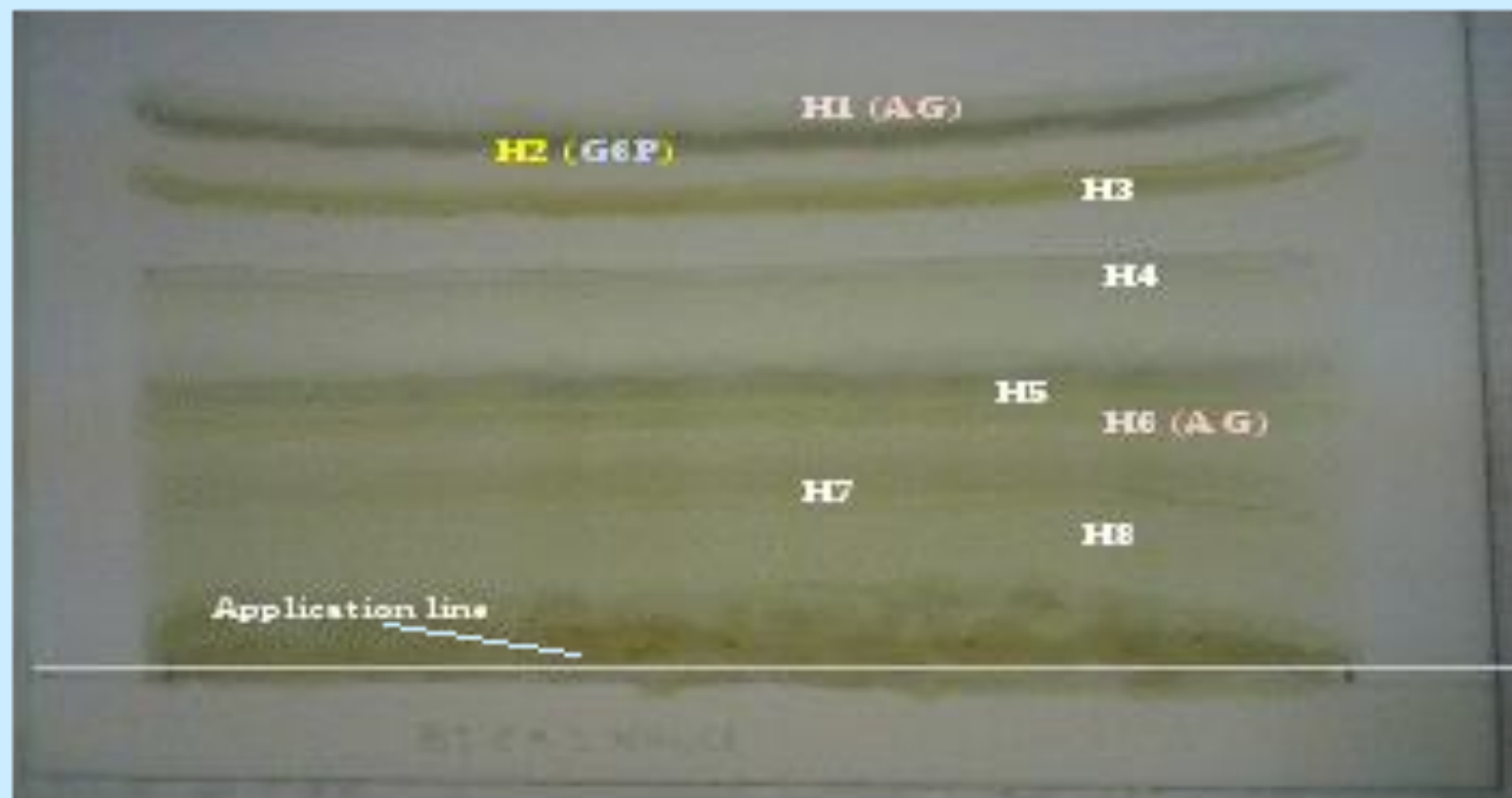
- analitis (identifikasi)
- preparatif
- mencari eluen terbaik





- analitis (identifikasi kualitatif & kuantitatif):
Seperti kromatografi kertas
- preparatif:
 - ◇ Pada isolasi komponen/pemurnian
 - ◇ Hasil pemisahan dikerjakan lebih lanjut
 - ◇ Deteksi dengan uv (tanpa pereaksi)
bila dengan pereaksi, bagian yang diberi pereaksi tidak digunakan lebih lanjut

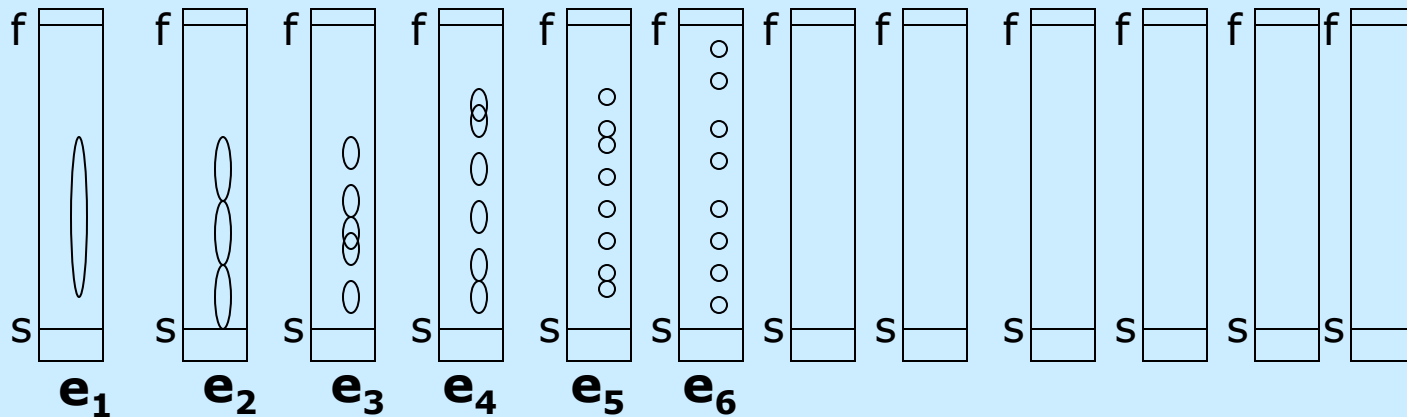




- mencari eluen terbaik

- ◇ Eluen untuk pemisahan dengan kolom

- ◇ Eluen untuk pemisahan dengan KLT



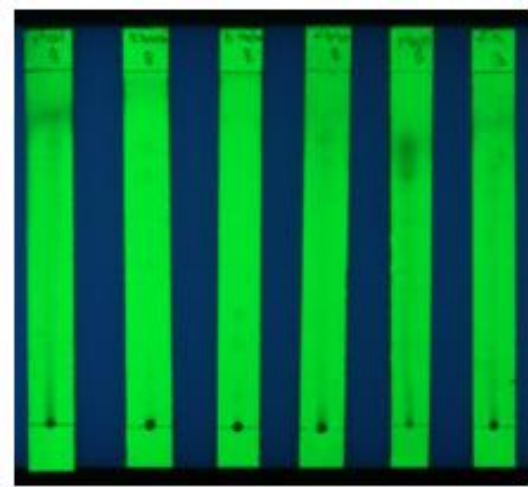
*Eluen terbaik (di antara eluen yang dicoba):
menghasilkan spot yang terbanyak dan terpisah*

- ◇ Tahap pemilihan:

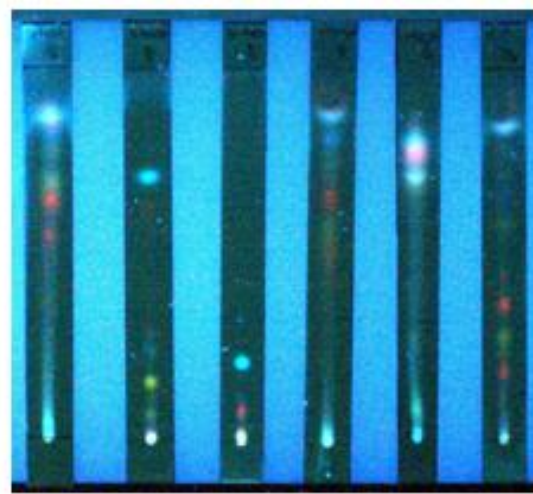
1. Dicoba eluen polar dan non polar

2. Diambil kesimpulan tentang sifat zat

3. Dicoba campuran eluen (tingkat kepolaran berbeda)

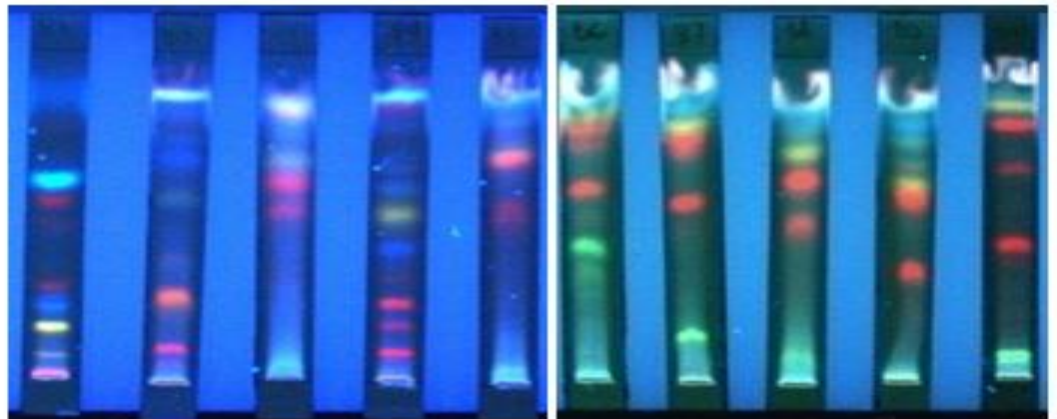


1 2 3 4 5 6



1 2 3 4 5 6

Keterangan : 1. Etanol, 2. Kloroform, 3. Diklorometana, 4. Aseton, 5. Metanol, 6. Etil asetat



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Gambar 9 Profil KLT elusi ekstrak brotowali menggunakan fase gerak campuran komposisi 1-10 di bawah sinar UV 366 nm.

❖ ADSORBEN (untuk KLT & KOLOM)

- sifat adsorben

- ◇ Polaritas relatif : kekuatan untuk mengadsorpsi spesies tertentu

Untuk adsorbent polar seperti Alumina:

$-COOH > -OH > -NH_2 > -SH > -CHO > =C=O > -COOR > -OCH_3 > -CH=CH-$

Bagaimanakah urutan kapasitas relatif untuk adsorbent nonpolar seperti arang aktif?

- ◇ Kapasitas adsorpsi: Jumlah g solut yang dapat diadsorpsi per g adsorbent

Arang aktif > silika gel > alumina asam > alumina basa > Cr_2O_3 > ZnS > Al_2O_3 > CaF_2 > CaO

- Ukuran partikel : 5-50 μ m
- Jenis : anorganik, organik
 - Alumina
 - Kiesel guhr : asam silikat alami (dari fosil)
 - Silikat (Mg..., Ca...)
 - Fosfat
 - Kalsium sulfat
 - Oksida besi dan krom
 - Karbon aktif
 - Selulosa → senyawa hidrofilik
 - Pati → hidrofilik
 - Sukrosa → pigmen
 - Manitol
 - Dekstran

Variabel penentu pemisahan

Sifat adsorben
 Komposisi fasa gerak } Kecenderungan zat untuk teradsorpsi

Contoh: pada Alumina (adsorbent polar)

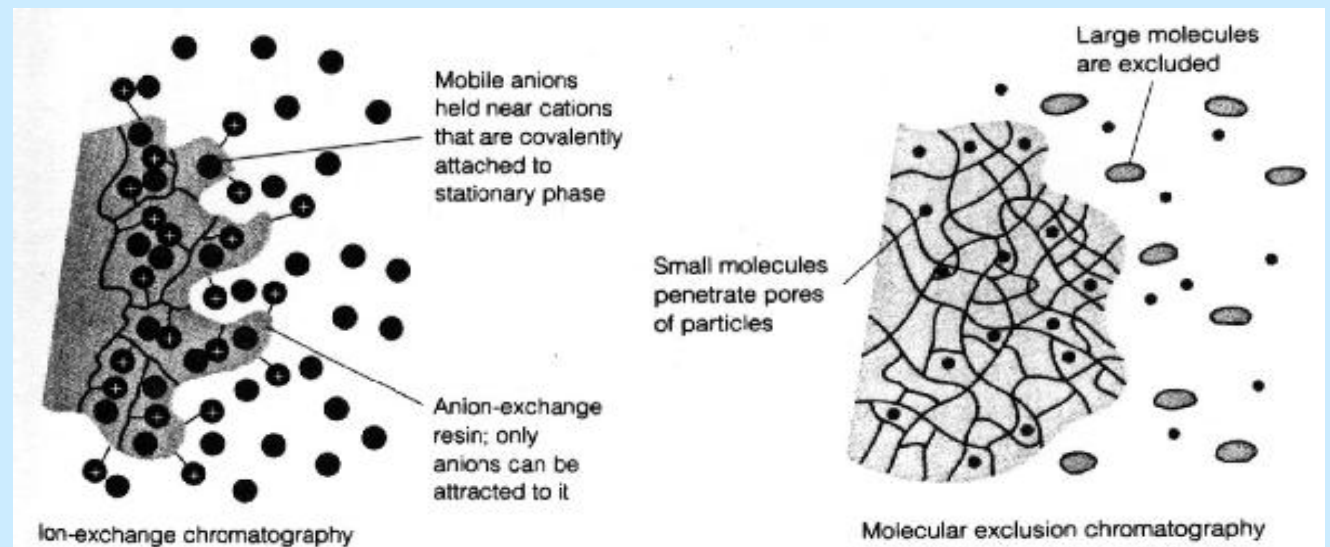
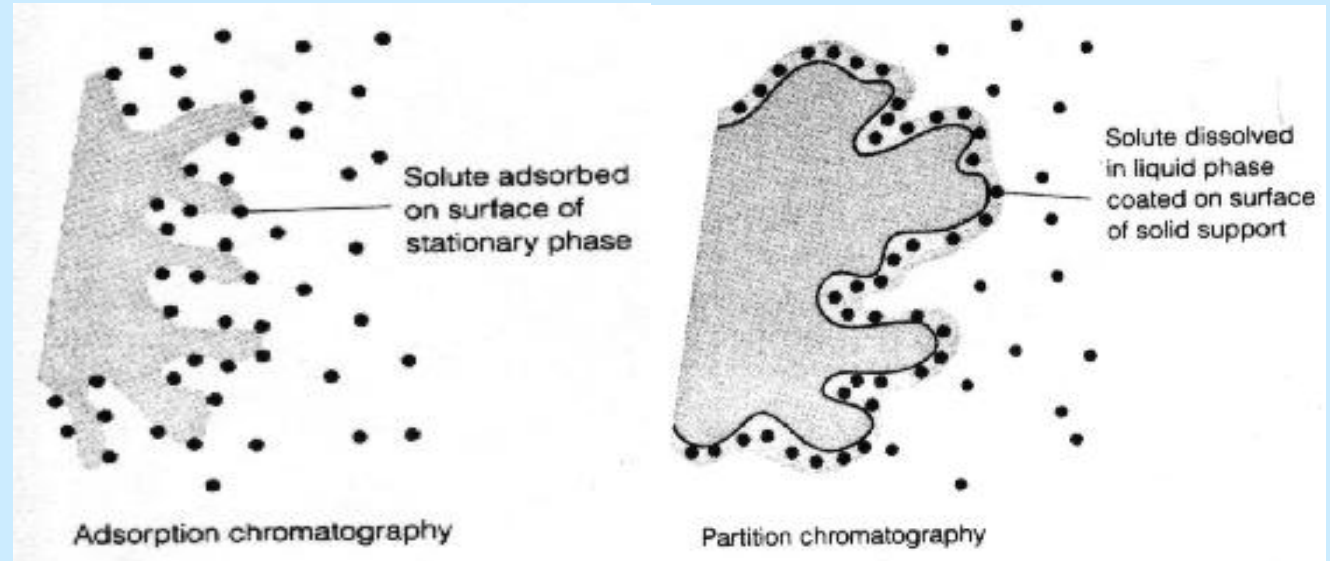
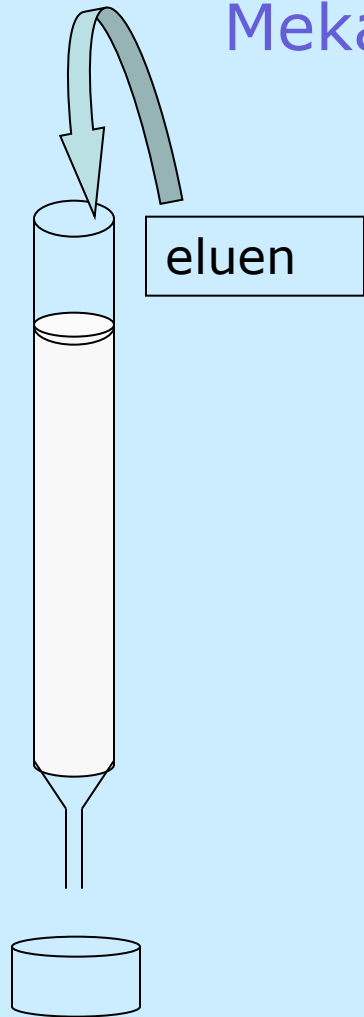
senyawa organik polar teradsorpsi kuat
 → digeser oleh aliran eluen polar

URUTAN KEPOLARAN PELARUT

Asam/basa > asam organik > piridin > air > metanol
> etanol > propanol > aseton > dikloroetana > etil
asetat > kloroform & dietileter > diklorometana >
benzena & toluena > karbon tetraklorida > heksana

► KROMATOGRAFI KOLOM

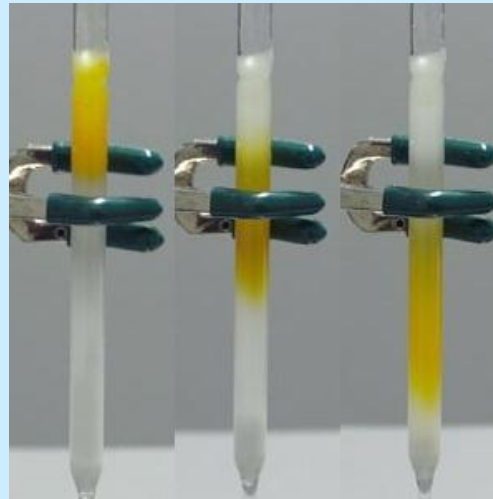
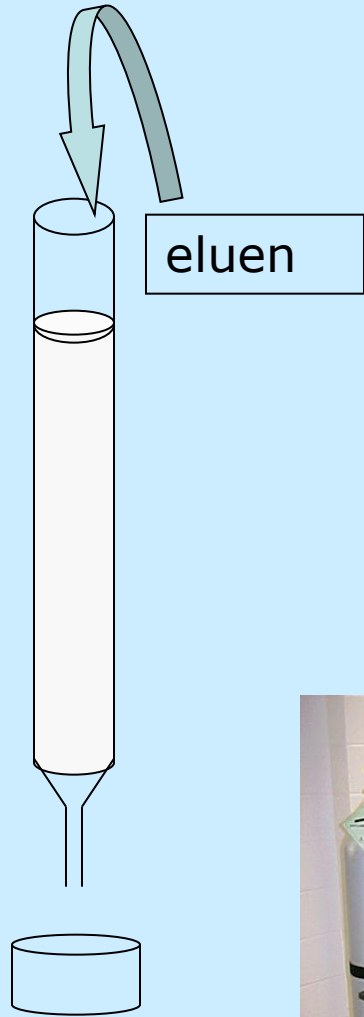
Mekanisme: adsorpsi, partisi, eksklusi, tukar ion



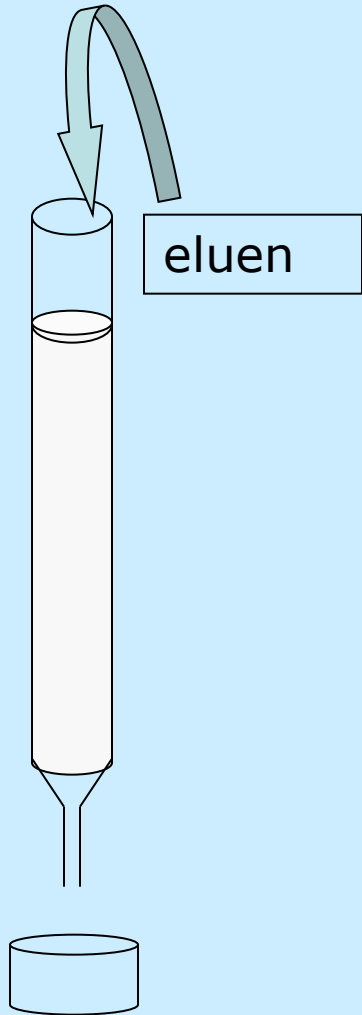
► KROMATOGRAFI KOLOM

Sistem: manual

Instrumetal; HPLC, GC



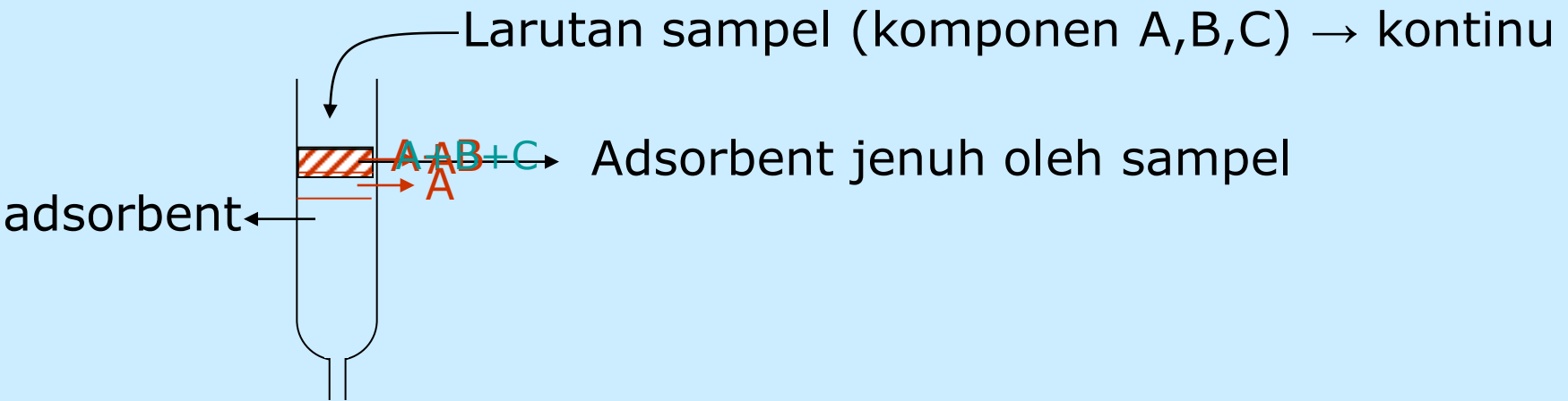
► KROMATOGRAFI KOLOM



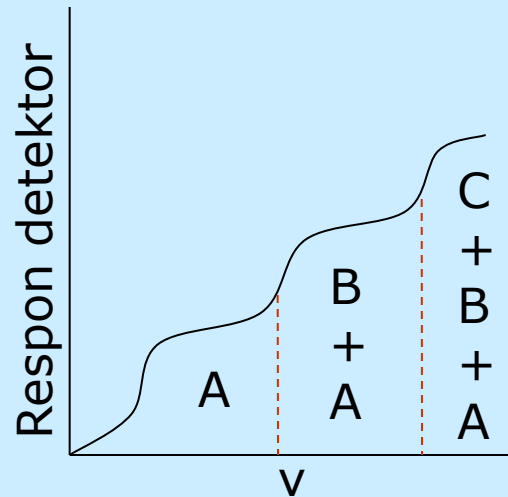
Sistem pemberian fasa gerak:

- a. Frontal
- b. pergeseran
- c. elusi

1) Cara frontal



Sampel → kolom → adsorbent jenuh → + sampel →
komponen yang paling lemah teradsorpsi, turun →
+ sampel → ...



- Tidak memisahkan komponen
- Memberi gambaran afinitas berbagai zat terhadap absorbent
- Volume retensi spesifik →
volume cairan yang melewati kolom (per g ads) sebelum komponen keluar dari kolom

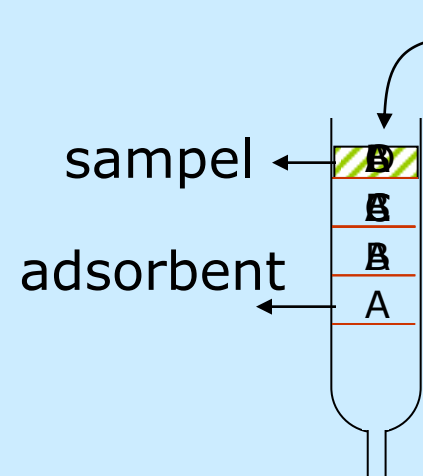
2) Cara pergeseran (displacement)

Fasa mobil:

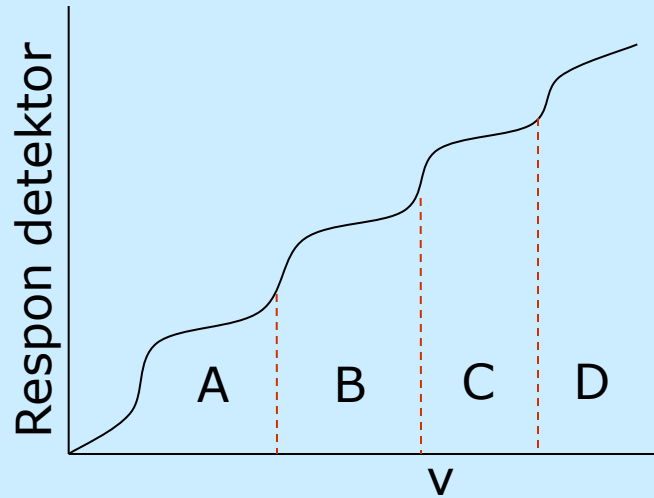
larutan zat yang lebih kuat teradsorpsi dibandingkan komponen-komponen sampel

Sampel : A+B+C (afinitas $A < B < C$)

Fasa mobil : berisi D (afinitas $> C$)

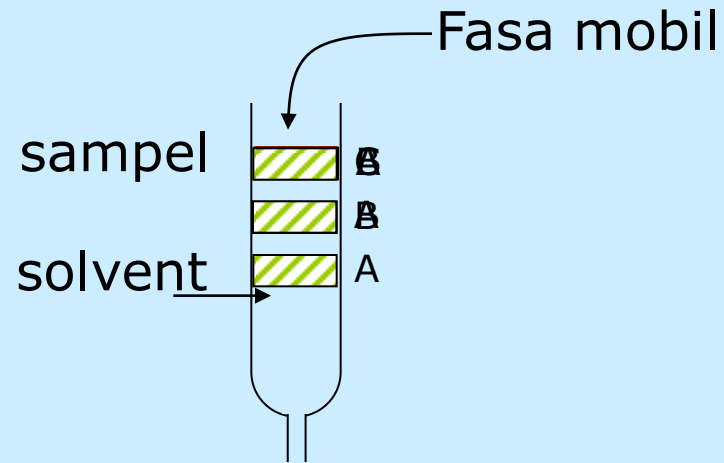


D pada fasa mobil menggeser $A < B < C$.
→ B menggeser A → C menggeser B →
urutan keluar dari kolom:
A → B → C



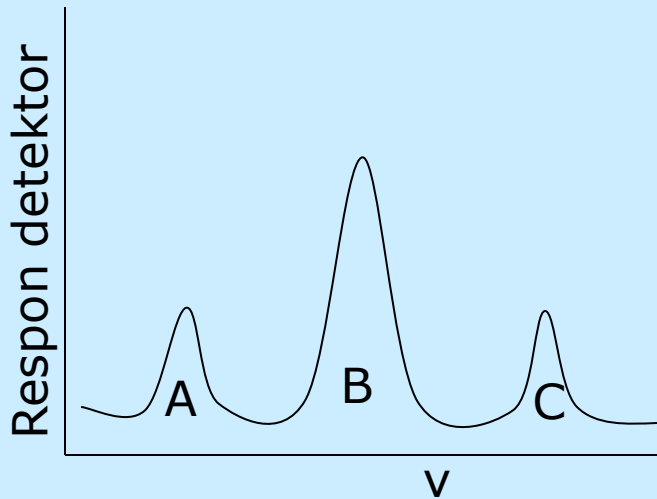
- Zona zat keluar dari kolom berurutan tanpa diselingi zona pelarut
→ + carrier
(afinitas diantara afinitas komponen)

3) Cara elusi



Fasa gerak

- Kontinu sampai semua komponen keluar



- Pemisahan bagus

Syarat:

1. Kolom tidak kelebihan beban solut → limit sampel
2. Efek difusi sekecil mungkin
 - Pengepakan kolom
 - Peningkatan laju
3. Adsorpsi & desorpsi dari fasa diam harus cepat → kesetimbangan cepat
4. Distribusi solut antara 2 fase berubah linier dengan Δc → sulit → tailing

SISTEM ELUSI

◇ Elusi isokratik

Eluen hanya satu jenis (bisa tunggal atau campuran dengan komposisi tetap)

◇ Elusi gradien

Eluen berubah kekuatannya secara bertahap

Eluen campuran dengan komposisi yang berubah

URUTAN KEPOLARAN PELARUT

Asam/basa > asam organik > piridin > air > metanol
> etanol > propanol > aseton > dikloroetana > etil
asetat > kloroform & dietileter > diklorometana >
benzena & toluena > karbon tetraklorida > heksana

Berikut disampaikan langkah-langkah pengemasan kolom yang dapat dilakukan di laboratorium:

1. Pilihlah kolom yang akan anda gunakan, pastikan kolom berada dalam keadaan baik dan bersih dengan ukuran yang sesuai. Ukuran kolom yang digunakan dapat proporsional dengan jumlah silika gel yang digunakan (rapatan silika gel $\pm 0,4$ gram/mL) dengan tinggi kolom sekurangnya 10 kali lipat ukuran diameternya.
2. Gunakan kawat atau kayu kecil untuk memasukkan kapas/glass wol ke ujung kolom (pastikan kapas/glass wol yang anda gunakan cukup untuk menahan fase diam (silika gel) tidak keluar dari kolom namun tidak berlebih karena akan menghambat aliran fase gerak keluar kolom).



Langkah 2

3. Tempatkan kolom pada statif hingga kolom dapat berdiri tegak. (optional: isikan pasir ke dalam kolom)
4. Isi kolom $\frac{1}{4}$ sampai $\frac{1}{3}$ bagiannya dengan eluen yang akan digunakan.



Sampai langkah 4

5. Siapkan bubur silika dengan cara berikut: rendam silika dengan eluen yang digunakan dalam wadah hingga terbentuk bubur silika. Kelebihan gas yang terlarut dalam bubur silika dapat dihilangkan dengan vakum (metode lebih lanjut dalam pembuatan bubur silika atau fase diam lainnya dapat dipelajari pada manual yang diberikan oleh pabrik penjualnya).



Langkah 5

6. Dengan cepat dan hati-hati tuangkan bubuk silika ke dalam kolom. Aduk dan tuangkan sisa silika dalam gelas piala, gunakan spatula untuk membantu memindahkan sisa silika.



Langkah 6

7. Buka cerat kolom agar eluen dapat menetes keluar dan tambahkan suplai eluen yang masuk ke dalam kolom. Ketuk-ketuklah dinding kolom agar silika gel tersusun uniform dalam kolom.
8. Gunakan pipet untuk membilas silika gel yang menempel pada dinding kolom bagian atas
9. Lakukan elusi berkali-kali agar silika gel terkemas dengan baik dan permanen/stabil.
9. (optional : Setelah silika gel stabil dengan hati-hati masukkan pasir ke atas permukaan silika)



Setelah langkah 9

PARAMETER KROMATOGRAFI KOLOM

- Nisbah partisi/koefisien partisi/koefisien distribusi

Kromatografi \approx partisi solut antara fasa diam dan fasa gerak

Setimbang: $A_m \leftrightarrow A_s$

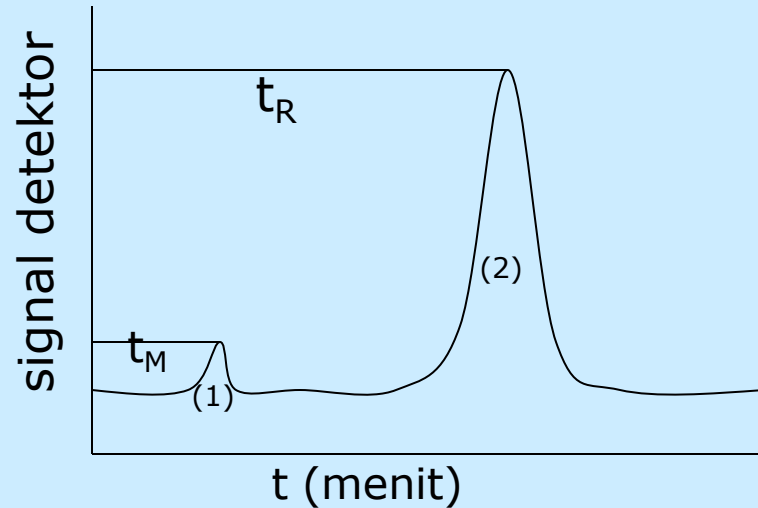
Koefisien partisi (K) = C_s/C_m

$$C_s = [A]_s$$

$$C_m = [A]_m$$

Ideal : nilai K konstan untuk kisaran [solut] yang luas

- Waktu retensi (t_R)



(1) = spesies yang tidak ditahan

(2) = spesies yang ditahan (analit)

t_M (*dead time*) = waktu yang dibutuhkan eluen untuk mencapai detektor setelah injek

t_R = waktu yang dibutuhkan komponen untuk mencapai detektor setelah injek

Rataan laju migrasi linier solut = $\bar{v} = L/t_R$ L = panjang kolom

Rataan laju migrasi linier fasa gerak = $\mu = L/t_M$

Hubungan K dan laju migrasi

$$\bar{v} = \mu \times \frac{1}{(1 + KV_s/V_M)}$$

- Faktor kapasitas

$$k'_A = K_A \cdot V_s / V_M$$

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

Ideal : $k' = 1-5$

bila $k < 1$, elusi terlalu cepat, penentuan t_R
yang tepat, sulit

k terlalu tinggi, elusi sangat lambat

- Faktor selektivitas (laju migrasi relatif)

$$\alpha = k'_B / k'_A$$

B = solut yang ditahan lebih kuat

A = solut yang ditahan kurang kuat

$$\alpha = ((t_R)_B - t_M) / ((t_R)_A - t_M)$$

EFISIENSI KOLOM

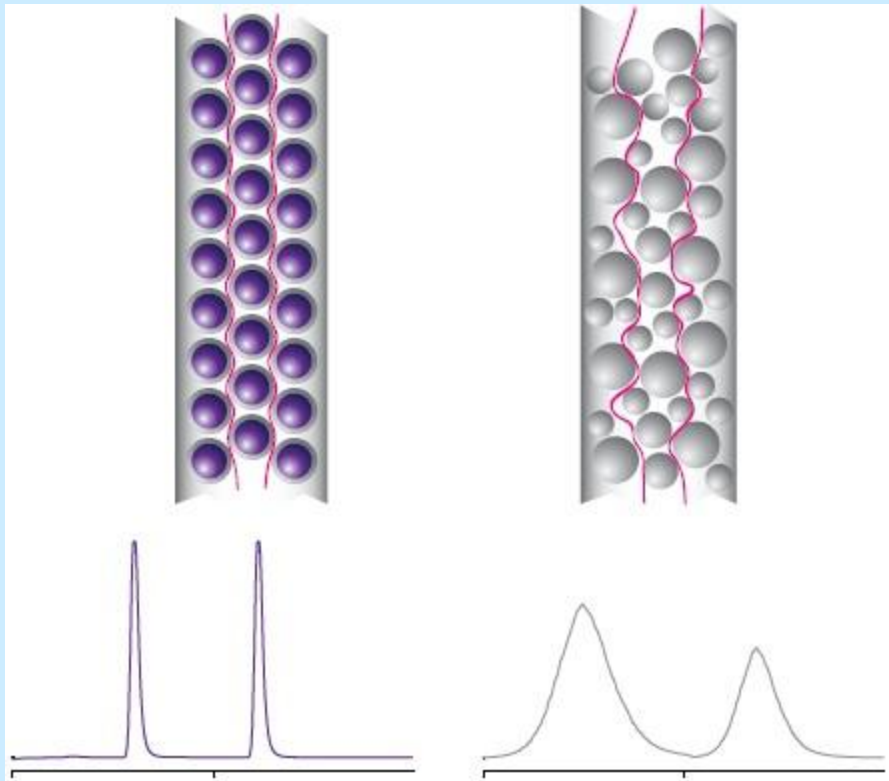
1. Jumlah lempeng teoritis (N)

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

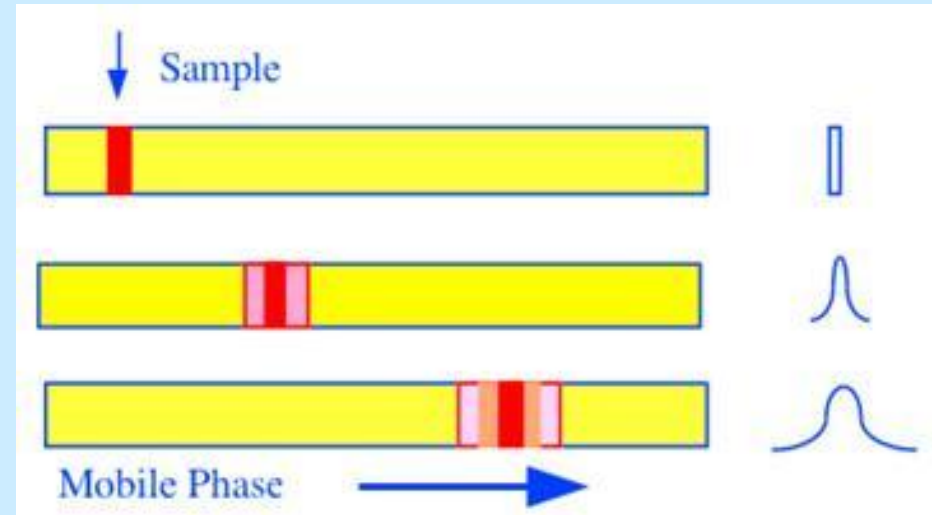
t_R = waktu retensi
 W = lebar kurva

❖ HETP (JSPT = Jarak setara dengan pelat teori)

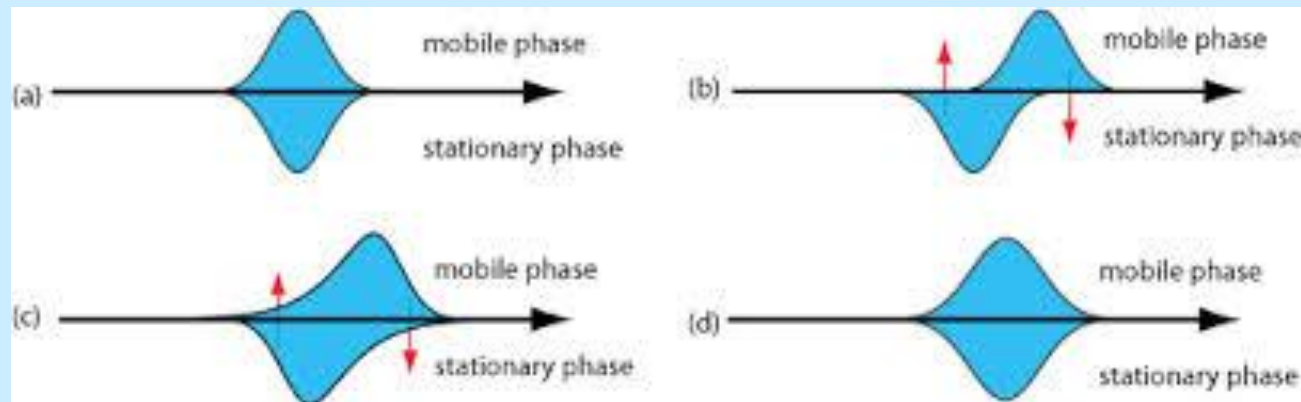
- HETP = Panjang kolom/jumlah lempeng teoritis
= L/N
- Faktor = a. difusi eddy (a)
b. difusi molekul (B)
c. tahanan terhadap alih massa (C)



www.pharmapolis.net



www.chromatography-online.org



community.asdlib.org

$$2. \text{ HETP} = a + \frac{B}{\bar{\mu}} + C\bar{\mu} \quad (\text{Van Deemter})$$

$\bar{\mu}$ = laju rata-rata carrier (cm/dtk.)

a ~ diffusi eddy ~ ketidakteraturan kemasan
Keragaman panjang jalur partikel dalam kolom

B ~ diffusi longitudinal/diffusi molekular

~ kedifusian zat dalam gas carrier (D_{gas}).

$D_{\text{gas}} \uparrow \rightarrow$ pita melebar \rightarrow efisiensi \downarrow

C ~ laju transfer massa ~ waktu yang diperlukan
untuk kesetimbangan zat dalam 2 fasa

3. Resolusi

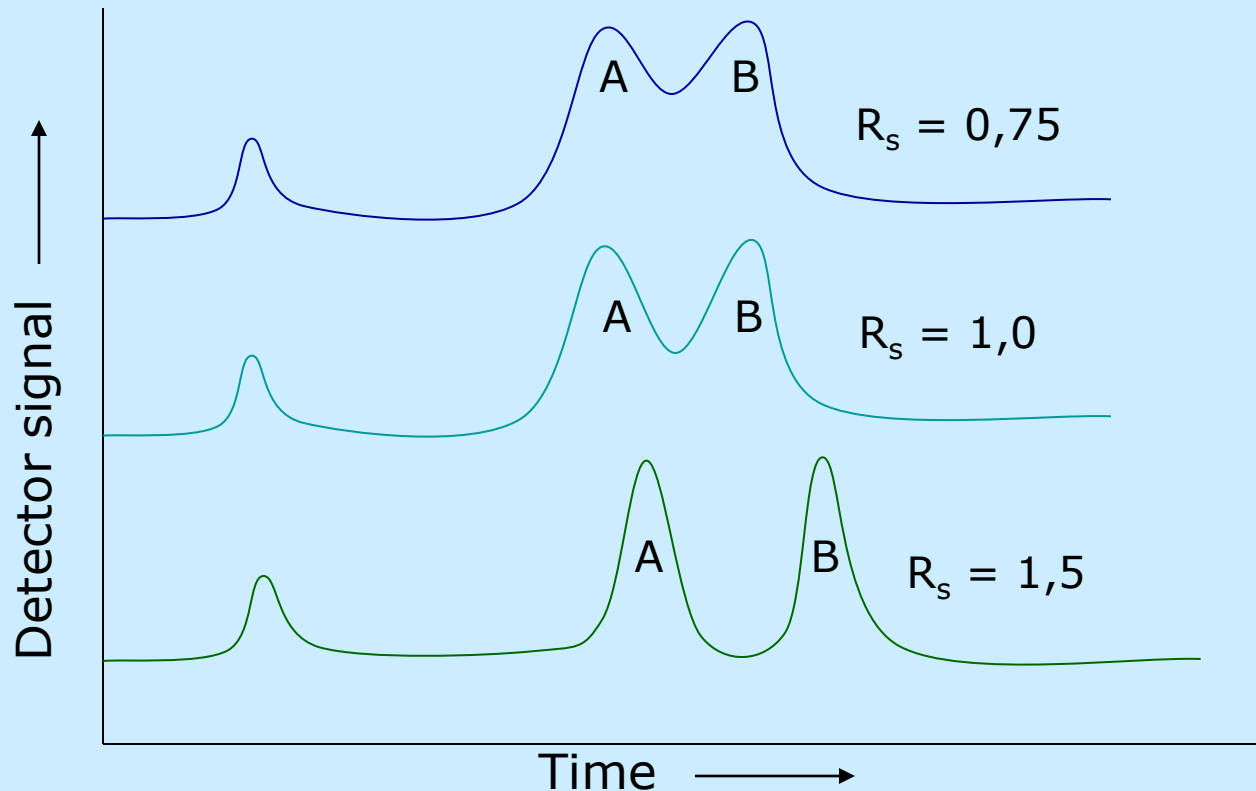
$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 (w_1 + w_2)}$$

$R=1 \longrightarrow 3\% \text{ overlap}$

$R=1,5 \longrightarrow 0,2\% \text{ overlap}$

$$R \propto \sqrt{N} \longrightarrow \propto \sqrt{L}$$

Panjang kolom jadi 2 kali $\longrightarrow R$ naik $\sqrt{2}$ ($=1,4$)



Pada analisis kromatografi asam berbobot molekul rendah, asam butirat memiliki waktu retensi 7.63 menit. Apabila waktu mati ialah 0.31 menit, maka faktor kapasitas asam butirat ialah...

Apabila dalam sampel terdapat xanthin dan hipoxanthin dengan waktu retensi masing masing 8,31 dan 9,53 menit. Tentukanlah faktor selektivitas xanthin dan hipoxanthin bila komponen yang tidak tertahan kolom terelusi pada menit ke 0.8

Dalam analisis ekstrak pegagan secara kromatografi terdapat dua buah pita yaitu asiaticosida dan quercetin dengan waktu retensi 8,16 dan 11,54 menit serta *baseline width* masing-masing 0,86 dan 0,64 menit. Hitunglah resolusi diantara pita dua buah senyawa tersebut