



IPB
Press

KIMIA PEMISAHAN



– BOHARI –



KIMIA PEMISAHAN



KIMIA PEMISAHAN

Penulis:
Bohari



Penerbit IPB Press
Jalan Taman Kencana No. 3,
Kota Bogor - Indonesia

C.01/07.2021

Judul Buku:

Kimia Pemisahan

Penulis:

Bohari

Penyunting Bahasa:

Dwi Murti Nastiti

Desain Sampul:

Bohari

Penata Isi:

Muhammar Alweddy

Alfyandi

Jumlah Halaman:

208 + 26 halaman romawi

Edisi/Cetakan:

Cetakan 1, Juli 2021

PT Penerbit IPB Press

Anggota IKAPI

Jalan Taman Kencana No. 3, Bogor 16128

Telp. 0251 - 8355 158 E-mail: penerbit.ipbpress@gmail.com

www.ipbpress.com

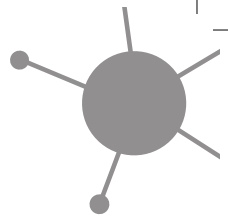
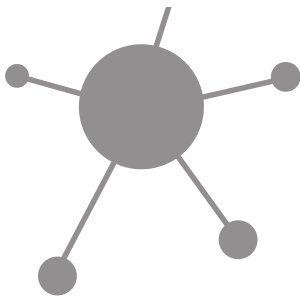
ISBN: 978-623-256-773-3

Dicetak oleh Percetakan IPB, Bogor - Indonesia

Isi di Luar Tanggung Jawab Percetakan

© 2021, HAK CIPTA DILINDUNGI OLEH UNDANG-UNDANG

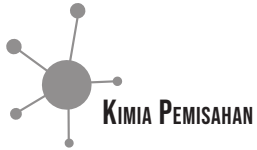
Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari penerbit



DAFTAR SINGKATAN

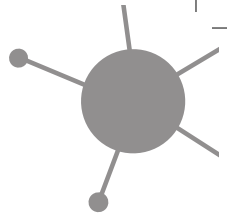
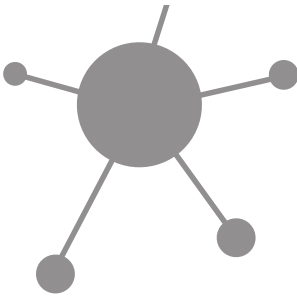
AAS	: Atomic Absorption Spectrophotometer
AES	: Atomic Emission Spectrophotometer
AFS	: Atomic Fluorescence Spectrophotometer
ASE	: Accelerated Solvent Extraction
CRMs	: Certified Reference Materials
CT	: Cryo-trapping
DAD	: Diode Array Detector
DNA	: Deoxyribonucleic acid
ECD (1)	: Electron Capture Detector
ECD (2)	: Electrolytic Conductivity Detector
EI-MS	: Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ET-AAS	: Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FAAS	: Flame Atomic Absorption Spectrometry
FID	: Flame Ionization Detector
FI-HG-AAS	: Flow Injection-Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrophotometer
FPD	: Flame-Photometric Detector
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC	: Gas Chromatography
GLC	: Gas-Liquid Chromatography
GSC	: Gas Solid Chromatography
HETP	: Height Equivalent Theoretical Plate
HG	: Hydride Generation

HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ICP	: Inductively Coupled Plasma
ICP-OES	: Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy
ICP-MS	: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy
IUPAC	: The International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	: Liquid Chromatography
LLE	: Liquid-Liquid Extraction
LLME	: Liquid-Liquid Micro-extraction
LOD	: Limit of Detection
LPME	: Liquid Phase Micro-extraction
MIP-AES	: Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Spectroscopy
MS	: Mass Spectrometry
MF	: Micro Filtration
MS	: Mass Spectrophotometer
MSPD	: Matrix Solid Phase Dispersion
NF	: Nano Filtration
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
NPD	: Nitrogen-Phosphorous Detector
PFE	: Pressurized Fluid Extraction
PID	: Photo-Ionization Detector
PLOT	: Porous Layer Open Tubular
SCOT	: Support-Coated Open Tubular
SFC	: Supercritical Fluid Chromatography
SLE	: Solid-Liquid Extraction
SPE	: Solid-Phase Extraction



SPME	: Solid-Phase Micro-extraction
RO	: Reverse Osmosis
RSD	: Relative Standard Deviation
SF	: Supercritical Fluid
TCD	: Thermal Conductivity Detector
UF	: Ultra Filtration
UV	: Ultra Violet
VOC	: Volatile Organic Compounds
WCOT	: Wall-Coated Open Tubular





SAMBUTAN

DEKAN FARMASI UNIVERSITAS MULAWARMAN

GURU BESAR ILMU KIMIA

Kebutuhan akan literatur berbahasa Indonesia untuk bidang keilmuan yang spesifik, sangat diperlukan oleh mahasiswa. Kimia Pemisahan adalah bagian dari ilmu kimia analitik yang sangat penting untuk mahasiswa farmasi. Oleh karena itu, penerbitan buku ini akan sangat membantu mahasiswa dalam mendalami teknik-teknik pemisahan termasuk teori yang mendasarinya.

Lebih jauh dari itu, dalam buku ini juga mencoba untuk memberikan pengantar terkait analisis spesiasi, sebuah ilmu yang sangat penting, khususnya dalam mempelajari toksisitas, mobilitas, dan bioavailabilitas logam dan metalloid yang sangat mungkin ditemukan di dalam bahan-bahan makanan dan farmasi.

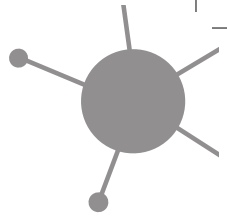
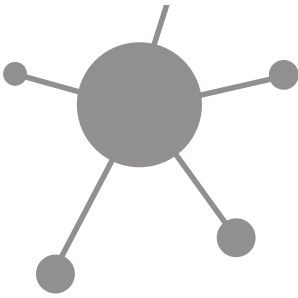
Semoga karya tulis yang penting ini dapat memberikan manfaat dalam mendukung peningkatan kualitas sumber daya manusia Indonesia, khususnya di bidang yang berhubungan dengan ilmu kimia analitik.

Selamat dan sukses untuk penulis semoga ke depannya dapat memberikan hasil-hasil karya tulis lebih banyak lagi.

Samarinda, 24 Mei 2021

Prof. Dr. H. Laode Rijai, M.Si





SAMBUTAN
DEKAN FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU
PENDIDIKAN UNIVERSITAS MULAWARMAN
GURU BESAR PENDIDIKAN KIMIA

Penerbitan buku ini patut untuk diberikan apresiasi, mengingat untuk bidang-bidang ilmu spesifik seperti kimia, sangat terbatas kita dapat menemukan sumber bacaan yang berbahasa Indonesia. Dengan diterbitkannya buku ini, tentu saja akan lebih memudahkan mahasiswa untuk mendapatkan literatur berkualitas.

Buku ini sangat penting untuk dipelajari oleh mahasiswa pendidikan kimia baik program sarjana maupun pascasarjana sebagai bekal untuk diterapkan di lapangan sebagai baik sebagai pendidik, peneliti maupun sebagai praktisi atau laboran.

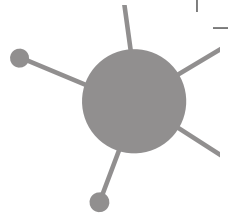
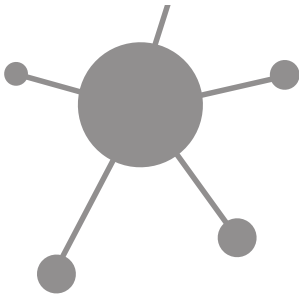
Saya berharap akan semakin banyak karya-karya tulis seperti ini yang diterbitkan, khususnya yang terkait dengan ilmu-ilmu langka dan spesifik seperti Buku Kimia Pemisahan ini.

Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di Indonesia.

Samarinda, 20 Mei 2021

Prof. Dr. H. Amir Masruhim, M.Kes.





KATA PENGANTAR

Buku ini diterbitkan untuk memenuhi kebutuhan atas literatur dibidang ilmu kimia yang berbahasa Indonesia dengan harapan dapat dijadikan salah satu bahan acuan bagi mahasiswa di Indonesia khususnya yang sedang mendalami Kimia Pemisahan dan Analisis Spesiasi, serta bidang ilmu lainnya yang berhubungan.

Disajikan dengan Bahasa yang diupayakan sesederhana mungkin untuk memudahkan pemahaman bagi pembacanya. Keseluruhan terdiri atas 6 Bab yang diawali Bab Pertama dengan statistik sangat sederhana, khususnya yang terkait dengan seringnya terdapat kekeliruan dalam penyajian laporan praktikum dan bahkan skripsi mahasiswa terkait penyajian angka bermakna dan juga makna dari angka-angka yang dituliskan. Selanjutnya mengingatkan kembali terkait ketelitian dan ketepatan pengukuran analitik.

Di bab kedua mengurai hal-hal umum yang terkait dengan pengambilan sampel, preservasi, dan preparasinya. Hal ini sangat penting karena ketepatan analisis sangat ditentukan oleh faktor-faktor yang berhubungan dengan pengolahan dan pengelolaan sampel hingga siap untuk dianalisis dengan instrumen. Secanggih apapun instrumen yang dihasilkan tidak akan berarti apa-apa jika keliru dalam mengelola sampel.

Pada bab ketiga membahas terkait metode metode pemisahan konvensional dalam analisis kimia yang hingga saat ini masih digunakan, seperti filtrasi, kristalisasi, destilasi, dan sebagainya. Sementara ekstraksi dan kromatografi dibahas secara khusus dalam satu bab tersendiri (Bab 4 dan Bab 5), mengingat kedua metode pemisahan ini sangat penting dalam analisis kimia saat ini. Ekstraksi sangat bermanfaat dalam hal pengelolaan

sampel (pra-injeksi), sedangkan kromatografi berperan dalam pemisahan spesies atau senyawa di dalam kolom dengan peralatan yang saat ini sudah sangat canggih.

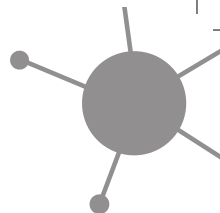
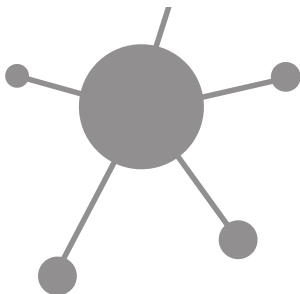
Selanjutnya pada bab keenam, diuraikan pengantar tentang teknik analisis spesiasi yang saat ini sudah semakin sering digunakan, khususnya jika akan mempelajari tentang toksisitas, mobilitas dan bioavailabilitas unsur, serta senyawa, khususnya logam dan metaloid. Teknik-teknik penggabungan instrument canggih adalah ciri dari analisis spesiasi dengan performa analitik yang sangat baik.

Sumber dari buku ini banyak diambil dari jurnal ilmiah, buku, book-chapter, laporan, dan sejenisnya untuk melengkapi sumber utama penulis yaitu dari catatan kuliah penulis untuk mata kuliah Kimia Pemisahan dan Analisis Spesiasi pada Program Pascasarjana Ilmu Kimia Universitas Gadjah Mada, pada tahun 1993 yang diampu saat itu, oleh Bapak Dr. Eko Sugiarto, DEA yang kemudian penulis lanjutkan sebagai disertasi Program Doktor pada Laboratorium Kimia Analitik, Bioorganik dan Lingkungan di Universite de Pau et des Pays de L'Adour Prancis, di bawah *supervise* Profesor Michel Astruc dan Dr. Annette Astruc pada tahun 1998–2001.

Semoga buku ini memberikan manfaat bagi pembacanya dan juga khususnya bagi penulis sendiri.

Samarinda, 1 Juni 2021

Bohari



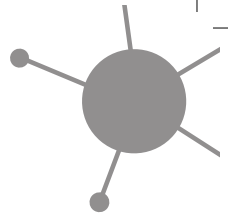
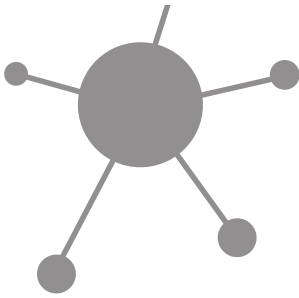
DAFTAR ISI

DAFTAR SINGKATAN.....	v
SAMBUTAN DEKAN FARMASI UNIVERSITAS MULAWARMAN GURU BESAR ILMU KIMIA	ix
SAMBUTAN DEKAN FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN UNIVERSITAS MULAWARMAN GURU BESAR PENDIDIKAN KIMIA.....	xi
KATA PENGANTAR.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
BAB 1 KETIDAKPASTIAN DALAM PENGUKURAN.....	1
1. Angka Bermakna dan Makna Angka-angka	1
2. Ketelitian dan Ketepatan	5
BAB 2 PRESERVASI DAN PREPARASI SAMPEL	11
1. Preservasi Sampel.....	11
a. Pengambilan Sampel.....	12
b. Identitas Sampel (Label)	17
c. Transportasi Sampel	18

d.	Penghancuran Sampel	20
e.	Pengeringan dan Penyimpanan Sampel	22
f.	Pengukuran <i>In-Situ</i>	23
g.	Aspek Lain yang Berpengaruh.	24
2.	Preparasi Sampel	34
BAB 3 METODE PEMISAHAN KONVENSIONAL		45
1.	Cara Mekanis	45
2.	Pengaruh Gaya	52
3.	Perbedaan Berat Jenis	57
4.	Kristalisasi	57
5.	Destilasi	61
BAB 4 EKSTRAKSI		71
1.	Prinsip Ekstraksi	71
2.	Metode Ekstraksi	78
a.	Metode Ekstraksi dengan Cara Batch	78
b.	Metode Ekstraksi dengan Sistem Kontinu	88
c.	Metode Ekstraksi Sistem Countercurrent	91
3.	Klasifikasi Ekstraksi	100
a.	Ekstraksi dengan Partisi Sederhana	101
b.	Ekstraksi dengan Pembentukan Khelat	101
c.	Ekstraksi dengan Asosiasi Ion	102
d.	Ekstraksi dengan Penukar Ion	102

4.	Faktor-faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi	102
a.	Ukuran Partikel	103
b.	Pelarut	103
c.	Suhu.	104
d.	Pengadukan	104
e.	Waktu.	105
f.	Teknik Ekstraksi	105
g.	Jenis Sampel	105
h.	Rasio Pelarut-Terlarut	106
BAB 5 KROMATOGRAFI.		107
1.	Pengantar.	107
2.	Klasifikasi Kromatografi.	111
3.	Teori Kromatografi	124
a.	Proses Isotermal pada Kolom (Sistem Elusi)	124
b.	Pengaruh Faktor Kapasitas	127
c.	Beberapa Besaran Penting	130
d.	Kromatografi Gas	142
e.	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.	153
BAB 6 PENGANTAR ANALISIS SPESIASI		163
1.	Pengantar.	163
2.	Preparasi Sampel dalam Analisis Spesiasi	168
a.	Sampling.	169
b.	Perlakuan Sampel di Lapangan	171
c.	Penyimpanan	172
d.	Preparasi	173

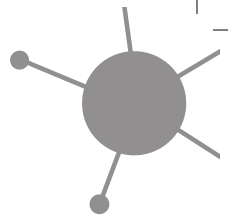
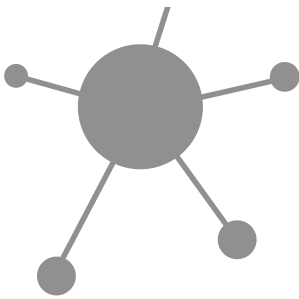
3.	Teknik-teknik Analisis Spesiasi	177
a.	Analisis Spesiasi Non-Kromatografi (Pembangkit Hidrida)	180
b.	HPLC-AAS/AFS/AES	183
c.	HPLC-ICP-MS	186
d.	Penggunaan Kromatografi Gas (GC) dalam Spesiasi	193
	DAFTAR PUSTAKA	197



DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Contoh penulisan laporan hasil pengukuran	3
Tabel 2.	Koreksi Tabel 1 contoh penulisan laporan hasil pengukuran . . .	4
Tabel 3.	Perbandingan antara ketelitian dan ketepatan (<i>random</i> dan <i>systematic error</i>)	8
Tabel 4.	Metode-metode yang digunakan untuk menghaluskan ukuran partikel sampel padat (Majors & Wilmington, 2013)	20
Tabel 5.	Beberapa Contoh Kondisi Penyimpanan Sampel (diterjemahkan bebas dari (European Commision, 2012)) . . .	22
Tabel 6.	Beberapa teknik preservasi sampel (Mitra & Brukh, 2003) . . .	25
Tabel 7.	Metode instrumen yang umum dan langkah-langkah preparasi sampel yang penting sebelum analisis (Mitra & Brukh, 2003)	38
Tabel 8.	Sumber kesalahan yang mungkin selama proses pengambilan hingga preparasi sampel (Annor, 2009)	39
Tabel 9.	Metode Konvensional atau Tradisional yang Umum Dilakukan Untuk Preparasi Sampel Padat (Majors & Wilmington, 2013)	40
Tabel 10.	Metode Ekstraksi Moderen untuk Preparasi Sampel Padat (Majors & Wilmington, 2013)	41
Tabel 11.	Media filtrasi yang umum digunakan (Majors & Wilmington, 2013)	50
Tabel 12.	Perbandingan hasil ekstraksi berdasarkan jumlah perlakuan pada volume yang sama	86

Tabel 13. Distribusi zat terlarut pada proses Craig	96
Tabel 14. Klasifikasi kromatografi berdasarkan fase diam dan fase gerak	111
Tabel 15. Perbandingan kolom kemas dengan kolom kapiler (https://pediaa.com/)	146
Tabel 16. Perbandingan metode ekstraksi untuk analisis spesiasi arsenic dalam CRM Daun Tembakau Virginia (Bohari, et al., 2002).	176
Tabel 17. Beberapa contoh spesies logam dan metaloid yang dianalisis menggunakan metode tandem (<i>hyphenated methods</i>) (Michalski, et al., 2013)	180
Tabel 18. Performa Analitik Spesiasi Arsenik dengan HPLC-HG-AAS (Bohari, et al., 2001).	184
Tabel 19. Evaluasi stabilitas spesies arsenik dalam ekstrak ikan hiu dan CRM DORM-3 yang disimpan pada temperature kamar, dingin dan beku. Hasil dalam $\mu\text{g g}^{-1}$ (as As), $n = 3$ (Schmidt, et al., 2018)	192



DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Diagram alir suatu analisis sampel
(Majors & Wilmington, 2013)12
- Gambar 2. Sampel akhir yang digunakan untuk analisis haruslah
merupakan representasi dari keseluruhan populasi
(Majors & Wilmington, 2013)13
- Gambar 3. Klasifikasi jenis analisis berdasarkan ukuran sampel
(Skoog, et al., 2014)14
- Gambar 4. Klasifikasi tipe komponen berdasarkan level
konsentrasi analit (Skoog, et al., 2014)15
- Gambar 5. Waktu yang diperlukan untuk analisis jenis kromatografi
(Majors & Wilmington, 2013)34
- Gambar 6. Sumber-sumber kesalahan (*error*) yang dapat muncul
pada analisis dengan kromatografi
(Majors & Wilmington, 2013)36
- Gambar 7. Diagram alir gambaran sederhana suatu rangkaian analisis
sampel lingkungan (Krasnodębska-Ostęga, et al., 2018) ...37
- Gambar 8. Prinsip membrane filtrasi (Wu & Imai, 2012)51
- Gambar 9. (a) Ilustrasi teori sentrifugasi (Aryal, 2018) dan
(b) Ilustrasi proses sentrifugasi (Anon, 2021).....53
- Gambar 10. (a) Sampel dengan campuran berbagai komponen
yang mengandung entitas target dan non-target, (b) isolasi
entitas target menggunakan medan magnet, (c) target
terkonsentrasi setelah pemindahan non-target56

Gambar 11. Ilustrasi Suatu Proses Kristalisasi	59
Gambar 12. Bagan proses pembuatan garam evaporasi kadar NaCl tinggi (Purbani, 2009)	61
Gambar 13. Diagram Titik Didih, Kesetimbangan fasa cair-gas (Tham, 1997)	63
Gambar 14. Diagram Titik Didih, Kesetimbangan fasa cair-gas (Tham, 1997)	65
Gambar 15. Ilustrasi hubungan antara tekanan suhu dan fraksi mol, contoh campuran heksana dan heptana	66
Gambar 16. Perbandingan fraksi mol pada fase cair dan fase uap yang dihubungkan dengan α	68
Gambar 17. Ilustrasi perbedaan kelarutan suatu senyawa pada dua pelarut berbeda	72
Gambar 18. Ilustrasi ekstraksi, di mana zat terlarut terdistribusi di antara dua pelarut	72
Gambar 19. Tiga kemungkinan yang terjadi jika asam benzoate dimasukkan ke dalam campuran eter-air dan benzene-air	75
Gambar 20. Ilustrasi ekstraksi asam butirat dengan 500 ml eter dengan empat cara (kondisi)	78
Gambar 21. Perolehan ekstraksi 4 gr butirat dalam air dengan 500 ml eter pada 10 kali ekstraksi @50 mL.	85
Gambar 22. Hubungan fraksi terlarut dalam pelarut dengan banyaknya perlakuan ekstraksi	88
Gambar 23. Contoh peralatan ekstraksi kontinu cair-cair (Davidson et al. 2019; Mendoza et al. 2019)	89
Gambar 24. Peralatan Extraksi Soxhlet (Wikipedia, 2020; Dabbs et al., 2005)	90

Gambar 25. Peralatan (<i>single glass</i>) ekstraksi counter current yang diperkenalkan pertama kali oleh Lyman C. Craig. Dalam praktiknya tabung tersebut disusun secara seri dalam jumlah cukup banyak (Efstathiou, 2004).	92
Gambar 26. Peralatan yang dioperasional oleh Craig yang terdiri atas 25 tabung (Efstathiou, 2004).	93
Gambar 27. Distribusi fraksi terlarut pada ekstraksi <i>counter current</i>	94
Gambar 28. Ilustrasi percobaan Tsweet	109
Gambar 29. Ilustrasi fenomena partisi dalam kromatografi	111
Gambar 30. Ilustrasi fenomena adsorpsi dalam kromatografi.	112
Gambar 31. Ilustrasi fenomena eksklusi dalam kromatografi	113
Gambar 32. Ilustrasi fenomena pertukaran ion dalam kromatografi . . .	115
Gambar 33. Ilustrasi fenomena afinitas dalam kromatografi	116
Gambar 34. Ilustrasi cara elusi dalam kromatografi	118
Gambar 35. Ilustrasi cara frontal dalam kromatografi	120
Gambar 36. Ilustrasi cara displacement dalam kromatografi	123
Gambar 37. Kurva isothermal ideal (linier)	125
Gambar 38. Kurva isothermal cembung (<i>tailing</i>)	126
Gambar 39. Kurva isothermal cekung (<i>fronting</i>)	126
Gambar 40. Ilustrasi profil kromatogram ideal	129
Gambar 41. Ilustrasi profil kromatogram yang mendekati ideal. Semakin langsing kurvanya semakin baik.	130
Gambar 42. Besaran-besaran dalam kromatogram.	132
Gambar 43. Contoh kromatogram A	133
Gambar 44. Dasar perhitungan teori plate (N)	137

- Gambar 45. Kurva van Deemter (Bigelow, 2009) 139
- Gambar 46. Ilustrasi besaran pada perhitungan resolusi. 142
- Gambar 47. Skema peralatan kromatografi gas 143
- Gambar 48. Jenis kolom yang digunakan pada GC
(Rahman, et al., 2015). 146
- Gambar 49. Perbedaan fisik kolom PLOT, WCOT dan SCOT
(Harvey, 2011) 148
- Gambar 50. Skema peralatan HPLC 154
- Gambar 51. Skema injektor rheodyne atau *injector loop* dalam posisi
mengisi dan injeksi (Dong, 2005) 157
- Gambar 52. Tabel periodik yang menunjukkan unsur-unsur yang
diperlukan untuk kehidupan tumbuhan dan/atau hewan,
dan unsur-unsur yang dapat menjadi racun bagi kehidupan
tumbuhan dan/atau hewan. Beberapa unsur merupakan
unsur hara pada konsentrasi rendah dan bersifat toksik pada
konsentrasi tinggi (Driscoll & Otton, 1994) 165
- Gambar 53. Diagram umum yang menunjukkan perjalanan transfer
dan spesiasi logam-logam runtu di lingkungan.
Sebagai catatan, secara spesifik tidak semua logam memenuhi
diagram ini karena setiap logam mempunyai perjalanan
yang berbeda-beda (Digambar kembali dari Driscoll & Otton,
1994). 167
- Gambar 54. Distribusi kemungkinan keberadaan spesies merkuri
dalam air, atmosfer dan sedimen (Leopold, et al., 2010) . . 168
- Gambar 55. Evolusi spesies arsenik dalam air Danau Daniel Prancis
yang ditambahkan larutan standar As(III) 5 ng.ml⁻¹
(Bohari, et al., 2001) 170

- Gambar 56. Skema metode pemisahan dan deteksi yang paling sering digunakan dalam analisis spesiasi (Michalski, et al., 2013). 179
- Gambar 57. Metodologi analisis untuk spesiasi non-kromatografi senyawa arsenik dengan teknik pembangkit hidrida (Welna dkk, 2020). 181
- Gambar 58. Kromatogram empat spesies Arsenik masing-masing 5 ng/ml : (1) As(III), (2) MMA, (3) DMA dan (4) As(V) (Bohari, et al., 2001) 184
- Gambar 59. Diagram tingkat energi yang menunjukkan transisi yang berhubungan dengan (a) AAS, (b) AES dan (c) AFS. Tanda panah menunjukkan absorpsi atau emisi cahaya (Sahin, 2019) 185
- Gambar 60. Karakterisasi analisis spesiasi menggunakan ICP-MS, yang didasarkan menurut focus bidang analisis (Feldmann, et al., 2018) 187
- Gambar 61. Kromatogram lima spesies arsenic (konsentrasi 2 ng/ml masing-masing) dengan kolom penukar anion Hamilton PRP-X100 dan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Na_2EDTA , dan MeOH sebagai fase gerak (Nguyen, et al., 2018) 188
- Gambar 62. Pemisahan ekstrak *F. velutipes* dengan HPLC (a) SEC-HPLC-DAD; (b) SEC-HPLC-ICP-MS. (Ti, et al., 2020) 189
- Gambar 63. Kromatogram beberapa spesies As, Hg dan Pb pada (a) larutan standar (100 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies arsenik, 10 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies merkuri dan 50 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies timbal) dan (b) tiga material referensi standar (ERM-CE464, SRM 1566b and NMIJ 7532-a) (Zhang, et al., 2020) 190
- Gambar 64. Kromatogram analisis spesiasi merkuri dan timah secara simultan (McSheehy, et al., 2009) 194



BAB 1

KETIDAKPASTIAN

DALAM PENGUKURAN

1. Angka Bermakna dan Makna Angka-angka

Sering kali kita dihadapkan pada pilihan di mana harus menuliskan angka-angka hasil perhitungan atau pengukuran yang kadang-kadang membuat kita ragu. Sebagai contoh pada saat kita akan mendesimalkan pecahan $1/3$ dari hasil perhitungan maka akan muncul angka $0,33333333\dots$ etc, demikian juga pada pecahan $2/3$ dari hasil perhitungan akan muncul angka $0,66666666\dots$ etc. Tentu saja kita sudah memahami metode pembulatan ke atas atau ke bawah, menjadi $0,33$ atau $0,67$, akan tetapi permasalahannya adalah kita akan berhenti pada berapa digit di belakang tanda koma? Pada laporan praktikum mahasiswa yang ditemui, sering kali hal ini tidak diperhatikan, di mana mahasiswa dengan bebas menulis menurut 'keinginan'-nya saja.

Pada kesempatan lainnya, jika kita bertanya berapa luas tanah tempat tinggal mahasiswa, kita akan memperoleh jawaban semisal 10 meter x 20 meter, atau paling tidak $12,5$ meter x 20 meter. Sangat jarang menemukan jawaban semisal $10,2$ meter x $20,7$ meter untuk ukuran luas tanah tempat tinggal. Atau pada kesempatan lain lagi, kita meminta mahasiswa menimbang satu karung sampel tanah maka akan diperoleh jawaban umum semisal 96 kg atau $95,5$ kg dan jarang sekali ada yang melaporkan angka semisal $96,002$ kg.

Angka bermakna, adalah penting untuk menjadi perhatian dalam penulisan hasil-hasil perhitungan atau pengukuran. Pada saat kita melakukan titrasi asam-basa menggunakan buret yang skala pengukuran terkecilnya adalah 1 ml, maka akan sangat riskan jika kita melaporkan titik akhir titrasi pada angka semisal 12,3 ml karena batas terendah pengukuran adalah 1 ml, sekalipun hasil perhitungan di atas kertas menunjukkan angka 12,3 ml. Kita harus menyesuaikan angka-angka yang secara praktis dapat dipertanggungjawabkan. Pada saat kita melakukan penimbangan dengan menggunakan neraca analitik dengan skala empat digit, maka kita dapat melaporkan hasil penimbangan atau perhitungan dari hasil penimbangan dengan angka-angka semisal 1,2834 gram, sebaliknya jika hanya menggunakan neraca dengan skala dua digit saja, maka kita hanya berhak melaporkan hasil dengan angka 1,28 gram setelah pembulatan. Dengan kata lain, penulisan jumlah digit nilai pengukuran atau perhitungan dari hasil pengukuran akan bermakna jika menyesuaikan dengan sensitivitas alat ukur yang kita gunakan.

Kebermaknaan angka-angka juga dapat dilihat jika kita menuliskan hasil penimbangan satu karung sampel tanah sebesar misalnya 128,1256 kg. Tiga digit terakhir setelah tanda koma sesungguhnya kurang terlalu bermakna dibanding angka utama 128 kg. Besaran 25,6 gram dibanding 128 kg sesungguhnya dapat diabaikan. Di samping itu, alat ukur neraca atau timbangan yang dapat mengukur bobot ratusan kilogram umumnya tidak sampai pada ketelitian 1 milligram. Sebagai panduan, kepada para mahasiswa dalam menuliskan angka-angka hasil pengukuran dan perhitungan diharapkan untuk memperhatikan angka-angka bermakna dengan realistis.

Makna Angka-angka, adalah hal yang penting dalam pelaporan hasil analisis kimia. Sebagai contoh, seorang mahasiswa yang diminta menganalisis kandungan logam berat Cd dan Pb pada air Sungai Mahakam, memberikan laporan seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Contoh penulisan laporan hasil pengukuran

Lokasi	Pb (ppm)	Cd (ppm)
A	5	-
B	0	3
C	2	5
D	4	0,005

Pada tabel 1 tersebut adalah contoh pelaporan yang sering dijumpai baik pada laporan praktikum, laporan penelitian skripsi atau bahkan laporan penelitian tesis. Pemberian informasi ini tentu saja terlihat sangat jelas, akan tetapi terdapat kekeliruan mendasar jika hal itu menyangkut hasil penelitian atau praktikum.

Penulisan angka nol (0 ppm), berarti menjustifikasi bahwa di dalam air Sungai Mahakam tidak mengandung Pb, padahal sesungguhnya kemungkinan Pb ada dalam perairan tersebut. Hal yang terjadi adalah bahwa sebenarnya metode dan instrumen yang digunakanlah yang tidak dapat mendeteksi keberadaan Pb dalam air yang diuji. Dengan demikian seharusnya pada angka 0 tersebut ditulis *nd* (*non detected*) atau *tt* (tidak terdeteksi). Perbedaannya dengan penulisan tanda *garis datar* (-) adalah pada tanda garis datar berarti tidak dianalisis atau tidak dikerjakan.

Penulisan angka lainnya seperti 5; 2; 4 ppm dan seterusnya memiliki makna yang sama dengan penulisan angka 0 tadi, yaitu memastikan bahwa di dalam air sampel sungai terdapat 5 ppm Pb di Lokasi A, 2 ppm Pb di lokasi B dan 4 ppm Pb di lokasi C. Angka-angka tersebut sebenarnya adalah angka rata-rata dari minimal 3 kali perulangan (*triplo*) atau lebih. Kita tidak boleh mengabaikan bahwa kita memiliki tingkat kesalahan (*error*) yang dituangkan minimal pada angka standar deviasi (SD) pada masing-masing pengukuran. Oleh karena itu, penulisan angka rata-rata tanpa mencantumkan plus-minus standar deviasi akan memberikan makna yang berbeda dari yang sebenarnya. Penulisan angka 5 ppm saja berarti kita memastikan bahwa di dalam air

tersebut mengandung 5 ppm Pb, tidak lebih dan tidak kurang, padahal sebenarnya memiliki standar deviasi misalnya 0,3 ppm. Jadi seharusnya dalam laporan ditulis $(5 \pm 0,3)$ ppm, atau kandungan Pb dalam air Sungai Mahakam pada lokasi A berada pada rentang 4,7 ($5 - 0,3$) ppm hingga 5,3 ($5+0,3$) ppm. Dengan menulis hasil seperti ini akan memberikan tingkat kepercayaan yang baik terhadap laporan yang kita sampaikan.

Penulisan angka 0,005 ppm Cd pada lokasi D juga perlu di evaluasi, mengingat angka tersebut sangat kecil dibanding angka lainnya. Evaluasi yang harus dilakukan adalah dengan melihat batas deteksi (*limit of detection, LOD*) instrumen atau metode yang digunakan. Batas deteksi adalah batas terendah yang boleh dilaporkan yang dihitung berdasarkan signal blanko ditambah tiga kali standar deviasi blanko. Jika hasil pengukuran berada di bawah LOD maka angka hasil pengukuran tersebut tidak boleh dicantumkan. Misalnya pada contoh di atas, LOD instrumen adalah 0,01 ppm, maka seharusnya angka 0,005 ppm Cd dituliskan $< LOD$ (di bawah batas deteksi).

Berdasarkan koreksi dari koreksi Tabel 1 tersebut, sebaiknya laporannya disampaikan sesuai dengan format tabel 2 berikut:

Tabel 2. Koreksi tabel 1 contoh penulisan laporan hasil pengukuran

Lokasi	Pb (ppm)	Cd (ppm)
A	$5 \pm 0.3^*$	-
B	nd	$3 \pm 0,2^*$
C	$2 \pm 0,05^*$	$5 \pm 0,3^*$
D	$4 \pm 0,2^*$	$< LOD$

Sering kali cara-cara penulisan hasil pengukuran atau perhitungan seperti ini tidak mendapat perhatian (terabaikan), tetapi mengingat makna yang terkandung dalam informasi tersebut sangat penting maka seharusnya menjadi hal yang sangat utama untuk diperhatikan oleh mahasiswa dan peneliti.

2. Ketelitian dan Ketepatan

Apabila kita bertanya kepada mahasiswa berapa tinggi Tugu Monas di Jakarta, mungkin dengan mudah mereka menjawab 137 meter, tetapi jika pertanyaan diubah “apakah tugu Monas itu termasuk tugu atau menara kategori tinggi?”, tentu saja jawabannya akan bervariasi, bisa tinggi dan bisa juga rendah, tergantung pembandingnya (standar). Bagi yang menjawab tinggi, mungkin saja membandingkannya dengan Tugu Jogja yang hanya 15 meter, tetapi yang menjawab rendah, kemungkinan membandingkannya dengan Menara Petronas di Kualalumpur yang memiliki tinggi 452 meter, atau menara Eiffel di Paris yang setinggi 324 meter. Pertanyaan sederhana ini memiliki makna bahwa kesimpulan terhadap pengukuran sesuatu sangat ditentukan oleh standar yang digunakan.

Standar menjadi sangat penting dalam pengukuran kimia. Siapa yang mengetahui kandungan Pb sesungguhnya (*true value*) di dalam air Sungai Mahakam?, atau kandungan merkuri yang tersisa pada eks-tambang emas di Kelian Kaltim?. Pengukuran boleh saja dilakukan dengan peralatan instrumen modern, tetapi siapa yang menjamin bahwa kandungan sebenarnya adalah sesuai dengan hasil pengukuran tersebut? Pendekatan yang paling mungkin dilakukan adalah penggunaan standar yang dapat menggunakan larutan murni *titrisol*, CRMs (*certified reference materials*), atau pelarutan bahan kimia berdasarkan perhitungan stoikhiometri. Selain standar tersebut, metode juga mempengaruhi hasil analisis yang dapat berupa metode sampling, preparasi hingga deteksi. Kekeliruan memilih metode akan dapat mempengaruhi hasil pengukuran dan dapat berakibat semakin jauh dari *true value*. Pada beberapa analisis kimia harga *true value* dapat ditentukan secara teoritis melalui perhitungan stoikhiometri, sebagai contoh pada analisis titrasi asam-basa, titik equivalen dapat ditentukan melalui perhitungan di mana dapat dianggap sebagai *true value* yang kemudian dibandingkan dengan titik akhir titrasi yang merupakan hasil eksperimen.

Kesalahan (*error*) dalam analisis kimia adalah hal yang sangat mungkin terjadi, mengingat bahwa peneliti atau mahasiswa adalah manusia biasa yang sangat mungkin untuk memiliki kesalahan baik pada saat penimbangan, pelarutan, pencampuran, dan lain-lain. Eksperimen dari para peneliti selalu memiliki salah satu dari tiga jenis *error* yaitu ***gross error***, ***random error*** (kesalahan acak) dan ***systematic error*** (kesalahan sistematik) (Miller & Miller, 2005). *Gross error* tentu harus dihindari karena merupakan kesalahan fatal dan tidak ada alternatif mengatasinya kecuali dengan mengulangi eksperimen dari awal, sebagai contoh peralatan rusak, kesalahan pembuatan larutan, atau sampel terkontaminasi tanpa sampel cadangan, dan lain-lain. *Random Error* atau kesalahan acak sangat erat hubungannya dengan ketelitian (*precision*) analisis, sedangkan *systematic error* berhubungan dengan ketepatan (*accuracy*) analisis.

Ketepatan (*accuracy*) adalah deviasi atau penyimpangan dari nilai sesungguhnya (*true value*) yang berhubungan erat dengan kesalahan sistematik dan sering diestimasi sebagai deviasi rata-rata (*mean*) terhadap *true value* (Mitra & Brukh, 2003) :

$$\text{Ketepatan} = \frac{(\text{nilai rerata} - \text{nilai sesungguhnya})}{(\text{nilai sesungguhnya})}$$

Nilai sesungguhnya tidak selamanya diketahui dengan pasti, maka untuk perbandingan, pengukuran dengan metode baku oleh institusi terakreditasi dapat diterima sebagai nilai sesungguhnya (*true value*), atau dengan penggunaan material referensi tersertifikasi (CRMs)

Ketelitian atau Presisi (*precision*) adalah pengukuran reproduibilitas (*reproductibility*) dan dipengaruhi oleh kesalahan acak (*random error*). Hasil dari pengukuran tunggal tidak dapat diterima sebagai *true value*. Sebuah estimasi dari *error* ini penting untuk diprediksi apakah masih masuk dalam range yang diharapkan dekat dengan *true value*. Hal ini dapat dilakukan dengan melakukan pengukuran yang diulang beberapa kali (biasanya ganjil). Ada dua parameter penting yang berpengaruh pada ketelitian ini

yaitu nilai rata-rata atau rerata (*average value*) dan variabilitas pengukuran (*variability of the measurement*). Variabilitas pengukuran sering diidentikkan dengan standar deviasi (SD) yang mencerminkan ketelitian pengukuran. Terminologi lain yang sering digunakan adalah koefisien variasi (*coefficient of variation*) atau standar deviasi relatif (*Relative Standar Deviation, RSD*) yang diekspresikan dalam persen dari hasil perhitungan:

$$RSD = \frac{\text{standar deviasi}}{\text{nilai rerata}} \times 100\%$$

Persen RSD ini yang kemudian sering dijadikan parameter dalam mengekspresikan ketelitian analisis atau pengukuran kimia.

Ilustrasi dari pengertian ketelitian dan ketepatan dapat dijelaskan sebagai berikut: Ada empat orang mahasiswa melakukan titrasi asam basa masing-masing diberi kesempatan untuk 5 kali perulangan dengan menggunakan 10,00 ml NaOH 0,2 Molar yang dititrasi dengan 0,2 Molar larutan HCl. Hasil titrasi dari ketiga mahasiswa tersebut setelah lima kali perulangan seperti terlihat pada tabel 3.



Secara teoritik, berdasarkan perhitungan stoikiometri maka titik ekuivalen dari titrasi ini adalah 10 ml dengan kata lain *true value* dari pengukuran seharusnya 10 ml. Hal ini diperoleh dari perhitungan perbandingan stoikiometri antara NaOH dan HCl adalah sama (koefisien pada persamaan reaksi adalah sama) sehingga jumlah mol harus sama pada saat reaksi terjadi. Karena jumlah mol sodium hidroksida ada 2 mmol (dari 0,2 mol/L x 10 ml) maka HCl yang digunakan seharusnya juga 2 mmol atau untuk konsentrasi 0,2 Molar diperlukan 10 ml asam klorida (diperoleh dari 2 mmol/0,2 M).

Tabel 3. Perbandingan antara ketelitian dan ketepatan (*random* dan *systematic error*)

Mahasiswa	Hasil Titrasi	Rata-rata	Standar deviasi	%RSD	Keterangan
A	10,09 10,10 10,12 10,11 10,10	10,09	0,04	0,4	Teliti Tidak Tepat
B	9,89 10,03 10,11 10,22 9,80	10,01	0,17	1,7	Tepat Tidak Tepat
C	10,21 10,01 9,77 9,68 9,76	9,89	0,02	2,2	Tidak Tepat Tidak Teliti
D	10,04 9,99 10,02 9,98 10,05	10,02	0,04	0,4	Tepat Teliti

Hasil yang diperoleh mahasiswa A memiliki dua karakteristik penting, pertama hasil pengukuran berdekatan satu dengan lainnya dengan standar deviasi yang cukup rendah jika terjadi setiap hari maka hasil tersebut dapat dikategorikan sangat *reproducible* atau memiliki keterulangan yang tinggi. Karakteristik kedua adalah hasil yang diperoleh semuanya lebih tinggi dari nilai rata-rata. Dalam hal ini terdapat *systematic error* pada hasil pengukuran ini dengan melihat hasil yang semuanya lebih tinggi dari nilai rata-rata tersebut. Sistematis error ini mempengaruhi ketepatan (*accuracy*). Sementara dari data mahasiswa A terlihat memiliki *random error* yang kecil yang mempengaruhi *reproducibility* (keterulangan) sehingga dapat dikatakan bahwa hasilnya teliti tetapi tidak tepat.

Mahasiswa B memiliki hasil pengukuran yang bertolak belakang dengan hasil mahasiswa A. Dari nilai rata-ran (10,01 ml) terlihat sangat dekat dengan *true value* sehingga dapat dikarakterisasi sebagai data yang akurat (tepat) tanpa *systematic error* yang berarti. Penyebaran data yang cukup lebar dengan standar deviasi yang besar mengindikasikan ketelitian yang jelek dan kehadiran *random error* yang berarti dapat diidentifikasi. Perbandingan hasil mahasiswa A dan mahasiswa B menunjukkan bahwa *random* dan *systematic error* dapat terjadi secara independen satu dengan lainnya.

Data hasil mahasiswa C dan D kemudian dapat disimpulkan bahwa mahasiswa C memiliki ketelitian (RSD, 2,2%) dan ketepatan (rata-ran, 9,89 ml) yang kurang baik sementara sebaliknya mahasiswa D memiliki ketelitian (RSD, 0,4%) dan ketepatan (rata-ran, 10,02 ml) yang baik.

Tentu saja dalam praktikum atau penelitian, kita menginginkan hasil sebagaimana diperoleh Mahasiswa D yang di samping ketelitian yang bagus juga ketepatannya sesuai. Akan tetapi, jika kita dihadapkan kepada pilihan akan ketelitian dan ketepatan, tentu kita harus benar-benar mempertimbangkan bahwa dalam analisis kimia ketepatan atau kedekatan dengan nilai sesungguhnya adalah sesuatu yang sangat penting.



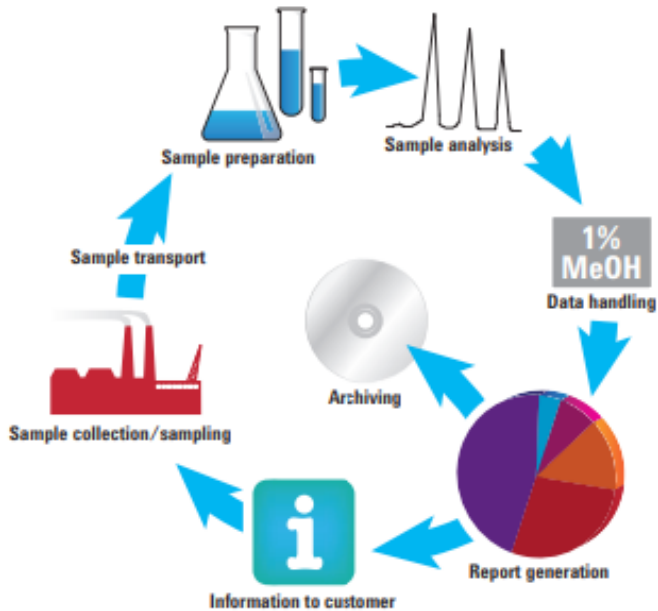
BAB 2

PRESERVASI DAN PREPARASI SAMPEL

1. Preservasi Sampel

Tujuan dari suatu analisis kimia adalah untuk mendapatkan informasi baik kualitatif maupun kuantitatif dari suatu materi atau sampel. Sampel dapat berupa sebuah padatan, cairan ataupun gas. Sampel tersebut dapat berasal dari alam atau sintetis dengan sekian banyak variasi seperti material biologi, sampah, limbah padat, air bawah tanah, udara, dan lain-lain. Dalam melakukan analisis kimia, khususnya kimia pemisahan harus melalui tahapan-tahapan penting sehingga data hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Tahapan umum dari proses pengukuran pada analisis kimia secara umum meliputi sampling (pengambilan sampel), transportasi sampel, preparasi sampel dan analisis sampel (menggunakan instrumen atau metode pengukuran lainnya), kemudian pengolahan data analisis yang secara sederhana diilustrasikan urutan-urutannya pada Gambar 1 (Majors & Wilmington, 2013). Setiap langkah-langkah pada preservasi tersebut memiliki peran yang penting dalam memberikan hasil analisis.

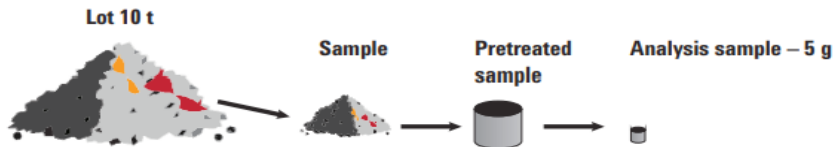
Harus diingat bahwa sering kali, khususnya untuk analisis *trace* dan *ultra-trace* kita hanya mengambil sangat sedikit jumlah sampel (milligram atau mililiter) yang dikumpulkan dari area heterogen yang begitu luas. Harapannya adalah bahwa kita mengambil sampel yang benar-benar mewakili lingkungan seakurat mungkin.



Gambar 1. Diagram alir suatu analisis sampel
(Majors & Wilmington, 2013)

a. Pengambilan Sampel

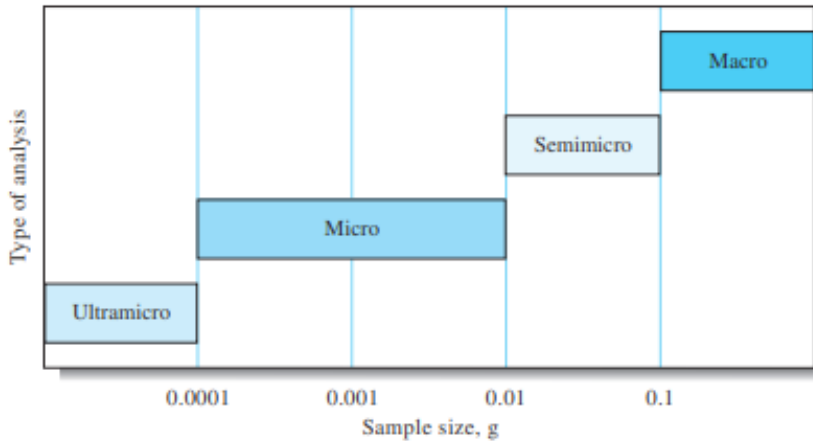
Tahap pertama yang harus dilakukan adalah sampling atau pengambilan sampel. Tahapan ini penting karena mengambil contoh sampel dari objek penelitian dapat bervariasi kondisinya (lokasi, matriks, wujud, dan lain-lain). Inti dari tahapan ini adalah bahwa sampel yang diambil harus merupakan representasi dari keseluruhan populasi atau objek penelitian (Gambar 2). Jumlah sampel yang diambil juga harus dapat diperhitungkan sehingga pada saat analisis tidak kekurangan.



Gambar 2. Sampel akhir yang digunakan untuk analisis haruslah merupakan representasi dari keseluruhan populasi (Majors & Wilmington, 2013)

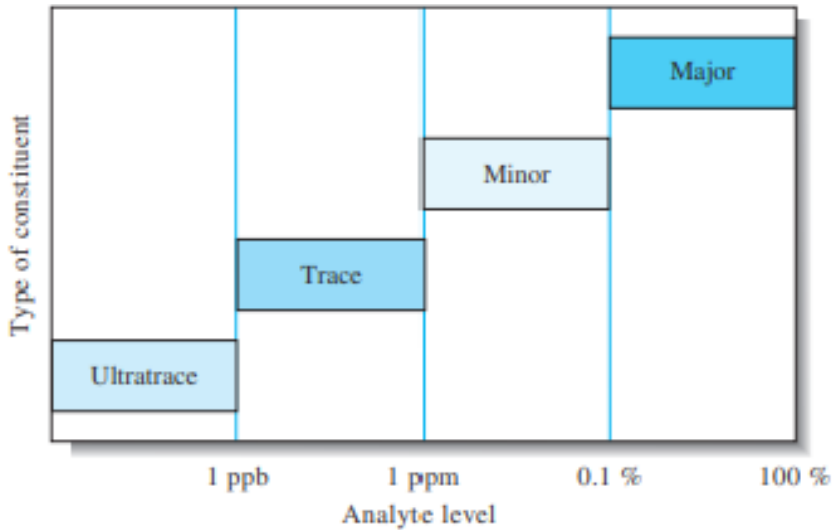
Sangat dianjurkan untuk menyiapkan sampel duplikat agar apabila sampel utama terjadi kerusakan, kehilangan atau kontaminasi, maka sampel duplikat dapat digunakan, tanpa harus kembali lagi ke lokasi pengambilan sampel. Titik-titik pengambilan sampel juga merupakan hal penting untuk menjadi perhatian, sebagai contoh pada saat analisis kalsium pada air danau harus dipertimbangkan bahwa pada air danau kemungkinan terdapat variasi konsentrasi berdasarkan lokasi atau bagian-bagian dari danau tersebut, termasuk memperhitungkan pengambilan sampel berdasarkan kedalaman air dan juga waktu atau musim (hujan atau kemarau).

Gambar 3 memberikan ilustrasi bahwa ukuran sampel berpengaruh pada jenis analisis yang dilakukan. Nama **analisis makro** diberikan untuk sampel dengan massa lebih besar dari 1 gram. **Analisis semi-mikro** adalah istilah yang diberikan untuk sampel dengan massa pada rentang 0,01 sampai 0,1 gram, sedangkan **analisis mikro** adalah analisis yang massa sampelnya berada pada rentang 10^{-4} sampai 10^{-2} gram. Untuk sampel dengan massa kurang dari 10^{-4} gram diistilahkan **analisis ultra-mikro** (Skoog, et al., 2014). Berdasarkan klasifikasi ini berarti jika kita analisis tanah dengan jumlah sampel 1 gram maka kita berarti kita melakukan analisis makro, sedangkan untuk analisis 5 mg sampel bubuk tanaman merupakan analisis mikro. Preservasi dan preparasi sampel untuk masing-masing jenis analisis tersebut tentu memerlukan teknik yang berbeda pula.



Gambar 3. Klasifikasi jenis analisis berdasarkan ukuran sampel (Skoog, et al., 2014)

Selanjutnya, jenis-jenis komponen (*constituent*) dalam prosedur analisis sampel diilustrasikan pada gambar 4 yang meliputi wilayah yang sangat lebar. Tidak jarang diperlukan metode analisis seperti *gravimetric* atau volumetri yang dapat digunakan untuk menentukan komponen utama (**komponen mayor**) yang berada pada range konsentrasi antara 1 sampai 100% massa. Demikian juga halnya dengan sampel yang berada pada rentang 1 ppm hingga 1% dikategorikan sebagai **komponen minor**. Sementara tipe komponen yang berada pada rentang konsentrasi antara 1ppb hingga 1 ppm dikategorikan sebagai komponen-runut (*trace constituent*) dan dibawah 1 ppb masuk dalam kategori komponen ultra-runut atau *ultra-trace constituent* (Skoog, et al., 2014). Jadi penentuan sampel 1 mg arsenik dari dalam tanah dengan konsentrasi 100 ng/L adalah merupakan sesuatu analisis mikro pada komponen ultra-runut.



Gambar 4. Klasifikasi tipe komponen berdasarkan level konsentrasi analit (Skoog, et al., 2014)

Permasalahan yang muncul kemudian adalah proses pengambilan sampel sering kali dilakukan oleh seseorang yang tidak memiliki keterampilan dari segi metodologinya. Analisis kimia di laboratorium sering tidak terlibat langsung dalam proses samplingnya. Hal ini berpotensi kehilangan informasi penting dan juga dapat memberikan hasil yang bias dari sisi ketelitian dan ketepatan. Oleh karena itu, seharusnya teori tentang sampling harus tetap menjadi bagian dari kurikulum untuk disiplin ilmu non-kimia analitik. Sangat disarankan untuk membuat perencanaan yang matang pada saat analisis kimia yang di dalamnya termasuk teori pengambilan sampel.

Salah satu jenis sampel yang sangat penting untuk mendapatkan perhatian pada saat sampling adalah sampel air di lingkungan. Untuk itu, beberapa petunjuk umum yang perlu menjadi perhatian untuk pengambilan sampel air adalah sebagai berikut (Khadse, 2010):

- Mencuci atau membilas wadah sampel sebanyak tiga kali dengan menggunakan air sampel.
- Menyisakan sedikit ruang udara dalam botol sampel untuk memudahkan pencampuran atau homogenisasi sampel pada saat akan dilakukan analisis atau preparasi. Kecuali jika analit akan terganggu dengan kehadiran udara/oksigen (terjadi oksidasi).
- Wadah sampel hari diberi wadah dengan benar.
- Kode sampel dan tanggal pengambilan sampel harus tercatat dengan benar.
- Formulir identifikasi sampel harus terisi dengan lengkap dan benar.
- Formulir identifikasi sampel tersebut harus diisi pada setiap titik atau stasiun pengambilan sampel dilakukan agar tidak ketinggalan berbagai informasi penting yang kemungkinan ada di lapangan.
- Jika menggunakan lebih dari satu botol pada titik sampling yang sama, semua identitas sampel harus dibuat dalam form yang sama.
- Identitas sampel harus tersimpan dalam master data di laboratorium ketika sampel dianalisis.

Dari sudut pandang statistika, tujuan dari suatu proses pengambilan sampel adalah (Skoog, et al., 2014):

- Untuk mendapatkan konsentrasi rata-rata analit yang merupakan pendekatan atau representasi dari rata-rata populasi. Hal ini hanya dapat terwujud jika semua anggota populasi memiliki kemungkinan atau peluang yang sama untuk dimasukkan ke dalam sampel.
- Untuk mendapatkan variansi konsentrasi analit yang diukur yang merupakan pendekatan dari variansi populasi, agar dapat ditemukan batas kepercayaan yang valid untuk rata-rata, dan berbagai uji hipotesis dapat diterapkan. Hal ini hanya dapat dicapai jika setiap sampel memiliki kemungkinan yang besar untuk diambil secara seimbang.

b. Identitas Sampel (Label)

Label dari sampel adalah hal yang sangat penting. Suatu sampel yang tidak diberi label dengan baik maka akan menjadi mimpi buruk untuk analisis yang dilakukan. Pelabelan sampel diperlukan paling ridak untuk hal-hal sebagai berikut:

- Mengurangi risiko kontaminasi.
- Mengurangi risiko kecelakaan kerja pada diri sendiri dan orang lain.
- Menjaga lingkungan kerja yang bersih dan teratur.
- Menghindari kehilangan atau kerusakan sampel yang sangat berharga.
- Menjaga integritas data penelitian yang dilakukan.

Untuk identitas sampel, maka setidaknya-tidaknya memiliki label pada botol sampel dengan bahan yang tahan air dan memuat informasi penting terkait sampel, sekurang-kurangnya informasi tersebut meliputi:

- Kode atau nomor sampel yang dapat merupakan identitas lokasi atau identitas sampel.
- Lokasi di mana sampel diambil bisa dalam bentuk koordinat atau alamat dan lain-lain.
- Waktu pengambilan sampel yang dapat meliputi waktu, hari dan tanggal pengambilan.
- Sumber dan tipe sampel yang diambil.
- Variabel yang berpengaruh terhadap sampel selama pengambilan seperti temperatur udara, ketinggian, kedalaman air, kelembapan, dan lainnya.
- Perlakuan yang telah dilakukan terhadap sampel, seperti pengawetan, stabilisasi, dan lainnya.

- Tipe sampel, misalnya sediment, jamur, batuan, air sungai dan lain-lain.
- Beberapa catatan yang harus diketahui oleh analis di laboratorium.
- Nama petugas pengambil sampel.

Dalam melakukan pelabelan, maka diupayakan agar label ditulis dengan tinta yang tidak luntur, atau jika mungkin dicetak. Bahasa yang digunakan adalah bahasa universal yang harus dapat dipahami oleh semua orang di laboratorium. Diupayakan label dapat terlindungi menggunakan selotip bening yang ditempel pada wadah secara merata. Jika menggunakan perekat atau lem harus dapat bertahan pada suhu panas (min. 70°C) ataupun suhu dingin. Sebaliknya, sebaiknya dihindari menulis langsung ke wadah menggunakan spidol atau pensil, atau menulis dengan tidak jelas dan juga menghindari menggunakan bahasa yang tidak dimengerti oleh setiap orang di laboratorium.

c. Transportasi Sampel

Selanjutnya, pada saat sampel sudah diambil di lokasi pengambilan, maka tantangan berikutnya adalah bahwa sampel harus dibawa ke laboratorium tanpa boleh ada perubahan karakteristik kimia atau fisik dari sampel tersebut. Banyak pihak yang menganggap ini hal biasa, dan bahkan orang beberapa tidak memperhatikan, tetapi ketika sampel kita mengandung senyawa volatil, tidak stabil atau reaktif, maka persoalan transportasi ini menjadi sangat penting, apalagi jika jarak antara tempat pengambilan sampel dengan laboratorium cukup jauh. Untuk mengatasi hal ini, biasanya teknik pengawetan menjadi penting untuk dilakukan untuk meminimalkan perubahan selama periode pengangkutan dan juga penyimpanan. Pengawetan yang baik akan mengurangi perubahan fisika seperti adsorpsi, difusi dan volatilisasi serta perubahan kimia seperti oksidasi dan degradasi mikrobiologi (Majors & Wilmington, 2013). Upaya-upaya

yang dapat dilakukan kepada sampel antara masa pengambilan sampel hingga masa preparasi adalah sebagai berikut:

- Memilih wadah sampling yang sesuai.
- Menambahkan bahan kimia penstabil seperti antioksidan dan anti bakteri.
- Menyimpan sampel pada pendingin atau freezer untuk menghindari degradasi termal.
- Diadsorpsi pada fase padat ketika di bawa ke laboratorium hingga sebelum analisis.

Pada saat pengangkutan sampel, hal-hal lain yang harus menjadi perhatian adalah menghindari menggunakan wadah dari kaca karena mudah pecah, untuk sampel kering, sebaiknya digunakan kotak logam yang steril, kaleng, tas atau wadah lainnya dengan penutup yang sesuai. Hal yang penting juga adalah bahwa kita tidak boleh lupa bahwa setiap sampel harus diidentifikasi dengan label yang tidak mudah lepas atau kabur, dan untuk pengangkutan menggunakan *container* beku atau dingin agar diperhatikan bahwa wadah benar-benar sudah terisolasi dan tersusun dengan rapid dana aman dari goncangan (Annor, 2009).

Sampel seharusnya dibawa ke laboratorium secepat mungkin, diharapkan kurang dari 48 jam sampel sudah sampai, bahkan sampel yang terkait dengan bakteri atau mikrobiologi lainnya harus dianalisis sebelum 24 jam pengambilan sampel.

d. Penghancuran Sampel

Dalam analisis kimia padatan (sampel padat), sangat diharapkan agar sampel dapat dihaluskan sekecil mungkin dengan alasan antara lain (1) sampel yang lebih halus akan lebih homogen dan lebih mencerminkan representasi populasi sekaligus akan meningkatkan ketelitian dan ketepatan analisis, (2)

sampel yang halus akan lebih mudah dan lebih cepat untuk dilarutkan dan juga akan mudah untuk diekstrak karena memiliki luas permukaan yang lebih besar. Oleh karena itu, sedapat mungkin salam preparasi sampel maka sampel padatan dari jenis apapun akan selalu diupayakan untuk dihaluskan.

Tabel 4. Metode-metode yang digunakan untuk menghaluskan ukuran partikel sampel padat (Majors & Wilmington, 2013)

Particle Size Reduction Method	Description of How Sample Reduction is Performed
Blending	A mechanical blender is used to chop a semi-soft substance into smaller parts, can also refer to the process of blending a heterogeneous sample into a more consistent and uniform sample.
Chopping	Process of mechanically cutting a sample into smaller parts.
Crushing *	Tungsten-carbide variable-jaw crusher can reduce large, hard samples to smaller diameter particles.
Cutting	Cutting mills can reduce soft-to-medium hard materials (<100 μm diameters).
Grinding *	Manual and automated mortar and pastles are the most popular, both wet and dry grinding are used; particles of approximately 10 μm diameters can be achieved.
Homogenizing	Process of making sample a sample more uniform in texture and consistency by breaking down into smaller parts and blending
Macerating	The process of breaking down a soft material into smaller parts by tearing, chopping, cutting, etc.
Milling *	Disk mills pulverize <20 mm diameters hard samples by feeding between stationary and rotating disks with adjustable gap setting; generally reduced to 100 μm in diameter. Rotor-speed mills combine impact and shearing processes to grind soft-to-medium hard and fibrous materials down 80 μm ; balls mills grind material to sub- μm fineness by developing high grinding energy via centrifugal or planetary actions using agate, tungsten carbide, or PTFE-coated stainless steel balls, a soil mill will gently pulverize dried samples of soils, sludges, clays, and similar material by rotating nylon brushes throwing a sample against a chamber wall.

Tabel 4. Metode-metode yang digunakan untuk menghaluskan ukuran partikel sampel padat (Majors & Wilmington, 2013) (lanjutan)

Mincing	The process of breaking down a meat or vegetable product into smaller parts by tearing, chopping, cutting, dicing, etc.
Pressing	Generally, the process of squeezing liquid from a semi-solid material (e.g. plants, fruit, meat).
Pulverizing*	Electromechanically-driven rod or vibrating bases used to particle size of wet or dry samples; freezer mil can be used with liquid N ₂ to treat malleable samples or those with low glass transition temperatures.
Sieving	Process of passing a sample through a metal or plastic mesh of a uniform cross-sectional area (square openings from 3-123 μm) in order to separate particles into uniform sizes; both and dry sieving can be used.
*The mechanical devices generate a considerable amount of heat and high shear forces that may be detrimental to the integrity of certain samples, such as polymers, which may undergo molecular weight degradation.	

Secara umum, metode-metode yang digunakan untuk mengecilkan atau menghaluskan ukuran partikel sampel dirangkum pada Tabel 4. Sering kali, tergantung pada ukuran partikel, awalnya diperlukan pengurangan ukuran secara kasar dahulu kemudian yang lebih halus. Contohnya saat analisis sampel kentang, biasanya dipotong-potong terlebih dahulu (kasar) kemudian di blender menjadi lebih halus (padatan lunak). Untuk material sampel yang lebih keras, kadang-kadang diperlukan peralatan khusus dengan pendekatan yang lebih ekstrim seperti penggunaan mesin penghancur, penggiling dan peralatan ‘berat’ lainnya. Pemilihan alat-alat tersebut ditentukan oleh beberapa parameter seperti (Majors & Wilmington, 2013):

- Tipe materialnya berdasarkan tingkat kekerasannya (material keras, batuan, kertas, *tissue*, plastik, tanaman dan lain-lain).
- Bentuk awal partikelnya (potongan, bubuk, dan lain-lain).
- Ukuran partikel akhir yang diinginkan (ukuran mm, μm).
- Jumlah akhir sampel yang diperlukan.
- Kontaminasi atau pengotor yang mungkin terjadi dan mengganggu analisis.

e. Pengeringan dan Penyimpanan Sampel

Khusus untuk sampel padat, sering kali berada pada kondisi basah dan diperlukan upaya untuk mengeringkannya agar supaya diperoleh berat yang konstan. Untuk sampel anorganik seperti dalam tanah harus dipanaskan pada suhu 100–110 °C untuk meyakinkan bahwa sampel tersebut tidak lembap. Untuk sampel organik yang hidrofobik jarang memerlukan pemanasan, sepanjang absorpsi airnya minimal. Akan tetapi uap organik terkadang juga diabsorpsi oleh sampel organik pada dan langkah pemanasan adalah salah satu cara untuk menghilangkan kontaminan ini. Untuk sampel higroskopik atau reaktif seperti asam anhidrida, direkomendasikan untuk dilakukan pengeringan dengan menggunakan desikator vakum. Sampel-sampel yang dapat teroksidasi pada kehadiran udara harusnya dikeringkan dengan desikator vakum. Sementara itu, untuk sampel-sampel biologi, umumnya tidak dipanaskan lebih dari 100 °C, dan suhu di atas suhu kamar harus dihindari agar dekomposisi sampel tidak terjadi. Oleh karena itu senyawa-senyawa biologi yang sensitive seperti enzim sering kali disimpan dan dilakukan preparasi pada ruang dingin di bawah 4°C untuk meminimalkan dekomposisi.

Tabel 5. Beberapa contoh kondisi penyimpanan sampel (diterjemahkan bebas dari (European Commission, 2012))

Product	Conditions
Sampel Sensitif Cahaya	Disimpan dalam Ruang Gelap
Sampel yang mengeluarkan racun atau bau tidak sedap.	Dapat disimpan dalam lemari asam atau ruangan dengan ventilasi mekanik yang cukup
Sampel mudah terbakar dan sampel berbahaya lainnya	Disimpan dalam penyimpanan khusus dan aman. Jika tidak tersedia, harus dikonsultasikan dengan laboratorium untuk kondisi penyimpanan
Sampel yang mudah hancur/rusak	Disimpan dalam freezer atau refrigerator tergantung pada karakter produknya
Sampel yang sangat mudah rusak	membekukan sampel berkonsultasi dengan laboratorium
Sampel produk dingin	Disimpan pada suhu sekitar 4 °C.

Tabel 5. Beberapa contoh kondisi penyimpanan sampel (diterjemahkan bebas dari (European Commission, 2012)) (lanjutan)

Sampel produk beku	Disimpan pada suhu sekitar - 18 °C.
Sampel kemasan produk makanan, obat-obatan dan farmasi	Disimpan sesuai dengan kondisi paket yang berlabel dan tidak boleh lebih dari 25 °C.
Sampel mineral dan minyak	Bahan mudah terbakar yang harus disimpan pada ruang berventilasi baik

Tabel 5 merangkum secara umum penyimpanan sampel sedapat mungkin harus dilakukan diruangan yang bersih, kering, gelap, dingin dan cukup ventilasi. Temperatur ruang penyimpanan harus selalu dimonitor secara regular dan jangan sampai drop hingga di bawah 0 °C dan juga tidak boleh lebih dari 30 °C. Sampel bahan makanan harus disimpan terpisah dari sampel lain, kemudian barang yang mudah rusak atau terdekomposisi harus disimpan di lemari es atau *freezer*. Jika dibekukan, sampel harus dijaga pada suhu di bawah -18 °C dan suhu penyimpanan harus dipantau secara teratur. Selain itu, Zat yang mudah terbakar harus disimpan sesuai dengan peraturan keselamatan kebakaran (European Commission, 2012).

f. Pengukuran *In-Situ*

Sangat sering terjadi dan jika memungkinkan, preservasi sampel tidak perlu dilakukan. Pengukuran langsung dapat juga dilakukan pada saat sampling (*in situ*), hal ini terjadi mengingat beberapa parameter-parameter kimia dan fisika tidak dapat dilakukan secara akurat jika melalui proses preservasi dan preparasi terlebih dahulu.

Pengambilan, penyimpanan dan preparasi sampel sangat berpengaruh terhadap hasil analisis. Dalam beberapa kasus atau beberapa parameter tertentu pengaruhnya sangat besar sehingga lebih disarankan untuk dilakukan analisis di lokasi tanpa harus membawa sampel ke laboratorium.

Contohnya, pada pengukuran keasaman air sungai, danau atau laut, pengukurannya langsung dilakukan ditempat dengan pH-meter *portable*. Demikian juga halnya dengan pengukuran suhu, kelembapan, oksigen

terlarut, konduktivitas, kekeruhan dan beberapa parameter lainnya dapat dilakukan secara langsung di lapangan (*on site*). Hal ini tentu memerlukan peralatan khusus yang *portable*, tetap untuk saat ini sudah tersedia secara komersial.

g. Aspek Lain yang Berpengaruh

Tahapan preservasi sampel merupakan tahapan selanjutnya yang sangat penting dalam analisis kimia. Pengaruh proses kimia, fisika, dan biologi dapat mengubah komposisi sampel setelah diambil dari lapangan. Proses kimia yang dapat mengubah komposisi kimia sampel misalnya reaksi-reaksi fotokimia, oksidasi dan juga pengendapan (*precipitation*). Sementara proses fisika seperti volatilisasi, difusi dan adsorpsi pada permukaan juga dapat mempengaruhi komposisi sampel sehingga kemungkinan berubah dari kondisi aslinya. Di sisi lain peristiwa biologi yang dapat berupa biodegradasi dan reaksi-reaksi enzimatis dapat berperan dalam perubahan komposisi sampel. Hal yang lebih khusus harus diantisipasi apabila analisis yang dilakukan adalah analisis pada orde sangat kecil seperti analisis konsentrasi rendah atau analisis runtu.

Sampel yang sudah diambil biasanya berada pada kondisi yang sangat berbeda dengan kondisi aslinya. Sebagai contoh analit tertentu dari sampel yang berasal dari air bawah tanah, di mana pada kondisi aslinya tidak pernah terpapar sinar matahari, dapat berubah secara signifikan melalui reaksi fotokimia apabila pada saat pengambilan sampel terpapar sinar matahari. Contoh lain adalah analit tertentu yang sangat mudah teroksidasi apabila bersentuhan langsung dengan udara dapat berubah menjadi kondisi teroksidasi. Tentu saja agak sulit untuk mempertahankan kondisi aslinya pada waktu yang cukup panjang. Teknik preservasi dilakukan paling tidak untuk mempertahankan komposisi sampel hingga pada saat analisis

dilakukan. Lebih cepat analisis dilakukan tentu saja akan lebih baik untuk memperoleh informasi yang akurat, akan tetapi hal yang juga sulit dihindari terjadinya jeda waktu antara sampling hingga analisis.

Tahapan-tahapan yang paling umum dilakukan dalam preservasi sampel adalah:

- Penggunaan wadah penyimpanan yang sesuai
- Mengontrol suhu dan kelembapan
- Penambahan bahan-bahan pengawet
- Mengatur waktu penyimpanan berdasarkan observasi hasil penelitian

Tahapan tersebut sangat tergantung pada jenis analit serta matriks sampel yang ada. Sebagai contoh beberapa logam terlarut dapat stabil di air dalam kurun waktu beberapa bulan, tetapi logam Cr(VI) hanya bisa stabil dalam 24 jam.

Tabel 6. Beberapa teknik preservasi sampel (Mitra & Brukh, 2003)

Sampel	Metode Preservasi	Jenis Wadah	Waktu
pH	-	-	langsung
Suhu	-	-	langsung
Anion Anorganik			
• Br, Cl, F ⁻	Tidak ada	Plastic atau gelas	28 hari
• Chlorine	Tidak ada	Plastic atau gelas	langsung
• Iodide	dinginkan 4°C	Plastic atau gelas	24 jam
• Nitrat, Nitrit	dinginkan 4°C	Plastic atau gelas	48 jam
• Sulfida	dinginkan 4°C, + Zn-asetat dan NaOH hingga pH 9	Plastic atau gelas	7 hari
Logam-Logam			
• Terlarut	Filtrate ditepat, pengasaman hingga pH 2 dengan HNO ₃	Plastic	6 bulan
• Total	pengasaman hingga pH 2 dengan HNO ₃ Pendinginan hingga 4°C	Plastic	6 bulan
• Cr(VI)	pengasaman hingga pH 2 dengan HNO ₃	Plastic	24 jam
• Hg		plastik	28 hari

Tabel 6. Beberapa teknik preservasi sampel (Mitra & Brukh, 2003)(lanjutan)

Organik			
• Karbon organik	Dinginkan 4°C+H ₂ SO ₄ hingga pH 2 Dinginkan 4°C+0,008% Na ₂ S ₂ O ₃	Plastic atau kaca coklat Gelas dg tutup Teflon	28 hari
• Hidrokarbon	Dinginkan 4°C+0,008% Na ₂ S ₂ O ₃	Gelas dg tutup Teflon	14 hari
• Aromatik	Dinginkan 4°C	Gelas atau Teflon	14 hari
• PCBs			7 hari ut ekstraksi
• Organik dalam tanah	Bekukan	Alum minum foil	40 hari se telahnya se gera
• Jaringan ikan	Dinginkan 4°C	Plastic atau gelas	28 hari
• BOD	Dinginkan 4°C	Plastic atau gelas	Tahunan
• COD			
DNA	Simpan di TE (pH 8), dibawah etanol pd -20°C, bekukan pada -20 atau - 80°C		Tahunan
RNA	Deionized formamida pada -80°C		Tahunan
Padatan yng tidak stabil dengan udara	Disimpan dalam box penuh argon dicampur dengan hidrokarbon oil		

Penelitian Bohari et al (2001) mencoba menentukan pengaruh waktu (*holding time*) dan pengasaman terhadap stabilitas spesies arsenik (As(III) dan As(V)) pada sampel air danau yang ditambahkan (*spike*) masing-masing 5 ppm As(III) dan As(V). Hasilnya menunjukkan bahwa tanpa pengasaman As(III) akan terdegradasi dengan cepat menjadi As(V) dalam beberapa hari. Sementara dengan pengasaman menggunakan asam nitrat (0,5%) dapat menahan degradasi As(III) hingga 10 hari dan pada pengasaman menggunakan asam klorida (0,1%) akan dapat menahan degradasi atau oksidasi As(III) menjadi As(V) dalam waktu hingga 2 bulan. Percobaan yang sama dapat dilakukan dengan menambahkan analit (*spike*) ke dalam sampel dengan matriks yang berbeda. Hal ini diperlukan mengingat pada matriks dan jenis analit yang berbeda akan memberikan hasil yang berbeda pula.

Tabel 6 menunjukkan secara umum metode preservasi, jenis-jenis wadah penampungan (*containers*) serta waktu penyimpanan beberapa jenis senyawa pada saat preservasi sampel. Beberapa faktor yang berpengaruh dalam preservasi sampel adalah volatilisasi, pemilihan wadah, absorpsi gas dari atmosfer dan perubahan kimia yang secara ringkas dapat dijelaskan sebagai berikut:

i. Volatilisasi

Senyawa-senyawa yang mudah menguap seperti beberapa senyawa organik volatil (VOC, *volatile organic compounds*), atau gas-gas terlarut seperti HCN, SO₂, dan lain-lain, dapat dengan mudah hilang akibat penguapan. Mengisi wadah sampel hingga penuh dan tidak tersisa ruang kosong adalah cara yang paling banyak dilakukan untuk meminimalkan penguapan. Untuk sampel padatan dapat diisi dengan cairan tertentu untuk menghindari ruang kosong agar tidak terjadi penguapan. Sampel juga sering disimpan pada suhu rendah (4 °C) untuk menurunkan tekanan uap. Guncangan atau pengadukan selama proses penanganan sampel seharusnya dihindari. Demikian juga membekukan sampel cairan (*liquid*) tidak direkomendasikan karena akan menyebabkan pemisahan fase.

Penguapan atau volatilisasi suatu bahan kimia dari permukaan cairan adalah proses partisi di mana bahan kimia tersebut mendistribusikan dirinya sendiri antara fase cair dan gas di atasnya. Bahan kimia organik yang dikatakan mudah menguap menunjukkan kecenderungan terbesar untuk melintasi antarmuka cairan-gas. Ketika senyawa menguap, konsentrasi analit organik dalam larutan berkurang. Sebaliknya, bahan kimia semivolatil dan *nonvolatile* (atau *involatile*) menggambarkan bahan kimia yang memiliki kecenderungan lebih kecil untuk keluar dari cairan untuk masuk ke atmosfer di atas cairan (Wells, 2003).

ii. Pemilihan Wadah / Kontainer

Jenis wadah yang digunakan untuk menyimpan sampel ternyata dapat berpengaruh pada sampel. Permukaan wadah atau container dapat berinteraksi dengan analit. Permukaan dapat berfungsi sebagai katalis (contohnya logam) untuk reaksi atau hanya sekedar adsorpsi *irreversible*. Sebagai contoh logam dapat teradsorpsi *irreversible* pada permukaan wadah

yang terbuat dari kaca/gelas sehingga penggunaan wadah plastik adalah pilihan yang tepat untuk menyimpan sampel air yang kandungan logamnya akan dianalisis. Sampel tersebut juga harus diasamkan dengan HNO_3 untuk membantu menjaga agar kandungan ion logam tetap berada dalam larutan. Molekul-molekul organik juga dapat berinteraksi dengan material wadah yang terbuat dari polimer. Bahan-bahan plastik seperti ester phthalate dapat berdifusi dari plastik ke dalam sampel, dan plastik sendiri dapat berfungsi sebagai penyerap (atau sebagai membran) untuk molekul-molekul organik. Konsekuensinya, bahan kaca/gelas adalah bahan yang cocok untuk analit organik. Tutup botol dapat terbuat dari teflon untuk menghindari kontaminasi dari tutup plastik.

Bahan-bahan seperti minyak dapat terserap dengan kuat oleh permukaan plastik, sehingga untuk menyimpannya digunakan botol kaca/gelas. Minyak yang tersisa pada botol hendaknya dibersihkan dengan menggunakan pelarut sehingga dapat dikembalikan ke dalam sampel.

Pemilihan wadah sampel juga harus memperhatikan beberapa hal sebagai berikut (Benson, 2014):

- Sampel yang volatile harus benar-benar disimpan pada wadah yang tertutup rapat untuk menghindari penguapan.
- Harus dapat dipilih wadah yang sesuai jika sampel harus disimpan di dalam *freezer* atau lemari pendingin
- Sampel yang peka terhadap cahaya harus disimpan dalam botol kuning atau cokelat. Beberapa peneliti juga membungkus botol kecil dengan aluminium foil. Apabila sampel dibungkus dengan aluminium foil, harus mencantumkan label diluarnya.
- Beberapa wadah dapat rusak dengan adanya beberapa bahan kimia dan suhu yang tinggi yang dikhawatirkan akan mencemari sampel. Dalam kondisi ini dipilih wadah yang memiliki penutup dengan bahan yang inert.

- Harus dipilih wadah yang paling sesuai untuk jangka waktu atau lama penyimpanan karena penyimpanan dapat dalam kurun waktu lama ataupun jangka pendek

Peralatan gelas laboratorium yang harganya cukup mahal seperti gelas kimia, erlenmeyer, cawan, dan lain-lain tidak dirancang untuk penyimpanan sampel apalagi dalam waktu jangka panjang karena tidak dilengkapi dengan penutup rapat, meskipun kadang-kadang peneliti menggunakan aluminium foil. Demikian juga dengan wadah dari bahan plastik, tidak selamanya steril dan ada beberapa jenis plastik yang tidak kompatibel dengan banyak pelarut atau suhu ekstrem. Oleh karena itu, sangat direkomendasikan untuk mengecek bahan plastik sebelum digunakan sebagai wadah sampel.

iii. Absorpsi Gas dari Atmosfer

Dalam proses sampling, gas-gas yang berasal dari atmosfer dapat teradsorpsi ke dalam sampel, sebagai contoh, ketika sampel cair dimasukkan ke dalam wadahnya, gas-gas seperti oksigen, karbon dioksida, dan juga VOC (*volatile organic compounds*) dapat terlarut ke dalam sampel tersebut. Keberadaan oksigen dalam sampel dapat mengoksidasi spesies tertentu, seperti sulfit atau sulfide menjadi sulfat, atau spesies logam As(III) menjadi As(V). Demikian juga halnya dengan CO₂, dapat mengubah konduktansi atau pH sampel. Hal ini yang menjadi alasan kenapa pengukuran pH sampel selalu dilakukan di tempat (*on site*). Gas CO₂ juga dapat menyebabkan pengendapan beberapa logam. Keberadaan senyawa organik yang mengontaminasi sampel dapat membuat keliru dalam analisis di mana seharusnya tidak ditemukan akhirnya menjadi terdeteksi. Penggunaan Blanko sangat penting untuk mengetahui terjadinya kontaminasi atau tidak pada sampel.

Dalam kaitan dengan pengambilan sampel gas di atmosfer, terdapat berbagai cara telah dikembangkan di antaranya sebagai berikut (Majors & Wilmington, 2013):

- *Grab Sampling*, teknik di mana sampel gas ditarik ke dalam peralatan gelas, atau tabung, atau dapat juga dengan jarum suntik. Gas juga dapat dipompa ke dalam kantong plastik atau wadah berongga lainnya. Teknik ini sebagian besar digunakan untuk senyawa volatil di udara di mana setelah sampai di laboratorium kemudian diisolasi atau dipekatkan dengan teknik perangkap dingin (*cold trapping*);
- *Solid Phase Trapping*, teknik di mana sampel gas melewati suatu tabung yang dilengkapi dengan adsorben (misalnya silika gel atau karbon aktif), kemudian analit akan terperangkap pada adsorben dan selanjutnya dielusi dengan pelarut yang kuat. Teknik ini digunakan untuk senyawa organik semivolatile di udara. Pengaturan laju aliran gas sangat penting untuk efisiensi adsorpsi dengan menghindari terjadinya pembentukan aerosol, adsorben *overloading*, dan adsorpsi *irreversible* dari analit yang reaktif. Penyerap yang populer seperti silika gel, alumina, polimer berpori (Tenax, busa poliuretan), karbon, reagen pengompleks, cocok meningkatkan efisiensi penjebakan;
- *Liquid Trapping*, teknik di mana sampel gas dialirkan dan digelembungkan melalui suatu larutan yang merupakan pelarut yang baik untuk analit, di mana analit ini memiliki afinitas yang lebih tinggi pada pelarut daripada afinitasnya pada gas. Laju aliran harus cukup rendah agar tidak membuat busa atau aerosol. Penambahan zat pengompleks dapat ke pelarut terkadang diperlukan untuk membantu menjebak analit, dan suhu dapat diturunkan untuk spesies analit yang sangat mudah menguap;

iv. Perubahan Kimia

Perubahan kimia pada saat proses penanganan sampel sangat mungkin terjadi di berbagai kondisi. Untuk sampel anorganik misalnya, control pH sangat penting dilakukan untuk mencegah terjadinya reaksi-reaksi kimia. Sebagai contoh ion-ion logam dapat teroksidasi menjadi bentuk oksida tak larut atau menjadi bentuk hidroksida. Dalam kondisi ini sampel sering diasamkan dengan asam nitrat sampai pH di bawah 2, di mana pada kondisi ini semua nitrat akan larut dan kelebihan nitrat akan mencegah pengendapan logam. Ion-ion lain seperti sulfida dan sianida juga dijaga dengan mengontrol keasamannya (pH). Sampel yang diambil untuk analisis NH_3 sering kali juga diasamkan dengan asam sulfat untuk menstabilkan NH_3 sebagai NH_4SO_4 .

Spesies senyawa organik juga sering mengalami perubahan akibat reaksi-reaksi kimia. Penyimpanan sampel dalam botol gelap dapat mencegah proses fotooksidasi senyawa organik (contoh: *polynuclear organic hydrocarbons*). Senyawa organik dapat juga bereaksi dengan gas-gas terlarut sebagai contoh, senyawa organik dapat bereaksi dengan klorin runtu dan membentuk senyawa-senyawa terhalogenasi pada saat melakukan pengambilan sampel air minum. Dalam hal ini, diperlukan penambahan natrium tiosulfat yang berfungsi menghilangkan klorin dalam sampel.

Sampel juga dapat mengandung mikroorganisme yang kemudian berpotensi mendegradasi sampel secara biologi. Penggunaan pH ekstrim (tinggi atau rendah) dan suhu rendah dapat meminimalkan degradasi *microbial* yang kemungkinan terjadi. Penambahan biosida seperti merkuri klorida atau pentaklorofenol dapat juga dilakukan untuk membunuh mikroba.

v. Kontaminasi

Kontaminasi sangat mungkin terjadi selama proses preservasi sampel. Sumber kontaminasi dapat berasal dari peralatan pengambilan sampel, botol sampel, bahan pengawet, bahan kimia dan standar, atmosfer sekitar, personel yang mengambil sampel dan analisis, tamu laboratorium dan lain-lain. Oleh karena itu, sangat perlu untuk memperhatikan semua aspek selama proses preservasi dan preparasi sampel, agar kontaminasi dapat dicegah. Jika kontaminasi terjadi, akan dapat menimbulkan persoalan serius terkait hasil analisis yang tentu saja dapat menjadi bias dan tidak sesuai dengan kondisi sesungguhnya.

Oleh karena itu, wadah yang digunakan harus benar-benar bersih, bahkan terkadang digunakan cara-cara khusus untuk membersihkannya, tergantung pada parameter yang akan dianalisis. Untuk menghindari kontaminasi silang antar wadah antar parameter jika perlu pada setiap uji parameter atau analit tertentu, menggunakan botol atau wadah yang sama. Beberapa hal yang dapat dipraktikkan untuk mencegah terjadinya kontaminasi adalah sebagai berikut:

- Untuk jenis sampel yang berbeda, misalnya air sungai dengan air limbah, perangkat wadah yang digunakan harus terpisah untuk masing-masing jenis sampel.
- Untuk menghindari kontaminasi dari tangan, setiap langkah dalam percobaan atau penelitian agar menggunakan sarung tangan plastik (Polietilen).
- Debu yang beterbangan di udara termasuk asap pembuangan kendaraan atau mesin yang bercampur di udara dapat mencemari sampel, untuk itu, hindarkan atau minimalkan kontak sampel dengan udara.
- Dalam memperlakukan sampel, analisis atau operator harus benar-benar berhati-hati agar tidak menyentuh bagian dalam botol atau wadah atau penutupnya.

- Wadah atau botol termasuk peralatan gelas yang digunakan harus dijaga dari debu dan kotoran.
- Pipet atau ujung pipet (tips) serta filter (kertas saring atau membrane) sebaiknya digunakan hanya satu kali untuk setiap parameter, analit, larutan atau reagen.

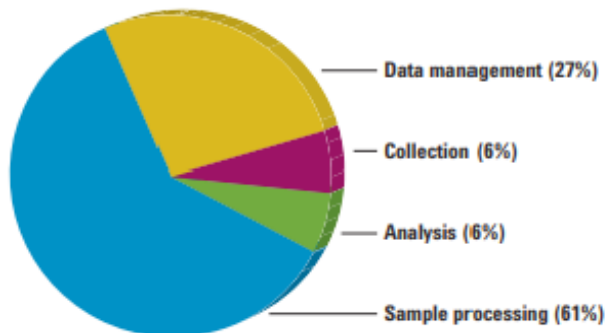
Untuk menjaga agar wadah, peralatan gelas dan peralatan lainnya benar-benar bersih dari kontaminan, cara-cara berikut dapat ditempuh dalam upaya membersihkan dan menghindarkan wadah sampel dan peralatan gelas serta peralatan lainnya dari kontaminan. Cara tersebut tergantung pada parameter dan jenis sampel yang akan diperiksa (Khadse, 2010):

- Untuk analisis logam berat, merendam wadah dan peralatan dengan larutan HNO_3 kualitas suprarur dengan perbandingan 1 : 1, selama 1 minggu yang kemudian diikuti dengan membilasnya sebanyak 3 kali dengan air aquades kualitas *ultra-pure* atau *deionized water*.
- Untuk analisis senyawa *organic runut* (terklorinasi) seperti pestisida, wadah harus dicuci dengan solven atau pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, termasuk kualitas kemurniannya harus tinggi.
- Untuk analisis sampel dengan karakterisasi fisika-kimia yang umum, tidak terlalu memerlukan cara khusus. Cukup dengan pembersihan dengan air untuk menghilangkan partikulat, dan selanjutnya dilakukan pembilasan dengan aquades atau *deionized water* sebanyak dua kali memungkinkan metode yang kurang kuat.
- Untuk pengawetan organisme atau material biologi dengan alcohol atau formalin, harus disimpan dalam botol kaca.
- Semua wadah atau botol yang dibawa ke lokasi pengambilan sampel, harus sudah dibersihkan sebelumnya dan terlindung dari kemungkinan kontaminasi yang tidak disengaja.
- Sebelum sampel diambil di lokasi, wadah sampel harus dibilas dua sampai tiga kali dengan menggunakan air sampel (khusus untuk sampel air/cair).

Selain hal tersebut, hal yang penting juga untuk dilakukan dalam menjaga agar kontaminasi tidak terjadi adalah dengan sterilisasi peralatan dengan *autoclave*. Kemudian secara periodik dan konsisten harus mengecek kualitas udara dan khususnya kualitas air karena akan sangat berpengaruh pada proses analisis.

2. Preparasi Sampel

Dalam analisis kimia, beberapa tahapan-tahapan penting sebelum deteksi atau penentuan konsentrasi harus dilalui agar dapat memperoleh hasil yang valid. Perkembangan teknologi bidang kimia dengan berbagai instrumen modern dengan tingkat ketelitian yang tinggi, tidak serta-merta menghilangkan proses tahapan praanalisis. Tahapan sampling, preservasi sampel dan preparasi sampel memegang peranan sangat penting dalam analisis secara keseluruhan. Gambar 5 menunjukkan hasil observasi secara umum yang menegaskan bahwa dalam satu rangkaian analisis kimia secara umum, waktu rata-rata yang diperlukan untuk pengambilan sampel adalah 6%, preparasi sampel 61%, analisis (*instrumen*) 6%, dan pengolahan data 27% (Majors & Wilmington, 2013).

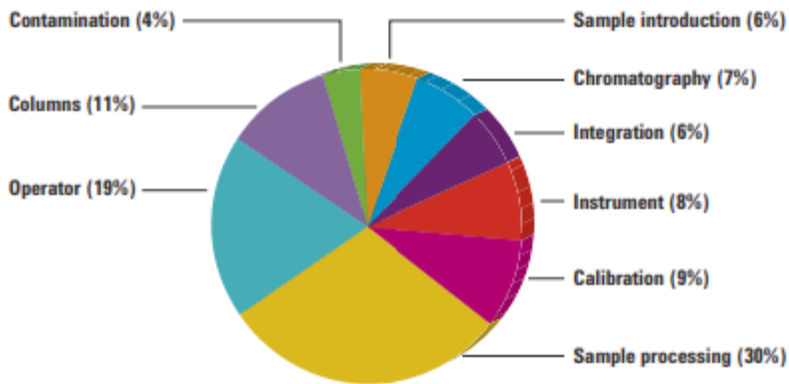


Gambar 5. Waktu yang diperlukan untuk analisis jenis kromatografi (Majors & Wilmington, 2013)

Dari data ini disimpulkan bahwa pengolahan sampel mulai dari pengambilan sampel, preservasi hingga preparasi masih memegang peranan penting dalam analisis dengan menggunakan instrumen apapun. Oleh karena itu, kehati-hatian dalam pengelolaan sampel menjadi hal yang sangat penting dilakukan.

Jika dalam preparasi sampel terdapat kekeliruan, sudah dapat dipastikan dengan alat apapun, hasil analisis akan keliru. Survei *Agilent Technologies* (2013) sebagaimana disajikan dalam gambar 6, pernah menghitung tingkat kesalahan yang mungkin dilakukan pada suatu analisis kimia yang menggunakan peralatan kromatografi (Majors & Wilmington, 2013). Dari data tersebut ditemukan bahwa 30% sumber kesalahan dan merupakan persentasi yang paling tinggi dapat berasal dari proses penanganan sampel termasuk preparasi, preservasi, dan sampling. Dengan demikian menjadi keniscayaan untuk memperhatikan dengan sungguh-sungguh tahapan penanganan sampel, terutama tahapan preparasi.

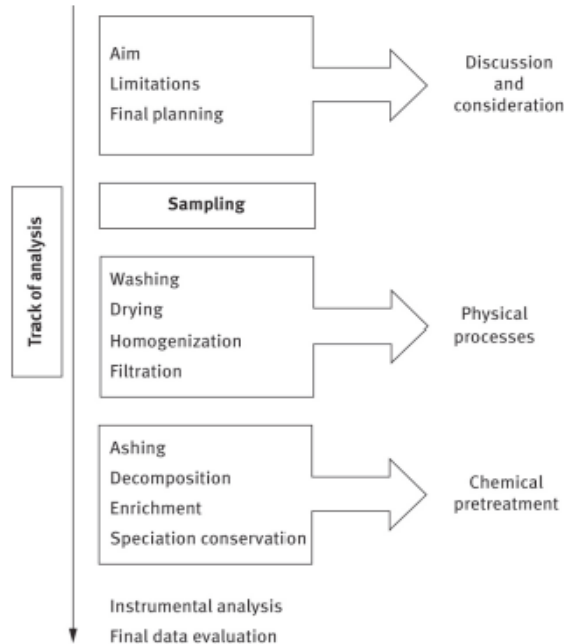
Kebanyakan sampel tidak siap untuk langsung di analisis dengan instrumen, sebagai contoh pada saat akan menganalisis kandungan logam dalam tanah dengan spektrofotometer serapan atom, memerlukan berbagai tahapan sehingga sampel pada akhirnya dapat diukur setelah sampel pada tersebut diolah hingga menjadi bentuk cair dengan tidak mengurangi, menghilangkan atau menambahkan kandungan logam yang ada. Pada analisis pestisida dalam hati ikan misalnya, hati ikan tidak dapat diukur kandungan pestisidanya secara langsung, tetapi perlu di ekstraksi ke dalam larutan yang kemudian baru dapat dianalisis dengan instrumen. Proses penanganan sampel tersebut yang kita namakan preparasi sampel.



Gambar 6. Sumber-sumber kesalahan (*error*) yang dapat muncul pada analisis dengan kromatografi (Majors & Wilmington, 2013)

Tahapan preparasi sampel bervariasi dan tergantung pada jenis sampel, matriks atau pengotor (*impurities*) serta tingkat konsentrasi yang diinginkan. Pada analisis runtu misalnya memerlukan preparasi yang lebih kompleks dibanding pada analisis komponen-komponen utama yang memiliki konsentrasi besar. Secara umum tahapan preparasi sampel meliputi homogenisasi atau pengecilan ukuran partikel, ekstraksi, pemekatan, *clean-up*, dan kemudian baru dapat dianalisis. Meskipun hasil analisis diperoleh dengan menggunakan metode dan peralatan yang canggih, tidak akan memberikan arti apa-apa jika sampelnya tidak merepresentasikan populasi yang diteliti atau untuk analisis spesiasi tidak akan berarti jika terjadi perubahan spesies sepanjang proses sampling hingga preparasinya. Beberapa perubahan kimia seperti pH, oksigenasi atau terpaan UV atau perubahan fisika seperti pengeringan, fragmentasi mempunyai pengaruh pada analisis kimia. Untuk itu, semua langkah-langkah dalam analisis kimia pemisahan (sampling, transportasi, penyimpanan dan pengawetan), khususnya dalam hal analisisnya berada pada konsentrasi runtu atau analisis spesi-asi, kita harus benar-benar berhati-hati terhadap kemungkinan perubahan yang

dapat mengubah sifat-sifat dari sampel atau analisis spesiasi, kita harus benar-benar berhati-hati terhadap kemungkinan perubahan yang dapat mengubah sifat-sifat dari sampel (Gambar 7).



Gambar 7. Diagram alur gambaran sederhana suatu rangkaian analisis sampel lingkungan (Krasnodębska-Ostęga, et al., 2018)

Teknik preparasi sampel juga ditentukan oleh instrumen yang digunakan. Berbagai variasi instrumen tersedia untuk analisis tergantung pada informasi yang diperlukan. Sebagai contoh penggunaan kromatografi untuk analisis senyawa organik, penggunaan spektrofotometer serapan atom untuk analisis logam, penggunaan elektroforesis kapiler untuk analisis DNA. Berbagai teknik preparasi dan instrumen yang berhubungan pada analisis berbagai jenis senyawa kimia dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Metode instrumen yang umum dan langkah-langkah preparasi sampel yang penting sebelum analisis (Mitra & Brukh, 2003)

Analytes	Sample Preparation	Instrument ^a
Organics	Extraction, concentration, cleanup, derivatization	GC, HPLC, GC/MS, LC/MS
Volatile organics	Transfer to vapor phase, concentration	GC, GC-MS
Metals	Extraction, concentration, speciation	AA, GFAA, ICP, ICP/MS
Metals	Extraction, derivatization, concentration, speciation	UV-VIS molecular absorption spectrophotometry, ion chromatography
Ions	Extraction, concentration, derivatization	IC, UV-VIS
DNA/RNA	Cell lysis, extraction, PCR	Electrophoresis, UV-VIS, fluorescence
Amino acids, fats carbohydrates	Extraction, cleanup	GC, HPLC, electrophoresis
Microstructures	Etching, polishing, reactive ion techniques, ion bombardments, etc.	Microscopy, surface spectroscopy

^aGC, gas chromatography; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS, mass spectroscopy; AA, atomic absorption; GFAA, graphite furnace atomic absorption; ICP, inductively coupled plasma; UV-VIS, ultraviolet-visible molecular absorption spectroscopy; IC, ion chromatography.

Pemisahan kimia adalah teknik yang menyangkut preparasi sampel, baik dalam analisis kimia sederhana maupun pada analisis kimia yang menggunakan peralatan modern. Keberhasilan dari analisis pemisahan kimia dan juga analisis spesiasi adalah bagaimana kesalahan (*error*) dapat diminimalkan sekecil mungkin. Tabel 8 menunjukkan rangkuman dari beberapa sumber kesalahan dalam analisis bahan makanan yang mungkin terjadi, baik masalah administrasi (kekeliruan dalam identifikasi sampel), ketidaksesuaian perlakuan dengan sifat-sifat sampel, kesalahan pada saat

transportasi sampel, kekeliruan dalam preparasi dan kekeliruan dalam penyimpanan (Annor, 2009). Hal ini harus mendapatkan perhatian khusus bagi peneliti, analis dan mahasiswa karena akan sangat berpengaruh pada penyajian data, khususnya mempengaruhi ketepatan (*accuracy*) data analisis.

Tabel 8. Sumber kesalahan yang mungkin selama proses pengambilan hingga preparasi sampel (Annor, 2009)

Source	Examples	Precaution
Food sample identification	Poor labeling of samples	Maintenance of documentation throughout sampling and analytical process
Nature of sample	Samples do not conform to the defined sampling protocol	Explicit instructions sampling protocol, training of sample staff
Transport and handling	Samples contaminated, degraded or depleted during transport, loss of samples	Protocol specifies condition to be maintained, supervision
Analytical sample preparation	Incorrect mixing or homogenization	Proper supervision in laboratory Laboratory quality assurance
Analytical sample storage	Incorrect storage of samples	Proper laboratory techniques and supervision

Dalam analisis pangan sebagaimana digambarkan pada tabel 8, sumber-sumber kesalahan dapat berasal dari identifikasi sampel yang berupa kekeliruan pelabelan sampel, sumber kesalahnan dapat juga berasal dari sifat-sifat sampel atau analit yang kurang dipahami oleh analis sehingga keliru dalam penanganannya. Kecerobohan pada saat transportasi sampel dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi, degradasi atau bahkan kehilangan analit. Dan tentu saja hal yang paling mungkin terjadi kesalahan pada saat preparasi, baik saat pencampuran, homogenisasi atau bahkan pada saat pembuatan larutan atau standar.

Tabel 9. Metode konvensional atau tradisional yang umum dilakukan untuk preparasi sampel padat (Majors & Wilmington, 2013)

Traditional Methods for Sample Preparation of Solid Samples		
Method of Sample Pre-treatment	Principles of Technique	Comments
Solid-Liquid Extraction	Sample is placed in closed container and solvent is added that dissolves/extracts/leaches the analyte of interest; solution is separated from solid by filtration (sometimes called "shake/filter" method).	Solvent is sometimes boiled or refluxed to improve solubility; sample is in finely-divided state to aid leaching process; sample can be shaken manually or automatically; sample is filtered, decanted, or centrifuged to separate from insoluble solid.
Soxhlet Extraction	Sample is placed in disposable porous container (thimble); constantly refluxing fresh solvent flows through the thimble and dissolves analytes that are continuously collected in a boiling flask (see Chapter 14).	Extraction occurs in pure solvent; sample must be stable at boiling point of solvent; slow but extraction is carried out unattended until complete; inexpensive; best for freely flowing powders; excellent recoveries (used as standard to which other solid extraction methods are compared).
Homogenization	Sample is placed in a blender or a mechanical homogenizer, solvent is added, and sample is homogenized to a finely divided state; solvent is removed for further workup.	Used for plant and animal tissue, food, environmental samples; organic or aqueous solvent can be used; dry ice or diatomaceous earth can be added to make sample flow more freely; small dispersed sample promotes more efficient extraction.
Sonication	Use of ultrasound to create vigorous agitation at the surface of a finely divided solid material; direct method; uses a specially designed inert acoustical tool (horn or probe = sonotrode) placed in sample-solvent mixture; indirect method; sample container is immersed in ultrasonic bath with solvent and subject to ultrasonic radiation.	Dissolution is aided by ultrasonic process; heat can be added to increase rate extraction; safe; rapid; best for coarse, granular materials; for indirect method, multiple samples can be done simultaneously; efficient contact with solvent.
Dissolution	Sample is treated with dissolving solvent and taken directly into solution with or without chemical change.	Inorganic solids (e.g. minerals, metals) may require acid or base digestion to completely dissolve; organic samples can often be dissolved directly in solvent; biological samples may not fully dissolve; for many sample types. Filtration may be required after dissolution.

Teknik preparasi di laboratorium banyak dilakukan pada sampel padatan karena prosedur umum analisis kimia untuk sampel padat harus di transfer dulu menjadi cair sebelum diinjeksikan ke dalam instrumen. Meskipun sudah ada instrumen yang bias mendeteksi langsung dari sampel padat, tetapi umumnya instrumen kimia masih memerlukan sampel dalam kondisi cair. Oleh karena itu, preparasi sampel padat menjadi bentuk cair menjadi tahapan yang penting.

Pada tabel 9 merangkum berbagai metode tradisional beserta teknik dan penggunaannya yang sering dilakukan untuk preparasi sampel padat yang terdiri atas ekstraksi padat-cair, ekstraksi Soxhlet, homogenisasi, sonikasi, dan pelarutan. Sementara pada tabel 10 disajikan metode ekstraksi modern yang saat ini telah dikembangkan untuk preparasi sampel padat.

Pressurized Fluid Extraction (PFE)/Accelerated Solvent Extraction (ASE) adalah teknik preparasi di mana sampel ditempatkan dalam wadah tertutup dan dipanaskan hingga melebihi titik didih yang menyebabkan tekanan dalam bejana meningkat dan ekstraksi terjadi. Sampel hasil ekstraksi kemudian dikeluarkan dengan pompa khusus dan dipindahkan ke wadah untuk perlakuan analisis lebih lanjut.

Automated Soxhlet Extraction, merupakan kombinasi pelarutan pelarut panas dan ekstraksi Soxhlet yang didesain otomatis sehingga dalam operasionalnya sudah semakin mudah dan meminimalkan kesalahan. Pada awalnya, sampel dalam bidal pertama-tama direndam dalam pelarut yang mendidih, kemudian bidal diangkat untuk ekstraksi Soxhlet seperti cara konvensional. Kelebihan cara ini akan menghemat pelarut dan waktu yang diperlukan semakin kecil.

Tabel 10. Metode ekstraksi moderen untuk preparasi sampel padat (Majors & Wilmington, 2013)

Modern Extraction Methods for Solid Samples		
Method of Sample Pre-treatment	Principles of Technique	Comments
Pressurized Fluid Extraction (PFE)/Accelerated Solvent Extraction (ASE)	Sample is placed in a sealed container and heated to above its boiling point causing pressure in vessel to rise; extracted sample is removed and transferred to vial for further treatment.	Greatly increases speed of liquid-solid extraction process; may be automated; vessel must withstand high pressure; extracted sample is diluted and requires further concentration; safety provisions are required because of overpressured, high temperature solvents.

Tabel 10. Metode ekstraksi moderen untuk preparasi sampel padat (Majors & Wilmington, 2013)(lanjutan)

Automated Soxhlet Extraction	A combination of hot solvent leaching and Soxhlet extraction; sample in thimble is first immersed in boiling solvent, then thimble is raised for conventional Soxhlet extraction/rising with solvent refluxing and finally concentration.	Semi-automated and automated versions available; uses less solvent than traditional soxhlet, solvent is recovered for possible reuse; decreased extraction time due to two-step process.
Supercritical Fluid (SF) Extraction	Sample is placed in flow-through container and supercritical fluid (e.g. CO ₂) is passed through sample; after depressurization, extracted analyte is collected in solvent or trapped on adsorbent followed by desorption by rinsing with solvent.	Automated and manual versions available; to affect "polarity" of SF fluid, density (vary temperature and/or pressure) can be varied and solvent modifiers added; collected sample is usually concentrated and relatively contaminant-free because CO ₂ volatilize after extraction; matrix affect extraction process, thus method development may take longer than other modern methods.
Microwave-Assisted Extraction	Sample is placed in a solvent in an open or closed container and contents heated by microwave energy causing a temperature rise and extraction of analyte.	Extraction solvent can range from microwave absorbing (MA) to non-microwave absorbing (NMA); in MA case, sample is placed in high pressure container and heated well above its boiling point as in PFE/ASE; in NMA case, microwave absorbing device placed container so solvent is indirectly heated; safety provisions are required with organic solvent in microwave oven (MA/NMA) and high pressure of MA example.
Gas Phase Extraction	After equilibrium, analytes partition themselves between a gas phase and the solid phase at a constant ratio; static headspace; volatiles sampled above solid; dynamic headspace (purge & trap); volatiles sampled by continuously purging headspace above sample with inert gas and trapped on a solid medium, then thermally desorbed into GC, membrane can be used as interface between sample and flowing gas stream for added specificity.	Headspace techniques used for volatile analytes in solid sample; heat (usually <100 °C) can be applied to sample to speed up volatilization process sometimes water or solvent is added to aid in sample dispersion and/or to free organics from the matrix, esp. for soils and sediments; both static and dynamic headspace techniques have been automated dynamic techniques are more sensitive; microwaves have been used for heating.
Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)	Technique uses bonded phase supports as an abrasive to produce disruption of sample matrix architecture and as a "bound" solvent to aid complete sample disruption during the sample blending process.	Solid or viscous sample (approx. 0,5 g) is placed in mortar with about 2 g of SPE sorbent (e.g. C18) and is blended to homogenized mixture; sometimes solvent is added to aid extraction process; blend is transferred to column and analytes are eluted with solvent, sometimes to an SPE layer for further cleanup prior to injection; a "solid-solid" extraction process.

Supercritical Fluid (SF) Extraction adalah proses pemisahan satu komponen (ekstraktan) dari yang lain (matriks) menggunakan cairan superkritis sebagai pelarut ekstraksi. Ekstraksi biasanya dari matriks padat, tetapi bisa juga dari cairan. Tersedia peralatan dengan mode otomatis dan manual. Cara ini masih memerlukan pengembangan lebih lanjut.

Microwave-Assisted Extraction adalah teknik ekstraksi di mana sampel ditempatkan dalam pelarut dalam wadah (terbuka atau tertutup) dan kemudian dipanaskan oleh energi gelombang mikro yang menyebabkan kenaikan suhu dan ekstraksi kemudian terjadi di dalam wadah/tabung dalam waktu tertentu, kemudian siap dianalisis lebih lanjut.

Gas Phase Extraction adalah teknik ekstraksi di mana saat setelah kesetimbangan terjadi, analit membagi dirinya sendiri antara fase gas dan fase padat dengan rasio konstan yang terdiri atas *headspace* statis dan *headspace* dinamis, teknik yang digunakan untuk analit volatil dalam sampel padat. Penggunaan panas (biasanya $<100^{\circ}\text{C}$) dapat diterapkan pada sampel untuk mempercepat proses penguapan, terkadang air atau pelarut ditambahkan untuk membantu dispersi sampel dan/atau untuk membebaskan bahan organik dari matriks, khususnya untuk tanah dan sedimen.

Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) sebuah teknik ekstraksi yang dikenal dengan penerapan khususnya pada sampel padat, semi padat, dan sampel sangat kental. Sebuah bahan padat yang berfungsi sebagai sorben, bersama sampel ditempatkan dalam mortar, dicampur secara manual untuk waktu tertentu. Bahan campuran dipindahkan dan dikemas ke dalam kolom, diikuti dengan elusi. Sonikasi dapat diterapkan untuk membantu elusi setelah eluen dimasukkan ke kolom.



BAB 3

METODE PEMISAHAN KONVENSIONAL

Pada pemisahan kimia, berbagai metode dapat dilakukan, tergantung kepada jenis campuran yang akan dipisahkan termasuk wujud, sifat fisika kimia, dan karakteristik lainnya. Sejak dahulu, proses pemisahan telah dilakukan secara praktis di lapangan. Berikut beberapa metode pemisahan sederhana yang sering dilakukan dalam analisis kimia.

1. Cara Mekanis

Pemisahan cara mekanis didasarkan pada perbedaan ukuran partikel baik dalam campuran padatan maupun campuran padatan dalam cairan. Ada dua cara pemisahan sistem mekanis yang sering dilakukan yaitu cara pengayakan (*sieving*) dan cara penyaringan (*filtration*).

Pengayakan merupakan salah satu metode pemisahan partikel sesuai dengan ukuran yang diperlukan. Metode ini dimaksudkan untuk memisahkan fraksi-fraksi tertentu sesuai dengan keperluan dari suatu material atau sampel. Pada proses pengayakan menggunakan saringan, di mana ukuran partikel yang lolos disebut *undersize* dan partikel yang tertahan disebut *oversize*. Pengayakan sering dilakukan sesaat setelah penghancuran (*grinding*) yang bertujuan untuk mengecilkan ukuran (*size reduction*). Tujuan dari *size reduction* ini adalah untuk mempermudah proses pelarutan, mempercepat

reaksi kimia, dan mempertinggi kemampuan penyerapan. Memperkecil ukuran juga dimaksudkan untuk memperluas permukaan bahan sehingga kontak antara bahan dan pelarut saat pelarutan akan berlangsung optimum.

Penyaringan (*Filtration*) adalah cara fisika atau mekanis yang digunakan untuk memisahkan padatan (*solids*) dari fluida (gas atau cair) dengan cara melewatkan pada media di mana hanya fluida yang dapat melewatinya. Proses ini hanya terjadi jika padatan tidak terlarut dalam cairan atau gas sehingga harus merupakan campuran yang heterogen. Hal yang paling umum digunakan dalam penyaringan ini adalah kertas saring yang dilakukan berdasarkan gravitasi (*gravity filtration*) (Nichols, 2021). Dalam penyaringan, campuran kemudian dipisahkan menjadi dua bagian yaitu residu dan filtrate. Residu adalah padatan tak terlarut yang tertinggal pada media penyaring atau kertas saring, sedangkan filtrate adalah cairan yang melewati penyaring tersebut. Secara umum, teknik penyaringan ada bermacam-macam yaitu (Nichols, 2021):

- a. *Decanting*, atau penuangan yaitu proses pemisahan yang paling sederhana. Jika campuran padat-cair perlu dipisahkan, dimungkinkan untuk cukup menuangkan cairan sambil meninggalkan padatannya. Proses ini disebut decanting
- b. *Gravity Filtration*, yaitu proses penyaringan menggunakan kertas saring. Digunakan untuk memisahkan campuran padat-cair, di mana bagian padatannya tidak diperlukan. Jadi filtrat (cairan yang telah melewati kertas saring) akan digunakan selanjutnya, sedangkan padatan yang tertinggal pada kertas saring akan dibuang
- c. *Suction Filtration*, yaitu penyaringan hisap atau filtrasi vakum, merupakan teknik standar yang digunakan untuk memisahkan campuran padat-cair yang lebih sulit dipisahkan dengan filtrasi grafitasi dan juga digunakan apabila tujuannya adalah

untuk mempertahankan padatan (misalnya dalam kristalisasi). Prosesnya hampir sama dengan filtrasi gravitasi, campuran padat-cair dituangkan ke atas kertas saring menggunakan corong, perbedaannya utama adalah corong yang digunakan lebih khusus dan proses penyaringan ini dibantu dengan penyedotan vakum di bawah corong.

- d. *Hot Filtration*, yaitu filtrasi panas menggunakan corong yang panas, umumnya digunakan dalam proses kristalisasi, yaitu bila padatan Kristal mengandung kotoran yang tidak larut dalam pelarut kristalisasi, kotoran tersebut harus dihilangkan. Cara ini juga diperlukan dalam proses kristalisasi ketika sejenis arang digunakan untuk menghilangkan pengotor berwarna dari padatan kristal karena arang sangat halus sehingga tidak dapat dihilangkan dengan cara penuangan biasa (*decanting*).
- e. *Pipette Filtration*, yaitu filtrasi yang menggunakan pipet dan diperlukan untuk pemisahan volume kecil (<10mL) campuran padat-cair. Filter pipet cukup ideal karena kertas filter yang digunakan akan menyerap sejumlah besar material. Filtrasi pipet juga dapat digunakan jika sejumlah kecil padatan berada dalam sampel untuk analisis dengan NMR atau GC karena kedua instrumen memerlukan analisis cairan tanpa padatan tersuspensi sama sekali
- f. *Centrifugation*, atau Sentrifugasi yang digunakan untuk pemisahan campuran padat-cair yang sulit dipisahkan dengan cara pengendapan atau penyaringan. Cara ini menggunakan gaya sentrifugal, di mana sampel didesain untuk berputar dengan cepat sehingga padatan dipaksa ke bagian bawah tabung. Secara khusus sentrifugasi akan dibahas dalam bagian berikutnya.

Dalam teknik penyaringan atau filtrasi, terdapat beberapa terminolog yang harus dipahami sebelumnya yaitu *clarification* yaitu penyaringan di mana padatan tidak lebih dari 1,0% dan filtrate adalah produk utama yang dikehendaki. Sementara Ultra-Filtrasi adalah pemisahan cairan dari padatan dengan menggunakan tekanan pada sebuah membrane semi *permeable*. Istilah lain yang ditemukan dalam teknik penyaringan adalah *cake filtration* yaitu penyaringan di mana yang diinginkan adalah padatannya. *Feed atau Slurry* adalah istilah untuk suspense dari padat-cair yang akan disaring, sedangkan *filter cake* adalah akumulasi padatan yang tersisa pada filter.

Secara umum, mekanisme filtrasi adalah aliran solid dalam liquid ditahan oleh medium filter dan membiarkan *liquid* melewati filter tersebut. Filtrasi menyebabkan padatan tertahan pada filter hingga semua padatan tersaring pada medium filter. Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan filtrasi adalah:

- Luas area permukaan filter
- Ukuran partikel dari *cake solids*
- Ukuran pori dari media filter
- Viskositas *liquid* melewati filter
- Suhu
- Perbedaan tekanan yang melewati filter

Untuk menghitung kecepatan filtrasi digunakan persamaan sebagai berikut:

$$\frac{dV}{dT} = \frac{AP}{\mu \left(\frac{\alpha W}{A} + R \right)}$$

di mana V adalah volume filtrate, T adalah waktu, A adalah luas area filter, P adalah tekanan total antara *cake* dan filter, μ adalah viskositas filtrate, α adalah rata-rata resisten dari *cake*, W adalah berat padatan kering, dan R adalah tahanan dari media filter dan filter.

Permukaan di mana padatan (solid) terdeposit di dalam filter dinamakan medium filter. Sifat-sifat medium filter yang ideal adalah sebagai berikut:

- Secara kimia *innert* atau tidak bereaksi dengan bahan yang akan disaring termasuk dengan larutan atau cairannya.
- Memiliki kekuatan retensi yang tinggi
- Memiliki kekuatan mekanis yang cukup
- Tidak dapat mengabsorpsi atau menyerap material yang akan disaring
- Tahan terhadap korosi yang disebabkan oleh cairan/*liquid* yang disaring

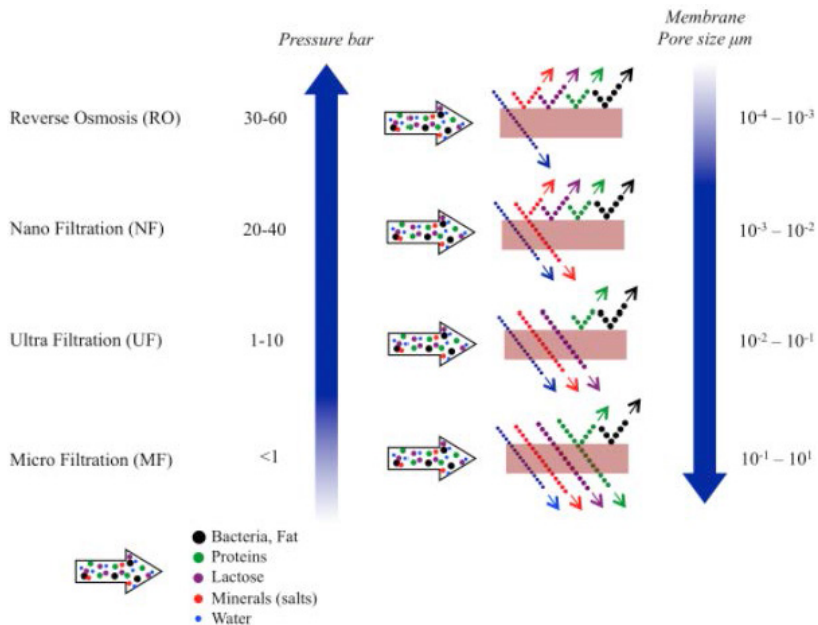
Pemilihan media filter tergantung pada ukuran partikel yang akan disaring, jumlah liquid yang akan disaring, sifat dari produk yang akan di saring serta tujuan penyaringan itu sendiri. Ukuran partikel yang akan disaring mempengaruhi pemilihan ukuran pori dari media filter yang akan digunakan, semakin kecil ukuran partikel semakin kecil pula ukuran pori yang dipilih. Kadang-kadang untuk ukuran pori yang terlalu kecil, digunakan bantuan tekanan baik manual maupun pompa. Pemilihan filter dari kertas saring adalah yang paling sering digunakan. Kelebihan kertas saring adalah porositasnya terkontrol dan lebih murah. Filter kertas memiliki grade dan kualitas yang berbeda serta ukuran pori yang berbeda. Kelemahan dari kertas saring adalah dapat menyerap *liquid* meskipun hanya dalam jumlah kecil serta ukuran pori yang sangat kecil dapat lolos dari saringan. Tabel 11 menunjukkan beberapa tipe filter yang umum digunakan beserta rekomendasi penggunaannya.

Tabel 11. Media filtrasi yang umum digunakan (Majors & Wilmington, 2013)

Filtration Media	Typical Products	Recommended Use	Comments
Filter Paper	Celulose	For removal of larger particles (>40 μm)	Beware of filter paper fibers getting into sample; ensure solvent compatibility of filter paper.
Membrane Filters	Regenerated cellulose, cellulose acetate, nylon, PTFE, polypropylene, polyester, polycarbonate, polyvinylpyrrolidone	For removal of small particles (>10 μm)	For "dirty" samples, prefilter or depth filter may be needed to prevent plugging; porosities from 0.20 to 2 μm are the most popular; avoid solvent incompatibility.
Functionalized Membranes	Ion exchange membranes, affinity membranes	Can remove both particulates and matrix interferences	For "dirty" samples, prefilter or depth filter may be needed to prevent plugging; avoid solvent incompatibility; primary goal is for removal of biomolecules from solution.
SPE Cartridges	Silica-and polymer-based		Particles of stationary phase may pass into filtrate; use only high-purity products with low extractables; beware of plugging.
SPE Disks	PTFE-and fiberglass-based		PTFE membranes are delicate, so handle with care; fiberglass disks are more structurally rigid; can pass large volume at higher flow rate than with cartridges; beware of plugging.

Bahan lain yang sering digunakan sebagai filter adalah katun, sutra, *wool*, nilon, dan bahan gelas/kaca. Filter dari bahan katun termasuk yang digunakan secara umum karena mudah ditempatkan pada mulut wadah yang digunakan. Bahan nilon lebih bagus dari bahan katun terutama karena tidak dipengaruhi oleh kehadiran fungi dan bakteri. Kelebihan lainnya adalah memiliki sifat yang tidak menyerap serta sangat kuat dibanding bahan katun. Sementara itu, bahan filter dari kawat biasanya terbuat dari *stainless steel* sehingga mudah dibersihkan dan tahan terhadap bahan-bahan kimia. Untuk bahan filter dari gelas wol biasanya digunakan untuk bahan kimia korosif tetapi dapat mengontaminasi filtrate dengan fiber gelas. Bahan asbes

juga sering digunakan khususnya untuk menyaring cairan korosif tetapi memiliki kekurangan di mana dapat mempengaruhi alkalinitas filtrate dan alkaloid dapat diserap serta dapat menkontaminasi filtrate.



Gambar 8. Prinsip membrane filtrasi (Wu & Imai, 2012)

Khusus untuk penyaringan dengan ultra-filtrasi, yang paling umum digunakan adalah membrane filter. Membran ini dapat terbuat dari selulosa, polivinilklorida, nilon, dan turunan selulosa lainnya. Membran filter memiliki ukuran yang bervariasi mulai dari yang paling besar dengan ukuran 8 μ hingga ukuran terkecil sebesar 0,22 μ. Ukuran partikel dipilih dengan maksud untuk menyaring partikel-partikel khusus seperti disajikan pada Gambar 8.

Keuntungan dari penggunaan membran ini adalah bakteri dapat dihilangkan, absorpsi dapat diabaikan, selalu baru karena setiap operasi yang baru selalu digunakan membrane baru, membrane ini juga dapat menyaring dengan sangat cepat. Kelemahan membrane ini adalah ukuran pori sangat kecil sehingga dapat menyumbat penyaringan, serta dapat larut pada beberapa larutan organik seperti keton dan ester.

2. Pengaruh Gaya

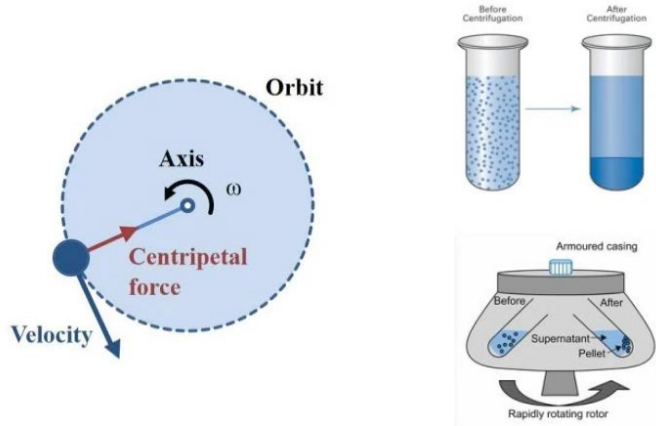
Prinsip kerja dari pemisahan berdasarkan pengaruh gaya adalah mengandalkan kecepatan pengendapan partikel. Teknik yang paling dikenal adalah pengaruh gravitasi, sentrifugasi serta pengaruh listrik dan magnet. Pemisahan dilakukan dengan cara mengendapkan partikel padatan tidak terlarut dan kemudian memisahkannya dengan larutannya.

Pemisahan dengan mengandalkan pengaruh gravitasi adalah yang paling konvensional, di mana pengendapan partikel mengandalkan gravitasi bumi dengan cara membiarkan partikel mengendap perlahan. Cara ini memerlukan waktu yang cukup banyak, di samping itu memiliki kelemahan lainnya di mana beberapa partikel-partikel yang sulit mengendap dapat saja melayang dalam larutan.

Kesulitan mengendapkan partikel pada larutan biasanya dibantu dengan alat yang disebut sentufuge melalui proses sentrifugasi. Pada proses ini kekuatan bertumpu pada pusat rotasi pada alat. Kekuatan sentrifugal dijabarkan dalam persamaan:

$$\text{Kekuatan Sentrifugal} = MR\omega \times \omega$$

Di mana M adalah massa, R adalah radius rotasi, dan ω adalah angular velocity.



Gambar 9. (a) Ilustrasi teori sentrifugasi (Aryal, 2018) dan (b) Ilustrasi proses sentrifugasi (Anon, 2021)

Gambar 9a menunjukkan ilustrasi dari teori sentrifugasi, sedangkan gambar 9b memberikan visualisasi bagaimana endapan dengan merode sentrifugasi ini dapat terjadi. Prinsip dari proses sentrifugasi adalah sebagai berikut (Aryal, 2018):

- Di dalam larutan, partikel yang massa jenis lebih tinggi akan mengendap ke dasar sebagai sedimen dan partikel dengan massa jenis yang lebih ringan akan mengapung ke atas.
- Semakin besar perbedaan kepadatan, semakin cepat pemisahan terjadi, sebaliknya jika tidak ada perbedaan densitas (*isopycnic condition*), partikel akan tetap stabil.
- Jika terdapat perbedaan densitas yang sangat kecil, maka untuk memisahkan berbagai partikel dalam suatu larutan, gaya gravitasi dapat diganti dengan “gaya sentrifugal” yang jauh lebih kuat yang disediakan oleh sentrifugal.

- *Centrifuge* adalah peralatan yang menempatkan objek dalam rotasi di sekitar sumbu tetap (memutarnya dalam lingkaran), menerapkan gaya yang berpotensi kuat tegak lurus ke sumbu putar (ke luar).
- Sentrifugal bekerja dengan prinsip sedimentasi, di mana percepatan sentripetal menyebabkan zat dan partikel yang lebih padat bergerak keluar dengan arah radial.
- Pada saat yang sama, benda-benda yang kurang padat dipindahkan dan pindah ke tengah.
- Dalam *centrifuge* laboratorium yang menggunakan tabung sampel, percepatan radial menyebabkan partikel yang lebih padat mengendap di dasar tabung, sedangkan zat dengan kepadatan rendah naik ke atas.

Berdasarkan hal tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses sentrifugasi adalah:

- densitas atau massa jenis
- suhu dan viskositas
- jarak antar partikel, dan
- kecepatan rotasi.

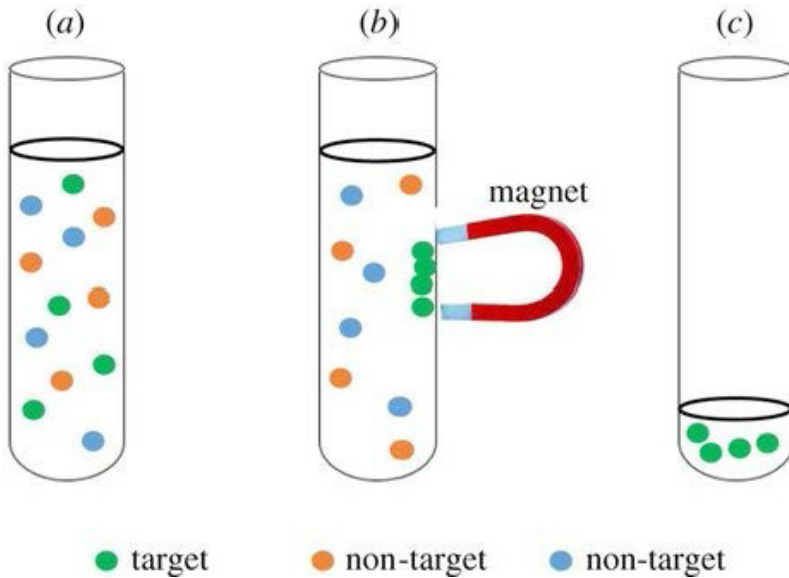
Peralatan sentrifuge digunakan untuk memisahkan partikel yang lebih berat dari larutannya melalui kekuatan sentrifugal. Ada tiga tipe sentrifuge yaitu *clarifier*, sentrifugal separator dan *purifier*. *Clarifier* adalah peralatan sentrifuge yang digunakan untuk memisahkan partikel padatan dari cairannya melalui aksi *centrifugal force*. Sementara itu, sentrifugal separator adalah alat yang digunakan untuk memisahkan dua liquid yang tidak saling bercampur (*insoluble*) melalui aksi *centrifugal force* (*water sealing required*). Sementara *purifier* adalah peralatan yang digunakan untuk memisahkan dua liquid yang tidak saling bercampur dan partikel padatan dalam waktu bersamaan melalui aksi *centrifugal force*.

Selain sentrifugasi, terdapat pula teknik pemisahan lain yaitu pemisahan secara magnetik (*magnetic separator*) yang digunakan untuk memisahkan mineral-mineral dari batuan non-magnetik. Sebagai contoh: pemisahan magnetite dari kuarsa atau pemisahan kontaminan-kontaminan magnetik dari suatu bahan. Bahan yang dimaksud dapat dikategorikan dalam dua kelompok yaitu bahan diamagnetic dan bahan-bahan paramagnetic. Diamagnetik adalah di mana bahan ditolak oleh garis-garis kekuatan magnetik ke titik di mana intensitasnya medan magnet yang lebih kecil, dalam hal ini kekuatan magnetiknya sangat kecil. Sementara itu, sebaliknya, Paramagnetik adalah sifat bahan di mana bahan tertarik ke garis-garis kekuatan magnetik menuju titik yang memiliki intensitas medan magnet yang lebih besar. Contoh paramagnetic adalah ilmenite (FeTiO_3), pyrrhotite (FeS) dan mineral-mineral mangan. Beberapa unsur-unsur termasuk paramagnetic, seperti Ni, Co, Mn, Cr, dan Pt. Sifat-sifat paramagnetic dipengaruhi oleh keberadaan logam-logam besi pada bahan.

Selain memisahkan mineral-mineral dari batuan sebagaimana dijelaskan di atas, pemisahan magnetik juga sangat baik digunakan dalam persiapan atau preparasi sampel untuk tujuan diagnostik. Untuk aplikasi tersebut, medan magnet eksternal diterapkan untuk mendorong pemisahan entitas target (misalnya bakteri, virus, parasit, dan sel kanker) dari sampel mentah yang kompleks. Hasil pemisahan ini selanjutnya memudahkan dalam diagnosis penyakit. Proses pemisahan ini tidak hanya dapat dicapai melalui pemanfaatan gradien medan magnet tinggi, tetapi juga dalam banyak kasus, gradien medan magnet rendah dengan magnitudo kurang dari 100 T m^{-1} .

Pemisahan entitas target untuk tujuan diagnostik ini dimungkinkan melalui penerapan gaya magnetoforetik (*magnetophoretic force*), dengan maksud untuk mengisolasi secara magnetis entitas target, baik yang karakteristik responsif magnetik intrinsic maupun yang tidak memiliki. Gambar 10 memberikan ilustrasi terkait hal ini, di mana adanya gradien

medan magnet, bahan magnet akan disejajarkan secara magnetis dan didorong ke daerah dengan kekuatan medan magnet tertinggi oleh gaya magnetoforetik. Fenomena ini dikenal dengan istilah *magnetophoresis*, yang melibatkan gerakan partikel magnetik relatif terhadap media non-magnetik sekitarnya di bawah medan magnet non-homogen. Sampel kemudian akan terperangkap secara magnetis dan terkonsentrasi yang selanjutnya dapat digunakan untuk analisis rutin berikutnya (Leong , et al., 2016).



Gambar 10. (a) Sampel dengan campuran berbagai komponen yang mengandung entitas target dan non-target, (b) isolasi entitas target menggunakan medan magnet, (c) target terkonsentrasi setelah pemindahan non-target. Perhatikan bahwa target harus memiliki respons magnetik intrinsik, atau telah diberi label sebelumnya dengan partikel responsif magnetik (Leong, et al., 2016).

3. Perbedaan Berat Jenis

Berdasarkan pengaruh berat jenis, pemisahan dapat dilakukan dengan dua cara yaitu pengendapan dan pengapungan. Metode ini biasanya kita temukan pada pengolahan air bersih (*Water Treatment Plant*). Prinsipnya adalah senyawa yang mempunyai berat jenis lebih kecil dari berat jenis pelarut akan “mengapung” dan senyawa yang mempunyai berat jenis lebih besar dari berat jenis pelarut akan “mengendap”.

Salah satu contoh aplikasi dari proses ini adalah pemisahan batubara dari pengotornya dalam media cair, di mana batubara dimurnikan dengan memisahkan atau mengendapkan zat-zat padat atau zat tersuspensi non koloidal dalam media cair. Proses ini juga sering disebut pencucian batubara yang dilakukan untuk memperbaiki kualitas batubara.

Kecepatan pengendapan dalam proses ini tidak semata-mata disebabkan oleh pengaruh berat jenis akan tetapi beberapa faktor ikut berperan di antaranya bentuk dan ukuran partikel, viskositas air, dan juga kecepatan aliran media air.

Pada pengolahan air bersih, teknik pengapungan (*floatation*) juga sering digunakan. Biasanya diaplikasikan untuk menyingkirkan polutan seperti minyak atau lemak.

4. Kristalisasi

Metode pemisahan berikutnya yang penting adalah pemisahan dengan cara kristalisasi. Proses ini adalah salah satu teknik pemisahan padat-cair secara kimiawi yang sangat penting dan sering diaplikasikan dalam dunia industri karena diharapkan dapat menghasilkan kemurnian produk hingga 100%. Dalam hal ini, terjadi perpindahan massa zat terlarut dari fase cair ke fase kristal padat murni. Dalam proses kristalisasi, super-saturasi (*supersaturation*) dan suhu adalah dua faktor penting yang berpengaruh.

Aplikasi proses kristalisasi dapat dilihat dalam industri makanan dan farmasi. Produksi wafer kristal silikon, garam bubuk untuk makanan, produksi sukrosa dari bit gula adalah beberapa contoh aplikasi industri.

Prinsip kerja dari metode ini adalah pemisahan berdasarkan perbedaan titik beku, biasanya digunakan untuk pemurnian suatu produk dari unsur-unsur pengotornya. Ada dua kondisi yang dapat terjadi pada pembentukan kristal yang umumnya dikenal yaitu pertama kondisi lewat jenuh yang berlaku untuk larutan seperti larutan gula atau larutan garam, dan kondisi kedua adalah kondisi lewat dingin yang terjadi pada suatu cairan atau lelehan (*melt*) seperti pada air ataupun lemak. Proses kristalisasi dari larutan terdiri atas dua fenomena yang berbeda, yaitu pertama adalah pembentukan inti kristal atau nukleasi (*nucleation*) dan yang kedua adalah pertumbuhan kristal (*crystal growth*). Baik nukleasi maupun pertumbuhan kristal memerlukan kondisi supersaturasi dari larutannya. Supersaturasi didefinisikan sebagai perbedaan antara konsentrasi aktual dalam larutan dan konsentrasi di mana fasa cair secara termodinamik berkesetimbangan dengan fasa padat (kelarutan). Keadaan supersaturasi dapat diperoleh dengan beberapa cara yaitu dengan perubahan suhu (pendinginan untuk sistem yang gradien kurva kelarutannya positif atau pemanasan untuk sistem yang gradien kurva kelarutannya negatif) dengan pemisahan pelarut (biasanya dengan penguapan) atau dengan penambahan bahan tertentu (*drowning-out agent*) (Setyoprato, et al., 2003).

Secara sederhana, proses kristalisasi digambarkan pada gambar 11, dengan penjelasan singkat sebagai berikut:

1. Awalnya larutan dipanaskan dalam wadah yang terbuka
2. Molekul pelarut (*solvent*) mulai menguap, meninggalkan zat terlarut (*solute*)
3. Pada saat larutan sudah menjadi dingin, kristal dari terlarut mulai berakumulasi pada permukaan larutan

4. Kristal kemudian dikumpulkan dan dikeringkan sesuai kebutuhan



Gambar 11. Ilustrasi suatu proses kristalisasi

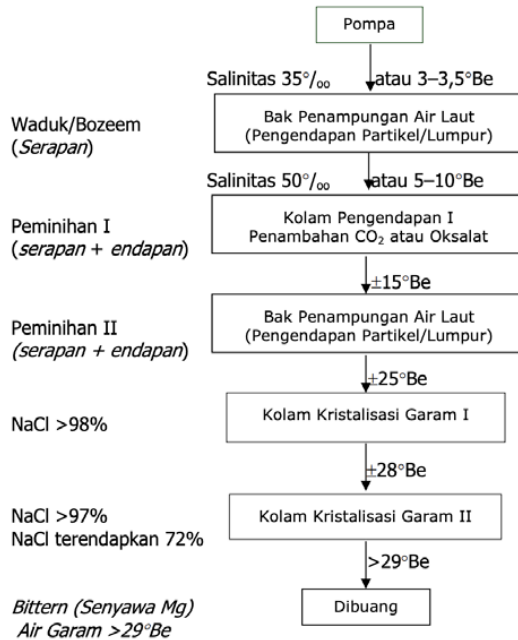
5. Padatan tak terlarut dalam cairan kemudian dipisahkan dengan cara filtrasi
6. Besarnya ukuran kristal yang terbentuk tergantung pada kecepatan pendinginan
7. Jika larutan didinginkan dengan kecepatan pendinginan yang tinggi, akan terbentuk banyak kristal kecil atau halus
8. Kristal ukuran besar terbentuk jika laju pendinginan lambat

Salah satu contoh sederhana proses kristalisasi adalah pada pembuatan gula dari tebu, sebuah bahan kristal yang berwarna putih berwujud padat. Prosesnya dimulai dari pemerahan tebu menghasilkan nira mentah, kemudian dimurnikan untuk menghilangkan kotoran dan dilakukan penguapan air untuk memperoleh nira kental yang kemudian merupakan bahan baku utama proses kristalisasi. Pada proses kristalisasi tersebut, kotoran dan air dari nira akan dihilangkan untuk selanjutnya diperoleh kristal gula.

Contoh lain dari penerapan pemisahan dengan cara kristalisasi adalah proses pemisahan gula pasir berdasarkan kualitasnya. Misalnya untuk memisahkan gula pasir kualitas I, II dan III, bahan kristal dilarutkan ke dalam solvent panas kemudian didinginkan pada temperatur tertentu hingga membeku, di mana pengotor tidak turut membeku, kemudian dilakukan dekantasi. Proses rekristalisasi juga sering dilakukan untuk menghilangkan unsur-unsur pengotor misalnya rekristalisasi senyawa KNO_3 dan NaClO_4 .

Contoh selanjutnya adalah pada proses pembentukan kristal garam, yaitu dengan menguapkan air laut hingga mineral-mineral yang ada di dalamnya kemudian mengendap, meskipun juga berisiko mengandung garam-garam lain yang kurang diinginkan, tetapi diharapkan hanya dalam jumlah yang cukup kecil (*impurities*).

Lahan pembuatan garam dibuat berpetak-petak secara bertingkat agar prosesnya mengikuti gaya grafitasi bumi sehingga menghemat energi. Pada prinsipnya proses pembuatan garam dari air laut terdiri atas dua langkah yaitu pemekatan dengan cara menguapkan airnya dan tahap selanjutnya adalah pemisahan garamnya (kristalisasi). Skema pembuatan garam oleh D. Purbani 2009 digambarkan sebagaimana pada gambar 12.



Gambar 12. Bagan proses pembuatan garam evaporasi kadar NaCl tinggi (Purbani, 2009)

5. Destilasi

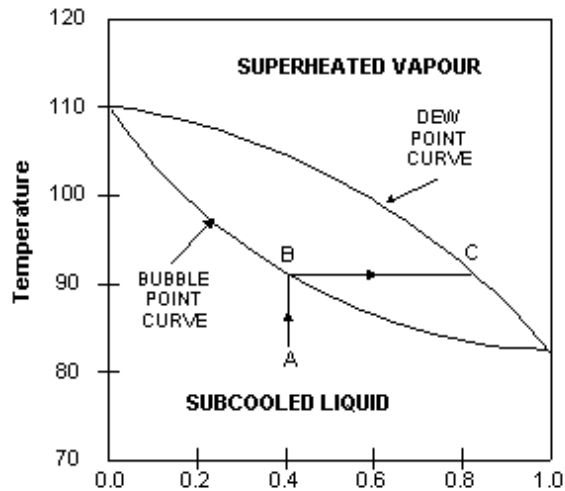
Sejarah menunjukkan bahwa destilasi pertama kali berasal dari peralatan (*Terracotta Distillation*) pada tahun 3000 Sebelum Masehi di Lembah Indus Pakistan, kemudian destilasi digunakan oleh orang-orang Abilonia di Mesopotamia. Awalnya destilasi digunakan untuk membuat parfum. Destilasi untuk minuman dan alkohol muncul kemudian ketika Ahli Kimia Arab Al-Kindi mendistilasi alkohol pada abad ke-9 di Irak, kemudian muncul destilasi alkohol sebagai minuman pada abad ke-12 di Italia dan China (Allchin, 1979; Forbes, 1970).

Destilasi adalah proses pemisahan komponen dalam suatu campuran berdasarkan perbedaan titik didih dari komponen individunya, dengan catatan merupakan larutan dan campurannya homogen. Dengan demikian maka metode atau teknik destilasi adalah pemisahan campuran larutan yang homogen dan dapat diuapkan berdasarkan perbedaan titik didihnya. Proses yang terjadi pada teknik destilasi adalah larutan (fase cair) diuapkan (fase uap) kemudian diembunkan kembali (fase cair). Selain tergantung kepada titik didih, proses destilasi juga tergantung pada konsentrasi komponen-komponen penyusun campuran. Proses destilasi juga tergantung pada karakteristik tekanan uap campuran *liquid* (Tham, 1997)

Komponen-komponen dalam campuran hanya bisa di destilasi apabila ada keseimbangan fasa gas dan fasa cair. Diagram titik didih pada gambar 13 menunjukkan bagaimana komposisi kesetimbangan dari komponen-komponen dalam suatu campuran liquid berdasarkan variasi temperatur pada tekanan tetap. Misalkan suatu campuran liquid yang mengandung 2 komponen (A dan B) sebuah campuran biner.

Titik didih komponen A adalah titik di mana fraksi mol A adalah 1. Titik didih komponen B adalah di mana fraksi mol A adalah 0. Dalam contoh ini, A adalah komponen yang lebih mudah menguap karena memiliki titik didih yang lebih rendah dari B. Kurva bagian atas pada diagram disebut kurva titik embun (*dew point curve*), sedangkan kurva yang lebih rendah disebut kurva titik gelembung (*bubble point curve*). Titik embun adalah suhu di mana uap jenuh mulai mengembun sedangkan titik gelembung adalah suhu di mana cairan mulai mendidih.

Daerah di atas kurva titik embun menunjukkan komposisi kesetimbangan uap *superheated* sedangkan daerah di bawah kurva titik gelembung menunjukkan komposisi kesetimbangan dari cairan *subcooled*.



Gambar 13. Diagram titik didih, kesetimbangan fasa cair-gas (Tham, 1997)

Misalnya, ketika cairan subcooled dengan fraksi mol $A = 0,4$ (titik A) dipanaskan, konsentrasinya tetap konstan hingga mencapai titik gelembung (titik B), ketika mulai mendidih. Uap yang berevolusi selama pendidihan memiliki komposisi kesetimbangan yang diberikan oleh titik C, kira-kira 0,8 fraksi mol A. Ini kira-kira 50% lebih kaya A daripada cairan aslinya. Perbedaan antara komposisi cairan dan uap inilah yang menjadi dasar untuk Teknik Distilasi (Tham, 1997)

Jadi jika kita mempunyai campuran dua larutan biner, tekanan uap komponen A merupakan fungsi dari fraksi mol komponen A di dalam campuran. Demikian pula tekanan uap komponen B merupakan fungsi fraksi mol komponen B, yang menurut Hukum Raoult digambarkan sebagai:

$$P_A = x_A \cdot P_A^\circ, \text{ di mana } P_A^\circ \text{ adalah tekanan uap jenuh larutan A}$$

$$\text{dan } P_B = x_B \cdot P_B^\circ$$

Jadi misalkan kita mempunyai dua campuran heksanaq (A) dan heptane (B) di mana masing-masing memiliki P_A° dan P_B° , maka tekana uap campuran adalah :

$$P = P_A + P_B$$

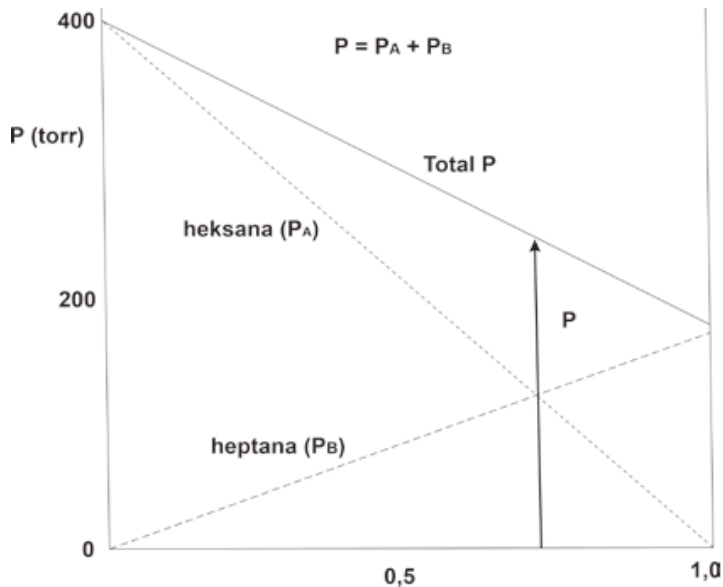
$$P = x_A \cdot P_A^\circ + x_B \cdot P_B^\circ$$

Keadaan tersebut hanya berlaku untuk larutan ideal biner, di mana:

- Interaksi komponen sejenis sama dengan interaksi antar komponen yang tak sejenis
- Homogen pada semua sistem mulai dari mol fraksi 0 sampai mol fraksi 1
- Tidak ada entalpi pencampuran pada komponen-komponen yang dicampur membentuk larutan (ΔH pencampuran =0)
- Tidak ada beda volume pencampuran, artinya volume larutan sama dengan jumlah volume komponen yang dicampurkan (ΔV pencampuran =0)
- Berlaku Hukum Raoult

Ilustrasi terkait campuran heksana dan heptane di mana masing-masing memiliki tekanan uap tetapi setelah pencampuran akan memberikan tekanan total (P) yang merupakan akumulasi dari tekanan uap masing-masing ($P_A + P_B$) dan fraksi mol dapat dilihat pada gambar 14 dapat dijelaskan, jika P_A lebih besar dari P_B maka titik didih komponen A lebih kecil daripada titik didih komponen B.

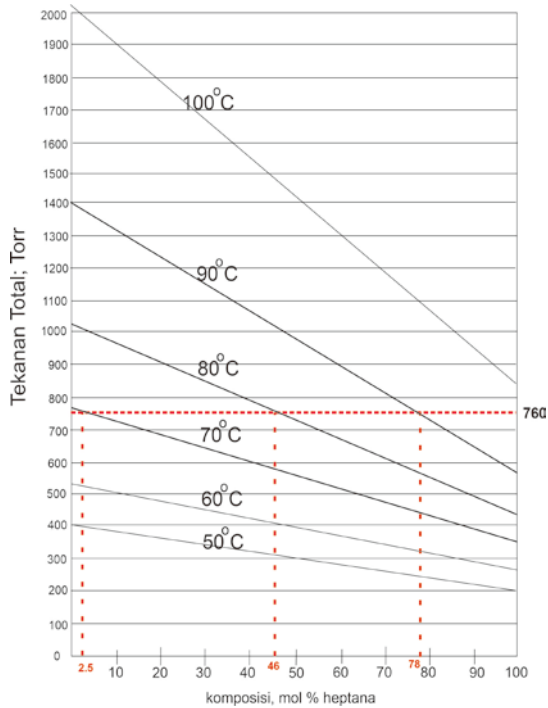
Sebagai ilustrasi lain dapat dilihat pada Merkuri (Hg) yang memiliki tekanan uap yang sangat besar sehingga mempunyai titik didih yang sangat kecil.



Gambar 14. Diagram titik didih, kesetimbangan fasa cair-gas (Tham, 1997)

Selanjutnya, apabila kita telaah lebih lanjut tentang campuran heksana dan heptana, Gambar 15 memberikan gambaran hubungan antara tekanan, suhu dan komposisi (heptana), di mana pada tekanan total 760 Torr, maka:

- Bila campuran mendidih pada 70°C , maka yang akan mendidih naik ke fase uap adalah 2,5% mol heptana
- Bila campuran mendidih pada 80°C , maka yang akan mendidih naik ke fase uap adalah 46% mol heptana
- Bila campuran mendidih pada 90°C , maka yang akan mendidih naik ke fase uap adalah 78% mol heptane



Gambar 15. Ilustrasi hubungan antara tekanan suhu dan fraksi mol, contoh campuran heksana dan heptana

Jika heksana pada fase cair adalah x_A dan pada fase uap adalah y_A , sedangkan heptana pada fase cair adalah x_B dan pada fase uap adalah y_B , banyaknya komponen A dalam fase uap adalah perbandingan P_A dan P_T pada tekanan dan suhu yang ditentukan.

$$y_A = \frac{P_A}{P_T}, \text{ dan } y_B = \frac{P_B}{P_T}$$

sehingga volatilitas relatif A terhadap B dalam campuran biner adalah

$$\frac{y_A}{y_B} = \frac{x_A P_A^\circ}{x_B P_B^\circ}$$

$$\frac{y_A}{y_B} = \alpha \frac{x_A}{x_B}$$

atau

$$\alpha = \frac{P_A^\circ}{P_B^\circ}$$

Jika P_A lebih besar dari P_B , maka :

$$\frac{y_A}{y_B} > \frac{x_A}{x_B}$$

Sehingga, bila tekanan uap A lebih besar dari tekanan uap B, maka perubahan komponen A dan komponen B dalam fase uap lebih besar dari fasa cair. Akibatnya, fase uap dalam kesetimbangan di atas fase cair akan lebih kaya mengandung komponen uap yang lebih volatil. Fenomena ini kemudian menjadi **Prinsip dasar Destilasi Fraksinasi**. Bila proses pendidihan tetap berlangsung untuk fase uap akan lebih diperkaya oleh komponen yang lebih volatile.

Sebagai contoh, jika kita diminta menentukan komposisi uap yang berada dalam suatu kesetimbangan larutan pada campuran yang mengandung 46% heptana dan 54% heksana pada 80°C, di mana diketahui P°_{Heptana} adalah 427 dan P°_{Heksana} adalah 1050, maka persamaan-persamaan di atas dapat digunakan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} P_A &= x_A P_A^\circ \\ &= (0,46) (427 \text{ Torr}) = 193 \text{ Torr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P_B &= x_B P_B^\circ \\ &= (0,54) (1050 \text{ Torr}) = 567 \text{ Torr} \end{aligned}$$

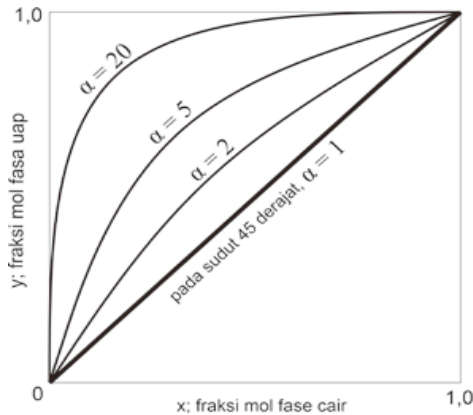
$$P_{\text{Total}} = P_A + P_B = (193+567) \text{ Torr} = 760 \text{ Torr}$$

Jadi :

$$J_{\text{heptana}} = \frac{193}{760} = 25,4\%$$

$$J_{\text{heksana}} = \frac{567}{760} = 74,6\%$$

Jadi komposisi uap yang berada dalam kestimbangan tersebut adalah heptana sebanyak 25,4% dan heksana adalah sebanyak 74,6%.



Gambar 16. Perbandingan fraksi mol pada fase cair dan fase uap yang dihubungkan dengan α

Gambar 16 menunjukkan perbandingan fraksi mol pada fase cair dan fase uap yang dihubungkan dengan α , di mana pada $\alpha = 1$ maka campuran tidak dapat dipisahkan dengan cara destilasi, atau semakin besar harga α maka kedua komponen tersebut semakin mudah untuk dipisahkan dengan cara destilasi.

Dalam destilasi sederhana, pemisahan dua komponen dalam fase uap yang mengandung komponen A yang lebih volatile, proses pemisahannya adalah proses pemisahan parsial yang berulang beberapa kali, di mana setiap

saat diperoleh pemisahan yang bertingkat. Hal tersebut terkait dengan istilah jumlah plat (*plate*) di mana biasanya jumlah plat efektif lebih kecil dari jumlah plat riil atau plat nyata.

Plat teoritis (N) diperlukan untuk memperkaya fasa uap, misalnya pada campuran A dan B di mana y terdiri atas y_A dan y_B dan x terdiri atas x_A dan x_B . Untuk memisahkan campuran atas komponen A dan komponen B sehingga mendapatkan kondensat A dengan fraksi mol x_A menghasilkan komponen A dengan derajat kemurnian yang tinggi (x_A, f), maka :

$$\frac{y_{A,0}}{y_{B,0}} = \alpha \frac{x_{A,0}}{x_{B,0}} ; \text{ atau } \frac{y_{A,0}}{1 - y_{A,0}} = \alpha \frac{x_{A,0}}{1 - x_{A,0}}$$

Bila uap dari flat 0 terkondensasi ke flat 1, konsentrasi $x_{A,1} = y_{A,0}$, bila teruapkan dari flat 1 maka :

$$\begin{aligned} \frac{y_{A,1}}{1 - y_{A,1}} &= \alpha \frac{y_{A,1}}{1 - x_{A,1}} \\ &= \alpha \frac{y_{A,0}}{1 - y_{A,0}} \\ &= \alpha^2 \frac{x_{A,0}}{1 - x_{A,0}} \end{aligned}$$

Maka sesudah N flat, akan memberikan kondensasi penguapan berulang sebanyak N+1, sehingga:

$$\begin{aligned} \frac{y_{A,N}}{1 - y_{A,N}} &= \alpha^{N+1} \frac{x_{A,0}}{1 - x_{A,0}} \\ \log \frac{y_{A,N}}{1 - y_{A,N}} &= (N + 1) \log \alpha + \log \frac{x_{A,0}}{1 - x_{A,0}} \end{aligned}$$

Bila uap pada flat nomor N terkondensasi, komposisi destilat final akan menjadi $y_{A,N} = x_{A,f}$ sehingga dengan demikian :

$$\log \frac{y_{A,N}}{1 - y_{A,1}} = \log \frac{x_{A,f}}{1 - x_{A,f}}$$

Jadi:

$$n + 1 = \frac{\log \frac{y_{A,N}}{1-y_{A,N}} - \log \frac{x_{A,0}}{1-x_{A,0}}}{\log \alpha}$$

$$n + 1 = \frac{\log \frac{y_{A,f}(1+x_{A,0})}{y_{A,0}(1+x_{A,f})}}{\log \alpha}$$

Persamaan tersebut kemudian dikenal dengan nama Persamaan FENSKE.

Dalam praktiknya, jarak antara flat sangat sempit. Bila kolom terisolasi dengan baik, temperatur dari bawah ke atas akan turun secara teratur. Dengan demikian maka efektivitas sebuah kolom tidak hanya ditentukan oleh panjang kolom, tetapi juga sangat dipengaruhi oleh desain *packing*, pengaturan suhu, dan kecepatan destilat keluar dari kolom.

Untuk mengetahui atau mengukur efektivitas kolom, maka yang harus dihitung adalah jumlah flat teoritisnya. Flat teoritis ini kemudian menjadi satuan dasar efisiensi yang dikenal dengan istilah *Height Equivalent Theoretical Plate* (HETP).

$$HETP = \frac{\text{panjang kolom}}{\text{jumlah flat}}$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Jumlah plat teoritik (N) yang dimiliki kolom nyata dapat ditemukan dengan memeriksa puncak kromatografi setelah elusi:

$$N = \frac{5,55t_R^2}{w^2_{1/2}}$$

Di mana adalah setengah lebar puncak kromatografi.

BAB 4

EKSTRAKSI

1. Prinsip Ekstraksi

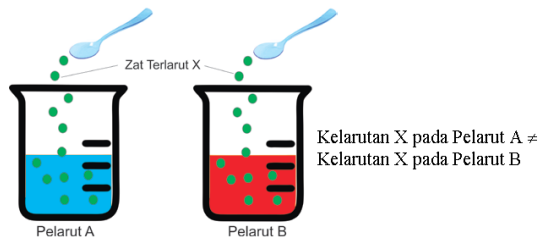
Cara pemisahan kimia dengan destilasi kemudian tidak akan efektif dan bahkan sulit dilakukan apabila (Warade, et al., 2011) :

- Diperlukan panas dalam jumlah besar, hal ini dapat terjadi pada larutan yang sangat encer di mana air harus diuapkan.
- Pada saat akan menggunakan campuran cairan yang membentuk *azeotrope* atau sangat dekat dengan titik didih campuran.
- Pada saat kita bekerja dengan senyawa yang tidak stabil pada suhu tinggi atau sensitif terhadap panas.

Ekstraksi merupakan Teknik pemisahan komponen atau senyawa kimia yang mirip dengan proses destilasi. Dalam destilasi prinsip dasar pemisahan adalah adanya perbedaan tekanan uap, atau perbedaan titik didih ataupun perbedaan volatilitas, di mana fasa yang terlibat adalah fase cair dan fase uap. Dengan demikian, pada destilasi, semakin besar tekanan, semakin kecil titik didih dan akan semakin volatile gas yang ada.

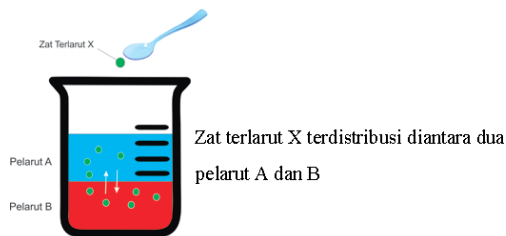
Ekstraksi pelarut merupakan salah satu teknik pemisahan yang disukai karena kesederhanaan, kecepatan, dan cakupannya yang luas. Dengan menggunakan peralatan yang relatif sederhana dan hanya memerlukan beberapa waktu untuk melakukannya, prosedur ekstraksi menawarkan banyak hal. Metode ini sangat ideal untuk memisahkan unsur-unsur kecil dari zat lain yang berada dalam jumlah besar (Kislik, 2012)

Ekstraksi merupakan perpindahan senyawa atau analit dari cairan atau padatan ke dalam pelarut atau fase yang berbeda. Sebagai contoh, apabila kita masukkan teh celup ke dalam air panas (bening) maka perlahan-lahan warna air (pelarut) akan berubah dari warna bening ke warna kemerahan atau kecokelatan ataupun kehijauan tergantung jenis teh. Hasilnya, air kemudian memberikan rasa teh dan warna spesifik, yang tidak lain adalah adanya perpindahan material (analit) dari bahan padat (teh) ke dalam pelarut air. Peristiwa ini adalah peristiwa ekstraksi sehari-hari yang dapat kita saksikan. Contoh lain dalam ekstraksi adalah pada pembuatan jamu, kopi, ekstrak obat herbal, dan lain-lain.



Gambar 17. Ilustrasi perbedaan kelarutan suatu senyawa pada dua pelarut berbeda

Apabila ke dalam pelarut (solute) A dimasukkan senyawa X, kemudian senyawa X tersebut dimasukkan ke dalam pelarut B, maka pada kedua campuran (A dan B) tersebut yang berbeda adalah kelarutannya sebagaimana diilustrasikan dalam gambar 17. Senyawa X mempunyai kelarutan yang berbeda jika dimasukkan ke dalam pelarut A dan pelarut B secara terpisah.



Gambar 18. Ilustrasi ekstraksi, di mana zat terlarut terdistribusi di antara dua pelarut

Selanjutnya, apabila kedua pelarut tersebut digabungkan atau dicampurkan (A+B), di mana keduanya tidak saling bercampur, misalnya pelarut organik dan pelarut air, kemudian ke dalam campuran tersebut dimasukkan zat terlarut X, maka akibat dari perbedaan kelarutan sebagaimana disampaikan pada contoh yang pertama, menyebabkan zat terlarut kemudian terdistribusi di antara kedua pelarut (gambar 18). Banyaknya konsentrasi zat terlarut tergantung pada pada kelarutan tersebut. **Nernst** (1891) kemudian membuat postulat yang tafsiran bebasnya kurang lebih sebagai berikut “Bila zat terlarut (*solute*) dimasukkan ke dalam suatu campuran dua pelarut (*solvent*) yang tidak saling bercampur, maka *solute* tersebut akan terdistribusi di antara dua *solvent* pada suhu dan tekanan yang tetap. Perbandingan relatif *solute* pada kedua *solvent* adalah tetap asalkan tidak terjadi interaksi kimia antara *solute* dan *solvent* selain proses pelarutan”.

Jadi, pada temperature dan tekanan yang tetap, maka:

$$\frac{[X]_{\text{solvent}-A}}{[X]_{\text{solvent}-B}} = K$$

Persyaratan terkait tidak ada interaksi kimia yang dimaksud pada Hukum Nernst dan membedakannya dengan peristiwa pelarutan, dapat diilustrasikan dengan membandingkan saat melarutkan asam asetat dan gula ke dalam air. Jika asam asetat dilarutkan ke dalam air, maka akan terjadi setidak-tidaknya dua peristiwa, yaitu ada pelarutan asam asetat dan juga ada disosiasi kimia. Dalam hal ini terjadi interaksi kimia sehingga dengan demikian pada kondisi ini ekstraksi tidak dapat dilakukan antara pelarut (air) dan terlarut (asam asetat). Sebaliknya, Jika gula dilarutkan ke dalam air, maka yang terjadi hanya proses pelarutan sehingga pada kondisi ini ekstraksi dapat dilakukan.

Jadi, pada prinsipnya ekstraksi didasarkan pada perbedaan kelarutan suatu komponen (ion/molekul) di dalam dua *solvent* yang tidak saling bercampur yang oleh Nernst secara umum digambarkan sebagai berikut:

$$Kd_A = \frac{[A]_1}{[A]_2}$$

Di mana :

Kd_A adalah koefisien distribusi A/Koefisien partisi A

$[A]_1$ adalah konsentrasi molar A dalam solvent 1

$[A]_2$ adalah konsentrasi molar A dalam solvent 2

Koefisien distribusi/koefisien partisi (Kd) adalah satuan penting dengan beberapa penjelasan sebagai berikut:

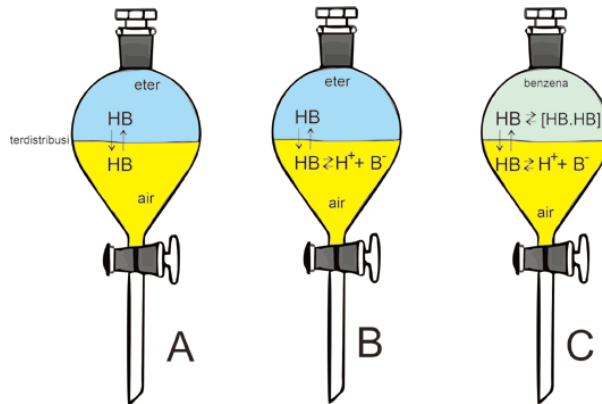
- Perbandingan relatif kelarutan suatu solute dalam dua solven yang tidak saling bercampur
- Hanya memperhitungkan satu spesies (ion/molekul) dalam fasa yang tidak saling bercampur, atau spesies tunggal
- Kelemahannya adalah tidak memperhitungkan adanya reaksi samping atau tidak memperhitungkan adanya interaksi

Umumnya pada ekstraksi dikenal dua macam pelarut yaitu pelarut organik dan pelarut anorganik atau pelarut air. Dengan demikian kita dapat memodifikasi persamaan di atas menjadi:

$$Kd_A = \frac{C_{organik}}{C_{air}} = \frac{C_o}{C_a}$$

Untuk ekstraksi senyawa ionik, maka $C_a > C_o$, sedangkan untuk senyawa organik maka $C_a < C_o$. Hal ini menganut prinsip “*like dissolve like*”.

Koefisien distribusi Kd sesungguhnya hanya membicarakan komponen tunggal karena yang diperhitungkan hanya yang larut saja. Problem yang kemudian terjadi adalah “bagaimana dengan terlarut yang terinteraksi dengan pelarut?”. Sebagai contoh, apa yang akan terjadi jika Asam Benzoat (HB) dimasukkan ke dalam campuran eter-air dan juga pada campuran benzene-air.



Gambar 19. Tiga kemungkinan yang terjadi jika asam benzoate dimasukkan ke dalam campuran eter-air dan benzene-air

- di dalam eter, HB akan larut
- di dalam air, HB akan larut dan terdissosiasi

$$HB \rightleftharpoons H^+ + B^-$$
- di dalam benzene, HB akan larut dan dimerisasi

$$HB \rightleftharpoons 1/2 HB \cdot HB$$

$$2HB \rightleftharpoons HB \cdot HB$$

Terkait dengan kondisi di atas maka kemungkinan yang bisa terjadi adalah (gambar 19):

a. **Dalam pelarut eter – air/HCl**

Dalam kondisi ini tidak terjadi interaksi kimia karena peristiwa yang berlangsung adalah peristiwa pelarutan tanpa disosiasi dan terjadi distribusi *HB* di antara pelarut eter dan air, dalam hal ini perhitungan *K_d* berlaku.

$$K_d = \frac{[HB]_{\text{eter}}}{[HB]_{\text{air}}}$$

b. **Dalam pelarut eter – air**

Pada kondisi ini, HB dalam air akan berinteraksi akibat terjadinya disosiasi HB sehingga dalam kondisi ini yang berpengaruh adalah tetapan kesetimbangan asam (K_a) dan dalam keadaan demikian harga K_d tidak dapat diperhitungkan atau digunakan.

$$K_a = \frac{[H^+][B^-]}{[HB]}$$

c. **Dalam pelarut benzene – air**

Pada keadaan ini terjadi dua peristiwa, di mana di dalam lapisan air terjadi peristiwa disosiasi dan di dalam pelarut benzene terjadi peristiwa dimerisasi. HB yang terdistribusi di antara kedua pelarut adalah HB yang tidak terdisosiasi dan yang tidak terdimerisasi.

Dalam keadaan ini, K_d tidak dapat digunakan untuk perhitungan ekstraksi karena pelarutnya berinteraksi dengan terlarut.

Untuk mengatasi hal ini, digunakan tetapan lain yaitu D , di mana:

$$D = \frac{[C_{A \text{ total}}]_{\text{organik}}}{[C_{A \text{ total}}]_{\text{air}}}$$

$$D = \frac{2[HB]_o + [HB.HB]}{[HB]_a + [B^-]_a}$$

Pada Air, diketahui $[B^-] = \frac{[HB]_a}{[H^+]}$, dan $[HB.HB] = K[HB]^2$

Sehingga :

$$D = \frac{2[HB]_o + [HB.HB]}{[HB]_a + [B^-]_a}$$

$$D = \frac{2[HB]_o + 2[HB]_o^2}{[HB]_a + \frac{K[HB]_a}{[H^+]}}$$

$$D = \frac{[HB]_o (2 + K [HB]_o)}{[HB]_a (1 + \frac{K}{[H^+]})}$$

$$D = K_d \frac{(2 + K_{dimer} [HB]_o)}{(1 + \frac{K_{dimer}}{[H^+]})}$$

Berdasarkan persamaan tersebut di atas menunjukkan bahwa D merupakan fungsi dari pH ($D = f(\text{pH})$), artinya bahwa pada ekstraksi, pH sangat mempengaruhi.

Pada umumnya dalam melakukan ekstraksi yang paling sederhana, K_d adalah konstan, dan sesuai dengan Hukum Nernst, zat terlarut akan terdistribusi pada kedua pelarut yang tidak saling bercampur (*immiscible*) dengan persyaratan yaitu selama tidak terinteraksi kimia. Dalam kondisi seperti ini maka $K_d = D$ (Bagal, 2014).

Dalam praktiknya, penggunaan Kd dan D oleh para analis kimia sering digantikan dengan menggunakan persen ekstraksi (%E), dan bahkan lebih umum digunakan, yang ditunjukkan seperti persamaan berikut :

$$\%Ekstraksi(E) = \frac{100D}{D + \frac{V_o}{V_a}}$$

Di mana V adalah volume pelarut, baik organik maupun air (*aqueous phase*). Dengan demikian persen ekstraksi dipengaruhi oleh rasio volume pelarut.

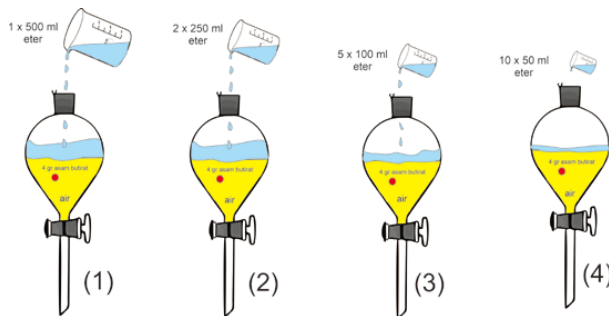
2. Metode Ekstraksi

Pada umumnya terdapat 3 (tiga) metode ekstraksi yang paling sering dilakukan di laboratorium analitik, yaitu Cara Batch, Sistem Kontinu dan Sistem Counter-Current Distribution.

a. Metode Ekstraksi dengan Cara Batch

Cara ini adalah cara paling sederhana dengan mengekstraksi zat terlarut dari suatu pelarut dengan menggunakan pelarut lainnya yang tidak saling bercampur. Campuran dua pelarut tersebut kemudian dikocok hingga diperoleh kesetimbangan distribusi zat terlarut di dalamnya dengan harapan zat terlarut akan pindah (terdistribusi) sebanyak mungkin ke pelarut yang diinginkan. Cara ini biasanya digunakan apabila akan mengekstrak sampel dalam jumlah yang tidak terlalu besar, dan peralatan yang digunakan adalah corong pisah. Pada cara ini biasanya sangat bagus digunakan untuk yang memiliki koefisien distribusi (K_d) yang besar.

Sebagai contoh: Akan dilakukan ekstraksi terhadap 4 gram asam butirat yang terlarut di dalam 500 ml air. Pelarut yang digunakan adalah eter sebanyak 500 ml dengan koefisien distribusi (K_d) pada 25°C adalah 3, dengan asumsi tidak terjadi interaksi kimia antara pelarut dan zat terlarut. Berapakah asam butirat yang dapat diekstrak?



Gambar 20. Ilustrasi ekstraksi asam butirat dengan 500 ml eter dengan empat cara (kondisi)

Untuk menjawab masalah ini, dapat dilakukan dengan banyak pendekatan yaitu satu kali ekstraksi atau dua atau lebih pengulangan ekstraksi dengan total pelarut tetap sama. Pada ilustrasi ini dilakukan 4 pendekatan sebagaimana dilihat pada gambar 20 yaitu satu kali ekstraksi (1 x 500 ml), dua kali ekstraksi (2 x 250 ml), lima kali ekstraksi (5 x 100 ml), dan sepuluh kali ekstraksi (10 x 50 ml).

1. Kondisi 1, dilakukan ekstraksi satu kali dengan 500 ml eter

Misalnya asam butirat yang tertinggal dalam fase air = x , maka

$$Kd = \frac{[butirat]_{eter}}{[butirat]_{air}}$$

$$3 = \frac{(4-x) \frac{gr}{500 mL}}{(x) \frac{gr}{500 mL}} = 4 - x$$

$$x = 1 \text{ gram}$$

Jadi butirat yang terekstrak pada fase organik dengan satu kali ekstraksi 500 ml eter adalah 3 gram

2. Kondisi 2, dilakukan ekstraksi lima kali masing-masing dengan 250 ml eter (volume total tetap 500 ml)

Pada ekstraksi pertama dengan 250 ml eter :

$$3 = \frac{(4-x_1) \frac{gr}{250 mL}}{(x_1) \frac{gr}{500 mL}} = \frac{(4-x_1) 2 \frac{gr}{L}}{(x_1) \frac{gr}{L}}$$

$$3x_1 = 8 - 2x_1$$

$$5x_1 = 8$$

$$x_1 = 1,6 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi pertama diperoleh $(4-1,6) \text{ gr} = 2,40 \text{ gram}$ butirat

Pada Ekstraksi Kedua dengan sisa 250 ml eter, diperoleh :

$$3 = \frac{(1,6 - x_2) \frac{gr}{250L}}{(x_2) \frac{gr}{500L}} = \frac{(1,6 - x_2) 2 \frac{gr}{L}}{(x_2) \frac{gr}{L}}$$

$$3x_2 = 3,2 - 2x_2$$

$$5x_2 = 3,2$$

$$x_2 = 0,64 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kedua diperoleh $(1,6 - 0,64) \text{ gr} = 0,96 \text{ gram}$ butirat

Sehingga secara keseluruhan, butirat yang dapat diekstrak oleh 2 x 250 ml eter adalah sebanyak $(2,40 + 0,96) \text{ gr} = 3,36 \text{ gram}$

3. Kondisi 3, dilakukan ekstraksi lima kali masing-masing dengan 100 ml eter (volume total tetap 500 ml)

Pada ekstraksi pertama dengan 100 ml eter pertama :

$$3 = \frac{(4 - x_1) \frac{gr}{100mL}}{(x_1) \frac{gr}{500mL}} = \frac{(4 - x_1) 5 \frac{gr}{L}}{(x_1) \frac{gr}{L}}$$

$$3x_1 = 20 - 5x_1$$

$$8x_1 = 20$$

$$x_1 = 2,5 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi pertama diperoleh $(4 - 2,5) \text{ gr} = 1,5 \text{ gram}$ butirat

Pada ekstraksi kedua dengan 100 ml eter kedua:

$$3 = \frac{(2,5 - x_2) \frac{gr}{100L}}{(x_2) \frac{gr}{500L}} = \frac{(2,5 - x_2) 5 \frac{gr}{L}}{(x_2) \frac{gr}{L}}$$

$$3x_2 = 12,5 - 5x_2$$

$$8x_2 = 12,5$$

$$x_2 = 1,5625 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kedua diperoleh $(2,5 - 1,5625)$ gr = 0.9375 gram butirat

Pada ekstraksi ketiga dengan 100 ml eter ketiga:

$$3 = \frac{(1,5625 - x_3) \frac{\text{gr}}{100L}}{(x_3) \frac{\text{gr}}{500L}}$$

$$3x_3 = 7,8125 - 5x_3$$

$$8x_3 = 7,8125$$

$$x_3 = 0,9766 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi ketiga diperoleh $(1,5625 - 0,9766)$ gr = 0.5859 gram butirat

Pada ekstraksi keempat dengan 100 ml eter keempat:

$$3 = \frac{(0,9766 - x_4) \frac{\text{gr}}{100L}}{(x_4) \frac{\text{gr}}{500L}}$$

$$3x_4 = 4,8828 - 5x_4$$

$$8x_4 = 4,8828$$

$$x_4 = 0,6104 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi keempat diperoleh $(0,9766 - 0,6104)$ gr = 0.3662 gram butirat

Pada ekstraksi terakhir dengan 100 ml eter sisa:

$$3 = \frac{(0,6104 - x_5) \frac{gr}{100L}}{(x_5) \frac{gr}{500L}}$$

$$3x_5 = 3,0518 - 5x_5$$

$$8x_5 = 3,0518$$

$$x_5 = 0,3815 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kelima diperoleh $(0,6104 - 0,3815) \text{ gr} = 0,2289$ gram butirat

Dengan demikian, pada multi-ekstraksi dengan lima kali 100 ml eter diperoleh ekstrak butirat sebanyak:

$$= (1,5000 + 0,9375 + 0,5859 + 0,3663 + 0,2289) \text{ gram}$$

$$= 3,6185 \text{ gram}$$

4. Kondisi 4, dilakukan ekstraksi sepuluh kali masing-masing dengan 50 ml eter (volume total tetap 500 ml)

Pada ekstraksi pertama dengan 50 ml eter pertama :

$$3 = \frac{(4 - x_1) \frac{gr}{50 mL}}{(x_1) \frac{gr}{500 mL}} = \frac{(4 - x_1) 10 \frac{gr}{L}}{(x_1) \frac{gr}{L}}$$

$$3x_1 = 40 - 10x_1$$

$$13x_1 = 40$$

$$x_1 = 3,0769 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi pertama diperoleh $(4 - 3,0769) \text{ gr} = 0,9231$ gram butirat

Pada ekstraksi kedua dengan 50 ml eter kedua:

$$3x_2 = 30,769 - 10x_2$$

$$13x_2 = 30,769$$

$$x_2 = 2,3669 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kedua diperoleh $(3,0769 - 2,3669)$ gr = 0,7101 gram butirat

Pada ekstraksi ketiga dengan 50 ml eter ketiga:

$$3x_3 = 23,669 - 10x_3$$

$$13x_3 = 23,669$$

$$x_3 = 1,8207 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi ketiga diperoleh $(2,3669 - 1,8207)$ gr = 0,5462 gram butirat

Pada ekstraksi keempat dengan 50 ml eter keempat:

$$3x_4 = 18,207 - 10x_4$$

$$13x_4 = 18,207$$

$$x_4 = 1,4005 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi keempat diperoleh $(1,8207 - 1,4005)$ gr = 0,4202 gram butirat

Pada ekstraksi kelima dengan 50 ml eter kelima:

$$3x_5 = 14,005 - 10x_5$$

$$13x_5 = 14,005$$

$$x_5 = 1,0773 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kelima diperoleh $(1,4005 - 1,0773)$ gr = 0,3232 gram butirat

Pada ekstraksi keenam dengan 50 ml eter keenam:

$$3x_6 = 10,773 - 10x_6$$

$$13x_6 = 10,773$$

$$x_6 = 0,8287 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi keenam diperoleh $(1,0773 - 0,8287)$ gr =
0,2486 gram butirat

Pada ekstraksi ketujuh dengan 50 ml eter ketujuh:

$$3x_7 = 8,287 - 10x_6$$

$$13x_7 = 8,287$$

$$x_7 = 0,6375 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi ketujuh diperoleh $(0,8287 - 0,6375)$ gr =
0,1912 gram butirat

Pada ekstraksi kedelapan dengan 50 ml eter kedelapan:

$$3x_8 = 6,375 - 10x_8$$

$$13x_8 = 6,375$$

$$x_8 = 0,4904 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kedelapan diperoleh $(0,6375 - 0,4904)$ gr =
0,1471 gram butirat

Pada ekstraksi kesembilan dengan 50 ml eter kesembilan:

$$3x_9 = 4,904 - 10x_9$$

$$13x_9 = 4,904$$

$$x_9 = 0,3772 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kesembilan diperoleh $(0,4904 - 0,3772)$ gr =
0,1132 gram butirat

Pada ekstraksi terakhir dengan 50 ml eter kesepuluh:

$$3x_{10} = 3,772 - 10x_{10}$$

$$13x_{10} = 3,772$$

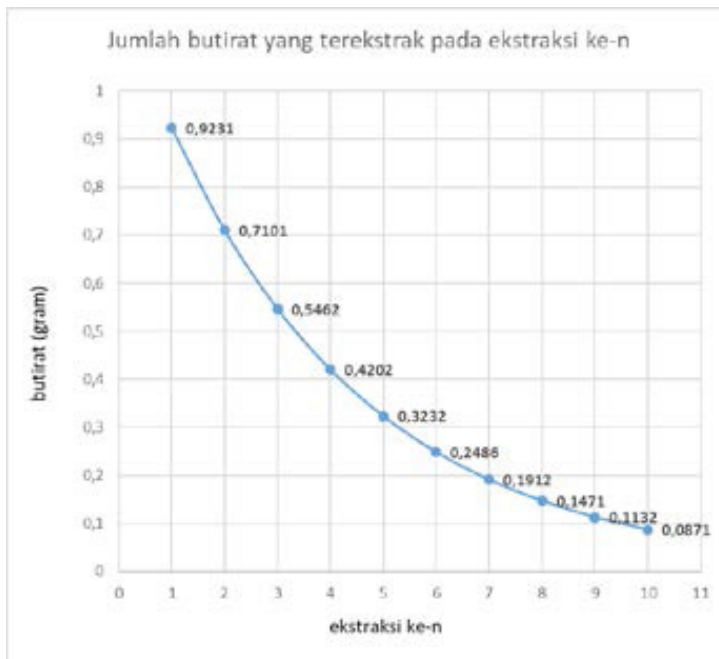
$$x_{10} = 0,2902 \text{ gram}$$

Jadi pada ekstraksi kesembilan diperoleh $(0,3772 - 0,2902)$ gr = 0,0871 gram butirat

Jadi pada ekstraksi dengan sepuluh kali @50mL. maka diperoleh asam butirat pada fase organik sebanyak:

$$= (0,9231 + 0,7101 + 0,5462 + 0,4202 + 0,3232 + 0,2486 + 0,1912 + 0,1471 + 0,1132 + 0,0871) \text{ gram}$$

$$= 3,71 \text{ gram}$$



Gambar 21. Perolehan ekstraksi 4 gr butirat dalam air dengan 500 ml eter pada 10 kali ekstraksi @50 mL.

Dari gambar 21 terlihat bahwa semakin banyak dilakukan ekstraksi maka hasilnya semakin besar dan hasil ekstraksi menurun secara teratur berdasarkan jumlah ekstraksi yang dilakukan. Hal ini juga menunjukkan bahwa secara praktis kita tidak dapat mengambil 100% sampel melalui ekstrak-si, akan tetap semakin banyak jumlah per-laku-an, maka akan semakin banyak pula sampel yang dapat diekstrak.

Berdasarkan hasil perhitungan pada contoh sebelumnya, tabel 12 menunjukkan perbandingan hasil yang diperoleh pada ekstraksi asam butirat 4 gram oleh 500 mL eter pada empat kondisi yang telah dijelaskan secara rinci di atas.

Tabel 12. Perbandingan hasil ekstraksi berdasarkan jumlah perlakuan pada volume yang sama

No	Jumlah ekstraksi	Jumlah Pelarut eter (mL)	Hasil (gr)
1	1	500	3,000
2	2	500	3,360
3	5	500	3,678
4	10	500	3,710

Ekstraksi cara Batch ini juga dipengaruhi oleh beberapa hal di antaranya koefisien distribusi (K_d), keasaman larutan (pH), dan juga perbandingan volume pelarut pada kedua fasa (V_o/V_a).

Sebagaimana disampaikan terdahulu bahwa apabila dalam ekstraksi tidak terjadi interaksi dengan salah satu pelarut maka $K_d = D$. Bila berinteraksi dengan salah satu pelarut (misalnya air) untuk mendapatkan yang terkestrak dipergunakan D (perbandingan distribusi). Sebagai contoh diilustrasikan dalam larutan yang mengandung Cromium (Cr) yang terdiri atas beberapa spesies seperti Cr^{2+} , CrO_4^{2-} , atau $Cr_2O_7^{2-}$, akan diekstrak dengan pelarut

organik. Jika yang diinginkan adalah Cr total terekstrak, menggunakan nilai D . Sementara jika hanya salah satu spesies saja yang akan diekstrak, maka menggunakan nilai K_d .

Dua pelarut tidak selalu harus campuran air-organik, tetapi dapat juga kedua pelarutnya organik, dengan syarat keduanya tidak saling bercampur (*like dissolve like*). Secara umum, bila W_o gram terlarut dalam V_A mL pelarut A, diekstrak dengan V_B mL pelarut B, maka:

$$K_d = \frac{[\dots]_A}{[\dots]_B}$$

$$W_A = [\dots]_A V_A$$

$$W_B = [\dots]_B V_B$$

$$W_A + W_B = W_o$$

Fraksi dalam pelarut A adalah :

$$\text{fraksi dalam solvent A} = \frac{W_{A,1}}{W_o}$$

$$= \frac{[\dots]_{A,1} V_A}{[\dots]_{A,1} V_A + [\dots]_{B,1} V_B} \dots \dots \dots \left(\frac{1}{[\dots]_{A,1}} \right)$$

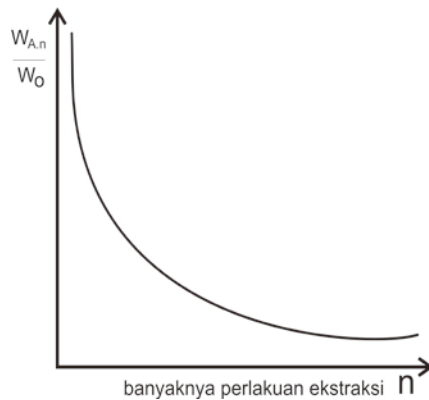
$$\frac{V_A}{V_A + \frac{[\dots]_{B,1} V_B}{[\dots]_{A,1}}}$$

$$\frac{V_A}{V_A + K_d V_B}$$

Jadi,

$$W_{A,1} = W_o \frac{V_A}{V_A + K_d V_B}$$

$$W_{A,n} = W_o \left(\frac{V_A}{V_A + K_d V_B} \right)^n$$



Gambar 22. Hubungan fraksi terlarut dalam pelarut dengan banyaknya perlakuan ekstraksi

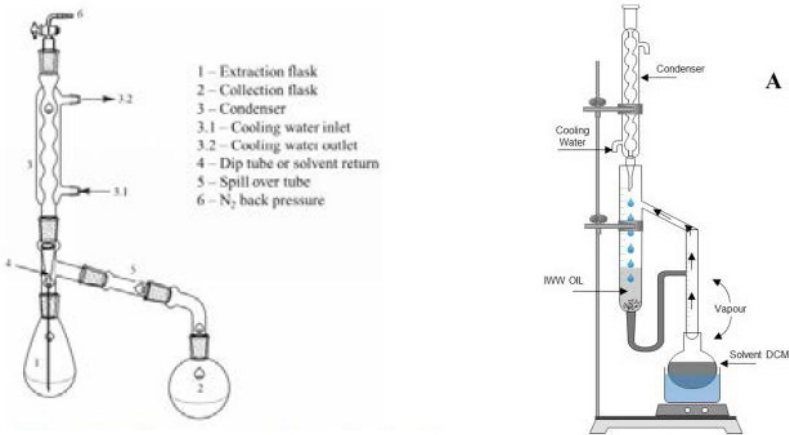
Bila K_d besar maka perbandingan V_o/V_A kurang berpengaruh sehingga bila K_d besar, cara Batch menjadi sangat mudah dilakukan.

Gambar 22 menunjukkan ilustrasi umum hubungan antara banyaknya perlakuan ekstraksi dengan fraksi terlarut di dalam pelarut.

b. Metode Ekstraksi dengan Sistem Kontinu

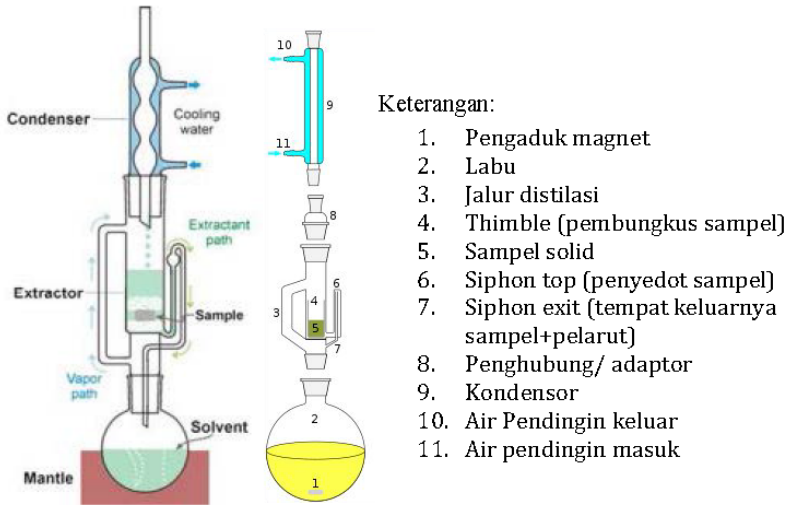
Metode ekstraksi selanjutnya adalah ekstraksi sistem kontinu, yang memanfaatkan aliran kontinu pelarut yang tidak saling bercampur. Ekstraksi kontinu dilakukan apabila koefisien distribusi relatif kecil ($D < 2$) atau jika harga faktor pemisahan (β) mendekati satu. Pada kondisi di mana D relatif kecil, maka ekstraksi cara Batch yang menggunakan corong pisah akan sulit

dilakukan karena harus mengekstrak hingga ratusan kali. Pada ekstraksi kontinu ini, pelarut yang mengekstrak sampel (terlarut) kemudian diuapkan lalu didinginkan kembali agar terjadi kondensasi sehingga pelarut tersebut kemudian dapat mengekstrak kembali. Hal ini berlangsung terus hingga berulang kali (kontinu). Peralatan terkait proses ekstraksi ini diilustrasikan pada gambar 23.



Gambar 23. Contoh peralatan ekstraksi kontinu cair-cair
(Davidson *et al.* 2019; Mendoza *et al.* 2019)

Contoh praktis yang paling banyak digunakan dalam hubungannya dengan ekstraksi kontinu ini adalah Ekstraksi Soxhlet atau biasa kita namakan Sokletasi. Pada metode ini menggunakan ekstraktor soxhlet yang diambil dari nama Franz von Soxhlet yang menemukan alat ini pada tahun 1879. Metode ekstraksi ini adalah ekstraksi padat-cair di mana analit yang akan diekstrak umumnya yang berada dalam bahan pada. Pada awalnya ekstraksi Soxhlet ini dirancang untuk ekstraksi lipid dari bahan padat. Metode ini digunakan pada saat senyawa yang diinginkan (analit) memiliki kelarutan yang terbatas dalam pelarut, di mana pelarut dapat mengekstrak secara berulang-ulang sambil mendaur ulang pelarut yang digunakan.



Gambar 24. Peralatan ekstraksi Soxhlet (Wikipedia, 2020; Dabbs et al., 2005)

Gambar 24 menunjukkan secara lengkap cara kerja dari peralatan ini, di mana pelarut ditempatkan di dalam labu (2) dan sampel (5) diletakkan di thimble (pembungkus sampel) yang terbuat dari kertas filter yang kuat atau selulosa (Gopalsatheeskumar, 2018) (4). Pada saat pelarut diberi suhu hingga titik didihnya (terkadang menggunakan pengaduk magnet (1)), maka pelarut akan menguap melewati jalur destilasi (3) hingga kemudian dikondensasikan pada kondensor (9) akibat pendinginan oleh keluar masuknya air (10,11) ke dalam kondensor. Akibat pengembunan tersebut menyebabkan pelarut dingin jatuh ke dalam sampel dan terjadilah peristiwa ekstraksi cair-padat hingga bagian thimble tersebut penuh, hingga secara otomatis siphon top (6) menyedot pelarut dan analit dan keluar melalui bagian siphon exit (7) hingga thimble kosong. Siphon ini juga berfungsi sebagai penghitung siklus pada sokletasi. Pelarut membawa analit masuk ke dalam labu kemudian akibat pemanasan maka pelarut murni menguap

kembali sehingga terjadi siklus berkali-kali tergantung waktu yang diatur oleh analis. Analit kemudian terkonsentrasi di dalam labu yang di akhir ekstraksi dapat dikuantifikasi dan diidentifikasi serta karakterisasi setelah menguapkan pelarutnya.

Pada proses Soxhletasi, persyarata pelarut paling tidak adalah sebagai berikut:

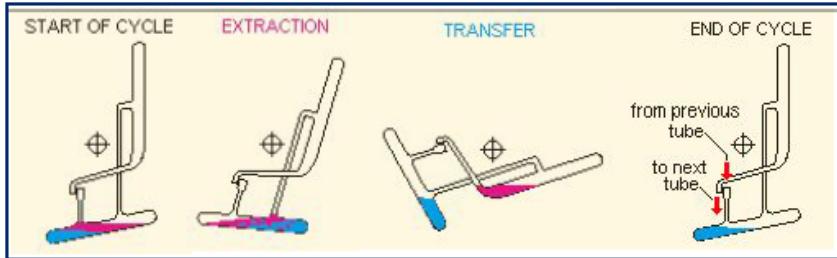
- Pelarut tersebut mudah menguap, seperti heksana, eter, petroleum eter, metil klorida, alkohol dan lain-lain
- Titik didihnya relatif rendah
- Pelarut tersebut tidak berinteraksi secara kimia dengan analit
- Memiliki kesesuaian fisiko-kimia dengan analit sebagai pelarut-terlarut
- Akan mudah dipisahkan dengan analit setelah ekstraksi

Metode ini tidak cocok untuk senyawa yang labil pada suhu tinggi karena pemanasan yang lama dapat menyebabkan senyawa terdegradasi (Gopalsatheeskumar, 2018).

c. Metode Ekstraksi Sistem Countercurrent

Ekstraksi countercurrent atau sistem ekstraksi arah berlawanan adalah metode ekstraksi cair-cair berulang/berganda (*multiple liquid-liquid extraction*). Metode ini memisahkan komponen-komponen atau senyawa-senyawa yang memiliki variasi kelarutan di dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur sehingga memungkinkan untuk memisahkan senyawa yang memiliki koefisien distribusi yang berbeda, meskipun perbedaannya cukup kecil. Dalam hal ini, dua pelarut tersebut mengalir pada arah yang berlawanan yang berlangsung pada banyak tempat atau tabung secara berulang-ulang.

Diciptakan pertama kali oleh Lyman C. Craig pada tahun 1943, sebenarnya adalah pseudo-counter current di mana sesungguhnya ada fase gerak (*mobile*) dan ada fase diam (*stasioner*).

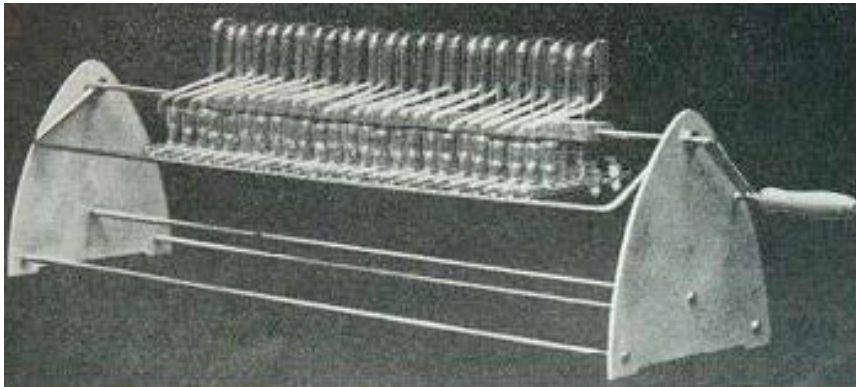


Gambar 25. Peralatan (*single glass*) ekstraksi counter current yang diperkenalkan pertama kali oleh Lyman C. Craig. Dalam prakteknya tabung tersebut disusun secara seri dalam jumlah cukup banyak (Efstathiou, 2004).

Pada gambar 25 merupakan peralatan yang digunakan oleh Craig, di mana fase di bagian bawah yang lebih berat dari kedua fase pelarut (misalnya air, warna biru pada gambar) merupakan fase stasioner atau fase diam, sedangkan di bagian atas (yang lebih ringan) seperti heksana (warna merah pada gambar) adalah fase mobile atau fase gerak (Efstathiou, 2004).

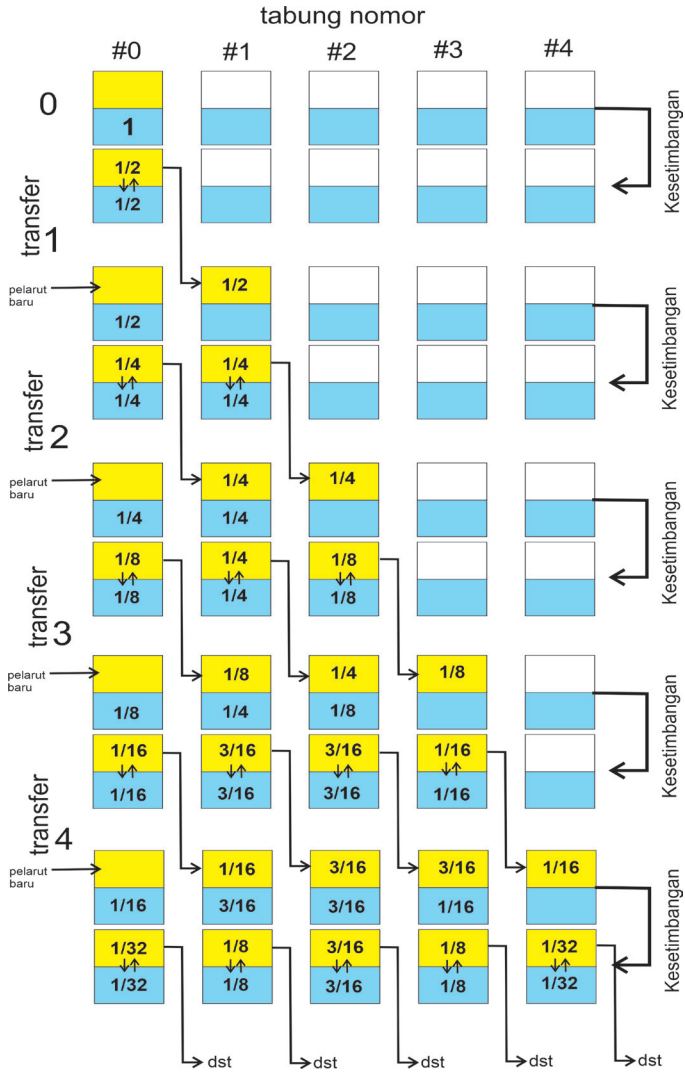
Pada awalnya tabung nomor #0 mengandung campuran senyawa yang akan dipisahkan yang terdapat pada pelarut yang lebih berat dan semua tabung lainnya mengandung pelarut yang sama dengan volume yang sama pula. Kemudian sebuah pelarut yang lebih ringan ditambahkan ke tabung #0, terjadi ekstraksi (kesetimbangan) yang berlangsung di antara kedua pelarut dan memungkinkan untuk memisahkan campuran. Kemudian fase gerak pada bagian atas dari tabung #0 di transfer ke tabung #1, kemudian pelarut yang sama kemudian ditambahkan kembali ke tabung #0, dan terjadi kesetimbangan kembali di kedua tabung. Fase gerak bagian atas tabung #0

dan tabung #1 secara simultan di transfer lagi ke tabung #1 dan tabung #2 dan seterusnya. Siklus ini berulang terus melalui semua tabung yang terdapat pada peralatan. Senyawa dengan perbandingan distribusi lebih tinggi akan bergerak lebih cepat dibanding yang memiliki perbandingan distribusi lebih rendah.



Gambar 26. Peralatan yang dioperasional oleh Craig, yang terdiri atas 25 tabung (Efsthathiou, 2004).

Gambar 26 menunjukkan peralatan yang digunakan oleh Craig yang terdiri atas 25 tabung di mana setiap tabungnya terjadi ekstraksi yang kemudian ditransfer ke tabung berikutnya untuk diekstraksi lebih lanjut dan seterusnya hingga pada tabung ke-25. Setelah 25 kali ekstraksi maka dua senyawa kemudian dapat dipisahkan.



Jika kita mengamati secara khusus distribusi suatu senyawa A (misalnya) dalam tabung sebagaimana digambarkan oleh Craig, akan diperoleh suatu fenomena yang sangat menarik.

Apabila diandaikan bahwa volume dua pelarut yang digunakan adalah sama (V) dan sampel A memiliki massa W , kemudian x dan y adalah fraksi dari senyawa A yang terdistribusi di antara kedua pelarut dengan perbandingan distribusi D , pada fase bagian atas terdiri atas pelarut dengan densitas lebih kecil (pelarut organik, o) dan pada fase bagian bawah terdiri dari pelarut dengan densitas lebih besar (pelarut air, a) sehingga diperoleh persamaan:

$$D = \frac{[C_A]_o}{[C_A]_a} = \frac{xW/V}{yW/V} = \frac{x}{y}$$

Jika $x + y = 1$,

$$x = \frac{D}{D+1}$$

$$y = \frac{1}{D+1}$$

Gambar 27 menunjukkan dengan jelas skema pergerakan fraksi terlarut pada kedua pelarut dalam setiap tabung pada ekstraksi counter current. Jika kita mengamati pergerakan dan distribusi tersebut, akan nampak adanya angka-angka yang teratur dan simetris pada deretan tabung tersebut. Angka-angka tersebut yang merupakan distribusi zat terlarut pada proses Craig ini selanjutnya dapat kita sederhanakan sebagaimana terlihat pada tabel 13. Jika jumlah total terlarut adalah 1, fraksi terlarut sesudah n kali pemindahan dalam tabung nomor r adalah $f_{n,r}$ jadi:

Pada pemisahan

0 kali, maka $f_{0,0} = 1$

1 kali, maka menjadi $f_{1,0} + f_{1,1}$

2 kali, maka menjadi $f_{2,0} + f_{2,1} + f_{2,2}$

n kali, maka menjadi $f_{n,0} + f_{n,1} + f_{n,2} + \dots + f_{n,x}$

Bila fraksi mol terlarut pada fasa organik (mobile) = x
dan fraksi mol terlarut pada fasa air (stasioner) = y

maka, $x + y = 1$

Berat terlarut pada fasa organik = $C_m V_m$

Berat terlarut pada fasa air = $C_s V_s$

Jadi :

$$x = \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s}$$

$$y = \frac{C_s V_s}{C_m V_m + C_s V_s}$$

Jika $\frac{C_m}{C_s} = K$;

Tabel 13. Distribusi zat terlarut pada proses Craig

Nomor Transfer	Tabung nomor ke								faktor pengali
	#0	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	
0	1								$x 2^0$
1	1	1							$x 2^{-1}$
2	1	2	1						$x 2^{-2}$
3	1	3	3	1					$x 2^{-3}$
4	1	4	6	4	1				$x 2^{-4}$
5	1	5	10	10	5	1			$x 2^{-5}$
6	1	6	15	20	15	6	1		$x 2^{-6}$
7	1	7	21	35	35	21	7	1	$x 2^{-7}$

$$x = \frac{\frac{C_m}{C_s} V_m}{\frac{C_m}{C_s} V_m + \frac{C_s}{C_s} V_s}$$

$$x = \frac{KV_m}{KV_m + V_s}$$

dan:

$$y = \frac{V_s}{KV_m + V_s}$$

Pada kondisi :

$n = 0$ atau tidak ada transfer, maka $f_{0,0} = x + y$

$n = 1$ atau satu kali transfer, maka:

$f_{1,0} \rightarrow y$ dan $r = 0$

$$\left[\begin{array}{c} \text{fraksi terlarut} \\ \text{dalam fasa mobile} \end{array} \right] = xy$$

$$\left[\begin{array}{c} \text{fraksi terlarut} \\ \text{dalam fasa stasioner} \end{array} \right] = y^2$$

Jadi $f_{1,0} = xy + y^2$

$$= y(x+y)$$

$F_{1,1} \rightarrow x$ dan $r = 1$

$$\left[\begin{array}{c} \textit{fraksi terlarut} \\ \textit{dalam fasa mobile} \end{array} \right] = x^2$$

$$\left[\begin{array}{c} \textit{fraksi terlarut} \\ \textit{dalam fasa stasioner} \end{array} \right] = xy$$

Jadi $f_{1,1} = x(x + y)$

$n = 2$ atau dua kali transfer, maka :

$f_{2,0} \rightarrow y^2$ dan $r = 0$

$$\left[\begin{array}{c} \textit{fraksi terlarut} \\ \textit{dalam fasa mobile} \end{array} \right] = xy^2$$

$$\left[\begin{array}{c} \textit{fraksi terlarut} \\ \textit{dalam fasa stasioner} \end{array} \right] = y^3$$

Jadi $f_{2,0} = y^2(x + y)$

$r = 1, f_{2,1} \rightarrow xy + xy = 2xy$

$$\left[\begin{array}{c} \textit{fraksi terlarut} \\ \textit{dalam fasa mobile} \end{array} \right] = 2x^2y$$

$$\left[\begin{array}{c} \textit{fraksi terlarut} \\ \textit{dalam fasa stasioner} \end{array} \right] = 2xy^2$$

Jadi $f_{2,1} = 2xy(x + y)$

$$r = 2, f_{2,2} \rightarrow x^2$$

$$\left[\begin{array}{l} \text{fraksi terlarut} \\ \text{dalam fasa mobile} \end{array} \right] = x^3$$

$$\left[\begin{array}{l} \text{fraksi terlarut} \\ \text{dalam fasa stasioner} \end{array} \right] = x^2 y$$

$$\text{Jadi } f_{1,1} = x^3 (x + y)$$

Berdasarkan perhitungan tersebut di atas, apabila $(x+y) = 1$, maka dapat dibuat penyederhanan sebagai berikut:

$$f_{0,0} = \frac{0!}{0!(0-0)!} x^0 y^{(0-0)} = 1$$

$$f_{1,0} = \frac{1!}{0!(1-0)!} x^0 y^{(1-0)} = y$$

$$f_{1,1} = \frac{1!}{1!(1-1)!} x^1 y^{(1-1)} = x$$

$$f_{2,0} = \frac{2!}{0!(2-0)!} x^0 y^{(2-0)} = y^2$$

$$f_{2,1} = \frac{2!}{1!(2-1)!} x^1 y^{(2-1)} = 2xy$$

$$f_{2,2} = \frac{2!}{2!(2-2)!} x^2 y^{(2-2)} = x^2$$

dan seterusnya sehingga:

$$f_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} x^r y^{(n-r)}$$

Sebagai contoh mari kita perhatikan soal berikut: akan dihitung berapa fraksi terlarut pada tabung ke tiga pada lima kali transfer jika diketahui $K = 4$, dan volume pelarut organik dan pelarut air sama. Maka dengan menggunakan persamaan di atas dapat dihitung sebagai berikut:

Jika $V_s = V_m$ dan $K = 4$, maka:

$$f_{5,3} = \frac{5!}{3!(5-3)!} x^3 y^{(5-3)}$$

dan diketahui:

$$x = \frac{4V_m}{4V_m + V_s}$$

$$x = \frac{4V_m}{V_m(4+1)} = \frac{4}{5} = 0,8$$

Kemudian,

$$y = 1 - x \text{ atau } y = 1 - 0,8 = 0,2$$

Sehingga

$$f_{5,3} = \frac{5!}{3!(5-3)!} (0,8)^3 (0,2)^{(5-3)}$$

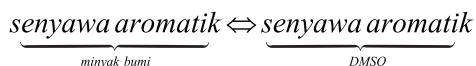
$$f_{5,3} = 10(0,8)^3 (0,2)^2 = 0,2048$$

3. Klasifikasi Ekstraksi

Klasifikasi ekstraksi secara singkat dapat dibagi 4, masing-masing: (1) partisi sederhana, (2) ekstraksi dengan pembentukan khelat, (3) ekstraksi dengan asosiasi ion, dan (4) ekstraksi dengan penukar ion. Berikut penjelasan singkat dari masing-masing klasifikasi tersebut:

a. Ekstraksi dengan partisi sederhana

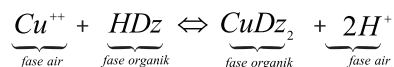
Ekstraksi dengan partisi sederhana adalah suatu ekstraksi yang didasarkan pada perbedaan kelarutan senyawa yang dipisahkan pada dua fasa. Misalnya dapat diilustrasikan sebagai berikut:



Dalam hal ini berlaku $K = \frac{C_1}{C_2}$

b. Ekstraksi dengan pembentukan khelat

Ekstraksi ini didasarkan pada perbedaan kelarutan khelat yang terbentuk dari senyawa yang dipisahkan di antara kedua fasa. Sebagai contoh, ekstraksi Cu^{++} yang mula-mula dalam fasa air kemudian diekstrak ke dalam fasa organik tetapi “tidak dapat pindah” karena Cu tidak larut dalam pelarut organik. Untuk mengatasi hal ini, maka Cu^{++} harus dibuat reaksi kompleks terlebih dahulu dengan membentuk khelat (ditizon, HDz). Ilustrasinya adalah sebagai berikut:



Dari reaksi ini terlihat bahwa ekstraksi dipengaruhi oleh pH. Sehingga dengan mengubah pH maka reaksi dapat diarahkan ke kiri atau ke kanan sehingga Cu^{++} dapat dikembalikan ke fase air. Kembalinya Cu ke fase air akibat pengaruh pH ini disebut Stripping. Cara pembentukan khelat ini dapat diterapkan untuk ekstraksi komponen-komponen secara bertingkat.

c. Ekstraksi dengan asosiasi ion

Ekstraksi ini didasarkan pada kekuatan solvasi dari ion berpasangan oleh fasa organik sehingga mempunyai kelarutan yang besar dalam fasa organiknya. Sebagai contoh, pada ekstraksi uranium dengan TBP, di mana uranium mudah larut dalam asam nitrat membentuk senyawa uranium nitrat sesuai reaksi berikut:



Senyawa yang terbentuk bukan senyawa kompleks khelat tetapi asosiasi ion.

d. Ekstraksi dengan penukar ion

Ekstraksi ini didasarkan pada perbedaan solvasi ion berpasangan oleh pelarut organik, sebagai contoh pada reaksi berikut:



Cara ini biasanya selektif untuk logam-logam lantanida dan aktinida.

4. Faktor-faktor yang mempengaruhi Ekstraksi

Berdasarkan fase zat terlarut dan pelarut yang terlibat, ekstraksi dibedakan menjadi tiga masing-masing: (1) ekstraksi cair-cair, (2) ekstraksi padat-cair dan (3) ekstraksi gas-cair. Dalam praktik sehari-hari yang paling sering digunakan adalah ekstraksi padat-cair, yang sering diistilahkan *Leaching*. Apabila ada zat terlarut yang terdapat dalam fase padat tetapi tidak diinginkan dan akan dihilangkan dari padatan dengan menggunakan air, maka proses leaching tersebut kita sebut pencucian.

Aplikasi proses ekstraksi padat-cair sedemikian luas diberbagai bidang seperti industri farmasi, industri bahan makanan, industri kosmetika dan lain-lain. Sementara itu, jenis-jenis pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi padat-cair juga bervariasi mulai dari air, alkohol (paling sering metanol dan etanol), heksana, eter, petroleum eter, kloroform, aseton bahkan asam-asam lemah anorganik.

Dalam ekstraksi padat-cair, ada beberapa faktor yang perlu diperhatikan di antaranya adalah kami rangkum sebagai berikut :

a. Ukuran Partikel

Ukuran partikel sampel (padat) berpengaruh terhadap luas permukaan. Semakin kecil ukuran partikel, semakin besar luas permukaan. Akibatnya memperbesar peluang kontak antara partikel dengan pelarut (cair) dan hal ini juga akan memperbesar laju perpindahan massa dan juga akan memperkecil jarak difusi.

Meskipun demikian, perlu menjadi catatan bahwa ukuran partikel yang sangat halus juga berpengaruh terhadap menurunnya efektivitas ekstraksi, terutama jika sirkulasi proses ekstraksi tidak dijalankan, termasuk akan mengalami kesulitan pada pembuangan sisa (ampas) pada saat akan melakukan pemisahan dan menyulitkan dalam hal pembuangan. Oleh karena itu, terkadang diperlukan optimasi untuk menentukan rentang ukuran partikel yang optimal

b. Pelarut

Jenis Pelarut akan sangat berpengaruh dalam segala tipe ekstraksi. Efektivitas ekstraksi benar-benar sangat dipengaruhi oleh pelarut yang dipilih. Persyaratan umum yang sering menjadi acuan adalah pelarut tidak

boleh berinteraksi atau bereaksi dengan terlarut (sampel), apalagi dapat merusak sampel. Pelarut juga mempunyai syarat tidak memiliki viskositas yang tinggi agar sirkulasi dapat berlangsung secara bebas.

Konsentrasi pelarut juga sangat berpengaruh terhadap efektivitas ekstraksi, dan terdapat konsentrasi optimum untuk jenis pelarut dan terlarut yang berbeda-beda (Montperrus, et al., 2002). Kadang-kadang digunakan juga campuran dua jenis pelarut dengan perbandingan tertentu (misalnya air-alkohol) (Bohari, et al., 2002).

Pemilihan pelarut ini menjadi sangat penting dalam proses ekstraksi sehingga memerlukan pertimbangan-pertimbangan. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam memilih pelarut adalah agar memenuhi kriteria di antaranya: (1) selektivitas, (2) kestabilan kimia dan panas, (3) kecocokan dengan terlarut, (4) viskositas, (5) *recovery* pelarut, (6) tidak mudah terbakar, (7) tidak beracun dan (8) mudah diperoleh dan murah.

c. Suhu

Temperatur atau suhu akan berpengaruh terhadap kelarutan zat terlarut yang akan diekstrak oleh pelarut (Jayanuddin, et al., 2014; Sulihono, et al., 2012). Jika suhu dinaikkan, kelarutan akan bertambah dan juga akan memperbesar difusi. Akibatnya kecepatan ekstraksi akan bertambah atau ekstraksi akan dipercepat selesainya. Akan tetapi, kita harus berhati-hari dalam mengontrol suhu ekstraksi karena suhu yang terlalu tinggi akan dapat merusak sampel atau terlarut.

d. Pengadukan

Seringkali dalam ekstraksi padat-cair dilakukan pengadukan dengan maksud untuk meningkatkan difusi sehingga ekstraksi dapat lebih efektif. Pengadukan dapat mempercepat perpindahan massa dari partikel ke dalam larutan, dan juga dengan pengadukan akan mencegah terjadinya pengendapan atau akan mempermudah proses penguapan.

e. Waktu

Waktu atau lamanya ekstraksi juga berpengaruh terhadap efektivitas ekstraksi. Waktu yang sangat sedikit, akan menyebabkan ekstraksi tidak optimal sementara waktu yang berlebihan dapat mempengaruhi hasil ekstraksi baik dapat berupa kerusakan sampel ataupun hal-hal lain yang kemungkinan muncul pada ekstraksi yang terlalu lama. Rentang waktu ekstraksi sangat bervariasi tergantung pada jenis pelarut, teknik ekstraksi, suhu dan lain-lain. Oleh karena itu, optimasi waktu ekstraksi menjadi sangat penting untuk dilakukan (Wahyuni & Widjanarko, 2015).

f. Teknik Ekstraksi

Teknik ekstraksi khususnya pada ekstraksi padat-cair sangat berpengaruh terhadap efektivitas ekstraksi. Hal ini dapat dipahami karena pada setiap teknik memiliki keunggulan dan kelemahan masing-masing. Beberapa teknik ekstraksi pada-cair yang sering digunakan adalah di antaranya teknik maserasi dengan merendam bahan sampel dengan dipanaskan pada suhu tertentu ataupun tidak dipanaskan, soxhletasi yang merupakan ekstraksi kontinu, sonikasi yang menggunakan ultrasonic, ekstraksi menggunakan gelombang mikro (*microwave*) dan juga ekstraksi biasa dengan menggunakan hanya corong pisah serta berbagai teknik lainnya.

Pemilihan teknik ekstraksi ini sangat penting dan juga sangat tergantung pada jenis sampel, jenis analit dan lain-lain (Bohari, et al., 2001).

g. Jenis sampel

Jenis sampel padatan yang akan diekstrak juga akan berpengaruh dalam memilih teknik ekstraksi dan variabel ekstraksi yang akan digunakan. Hal ini juga tentu akan mempengaruhi hasil ekstraksi. Beberapa jenis sampel padatan yang berbeda memerlukan kejelian dalam menentukan keputusan

teknik dan metode yang digunakan. Beberapa jenis sampel yang dimaksud seperti di antaranya sampel tanah, sampel sedimen, sampel material biologi, sampel batuan, sampel limbah pada, dan lain-lain yang kesemuanya sangat berbeda karakteristiknya. Perbedaan karakteristik tersebut tentu memerlukan cara yang berbeda untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal.

h. Rasio Pelarut-Terlarut

Semakin banyak pelarut yang digunakan dengan rasio yang besar terhadap terlarut, tentu akan memperbesar hasil ekstraksi analit dari zat terlarut karena akan lebih banyak dan lebih cepat sampel yang dapat larut dan kemudian mengekstraksi analit. Akan tetapi penggunaan volume pelarut perlu mendapatkan perhatian karena akan menyebabkan biaya operasional menjadi lebih besar juga atau mahal. Oleh karena itu, penetapan rasio pelarut-terlarut menjadi sangat penting untuk dioptimasi.

BAB 5

KROMATOGRAFI

1. Pengantar

Istilah kromatografi pada awalnya berasal dari dua kata yaitu *chromatos* yang berarti warna dan *graphien* yang berarti menulis yang jika diterjemahkan bebas dapat diartikan dengan “menulis dengan warna”. Istilah ini tentu tidak terlepas dari penelitian dan penemuan oleh Michael Tswet (atau *Mikhail Semyonovich Tsvet*) pada tahun 1903, seorang botanis Russia-Italia, pada saat melakukan riset terkait pigmen tanaman. Tswet menggunakan kromatografi kolom dengan kalsium karbonat sebagai adsorben dan campuran petroleum eter/etanol sebagai eluen untuk memisahkan klorofil dan karotenoid. Metode tersebut disajikan pada The XI Congress of Naturalist and Physicians di St. Petersburg pada tanggal 30 Desember 1901. Dokumen pertama temuan ini ditulis pertama kali pada tahun 1905 dalam *Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists, biology section*. Kemudian terminologi kromatografi pertama kali disampaikan pada tahun 1906 dalam artikel dalam jurnal botanical Jerman *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft*. Kemudian pada tahun 1907, Tswet mendemonstrasikan kromatografi untuk German Botanical Society (Wikipedia.org., 2021).

Ilustrasi percobaan Tswet digambarkan pada gambar 28, di mana pigmen klorofil dielus dengan petroleum eter sebagai fase gerak melalui kalsium karbonat sebagai adsorben. Pigmen tersebut kemudian terpisah berdasarkan warna-warna yang berbeda dan pita warna tersebut tidak keluar

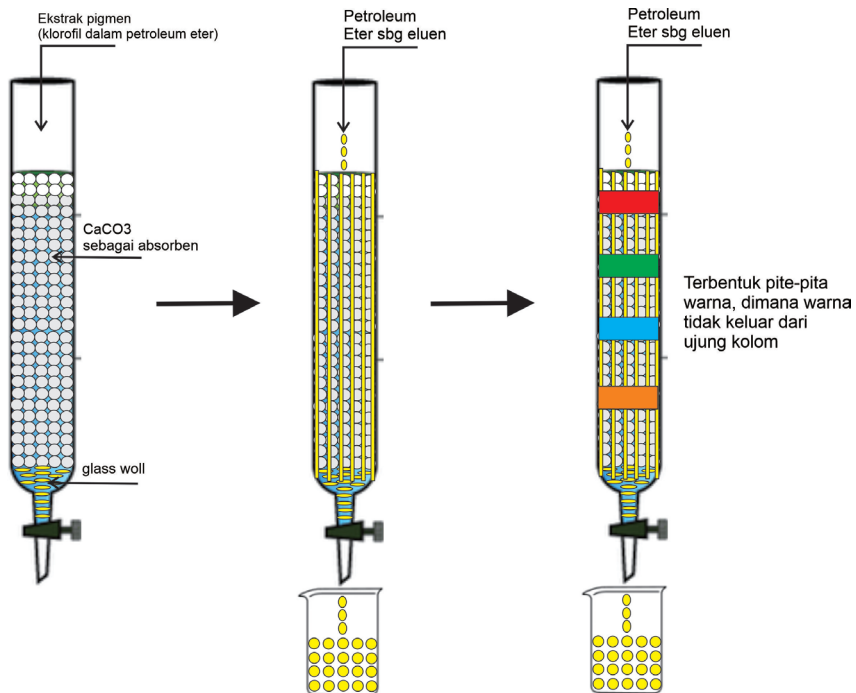
dari ujung kolom. Dari percobaan tersebut, Tsweet berkesimpulan bahwa zat warna yang di adsorb lebih kuat akan mendorong zat warna yang diadsorb lebih lemah. Atau zat warna yang teradsorb lebih lemah akan terdorong ke bawah dibanding zat warna yang teradsorb lebih kuat.

Secara terpisah kromatografi modern diperkenalkan juga oleh David T. Day seorang insinyur geologi dan pertambangan dari Amerika di awal abad ke-20, di mana Day mengembangkan prosedur fraksinasi minyak mentah.

Pada awalnya, kromatografi hanya dapat memisahkan komponen yang berwarna. Terjadinya pemisahan berdasarkan pada kecepatan migrasi komponen-komponen dalam sampel yang berbeda. Perbedaan migrasi ini disebabkan karena adanya perbedaan kesetimbangan distribusi dalam fasa diam dan fase gerak untuk setiap senyawa.

Berbeda dengan metode ekstraksi pada Metode Craig, pada kromatografi, ada fase diam (stasioner) dan ada fase mobil (gerak). Komponen akan bermigrasi karena adanya fase mobil yang terus menerus bergerak (oleh Craig, hanya bergerak jika dipindahkan) sehingga cocok atau relevan dengan ekstraksi counter current oleh Craig.

Kromatografi adalah istilah yang umum untuk teknik pemisahan yang didasarkan pada partisi atau distribusi sampel (terlarut) di antara fase gerak (fase mobil) dan fase diam (fase stasioner). Kromatografi dapat dipandang sebagai serangkaian proses kesetimbangan antara fase mobil dan fase stasioner. Interaksi relatif dari terlarut dengan kedua fasa ini digambarkan sebagai koefisien partisi (K) atau koefisien distribusi (D) (Perbandingan konsentrasi terlarut dalam fase stasioner dengan konsentrasi terlarut pada fase mobil) (Ismail & Nielsen, 2010).



Gambar 28. Ilustrasi percobaan Tsweet

Fase mobil dapat berupa gas (*Gas Chromatography/GC*), atau liquid (*Liquid Chromatography/LC*) ataupun berupa *Supercritical Fluid (Supercritical Fluid Chromatography/SFC)*. Sementara fase diam dapat berupa liquid dan lebih sering berupa padatan. Pada kromatografi dikenal istilah jumlah plat (plate number) yaitu suatu segmen imajiner tempat terjadinya migrasi.

Pada kromatografi, harga K dan D tergantung pada: (1) perbedaan kelarutan, (2) perbedaan adsorpsi, dan (3) perbedaan volatilitas. Komponen yang akan dipisahkan berada dalam sistem yang dinamis dengan melakukan pengaliran dan selama itu akan terjadi proses pelarutan, adsorpsi, dan penguapan.

Proses pelarutan terjadi akibat adanya perbedaan atau distribusi terlarut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur (ingat Hukum Nernst). Dalam hal ini terjadi peristiwa partisi selama proses ini.

Proses Adsorpsi dapat terjadi misalnya bila suatu senyawa yang ada di dalam larutan dimasukkan adsorben (misalnya arang aktif), sebagian komponen dalam larutan akan teradsorp dan sebagian yang lain tidak teradsorp. Dalam hal ini, peristiwa yang terjadi adalah peristiwa pelarutan dan peristiwa adsorpsi.

Selanjutnya, proses penguapan (volatilitas) dapat terjadi jika suatu senyawa volatile dimasukkan ke dalam larutan, kemudian dituangkan ke dalam lempeng lalu diberi adsorben berupa lapisan tipis. Pada keadaan ini sebagian komponen akan diadsorb, sebagian dalam larutan dan sebagian lainnya yang volatile akan menguap. Dalam hal ini terjadi peristiwa pelarutan, adsorpsi dan volatilitas.

Tujuan dari penggunaan kromatografi setidaknya ada dua: *pertama* untuk keperluan analisis, yaitu penentuan komposisi kimia dari suatu sampel dan *kedua* untuk keperluan preparatif, yaitu pemurnian dan pengambilan satu atau lebih komponen dari suatu sampel. Jadi kromatografi memiliki kemampuan untuk memisahkan molekul–molekul dengan cara menahannya pada fase diam (*stationer*) yang dibawa oleh arus fase gerak. Sekali molekul tersebut terpisahkan dari campuran maka molekul tersebut dapat diidentifikasi (kualitatif), diisolasi (*preparative*) dan di kuantifikasi (kuantitatif).

2. Klasifikasi Kromatografi

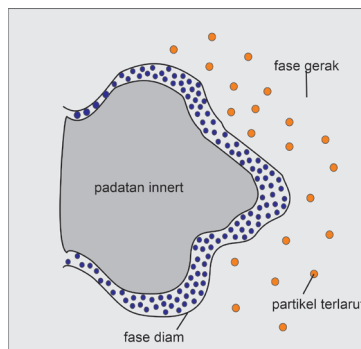
Jenis-jenis kromatografi ada bermacam-macam tergantung kepada dasar pengklasifikasiannya.

- a. Berdasarkan fase mobil dan fase diam yang terlibat, maka kromatografi diklasifikasikan menjadi 4 bagian masing-masing sebagaimana tercantum pada tabel 14 berikut

Tabel 14. Klasifikasi kromatografi berdasarkan fase diam dan fase gerak

Fase Gerak	Fase Diam	Nama
Gas	Solid	Gas-Solid Chromatography
Gas	Liquid	Gas-Liquid Chromatography (GLC /GC)
Liquid	Solid	Liquid-Solid Chromatography (LSC / HPLC)
Liquid	Liquid	Liquid-Liquid Chromatography (LLC)

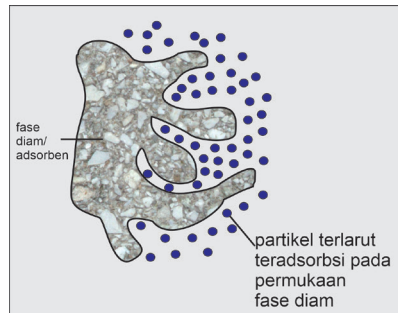
- b. Berdasarkan fenomena yang terjadi, kromatografi dibagi menjadi 5 jenis masing-masing partisi, adsorpsi, eksklusi, pertukaran Ion, dan afinitas.



Gambar 29. Ilustrasi fenomena partisi dalam kromatografi

- **Partisi** adalah fenomena yang terjadi di mana dua pelarut yang tidak saling bercampur dimasukkan terlarut maka terlarut akan terdistribusi di antara dua fasa yang tidak saling bercampur.

Perbedaan distribusi yang terjadi berdasarkan pada kelarutan terlarut terhadap dua fasa tersebut. Gambar 29 menunjukkan fenomena partisi di mana proses pemisahannya berdasarkan kemampuan adsorpsi analit (partikel terlarut) pada lapisan tipis cairan yang dilapiskan pada partikel padatan inert fase diamnya. Prinsip utama pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan antara komponen sampel pada fase diamnya (*gas chromatography*), atau berdasarkan perbedaan kelarutan komponen dalam fase gerak dengan fase diamnya (*liquid chromatography*). Keuntungan metode kromatografi partisi ini adalah distribusinya tidak bergantung pada konsentrasi sehingga pemisahan dapat terjadi lebih baik.

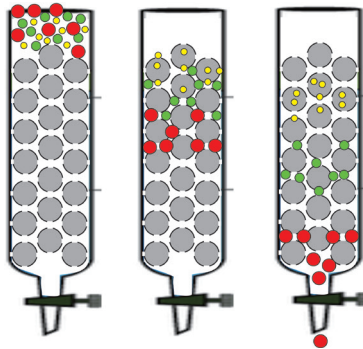


Gambar 30. Ilustrasi fenomena adsorpsi dalam kromatografi

- **Adsorpsi** yaitu fenomena di mana larutan yang mungkin terdiri atas lebih dari satu komponen yang homogen, kemudian dimasukkan adsorben, maka komponen-komponen tersebut akan teradsorb tergantung pada kecenderungan komponen-komponen tersebut. Pemisahan didasarkan pada perbedaan sifat afinitas adsorpsi dari komponen sampel pada permukaan padatan aktif. Kromatografi adsorpsi menggunakan fase gerak cairan maupun padatan yang mampu teradsorpsi pada

permukaan fase diamnya. Pada gambar 30 ini ditunjukkan interaksi adsorpsi antara analit pada fase gerak dengan permukaan fase diamnya.

- **Eksklusi** yaitu fenomena pemisahan yang didasarkan pada ukuran partikel. Biasanya digunakan untuk memisahkan molekul-molekul yang besar (makromolekul) seperti protein. Tipe ini tidak banyak dipengaruhi oleh interaksi antara fase diam dengan zat terlarutnya.

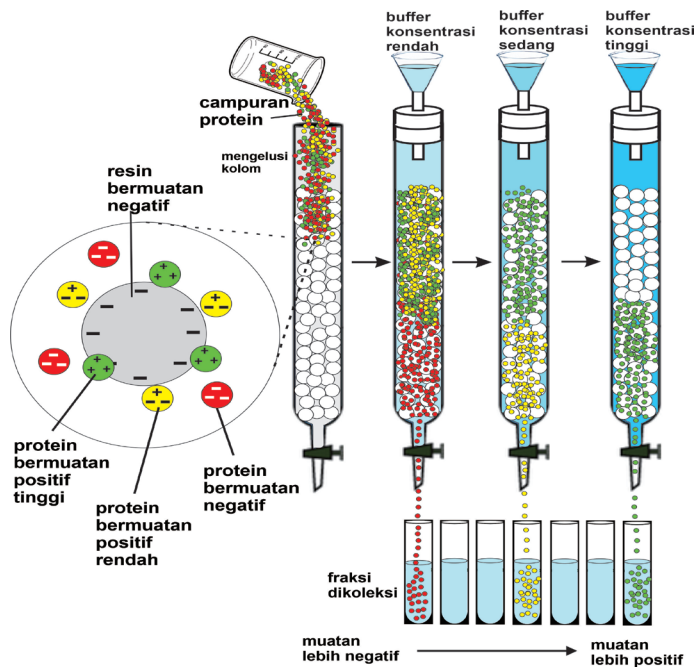


Gambar 31. Ilustrasi fenomena eksklusi dalam kromatografi

- Proses pemisahan berdasarkan volume hidrodinamik dari molekul atau partikel. Dalam teknik ini, gel nonionik dengan ukuran pori yang sama digunakan untuk memisahkan campuran berdasarkan perbedaan ukuran molekulnya (BM). Diilustrasikan pada gambar 31 di mana molekul-molekul yang kecil akan memasuki pori-pori dari gel sedangkan molekul besar akan melewati sela-sela gel lebih cepat bila dibandingkan dengan molekul yang melewati pori-porinya. Jadi urutan elusi mula-mula adalah molekul yang lebih besar, molekul sedang, dan terakhir molekul yang paling kecil. Apabila fasa diamnya adalah gel yang hidrofil maka teknik ini disebut

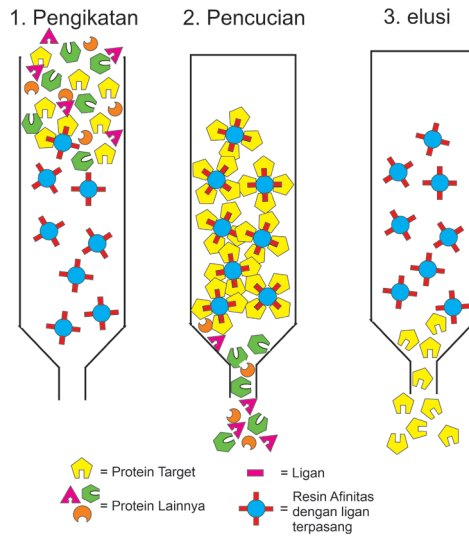
gel filtration chromatography dan bila digunakan gel yang hidrofob (polystyrene-divinylbenzene) disebut gel permeation chromatography.

- **Penukaran Ion** yaitu fenomena yang didasarkan pada interaksi muatan positif dan negatif antara molekul spesifik dengan matriks yang berada di dalam kolom sebagaimana diilustrasikan pada Gambar 32. Terdiri atas dua fenomena yaitu pertukaran kation bila molekul spesifik yang diinginkan bermuatan positif dan kolom kromatografi yang digunakan bermuatan negatif, dan pertukaran anion bila molekul spesifik yang diinginkan bermuatan negatif dan kolom kromatografi yang digunakan bermuatan positif. Sangat bermanfaat untuk menganalisis anion dan kation anorganik (seperti anion klorida dan nitrat dan kation kalium dan natrium). Selain itu juga dapat menganalisis ion organik serta dapat digunakan untuk pemurnian protein karena protein memuat molekul bermuatan pada nilai pH tertentu. Pada cara ini digunakan fase diam padat tempat partikel bermuatan dapat menempel (seperti resin kopolimer polistiren-divinilbenzena). Fase diam memiliki ion tetap seperti anion sulfat atau kation amina kuartener. Masing-masing harus diasosiasikan dengan ion counter (ion dengan muatan berlawanan) jika kita ingin menjaga netralitas sistem ini. Jika ion counter adalah kation, sistem tersebut dinamakan resin penukar kation. Namun, jika ion counter-nya adalah anion, maka sistemnya adalah resin penukar anion. Secara umum terdapat lima langkah utama dalam kromatografi pertukaran ion yaitu (1) tahap awal, (2) adsorpsi target, (3) memulai elusi, (4) akhir elusi, dan (5) regenerasi



Gambar 32. Ilustrasi fenomena pertukaran ion dalam kromatografi

- **Affinitas** kromatografi bekerja berdasarkan pada interaksi spesifik antara satu jenis molekul zat terlarut dengan jenis molekul lain yang terimmobilisasi dalam fase diam. Sebagai contoh, molekul yang terimmobilisasi dapat menjadi antibodi untuk beberapa protein yang spesifik. Saat zat terlarut yang mengandung campuran protein melewati molekul ini, hanya protein tertentu saja yang akan bereaksi dengan antibodi yang terimmobilisasi pada fase diam. Gambar 33 memberikan ilustrasi sederhana terkait fenomena afinitas tersebut.



Gambar 33. Ilustrasi fenomena afinitas dalam kromatografi

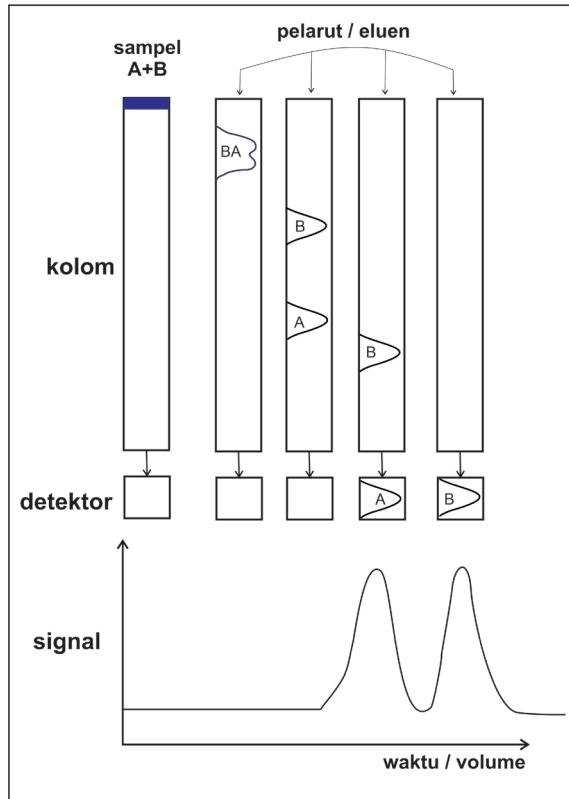
- c. Berdasarkan teknik pemisahan, kromatografi terdiri atas kromatografi kolom dan kromatografi planar (kertas dan lapis tipis).
- **Kromatografi kolom**, adalah kromatografi di mana fase diamnya terdeposisi pada pipa yang berbentuk kolom, kemudian komponen yang akan dipisahkan bergerak bersama fase gerak melalui kolom tersebut dan kemudian setiap komponen akan terpisahkan pada fase diamnya. Oleh fase mobil membuat setiap komponen yang keluar dari kolom dengan waktu yang berbeda dan kemudian akan masuk ke detektor untuk dideteksi dan dianalisis lebih lanjut.
 - **Kromatografi Planar** (biasanya berupa kromatografi lapis tipis) merupakan jenis kromatografi di mana fase diamnya berupa film atau lapisan tipis dengan partikel padat yang terikat bersama melalui kekuatan mekanik pada senyawa pengikat

seperti kalsium sulfat. komponen yang akan dipisahkan bergerak bersama fase gerak dalam sebuah bidang datar (planar). Senyawa yang bergerak terlihat seperti noda (spot) yang dapat diidentifikasi. Posisi noda menunjukkan identitas suatu komponen/senyawa (kualitatif), sedangkan besar atau intensitas noda menunjukkan konsentrasinya (kuantitatif).

d. Berdasarkan metode pengembangan, kromatografi didasarkan pada teknik elusi, metode frontal dan metode pergeseran/ displacement.

- Cara Elusi

Secara umum, dalam ilmu khususnya kimia analitik dan kimia organik, elusi dapat diartikan sebagai proses ekstraksi suatu bahan dari bahan lainnya dengan cara mencuci menggunakan pelarut; seperti dalam pencucian resin penukar ion yang telah jenuh untuk menghilangkan ion atau analit yang tertangkap didalamnya. Dalam percobaan kromatografi sebagai contoh, suatu analit umumnya dijerap/diadsorb, atau “terikat” pada fase diam di dalam kolom kromatografi. Elusi adalah proses menyingkirkan analit dari adsorben dengan mengalirkan suatu pelarut yang disebut dengan “eluen”. Eluen ini melewati kompleks adsorben-analit. Seiring dengan “elusi” molekul pelarut, atau pergerakan turun eluen melalui kromatografi kolom, pelarut atau eluen melewati kompleks adsorben-analit dan kemudian menggantikan analit dalam berikatan dengan adsorben. Setelah molekul pelarut menggantikan analit, analit dapat dikeluarkan dari kolom untuk dianalisis.



Gambar 34. Ilustrasi cara elusi dalam kromatografi

Mekanisme proses elusi dapat digambarkan pada skema di samping (Gambar 34) dengan keterangan sebagai berikut :

- a) Dimasukkan sampel A dan B
- b) Kemudian dialiri eluen (elusi)
- c) Elusi kemudian terjadi, di mana pelarut/eluen bergerak sepanjang fasa diam karena adanya aliran pelarut baru
- d) Pelarut terus bergerak sepanjang aliran menembus fasa diam

- e) Selama pelarut bergerak, selama itu akan terdistribusi antara dua fasa
- f) Bila laju alir pelarut tetap, maka gerakan komponen A dan B akan bergantung pada koefisien distribusi

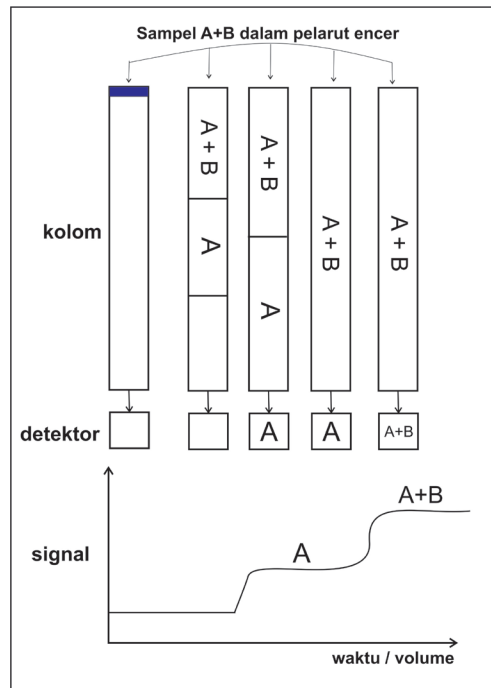
$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Jika $K_A < K_B$, A terelusi lebih dahulu, A kemudian akan bergerak lebih cepat daripada B, hal ini kita sebut migrasi differensial. Semakin panjang kolom, A semakin jauh akan meninggalkan B. Semakin besar perbedaan K, A dan B semakin mudah terpisah karena akan semakin pendek transfer yang diperlukan. Jika panjang kolom, fasa diam dan laju alir tetap, komponen A akan keluar dari kolom dalam waktu yang selalu sama, atau waktu retensi selalu sama. Letak puncak pada waktu retensi tertentu akan menentukan atau spesifik untuk suatu komponen (kualitatif), sedangkan secara kuantitatif tergantung pada luas segitiganya (*peak*/puncak).

- Cara Frontal

Metode frontal analisis sangat jarang digunakan secara umum, dan kemungkinan hanya digunakan pada studi akademis atau riset saja. Cara inipun hanya secara efektif dapat digunakan dalam sistem kromatografi kolom. Sampel dimasukkan secara terus-menerus ke dalam kolom dalam bentuk larutan encer dalam fase gerak. Hal ini berbeda dengan cara elusi, di mana sampel yang akan dipisahkan ditempatkan dalam sistem kromatografi dan pemisahan berlangsung secara bergantian. Pada analisis frontal, kita dapat memisahkan suatu campuran sampel dengan hasil yang relatif murni hanya untuk komponen sampel yang pertama kali keluar dari sistem

kromatografi, sedangkan setiap komponen sampel berikutnya tercampur dengan komponen yang terelusi didepannya. Sebagai contoh dalam Gambar 35 suatu campuran sampel terdapat tiga komponen yang hendak dipisahkan, yaitu (A), (B) dan (C), yang merupakan larutan encer dalam fase gerak yang dimasukkan secara terus menerus ke dalam kolom. Komponen pertama yang terelusi (A) merupakan sampel yang paling lemah terikat fase diam. Sampel kedua (B) akan terelusi tetapi masih tercampur dengan sampel pertama yaitu (A). Akhirnya, sampel ketiga, (C), akan terelusi bersamaan dengan (A) dan (B). Dari sini terlihat jelas bahwa hanya sampel (A) yang terelusi menjadi komponen yang murni. Oleh karena itu, analisis frontal tidak cocok untuk kebanyakan aplikasi analisis.



Gambar 35. Ilustrasi Cara Frontal dalam kromatografi

Gambar 34 memberikan ilustrasi terkait cara frontal ini, dengan penjelasan sebagai berikut:

- a) Sampel A dan B (A+B) dimasukkan pada ujung atas kolom secara terus menerus
- b) Bila perbandingan K_d antara A dan B sangat besar, maka A yang berada pada sampel akan bergerak lebih cepat
- c) Semakin besar harga K_d komponen B maka makin lambat pergerakannya.

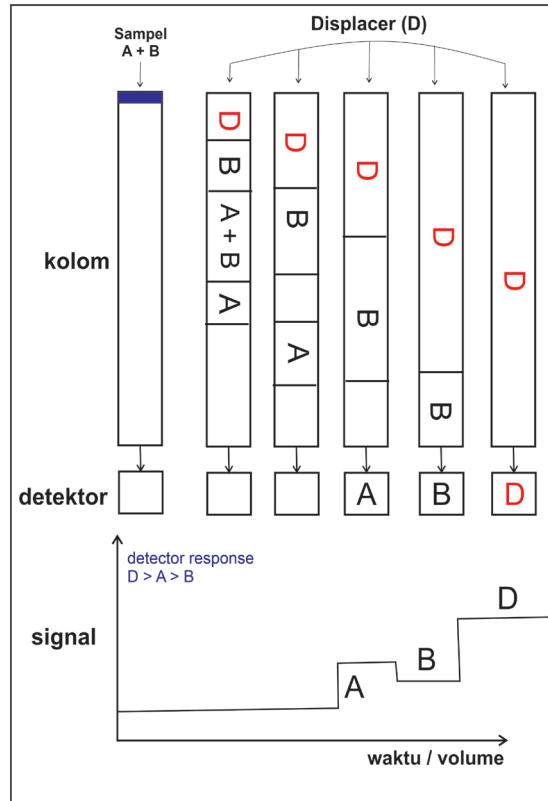
Biasanya cara ini digunakan untuk menyaring unsur/senyawa tertentu dan diaplikasikan dalam kromatografi Gas-Padat (GSC)

- Cara *Displacement*

Suatu senyawa atau analit biasanya teradsorpsi ke fase diam atau adsorben. Untuk analit yang teradsorpsi lebih kuat dapat mendesak keluar atau mengusir senyawa yang teradsorpsi lebih lemah. Metode ini disebut cara desakan atau pergeseran (cara *displacement*). Pita senyawa yang teradsorpsi paling lemah akan meninggalkan kolom lebih dahulu, kemudian diikuti dengan senyawa berikutnya, hingga senyawa paling akhir didesak oleh suatu senyawa tertentu yang sengaja dipilih untuk mendesak (misalnya fenol untuk peptide, efedrin untuk polisakarida). Cara *displacement* ini hanya efektif pada fase gerak di mana sampel teradsorpsi pada permukaan fase diam padat. Jika campuran sampel ditempatkan pada ujung sistem kromatografi, setiap sampel akan bersaing untuk segera menempati tempat adsorpsi yang ada. Pada awalnya, semua tempat adsorpsi akan terjenuhi dengan komponen sampel yang terikat paling kuat terlebih dahulu. Pada saat pita sampel

bergerak melewati sistem, tempat adsorpsi yang ada berikutnya akan dijenuhi dengan komponen sampel yang teradsorpsi paling kuat berikutnya. Oleh karena itu, komponen-komponen sampel akan mengatur diri mereka masing-masing sepanjang sistem kromatografi sesuai dengan kekuatan adsorpsi yang menurun berturut-turut. Jadi komponen yang teradsorpsi paling lemah, akan bergerak paling jauh.

Komponen-komponen sampel biasanya terikat sangat kuat pada permukaan fase diam sehingga mereka akan terelusi sangat lambat atau bahkan tidak terelusi sama sekali. Akibatnya, sampel harus didesak oleh suatu senyawa yang lebih kuat terikat daripada sampel-sampel yang diuji (disebut sebagai pendesak). Pendesak, terkandung dalam fase gerak pada konsentrasi yang rendah, pertama kali akan mendesak komponen sampel yang paling kuat terikat pada fase diam. Pada gilirannya komponen sampel ini akan mendesak komponen sampel yang terikat kurang kuat yang berada tepat di depannya. Jadi, pendesak mendorong komponen-komponen yang teradsorpsi secara progresif sepanjang sistem kromatografi, setiap komponen akan mendesak satu komponen lain yang berada di depannya sampai mereka semua melewati sistem kromatografi. Setiap sampel akan terkarakterisasi sesuai dengan urutan mereka terelusi serta jumlah setiap sampel yang ada akan proporsional dengan panjang setiap pita (bukan pada tingginya). Pada cara *displacement* ini, sampel tidak pernah benar-benar terpisah satu sama lain. Sampel meninggalkan sistem berurutan dan bersambung satu sama lain, masing-masing masih tercampur dengan komponen sampel yang ada di depan dan di belakangnya. Tipe pengembangan ini sangat jarang digunakan dalam kromatografi cair.



Gambar 36. Ilustrasi cara *displacement* dalam kromatografi

Gambar 36 menunjukkan secara sederhana ilustrasi bagaimana cara-*displacement* ini bisa berlangsung dengan ketentuan sebagai berikut :

- Mengandung *displacer* (komponen pendorong)
- Digunakan apabila komponen yang akan dipisahkan mempunyai harga K yang besar
- Sampel a dan B dimasukkan di ujung kolom
- Kemudian dialiri pelarut yang mengandung komponen D
- Cara ini dilakukan bila cara elusi dan frontal mempunyai masalah.

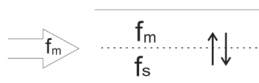
Tujuan aplikasi kromatografi adalah untuk analisis kuantitatif sebagai bagian dari proses pemisahan. Diharapkan diperoleh pemisahan yang memuaskan dari proses kromatografi berdasarkan interval waktu yang sesuai. Saat ini berbagai macam metode kromatografi telah dikembangkan, di antaranya adalah (Coskun, 2016):

- Kromatografi Kolom
- Kromatografi Penukar Ion
- Kromatografi Permeasi Gel (*Gel-Permeation/Molecular sieve*)
- Kromatografi Affinitas
- Kromatografi Kertas
- Kromatografi Lapis Tipis
- Kromatografi Gas
- Kromatografi Dye-Ligand
- Kromatografi Interaksi Hidrofobik
- Kromatografi Pseudo-Affinitas
- Kromatografi Cair Tekanan Tinggi (HPLC)

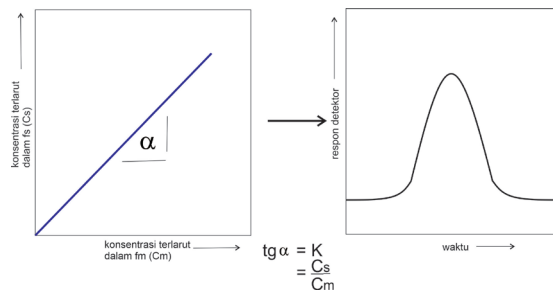
3. Teori Kromatografi

a. Proses Isotermal pada Kolom (Sistem Elusi)

Apabila suatu komponen atau analit dimasukkan ke dalam kolom, kemudian digerakkan oleh fasa mobil di mana di dalam kolom terisi fasa diam, maka dalam kolom akan terdiri atas dua fasa (f_m dan f_s). Selama elusi terjadi, di setiap segmen akan terjadi proses keseimbangan, tetapi segmen tersebut imajiner yang sering disebut Plat.



Pada segment tersebut, kita mempunyai harga koefisien distribusi $K = C_s/C_m$. Jika diketahui bahwa pada suatu suhu tetap, harga K tetap, dan untuk suatu keadaan apabila keseimbangan terjadi antara satu plat ke plat berikutnya, bila pemindahan berlangsung secara ideal, maka akan terjadi kromatografi ideal yang linier.



Gambar 37. Kurva isothermal ideal (linier)

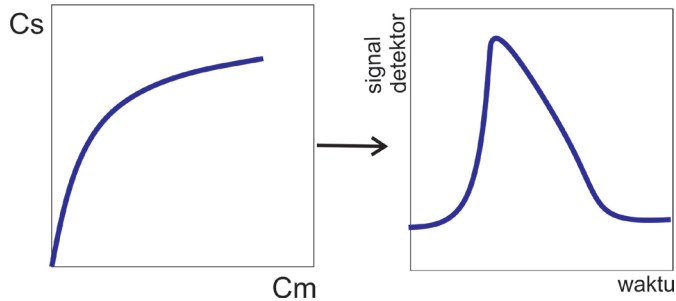
Pada kondisi tersebut di atas berarti harga K tidak bergantung pada C_s dan C_m . Kurva tersebut di atas disebut kurva isotherm dengan slope sama dengan K . Isothermal ideal atau linier ini akan menghasilkan pita elusi yang simetris seperti ditunjukkan Gambar 37 (Kurva Tipe Gauss).

Suatu keadaan ideal sangat sulit tercapai yang paling sering terjadi adalah dua kemungkinan:

1. Bila konsentrasi terlarut terlalu besar maka fraksi terlarut yang lebih besar tetap tertinggal dalam fase gerak/mobil.

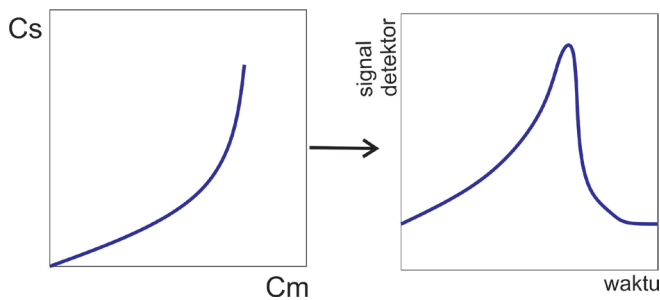
Pada situasi ini, terjadi kurva isothermal yang cembung akibatnya pita elusi tidak simetris. Proses seperti ini diistilahkan dengan peristiwa *tailing* (Gambar 38). Peristiwa yang terjadi disini adalah fasa gerak keluar terus-menerus membawa terlarut/analiti yang mengakibatkan terjadinya pergeseran baseline (garis dasar). Peristiwa seperti ini juga sering terjadi pada AAS (Spektroskopi

Serapan Atom), di mana detektor selalu mendeteksi adanya terlarut/ analit. Kemungkinan lain yang dapat menyebabkan hal ini adalah adanya impuritas (pengotor) atau kontaminan dari fasa mobil.



Gambar 38. Kurva isothermal cembung (*tailing*)

2. Bila konsentrasi terlarut sangat kecil pada fasa mobil dan lebih besar tertinggal pada fasa diam/stasioner sehingga yang terjadi adalah keadaan sebaliknya. Semakin tinggi konsentrasi dalam fase diam/stasioner, dan konsentrasi fase mobil yang mengandung sedikit analit semakin besar, maka akan menghasilkan pita serapan cekung yang disebut *fronting*, seperti diilustrasikan pada Gambar 39.



Gambar 39. Kurva isothermal cekung (*fronting*)

Keadaan linier akan sulit tercapai disebabkan oleh berbagai faktor, di antaranya:

1. Terjadinya proses keseimbangan di setiap plat tidak seperti pada proses Craig.
2. Ketidakseragaman isi kolom dalam hal ukuran, bentuk geometrisnya, cara pengisian. Perbedaan hal-hal tersebut akan menyebabkan perubahan kecepatan terlarut/analit yang bergerak sepanjang kolom.
3. Jika pada kondisi ideal keseimbangan terjadi dengan baik dan tidak ada diffuse, pada kondisi tidak ideal biasanya terjadi diffuse antara terlarut dan fasa air ataupun fasa organik, hal ini akan mengganggu keseimbangan.

Karena faktor-faktor tersebut di atas sehingga kromatografi yang berlangsung biasanya non ideal tetapi cenderung linier.

b. Pengaruh Faktor Kapasitas

Apabila terlarut/analit terus berada dalam keseimbangan antara fasa diam dan fasa gerak, artinya setiap terlarut memiliki fraksi waktu tinggal, yaitu jumlah molekul dalam fasa mobil dibandingkan dengan jumlah molekul total:

$$\frac{\Sigma \text{mol dalam fm}}{\Sigma \text{mol total}}$$

maka dapat dikonotasikan:

$$\frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s}$$

Jika diketahui $K \frac{C_s}{C_m}$ dan persamaan di atas dibagi $C_m V_m$ maka :

$$= \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

Fraaksi waktu tinggal dalam fasa gerak dipengaruhi oleh K dan perbandingan volume pada kedua fasa. Jika kedua hal tersebut merupakan parameter, $K \frac{V_s}{V_m} = k'$ sehingga :

$$k' = \frac{1}{(1 + k')}$$

k' selanjutnya disebut **faktor kapasitas**, yang merupakan perbandingan fasa diam (f_s) terhadap fasa mobil (f_m). Faktor kapasitas dapat didefinisikan sebagai besaran termodinamis yang merupakan perbandingan jumlah molekul yang berada pada fasa diam dan fasa gerak, dengan demikian faktor kapasitas dapat diekspresikan sebagai:

$$k' = \frac{[C_x]_s}{[C_x]_m} \frac{V_s}{V_m}$$

Pengaruh k' terhadap pemisahan secara kromatografi dapat dijelaskan di mana k' akan menentukan laju gerakan rata-rata molekul sampel. Apabila kecepatan linier rata-rata adalah μ , laju gerakan rata-rata molekul sampel adalah:

$$\text{Laju} = \mu \frac{1}{1 + k'}$$

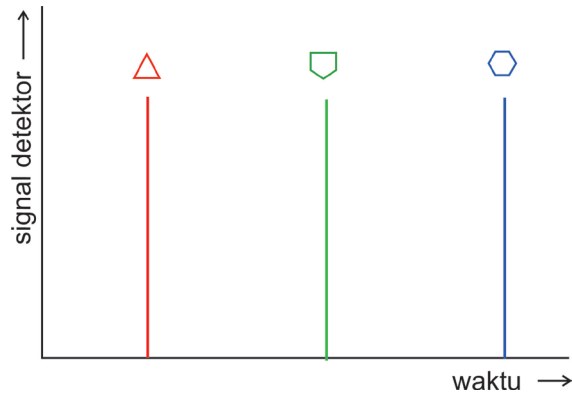
Sehingga dalam kolom kromatografi yang dialiri fasa gerak dengan kecepatan μ , gerakan rata-rata molekul sampel ditentukan oleh 3 faktor yaitu:

1. Kecepatan fasa gerak (μ), di mana akan sama untuk setiap komponen dalam zat terlarut yang akan dipisahkan.
2. Perbandingan volume fasa diam (f_s) dengan volume fasa gerak (f_m), di mana besar V_s/V_m akan sama untuk setiap bagian asalkan fasa diam yang diberikan adalah homogeni.
3. Koefisien distribusi/partisi, di mana harga K berbeda untuk tiap komponen yang berbeda dalam setiap campuran zat terlarut.

Dari tiga parameter tersebut di atas, kemudian akan muncul dua akibat:

1. Pada waktu yang sama, stiap komponen akan menempuh jarak yang berbeda sehingga di dalam kolom akan terjadi pemisahan.
2. Setiap komponen dalam zat terlarut akan muncul atau keluar dari ujung kolom dengan waktu yang berbeda sesuai dengan perbedaan harga K.

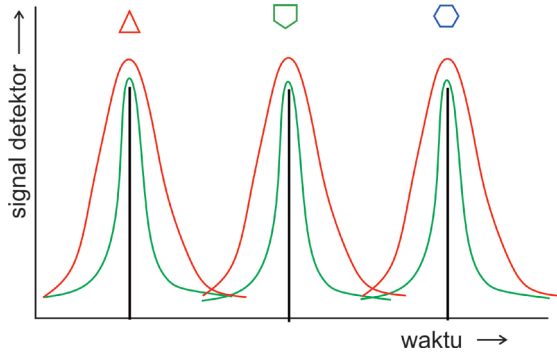
Akibatnya, secara ideal seharusnya akan muncul kromatogram ideal sebagaimana ditunjukkan oleh gambar 40.



Gambar 40. Ilustrasi profil kromatogram ideal

Hasil ideal tersebut dalam implementasinya sangat sulit dicapai dan hanya dapat didekati. Untuk mendekati keadaan ideal tersebut, akan diupayakan untuk memperoleh kurva yang selangsing mungkin dengan cara melakukan optimasi parameter-parameter yang berpengaruh terhadap pemisahan secara kromatografi. Gambar 41 memberikan ilustrasi terkait kemungkinan-kemungkinan tampilan kromatogram yang diupayakan mendekati kondisi ideal. Makin mendekati kondisi ideal maka kromatogram tersebut dianggap lebih baik dan hasil perhitungan kualitatif dan kuantitatif diharapkan akan memiliki ketelitian dan ketepatan yang sangat baik.

Karena pemisahan hanya dipengaruhi oleh harga K, maka faktor-faktor lain yang mempengaruhi keluarnya komponen dalam pemisahan perlu juga diketahui.



Gambar 41. Ilustrasi profil kromatogram yang mendekati ideal. Semakin langsing kurvanya semakin baik

c. Beberapa Besaran Penting

i. Waktu Mati/ Volume Mati

Sebagaimana diketahui bahwa kolom kromatografi akan dilewati oleh terlarut yang mengandung analit yang akan dipisahkan. Sebelum terlarut dimasukkan ke dalam ujung kolom, kolom sudah dialiri dengan fasa gerak sehingga di depan terlarut sudah ada fasa gerak.

$$t_0 = \frac{\text{Panjang Kolom}}{\text{Laju Alir Fasa Gerak}}$$

Waktu mati adalah waktu yang diperlukan oleh fasa gerak untuk meninggalkan kolom. Jadi biasanya sebelum puncak analit muncul diawali dengan munculnya puncak sangat kecil di depannya. Hal tersebutlah yang menandai waktu mati yang dimaksud.

ii. Waktu Retensi

Waktu retensi (t_R , *time of retention*) adalah besaran yang sangat penting dalam kromatografi karena merupakan acuan analisis kualitatif. Bila laju alir (μ) tetap, suhu (K) tetap, V_s/V_m tetap, setiap komponen akan mempunyai waktu tinggal yang tetap. Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan oleh suatu komponen untuk melintasi fasa diam sepanjang kolom.

$$t_{R_A} = \frac{\text{Panjang Kolom}}{\text{Laju Alir Komponen A}}$$

Beberapa faktor yang mempengaruhi harga waktu retensi adalah:

- a. Pasangan fasa diam dan fasa gerak. Bila fasa diam dan fasa gerak diubah, maka akan mengubah harga K sehingga harga t_R juga akan berubah.
- b. Perubahan V_s/V_m , yang tergantung pada
 - 1) Ukuran butir atau luas permukaan (yang harus sama) fasa diam, semakin kecil ukuran, maka volume akan semakin besar. Ukuran butir diberi satuan mesh
 - 2) Keragaman butir fasa diam
 - 3) Cara pengisian kolom (fasa diam)
- c. Laju alir fasa gerak
- d. Suhu kolom yang akan mempengaruhi harga K

Sementara itu, yang tidak berpengaruh terhadap besaran waktu retensi adalah konsentrasi dan volume komponen. Keistimewaan waktu retensi dalam pemisahan adalah:

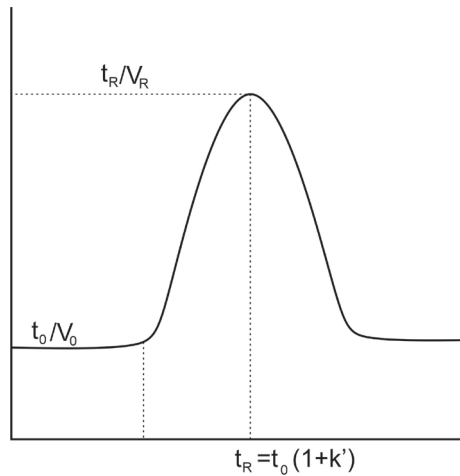
- Setiap komponen akan mempunyai harga t_R yang tetap asalkan mempunyai laju alir dan perbandingan fasa diam dan fasa gerak yang tetap.

- Dapat digunakan untuk analisis kualitatif.
- Dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.

Bila L adalah panjang kolom dan μ adalah laju alir, maka :

$$t_0 = L/\mu$$

$$t_{RA} = \frac{L}{\mu} (1 + k') = t_0 (1 + k')$$



Gambar 42. Besaran-besaran dalam kromatogram

iii. Volume Retensi

Volume retensi sesungguhnya mirip dengan volume retensi, dan bahkan kadang-kadang lebih disenangi oleh banyak peneliti karena mengukur volume lebih mudah daripada mengukur waktu. Bila kecepatan alir fasa gerak adalah F , maka:

$$VR = Ft_R$$

$$V_0 = Ft_0$$

Dalam kondisi ini, V_0 dan t_0 perlu ditekan hingga sekecil mungkin

$$V_R = Ft_R = Ft_0 (1 + k') = V_0 (1 + k')$$

Jika $k' = K \frac{V_s}{V_m}$, dan $V_0 = V_m$, maka :

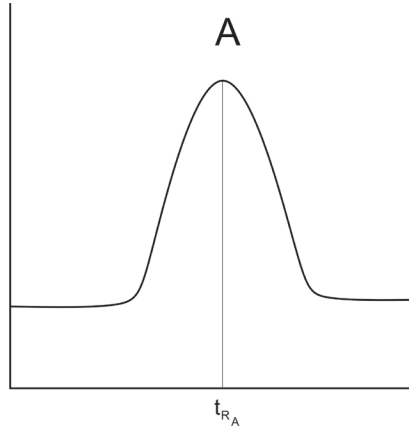
$$V_R = V_0 (1 + k')$$

F adalah laju volumetric, maka :

$$F = \frac{\pi d^2}{4} E_{total} \frac{L}{t_0}$$

$\frac{L}{t_0}$ adalah luas penampang lintang kolom kosong, E_{total} adalah porositas total, dan $\frac{L}{t_0}$ adalah μ , maka :

$$F = \frac{V_{kolom} E_{total}}{t_0}$$



Gambar 43. Contoh kromatogram A

Misalnya dihasilkan bentuk kromatogram seperti pada Gambar 43. Saat komponen A keluar dengan maksimum dari kolom, maka kromatogram akan mencapai puncak yang simetris. Apabila kromatogram mencapai puncak hal itu berarti setengah dari sampel sudah keluar dari kolom dan setengahnya lagi masih tertinggal di dalam kolom. Komponen setengah yang masih tersisa tersebut, masih terdistribusi antara fasa diam dan fasa gerak.

Bila yang tertinggal pada fasa gerak adalah $C_m V_m$ dan pada fasa diam adalah $C_s V_s$, maka banyaknya molekul yang belum keluar dari kolom adalah:

$C_m V_R = \Sigma \text{molekul pada fasa gerak} + \Sigma \text{molekul pada fasa diam}$

$$C_m V_R = V_m C_m + V_s C_s$$

$$V_R = V_m + K V_s$$

$$V_R - V_m = K V_s$$

Persamaan di atas berlaku untuk kromatografi cair-cair dengan dasar pemisahan partisi di mana terlarut terdistribusi di antara dua fasa yang tidak saling bercampur.

Untuk kromatografi dengan dasar adsorpsi, maka berlaku:

$$V_R - V_m = K A_s$$

di mana A_s adalah luas permukaan adsorben.

Jika diketahui faktor kapasitas $k'_A = K_A \frac{V_s}{V_m}$, berarti k' juga merupakan perbandingan partisi, di mana:

$$k'_A = K_A \frac{V_s}{V_m}$$

$$k'_B = K_B \frac{V_s}{V_m}$$

Dari perbandingan ini, tetapan ini menunjukkan hubungan distribusi sampel dalam kolom dengan laju alir μ .

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

Persamaan tersebut menunjukkan perbandingan jumlah mol dalam kedua fasa, maka dengan sendirinya:

$$k_A' = \frac{[C_A]_s - V_s}{[C_A]_m - V_m}$$

dan

$$k_B' = \frac{[C_B]_s - V_s}{[C_B]_m - V_m}$$

Diketahui bahwa A dan B mempunyai waktu retensi yang berbeda, A dan B juga mempunyai waktu elusi sendiri-sendiri, dengan demikian maka k' juga dapat dikatakan sebagai perbandingan waktu elusi bersih komponen sampel dalam kolom terhadap waktu yang dibutuhkan untuk elusi komponen atau pelarut yang tidak tertahan oleh kolom:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

atau

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Apabila kita hubungkan dengan panjang kolom L dan laju alir μ , maka :

$$t_R = \frac{1}{\mu} (1 + k'), \text{ dan } V_R = V_0 + kV_s$$

- Bila $k' > 10$, waktu retensi akan semakin besar. Untuk mengatasinya dapat dilakukan dengan mengubah V_s/V_m
- Bila $k' < 1$, maka waktu retensi akan mendekati t_0 , atau puncak akan keluar lebih cepat

Harga waktu retensi (t_R) sangat ditentukan juga oleh konstruksi kolom dan cara bagaimana kolom tersebut dioperasikan. Bila konstruksi dan operasinya berbeda, t_0 juga akan berbeda, tetapi besaran $t_R - t_0$ tetap sama sehingga ada besaran lain yang dikenal dengan retensi relatif (α), dan bila digunakan standar dengan t_R^* , maka:

$$\alpha = \frac{t_R - t_0}{t_R^* - t_0^*}, \text{ dan } \alpha = \frac{V_R - V_0}{V_R^* - V_0^*}, \text{ serta } \alpha = \frac{K}{K^*}$$

iv. Faktor Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan alat untuk mengenali senyawa-senyawa yang akan dipisahkan di dalam campuran. Selektivitas menyatakan ukuran untuk distribusi relatif komponen di antara fasa diam dan fasa gerak. Faktor selektivitas disebut juga faktor pemisahan, untuk dua senyawa A dan B dinyatakan sebagai berikut:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0}$$

Jika kedua senyawa A dan B memiliki nilai K yang sama berarti faktor selektivitasnya (α) sama dengan 1, kedua senyawa/analit tersebut tidak dapat dipisahkan karena memiliki waktu retensi yang identik.

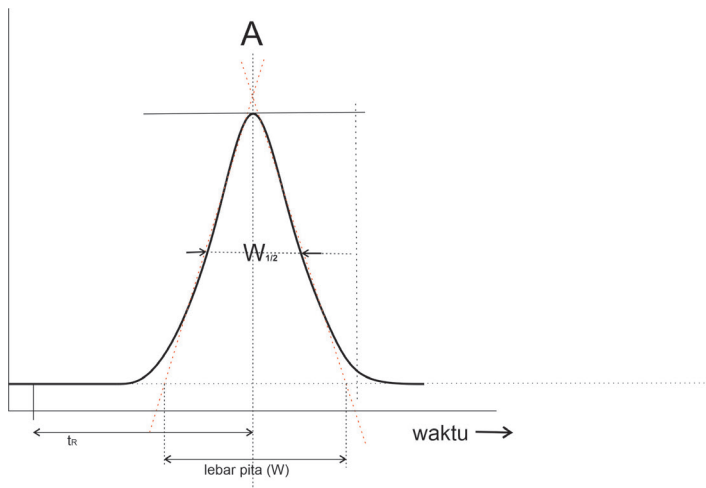
v. Teori Plate dan Teori Kecepatan

Jika kita akan membandingkan perbedaan antara ekstraksi dan kromatografi, maka dapat diberikan beberapa hal sebagai berikut:

- Pada Ekstraksi Craig
 - Kesetimbangan terjadi pada setiap sel atau tabung
 - Kesetimbangan terjadi pada satu tabung yang tidak kontinu

- Pada Kromatografi
 - Keseimbangan terjadi secara kontinu
 - Setiap sel tempat terjadinya keseimbangan disebut plat teoritis

Teori Plate pertama kali dikemukakan oleh Martin dan Synge pada tahun 1941, Konsep teori ini berasal dari teori distilasi, kemudian dikembangkan pada kromatografi. Untuk memahami teori ini, kita harus membayangkan bahwa di dalam kolom kromatografi terdapat plat-plat imajiner tempat terjadinya keseimbangan komponen terlarut antara fase diam dan fase gerak. Kejadian ini cukup identik dengan peristiwa yang terjadi pada satu tabung pada ekstraksi Craig (*counter current extraction*) seperti yang dibahas sebelumnya. Jika sistem kromatografi memiliki jumlah plat teoritis (N) yang besar, dianggap akan mampu memisahkan terlarut atau analit-analit yang memiliki perbedaan koefisien distribusi yang cukup kecil, dengan demikian sistem ini dianggap lebih efisien.



Gambar 44. Dasar perhitungan teori plate (N)

Jumlah plat teoritis ditentukan oleh HETP (*High Equivalent of Theoretical Plate*) dan panjang kolom (L). Jadi HETP adalah panjang dari terjadinya proses kesetimbangan dan bukan panjang kolomnya. Jumlah plat teoritis/imajiner (N) dapat dihitung dari kromatogram (Gambar 44) dengan persamaan berikut:

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{(W_{1/2})^2}$$

$$N = 16 \frac{t_R^2}{W^2}$$

Sementara itu, Teori Kecepatan atau Teori Kinetik pertama kali diperkenalkan oleh van Deemter tahun 1956, yang mempelajari tentang faktor-faktor yang berpengaruh terhadap lebar puncak kromatogram karena lebar puncak ini berpengaruh terhadap perhitungan HETP merujuk pada persamaan di atas di mana harga N dipengaruhi oleh lebar puncak. HETP merupakan ukuran efisiensi suatu kolom, di mana suatu kolom akan lebih efisien jika memiliki nilai N yang besar, HETP yang kecil dan lebar puncak yang kecil.

$$N = \frac{L}{HETP}$$

Sekali lagi, HETP tidak sama dengan panjang kolom. Jika kolom diisi dengan fasa diam akan terjadi kesetimbangan. Jumlah tempat terjadinya kesetimbangan tersebut yang disebut dengan istilah plat imajiner/teoritis (N).

Jika ada dua kolom dengan panjang yang sama tetapi jumlah plat teoritis (N) berbeda, kolom yang memiliki N lebih besar akan lebih efisien. Di lain pihak jika dua kolom memiliki jumlah plat teoritis yang sama tetapi panjang yang berbeda, kolom yang lebih panjang yang akan lebih efisien. Semakin kecil jumlah plat teoritis, maka kurva akan semakin tumpul, akibatnya

waktu pemisahan akan pambat atau jika ada dua analit yang berdekatan, maka akan cenderung untuk *overlapping*. Agar lebih efisien maka HETP harus diperkecil.

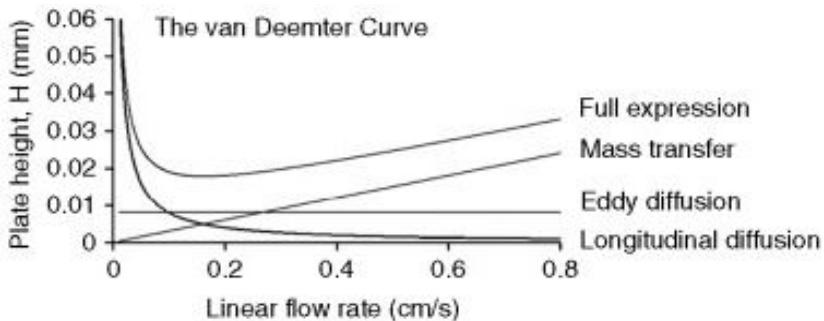
Berdasarkan hal tersebut di atas, maka teori kecepatan (*rate theory*) dipelajari untuk membahas faktor-faktor yang mempengaruhi besarnya HETP selanjutnya disingkat H. Untuk menjelaskan pelebaran pita atau puncak/kurva secara teoritik menggunakan persamaan van Deemter (Edge, 2003; Marriott, 2005) sebagai berikut :

$$R_s = A + \frac{B}{v} + Cv$$

Di mana :

- H adalah HETP
- A adalah Diffusi Eddy
- B adalah Diffusi Longitudinal
- C adalah Resistensi terhadap Transfer Massa
- v adalah laju alir

Bigelow (2009) menggambarkan hubungan besaran-besaran dalam persamaan van Deemter sebagaimana terlihat dalam gambar 45.



Gambar 45. Kurva van Deemter (Bigelow, 2009)

Kurva tersebut menunjukkan tiga komponen individu utama dari persamaan van Deemter tersebut, yaitu Diffusi Eddy (A) merupakan sebuah konstanta yang tidak berubah pada saat laju aliran linier berubah. Kemudian Diffusi Longitudinal (B) dapat menyebabkan lebar pita menjadi semakin kecil yang berarti analit tinggal dalam kolom lebih singkat atau laju alir semakin cepat. Kemudian kontribusi dari resistensi transfer massa analit baik ke dalam maupun ke luar fasa diam akan meningkat secara linier sejalan dengan meningkatnya laju alir fasa gerak. Pemisahan akan paling efisien pada laju alir yang meminimalkan tinggi pelat yaitu sekitar 0,1 cm/detik (Bigelow, 2009).

Meyer (2015) memberikan penjelasan lebih jauh tentang tiga besaran di atas dalam kurva van Deemter. Diffusi Eddy (A) dan distribusi aliran terjadi di dalam fasa diam yang padat. Tidak semua molekul sampel dapat dengan mulus melewati jalur yang sama, di mana jalur ini tidak lurus. Oleh karena itu, waktu tinggalnya di dalam fasa gerak akan berbeda. Selain itu, laju alir antara partikel pada fasa diam tidak seragam tetapi memberikan kurva yang terdistribusi berbentuk parabola. Hal inilah yang memungkinkan beberapa molekul dapat bergerak lebih cepat daripada yang lainnya dan kemudian menempuh jalur yang tidak sama panjangnya di dalam fasa diam (Meyer, 2005).

Diffusi Longitudinal (B) adalah fenomena di mana sampel atau molekul tidak hanya diangkut secara pasif oleh fasa gerak tetapi juga bergerak maju-mundur akibat difusinya sendiri. Gejala ini tidak dapat diatasi sebab bergantung pada koefisien difusi, akan tetapi bukanlah menjadi masalah, akan tetapi mempengaruhi pemisahan secara signifikan.

Sementara itu, Resistensi terhadap transfer massa (C) antara fasa gerak dan fasa diam adalah fenomena di mana molekul terlarut memerlukan pemerapan waktu untuk mencapai fasa diam, kemudian masuk ke dalamnya, bertahan di dalam fasa diam selama beberapa waktu, kemudian meninggalkan

fasa diam dan masuk kembali ke fasa gerak. Sementara itu, molekul yang lain pada periode yang sama tidak terlibat dalam perpindahan massa tersebut dan akan lebih jauh berada di depan sepanjang lapisan kromatografi. Hal ini akan memperluas pita kromatogram. Hal ini dapat dijaga tetap rendah dengan menggunakan fasa gerak viskositas rendah, kemasan kolom menggunakan partikel yang halus, menggunakan kapiler terbuka dengan diameter yang kecil, atau menggunakan lapisan tipis dari fasa diam jika merupakan cairan.

vi. Resolusi

Tujuan utama dari analisis kromatografi adalah agar didapatkan pemisahan yang sempurna antara analit-analit yang akan dipisahkan. Resolusi kolom adalah besaran kromatografi yang menyatakan kemampuan kolom dalam memisahkan komponen-komponen. Jadi daya pemisah antar komponen dalam campuran dapat dilihat dari harga resolusi (R_s). Semakin besar resolusi kromatogram yang dihasilkan maka semakin baik pemisahan analit terjadi di dalam kolom. Resolusi tidak memiliki satuan, pemisahan akan digolongkan baik jika mempunyai harga resolusi lebih dari 1,5

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_B + W_A}$$

di mana:

- t_{RB} adalah waktu retensi zat terlarut B
- t_{RA} adalah waktu retensi zat terlarut A
- W_A adalah lebar alas Kurva Gauss terlarut A
- W_B adalah lebar alas Kurva Gauss terlarut B

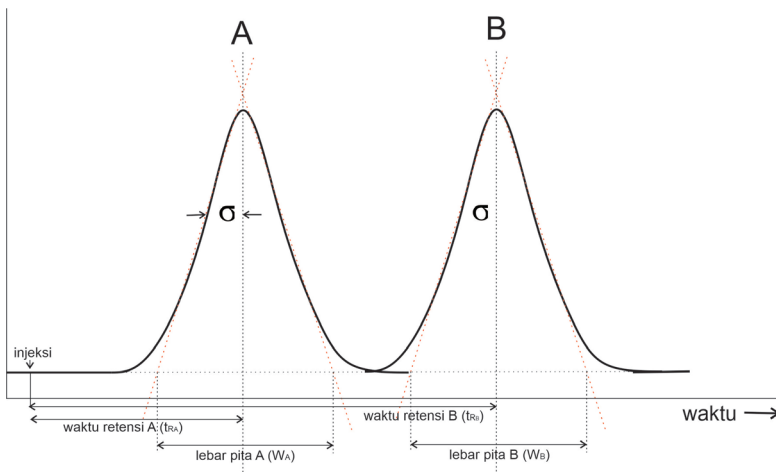
Apabila dua puncak yang bersebelahan cukup dekat seperti ditunjukkan pada gambar 46, dan W keduanya hamper sama, resolusinya dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_B + W_A}$$

Jika letak puncak cukup dekat, yang merupakan masalah yang paling sering ditemukan, kemudian lebar pita W hampir sama untuk kedua puncak, resolusi dapat dinyatakan sebagai :

$$R_s = \frac{t_{R_B} - t_{R_A}}{4\sigma}$$

Jadi jika jarak antara dua puncak adalah 4σ , maka nilai R_s adalah 1 dan pada kondisi ini, 2,5% luas puncak pertama akan *overlapping* dengan 2,5% puncak kedua. Pada saat nilai resolusi sama dengan 1,5 maka dianggap kedua puncak sudah terpisah sempurna.

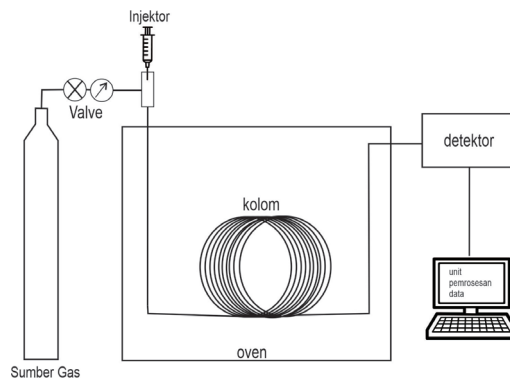


Gambar 46. Ilustrasi besaran pada perhitungan resolusi

d. Kromatografi Gas

Kromatografi Gas (*GC/Gas Chromatography*) pertama kali dikemukakan oleh Martin dan James pada tahun 1952. Saat ini GC adalah teknik pemisahan yang paling banyak digunakan untuk analisis gas dan cairan atau padatan volatil (Yuwono & Indrayanto, 2004).

Pengertian Kromatografi Gas adalah teknik kromatografi yang menggunakan gas sebagai fasa gerak dan padatan atau cairan sebagai fasa diam. GC adalah satu-satunya bentuk kromatografi di mana fase geraknya tidak berinteraksi dengan analit. Jika fasa diamnya adalah adsorben padat, proses ini disebut Kromatografi Gas-Padat (*Gas-Solid Chromatography/GSC*) dan yang terjadi adalah adsorpsi, Kemudian jika fasa diamnya adalah cair (liquid) dengan penyangga inert, maka proses ini disebut Kromatografi Gas-Cair (*Gas-Liquid Chromatography/GLC*), dalam hal ini yang terjadi adalah partisi (Rahman, et al., 2015). Jenis molekul yang dapat di analisis dengan GC cukup terbatas, di mana senyawa harus memiliki tekanan uap yang cukup besar pada suhu 300 °C sampai 400 °C. Bukan hanya itu, senyawa tersebut juga harus mudah diuapkan tanpa terurai atau bereaksi dengan fasa diam, fasa gerak atau komponen lain yang ada di dalam sampel yang akan dianalisis (Forgács & Cserhádi, 2003).



Gambar 47. Skema peralatan kromatografi gas

Secara garis besar, kromatografi gas memiliki perangkat utama yang terdiri atas (1) sistem gas pembawa termasuk pengatur laju alir, (2) injektor, (3) kolom kromatografi gas, (4) detector, dan (5) unit pemrosesan data atau *recorder*. Skema peralatan kromatografi gas dapat dilihat pada gambar 47.

i. Sistem Gas Pembawa

Gas pembawa selaku fasa gerak umumnya merupakan gas permanen dengan kapasitas adsorpsi yang rendah seperti hidrogen, helium atau nitrogen. Sifat fisiko-kimia gas pembawa dapat mempengaruhi karakteristik pemisahan sistem kromatografi gas serta dapat mengubah sensitivitas pendeteksian. Hal yang paling penting pada gas pembawa ini adalah kestabilan serta reproduktibilitas laju alirnya karena akan mempengaruhi efektivitas pemisahan serta kuantifikasi hasil (Forgács & Cserhádi, 2003).

ii. Injektor

Sampel diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas melalui sebuah injektor. Injektor ada dua macam, yang pertama adalah injektor penguapan (*vaporization injectors*) dan yang kedua adalah injektor kolom (*on-column injectors*) (Forgács & Cserhádi, 2003).

Injektor penguapan menggunakan suhu tinggi (sekitar 100–300°C) agar dapat menguapkan sampel cairan dengan cepat. Caranya adalah jarum injeksi digunakan untuk memasukkan sampel ke dalam thermostat di mana sampel dapat menguap dengan cepat yang kemudian bergabung dengan gas pembawa selaku fasa gerak dan selanjutnya diangkut ke dalam kolom.

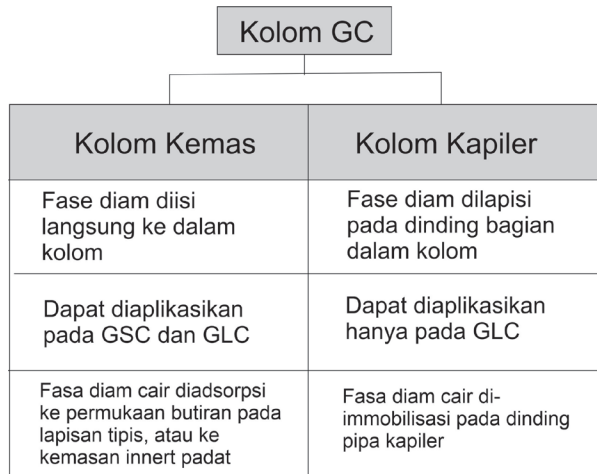
Sementara injektor kolom adalah menyuntikkan sampel langsung ke dalam kolom tanpa penguapan sampel. Selanjutnya sampel dibawa oleh gas pembawa selaku fasa gerak dan pemisahan senyawa volatil dalam sampel akan terjadi di dalam kolom tersebut.

iii. Kolom Kromatografi Gas

Kolom pada kromatografi gas sering disebut “the heart of GC” artinya “jantung”nya GC, hal ini sangat dipahami mengingat peristiwa yang terjadi di dalam kolom adalah hal yang sangat menentukan hasil analisis. Kolom kromatografi gas dibagi menjadi dua jenis yaitu kolom kemas (*packed columns*) dan kolom kapiler (*capillary columns*), meskipun sering disebutkan ada jenis ketiga yaitu kolom preparatif. Perbandingan kedua jenis kolom kemas dan kolom kapiler dapat dilihat pada gambar 48.

Tabel 15 memberikan perbandingan antara kolom kemas dengan kolom kapiler, di mana secara operasional kolom kemas memiliki keunggulan dari banyak hal seperti jumlah sampel yang digunakan, efisiensi, harga, dan resolusi.

Kolom kemas adalah kolom pertama yang dikenal pada kromatografi gas sehingga pada awalnya, hampir semua teori kolom merujuk pada kolom kemas tersebut. Kolom kemas biasanya terbuat dari baja tahan karat dengan diameter luar 0,64 atau 0,32 cm dan panjangnya berkisar 0,61 sampai 3,05 meter. Selain baja, bahan alternatif yang juga dapat digunakan sebagai bahan kolom adalah kaca, nikel, polimer fluorokarbon (teflon) serta baja yang dilapisi kaca atau teflon (Rahman, et al., 2015). Sementara itu, kolom kemas dilengkapi dengan penyangga inert secara kimiawi yang diisi dengan 5 sampai 20% fasa diam cair. Penyangga tersebut memiliki luas permukaan sekitar 0,5 sampai 5 m²/g, memiliki aktivitas serapan rendah terhadap analit secara umum dan memiliki kekuatan mekanik yang baik (Rahman, et al., 2015).



Gambar 48. Jenis kolom yang digunakan pada GC (Rahman, et al., 2015)

Fasa diam cair pada GC umumnya berupa minyak berbasis silikon yang memiliki stabilitas pada suhu tinggi. Fasa diam cair ini tersedia dalam berbagai polaritas, mulai dari metil silikon, metil-fenil silikon, metil-trifluoro-profil silikon, hingga metil-siano-etil silikon (Rahman, et al., 2015). Penggunaan fasa cair dengan kandungan yang lebih tinggi (~10%) akan berguna selain untuk mengurangi interaksi adsorpsi antara zat terlarut dengan padatan, juga akan meningkatkan kapasitas kolom, meskipun memerlukan penggunaan suhu kolom yang lebih tinggi pada saat elusi dilakukan.

Tabel 15. Perbandingan kolom kemas dengan kolom kapiler (<https://pediaa.com/>)

No	Kolom Kemas	Kolom Kapiler
1	Kolom berisi fasa diam yang dikemas penuh dengan material halus	Fasa diam yang dilapiskan pada permukaan bagian dalam kolom
2	Memerlukan sampel dalam jumlah besar	Hanya memerlukan sedikit sampel
3	Tekanan tinggi di dalam kolom	Tekanan lebih rendah did alam kolom

Tabel 15. Perbandingan kolom kemas dengan kolom kapiler (<https://pediaa.com/>)
(lanjutan)

4	Ukurannya pendek	Ukurannya panjang
5	Diameter sekitar beberapa millimeter	Diameter sekitar 1 millimeter
6	Efisiensi rendah	Efisiensi tinggi
7	Resolusi kurang baik	Resolusi tinggi
8	Harga lebih murah	Harga lebih mahal
9	Baik untuk pemisahan sampel non-polar pada tabung kolom stainless steel	Baik untuk pemisahan sampel polar jika tabung kolomnya dari kaca

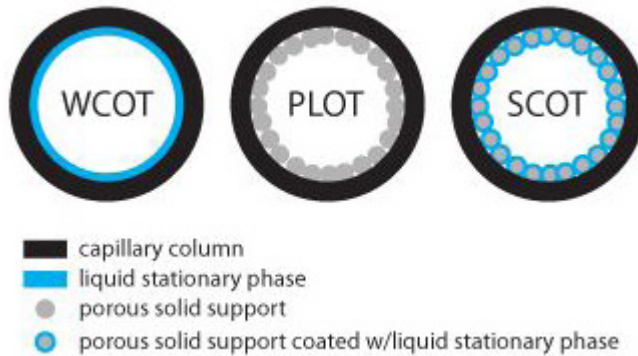
Untuk kolom kapiler, sebenarnya sudah mulai diperkenalkan pada tahun 1959, akan tetapi baru populer digunakan pada tahun 1980-an hingga saat ini. Lebih dari 80% aplikasi GC saat ini menggunakan kolom kapiler karena proses pemisahan yang terjadi lebih cepat dan efisien. Pada kolom kapiler, tidak diisi dengan bahan pembungkus, tetapi lapisan tipis fasa diam cair berada di dinding bagian dalam. Karena tabung atau pipa kolomnya terbuka, maka hambatan terhadap aliran menjadi sangat rendah, hal itu yang menyebabkan kolom ini sering disebut kolom terbuka (*open tubular column*). Kolom terbuka ini terdiri atas 3 kelompok masing-masing dijelaskan secara singkat dalam penjelasan berikut.

a. Porous Layer Open Tubular (PLOT) Column

Kolom PLOT atau Kolom Terbuka Lapisan Berpori, pertama kali diperkenalkan oleh Golay pada akhir tahun 1950-an dan berhasil dikembangkan hingga komersialisasi. Kolom PLOT berisi lapisan berpori dari adsorben padat seperti alumina. Kolom ini sangat cocok untuk analisis cahaya, gas-gas, dan senyawa volatil lainnya.

b. Wall-Coated Open Tubular (WCOT) Column

Pada tahun 1957, Golay memperkenalkan kolom WCOT dengan efisiensi 100 kali lebih baik dari kolom kemas, tetapi memerlukan waktu setengah abad untuk merealisasikannya. Pada kolom WCOT dinding kolom dilapisi secara langsung dengan lapisan fasa diam dengan ketebalan sekitar 0,05 sampai 3 μm .



Gambar 49. Perbedaan fisik kolom PLOT, WCOT dan SCOT (Harvey, 2011)

c. Support-Coated Open Tubular (SCOT) Column

Kolom SCOT diperkenalkan pertama kali pada tahun 1963 oleh Halász dan Horváth (Halász & Horváth, 1963). Kolom ini berisi lebih banyak fasa diam cair yang disanglah oleh lapisan padat yang halus serta memiliki kapasitas sampel yang lebih tinggi dari kolom WCOT. Perbedaan kolom-kolom PLOT, WCOT dan SCOT dapat dilihat pada Gambar 49.

iv. Detektor

Seperti halnya pada kebanyakan instrumen modern, detektor pada GC harus memenuhi beberapa syarat, di antaranya adalah:

- Harus memiliki sensitivitas yang memadai untuk beberapa analisis
- Mempunyai stabilitas dan reproduisibilitas yang baik
- Mempunyai respons linier (linieritas) analit/zat terlarut yang cukup luas
- Dapat diaplikasikan pada rentang temperatur yang luas
- Memiliki waktu respons yang singkat, dan tidak tergantung pada laju alir
- Mempunyai keandalan (*reliability*) yang baik serta mudah digunakan
- Mempunyai kesamaan dalam merespons semua analit/zat yang diperiksa

Detektor dapat diklasifikasikan berdasarkan selektivitasnya. Sebuah detektor universal akan merespons seluruh senyawa dalam fasa gerak, kecuali gas pembawa, sedangkan sebuah detektor spesifik akan merespon hanya kepada senyawa yang berhubungan saja dan khusus pada senyawa kimia tertentu saja (Yuwono & Indrayanto, 2004). Beberapa contoh detektor GC adalah:

a. Flame Ionization Detector (FID)

Merupakan detektor paling umum digunakan pada peralatan GC, keluaran dari kolom dialirkan langsung ke dalam nyala udara-hidrogen. Kebanyakan atom-atom karbon (kecuali C=O) memproduksi senyawa radikal (CHO^{\bullet}) dalam nyala dengan reaksi $\text{CH} + \text{O} \rightarrow \text{CHO}^{\bullet} + e^{-}$. Elektron digunakan untuk menetralkan

CHO⁺, dan ion kemudian dikumpulkan di elektroda agar supaya tercipta arus yang dapat diukur. Arus inilah yang kemudian sebanding dengan molekul yang ada.

FID memiliki cukup banyak kelebihan di antaranya merupakan detektor universal untuk senyawa organik dan tidak merespons untuk senyawa anorganik yang umum, pengotor pada fasa gerak serta gas pembawa tidak terdeteksi, memiliki batas deteksi yang lebih baik 1000 kali dibanding dengan TCD, dan memiliki rentang linearitas yang lebih baik dari TCD. Kelemahannya adalah merupakan detektor destruktif.

b. Thermal Conductivity Detector (TCD)

Detektor ini merupakan detektor terbaru untuk GC. Perangkat ini terdiri atas sumber pemanas listrik di mana suhu pada sumber listrik yang konstan tergantung pada konduktifitas termal gas yang ada di sekitarnya. Biasanya menggunakan detektor kembar (*twin detectors*), satu terletak di depan tempat injeksi sampel, dan yang lainnya diletakkan tepat di luar/ujung kolom. Sebuah rangkaian jembatan *wheatstone* dirangkai sedemikian rupa sehingga konduktifitas termal dari gas pembawa dapat diabaikan. Kelebihan dari TCD adalah lebih simpel, memiliki rentang linearitas yang lebar, dan non-destruktif. Sementara itu, kekurangannya adalah sensitivitasnya yang cukup rendah.

c. Electron Capture Detector (ECD)

Detektor ini adalah detektor dengan dasar peluruhan radioaktif. Cukup selektif untuk senyawa yang mengandung atom-atom elektronegatif seperti halogen, peroksida, quinone, dan gugus nitro. Sampel yang dibawa oleh fasa gerak setelah dari kolom dilewatkan melalui pemancar sinar radioaktif β , biasanya dengan menggunakan

^{63}Ni . Elektron ini kemudian menyebabkan terjadinya ionnisasi gas pembawa (umumnya N_2) dan memproduksi ledakan elektron sesuai reaksi $\text{N}_2 + \beta^- \rightarrow \text{N}_2^+ + e^-$.

Dengan absennya spesies organik, suatu arus konstan kemudian dihasilkan antara elektroda dari proses ionisasi ini. Arus kemudian berkurang secara signifikan dengan adanya kehadiran molekul organik yang mengandung gugus negatif yang cenderung menangkap elektron.

Kelebihan dari jenis detektor ini adalah sangat baik digunakan untuk uji lingkungan, khususnya dalam mendeteksi keberadaan pestisida atau herbisida terklorinasi, senyawa karsinogen aromatic poli-nuklir, serta senyawa-senyawa organologam. Detektor ini juga selektif untuk analisis senyawa-senyawa yang mengandung halogen, nitro dan sulfur. Kekurangannya adalah detektor jenis ini dipengaruhi oleh laju alir.

d. Thermionic Detector/Nitrogen-Phosphorous Detector (NPD)

Prinsip dasar detektor ini mirip dengan FID, akan tetapi terdapat sejumlah kecil logam alkali di dalam nyala api yang dapat meningkatkan proses pembentukan ion dari senyawa-senyawa yang mengandung nitrogen dan posfor. Oleh karena itu dibanding dengan FID, maka NPD lebih sensitive 500 kali lipat dalam mendeteksi senyawa yang mengandung posfor, dan 50 kali lipat lebih sensitif untuk senyawa yang mengandung nitrogen.

e. Electrolytic Conductivity Detector (ECD)

Detektor ini adalah detektor selektif, khusus untuk senyawa-senyawa yang mengandung halogen, sulfur, dan nitrogen. Senyawa yang mengandung halogen, sulfur, dan nitrogen dicampur dalam

reactor kecil yang biasanya terbuat dari Ni. Hasil reaksi dalam reactor tersebut kemudian dilarutkan ke dalam cairan yang menghasilkan larutan konduktif. Perubahan konduktivitas kemudian diukur.

f. Detektor Lainnya

Berbagai detektor lainnya juga sudah semakin berkembang untuk GC, khususnya untuk mendeteksi hal-hal yang spesifik, di antaranya adalah:

- *Photoionization Detector*, yang selektif untuk senyawa hidrokarbon aromatic dan senyawa organo-sulfur atau organo-posfor
- *Atomic Emission Detector*, selektif untuk mendeteksi unsur-unsur
- *Flame Photometric Detector*, selektif untuk senyawa yang mengandung sulfur dan posfor.
- *Mass Spectrometry Detector*, adalah kombinasi detektor GC yang paling canggih, dan sering disingkat dengan GC-MS.

v. Unit Pemrosesan Data

Pemrosesan data dengan GC dibagi dalam tiga garis besar yaitu (Braithwaite & Smith, 1999):

1. Mengoleksi dan mengolah signal dari detektor untuk menghasilkan kromatogram dan data mentah seperti waktu retensi, luas puncak, dan lebar puncak.
2. Menyusun dan menganalisis data untuk menghasilkan informasi kualitatif dan kuantitatif yang selanjutnya membuat laporannya.
3. Optimasi parameter-parameter kromatografi.

Saat ini pengolahan data sudah sedemikian canggih dengan menggunakan komputer yang sudah sangat canggih sesuai perkembangan. Beberapa *software* terkait dengan pencatatan data, penanganan data, evaluasi hingga dokumentasi kromatogram sudah tersedia oleh masing-masing pabrikan peralatan kromatografi yang pada hakekatnya tetap berpatokan pada 3 hal di atas.

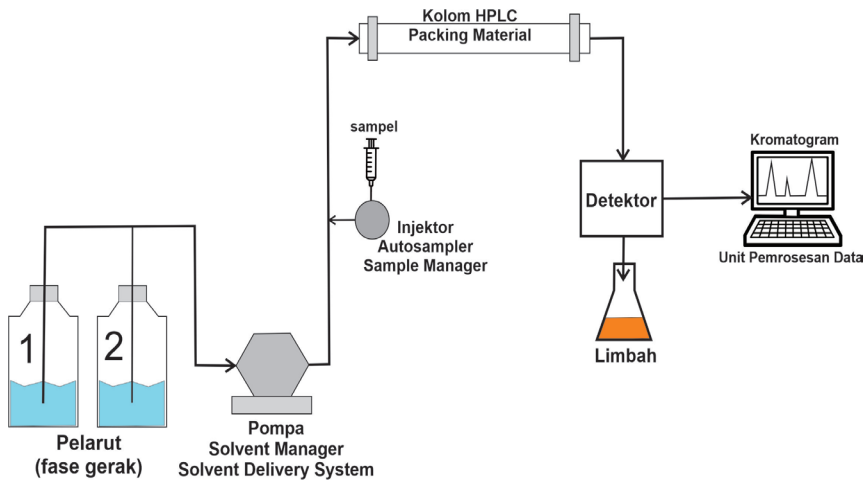
e. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau yang paling dikenal dengan nama HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* atau *High Pressure Liquid Chromatography*) adalah jenis kromatografi elusi yang paling banyak dan paling luas digunakan. Teknik pemisahan ini digunakan oleh para ilmuwan di dunia untuk memisahkan komponen-komponen dalam sampel-sampel cair dan padatan serta material biologi untuk banyak sekali keperluan seperti analisis lingkungan, farmasi dan obat-obatan, analisis forensik, analisis pangan, keperluan toksikologi, dan keperluan-keperluan lainnya.

HPLC adalah tipe kromatografi cair di mana fasa gerak adalah pelarut cair yang mengandung sampel di mana di dalamnya terdapat komponen-komponen yang akan dipisahkan. Sampel tersebut biasanya harus dilarutkan dalam bentuk cair terlebih dahulu meskipun berasal dari sampel padatan atau material biologi. Klasifikasi HPLC biasanya didasarkan pada mekanisme pemisahan atau berdasarkan jenis fasa diamnya sehingga dikenal beberapa jenis HPLC seperti partisi (kromatografi cair-cair), adsorpsi (kromatografi cair-padat), penukar ion (kromatografi ion), kromatografi size-eksklusi, kromatografi afinitas dan kromatografi kiral (Skoog, et al., 2014)

Skema umum peralatan HPLC dapat dilihat pada gambar 50. Pelarut selaku fasa gerak ditampung dalam satu atau lebih wadah, kemudian dengan pompa bertekanan tinggi dialirkan pada laju alir tertentu (biasanya dalam

satuan mililitrer per menit), sebuah injektor digunakan untuk memasukkan sampel ke dalam fasa gerak (bisa secara manual, *auto sampler* atau *sample system*) yang terus mengalir dan membawa sampel tersebut ke dalam kolom HPLC. Kolom tersebut berisi fasa diam yang berupa kemasan kromatografi tempat terjadinya pemisahan komponen. Komponen yang terpisah di dalam kolom kemudian keluar dari kolom dibawa oleh fasa gerak. Komponen-komponen kemudian dideteksi keberadaannya oleh detektor secara terpisah, sedangkan fasa gerak (pelarut) kemudian dibuang sebagai limbah. Suatu unit pemrosesan data berbasis komputer kemudian mengolah informasi sesuai keperluan. Fraksi komponen-komponen yang terpisah sebenarnya dapat dikumpulkan lebih lanjut kemudian dimurnikan. Proses pengumpulan fraksi ini kemudian kita kenal dengan istilah kromatografi preparatif.



Gambar 50. Skema peralatan HPLC

i. Kontainer Pelarut dan Sistem Pengelolaan Pelarut

Peralatan HPLC dilengkapi dengan satu atau lebih kontainer atau wadah tempat pelarut atau eluen diletakkan, volumenya sekitar 500 mL atau lebih. Kontainer ini biasanya terbuat dari plastik atau kaca, dan harus aman dari peristiwa penguapan pelarut. Pelarut yang digunakan pada HPLC harusnya kualitasnya murni dan diharapkan tidak mengandung gas terlarut atau debu pengotor. Oleh karena itu sistem pengelolaan pelarut biasanya dilengkapi dengan '*degasser*' atau pengusir gas terlarut dan juga penghilang debu pengotor. Kehadiran gas pada pelarut dapat mengganggu hasil karena akan menghasilkan laju alir yang tidak reproduksibel dan juga menyebabkan pelebaran pita kromatogram. Kehadiran gas dan debu juga dapat mengganggu performa detektor. *Degasser* terdiri atas sistem pompa vakum, sistem destilasi dan peralatan untuk pemanas dan pengaduk (Skoog, et al., 2014).

Suatu elusi yang menggunakan satu jenis eluen atau pelarut atau campuran pelarut dengan komposisi tetap selama proses kromatografi disebut dengan istilah elusi isokratik. Sementara, jika ada dua atau lebih pelarut atau eluen yang berbeda (baik jenis, konsentrasi atau kelarutannya) kemudian diprogram dengan variasi komposisi selama pemisahan, cara ini kita istilahkan elusi gradien. Komposisi dalam elusi gradient diprogram terlebih dahulu di awal sebelum proses kromatografi dijalankan, baik secara kontinu ataupun bertahap. Elusi gradient ini dapat meningkatkan efisiensi pemisahan, menghemat waktu dan tentu saja akan dapat menghemat biaya. Pemilihan jenis elusi tersebut sangat bermanfaat dalam upaya meminimalkan penggunaan reagen atau pelarut dan juga untuk menghemat waktu analisis.

ii. Sistem Pompa

Pompa HPLC sering juga diistilahkan '*solvent delivery system*' atau sistem yang bertanggungjawab pada pengiriman pelarut/eluen ke dalam kolom. Tujuannya adalah untuk mempertahankan agar aliran fase gerak bisa tetap konstan, meskipun ada tekanan balik yang disebabkan oleh hambatan pada kolom. Untuk melawan tekanan balik tersebut, pompa HPLC harus bertekanan minimal 6000 psi, bahkan untuk Ultra-HPLC tekanannya dapat mencapai 20.000 psi.

Pompa utama HPLC adalah pompa bertekanan tinggi, yang harus memiliki kemampuan untuk mendorong fasa gerak melewati kolom yang sangat rigid. Oleh karena itu, pompa tersebut memiliki beberapa persyaratan teknis, di antaranya sebagai berikut (Hashim, 2018) :

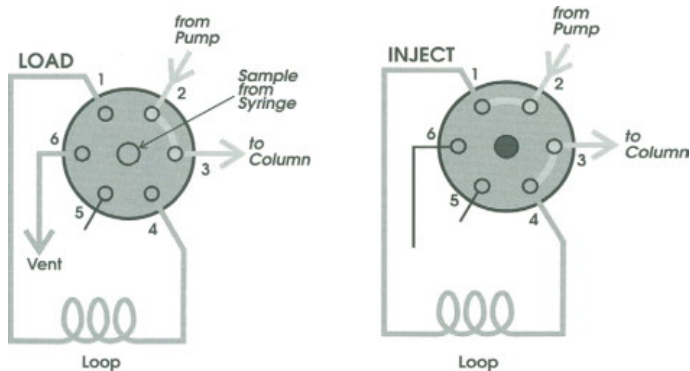
- Terbuat dari bahan yang tahan (termasuk dari korosi) terhadap pelarut yang akan digunakan
- Mampu men-*deliver* pelarut dengan volume dan laju alir yang cukup besar (sekitar 10 mL/menit untuk HPLC analitik dan lebih tinggi untuk HPLC preparatif)
- Memberikan aliran yang tepat dan akurat (variasi < 0,5%)
- Memberikan tekanan tinggi (lebih dari 6000 psi)
- Bebas dari getaran yang dapat mengganggu

Tekanan tinggi yang dimiliki oleh pompa HPLC ini tidaklah dapat menimbulkan ledakan berbahaya karena cairan tidak dapat dimampatkan. Akan tetapi, kemungkinan masalah yang dapat timbul adalah kebocoran yang bisa berakibat kebakaran atau gangguan lingkungan tergantung dari bahan kimia yang digunakan (Skoog, et al., 2014).

iii. Sistem Injeksi Sampel

Injektor adalah peralatan kecil yang digunakan untuk memasukkan sampel ke dalam sistem HPLC. Sistem injeksi sampel didesain khusus yang terletak sebelum kolom HPLC. Ada tiga jenis injektor yang dikenal masing-masing (1) injektor rheodyne atau injektor loop, (2) injektor septum, dan (3) injektor stop flow. Secara umum persyaratan untuk injektor dalam sistem HPLC adalah:

- Volume injeksi yang dihasilkan harus sama untuk semua sampel dalam satu percobaan
- Sampel yang diinjeksikan tidak boleh mengalami gangguan tekanan sistem atau gangguan laju alir pada HPLC
- Sampel yang diinjeksikan harus bebas dari gelembung udara.
- Volume harus akurat karena volume sampel dalam satuan mikro liter (antara 0,1 hingga 100 mikroliter).
- Larutan sampel harus bebas dari partikel apapun.



Gambar 51. Skema injektor rheodyne atau *injector loop* dalam posisi mengisi dan injeksi (Dong, 2005)

Gambar 51 menunjukkan tipe injektor manual dengan katup *6-port* menggunakan rotor, sampel loop dan jarum-port. Larutan sampel dimasukkan ke dalam sampel loop menggunakan syringe pada posisi 'LOAD'. Pada posisi ini, sampel belum terhubung ke kolom oleh fase gerak yang didorong oleh pompa HPLC. Injeksi sampel ke dalam kolom dengan mengatur katup ke posisi 'INJECT', pada saat tersebut, sampel terhubung ke fase gerak dan kemudian dibawa ke kolom dengan dorongan pompa bertekanan tinggi.

Penggunaan injektor otomatis sudah semakin berkembang dalam analisis dengan HPLC. Hal ini diperlukan untuk sampel dalam jumlah besar, khususnya pada analisis sampel secara rutin tanpa intervensi operator, misalnya untuk control kualitas suatu produk, apalagi jika HPLC dihubungkan dengan sistem pengolah data otomatis. Injektor otomatis ini juga sangat bermanfaat pada analisis yang memerlukan waktu panjang tanpa harus dijaga oleh operator.

iv. Kolom HPLC

Kolom dalam kromatografi, termasuk HPLC, adalah komponen terpenting karena pemisahan komponen-komponen analit dilakukan di dalam kolom. Jadi keberhasilan analisis kromatografi sangat ditentukan oleh performa dari kolom tersebut. Sampel dibawa oleh fase gerak masuk ke dalam kolom kemudian analit dipisahkan didalamnya dan masing-masing keluar dari kolom dengan waktu retensi yang berbeda.

Umumnya kolom HPLC diisi dengan silika gel mengingat ukuran partikel dan porositasnya yang membantu pemisahan komponen di dalamnya. Silika gel juga adalah bahan inert yang tidak bereaksi dengan fase gerak serta dapat digunakan untuk analisis senyawa-senyawa kimia yang memiliki sifat-sifat yang berbeda-beda. Bahan yang dimasukkan untuk mengisi kolom HPLC inilah yang kemudian kita kenal dengan fase diam.

Kolom HPLC memiliki panjang yang bervariasi antara 30 mm hingga 250 mm dengan ukuran partikel atau porositas antara 3μ hingga 5μ . Pemilihan kolom berpengaruh terhadap hasil analisis sampel dan harus disesuaikan dengan sifat-sifat komponen yang akan dianalisis serta fase gerak yang digunakan. Kolom juga harus selalu diregenerasi secara periodik setiap seribu kali penggunaan.

Tipe kromatografi kolom yang dikenal ada beberapa berdasarkan komposisi dan metode pemisahan yang terjadi. Tipe tersebut adalah:

- Kolom Fase Normal (*Normal phase column*)
- Kolom Fase Terbalik (*Reverse phase column*)
- Kolom Penukar Ion (*Ion Exchange Column*)
- Kolom Eksklusi-Ukuran (*Size Exclusion Column*)

Kolom Fase Normal memiliki fase diam yang lebih polar daripada fase geraknya. Berarti pengepakan bahan ke dalam kolom harus menggunakan bahan yang lebih polar, dalam hal ini silica adalah material polar. Akan tetapi karena air lebih polar daripada silica maka tidak dapat digunakan sebagai fase gerak. Metilen-klorida, heksana dan kloroform atau campuran senyawa-senyawa tersebut dengan dietil eter biasanya yang digunakan sebagai fase gerak untuk jenis kolom ini (Choudhari, 2020).

Komponen sampel yang lebih polar berinteraksi lebih baik dengan fase diam yang juga lebih polar, sedangkan komponen yang kurang polar, lebih suka berinteraksi dengan fase gerak yang kurang polar juga, yang pada akhirnya komponen-komponen tersebut terpisah. Penggunaan kolom jenis ini pada kromatografi yang kemudian dikenal istilah Kromatografi Fase Normal (*Normal Phase Chromatography*).

Kolom Fase Terbalik adalah kebalikan dari kolom fase normal, di mana fase diamnya tidak atau kurang polar dan fase geraknya lebih polar. Rangkaian hidrokarbon seperti C-8 dan C-18 dan beberapa hidrokarbon non polar lainnya sering digunakan sebagai material fase diam pada jenis

kolom ini, sedangkan senyawa organik encer seperti campuran air-metanol atau air-asetonitril sering digunakan sebagai fase gerak (Choudhari, 2020). Kromatografi yang menggunakan kolom fase terbalik ini kemudian kita istilahkan sebagai Kromatografi Fase Terbalik (*Reverse Phase Chromatography*).

Kolom Penukar Ion digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa yang mudah terionisasi. Fase diam kolom jenis ini adalah asam atau basa yang memiliki muatan positif atau negatif, sedangkan fase geanya adalah larutan polar seperti larutan garam dalam air. Pemisahan komponen analit terjadi berdasarkan kekuatan tarik-menarik ion antara komponen dengan fase diam yang bermuatan. Terjadinya penukaran ion di dalam proses pemisahan ini sehingga kromatografi jenis ini diberi nama Kromatografi Penukar Ion (*Ion Exchange Chromatography*).

Kolom Eksklusi Ukuran adalah kolom yang digunakan berdasarkan pori-pori fase diam. Pori-pori ini yang kemudian memungkinkan komponen terpisah berdasarkan ukuran partikelnya. Kombinasi polimer seperti polisakarida dan silica digunakan sebagai fase diam untuk kolom ini (Choudhari, 2020). Jadi, komponen dengan ukuran lebih kecil melakukan penetrasi ke dalam pori fase diam dibanding komponen dengan ukuran lebih besar. Akibatnya komponen yang lebih besar akan terelusi lebih dahulu. Kromatografi yang menggunakan kolom ini kemudian kita sebut Kromatografi Eksklusi-Ukuran (*Size Exclusion Chromatography*).

v. Detektor HPLC

Detektor ditempatkan pada bagian akhir rangkaian peralatan kromatografi. Fungsi utamanya adalah mendeteksi dan memberikan informasi tentang komponen-komponen yang keluar secara terpisah dari kolom. Detektorlah yang memberikan informasi tentang waktu atau volume retensi, luas atau tinggi kurva, serta informasi lainnya yang penting untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Signal yang dideteksi oleh detektor berbanding lurus dengan konsentrasi komponen yang dideteksi.

Detektor harus memiliki kriteria atau persyaratan tertentu, di antaranya adalah (Snyder, et al., 2010; Sunil, et al., 2018):

- Memiliki sensitivitas yang tinggi dan respons yang dapat di prediksi.
- Harus dapat menampilkan respons terhadap semua komponen atau terlarut dalam campuran sampel atau hal lain yang sudah diprediksi sebelumnya
- Harus dapat memberikan respons yang linier antara signal dan konsentrasi analit
- Variasi temperature dan laju alir tidak boleh mempengaruhi respons detektor
- Bebas dari pengaruh komposisi eluen, khusus untuk elusi gradient
- Harusnya dapat mendeteksi komponen pada konsentrasi rendah
- Puncak yang dihasilkan tidak terlalu melebar
- Harus dapat memproduksi signal yang stabil selama deteksi
- Harus non-destruktif
- Dapat memberikan informasi kualitatif pada puncak yang terdeteksi.

Detektor HPLC terbagi atas dua kelompok yaitu ***Bulk Property Detectors*** dan ***Solute Property Detectors***. Pada ***Bulk Property Detectors***, detektor mengukur perubahan yang terjadi pada zat terlarut (solute) dan pelarut (fase gerak) sekaligus. Detektor ini memiliki kekurangan karena menunjukkan fluktuasi saat pembacaan dan berubah-ubah pada kombinasi fase gerak yang berbeda. Detektor ini juga mempunyai sensitivitas rendah dan rentang pengujuran yang terbatas. Dikenal sebagai detektor non-selektif karena mendeteksi sekaligus analit secara bersamaan. Contoh untuk detektor ini adalah:

- *Electrical Conductivity Detectors,*
- *Refractive Index detectors,*
- *Electrochemical Detectors,* dan
- *Light Scattering Detectors.*

Untuk ***Solute Property Detectors***, sesuai namanya dikenal sebagai detektor selektif karena memberikan respons khusus terhadap sifat fisika dan kimia analit saja dan secara ideal tidak tergantung pada fase gerak. Meskipun secara praktisnya akan ditemukan sedikit pengaruh fase gerak, yang kemudian dapat diatasi dengan menggunakan elusi gradien. Contoh untuk detektor kelompok ini adalah:

- Ultraviolet/Visible Detectors
- Fixed Wave Length Detectors
- Variable Wavelength Detectors
- Diode Array Detectors
- Fluorescence Detectors
- Mass Spectrometric Detectors
- Infrared Detector

vi. Rekorder dan Integrator

Rekorder atau integrator atau unit pemrosesan data pada HPLC diperlukan untuk mencatat respons yang diperoleh oleh detektor. Bagian ini mencatat dan merekam mulai dari baseline hingga semua puncak-puncak kromatogram yang dihasilkan pada waktu retensi masing-masing. Akan tetapi, rekorder tidak mampu menghitung detail puncak secara individu, oleh karena itu integrator digunakan sebagai bentuk pengembangan dari rekorder yang memiliki kemampuan memproses data seperti waktu retensi, tinggi dan lebar, serta luas area puncak kromatogram.

BAB 6

PENGANTAR ANALISIS SPESIASI

1. Pengantar

Ketika kita mendeteksi keberadaan logam berat dengan menggunakan peralatan Spektroskopi Serapan Atom (AAS/*atomic absorption spectrophotometer*) atau dengan Spektrofotometer Massa (MS/*Mass Spectrophotometer*) maka yang akan terdeteksi adalah konsentrasi total logam berat tersebut. Pengetahuan kita tentang konsentrasi total suatu logam berat baik di lingkungan maupun dalam bahan makanan atau obat-obatan, tidak dapat dijadikan dasar berpijak untuk membahas toksikologi dari logam berat tersebut karena kehadiran logam berat tersebut boleh jadi adalah jenis logam berat yang tidak beracun (toksik) atau sebaliknya. Meskipun secara umum unsur arsenik dikategorikan sebagai unsur logam toksik, tetapi tidak semua senyawa arsenik adalah beracun, contohnya adalah arsenobetaine dan arsenocholine yang dianggap kurang toksik (Bhattacharya, et al., 2007) meskipun tidak bisa diabaikan toksisitasnya karena diduga masih menimbulkan efek bagi kesehatan manusia (Leffers, et al., 2013), tetapi tidak se-toksik arsenik anorganik khususnya As^{3+} yang sangat mematikan. Jenis-jenis arsenik tersebutlah kemudian yang disebut spesies dalam kimia analitik.

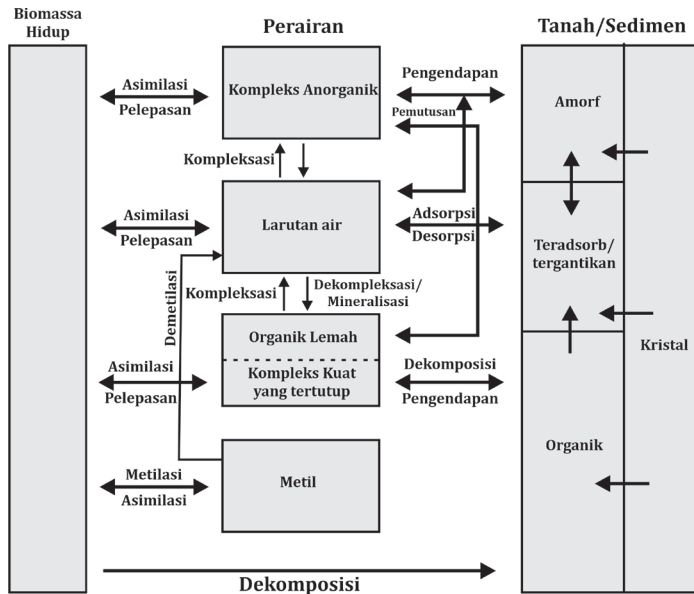
Saat ini kesadaran akan pentingnya bentuk-bentuk kimia suatu unsur untuk dipelajari semakin meningkat, khususnya yang terkait dengan toksikologinya. Dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif, penentuan

bentuk-bentuk individu (spesies) suatu unsur menjadi semakin penting untuk diteliti sehingga berbagai teknik analisis telah dikembangkan untuk mempelajari keberadaan spesies-spesies ini (Kot & Namiesńnik, 2000). IUPAC (*The International Union of Pure and Applied Chemistry*) telah memberikan definisi terkait dengan spesies, spesiasi, dan analisis spesiasi (*chemical species, speciation, speciation analysis*). Spesies kimia suatu unsur didefinisikan sebagai bentuk spesifik dari unsur tersebut yang ditandai dengan komposisi isotop, keadaan elektron atau keadaan oksidasi, dan/atau struktur molekul kompleks (Nordberg, et al., 2004). Jadi spesies kimia suatu unsur dijelaskan sebagai tingkatan suatu unsur berdasarkan komposisi isotop, keadaan teroksidasi, senyawa anorganik, kompleks organik, struktur organo-metalik dan juga senyawa kompleks dengan makro-molekul (Templeton & Fujishiro, 2017). Sementara itu, IUPAC juga telah mengeluarkan pengertian resmi tentang Spesiasi yaitu distribusi spesies kimia suatu unsur dalam suatu sistem, sedangkan analisis spesiasi adalah kegiatan analitik untuk mengidentifikasi dan/atau mengukur jumlah satu atau lebih spesies kimia suatu unsur yang ada di dalam sampel (Nordberg, et al., 2004).

Konsekwensi yang kemudian timbul oleh adanya pengetahuan dan pemahaman tentang spesiasi adalah adanya tuntutan sosial untuk menyesuaikan batas-batas ambang internasional untuk lingkungan dan makanan. Penentuan batas ambang logam berat berdasarkan konsentrasi totalnya, sudah tidak relevan lagi untuk menjelaskan efek toksikologi logam tersebut. Keperluan akan analisis kualitatif dan kuantitatif spesies kimia (analisis spesiasi) ini mengharuskan untuk mengembangkan metode-metode yang cukup sensitif dan selektif, dalam hal ini yang paling diperlukan adalah metode pemisahan seperti kromatografi (Quiroz, 2021) meskipun metode non-kromatografi juga tetap berkembang. Permasalahan yang kemudian muncul adalah masih sangat minimnya bahan kimia referensi untuk spesies ini sehingga akan menyulitkan dalam validasi metode. Hal lain yang akan

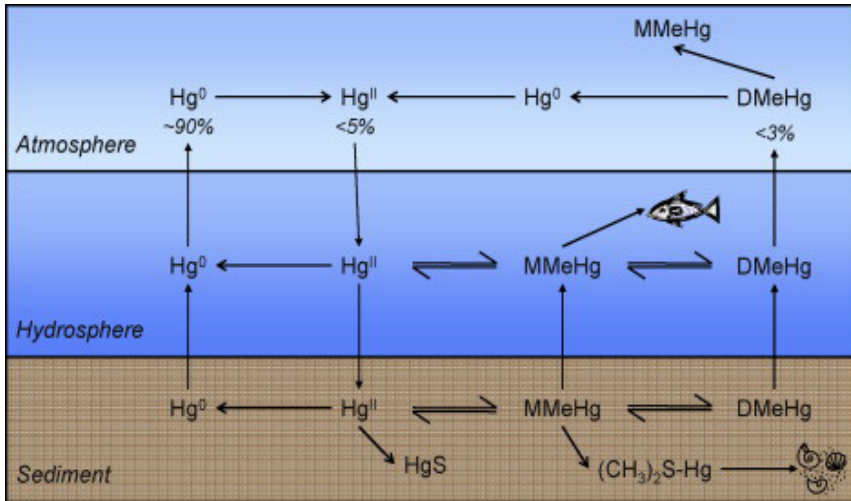
aktivitas industri, dan lain-lain, yang memungkinkan bergesernya siklus biogeokimia dari logam tersebut dan meningkatkan bioavailabilitasnya di alam. Beberapa logam sangat diperlukan oleh organisme (tanaman dan hewan) tetapi pada konsentrasi tertentu yang lebih tinggi justru dapat bersifat racun, contohnya logam Cr, Cu, Ni dan Se. Namun, ada juga logam trace yang toksik meskipun dalam konsentrasi rendah, seperti As, Hg, Cd dan Pb (Driscoll & Otton, 1994). Gambar 52 menunjukkan bagian table periodik unsur yang membedakan antara unsur-unsur toksik, nutrien, dan yang berfungsi nutrient pada konsentrasi rendah dan toksik pada konsentrasi tinggi.

Pada Gambar 53 menunjukkan bahwa geokimia dan keberadaan logam-logam runtu dipengaruhi sangat kuat oleh spesiasi (Driscoll & Otton, 1994). Logam-logam runtu dapat berada dalam bentuk spesies yang bervariasi baik di dalam perairan ataupun dalam tanah serta organisme hidup. Pada lingkungan perairan, logam dapat berasosiasi dengan sangat banyak macam ligan dan kemudian membentuk senyawa kompleks. Ligan-ligan tersebut meliputi air (*aquo complexes*), OH^- (*hydroxo-complexes*), ligan-ligan anorganik lainnya (seperti Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-) dan ligan-ligan organik. Logam-logam runtu juga dapat dimobilisasi atau immobilisasi dari fase padatan, termasuk partikel tersuspensi, tanah, dan sedimen. Interaksi padatan-larutan dari logam runtu terjadi melalui reaksi adsorpsi/desorpsi pada gugus-gugus fungsi organik atau mineralnya atau melalui reaksi pengendapan dan dissolusi secara langsung. Logam-logam pada fase padatan dapat berasosiasi dengan permukaan gugus-gugus fungsi, mineral-mineral hidroksida, karbonat atau sulfida ataupun dengan senyawa organik yang ada. Demikian juga halnya dalam organisme hidup (biota) dapat mempengaruhi siklus logam runtu di alam melalui peristiwa asimilasi atau adsorpsi permukaan dan melepaskannya melalui peristiwa mineralisasi, metilasi atau desorpsi.



Gambar 53. Diagram umum yang menunjukkan perjalanan transfer dan spesiasi logam-logam runtu di lingkungan. Sebagai catatan, secara spesifik tidak semua logam memenuhi diagram ini karena setiap logam mempunyai perjalanan yang berbeda-beda (Digambar kembali dari Driscoll & Otton, 1994)

Pergerakan spesies-spesies logam tentu berbeda-beda tergantung logamnya ataupun organisme yang terlibat di dalamnya serta faktor-faktor alamiah lainnya di dalam lingkungan. Sebagai contoh, Leopold dkk (2010) menggambarkan kemungkinan transformasi spesies-spesies merkuri pada tiga lingkungan yang berbeda di laut yaitu sedimen (padatan), hidrosfir (perairan), dan atmosfer (udara). Khusus merkuri, spesies-spesies dominan yang sangat mungkin terjadi adalah Hg^0 , Hg^{2+} , Monometil Merkuri (MMeHg), dan Dimetil Merkuri (DMeHg) yang bertransformasi satu sama lain tergantung pada kondisi di lingkungan tersebut (Gambar 54).



Gambar 54. Distribusi kemungkinan keberadaan spesies merkuri dalam air, atmosfer dan sedimen (Leopold, et al., 2010)

Untuk mendeteksi keberadaan spesies-spesies suatu unsur, khususnya unsur logam runtu dan logam berat, tentu saja diperlukan teknik-teknik analisis yang di samping dapat mendeteksi spesies pada konsentrasi rendah, juga mampu memisahkan jenis-jenis spesies dalam suatu sampel. Selain itu, teknik preparasi sampel juga sangat penting menjadi perhatian agar hasil analisis baik kualitatif maupun kuantitatif dapat sesuai dengan kondisi sesungguhnya.

2. Preparasi Sampel dalam Analisis Spesiasi

Rangkaian preparasi sampel yang dimaksud di sini adalah mulai dari pengambilan sampel, pengawetan jika diperlukan dan preparasi yang meliputi berbagai metode. Rangkaian ini sangat penting dan menentukan hasil analisis karena jika rangkaian ini salah satunya mengalami kegagalan atau permasalahan, secara keseluruhan akan memberikan hasil yang bias dan bahkan keliru.

a. Sampling

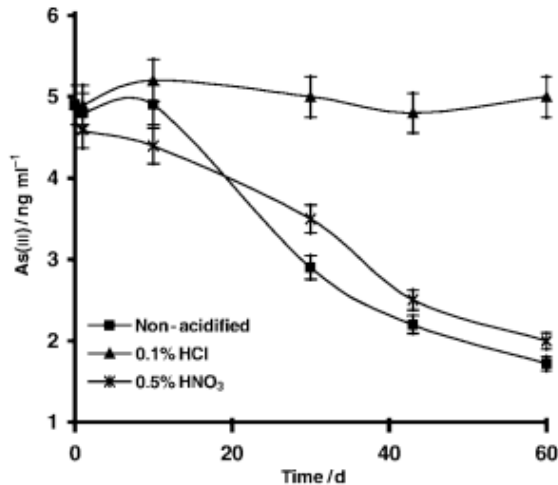
Masalah pertama yang menjadi perhatian adalah bagaimana kita dapat memperoleh sampel yang representatif, di mana kita benar-benar mengharapkan memperoleh sampel utuh yang mewakili populasi. Oleh karena itu, berbagai upaya pencegahan harus dilakukan untuk menghindari kesalahan tersebut. Sebenarnya *sampling* untuk spesiasi dan analisis total kurang lebih sama saja, akan tetap dalam spesiasi, sampel harus benar-benar dijaga agar tidak terjadi transformasi spesies dan juga pada saat transportasinya agar sesingkat mungkin, untuk menghindari kerusakan sampel yang tidak diinginkan (Krasnodębska-Ostręga, et al., 2018).

Faktor kontaminasi adalah hal yang sangat penting untuk dihindari, apalagi jika analit kita memiliki konsentrasi yang sangat kecil. Kontaminasi ini tidak hanya dapat mengubah konsentrasi total analit, tetapi juga mempengaruhi spesiasinya. Penggunaan peralatan yang standar dan bebas kontaminan menjadi sangat penting untuk diperhatikan. Pada saat pencucian atau sterilisasi peralatan gelas, terkadang menggunakan larutan asam (pH 1), akan tetapi jika tidak dibilas hingga bersih, asamnya tersisa di dalam peralatan gelas dan ini akan membuat perubahan pH sampel dan jika ini terjadi maka akan dapat berpengaruh langsung atau tidak langsung terhadap kesetimbangan semua bentuk-bentuk spesies dalam sampel (Krasnodębska-Ostręga, et al., 2018).

Semua wadah, peralatan dan yang akan kontak dengan sampel harus disterilkan terlebih dahulu. Wadah sampel yang digunakan juga harus sesuai di mana bahan wadah sampel seharusnya tidak boleh sama dengan analit yang akan diteliti, misalnya untuk analisis spesiasi logam akan lebih baik untuk wadah yang bahannya dari plastik khusus tetapi ada juga logam yang tidak cocok dengan plastik, seperti merkuri (Fytianos, 2000). Pada intinya wadah yang digunakan tidak boleh memiliki kemungkinan menyerap analit yang akan diteliti. Untuk spesiasi kimia biasanya direkomendasikan Polietilen (PE) atau polipropilen (PP) dan sebaiknya dihindari penggunaan

bahan dari kaca karena memiliki kemampuan adsorbs analit (Krasnodebska-Ostrega, et al., 2018), meskipun beberapa penelitian masih mengizinkan penggunaan bahan dari plastik atau kaca. Selain itu, sampel yang diambil sebaiknya dihindarkan terpapar langsung matahari (radiasi UV-Vis) untuk menghindari adanya degradasi ikatan kimia yang mungkin terjadi dalam sampel, khususnya senyawa organik.

Teknik sampling dan program sampling juga sangat penting ditetapkan sebelum sampling dilakukan. Dalam hal ini sangat tergantung pada jenis sampel yang akan diambil. Sampel tanah, sedimen, air sungai, udara ambien ataupun material biologi mempunyai teknik dan program sampling yang tentu saja berbeda. Kondisi geografis juga perlu mendapatkan perhatian pada saat mengambil sampel di lapangan. Contohnya jika akan meneliti spesiasi logam berat di suatu daerah aliran sungai, yang perlu mendapatkan perhatian adalah titik-titik sampling yang harus mempertimbangkan banyak hal seperti daerah hulu, hilir, pengaruh pelarutan anak sungai, kehadiran industri atau pemukiman di sekitar, dan lain-lain.



Gambar 55. Evolusi spesies arsenik dalam air Danau Daniel Prancis yang ditambahkan larutan standar As(III) 5 ng.ml⁻¹ (Bohari, et al., 2001)

b. Perlakuan Sampel di Lapangan

Perlakuan terhadap sampel di lapangan tidak jarang dilakukan baik pada sampel tanah, sedimen atau perairan. Hal penting yang harus diingat adalah bahwa apapun yang ditambahkan ke dalam sampel baik itu intervensi kimia ataupun fisika, tidak boleh mengganggu kesetimbangan dari analit yang diteliti.

Penambahan bahan-bahan kimia dengan maksud menstabilkan analit tidak jarang dilakukan, misalnya dengan menambahkan asam dan gugus peng-khelat seperti EDTA atau DTPA (Krasnodębska-Ostręga, et al., 2018). Sebuah studi dilakukan untuk mengetahui evolusi spesies arsenik anorganik pada air danau Daniel di Prancis (Bohari, et al., 2001). Air danau sesaat setelah sampling ditambahkan larutan standar As(III) 5 ng/ml kemudian dibagi tiga di mana masing-masing diperlakukan berbeda, satu bagian diasamkan dengan HCl 01%, satu bagian lagi diasamkan dengan HNO₃ 0,5%, dan satu bagian terakhir tidak ditambahkan apa-apa, kemudian diamati perubahannya (konsentrasi As³⁺) selama 60 hari. Gambar 55 memperlihatkan bahwa dalam kurun waktu 7 hari masih belum terlihat adanya transformasi spesies, tetapi setelah hari ke-8 hingga hari ke-60 terjadi oksidasi spesies As³⁺ menjadi As⁵⁺ baik pada sampel yang tidak diasamkan maupun sampel yang diasamkan dengan HNO₃, sedangkan pada sampel yang diasamkan dengan HCL 0,1%, As³⁺ bertahan lebih stabil bahkan hingga 60 hari.

Perubahan spesies dalam air sangat mungkin terjadi yang dapat disebabkan oleh kehadiran partikel tersuspensi (SPM, *suspended particle matter*). SPM merupakan komponen utama air alami dan umumnya tersusun dari partikel koloid anorganik dalam bentuk-bentuk oksida, hidroksida, karbonat dan komponen-komponen organik. Kehadiran SPM ini memungkinkan terjadinya proses-proses ko-presipitasi, adsorpsi dan desorpsi serta penukar ion antara SPM dan fraksi terlarut lainnya di dalam air

yang secara langsung maupun tidak langsung mempengaruhi spesies logam di dalam air (Krasnodębska-Ostęga, et al., 2018). Oleh karena itu, untuk mengatasi permasalahan seperti ini, khususnya menghindari perubahan spesies selama proses sampling, maka sebaiknya perlakuan terhadap sampel harus dilakukan dalam waktu yang relatif pendek (singkat).

c. Penyimpanan

Analisis dan pengolahan sampel secara langsung di lapangan ataupun langsung setelah tiba di laboratorium terkadang sulit dilakukan. Analisis spesiasi biasanya memerlukan metode yang lebih canggih sehingga diperlukan peralatan baik pemisahan maupun deteksi yang lebih kompleks. Oleh karena itu, sering kali diperlukan waktu antara sampling dengan analisis yang menyebabkan sampel harus disimpan terlebih dahulu. Tata cara penyimpanan sampel tentu saja mempunyai prosedur yang sangat tergantung pada jenis sampel dan analit yang akan diperiksa. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk metode penyimpanan ini dan berbagai kondisi telah dilaporkan dalam jurnal-jurnal terkait. Sebagai contoh, penyimpanan sampel material biologi sebaiknya tidak disimpan terlalu lama lebih dari dua minggu (Market, 1995), meskipun dalam beberapa kasus seperti analisis arsenik dalam air dapat stabil hingga tiga bulan (Bohari, et al., 2001) dan bahkan hingga 12 bulan untuk arsenik dalam sampel kering alga (García-Salgado & Quijano, 2014). Penyimpanan terlalu lama dapat menyebabkan munculnya aktivitas mikrobiologi, sedangkan aktivitas pertumbuhan semacam bakteri di dalam sampel harus dihindari karena akan mengubah bentuk-bentuk spesies (transformasi spesies).

Secara umum, untuk analisis spesiasi di dalam air, sebaiknya sampel tidak disimpan terlalu lama lebih dari satu minggu pada suhu 4°C jika memungkinkan di analisis langsung setelah tiba di laboratorium. Untuk sampel padat, maka terlebih dahulu harus dikeringkan dengan tetap

menjaga kestabilan analit (sebaiknya dikering-anginkan saja). Pengeringan disebut juga dehidrasi bertujuan untuk menghilangkan pelarut/cairan dari sampel dan tujuan utamanya adalah untuk membatasi aktivitas mikroba dan menjadi massa tetap konstan. Studi menunjukkan bahwa jika sampel tanah dijaga tetap kering, maka akan meminimalkan kehilangan analit dan mobilitasnya (Rubio & Ure, 1993).

Material biologi agak lebih sulit untuk mengeringkannya sementara material padatan lainnya seperti tanah dan sedimen relatif lebih mudah. Sampel padatan kering tersebut kemudian dapat disimpan dalam kurun waktu yang lebih panjang pada desikator ataupun lemari pendingin pada suhu 4 °C (Bohari, et al., 2002). Dalam beberapa kasus, penyimpanan sampel untuk analisis spesiasi dilakukan dalam suhu yang sangat dingin untuk menjaga konsentrasi analit tetap konstan dalam kurun waktu panjang, misalnya pada suhu -80°C untuk analisis arsenik pada sampel tanaman (Bluemlein, et al., 2008).

d. Preparasi

Tahapan terpenting dari analisis spesiasi adalah preparasi sampel yang terkait dengan teknik-teknik pengelolaan sampel sebelum dideteksi analitnya dengan sistem deteksi yang dipilih. Preparasi ini juga sering diistilahkan “metode sebelum injeksi” dan sangat berpengaruh terhadap hasil analisis, bahkan merupakan sumber utama kesalahan dalam analisis spesiasi (Smith, 2003). Alasan utama kenapa preparasi ini diperlukan dalam analisis spesiasi adalah di antaranya (Michalski, et al., 2013) :

- Untuk mengisolasi analit atau pra-konsentrasi
- Untuk menghilangkan interferensi di dalam sampel
- Untuk mengonversi analit menjadi bentuk yang memungkinkan untuk di deteksi oleh detektor yang ada

- Untuk menyesuaikan konsentrasi analit yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dibanding batas deteksi atau batas kuantifikasi sehingga sampel memerlukan pelarutan atau pemekatan
- Untuk menyesuaikan bila metode penelitian yang diperlukan memerlukan transformasi dari bentuk gas atau padatan menjadi bentuk cair.

Teknik preparasi ini juga sangat ditentukan oleh jenis sampel (padat, cair, gas) dan juga analit yang akan diperiksa. Khusus untuk sampel gas, tidak dibahas secara khusus karena untuk sampel gas setelah dilakukan sampling menggunakan peralatan sampling gas seperti HVAS (*High Volume Air Sampler*), maka dapat langsung dianalisis misalnya dengan menggunakan Kromatografi Gas yang dihubungkan dengan beberapa jenis detektor seperti AAS, ICP-MS ataupun detektor lain seperti *cryogenic trap* pada analisis spesiasi merkuri (Thompson & Schulz, 2002).

Khusus untuk sampel cair, teknik preparasi yang digunakan juga tergantung pada jenis sampel yang akan dianalisis. Untuk sampel cair yang relatif bersih/jernih seperti air mineral, air danau, air sungai dan sejenisnya, cukup dilakukan penyaringan dengan filter membran 0,45 μm (Bohari, et al., 2001), kemudian dapat langsung dilakukan injeksi atau analisis dengan instrumen yang tersedia. Untuk sampel cair dengan matriks yang lebih kompleks, dapat dilakukan perlakuan preparasi yang spesifik seperti penambahan bahan-bahan kimia (organik dan anorganik) yang diperlukan untuk melakukan ekstraksi agar analit dapat terbebas dari matriks atau pengotor yang ada di dalam sampel. Setelah itu kemudian disaring dengan filter membran 0,45 μm sebelum dianalisis lebih lanjut.

Sampel yang memerlukan perlakuan khusus lebih banyak adalah sampel padatan yang jenisnya bervariasi seperti sampel tanah, sedimen, material biologi, limbah padat, batuan dan lain-lain. Ekstraksi adalah teknik yang paling umum dan luas dilakukan untuk analisis unsur-unsur

runut. Fenomena yang terjadi selama proses ekstraksi juga sudah dikenal luas, baik Ekstraksi Liquid-Liquid (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*) maupun Ekstraksi Solid-Liquid (SLE, *Solid-Liquid Extraction*), yang dipergunakan untuk isolasi selektif bentuk-bentuk kimia yang spesifik di dalam sampel (Krasnodębska-Ostregę, et al., 2018). Ekstraksi adalah metode umum yang dilakukan untuk “mengambil” analit atau kelompok spesies tertentu dari dalam sampel baik secara lunak (*soft-extraction*) ataupun kuat (*hard-extraction*) yang juga dapat diperuntukkan untuk pra-konsentrasi ataupun isolasi analit. LLE ada metode ekstraksi pada analisis spesiasi yang tergolong paling tua digunakan, dan dapat digunakan secara langsung untuk sampel-sampel yang tidak dapat disaring dan memiliki matriks yang kompleks (Yu, et al., 2019). Namun, saat ini, LLE sudah jarang diaplikasikan untuk spesiasi unsur-unsur di dalam sampel khususnya sampel cair. Beberapa modifikasi dari LLE ini sudah dilakukan sebagai contoh dengan Ultrasonic *Liquid-Liquid Microextraction* (LLME).

Berdasarkan prinsi-prinsip ekstraksi yang sudah dibahas terdahulu, maka metode ekstraksi saat ini sudah dikembangkan lebih jauh di antaranya seperti *Liquid Phase Microextraction* (LPME), *Solid-Phase Extraction* (SPE), *Solid-Phase Microextraction* (SPME) yang tujuannya adalah untuk menghemat penggunaan bahan kimia.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam analisis spesiasi bervariasi seperti pengadukan, sonikasi ataupun dengan menggunakan peralatan *microwave*, dan bahkan dapat dikombinasi baik metode ekstraksinya maupun parameter-parameter yang terkait. Demikian pula halnya dengan ekstraktan atau pelarut yang digunakan dapat bervariasi dengan tingkat efektivitas yang tergantung pada jenis sampel dan analit yang diperiksa. Penelitian yang telah kami lakukan sebelumnya (Bohari, et al., 2002), membuat optimasi teknik ekstraksi untuk mengetahui efektivitas ekstraksi spesies arsenik pada CRMs Daun Tembakau Virginia (Tabel 16). Metode yang dibandingkan adalah

metode ekstraksi dengan cara pengadukan (*agitation*), sonikasi (*sonication*), gabungan pengadukan dan sonikasi, serta menggunakan gelombang mikro (*microwave*) dengan melakukan variasi jenis dan konsentrasi ekstrak mulai dari air, campuran methanol-air (dengan berbagai komposisi) dan asam posfat. Hasil ekstraksi kemudian dianalisis dengan HPLC-HG-AFS.

Tabel 16. Perbandingan metode ekstraksi untuk analisis spesiasi arsenic dalam CRM Daun Tembakau Virginia (Bohari, et al., 2002)

Extractant	Extraction method	% of certified value			
		As ^{III}	As ^V	Sum of species	
Water	Shaking	14 h	1.2	16.8	18.0
	Sonication	30 min	1.0	12.3	13.3
		60 min	1.3	15.6	16.9
	Shaking + sonication	4 h + 1 h	2.5	23.8	26.3
	Microwave	50 W, 6 min	6.8	27.3	34.1
Methanol-water		40 W, 20 min	8.1	26.9	35.0
	Shaking	14 h (10% MeOH)	1.4	14.2	15.6
		14 h (50% MeOH)	0.7	8.4	9.1
		14 h (90% MeOH)	0.6	3.2	3.8
	Sonication	30 min (10% MeOH)	1.1	9.7	10.8
0.3 M H ₃ PO ₄	Shaking + sonication	4 h + 1 h (10% MeOH)	2.2	12.7	14.9
	Microwave	50 W; 6 min (10% MeOH)	6.0	25.0	31.0
	Sonication	30 min	2.4	36.0	38.4
HNO ₃ /H ₂ O ₂		60 min	2.5	37.1	39.6
	Total arsenic in extracts (after mineralisation)				
	Water extract	HG-AFS detection	35 ± 1		
		ICP-MS detection	40 ± 2		
	Phosphoric acid extract	HG-AFS detection	101 ± 5		
	ICP-MS detection	110 ± 5			

Hasil yang diperoleh adalah bahwa untuk ekstraksi spesies arsenik pada CRM Daun Tembakau Virginia, metode ekstraksi yang paling baik adalah dengan menggunakan microwave dan ekstrak asam posfat 0,3 M, meskipun hanya menemukan keberadaan As (III) dan As(V) di dalam sampel tanpa kehadiran arsenik organik.

Apabila akan dianalisis spesiasi logam secara simultan untuk lebih dari satu jenis logam dalam satu sampel, maka efektivitas ekstraksi akan berbeda untuk jenis logam yang berbeda juga. Sebagai contoh, ekstraksi spesies arsenik (As) dan spesies antimony (Sb) sekaligus dalam satu sampel memberikan hasil yang berbeda untuk kedua logam, di mana pada ekstraksi pada matriks tanaman menggunakan ekstrak 0,2 mol/L asam asetat, diketahui bahwa logam antimony lebih sulit diekstraksi dibanding logam

arsenik, dan memberikan hasil di bawah 10%. Sementara untuk arsenik memberikan hasil lebih baik (di atas 10%). bahkan dengan menggunakan ekstraktan campuran metanol-air (9:1) dapat mengekstrak lebih dari 90 % arsenik (Krachler, et al., 2002).

Optimasi terhadap metode ekstraksi sangat penting untuk mencari kondisi terbaik di mana spesies dapat diperoleh sebanyak-banyaknya tanpa mengganggu stabilitas spesies. Penentuan konsentrasi total dengan cara mineralisasi tetap diperlukan untuk validasi jumlah spesies-spesies yang diperoleh, di mana total spesies harusnya sama dengan konsentrasi total hasil analisis dengan AAS atau ICP-MS secara langsung. Hal yang terpenting yang harus dijaga yaitu jangan sampai proses ekstraksi yang dilakukan mengakibatkan terjadinya transformasi spesies dan kontaminasi (Vergara Gallardo, et al., 2001).

Hasil ekstraksi atau sampel yang sudah diekstrak spesies analitnya sebaiknya langsung dianalisis tanpa harus menunggu lebih lama karena dengan menyimpan meskipun dalam lemari pendingin, akan berisiko terjadinya transformasi spesies di dalam sampel (Montperrus, et al., 2002).

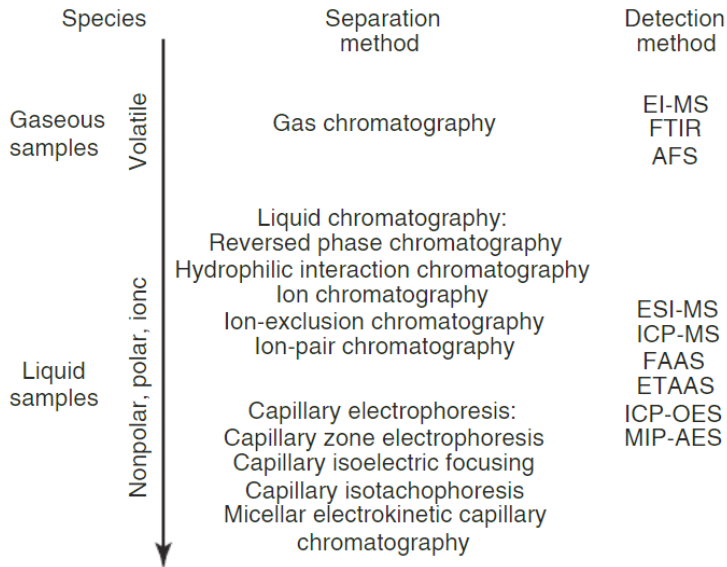
3. Teknik-teknik Analisis Spesiasi

Pada analisis spesiasi, sampel yang sudah di ekstraksi kemudian dianalisis lebih lanjut, melalui sekurang-kurangnya dua tahapan penting yaitu tahap pertama adalah pemisahan spesies-spesies analit dengan menggunakan peralatan yang memungkinkan untuk memisahkan (biasanya menggunakan kromatografi) dan tahap kedua adalah deteksi masing-masing spesies secara individu setelah dipisahkan dengan menggunakan peralatan detektor yang memungkinkan. Dalam beberapa kasus, antara pemisahan dan deteksi ditambahkan teknik pemekatan atau teknik yang diperuntukkan agar spesies tersebut dapat dideteksi oleh detektor yang digunakan, misalnya dengan penggunaan pembangkit hidrida.

Mengingat kedua proses tersebut adalah proses yang sangat penting maka rangkaian peralatan analisis spesiasi biasanya menggabungkan setidaknya dua instrumen (pemisahan dan deteksi). Berikut kami uraikan secara singkat beberapa teknik analisis spesiasi yang biasanya dilakukan oleh para peneliti.

Metode deteksi yang paling sering digunakan dalam analisis spesiasi adalah MS (*mass spectrometry*), ICP-MS (*inductively coupled plasma-mass spectrometry*), FAAS (*flame atomic absorption spectrometry*), ET-AAS (*electrothermal atomic absorption spectrometry*), AFS (*atomic fluorescence spectrometry*), ICP-OES (*inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy*), MIP AES (*microwave-induced plasma atomic emission spectroscopy*), FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*), dan NMR (*nuclear magnetic resonance*) (Michalski, et al., 2013).

Gambar 56 memberikan gambaran metode pemisahan dan deteksi yang paling populer digunakan dalam bentuk tandem (*hyphenated methods*) dalam riset-riset tentang analisis spesiasi.



Gambar 56. Skema metode pemisahan dan deteksi yang paling sering digunakan dalam analisis spesiasi (Michalski, et al., 2013)

Pada awalnya perkembangan analisis spesiasi tahun 1980 an dan 1990 an didominasi oleh analisis spesiasi dari logam-logam arsenik, selenium, kromium, timbal, merkuri, dan besi di dalam sampel air. Namun sekarang penelitian dan aplikasi tentang spesiasi sudah semakin luas hingga pada berbagai macam bentuk-bentuk sepsis anorganik dan organik dari logam dan metaloid. Performa analitik dari metode analisis spesiasi juga saat sudah semakin membaik dengan batas deteksi dan batas kuantifikasi yang sudah sangat renda hingga mencapai batas deteksi absolut sampai pada orde femto-gram (fg). Beberapa contoh logam-logam yang umum diteliti dan metode analisis digambarkan pada tabel 17.

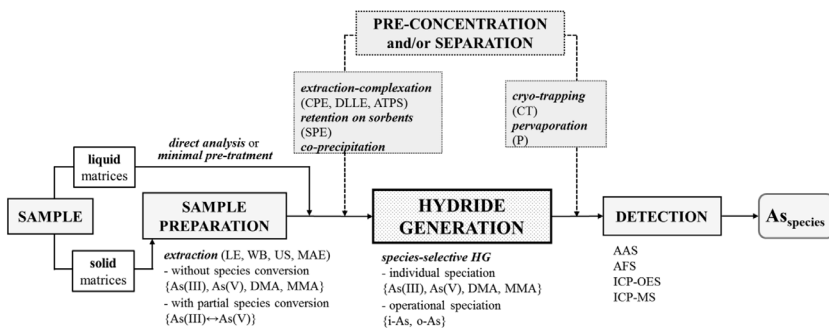
Tabel 17. Beberapa contoh spesies logam dan metaloid yang dianalisis menggunakan metoda tandem (*hyphenated methods*) (Michalski, et al., 2013)

Element	Inorganic species	Organic species
Arsenium	As(III), As(V)	Arsenobetaine, monomethylarsinic acid (III), monomethylarsinic acid (amid), dimethylarsonic acid (III), dimethylarsonic acid (V), arsenosugars, arsenocholine, arsenolipids
Selenium	Se(IV), Se(VI)	Selenocystine, selenomethionine, selenocystine, methylselenocysteine, and diphenylselenide
Chromium	Cr(III), Cr(VI), hydroxy complexes	—
Tin	Sn(II), Sn(IV)	Mono-, di-, and tributyltin; mono-, di-, and triphenyltin; methylated tin; tetraphenyltin; tetracyclohexyltin; tripropyltin; trimethylphenyltin; monophenyltin; monoethyltin; monoethyltin; and methylbutyltin
Mercury	Hg(I), Hg(II)	Methyl- and dimethylmercury, ethyl- and diethylmercury, higher alkyl mercury compounds, mixed alkyl mercury compounds, phenylmercury, and heptylmercury
Antimony	Sb(III), Sb(V), inorganic complexes	Trimethylantimony dichloride, trimethylantimony dihydroxide
Aluminum	Al(III), fluoride and sulfate complexes	Humic and fulvic aluminum complexes
Thallium	Tl(I), Tl(III)	—
Lead	Pb(II), Pb(IV)	Tetraethyllead, tetramethyllead, tripropyllead, and triphenyllead
Others	Fe(II), Fe(III); Mn(II), Mn(III), Mn(V), Mn(VII); V(IV), V(V); Mo(V), Mo(VI); Au(I), Au(III); Pt(II), Pt(IV); Se(I), Se(II), Se(III), Se(IV), and Se(V); Ga(III), Ga(IV), and Ga(V); and Np(IV), Np(V), and Np(VI)	—
Halides	ClO_2^- , ClO_3^- , ClO_4^- , Br^- , BrO_3^- , I^- , IO_3^- , and IO_4^-	Haloacetic acids, organic derivatives

a. Analisis Spesiasi Non-Kromatografi (Pembangkit Hidrida)

Sangat banyak teknik analisis yang telah dikembangkan untuk analisis spesiasi dan dengan pertimbangan sisi ekonomis, terkadang digunakan teknik langsung non-kromatografi yaitu biasanya dengan menggunakan metode *Flow Injection-Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrophotometer* (FI-HG-AAS), atau dengan detektor lain seperti AFS dan ICP-MS. Sebagai contoh pada pemisahan arsenik anorganik antara As(III) dan As(V), yang dapat dipisahkan secara selektif dengan kondisi yang berbeda di mana saat deteksi As(III) menggunakan kondisi HCl konsentrasi rendah sementara untuk penetapan arsenik anorganik lainnya menggunakan suasana campuran KI dan asam askorbat (Chooto, et al., 2015).

Jadi untuk sampel yang hanya mengandung Arsenik anorganik seperti As(III) dan As(V), pemisahan secara kromatografi sebenarnya tidak terlalu penting. Injeksi langsung dengan penggunaan teknik pembangkit hidrida (*hydride generation*) yang dirangkaikan dengan AAS sudah dapat memisahkan kedua spesies tersebut. Untuk hal ini, Analisis dilakukan dengan dua tahap yaitu tahap pertama penentuan kandungan As(III) kemudian tahap kedua penentuan kandungan total arsenik anorganik (As(III) + As(IV)). Selisih kedua hasil tersebut merupakan kandungan As(V). Pada tahap pertama di dalam pembangkit hidrida diberikan reagen seperti natrium borohidrat (NaBH_4) agar supaya arsenit (As(III)) dapat langsung membentuk senyawa gas arsin dengan control kondisi pH tertentu. Sementara arsenik anorganik total kemudian direduksi terlebih dahulu dengan gugus pereduksi di mana semua As(V) akan direduksi menjadi As(III) lalu kemudian dibuat senyawa hidrida (arsin) yang selanjutnya di deteksi dengan AAS (Chooto, et al., 2015). Untuk pemisahan campuran empat spesies arsenik anorganik dan organik (As(III), As(V), MMA, DMA) sebenarnya juga dapat dilakukan dan telah tersedia secara komersial peralatan FI-HG yang kemudian dapat dikoneksikan dengan AAS yang juga dilakukan secara terpisah dalam beberapa tahapan (Rude dan Puchelt, 1995).

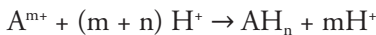
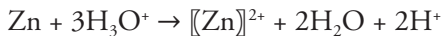


Gambar 57. Metodologi analisis untuk spesiasi non-kromatografi senyawa arsenik dengan teknik pembangkit hidrida (Welna dkk, 2020)

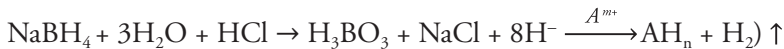
Gambar 57 memberikan ilustrasi terkait rangkuman revidi metodologi analisis untuk spesiasi arsenik non-kromatografi yang menggunakan pembangkit hidrida dan juga kemungkinan metode lainnya seperti *Cryo-trapping* (CT) dan *perpavoration* (P), sebelum deteksi dengan AAS, AFS, ICP-OES atau ICP-MS (Welna, et al., 2020). Gambaran ini menjelaskan bahwa untuk spesies arsenik (dan juga spesies logam lainnya), adalah memungkinkan untuk melakukan spesiasi tanpa peralatan pemisahan khusus seperti kromatografi, sekalipun pada akhirnya diperoleh batas deteksi yang relatif tinggi (besar).

Teknik analisis non-kromatografi seperti FI-HG-AAS tidak hanya berlaku untuk spesies arsenik, tetapi dengan cara yang serupa dapat juga diterapkan untuk spesiasi logam-logam lainnya seperti antimony (Sb) dan Selenium (Se) dengan batas deteksi yang baik (Koronevska, 2006).

Gugus-gugus pereduksi dan sumber-sumber oksigen baru pada teknik pembangkit hidrida sangat bervariasi jenisnya seperti Zn/HCl, SnCl₂/HCl-KI, Mg/HCl-TiCl₃ dan THB (*sodium-tetrahydroborate*). Reaksi kemudian berlangsung membentuk hidrida dengan logam dan asam pereduksi yang dapat dituliskan sebagai berikut (Kumar & Riyazuddin, 2005) :



THB atau natrium tetraborohidrat adalah gugus pereduksi yang serbaguna dan sangat banyak digunakan dalam analisis spesiasi. Dengan reaksi sebagai berikut:



Hydrogen baru yang dihasilkan pada hidrolisis asam dari THB ini juga dapat dimanfaatkan sebagai gas pendorong ataupun pembakar jika menggunakan detektor seperti AFS (Bohari, et al., 2001) meskipun masih harus dibantu baik oleh gas pembakar eksternal maupun pengeringan dengan menggunakan membrane higroskopik.

Penggunaan pembangkit hidrida ini kemudian diketahui akan mampu meningkatkan performa analitik hasil pemeriksaan khususnya dapat memperbaiki batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ)

b. HPLC-AAS/AFS/AES

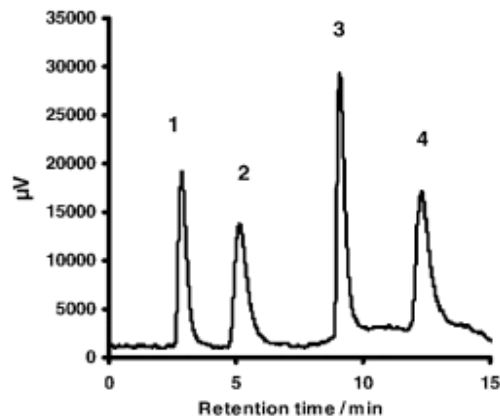
Detail proses pemisahan spesies logam dan organologam yang terjadi di dalam kolom HPLC, berdasarkan teori yang telah dikemukakan sebelumnya, yang keremudian tidak lagi dibahas di sini. Dari sisi instrumentasi, detektor yang digunakan dalam analisis spesiasi, sering kali dikombinasikan dengan detektor eksternal seperti AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*), AFS (*Atomic Fluorescence Spectrophotometer*) atau AES (*Atomic Emission Spectrophotometer*) dan juga dengan ICP/MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrophotometer*). Dengan demikian koneksi ke detektor internal dilepaskan kemudian ujung kolom dihubungkan baik secara langsung ke instrumen (detektor) AAS/AFS/AES maupun menggunakan intermediate seperti pembangkit hidrida (HG). Penggunaan AFS lebih sering dilakukan dibanding AAS atau AES untuk spesiasi logam (Yu, et al., 2019). Untuk pengaturan laju alir dari keluaran kolom ke detektor eksternal, biasanya menggunakan pompa peristaltic (Bohari, et al., 2001).

Tabel 18. Performa analitik spesiasi arsenik dengan HPLC-HG-AAS (Bohari, et al., 2001)

	As(III)	DMAA	MMAA	As(V)
Linearity range/ng As	0.005-20	0.007-40	0.005-20	0.006-40
Reproducibility (%) ^a	5	5	4	4
Slope of calibration curve/ $\mu\text{V ng ml}^{-1\text{b}}$	90000	80000	100000	76000
Correlation coefficient (R^2) ^c	0.998	0.999	0.998	0.999
Relative detection limit/ng As $\text{ml}^{-1\text{e}}$	0.05	0.07	0.05	0.06
Relative quantification limit/ng As $\text{ml}^{-1\text{d}}$	0.17	0.22	0.15	0.21

^aRelative standard deviation of 10 analysis. ^bCalculated from the calibration curve in the linearity range. ^cCalculated as $3 \times$ standard deviation of 20 blanks/slope of calibration curve. ^dCalculated as $10 \times$ standard deviation of 20 blanks/slope of calibration curve.

Performa analitik dengan metode ini ternyata menjanjikan untuk analisis rutin karena relatif lebih mudah dan murah operasionalnya, sedangkan memberikan akurasi, presisi dan batas deteksi yang sangat baik. (Bohari, et al., 2001) telah mengembangkan metode analisis arsenik dengan menggunakan penggabungan HPLC-HG-AFS dan memberikan performa analitik yang sangat baik sebagaimana dicantumkan pada Tabel 18. Artinya bahwa dengan analisis menggunakan HPLC-HG-AFS sangat cocok untuk digunakan dalam pemantauan lingkungan secara rutin, atau uji kualitas produk makanan, dan lain-lain yang dapat menekan biaya analisis (Bohari, et al., 2007).

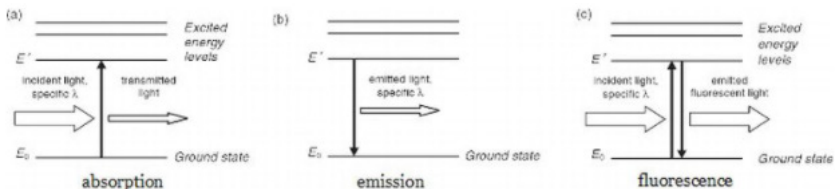


Gambar 58. Kromatogram empat spesies Arsenik masing-masing 5 ng/ml : (1) As(III), (2) MMA, (3) DMA dan (4) As(V) (Bohari, et al., 2001)

Metode HPLC-HG-AFS mampu menampilkan dengan sangat jelas kromatogram spesies arsenik dengan konsentrasi yang cukup kecil sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 58 yang menunjukkan dengan jelas kromatogram empat spesies arsenik dengan konsentrasi masing-masing 5 ng/ml atau 5 part per billion (ppb).

Penelitian terkait spesies-spesies arsenik, merkuri, selenium dan antimony yang dilakukan dengan metode HPLC-AAS telah di reviu dengan baik (Yu, et al., 2019) dan hasilnya yang sangat baik. Sementara itu, penelitian spesiasi menggunakan AES sering kali digabungkan selain dengan pembangkit hidrida (HG) juga dengan plasma (ICP), khususnya dalam analisis spesiasi arsenik (Jitmanee, et al., 2005)

Perbedaan mendasar antara AAS, AFS dan AES dapat diilustrasikan pada Gambar 59. Diketahui bahwa setiap unsur memiliki karakteristik tersendiri di mana atom terdiri atas inti kecil bermuatan positif yang dikelilingi oleh sejumlah elektron yang diperlukan untuk menjaga netralitas. Elektron dapat melompat dari satu tingkat energi ke tingkat yang lebih tinggi dengan memperoleh energi yang diperlukan. Pada saat terjadi transisi, maka akan terjadi perbedaan energi (ΔE). Sebuah atom netral mempunyai kulit berenergi rendah atau keadaan dasar (E_0), sedangkan elektron dapat tereksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi (E'). Setiap unsur memiliki tingkat energi yang unik dan ΔE yang terkait dengan transisi pada tingkat energi tersebut.



Gambar 59. Diagram tingkat energi yang menunjukkan transisi yang berhubungan dengan (a) AAS, (b) AES dan (c) AFS. Tanda panah menunjukkan absorpsi atau emisi cahaya (Sahin, 2019)

Ketika cahaya dengan panjang gelombang tertentu memasuki sistem analitik, elektron kulit terluar dari atom yang sesuai akan tereksitasi saat energi diserap (absorpsi). Akibatnya jumlah cahaya yang ditransmisikan dari sistem ke detektor akan berkurang, hal ini dipahami sebagai AAS (Gambar 59a). Dalam keadaan yang tepat, elektron kulit terluar dari atom yang menguap dapat tereksitasi dengan pemanasan. Ketika elektron-elektron ini kembali ke keadaan dasar yang lebih stabil, energi akan hilang. Seperti yang ditunjukkan Gambar 59b, sebagian energi ini dipancarkan sebagai cahaya, yang dapat diukur dengan detektor, yaitu AES. Beberapa energi radiasi yang diserap oleh atom keadaan dasar dapat dipancarkan sebagai cahaya pada saat atom kembali ke keadaan dasar yang dikenal dengan AFS (Gambar 59c) (Sahin, 2019).

c. HPLC-ICP-MS

Spesiasi logam dan metaloid dengan HPLC-ICP MS termasuk metode yang paling populer dilakukan oleh para peneliti karena merupakan metode yang dianggap paling sensitif dengan akurasi, presisi dan batas deteksi yang sangat baik.

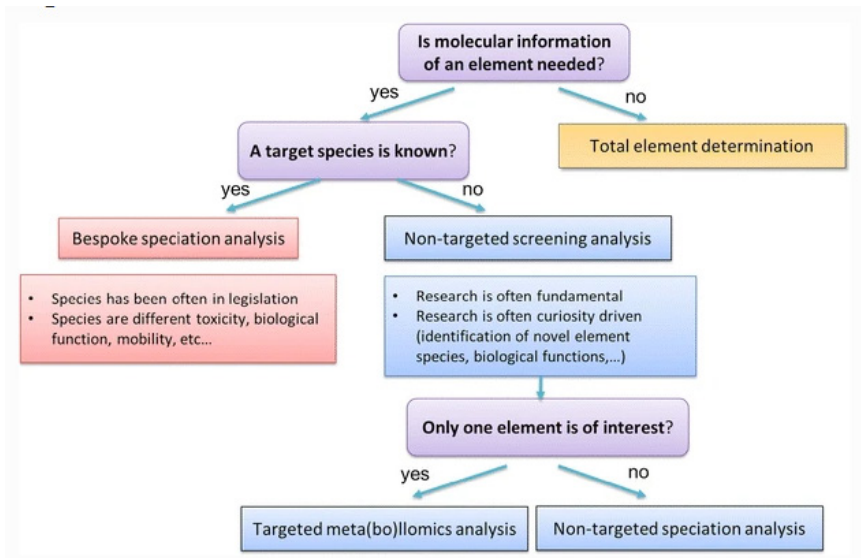
Penggunaan ICP-MS tidak hanya baik untuk analisis unsur logam dan metaloid (monoatom), tetapi juga cukup penting untuk analisis molekul organik yang mengandung heteroatom. CPMS juga diprediksi akan digunakan lebih banyak lagi di masa mendatang untuk analisis elemen non-target yang biasanya tidak terkait dengan analisis ICPMS, seperti non-logam seperti sulfur, fosfor, klorin, dan fluor (Feldmann, et al., 2018).

Para ahli analisis spesiasi sangat populer menggunakan spektrometri, khususnya spektrofotometer massa (MS), yaitu, MS plasma yang digabungkan secara induktif (disingkat ICPMS). Adanya sumber ionisasi plasma argon sedemikian kuat sehingga tidak ada informasi spesies yang tersisa pada molekul yang diinjeksikan ke dalam sistem. Hal inilah yang

membuat ICPMS menjadi metode deteksi yang ideal untuk analisis spesiasi. Detektor, bagaimanapun canggihnya masih perlu digabungkan dengan sesuatu yang selektif dengan sifat molekul elemen, dalam hal ini digunakan kromatografi berkinerja tinggi (HPLC) atau kromatografi Gas (GC).

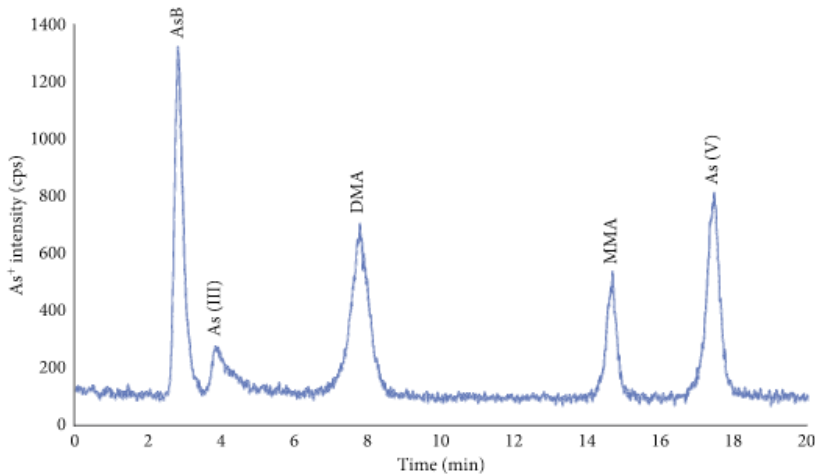
Pemanfaatan atau penggunaan ICP-MS pada analisis spesiasi dapat dibagi menjadi dua area penting sebagaimana diilustrasikan pada gambar 60 (Feldmann, et al., 2018), yaitu:

- Metode analisis ditetapkan terlebih dahulu untuk analit unsur yang memang sudah menjadi target analisis.
- Metode analisis untuk identifikasi unsur/molekul non target yang baru (*unknown*), biasanya dalam bidang ilmu biologi dan lingkungan.



Gambar 60. Karakterisasi analisis spesiasi menggunakan ICP-MS, yang didasarkan menurut focus bidang analisis (Feldmann, et al., 2018)

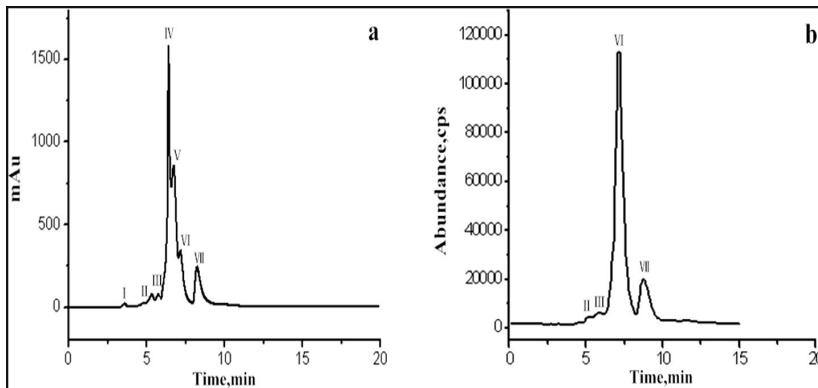
Untuk analisis spesiasi pada target yang sudah ditetapkan terlebih dahulu maka akan mudah untuk mencari prosedur standar yang mungkin dan telah digunakan. Misalnya pada analisis spesies arsenik dalam urine dan serum darah sudah memiliki acuan metode dengan HPLC-ICP-MS (Nguyen, et al., 2018). Dengan HPLC-ICP-MS, keberadaan spesies arsenik pada serum darah pada konsentrasi sangat rendah (2 ng/ml) sangat terlihat dengan jelas puncak-puncak kromatogramnya sebagaimana terlihat pada gambar 61.



Gambar 61. Kromatogram lima spesies arsenic (konsentrasi 2 ng/ml masing-masing) dengan kolom penukar anion Hamilton PRP-X100 dan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Na_2EDTA , dan MeOH sebagai fase gerak (Nguyen, et al., 2018)

Suatu penelitian terhadap tanaman jamur enoki (*Flammulina velutipes*) dengan maksud menentukan spesiasi selenium yang ada di dalamnya dengan membandingkan HPLC dengan detektor internalnya yaitu DAD (*Diode Array Detector*) dengan HPLC-ICP-MS. Jika dilakukan dengan detektor DAD maka spesies selenium tidak kelihatan (Gambar 62a) dan

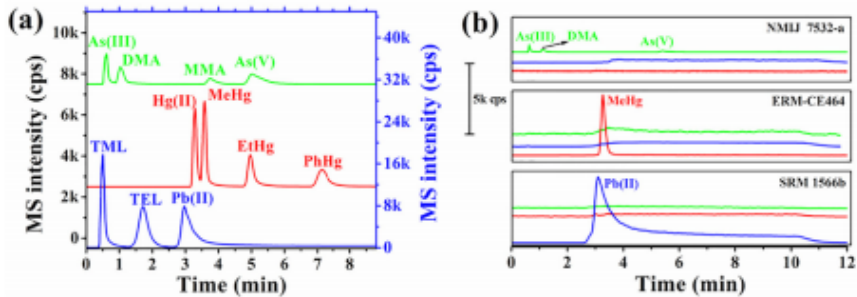
yang nampak adalah puncak-puncak dari protein atau peptide, sedangkan pada saat menggunakan HPLC-ICPMS, puncak-puncak dari empat spesies selenium baru dapat terdeteksi (Gambar 62b) (Ti, et al., 2020) *menjadi hal yang menarik.*



Gambar 62. Pemisahan ekstrak *F. velutipes* dengan HPLC (a) SEC-HPLC-DAD; (b) SEC-HPLC-ICP-MS. (Ti, et al., 2020)

HPLC-ICP-MS juga dapat digunakan untuk melakukan analisis spesiasi beberapa logam (multielemen) sekaligus secara simultan, misalnya dengan pemisahan spesies-spesies arsenik, merkuri dan timbal, di mana dapat dipisahkan dengan baik empat spesies arsenik (As(III), DMA, MMA, As(V)), empat spesies merkuri (Hg(II), Me-Hg, Et-Hg, Ph-Hg) dan tiga spesies timbal (Pb(II), TML, TEL) dengan limit deteksi yang relatif rendah yaitu sekitar 0.036–0.20 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies arsenik, 0.023–0.041 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies merkuri dan 0.0076–0.14 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies timbal. Di samping itu, waktu yang diperlukan untuk pemisahan tersebut juga hanya memakan waktu hanya sekitar 8 menit dan selanjutnya dapat diaplikasikan pada sampel-sampel biologi dan lingkungan. Gambar 63 menunjukkan kromatogram spesies-spesies As, Hg dan Pb baik dalam larutan standar (Gambar 63a) maupun pada tiga jenis material referensi standar (ERM-

CE464, SRM 1566b and NMIJ 7532-a). Dari kromatogram tersebut dapat dilihat dengan baik bagaimana spesies-spesies As, Hg, dan Pb dapat dipisahkan dengan sempurna (Zhang, et al., 2020).



Gambar 63. Kromatogram beberapa spesies As, Hg dan Pb pada (a) larutan standar (100 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies arsenik, 10 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies merkuri dan 50 $\mu\text{g/L}$ untuk spesies timbal) dan (b) tiga material referensi standar (ERM-CE464, SRM 1566b and NMIJ 7532-a) (Zhang, et al., 2020)

Mengingat kemampuan peralatan ICP-MS yang sedemikian canggih, dalam pemanfaatannya benar-benar harus dapat menggali sebanyak mungkin informasi dari sampel. Oleh karena itu agar lebih sistematis dalam analisisnya, langkah-langkah yang harus dilakukan sebagaimana diilustrasikan pada Gambar 63 adalah dapat jelaskan secara sederhana sebagai berikut

- Pertama-tama harus dipastikan apakah kita membutuhkan informasi molekuler dari unsur yang akan diteliti. Jika tidak ada, cukup ditetapkan analisis total unsur saja (tidak perlu analisis spesiasi)
- Jika diperlukan informasi molekuler, maka harus dipastikan apakah target spesies logam yang akan dianalisis telah ditentukan atau belum. Jika sudah, dapat ditetapkan metode analisis yang tepat (sudah standar) untuk analisis spesiasi lebih lanjut.

- Apabila spesies target belum ditentukan maka selanjutnya dipastikan terlebih dahulu apakah hanya berkepentingan untuk satu unsur tertentu sebagai target atau tidak. Jika iya, selanjutnya dilakukan analisis terhadap target yang sudah ditetapkan, dan jika ternyata tertarik tidak hanya satu unsur saja, dilakukan analisis spesiasi non-target.

Ketika kita meneliti proses lingkungan dan biologis dari suatu unsur, maka akan sangat penting untuk memahami bagaimana bentuk molekul yang berbeda dari unsur-unsur yang ada dalam sistem yang dipelajari. Oleh karena itu, sangatlah penting mengidentifikasi semua bentuk molekul yang berbeda dari satu unsur ini dalam sampel. Ini berarti bahwa kita memerlukan analisis spesiasi non-target yang melihat semua spesies unsur yang dipelajari.

Instrumen yang lebih modern lagi telah diaplikasikan dalam analisis spesiasi logam dan metaloid yaitu *triple quadrupole mass spectrometry* atau disingkat MS/MS yang juga dikombinasikan dengan HPLC dan ICP menjadi HPLC-ICP-MS/MS. Keunggulannya adalah memiliki sensitivitas yang jauh lebih baik dari pada spektrofotometer massa biasa, serta dapat melakukan analisis lebih mendalam dan lebih detail. Sebagai contoh, dengan HPLC-ICP-MS/MS dapat melihat ada atau tidak perubahan spesies racun arsenik secara detail pada bahan makanan, seperti ikan hiu, cumi-cumi, udang, dan kerang yang ternyata diketahui kemudian mengandung cukup tinggi arsenic, tetapi hanya arsenobetaine yang tidak beracun. Stabilitas spesies arsen tersebut juga dapat diikuti berdasarkan cara pengolahan bahan makanan (Schmidt, et al., 2017) dan penyimpanan (Schmidt, et al., 2018). Tabel 19 menunjukkan bagaimana spesies arsenobetain yang ada dalam ikan hiu tidak berubah atau sangat stabil dalam berbagai jenis suhu (suhu kamar, suhu dingin 4°C, dan suhu beku -20°C) dan waktu penyimpanan (0–12 jam, 14 hari, 21 hari). Stabilitas spesies juga terjadi pada sepsis arsenik lainnya.

Tabel 19. Evaluasi stabilitas spesies arsenik dalam ekstrak ikan hiu dan CRM DORM-3 yang disimpan pada temperature kamar, dingin dan beku. Hasil dalam $\mu\text{g g}^{-1}$ (as As), $n = 3$ (Schmidt, et al., 2018)

Time	As species	Room temperature		Cooled, 4 °C		Frozen, -20 °C	
		Shark	DORM-3	Shark	DORM-3	Shark	DORM-3
0-12h	AsB	13.6	6.23	–	–	–	–
	As(III)	< 0.03	< 0.03	–	–	–	–
	DMA	< 0.006	0.51	–	–	–	–
	MMA	< 0.012	0.05	–	–	–	–
	As(V)	< 0.026	0.21	–	–	–	–
	Σ species	13.6	7.00	–	–	–	–
14 days	AsB	–	–	14.2	6.17	14.2	6.06
	As(III)	–	–	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
	DMA	–	–	< 0.006	0.49	< 0.006	0.48
	MMA	–	–	< 0.012	0.03	< 0.012	0.03
	As(V)	–	–	< 0.026	0.21	< 0.026	0.20
	Σ species	–	–	14.2	6.90	14.2	6.77
21 days	AsB	–	–	13.4	6.18	13.6	6.32
	As(III)	–	–	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
	DMA	–	–	< 0.006	0.50	< 0.006	0.53
	MMA	–	–	< 0.012	0.05	< 0.012	0.04
	As(V)	–	–	< 0.026	0.22	< 0.026	0.22
	Σ species	–	–	13.4	6.95	13.6	7.11

Total As concentration in shark: $14.5 \pm 0.5 \mu\text{g g}^{-1}$.

Certified value for total As concentration in DORM-3: $6.88 \pm 0.30 \mu\text{g g}^{-1}$.

ICP-MS adalah sebuah teknik yang mampu mendeteksi unsur dengan konsentrasi rendah (orde ppb atau $\mu\text{g/L}$) atau bahkan pada level konsentrasi sangat rendah (*ultra-low*) (orde ppt atau ng/L). Kelebihan dari ICP-MS dibanding AAS atau ICP-OES adalah memiliki batas deteksi yang sangat rendah, rentang linearitas yang cukup lebar dan memungkinkan untuk mendeteksi komposisi isotop dari unsur-unsur.

ICP beroperasi menggunakan plasma Argon yang diinjeksi dengan sampel cairan yang diatomisasi. Sampel itu berionisasi dalam plasma dan ion-ion memancarkan cahaya pada panjang gelombang khas berbeda-beda yang kemudian diukur. Argon harusnya memiliki kandungan oksigen dan air yang rendah karena akan menimbulkan efek shielding pada sinyal untuk beberapa logam sehingga memberikan hasil pengukuran yang bias. Argon juga membutuhkan tingkat hidrokarbon yang rendah karena hidrokarbon dapat menyebabkan karbon mengendap pada cermin, yang dapat mengurangi kekuatan sinyal. Nitrogen kadang-kadang digunakan sebagai gas pendinginan dalam ICP. Selanjutnya ion yang dihasilkan dalam plasma

Argon diinjeksikan ke dalam MS, di mana MS memisahkan ion berdasarkan rasio massa/muatan. Hal ini ideal untuk analisis logam dengan konsentrasi hingga serendah part per billion (ppb) atau bahkan part per triliun (ppt).

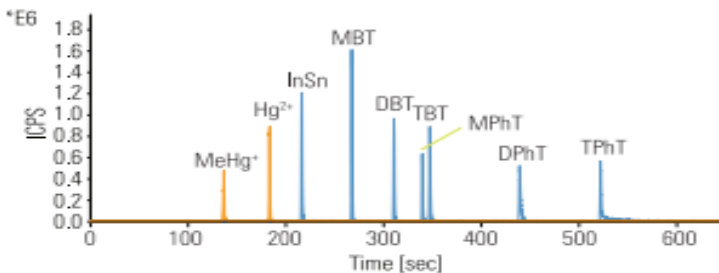
d. Penggunaan Kromatografi Gas (GC) dalam Spesiasi

GC adalah teknik analisis yang digunakan untuk memisahkan dan menganalisis sampel yang dapat diuapkan tanpa dekomposisi termal. Pemisahan komponen bergantung pada perbedaan perilaku antara fase gas bergerak yang mengalir dan fase cair yang diam. **Cara Kerja Kromatografi Gas adalah** pertama, sampel dengan ukuran sangat kecil (kisaran microliter) dicampur dengan pelarut dan disuntikkan ke dalam kromatografi gas. Sampel yang tadinya cair kemudian diuapkan menjadi fase gas. Gas pembawa sebagai eluen kemudian mengalir melalui kolom kromatografi dengan syarat eluen tersebut tidak boleh bereaksi dengan komponen apapun termasuk sampel dan analit dalam sampel. Selanjutnya suatu gas pembawa umum seperti argon, helium, atau hydrogen bersama-sama sampel dipanaskan dan memasuki tabung panjang atau kolom yang biasanya digulung untuk menjaga ukuran kromatografi agar dapat dijangkau dan dikelola. Tabung atau kolom diisi dengan bahan pendukung inert yang dibagi (dalam kolom padat). Kolom yang panjang dimaksudkan untuk memungkinkan pemisahan komponen yang lebih baik, kemudian di ujung tabung ditempatkan detektor yang mencatat jumlah sampel yang kemudian menghasilkan kromatogram yang selanjutnya diolah secara kualitatif ataupun kuantitatif.

Ada banyak jenis detektor yang dapat digunakan untuk menghasilkan kromatogram. Secara umum detektor dapat dibagi menjadi tiga kategori yaitu detektor non-selektif yang berarti detektor tersebut merespons semua senyawa kecuali gas pembawa. Kemudian detektor selektif yang merespons berbagai senyawa dengan sifat umum. Selanjutnya detektor spesifik yang merespons hanya pada senyawa tertentu. Detektor tersebut memiliki tingkat

sensitivitas yang berbeda. Detektor internal suatu instrumen GC biasanya menggunakan ionisasi nyala (FID/*Flame Ionization Detector*), konduktivitas termal (TCD/*Thermal Conductivity Detector*), penangkapan elektron (ECD/*Electron Capture Detector*) dan foto-ionisasi (PID/*Photo-Ionization Detector*). Akan tetapi, dalam analisis spesiasi detektor yang digunakan adalah detektor eksternal dengan menggabungkan GC dengan instrumen lain yang berfungsi sebagai detektor seperti AAS atau ICP-MS.

Aplikasi GC dalam spesiasi logam dan metaloid telah banyak dilakukan. Spesiasi senyawa-senyawa sulfur, posfor, dan klorida yang volatile yang berasal dari sampel cadaver (mayat) telah berhasil dipisahkan dengan GC-ICP-MS, dengan batas deteksi yang cukup rendah yaitu 0.7 ng/L untuk posfor, 5.4 ng/L untuk sulfur dan 1.6 ng/L untuk klorida (Clases, et al., 2021). Penelitian lain menunjukkan bahwa analisis spesiasi merkuri dalam sampel darah juga telah berhasil dipisahkan dengan GC-ICP-MS, di mana spesies penting merkuri seperti metil-merkuri (MeHg), etil-merkuri (Et-Hg), dan merkuri anorganik (Ino-Hg) terpisah dengan baik dengan batas deteksi absolut pada kisaran 20–50 fg (Rodrigues, et al., 2011). GC-MS juga sering digunakan dalam analisis spesiasi non-logam seperti pada spesiasi hidrokarbon dari hasil pembakaran mesin, di mana ditemukan bahwa umumnya emisi hidrokarbon hasil pembakaran mesin adalah senyawa-senyawa hidrokarbon dengan atom C6 sampai C12 (Elghawi, et al., 2009).



Gambar 64. Kromatogram analisis spesiasi merkuri dan timah secara simultan (McSheehy, et al., 2009)

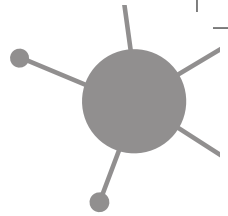
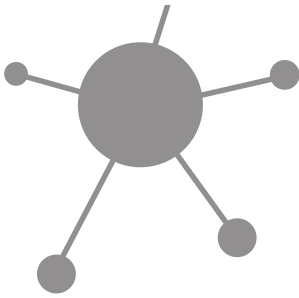
Dengan menggabungkan GC dan instrumen yang lebih canggih seperti ICP-SF-MS (SF, *Sector Field*) dan ICP-Q-MS (Q, *Quadropole*) dapat memisahkan sepsis multielemen seperti merkuri dan timah secara simultan. Gambar 64 menunjukkan kromatogram yang sangat sensitif dan batas deteksi yang cukup rendah pada analisis pemisahan merkuri dan timah. Larutan standar dengan konsentrasi 0,5 ng/ml dapat terlihat kromatogram dengan sangat jelas (McSheehy, et al., 2009)

Selain menggunakan ICP-MS, tandem GC untuk analisis spesiasi juga telah lama dilakukan dengan AAS atau ICP-OES. Timbal adalah salah satu spesies logam yang pertama kali dianalisis spesiesnya yang diawali dengan penggunaan tetra-etil-timbal (TEL, *Tetra-ethyl-lead*) pada tahun 1923 sebagai senyawa aditif pada bensin untuk mencegah pengapian premature (*anti knocking*) (Van Cleuvenbergen, et al., 1990). Penelitian tentang analisis spesiasi timbal, khususnya organotimbal kemudian menjadi berkembang di tahun 1980an dan 1990an, yang umumnya menggunakan peralatan tandem GC-AAS (Dirks, et al., 1992; Harrison & Hewitt, 1985).

Di akhir tahun 90-an dan memasuki tahun 2000an, penggunaan GC-AAS untuk analisis spesiasi selanjutnya semakin berkembang untuk jenis logam-logam yang lainnya seperti analisis spesiasi senyawa organo-timah dengan GC yang sudah dilengkapi dengan pembangkit hidrida dan AAS dan mampu memisahkan senyawa tributil-timah (*tributyltin*, TBT) dan timah trifenil (*triphenyltin*, TPT) dengan sangat baik, bahkan dengan kehadiran interferen Sn(II) dan Sn(IV) dapat memberikan batas deteksi absolut hingga 95 untuk TBT dan 145 pg untuk TPT (Feng & Narasaki, 2002). Tentu saja perkembangan hingga saat ini sedemikian pesat sehingga cukup banyak riset-riset yang telah dihasilkan menggunakan metode tandem GC dan Spektroskopi Atom. Secara umum, detektor spektrometri atom adalah metode selektif untuk unsur-unsur tertentu, yang secara garis besar dibagi dalam tiga kategori sebagai berikut:

- Spektroskopi Emisi Atom (*Atomic emission spectrometry*, AES) memungkinkan untuk mendeteksi secara simultan beberapa unsur-unsur berbeda.
 - *Microwave induced plasma detectors* (GC-MIP-AES), yang juga dapat menentukan unsur-unsur non-logam (O, N, P, S, halogens).
 - *Inductively coupled plasma* (GC-ICP-AES).
- Spektroskopi Serapan Atom (GC-AAS) adalah sensitif untuk detektor unsur tunggal (*single element*).
- Spektroskopi Fluoresensi Atom (GC-AFS) umumnya digunakan untuk merkuri dan unsur-unsur yang dapat membentuk senyawa hidrida.

Detektor lain yang sering dihubungkan dengan Kromatografi Gas dalam analisis spesiasi adalah *Flame-photometric detector* (FPD) dan *Flame-ionization detectors* (FID).



DAFTAR PUSTAKA

- Allchin, F.R. 1979. "India: the ancient home of distillation?". *Man* 14 (1).
- Annor, G. A. 2009. "Sample Collection, handling and preparation", Ghana: *West Africa Graduate Course on Food Composition and Biodiversity*.
- Anon. 2021. <https://www.fishersci.se>. [Online] Available at: <https://www.fishersci.se/se/en/scientific-products/centrifuge-guide/centrifugation-theory.html> [Accessed 20 05 2021].
- Aryal, S. 2018. "<https://microbenotes.com/>", Accessed 05 21, 2021. <https://microbenotes.com/centrifugation-principle-types-and-applications/>.
- Bagal, M.R. 2014. *Study of Liquid Liquid Extraction of Platinum Group Metals from Various Media*, Aurangabad, India: Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University.
- Benson, M. C. 2014. *Guidelines on the Organization of Samples in a Laboratory*. <https://research.columbia.edu/>: Office of Research Compliance and Training Columbia University.
- Bhattacharya, P., A.H. Welch, K.G. Stollenwerk, M.J. McLaughlin, J. Bundschuh, and G. Panauallah. 2007. "Arsenic in the environment: Biology and chemistry." *Science of The Total Environment* 379 (2–3): 109-120.
- Bigelow, J. 2009. "Bioanalytical Tools for drug analysis." In *Pharmacology*, edited by M Hacker, W Messer and Kenneth, 279–302. Karger Publishers.

- Bluemlein, K., A. Raab, and J. Feldmann. 2008. "Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation." *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 357–66.
- Bohari, Y, T. Stoichev, D.L. Tsalev, and A. Bosev. 2007. "Arsenic speciation in soils in the vicinity of a copper smelter in Pirdop, Bulgaria." *Bulgarian Chemistry and Industry* 78: 9–12.
- Bohari, Y., A Astruc, M. Astruc, and J. Cloud. 2001. "Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS." *J. Anal. At. Spectrom* 16: 774-778.
- Bohari, Y., G. Lobos, H. Pinochet, F. Pannier, A. Astruc, and M. Potin-Gautier. 2002. "Speciation of arsenic in plants by HPLC-HG-AFS: Extraction optimisation on CRM materials and application to cultivated samples." *Journal of Environmental Monitoring* 4 (4): 596–602.
- Braithwaite, A., and F.J Smith. 1999. "Processing chromatographic data." In *Chromatographic Methods*, edited by A. Braithwaite and F.J. Smith, 399–425. Amsterdam: Springer-Nature.
- Chooto, P., P Wararattananurak, T Kankamano, C Innuphat, and W Sirinawin. 2015. "Determination of inorganic arsenic species by hydride generation atomic absorption spectrophotometry and cathodic stripping voltammetry." *ScienceAsia* 41: 187–197.
- Choudhari, A. 2020. *Different Types of Column Used in HPLC, Pharmaceutical Guideliens*. <https://www.pharmaguideline.com>, 02 09. Accessed 05 15, 2021. <https://www.pharmaguideline.com/2016/01/different-types-of-columns-used-in-hplc.html>.
- Clases, D., M. Ueland, R. Gonzalez de Vega, P. Doble, and D. Profrock. 2021. "Quantitative speciation of volatile sulphur compounds from human." *Talanta* 221: 121–424.

- Coskun, O. 2016. "Separation techniques: Chromatography." *North Clin Istanb.* 3 (2): 156–160.
- Dirks, W.M.R., R.J.A. Van Cleuvenbergen, and F.C. Adams. 1992. "Speciation of alkyllead compounds by GC-AAS : A State of Affairs." *Microchim. Acta* 109: 133–135.
- Dong, M.W. 2005. "HPLC Instrumentation in Pharmaceutical Analysis: status, advances, and trends." In *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, edited by Satinder Ahuja and Michael W. Dong, 47–75. Elsevier.
- Driscoll, C., and J. Otton. 1994. "Trace metals speciation and cycling." In *Biogeochemistry of Small Catchments: A Tool for Environmental Research*, edited by B. Moldan and J. Cerny. John Wiley and Sons.
- Edge, T. 2003. "Bioanalytical separations." In *Handbook of Analytical Separations*, edited by Ian D. Wilson, 91–128. Elsevier.
- Efstathiou, C. E. 2004. "http://195.134.76.37/." 04. Accessed 05 2020. http://195.134.76.37/applets/AppletCraig/Applet_Craig2.html.
- Elghawi, U, J. Misztal, A. Tsolakis, M.L. Wyszynski, H.M. Xu, and J. Qiao. 2009. "GC-MS speciation and quantification of 1,3 Butadiene and other C1-C6 Hydrocarbons in SI / HCCI V6 engine exhaust." *International Journal of Fuels and Lubricants* 1 (1): 1–11.
- European Commission, Taxation and Customs Union. 2012. *Handling of Samples*. Accessed 05 30, 2021. https://ec.europa.eu/taxation_customs/dds2/SAMANCTA/EN/GeneralProcedures/SampleTransportation_EN.htm.
- Feldmann, J, A. Raab, and E. M. Krupp. 2018. "Importance of ICPMS for speciation analysis is changing: future trends for targeted and non-targeted element speciation analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410: 661–667.

- Feng, Y.L., and H. Narasaki. 2002. "Speciation of organotin compounds in marine sediments by capillary column gas chromatography-atomic absorption spectrometry coupled with hydride generation." *Anal Bioanal Chem* 372: 382–386.
- Forbes, R.J. 1970. *A short history of the art of distillation : from the beginnings up to the death of Cellier Blumenthal*. Leiden: E.J. Brill.
- Forgács, E., and T. Cserhádi. 2003. "Gas chromatography." In *Food Authenticity and Traceability*, edited by M. Lees. Woodhead Publishing.
- Fytianos, K. 2000. "Speciation analysis of heavy metals in natural waters: A review." *Journal of AOAC International* 84 (6).
- García-Salgado, S., and M.A. Quijano. 2014. "Stability of toxic arsenic species and arsenosugars found in the dry alga Hijiki and its water extracts." *Talanta* 128: 83–91.
- Gopalasatheeskumar, K. 2018. "Significant role of soxhlet extraction process in photochemical research." *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences* 7 (1): 43–47.
- Halász, T., and C. Horváth. 1963. "Thin-layer graphited carbon black as the stationary phase for capillary columns in gas chromatography." *Nature* 197: 71–72.
- Harrison, R.M., and C.N. Hewitt. 1985. "Development of sensitive GC-AAS instrumentation for analysis of organometallic species in the environment." *International J. of Environmental Analytical Chemistry* 21 (1-2): 89–104.
- Harvey. 2011. "<http://community.asdlib.org/>." 0621. Accessed 05/20/2011. <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2011/06/21/gc-columns/>.
- Hashim, H.O. 2018. *Chromatography and HPLC principles*. Hillah, Iraq: DOI: 10.13140/RG.2.2.33635.25126 University of Babylon.

- Ismail, B. , and S. S. Nielsen. 2010. "Basic principles of chromatography." In *Food Analysis*, edited by S. Suzanne Nielsen, 475–498. Springer Science+Business Media.
- Jayanuddin, J, A. Z. Lestari, and F. Nurbayanti. 2014. "Pengaruh suhu dan rasio pelarut ekstraksi terhadap rendemen dan viskositas natrium alginat dari rumput laut cokelat (*Sargassum* sp)." *Jurnal Integrasi Proses* 5 (1).
- Jitmanee, K., M. Oshima, and S. Motomizu. 2005. "Speciation of arsenic(III) and arsenic(V) by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry coupled with preconcentration system." *Talanta* 66 (3): 529–533.
- Khadse, G.K. 2010. "Collection and preservation of samples and field analysis." Nagpur: Training training programme programme on QAQC in Water.
- Kislik, V.S. . 2012. *Solvent extraction: Classical and novel approaches*. First Edition. Amsterdam: Elsevier.
- Koronevska, M. 2006. "Determination of arsenic, antimony, and selenium by FI-HG-AAS in foods consumed in Slovakia." *Journal of Food and Nutrition Research* 42 (2): 84–88.
- Kot, A., and J. Namiesńnik. 2000. "The role of speciation in analytical chemistry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19 (2–3): 69–79.
- Krachler, M., K. Falk, and H. Emons. 2002. "HPLC-HG-AAS and HPLC-ICP-MS for speciation of arsenic and antimony in biomonitoring." *American Laboratory* 34 (6).
- Krasnodębska-Ostręga, B, M. Sadowska, and E. Biaduń. 2018. "Sample pretreatment for trace speciation analysis." *Physical Sciences Reviews* 2 (12).

- Kumar, A.R., and P. Riyazuddin. 2005. "Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry." *Analytical sciences* 21 (12): 1401–1410.
- Leffers, L., F. Ebert, M.S. Talesi, K.A. Francesconi, and T. Schwerdtle. 2013. "In vitro toxicological characterization of two arsenosugars and their metabolites." *Molecular Nutrition & Food Research* 57 (7): 1270–1282.
- Leong, S.S., S.P. Yeap, and J.K. Lim. 2016. "Working principle and application of magnetic separation for biomedical diagnostic at high- and low-field gradients." *Interface Focus* 6 (6): <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0048>.
- Leopold, K., M. Foulkes, and P. Worsfold. 2010. "Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review." *Analytica Chimica Acta* 663 (2): 127–138.
- Majors, R. 1992. "Trends in Sample Preparation." *LCGC North America* 10: 1098–1113.
- Majors, R.E., and D.E. Wilmington. 2013. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography*. Agilent Technologies.
- Market, B. 1995. "Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices." *Sci Total Environ.* 176: 45–61.
- Marriott, P.J. 2005. "Gas chromatography, principle." In *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, edited by Paul Worsfold, Alan Townshend and Colin Poole, 7–18. Elsevier.
- McSheehy, S., J. Wills, H.J. Schlüter, T. Lindemann, and M. Hamster. 2009. *Speciation of Trace Elemental Species using GC-ICP-MS and GC-HR-ICP-MS*.

- Meyer, V.R. 2005. "Chromatography, principle." In *Encyclopedia of Analytical Science 2nd Edition*, edited by P. Worsfold, A. Townshend and C. Poole, 98–105. Amsterdam: Elsevier.
- Michalski, R., M. Jabłonska-Czapla, A. Łyko, and S. Szopa. 2013. "Hyphenated methods for speciation analysis." In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, edited by R.A. Meyers, DOI:10.1002/9780470027318.a9291. Chichester: John Wiley & Sons.
- Miller, J.N., and J.C. Miller. 2005. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th. Harlow, Essex: Pearson Education Limited.
- Mitra, S., and R. Brukh. 2003. "Sample preparation: An analytical perspective." In *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, edited by Somenath Mitra, 1–36. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Montperrus, M., Y. Bohari, M. Bueno, A. Astruc, and M. Astruc. 2002. "Comparison of extraction procedures for arsenic speciation in environmental solid reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectroscopy." *Applied Organometallic Chemistry* 16 (7): 347–354.
- Nguyen, H M, D T Pham, L T Nguyen, H A Vu, T T Ta, B M Tu, Y T.H Nguyen, and B D Chu. 2018. "Speciation analysis of arsenic compounds by HPLC-ICP-MS: Application for human serum and urine." *Journal of Analytical Methods in Chemistry* <https://doi.org/10.1155/2018/9462019>.
- Nichols, L. 2021. "<https://chem.libretexts.org/>" 03 05. Accessed 05 30, 2021. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_\(Nichols\)/01%3A_General_Techniques/1.05%3A_Filtering_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/01%3A_General_Techniques/1.05%3A_Filtering_Methods).

- Nordberg, M., J.H. Duffus, and D.M. Templeton. 2004. "International union of pure and applied chemistry: Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendation 2003)." *Pure Appl. Chem.* 76 (5): 1033–1082.
- Purbani, D. 2009. "Proses pembentukan kristalisasi garam." *Pusat Riset Wilayah Laut dan Sumberdaya Nonhayati Badan Riset Kelautan dan Perikanan Departemen Kelautan dan Perikanan*.
- Quiroz, W. 2021. "Speciation analysis in chemistry." *ChemTexts, Open-access Springer 7*: DOI: 10.1007/s40828-020-00125-8.
- Rahman, M.M., A.M.A. El-Aty, J.H. Choi, H.C. Shin, S.C. Shin, and J.H. Shim. 2015. "Basic overview on gas chromatography columns." In *Analytical Separation Science, 1st Edition*, edited by A. Berthod, V.P. Estévez and A.M. Stalcup. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Rodrigues, J. L, C. R. Alvarez, N. R. Fariñas, J. J. B. Nevado, F. Barbosa Jr, and R. C. R. Martín-Doimeadios. 2011. "Mercury speciation in whole blood by gas chromatography coupled to ICP-MS with a fast microwave-assisted sample preparation procedure." *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2): 436–442.
- Rubio, R., and A.M. Ure. 1993. "Approaches to sampling and sample pretreatments for metal speciation in soils and sediments." *Int. J. Environmental Analytical Chemistry* 51: 205–217.
- Sahin, D. 2019. "Atomic spectroscopy." In *Modern Spectroscopic Techniques and Applications*, by Maaz Khan. open access: DOI: 10.5772/intechopen.89269.
- Schmidt, L., J. A. Landero, R.F. Santos, M.F. Mesko, P. A. Mello, E.M.M Flores, and J.A. Caruso. 2017. "Arsenic speciation in seafood by LC-ICP-MS/MS: method development and influence of culinary treatment." *J. Anal. At. Spectrom.* (8).

- Schmidt, L., J. A. Landero, D.L.R. Novo, F. A. Duarte, M.F. Mesko, J. A. Caruso, and E. M. M. Flores. 2018. "A feasible method for As speciation in several types of seafood by LC-ICP-MS/MS." *Food Chemistry* 255: 340–347.
- Setyoprato, P., W. Siswanto, and H. S. Ilham. 2003. "Studi eksperimental pemurnian garam NaCl dengan cara kristalisasi ." *Unitas* 11 (2): 17-28.
- Skoog, D.A., D.M. West, F.J. Holler, and S.R. Crouch. 2014. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th. Brooks/Cole Cengage Learning.
- Smith, R. 2003. "Before the Injection — Modern methods of sample preparation for separation techniques." *J. Chromatogr. A* 1000 (1-2): 3–27.
- Snyder, R.L., J.J. Kirkland, and J.W. Dolan. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Third Edition. John Wiley & Sons.
- Sulihono, A., B. Tarihoran, and T. E. Agustina. 2012. "Pengaruh Waktu, temperatur, dan jenis pelarut terhadap ekstraksi pektin dari kulit jeruk bali (Citrus Maxima) ." *J. of Chemical Eng. Sriwijaya Univ.* 18 (4).
- Sunil, A., G. Anju, and V. Rajat. 2018. "HPLC detectors, their types and use: A review." *Organic & Medicinal Chemistry International Journal* 6 (5): DOI: 10.19080/OMCIJ.2018.06. 555700.
- Templeton, M., and H. Fujishiro. 2017. "Terminology of elemental speciation- An IUPAC perspective." *Coordination Chemistry Reviews* 352: 424–431.
- Tham, M.T. 1997. "https://cupdf.com ." Accessed May 20, 2021. <https://cupdf.com/document/introduction-to-distillation.html>.
- Thompson, J.S., and R.L. Schulz. 2002. *Development of Speciation and Sampling Tools for Mercury in Flue Gas*. US Environmental Agency.

- Ti, M., B. Li, T. Sun, W. Guan, Y. Liang, and H. Li. 2020. "HPLC-ICP-MS speciation of selenium in Se-cultivated *Flammulina velutipes*." *Arabian Journal of Chemistry* 13 (1): 416–422.
- Van Cleuvenbergen, R.J.A., W.D. Marshall, and F.C. Adams. 1990. "Speciation of organolead compounds by GC-AAS." In *Metal Speciation in the Environment. NATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences)*, by J.A.C. Broekaert, S. Güçer and F. Adams, https://doi.org/10.1007/978-3-642-74206-4_17. Berlin: Springer.
- Vergara Gallardo, M., Y. Bohari, A. Astruc, M. Potin-Gautier, and M. Astruc. 2001. "Speciation analysis of arsenic in environmental solids reference materials by high-performance liquid chromatography–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry following orthophosphoric acid extraction." *Analitica Chimica Acta* 441 (2): 257–268.
- Wahyuni, Dyah Tri, and Simon Bambang Widjanarko. 2015. "Pengaruh jenis pelarut dan lama ekstraksi terhadap ekstrak karotenoid labu kuning dengan metode gelombang ultrasonik." *Jurnal Pangan dan Industri* 3 (2).
- Warade, A., R. Gaikwat, R. Sapkal, and V. Sapkal. 2011. "Simulation of multistage countercurrent liquid-liquid extraction." *Leonardo Journal of Sciences* (20): 79–94.
- Wells, M. J.M. 2003. "Principle of extraction and the extraction of semivolatiles from liquids." In *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, edited by S Mitra, 37–225. John Wiley & Sons.
- Welna, M, A Szmczycha-Madeja, and P Pohl. 2020. "Non-chromatographic speciation of As by Hg technique—Analysis of samples with different matrices." *Molecules* 25: 4944.

- Wu, P., and M. Imai. 2012. "Novel biopolymer composite membrane involved with selective mass transfer and excellent water permeability." In *Advancing Desalination*, edited by Robert Y. Ning, Open access peer-reviewed chapter. eBook (PDF) ISBN: 978-953-51-6234-6.
- Yu, X, C Liu, Y Guo, and T Deng. 2019. "Speciation analysis of trace arsenic, mercury, selenium and antimony in environmental and biological samples based on hyphenated techniques." *Molecules* 24: 926.
- Yuwono, M., and G. Indrayanto. 2004. "Chromatography system instrumentation." In *Encyclopedia of Chromatography 2nd*, edited by J Cazes, 682-684. Taylor & Francis.
- Zhang, D., S. Yang, Q. Ma, J. Sun, H. Cheng, Y. Wang, and J. Liu. 2020. "Simultaneous multi-elemental speciation of As, Hg and Pb by inductively coupled plasma mass spectrometry interfaced with high-performance liquid chromatography." *Food Chemistry* 313: 126119.



KIMIA PEMISAHAN



Dr. Ir. Bohari Yusuf, M.Si, Lahir di Bantaeng, 5 November 1965, adalah Dosen Lektor Kepala pada Program Studi Ilmu Kimia Fakultas MIPA Universitas Mulawarman. Menyelesaikan pendidikan sarjana kimia pada tahun 1991 di Universitas Hasanuddin, kemudian Magisterbidang kimia analitik di Universitas Gadjah Mada tahun 1996, selanjutnya menyelesaikan program doktor bidang kimia analitik di Laboratoire de Chimie Analytique et Bio Inorganique et Environnement (LCABIE), Universite de Pau et des Pays de l'Adour, Prancis tahun 2001, dengan keahlian khusus di bidang analisis spesiasi arsenik. Sementara itu, profesi insinyur diperoleh dari Universitas Mulawarman tahun 2019.

Pengalaman penelitian bersama tim dituangkan dalam beberapa jurnal ilmiah seperti: Journal of Analytical Atomic Spectrometry (JAAS), 2001, 16(7); Analytica Chimica Acta (ACA), 2001, 441(2); Journal of Environmental Monitoring (JEM), 2002, 4(4); Applied Organometallic, 2007, 78(1-4); Indonesian Journal of Chemistry, 2014, 14(1); International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2015, 6(3); F1000 Research, 2018, (7); Molecular and Cellular Biomedical Sciences, 2021, 4(1).

Pernah bertugas di luar kampus sebagai Kepala Dinas Pendidikan Kabupaten Kutai Timur (2006), Ketua Dewan Pendidikan Provinsi Kaltim (2008-2013), Staf Ahli Gubernur Kaltim (2010-2013), sementara di kampus pernah sebagai Pembantu Dekan I FMIPA Unmul (2001-2003), Ketua Program Magister Ilmu Lingkungan Unmul (2003-2005), dan Wakil rektor Bidang Perencanaan, Kerjasama dan Humas Unmul (2014-2022).

PT Penerbit IPB Press

Jalan Taman Kencana No. 3, Bogor 16128

Telp. 0251 - 8355 158 E-mail: penerbit.ipbpress@gmail.com

 www.ipbpress.com  [IPB PRESS](#)  [IPB PRESS](#)  [IPB PRESS](#)

Sains

ISBN : 978-623-256-773-3



9 786232 567733