

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

METODE SEDERHANA DALAM ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

PROFIL SINGKAT PENULIS

Enih Rosamah, lahir di Sumedang pada tanggal 17 Agustus 1966. Ia menyelesaikan program Sarjana (S1) di Jurusan Teknologi Hasil Hutan Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor (lulus Th 1990), Pendidikan Magister Science (M.Sc.for.prof.) ditempuh di Georg-August Universität Göttingen, Jerman (lulus Th 1997). Dan terakhir menempuh jenjang Pendidikan Doktor (S3) di Georg-August Universität Göttingen, Jerman (lulus Th 2003), dengan bidang keahlian Teknologi Kimia Kayu, khususnya bidang Kimia Ekstraktif Kayu (tumbuhan berkayu).

Sejak tahun 1991 hingga sekarang bekerja sebagai dosen pada Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman Samarinda, Kalimantan Timur.

Ia menikah dengan Dr. Sjamsu Djohan, M.Si, dikaruniai dua orang anak putra dan putri, Yusril Sinrang S. Djohan dan Meidina Sinrang S. Djohan



Penerbit
Mulawarman University PRESS
Gedung LP2M Universitas Mulawarman
Jl. Krayan, Kampus Gunung Kelua
Samarinda - Kalimantan Timur - Indonesia 75123
Telp/Fax (0541) 747432, Email : mup@lppm.unmul.ac.id



KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

METODE SEDERHANA DALAM ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS
METODE SEDERHANA DALAM ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

ENIH ROSAMAH

ENIH ROSAMAH

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

METODE SEDERHANA DALAM ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

Penulis : Enih Rosamah

Editor & Cover Design : Andi Hafitz Khanz

ISBN : © 2019. Mulawarman University Press

Edisi : 2019

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang Dilarang
memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi
buku ini dalam bentuk apapun tanpa
izin tertulis dari penerbit

Isi diluar tanggung jawab percetakan.

Enih Rosamah. 2019. Kromatografi Lapis Tipis: Metode
Sederhana dalam Analisis Kimia Tumbuhan Berkayu.
Mulawarman University Press. Samarinda



Mulawarman
University PRESS
Member of IKAPI & APPTI

Penerbit

Mulawarman University PRESS

Gedung LP2M Universitas Mulawarman

Jl. Krayan, Kampus Gunung Kelua

Samarinda - Kalimantan Timur - Indonesia 75123

Telp/Fax (0541) 747432, Email : mup@lppm.unmul.ac.id

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

METODE SEDERHANA DALAM ANALISIS KIMIA
TUMBUHAN BERKAYU

Acknowledgment
Terima Kasih
Kepada

DIREKTORAT KARIER DAN KOMPETENSI SDM
DIREKTORAT JENDERAL SUMBER DAYA IPTEK
DAN PENDIDIKAN TINGGI

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN
PENDIDIKAN TINGGI

PROGRAM DOSEN MERENUNG 2019

No Kontrak: T/128/D2.3/KK.04.03/2019

Tanggal 27 September 2019

PENGANTAR

Puji dan syukur penulis sampaikan ke hadirat Allah SWT, karena atas berkat dan karunia-Nya penulis dikaruniai kesempatan untuk dapat menyusun buku tentang dasar pengetahuan tentang kromatografi lapis tipis (KLT).

Penulis merasa tergerak untuk menyusun tulisan ini, karena selama ini masih dirasa perlu pengayaan buku-buku pegangan khusus yang mengupas tentang prinsip dan cara melakukan kromatografi lapis tipis, baik bagi mahasiswa, laboran, maupun bagi peneliti di laboratorium secara ringkas namun lengkap. Sehingga diharapkan para mahasiswa, laboran, maupun bagi peneliti di laboratorium kimia dapat lebih mudah memahami mengenai Teknik kromatografi lapis tipis, baik dari segi teori maupun prakteknya. Buku tipis ini berisi penjelasan mengenai teori singkat dan contoh praktis dalam hal metode analisa kimia dengan metode KLT, sehingga akan lebih mudah dipahami dan dipraktekkan sendiri.

Akhir kata penulis berharap saran dan kritik demi penyempurnaan buku ini dimasa yang akan datang. Semoga kiranya tulisan singkat ini memberi manfaat bagi yang memerlukan dan mendapat Ridho Allah SWT. Aamiin.

Penulis

DAFTAR ISI

I	Pendahuluan	1
II	Melakukan Kromatografi Lapis Tipis	4
III	Fase Diam (Stationary Phase)	8
	3.1 Adsorbent	8
	3.2 Persiapan Lempengan KLT	15
	3.3 Adsorbent yang dimodifikasi	21
	3.4 Plat pra-lapisan komersial	22
IV	Fase Gerak (Mobile Fase)	25
	4.1 Sifat-sifat umum yang di perlukan ole fase bergerah (gerake fase)	25
	4.2 Pemilihan Pelarut	27
	4.3 Sampel	29
V	Teknik Praktis dalam Kromatografi Lapis Tipis	32
	5.1. Aplikasi sampel pada plat (pemberian spot)	32
	5.2 Pengembangan kromatogram	38
	5.3 Visualisasi	41
VI	Analisis Kromatografi Kualitatif dan Kuantitatif	52
	6.1 Nilai Rf yang bisa di reproduksi	52
	6.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Kuantitatif	60
VII	Aplikasi KLT dalam Berbagai Bidang	63
	7.1 Asam amino	63
	7.2 Farmasi dan obat-obatan	64
	7.3 Analisis kualitatif alkaloid	64
	7.4 Kimia klinis dan Biokimia	65
	7.5 Bidang Kosmetik	65
	7.6 Analisis Makanan	65
	7.7 Pemisahan aromatik	65
	7.8 Analisis Produk Minyak Bumi	66
	7.9 Aplikasi yang terkait dengan Kimia Organik	66
	REFERENSI	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran Umum Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	4
Gambar 2.2 Contoh Pemisahan campuran	5
Gambar 2.3 Cara pengukuran nilai Rf	6
Gambar 2.4 Cara melakukan teknik kromatografi lapis tipis	7
Gambar 3.1 Pemisahan KLT pada Lempeng yang disiapkan 2 minggu secara terpisah	12
Gambar 3.2 Lempengan KLT setelah pemanasan hingga 230 °C	12
Gambar 3.4 Potongan melintang pada sebuah lempengan KLT yang di modifikasi	16
Gambar 3.5 Cara menyiapkan plat (lempengan) 20 x 20 cm	19
Gambar 3.6 Plat dengan lapisan pra-adsorben	24
Gambar 5.1a. Efek dari pemberian spot dengan menggunakan pelarut polar	33
Gambar 5. 1b. Pembuatan spot sampel pada lempeng (plat) KLT	35
Gambar 5.1c. templat plastik	36
Gambar 5.1d. sebuah plat TLC dengan teknik pembuatan spot yang memuaskan	36
Gambar 5.1e. Sebuah plat TLC dengan teknik pembuatan spot yang tidak memuaskan	37
Gambar 5.2a. penggunaan plat berlapis	40
Gambar 5.2b. KLT dua dimensi	41
Gambar 5.3a. metode Visualisasi	42
Gambar 6.1 Plat KLT yang dikembangkan dalam tank yang tidak jenuh	55

DAFTAR TABEL

Table 3.1 Daftar pilihan adsorbent	10
Tabel 5.3a Agen-agen visualisasi destruktif	46
Tabel 5.3b. Bahan-bahan Fluorescens untuk Metode deteksi Non Destruktif pada Senyawa Lipofilik	50

DAFTAR BAGAN

Bagan 4.1 Kekuatan eluent dari Campuran - campuran biner	28
Bagan 5.1 Energy adsorpsi pada beberapa gugus fungsi	31

I. Pendahuluan

Kromatografi merupakan suatu tehnik praktis yang sudah dikembangkan dari ketertarikan para ahli kimia dalam memiliki kemampuan untuk memisahkan suatu campuran senyawa menjadi komponen-komponennya, dengan tujuan akhirnya mampu untuk mengidentifikasi komponen-komponen individualnya. Para ahli kimia terdahulu, para "Al-Chemist", memiliki teori tentang pemisahan elemen awal seperti dalam tulisan kuno: "Anda akan memisahkan bumi dari api, yang remah dengan yang padat, secara perlahan dengan keahlian yang tinggi."

Istilah kromatografi, yang secara harfiah berarti "menulis dengan warna", pertama kali diperkenalkan pada awal 1900-an untuk menggambarkan penggunaannya dalam memisahkan pigmen tumbuhan. Dalam kromatografi, molekul dipisahkan dengan melarutkan campuran dalam fase gerak (misalnya, buffer) dan melewatkannya melalui fase diam (misalnya, manik-manik kromatografi). Mereka semua memiliki fase diam (padat, atau cair yang didukung pada padat) dan fase gerak (cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen campuran dengannya. Komponen yang berbeda berjalan dengan laju yang berbeda. Kromatografi digunakan untuk memisahkan campuran zat ke dalam komponennya. Semua bentuk kromatografi bekerja dengan prinsip yang sama.

Kromatografi lapis tipis (*Thin-layer chromatography*/TLC) merupakan tehnik kromatografi yang berguna untuk memisahkan senyawa organik. Karena kesederhanaan dan kecepatan TLC, sering digunakan untuk memantau kemajuan reaksi organik dan untuk memeriksa kemurnian produk.

Dalam buku tipis ini, pembahasan lebih dititikberatkan untuk meninjau prinsip-prinsip dasar dan pentingnya Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dalam penelitian pada umumnya dan dalam fitokimia khususnya. Kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi planar sederhana, hemat biaya, dan mudah dioperasikan yang telah digunakan di laboratorium kimia umum selama beberapa dekade untuk memisahkan senyawa kimia dan biokimia secara rutin. Secara tradisional, metode kimia dan optik digunakan untuk memvisualisasikan bintik analit pada pelat TLC. Juga memiliki aplikasi luas dalam mengidentifikasi kotoran atau ketidakmurnian dalam senyawa. Studi menyoroti ulasan tentang KLT dan penerapan estimasi kualitatif dan kuantitatif senyawa bioaktif dari tanaman obat.

Teknik pemisahan dengan KLT memiliki banyak kelebihan, karena KLT merupakan Teknik yang serbaguna, yang dapat diaplikasikan untuk hampir semua senyawa. Pemisahan dapat dicapai dengan biaya tidak terlalu mahal, yang dihasilkan dari adsorben yang baik dan pelarut yang murni. Pemisahan dapat dicapai dalam waktu yang singkat, sehingga memungkinkan KLT merupakan suatu Teknik dengan jaminan keberhasilan, di dalam pemisahan campuran yang tidak diketahui.

Sedangkan beberapa kerugian dari KLT diantaranya yaitu KLT bisa menjadi pekerjaan yang kurang bersih, khususnya bila plat disiapkan sendiri. Para peneliti disarankan untuk menggunakan plat yang siap pakai. KLT dapat dibuat sebagai kromatografi kuantitatif, dengan memodifikasi peralatan kromatografi. Dan ini

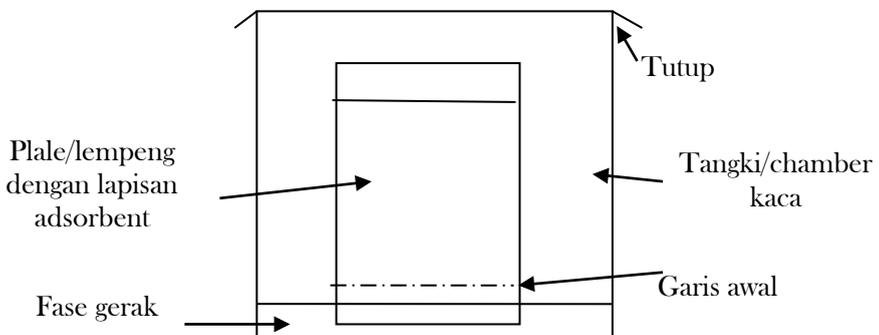
memerlukan biaya yang tidak sedikit. Lebih baik untuk menggunakan Analisa semi kuantitatif.

Dalam buku tipis ini, pembahasan lebih ditujukan kepada peninjauan prinsip-prinsip dasar dan pentingnya Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dalam penelitian pada umumnya dan dalam fitokimia khususnya. Kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi planar sederhana, hemat biaya, dan mudah dioperasikan yang telah digunakan di laboratorium kimia umum selama beberapa dekade untuk memisahkan senyawa kimia dan biokimia secara rutin. Secara tradisional, metode kimia dan optik digunakan untuk memvisualisasikan bintik analit pada pelat TLC. Juga memiliki aplikasi luas dalam mengidentifikasi ketidakmurnian dalam senyawa. Studi menyoroti ulasan tentang KLT dan penerapan estimasi kualitatif dan kuantitatif senyawa bioaktif dari tanaman obat. Kromatografi lapis tipis adalah teknik yang sederhana, hemat biaya, dan mudah dioperasikan dalam fitokimia dan biokimia dengan banyak aplikasi yang digunakan dalam pengembangan obat baru dan berbagai jenis formulasi dari tanaman obat. Selanjutnya dibutuhkan dokumentasi terperinci untuk pembangunan berkelanjutan dalam pendidikan dan penelitian.

II. Melakukan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan sepotong kaca, logam atau plastik kaku yang dilapisi lapisan tipis silika gel atau alumina. Silika gel (atau alumina) adalah fase diam. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis juga sering mengandung zat yang berfluoresensi dalam sinar UV. Fase gerak adalah pelarut cair yang cocok atau campuran pelarut.

Kromatografi Lapisan Tipis (KLT), seperti halnya semua teknik analisis, memiliki istilah-istilah khusus yang diperlukan untuk dipelajari, sebelum kita dapat mengerti gambaran dari sebuah system TLC (Gambar 2.1).



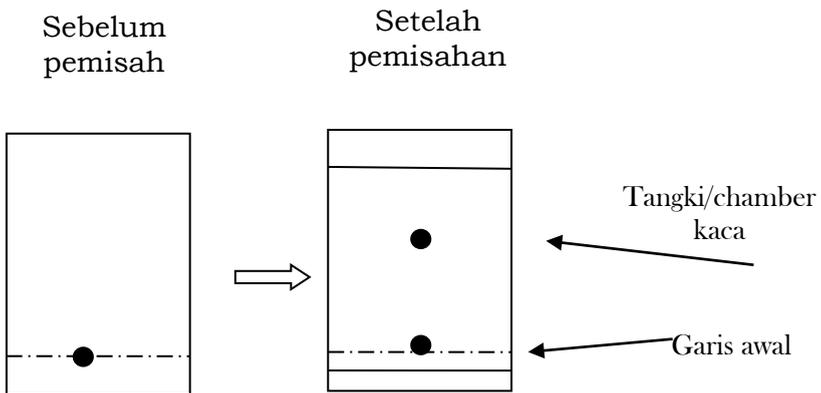
Gambar 2.1 Gambaran Umum Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Campuran senyawa-senyawa yang akan dipisahkan biasa disebut contoh uji (*sample*) dan susunan individunya di sebut komponen (*components*) atau

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

yang terlarut (*solutes*). Sample, dalam bentuk larutan, diaplikasikan berupa spot pada lempeng KLT. Lempengsn terdiri dari bahanan dasar padat, seperti gelas, plastic atau alumunium yang dilapisi dengan suatu lapisan adsorbent atau biasa disebut fase diam (*stationary phase*), yang khusus dipilih untuk memberikan efek pada pemisahannya. Sekarang ini sudah banyak dijual lempengan KLT yang siap untuk dipakai untuk tujuan pemisiahan.

Lempengan yang sudah diberi spot-spot kemudian disimpan dalam sebuah *tank* yang berisi pelarut (*eluting solvent*) atau fase gerak (*gerake phase*) yang akan bergerak pada permukaan KLT. Solute harus diaplikasikan pada jarak yang sudah ditentukan jaraknya dari bawah lempeng KLT, yang biasa disebut batas awal (*origin*), seperti terlihat pada Gambar 2.2



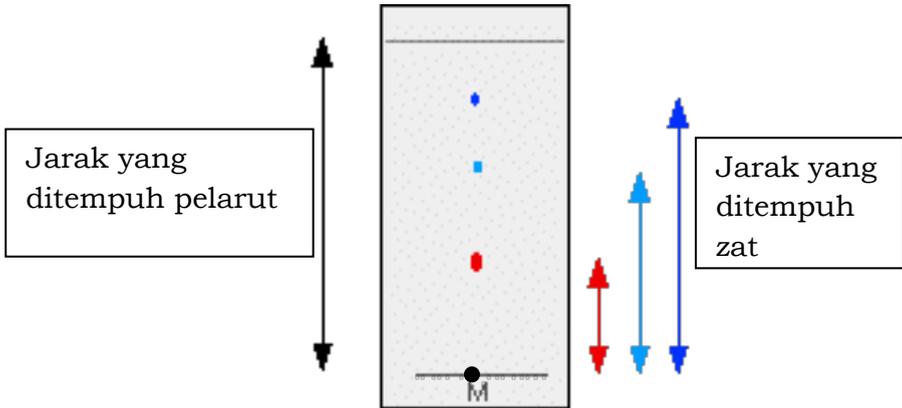
Gambar 2.2 Contoh Pemisahan campuran

Setelah pemisahan, campuran terbagi menjadi dua komponen penyusun dan keduanya diidentifikasi dengan mnengeringkan plat dari tank (chamber), membiarkan pelarutnya kering dan untuk sample

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

khusus, plat ditempatkan dalam larutan iodine agar spot-spot memberikan warna.

Jarak yang ditempuh spot-spot pada permukaan plat diukur dan dengan menggunakan persamaan dapat dihitung besarnya nilai R_f , sebagai berikut:



$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

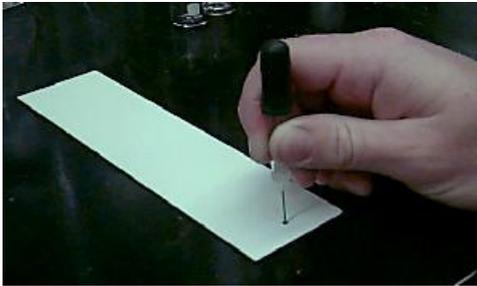
Gambar 2.3 Cara pengukuran nilai R_f

Hal ini dimulai dengan campuran senyawa yang awalnya dibuatkan spot sebagai titik awal, dengan bantuan fase bergerak spot mengalami pemisahan dan masing-masing komponen bergerak sendiri-sendiri.

Cara pembuatan spot sample pada lempeng TLC, seperti pada gambar 2.4

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Pembuatan spot TLC
dengan sampel uji



Menyimpan plat TLC
dalam pelarut



Gambar 2.4 Cara melakukan teknik kromatografi lapis tipis

Dari rumus R_f tersebut terlihat jelas bahwa nilai R_f sangat berbeda, hal ini penting untuk melihat apa yang terjadi pada system. Hal ini disebabkan sample yang merupakan campuran senyawa yang awalnya dibuatkan spot sebagai titik awal, dengan bantuan fase bergerak spot mengalami pemisahan dan masing-masing komponen bergerak.

III. Fase Diam (Stationary Phase)

3.1 Adsorbent

Lapisan padat pada sebuah lempengan tidak berpori (non-porous) di dalam KLT biasanya disebut dengan adsorbent, meskipun fase diam yang lain mungkin bisa juga digunakan dalam KLT yang tidak melibatkan adsorpsi sebagai mekanisme primer atau hanya merupakan mekanisme sorpsi. Sifat dan keadaan adsorbent sangat krusial atau penting dalam teknik ini

Kita mungkin bertanya pada diri kita sendiri, mengapa Adsorbent dan bukan Adsorpsi, dan itu penting untuk membedakan dua proses adsorpsi dan adsorpsi pada tahap ini.

Absorpsi merujuk kepada proses dimana suatu solute atau zat diserap atau ditahan/diikat oleh zat lain. Misalnya suatu spon menghisap/ menyerap air. Bagaimana dengan adsorpsi? Proses yang kita akan bahas. Disini ada beberapa contoh:

Arang (batubara) yang berasal dari fosil binatang merupakan adsorbent yang digunakan dalam Laboratorium Kimia Organik untuk membuang pewarna dari produk/hasil reaksi sebelum rekristalisasi dalam proses pemurnian.

Arang digunakan sebagai maskergas selama perang Dunia Kedua (PD II), dengan harapan bahwa gas

beracun akan terserap pada permukaan arang. Sehingga gas beracun tersebut dapat dibuang dari udara sebelum terhisap. Arang dapat juga digunakan untuk membuang gas klorin yang berlebihan dari air yang akan dimurnikan dengan proses klorinasi.

Adsorpsi adalah kemampuan dari suatu padatan untuk menangkap molekul-molekul lain ke permukaan dan menahannya pada permukaannya. Sehingga arang dapat menyerap warna gas-gas beracun dan klor

Adsorben bukan merupakan suatu kelompok bahan kimia tertentu tetapi mereka hadir dalam berbagai variasi struktur kimia yang menyatakan bahwa adsorpsi mungkin lebih merupakan suatu proses fisika dibandingkan proses kimia. Sebagaimana diketahui bahwa penting sekali di dalam KLT untuk melepaskan bahan yang terserap, dan harus dicatat bahwa tidak ada reaksi kimia yang terjadi antara adsorbent dengan zat yang teradsorpsi.

Meskipun demikian, adsorben tidak memiliki partikel seperti bola bilyard yang tipis dan sebagai gambaran yang lebih baik bahwa mereka memiliki permukaan berpori. Permukaan bagian dalam pori-pori mengembangkan area bidang permukaan adsorpsi tambahan. Suatu penampang melintang partikel silica kadang-kadang bisa tergambar yang menunjukkan struktur hubungan antar pori.

Keaktifan suatu adsorbent ditentukan oleh area permukaannya, sifat kimianya dan susunan

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

geometrical atom-atom yang menyusun permukaannya. Ratusan material telah digunakan sebagai adsorbent, bahkan penemu kromatografi kolom, TSWETT, telah menggunakan hampir 100 macam adsorbent. Beberapa contoh pilihan adsorbent seperti tercantum dalam table 2.1c berikut:

Table 3.1 Daftar pilihan adsorbent

LEMAH	SEDANG (MEDIUM)	KUAT
Sukrosa Kanji (starch) Inulin Talc Natrium Karbonat	Kalsium Karbonat Kalsium Posfat Magnesium Posfat Magnesia Kalsium Hidroksida	Magnesium Silikat aktif Alumina aktif Arang aktif Pengisi Tanah Silika gel

Area permukaan dari suatu adsorbent sedang sekitar 10-15 meter per gram, sedangkan suatu adsorbent yang kuat memiliki area 100-500 meter per gram

Berikut ini adalah beberapa situasi dimana seorang analis mungkin menemukan sendiri hal-hal berikut:

(1) Seorang peneliti mencoba untuk menganalisa larutan ion kalium, natrium dan kalsium dengan KLT. Ia memutuskan mencoba sukrosa (gula) sebagai adsorbent dengan larutan asam klorida (HCl) sebagai eluent.

- Dapatkah kita melihat kekurangan dalam system ini?

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

- Sukrosa atau gula adalah larut dalam air, sehingga dapat larut dalam system ini.

Jadi secara umum, bahan adsorbent tidak boleh larut di dalam pelarut kromatografi

(2) Selama proses pemisahan steroid pada dasar alumina dengan suatu pelarut aseton, seorang peneliti menaruh 10 mg campuran steroid dan berakhir dengan 15 mg?

Secara jelas kita tidak dapat menciptakan bahan sehingga kita harus berakhir dengan steroid tidak lebih dari 10 mg. bagaimanapun, dengan kehadiran alumina sebagai dasar, reaksi berikut dapat terjadi:

Penambahan dari produk ini biasa disebut diaseton alcohol.

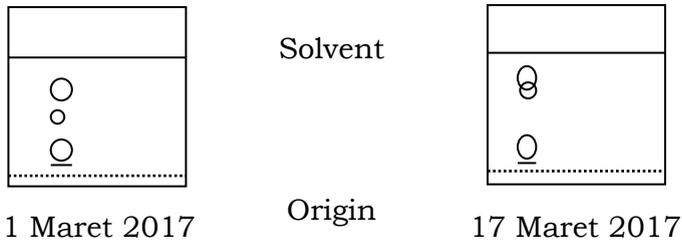
Secara Umum bahan adsorbent tidak boleh bereaksi dengan pelarut. Dalam kasus diatas, menyebabkan dimerisasi pelarut.

(3) Jika seorang peneliti mencoba untuk memisahkan alkyl ethanoat dari keton pada fase diam silica gel asam, memperoleh tiga spot pada lempengan KLT. Dua spot berhubungan dengan alkyl ethanoat dan keton yang tidak berubah. Spot yang ketiga teridentifikasi sebagai produk hydrolysis ethanoat, seperti contoh alcohol yang dibentuk oleh adsorbent asam.

Jadi secara umum, adsorbent tidak boleh bereaksi dengan solute selama pemisahan.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

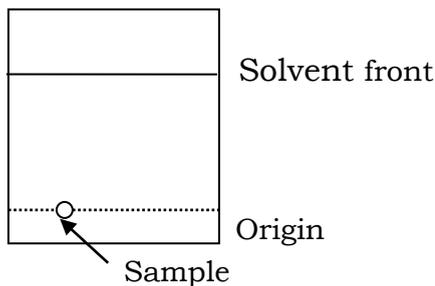
- (4) Seorang peneliti memperoleh hasil sebagai berikut, jika ia memisahkan suatu campuran yang terdiri dari 3 komponen pada 2 lempeng silica gel, dimana salah satunya sudah ia siapkan sejak 2 minggu secara terpisah.



Gambar 3.1 Pemisahan KLT pada Lempeng yang disiapkan 2 minggu secara terpisah

terlihat jelas dari kedua lempengan KLT, bahwa si peneliti tidak dapat mengandalkan hasil pada pemisahan yang ia dapatkan/ia peroleh. Jadi secara umum, suatu adsorbent harus memberikan hasil yang yang dapat direproduksi lagi. Jadi harus memberikan hasil yang (hampir) sama.

- (5) Seorang peneliti mencoba kromatografi suatu terpen alcohol pada silica gel yang sudah ia aktifkan dengan pemanasan hingga 230 °C. ia memperoleh suatu lempeng KLT yang terlihat seperti berikut:



Gambar 3.2 Lempengan KLT setelah pemanasan hingga 230 °C

Ini adalah suatu contoh dimana kekuatan (gaya) fisik yang menahan terpen hingga ke permukaan terlalu kuat.

Jadi secara umum, proses adsorpsi harus bisa mereversibel. Dan terakhir, adsorbent harus cukup ekonomis (tidak mahal).

Sekarang kita lihat 3 macam adsorben yang biasa digunakan:

a. Silika Gel

Silika gel adalah adsorbent yang sangat populer dan disiapkan melalui hydrolysis natrium silikat yang diikuti oleh kondensasi dan polimerisasi lanjutan. Strukturnya digambarkan sebagai berikut:

Keaktifan silica gel disebabkan oleh gugus Si-OH (silanol) pada permukaan. Pihak pembuat silica gel mengontrol keaktifannya pada tahap pemanasan pada persiapan. Jika menggunakan KLT, maka ukuran partikel silica gel harus memiliki rata-rata diameter pada kisaran 5 – 10 mikrometer.

Pada beberapa produk digunakan istilah-istilah berikut untuk menggambarkan macam-macam type silica gel:

- Silika gel G : dengan binder 13 % kalsium sulfat
- Silika gel H : tanpa binder
- Silika gel F2 : dengan indicator fluorescens
- Silika gel UV 254 : dengan indicator fluorescens

Di alam silica gel merupakan asam lemah, dan kita dapat menggunakannya untuk membedakan steroid,

asam amino, alcohol, hydrocarbon, lipid (lemak), aflatoxin, asam bile, vitamin dan alkaloid

b. Alumina

Keaktifan silica gel tergantung pada jumlah gugus Si-OH pada permukaan. Untuk alumina (aluminium oxide), keaktifannya tergantung kepada atom oksigen dan atom aluminium, dan metode/cara menghasilkannya berdasarkan pada kondensasi aluminium hydroxide terhidrat

Alumina dapat dibuat dengan 3 derajat keasaman permukaan, yaitu asam – netral – basa, dan adsorbennya dapat diperoleh dengan atau tanpa binder. Alumina basa adalah yang paling populer dari ketiganya. Adsorbent alumina dapat digunakan untuk memisahkan sterol, bahan pewarna, vitamin dan alkaloid.

c. Selulosa

Kita mungkin merasa bahwa sangat penting untuk membuat lempengan KLT yang dilapisi dengan selulosa jika kertas dapat digunakan dengan mudah. Dalam kertas, serat-serat meninggalkan gap-gap sehingga pelarut eluent mengalir sepanjang serat-serat dan mengisi gap-gap dengan larutan stagnan. Solute berdifusi melalui genangan-genangan cairan ini dan oleh karenanya spot cenderung untuk mendapatkan "lebih" elusi yang berlebih. Lempeng KLT selulosa terbuat dari partikel-partikel kecil selulosa, semuanya memiliki ukuran yang sama, sehingga aliran pelarut lebih stabil dan spot tidak menyebar sebagaimana kebanyakan KLT.

Selulosa digunakan untuk memisahkan senyawa hidrofil seperti gula, asam amino, ion anorganik yang terlarut dan asam nukleat, yang akan mengikat sangat kuat kepada alumina atau silika.

Selanjutnya kita akan melihat bahwa dengan selulosa mekanisme sorpsi adalah merupakan 'partisi perdominan' dimana selulosa bertindak sebagai suatu support (pendukung) bagi air yang mengabsorpsi pada permukaan.

3.2 Persiapan Lempengan KLT

Seperti dijelaskan dalam Bab 1.2 dimana dapat kita katakan bahwa adsorbent merupakan suatu bentuk lapisan pada suatu lempengan/lapisan kaca, plastic atau aluminium.

3.2.1 Perlakuan Pendahuluan (Pre-treatment)

Sebelum kita mengaplikasikan adsorbent, lempengan kaca harus dicuci dalam air sabun, kemudian bilas dengan air bersih dan terakhir dengan aseton untuk mengeringkan langsung kaca tersebut.

Sentukan pada gelas setelah kering akan meninggalkan sidik jari pada permukaan yang akan mencegah/menghalangi adsorbent dari adhering (pengikatan).

3.2.2 Ketebalan Lapisan

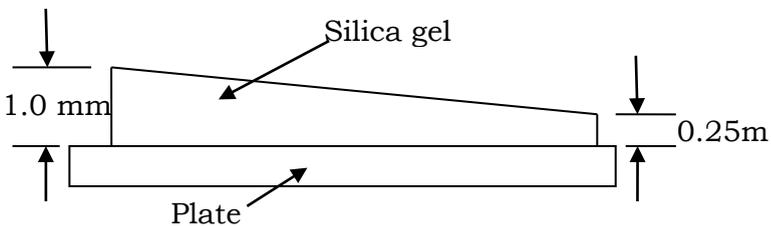
Untuk penggunaan yang sangat kualitatif, KLT memerlukan suatu ketebalan sekita 0,25 mm dengan ketebalan seseragam mungkin. Jika kita mengharapkan untuk menaruh sejumlah besar sample

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

(2 – 20 mg) keatas lembaran tadi agar kita bisa mengisolasi spot-spot pemisahan (biasa disebut preparative KLT), maka kita perlu untuk memiliki lapisan-lapisan yang lebih tebal antara 0,50 – 2,0 mm. jika kita menaruh sampel terlalu banyak dalam suatu spot, maka akan terjadi overload (luber) dan batas antar komponen akan saling tumpang tindih (overlap) dengan hasil yang terpisahkan dari spot dan akan saling terkontaminasi dengan komponen lainnya.

Pada bagian awal telah dijelaskan, bahwa lempeng TLC (KLT) memiliki kelebihan utama, yaitu dapat dimodifikasi. Suatu modifikasi yang sering dijumpai, yaitu dimana lapisan silica gel tidak seragam, pada

Gb. 2.2a kita melihat potongan bidang melintang dari suatu lempengan KLT, dimana tebal lapisannya 1,0 mm pada satu sisi lempengan dan berkurang ketebalannya hingga 0,25 mm pada sisi lainnya.



Gambar 3.4 Potongan melintang pada sebuah lempengan KLT yang di modifikasi

Lempengan atau lembaran-lembaran KLT ini sangat berharga bila kita perlu menggunakan kromatografi dalam jumlah besras dari suatu campuran yang kebanyakan dari komponen-komponenya tidak kita perlukan. Lapisan yang lebih tebal member kita

kesempatan untuk menaruh lebih banyak campuran pada spot. Pelarut mengelusi komponen-komponen yang kita inginkan dan akan melewati lempengan tersebut. Komponen-komponen senyawa akan mencapai bagian lapisan yang lebih tipis, dimana ia terpisah lebih efisien. Kita perlu untuk menyesuaikan komposisi pelarut untuk meyakinkan bahwa komponen yang kita inginkan memiliki nilai R_f yang tinggi.

Salah satu contoh adalah situasi yang terjadi pada analisis herbisida, dimana kita mengekstraksi daun dari suatu tumbuhan dengan hexan untuk mengisolasi herbisida dalam jumlah yang sangat kecil. Ekstrak kemungkinan mengandung komponen-komponen tambahan lain selain herbisida.

Lapisan setebal 0,25 mm memberikan hasil terbaik untuk sample dengan jumlah sekitar 5 – 25 mikro gram. Untuk mendapatkan 5 mikro gram herbisida pada lempengan, kita dapat mengaplikasikan sedikitnya 1 mg ekstrak. Sampel sejumlah itu akan overload (meluap) pada lapisan setebal 0,25 mm, tetapi akan diterima oleh lapisan yang lebih tebal yaitu 1,0 mm dari lempengan yang dimodifikasi. Berikut akan kita lihat 3 cara melapisi lempengan kaca KLT

3.2.3 Slide Mikroskop

Cara singkat untuk membuat lembaran/lempengan yang murah dan dapat digunakan adalah dengan melapisi dua kaca slide mikroskop dang menggabungkannya pada masing-masing bagian belakangnya dan mencelupkannya kedalam sebuah gelas beaker yang berisi larutan silica dalam dikloro methan. Setelah kedua slide tersebut dikeluarkan dari

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

gelas beaker, dikloromethan akan menguap dan kita akan mendapatkan 2 slide yang sudah terlapisi pada masing-masing satu sisinya.

-Dari metode ini dapatkah kita melihat adanya kerugian / kekurangannya?

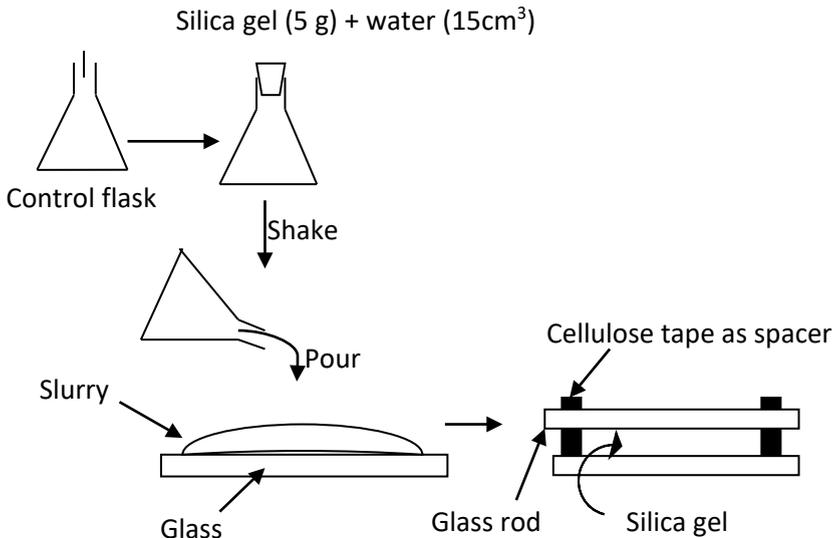
*Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: silica gel cenderung untuk mengendap dengan cepat pada pelarut organic. Oleh sebab itu, gelas beaker dan larutannya perlu diaduk setiap kali sebelum digunakan, untuk meyakinkan bahwa kita memiliki suspense yang seragam (merata).

Lempengan KLT pendek ini dapat digunakan tanpa pengaktifan dan lempengan ini sangat populer untuk pengamatan yang cepat pada reaksi campuran. Hal ini disebabkan terutama karena lempengan ini lebih murah dibandingkan dengan lempengan konvensional yang berukuran 20 x 5 cm, yang biasanya menggunakan lebih sedikit silica gel.

3.2.4 Lempengan (Plat 20 x 20 cm)

Untuk membuat suatu lempengan kita mencampur 5 g silica gel dengan 15 cm³ air dalam labu conical (Erlenmeyer) yang dilengkapi dengan penutup yang pas. Campuran ini kemudian digoncang (dikocok_ dengan tangan tinggi membentuk suatu dispresi yang halus. Selain itu kita harus yakinkan bahwa hal ini tercapai hanya dalam 60 detik, setelah waktu itu kita tumpahkan suspense ke atas plat (lempengan), seperti terlihat pada Gb. 2.2b dibawah ini.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana



Gambar 3.5 Cara menyiapkan plat (lempengan) 20 x 20 cm

■ Kenapa larutan suspensi harus ditumpahkan/disebarkan setelah 60 detik?

■ Hal ini bisa dijelaskan bahwa waktu pendek ini penting karena binder cenderung untuk membuat silica gel akan mengeras dengan cepat sehingga tidak akan menyebar lagi setelah lewat beberapa menit.

Untuk membentuk lapisan kita gunakan peralatan sederhana, kita sebarkan suspensi tadi diatas lempengan kaca dengan sebuah batang gelas (spatula), yang memiliki 2 strip pita selulosa di kedua bagian ujung batangnya, yang akan bertindak sebagai pembatas, diatas permukaan plat.

Ketebalan lapisan ditentukan oleh ketebalan pita selulosa 0,25 mm sebagai ketebalan normal (standard) untuk penisahan secara kualitatif (Gb. 2.2b).

Metode ini cocok juga untuk melapisi 5 plat (lempengan 20 x 20 cm) sekaligus dalam waktu yang bersamaan. Sebanyak 30 g silica gel dilarutkan dengan 65 cm³ air dan kemudian di sebarakan melewati reservoir pada sebuah system spreading komersial.

Salah satu jenis ini (Gb. 2.2c) merupakan suatu alat untuk menyebarkan suspense silica gel. Kita menggerakkan/melewatkan lempengan kaca dibawah alat tsb. Dan dari alat tadi keluar suspense yang mengalir untuk memberikan lapisan dengan ketebalan yang sesuai.

Jenis kedua dari peralatan spreading adalah dari sebuah 'bak' plastic. Lempengan kaca ditahan oleh sebuah templat plastik. Bak plastik tersebut berbentuk empat persegi panjang.

3.2.5 Pengaktifan

Lempengan dikering udarakan selama 15 menit, setelah itu lempengan dikeringkan dalam ovan dongan suhu 110 °C. pengeringan lanjutan pada temperatur 110 °C selama 30 menit akan menghasilkan silica gel aktif yang memuaskan (baik). Pemanasan plat hingga temperatur yang lebih tinggi juga mungkin terjadi, misalnya hingga suhu 200 °C dengan waktu yang lebih lama hingga 4 jam, untuk menghasilkan silica gel aktif yang lebih ringan. Secara umum, sudah terbukti bahwa pemanasan dengan temperatur 110 °C selama 30 menit memberikan hasil yang memuaskan sebagai hasil kompromi antara keaktifan dan waktu yang diperlukan untuk mempersiapkan plat.

TLC dalam tahap ini, seperti juga seluruh tahapan proses, sangat penting untuk menjaga temperatur dan waktu yang konstan. Jadi jangan melakukan satu proses pada temperatur 110 °C sedangkan yang lainnya dilakukan pada temperatur 200 °C.

3.2.6 Penyimpanan

Jika waktu pengeringan/pengaktifan telah berlangsung selama 30 menit, maka plat harus ditransfer (dipindahkan) dari dalam oven ke dalam desiccators. Satu hal yang kadang-kadang sering terlupakan adalah bahwa silica gel akan mengalami de-aktivasi dengan cepat yang disebabkan oleh pengaruh kelembaban udara. Meski demikian, plat komersial bekerja dengan sempurna tanpa pengeringan dan penyimpanan.

Pernahkah anda menggunakan silica gel biru di rumah untuk menjaga jendela double glass kondensasi? Jika pernah, anda akan tahu bahwa silica gel memerlukan reaktivasi sangat cepat pada saat musim dingin (winter). Sebuah plat silica gel aktif akan kehilangan 50 % kereaktifannya dalam 3 menit jika ia ditempatkan dalam atmosfer dengan kelembaban relatif (RH) 50 %. Sehingga penanganan plat dan aplikasi campuran ke atas silica gel harus dilakukan di dalam sebuah ruangan yang kelembabannya tetap.

3.3 Adsorbent yang dimodifikasi

Seperti telah diuraikan sebelumnya, bahwa salah satu keuntungan dari KLT adalah bahwa ia dapat dimodifikasi dengan mudah, seperti plat (lempengan) yang menyusun perak nitrat hingga silica gel dapat

dibuat dari air yang mengandung 3,0 g perak nitrat. Apabila plat sudah dikeringkan, kita memiliki sebuah lapisan yang mengandung ion-ion perak. Ini akan berinteraksi dengan ikatan- π dari molekul-molekul yang tidak jenuh. Semakin banyak ikatan- π dalam molekul yang dihasilkan, maka semakin kuat ia akan berkaitan dengan ion-ion perak dalam adsorbent. Sehingga hal itu memungkinkan untuk memisahkan senyawa-senyawa sesuai dengan jumlah ikatan rangkapnya, seperti contoh dari seri: mono-, di- dan trialkena. Asam borat pada silica gel dapat disiapkan dengan cara yang sama dengan melarutkan silica gel dalam larutan yang berisi asam Borat. Adsorbent modifikasi ini sangat berguna untuk pemisahan senyawa diols dan triols.

3.4 Plat pra-lapisan komersial

Saat ini semakin banyak laboratorium yang lebih suka untuk membeli plat KLT yang sudah siap. Hal ini dikarenakan persiapan plat memerlukan banyak waktu dan peralatannya pun cukup mahal.

Lebih dari itu, perusahaan sekarang menyediakan plate pre-coated yang sangat bervariasi, dan produknya biasanya lebih konsisten dari yang di buat di laboratorium.

Adsorbent dapat tersedia dengan lapisan gelas (yang lebih tipis dari yang digunakan pada plat yang disiapkan di Lab.), aluminium atau pun plastik (biasanya polyethylene terephthalat). Pilihan-pilihan biasanya 'dengan binder' (G) atau 'tanpa binder' (H) dan indicator fluorescen (F atau F254) atau tanpa

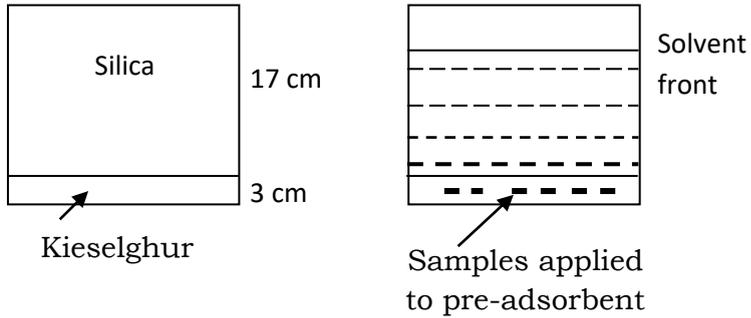
fluorescens. Yang memiliki kode 254 menunjukkan bahwa fluorescens yang maksimum akan teramati pada suatu jerapan panjang gelombang 254 nm.

Kita dapat membeli plat dengan perbedaan ketebalan lapisan seperti 0,25mm, 0,5 mm, 1,0 mm dan 2,0 mm. tetapi ketebalan 0,25 mm paling banyak digunakan.

Setiap perusahaan akan mengklaim memiliki produk standard, seperti lapisan yang homogen, ketebalan lapisan yang seragam, adsorben dengan kepadatan tinggi, lapisan dengan adherent yang sesuai dan karakteristik kromatografi yang konsisten. Sehingga pilihan dan efisiensi dapat sangat bervariasi.

Plat berlapis yang sudah siap ini dapat menunjukkan beberapa keuntungan. Yang diakui untuk plat yang disiapkan sendiri, umumnya bahwa mereka dapat dengan mudah dimodifikasi. Satu perusahaan menyuplai plat dengan suatu strip kieselguhr selebar 3 cm yang menempel sepanjang salah satu sisinya, sisinya 17 cm merupakan lapisan silica gel. Adsorben kieselguhr ini mengijinkan solute sampel dapat di aplikasikan tanpa memerhatikan jumlah minimum sampel yang diperoleh oleh plat normal. Adsorpsi yang sangat kecil terjadi pada lapisan kieselguhr, sehingga larutan eluen membasuh seluruh komponen pada permukaan silica gel sebagai pita kompak.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana



Gambar 3.6 Plat dengan lapisan pra-adsorben

Adsorben pra-lapisan dapat dimodifikasi dalam pembuatannya sehingga perak nitrat/lempengan silica sebagai contoh, tersedia komersial. Sebagai alternative, beberapa peneliti lebih suka untuk membeli plat silica gel dan kemudian melapisi lapisan adsorben dengan mencelupkannya ke dalam baki yang berisi campuran ethanol : 20% (w/v) perak nitrat dalam air (1:1). Setelah 30 detik, plat diangkat dan kelebihan perak nitrat dilap dengan kertas tissue lembut ke atas permukaannya. Selanjutnya diaktifkan dengan pemanasan 70 °C selama 15 menit sampai 20 menit

IV. Fase Gerak (Mobile Phase)

Tiga komponen dasar dari suatu system kromatografi adalah adsorben, fase gerak dan sampel.

4.1 Sifat-sifat umum yang di perlukan ole fase bergerak (gerake fase)

Berikut ini adalah beberapa sifat yang dimiliki fase gerak yang dapat dipilih sesuai dengan kepentingan:

- Persyaratan pertama dari suatu pelarut yang kan digunakan sebagai suatu gerak fase adalah bahwa ia harus murah! Meskipun demikian bukan berarti murah dan jelek!! Hal ini penting karena kita bekerja di Laboratorium dengan metode dan pengujian yang dilakukan beberapa kali setiap harinya. Bila per hari digunakan ratusan liter pelarut, maka pilihan ini akan sangat bernilai ekonomis.
- Pelarut harus memiliki kemurnian yang tinggi, sehingga disarankan untuk sedapat mungkin menggunakan pelarut dengan grade analar (analitik) yang terbaik. Karena todak akan bagus hasilnya apabila untuk nalisa pemisahan secara kalitatif menggunakan fase gerak dari beberapa

botol pelarut yang berlainan, karena hal ini akan menimbulkan adanya ketidakmurnian pelarut.

- Fase gerak harus yang tidak reaktif terhadap solute atau sampel dan adsorben. Tidaklah bijaksana jika pemisahan asam-asam lemak dengan menggunakan fase gerak yang mengandung NaOH, karena pemisahannya bisa jadi menghasilkan garam dan bukan asam lemak. Suatu fase gerak yang bereaksi dengan adsorben akan dengan jelas membuat interpretasi hasil data menjadi sangat sukar.
- Suatu pelarut dengan titik didih rendah secara umum lebih disukai karena tahap akhir dalam proses kromatografi adalah untuk memindahkan lempengan dari tank dan menguapkan fase gerak. Meskipun demikian jika diperlukan untuk memilih pelarut dengan titik didih yang tinggi dan kita tidak bisa mendapatkan hasil yang memuaskan dengan yang bertitik didih rendah, plat/lempengan dapat dikeringkan dalam sebuah oven.

Sifat-sifat umum yang diperlukan oleh suatu fase gerak, adalah bahwa kita masih memiliki banyak pilihan dari pelarut yang memungkinkan. Sehingga bagaimana sebaiknya kita memilih fase gerak untuk analisa yang khusus.

4.2 Pemilihan Pelarut

Dalam KLT, fase bergerak (fase gerak) memiliki dua tugas penting, yaitu:

- Ia harus memindahkan solute dari adsorben sehingga solute dapat dibawa dalam fase gerak melewati plat/lempengan.
- Ia harus membantu untuk memisahkan suatu campuran solute (sampel), sehingga ia dapat dideposit (disimpan) pada tempat yang berbeda dan dapat diidentifikasi. Ini mengacu kepada pemilihan pelarut.

Efektifitas suatu pelarut dalam memindahkan solute (sampel) dari suatu adsorben disebut dengan *kekuatan eluen*. Pada masa kromatografi adsorpsi dahulu, dikenal suatu daftar pelarut yang dipublikasikan nilai 'eluting powernya' untuk zat-zat yang disorpsi oleh silica gel, yang kini sudah menurun pemakaiannya. Pelarut-pelarut tersebut adalah: air murni, methanol, ethanol, propan, ethyl ethanoat, ethoxyethan, triklorometan, diklorometan, benzene, methylbenzen, trikloroethan, tetraklorometan, sikloheksan, heksana.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Bagan 4.1 Kekuatan eluent dari campuran-campuran biner

Pada Silika:

Methanol : Ethoxyethane	Kekuatan Eluent	Acetonitril : Methanol
0,25 : 99,75	0,40	
0,75 : 99,25	0,45	
1,70 : 98,30	0,50	
3,50 : 96,50	0,55	
8,00 : 92,00	0,60	
18,00 : 82,00	0,65	70,0 : 30,0
42,00 : 58,00	0,70	60,0 : 40,0
100,00 : 0,00	0,73	0,0 : 100,0

Pada Alumina :

2- Kloropropana:Pentana	Kekuatan Eluent	Ethoxyethan : Pentana
8 : 92	0,05	3 : 96
19 : 81	0,10	9 : 91
34 : 66	0,15	15 : 85
52 : 48	0,20	25 : 75
77 : 23	0,25	38 : 63
Dikloromethan : Pentana	Kekuatan Eluent	Ethocyethan : Pentana
13 : 87	0,20	25 : 75
22 : 78	0,25	38 : 62
34 : 66	0,30	55 : 45
54 : 46	0,35	81 : 19

Aturan yang sangat sederhana ini sudah digunakan bertahun-tahun untuk sampel yang tidak diketahui. Kita mulai dengan pelarut yang memiliki polaritas rendah, kemudian kita tambahkan pelarut yang lebih polar, dalam meningkatkan tahapan untuk memberikan kandungan campuran berturut-turut 2, 4, 6, 8, 16 dan 32%. Setiap peningkatan (dalam %) ini akan bersesuaian dengan suatu peningkatan dari kekuatan eluen sekitar 0,05 unit.

Jika diperoleh nilai R_f terlalu tinggi, maka pilihan fase gerak dengan nilai kekuatan eluent rendah. Jika ia terlalu rendah, maka ambil fase gerak yang memiliki nilai kekuatan lebih tinggi. Buatlah penyesuaian yang baik dengan mencampur 2 macam pelarut yang bersesuaian.

Sebagai kesimpulan, sifat kimia dan fisika pelarut menentukan kecocokannya sebagai suatu fase gerak (fase bergerak). Efikasi relative suatu pelarut dapat diamati dengan pengujian posisinya dalam deret eluotropik. Untuk menentukan system pelarut yang terbaik, mulailah dengan memilih pelarut non-polar, kemudian meningkatkan proporsi penambahan pelarut polar tersebut secara bertahap.

4.3 Sampel

Ini adalah komponen ketiga dalam sistem kromatografi. Kita akan menganggap bahwa 2 komponen lainnya itu adalah adsorben dan fase gerak tidak mengalami perubahan. Dapatkah kita menemukan aturan-aturan umum agar komponen

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

sampel akan bergerak jauh pada plat dan memiliki nilai Rf paling kecil?

Kita dapat mengingat 2 konsep sederhana yaitu konsep sederhana tersebut adalah daftar homolog dan efek gugus fungsi. Perbedaan jumlah dan sifat gugus fungsi dapat digunakan untuk menerangkan variasi nilai Rf dari komponen-komponen sampel.

Sauatu studi tentang energy adsorpsi, Q_i^0 , menyatakan bahwa pemilihan senyawa-senyawa yang memungkinkan bisa memprediksi perilaku kromatografik akan dapat dibuat bagan 4.1 merupakan daftar gugus fungsi hingga gugus alifatik R yang sesuai dengan energy adsorpsinya pada silica gel dan alumina. Ini adalah suatu pendekatan dimana senyawa gugus fungsi ini akan dielusi pada lempengan KLT.

Bagan 5.1 Energy adsorpsi pada beberapa gugus fungsi

Gugus	Silika gel Q_i^0	Interaksi	Alumina Q_i^0	Interaksi
R-CH ₃	0,07	Van der Waal	-0,03	Van der Waal
R-CH ₂ -	-0,05	Van der Waal	0,02	Van der Waal
R-C ₁	1,32	Induksi	1,82	Induksi
R-O-R	3,61	Akseptor Proton	3,50	Induksi
R-CHO	4,97	Akseptor Proton	4,73	Induksi
R-NO ₂	5,71	Induksi	5,40	Induksi
R-CO ₂ R	5,27	Akseptor Proton/Induksi	5,00	Induksi
R-COR	5,27	Akseptor Proton/Induksi	5,00	Induksi
R-OH	5,60	Akseptor Proton/Induksi	6,50	Induksi
R-NH ₂	8,00	Akseptor Proton/Induksi	6,24	Induksi
R-CO ₂ H	7,60	Ikatan Hidrogen	21,00	Kemisorpsi
		Ikatan Hidrogen		
		Ikatan Hidrogen		

V. Teknik Praktis dalam Kromatografi Lapis Tipis

5.1. Aplikasi sampel pada plat (pemberian spot)

Sample dalam bentuk larutan dapat diaplikasikan langsung di atas plat (lempengan), tetapi larutan pekat sebanyak 1 hingga 10 mikro liter terlalu kental dan akan banyak meleleh atau terjadi overload di atas plat. Larutan sampel biasanya dicampur dengan larutan pengencer yang sesuai.

Sampel dalam bentuk padat tidak dapat diaplikasikan secara langsung pada plat (lempengan), sampel harus dilarutkan terlebih dahulu dalam suatu pelarut yang sesuai. Kisaran konsentrasi optimum dari larutan berkisar 0,01 hingga 1,00 % (w/v).

Sifat-sifat umum pelarut. Kisaran dari sifat-sifat pelarut yang bisa diterapkan pada pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel dan digunakan sebagai fase gerak, adalah sebagai berikut:

Perlu digarisbawahi sifat-sifat yang mungkin kita anggap penting untuk pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel sebelum diaplikasikan ke atas plat.

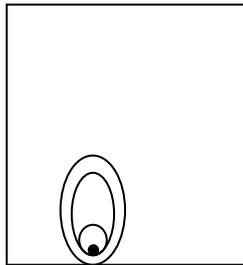
Bisa jadi ada beberapa sifat yang overlap (tumpang tindih), sebagai contoh: adalah sangat penting untuk menggunakan pelarut yang murni akan mengkontaminasi sampel. Pelarut sampel harus bersifat tidak reaktif terhadap adsorbent dan solute (sample). Dalam hal ini harga tidak terlalu penting

dibandingkan dengan kualitas suatu gerake fase. Semakin volatile (mudah menguap) suatu pelarut, akan semakin baik, seperti bila kita mengaplikasikan spot-spot sampel pada plat, maka pelarutnya harus cepat menguap, dan juga harus dapat membuat spot yang seragam. Penambahan larutan yang berlebih pada spot tanpa member kesempatan kepada pelarut untuk menguap, akan menyebabkan pembesaran spot. Dalam hal ini sangat penting untuk mengeringkan pelarut sebelum memasukkan plat ke dalam chamber KLT.

Pemilihan Pelarut

Harus diingat bahwa sifat- sifat diatas, adalah bagaimana kita memilih pelarut terbaik yang dapat melarutkan sampel yang akan kita deteksi.

Jika siatu spot larutan ditempatkan pada permukaan suatu adsorben, molekul pelarut akan berlomba dengan sampel untuk tetap aktif pada permukaan adsorben. Jika molekul pelarut bereaksi dengan kuat dengan tempat aktif, maka molekul sampel bergerak keluar atau ke samping dari spot. Dan hasilnya diperoleh pada pengeringan seperti ditunjukkan pada gambar 5.1a berikut:



Gambar 5.1a. Efek dari pemberian spot dengan menggunakan pelarut polar

Banyaknya sampel yang digunakan

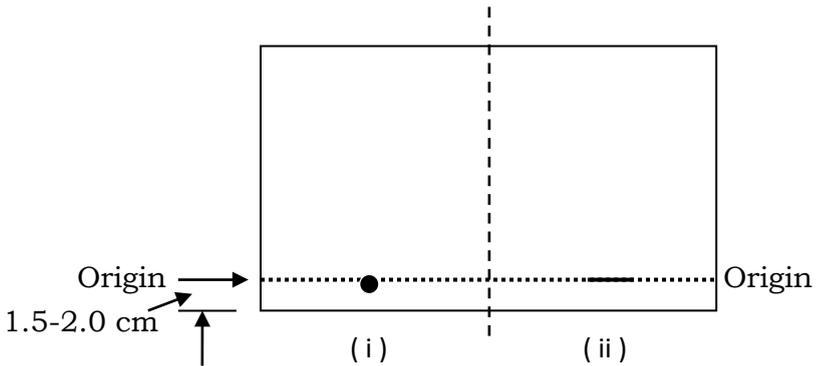
Larutan sampel harus dibuat sedemikian rupa sehingga secara umum, untuk adsorben dengan ketebalan 0,25 mm, jika buat spot 10 mikro liter larutan sampel diatas plat, maka total sampel yang tertampung 1 hingga 50 mikro gram. Dengan adsorben yang lebih tebal kita dapat menggunakan sampel lebih banyak. Dan di dalam beberapa kasus dimana kita memiliki metode yang sangat peka, untuk mendeteksi sampel kita dapat menggunakan lebih sedikit sampel.

Karena kesulitan dalam penimbangan dalam jumlah kecil, lebih baik untuk memulai dengan suatu larutan sekurang-kurangnya 2mg per cm³. Dengan membuat satu atau lebih pengenceran akan memungkinkan untuk dapat mengurangi konsentrasi larutan sampel kedalam kisaran 0,1 hingga 500 mikoliter per cm³.

Pembuatan spot sampel pada lempengan KLT

Pekerjaan ini lebih mudah dimana lapisan adsorben sudah tersamuk pada plat (lihat Bab. 2.4). gambaran dibawah diterapkan kepada plat ranpa lapisan pra-adsorben. Sampel harus di buat spot (noktah) pada satu tempat dan harus memiliki diameter sekecil mungkin (Gb. 5.1b.(i)).

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana



Gambar 5. 1b. Pembuatan spot sampel pada lempeng (plat) KLT

Sekarang bagaimana menjamin penyebaran spot tidak akan terjadi ?

Cara terbaik untuk menjamin bahwa penyebaran spot minimum adalah dengan mengaktifkan pengeringan antara aplikasi-aplikasi pada plat sehingga dapat membuang pelarut.

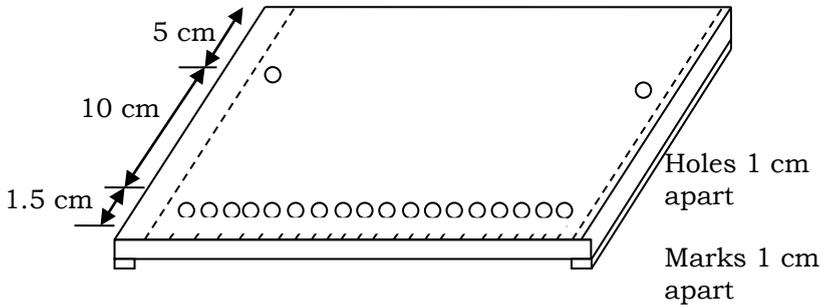
Sebagai alternatif, sampel dapat diletakkan pada plat seperti membentuk suatu strip (Gb.5.1b(ii)).

Aplikasi dapat dibuat dengan sebuah mikro pipet kapiler, yang mudah untuk diisi dan terkalibrasi dengan baik dan teliti misalnya pipet berukuran 1, 2, 5, atau 10 mikro. Suatu pipet berupa syringe dengan volume 0,1 hingga 50 mikro dapat juga digunakan.

Suatu templat spot yang terbuat dari bahan plastik dapat membantu untuk menjamin bahwa spot dapat melewati plat. Templat ini terdiri dari bermacam-macam design; dibawah ini di sajikan suatu contoh

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

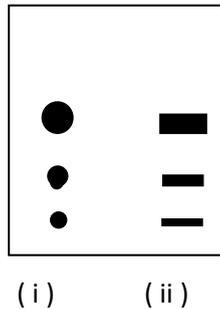
templat yang mengcover plat TLC, sampel di suntikkan lewat lubang-lubang pada templat tsb.



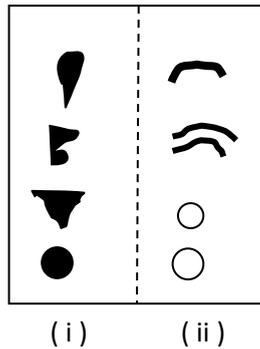
Gb. 5.1c. templat plastik

Tindakan-tindakan pencegahan

Adalah penting untuk tidak menorah lapisan apabila larutan sampel diaplikasikan, seperti memberikan tanda-tanda, karena akan menyebabkan fase gerak (gerak) akan mengelusi dengan tidak merata dan spot akan mengalami distorsi



Gb.5.1d. sebuah plat TLC dengan teknik pembuatan spot yang memuaskan



Gb. 5.1e. Sebuah plat TLC dengan teknik pembuatan spot yang tidak memuaskan

Dalam Gambar 5.1d (i) dan (ii) adalah contoh-contoh plat yang telah yang telah di beri spot dengan baik setelah dielusi, sementara (i) dan (ii) dalam Gambar 5.1e menunjukkan:

- (i) Pengaruh penggunaan sampel yang terlalu banyak, seperti sampel terlalu pekat. Efek tersebut disebut “mengekor”,
- (ii) Efek dari pemberian sampel tanpa pengeringan pelarut pada selang antara pemberian masing-masing spot, sehingga muncul cincin sampel.

Resolusi dan ukuran spot

Dalam suatu system KLT, resolusi dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$R_s = \frac{X}{0,5 (d_1 + d_2)}$$

Dimana:

X: jarak antara pusat dua spot

d1 dan d2: rata-rata diameter spot

Komponen-komponen terpisah jika $R_s = 1$.

Sehingga resolusi dapat dikembangkan oleh peningkatan nilai X atau penurunan rata-rata diameter spot. Ini adalah faktor kedua yang penting dan resolusi dapat di kembangkan jika sedikit tahan ditaruh di atas plat. Kepekaan metode deteksi kemudian menjadi faktor penting dalam penentuan yang paling mungkin.

5.2 Pengembangan kromatogram

Sebuah plat KLT yang dilapisi dengan adsorben, diaktifkan dan dimuati sampel seperti dijelaskan pada bagian awal tulisan ini. Kini saatnya plat (lempengan) di bawa ke dalam fase bergerak dalam tank (chamber) yang sesuai (atau pada gelas silinder untuk plat yang kurang lebar).

Sebuah tank yang cukup besar untuk diisi plat yang sudah disiapkan, dipilih dan dibersihkan dan dilapisi dengan kertas saring pada kedua dinidng sisi panjangnya. Fase bergerak ditambahkan hingga mencapai suatu kedalaman sekitar 0,5 hingga 1,0 cm, dan agar tank jenuh dengan uap pelarut, maka tank harus digoyang untuk membiarkan atmosfirnya mencapai keseimbangan.

Seorang peneliti merasa bahwa ia dapat mempercepat proses penjenuhan dengan penambahan kedalaman fase bergerak hingga

5,0 cm. sedangkan kromatogramnya tidak dikembangkan dan ia harus melihat lagi pada tekniknya untuk menemukan alasan. Dapatkan kita melihat problemnya?

*Suatu fase bergerak dengan kedalaman 5,0 cm dapat mengcover (merendam) spot sampel awal sehingga spot-spot dapat mengalami difusi oleh pelarut di dalam tank. Sehingga sangat penting bahwa batas pelarut harus berada dibawah spot awal.

Plat (lempeng) berlapis

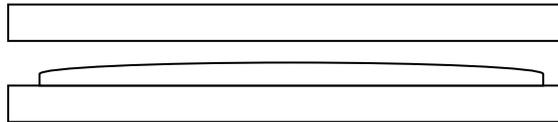
Untuk meminimalkan volume pelingkupan volume dan meningkatkan kejenuhan udara di atas plat, sebuah tank atau chamber berlapis terdiri dari plat gelas yang lapisan keduanya dapat digunakan pada bagian atas KLT untuk untuk dimuati. Plat ditahan oleh suatu klem atau pita karet. Hati-hati ketika menaruhnya jangan merusak lapisan adsorben suatu pemisah dari bahan plastik atau metal digunakan untuk menjaga pemisahan dua lempengan gelas.

Banyak pengembangan (perendaman plat dalam tank) dilakukan dengan mengangkat kromatografi, misalnya pelarut di biarkan untuk mengalir di atas plat lewat aksi kapiler. Karena plat harus bergerak melawan gaya gravitasi, maka laju pergerakan pelarut pada plat KLT menjadi lebih lambat pada plat yang lebih besar.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Dapatkah kita berfikir dari situasi dimana pelarut tidak harus bergerak melawan gaya gravitasi?

*Hal ini bisa dicapai dengan menempatkan plat dalam bidang horizontal. Plat berlapis dapat digunakan dengan cara ini, dimana pelarut ditransfer dari suatu lubang (saluran) menuju ke adsorben, sebagai media biasanya digunakan kertas saring, seperti ditunjukkan pada Gambar 5.2a.



Gambar 5.2a. penggunaan plat berlapis pada bidang horizontal

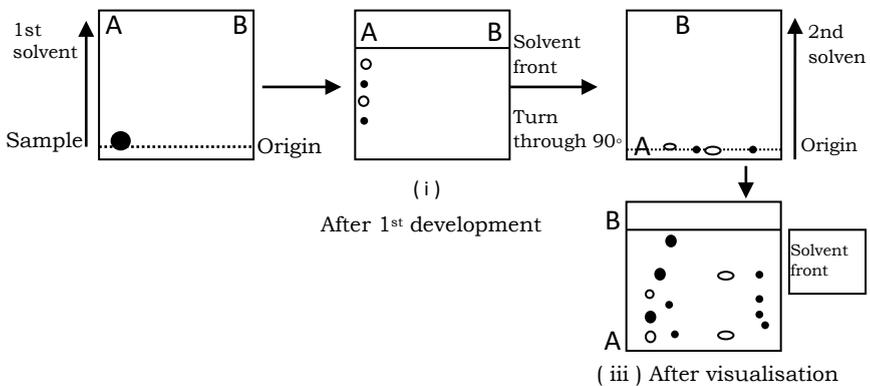
Plat yang berukuran lebih besar (20 x 20 cm) dapat digunakan dengan cara ini dengan komponen-komponen yang sulit untuk dipisahkan

Pengembangan dua Dimensi

Metode ini di pinjam dari prinsip kromatografi kertas dan telah dianggap sangat penting untuk analisis asam amino dan karbohidrat. Sampel diaplikasikan (berupa spot) pada salah satu pojok plat, kurang lebih berjarak 1 cm dari kedua sisinya. Plat di kembangkan dengan cara biasa sekitar 15 menit dalam fase gerak pertama. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.2b. Plat diambil dari tank pengembang dan kemudian di

keringkan. Jika plat ini dilihat secara visualisasi akan terlihat seperti pada Gambar 5.2b(I). tetapi pada tahap ini dilihat secara divisualisasi (tidak diamati). Sekarang putar plat 90° dan disimpan dalam tank pengembangan kedua yang berisi fase gerak yang kedua.

Komponen-komponen sudah terpisah oleh pemisahan pertama dan terbentuk garis spot, yang kemudian bertindak sebagai awal (origin) untuk pengembangan yang kedua (Gb. 5.2b (ii)).



Gambar 5.2b. KLT dua dimensi

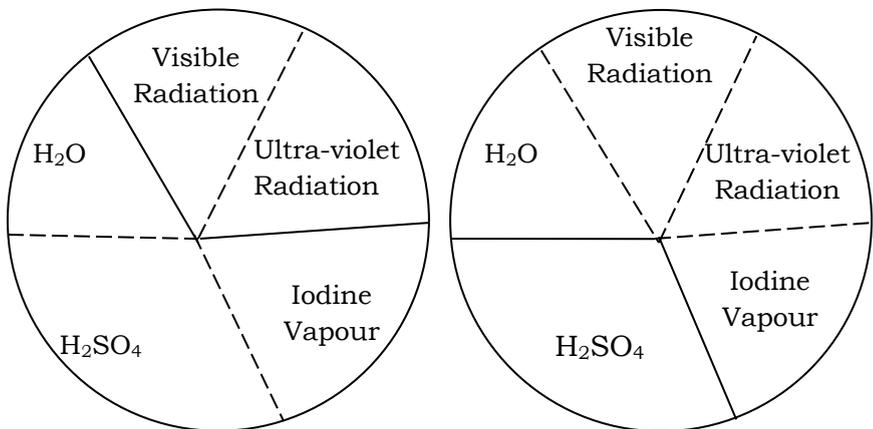
5.3 Visualisasi

Sekali kita pernah memisahkan komponen-komponen campuran, maka kita perlu untuk mampu mengenali dimana spot-spot untuk masing-masing komponen terletak pada plat. Peneliti pendahulu mencoba untuk memisahkan senyawa-senyawa berwarna.

Sayang sekali, sedikit sekali sampel yang kita coba untuk memisahkannya pada masakini yang berwarna. Tetapi seperti halnya suatu aturan umum dari visualisasi kita mengikuti contoh dari peneliti

pendahulu dan mencoba untuk menjaga metode pendeteksian sesederhana mungkin.

Kita dapat mengelompokkan metode visualisasi yang tersedia menjadi dua cara. Hal ini digambarkan dengan dua bagan lingkaran (Gambar 5.3a). Gambar ini mengingatkan kita bahwa sub-divisi tidak terpisah satu sama lain. Contohnya air dapat digunakan baik pada metode destruktif maupun metode non-destruktif.



Gambar 5.3a. metode Visualisasi

Metode Non-destruktif

Radiasi Tampak

Jika kita melihat spot yang berwarna di bawah cahaya tampak, itu artinya kita sedang menggunakan teknik non-destruktif. Sebagai contoh kita menginginkan untuk membuang sebyawa dari lapisan silica gel setelah proses KLT, hal ini tidak dapat diubah dengan teknik aksi visualisasi. Contohnya dari zat-zat

berwarna seperti pigmen tumbuhan, bahan pewarna dan zat pewarna makanan.

Radiasi Ultra Violet

Beberapa senyawa berwarna menyerap radiasi ultraviolet, sehingga kita dapat melihat spot KLT dengan penyinaran lampu UV pada permukaan plat. Spot biasanya terlihat sebagai suatu daerah fluorescens pada latar belakang putih yang diberikan oleh silica gel yang tidak mengandung posfor anorganik (mis: zinc silikat atau sulfide). Jika ada posfor, spot akan menunjukkan spot gelap pada latar belakang yang cerah.

Mengapa radiasi ultraviolet juga termasuk dalam bagian destruktif dari bagan lingkaran (Gb 5.3a)?

*Hal ini disebabkan beberapa senyawa, seperti vitamin-vitamin tertentu, yang mengalami perubahan fotokimia atau mengalami dekomposisi jika terekspos radiasi UV. Contoh-contoh ini sangat banyak memiliki kekecualian, dan ekspos terhadap radiasi ultraviolet adalah yang sangat penting dari teknik non-destruktif yang ada.

Kita bisa melihat preparat KLT yang dapat kita semprot plat-nya setelah pemisahan dengan suatu bahan pewarna seperti 2,7 diklorofluorescen, yang memberikan fasilitas visualisasi dibawah lampu UV.

Uap lodin

Cara visualisasi dengan iodine merupakan metode yang paling sederhana dan sudah biasa dipakai. Sebuah tank KLT tidak diisi dengan pelarut melainkan dengan Kristal iodine pada bagian bawahnya. Pemanasan yang perlahan akan menyebabkan iodine menguap dan mengisi udara dalam tank. Jika plat KLT disimpan dalam uap ini, iodine akan larut dalam solute (sampel) yang tampak sebagai spot coklat dengan intensitas yang bervariasi.

■ Pada pemindahan plat KLT dari uap iodine, garis luar spot harus diberi tanda dengan memberikan skor pada ujung plat. Dari pengetahuan kita mengenai sifat-sifat iodine, dapatkah kita memberikan saran, kenapa?

■ Iodine akan langsung menguap dari spot dan plat akan kembali ke kondisi awal yang berwarna putih, dalam jangka waktu sekitar setengah jam.

Hanya beberapa zat terutama asam lemak yang sangat tidak jenuh, akan bereaksi secara kimia dengan iodine, sehingga produknya setelah visualisasi akan tidak sama dengan asam lemak aslinya. Untuk alasan ini, maka tidaklah bijaksana untuk menggunakan iodine untuk visualisasi suatu pemisahan preparative dimana kita perlu untuk meyakinkan bahwa setelah visualisasi produk yang kita dapatkan tidak akan berubah.

Air

Dengan beberapa bahan lemak atau steroid, penyemprotan dengan air dapat dikategorikan sebagai reagen visualisasi non-destruktif. Plat yang disemprot dijaga daripengaruh cahaya jika senyawa lipofilik muncul sebagai spot putih dengan latar belakang yang tembus cahaya.

Biasanya dengan komponen-komponen ini sangat mungkin untuk melihat spot begitu plat dikeluarkan dari tank sebelum seluruh pelarut menguap dari permukaannya.

Bagan pada Gambar 5.3 menunjukkan bahwa air mungkin menjadi suatu reagen destruktif, karena ester-ester tertentu mungkin terhidrolisa oleh penyemprotan spot-spot tsb. Senyawa- senyawa ini adalah keksualian dari aturan-aturan yang ada.

Method Destraktif

Terdapat daftar pelarut-pelarut (reagen) yang bersifat destruktif (merusak) yang bereaksi dengan komponen sampel pada plat untuk memberikan hasil warna yang dapat dilihat pada daerah tampak.

Kebanyakan dari senyawa organic akan hangus (gosong) jika disemprot dengan asam sulfat pekat 50% dan kemudian bila di panaskan hingga 110 °C. pada plat KLT akan dihasilkan spot berwarna coklat atau hitam yang sering digunakan apabila diperlukan metode kuantitatif.

Sebagai reagen alternatif adalah larutan kalium dikromat 5% dalam asam sulfat 40%. Reagen ini dapat disemprotkan kepada plat KLT yang kemudian dipanaskan hingga 110 °C selama 15 menit.

Tabel 5.3a Agen-agen visualisasi destruktif

Sampel	Pelarut (Reagen)	Prosedur	Hasil
Alcohol	Ammonium Cerik Nitrat	Larutkan reagen (6 g) dalam 100 cm ³ HNO ₃ 4 M Keringkan plat selama 5 min pada suhu 105 °C. dinginkan sebelum penyemprotan	Poli alcohol menunjukkan spot berwarna coklat pada dasar kuning
Alcohol (asam empedu dan steroid)	Vanilin Asam Sulfat	Larutkan 3 g vanillin dalam 100 cm ³ ethanol. Tambahkan 0,5 cm ³ asam sulfat kons, dikocok dengan stirrer. Semprotkan dan panaskan pada suhu 120 °C	Alcohol yang lebih tinggi dan keton memberikan warna spot biru-hijau
Aldehyd dan keton	2,4/dinitro-phenylhydrazine	Larutkan 0,4 g reagent dalam 100 cm ³ HCL 2 M	Spot kuning/merah
Alkaloid	Kobalt (II) thiosianat	Larutkan 3g ammonium thiosianat dan 1 g kobalt (II) klorida di dalam 20 cm ³ air	Spot biru pada dasar putih/pink
Alkalodi (Antihistamin, siklohexylamin, lactam)	Dragendorff (modif. Munir) Modifikasi	Larutkan 1,7g bismuth subnitrat dan 20g asam tartaric dalam 80 cm ³ air – Larutan (a) Larutkan 16g kalium iodide didalam 40 cm ³ air-lar. (b). semprotkan reagen yang disiapkan oleh campuran lar. (a) dan lar (b) dengan volume sama. Ambil 5ml dari larutan ini dan campur dengan larutan dari 10 g asam tartaric dalam 50 cm ³ air.	Macam-macam warna
Asam amino (juga kelompok amina)	Ninhydrin	Larutkan 0,20g ninhidrin dalam 100 cm ³ butan-1-ol- Larutan (a) Larutan asam asetat akuatik 10%- Larutan (b). semprotkan campuran larutan (a) dan (b) (95:5). Panaskan	Spot pink-merah pada latar belakang putih

Amina	Alizarin	pada suhu 100 °C Larutkan 0,10g alizarin dalam 100 cm ³ ethanol	Alipatik amina dan amino alcohol memberikan spot ungu pada latar belakang kuning pucat
Barbiturat	s-Diphenylkarbazon	Larutkan 0,10g s-diphenylkarbazin dalam 100 cm ³ ethanol 95%	Spot ungu
Karbohidrat	p-anisaldehyd	Larutkan 1 cm ³ p-anisaldehyd dan 1 cm ³ H ₂ SO ₄ kons. Dalam 18 cm ³ ethanol. Semprot dan panaskan pada suhu 110 °C.	Gula phenylhidrazon memberikan warna spot hijau-kuning
Asam –asam karboksilat	p-anisidin-asam ptalat	Larutkan 1,23 g p-anisidin dan 1,66g asam ptalat dalam 100 cm ³ methanol	Aldoheksosa hijau, pentose merah-ungu, methylpentosa kuning/hijau, asam uronat coklat
Ester dan amida	Bromocresol hijau	Larutkan 0,04g reagent dalam 100 cm ³ ethanol. Tambahkan NaOH 1M hingga muncul warna biru	Spot kuning pada latar belakang hijau
Lemak	Hydroxylami/Besi nitrat	Larutkan 1g hydroksilamin hydroklorid dalam 9 cm ³ air –lar. (a). larutkan 2g natrium hidroksida dalam 8 cm ³ air-Lar.(b). Larutkan 4g besi nitrat dalam 60 cm ³ air dan 40 cm ³ asam asetat – Lar. (c). semprot dengan campuran satu volume lar. (a) dan satu volume lar.(b). keringkan pada suhu 110 °C selama 10 min. semprot dengan campuran 45 1 cm ³ larutan (c) dan 61 cm ³ HCL kons.	Spot berwarna

Lemak	Rhodamin B	Larutkan 0,05g rhodamin B dalam ethanol-Lar (a) Hydrogen peroksida 3% -Lar. (b) KOH 10 M-Lar.(C). semprot plat dengan larutan (A). amati dengan mata langsung dan dengan pengamatan radiasu UV. Semprot dengan lar. (C) untuk memperjelas warna	Fluorescens merah cerah Trigliserida menghasilkan spot putih cerah pada latar belakang pink-merah
Phospolipid	Rhodamin B	Semprot deng lar. (a) dan kemudian dengan lar. (c).	Phospolipid mengandung cholin memberikan warna oranye
Pestisida	Dragendorff's reagent	Larutan bismuth nitrat 17% dalam asam asetat akuatis 20%-lar.(s). kalium iodide aquatic 40%-lar.(b). Air - lar. (c). semprot dengan lar (a): (b) (c) : 4: 1: 14.	Pestisida berklor memberikan bermacam warna
Phenol	Diphenylamine:zinc	Larut 0,5g diphenylamine dan 0,5g zinc klorida dalam aseton 100 cm ³ . semprot dan panaskan pada 200 °C selama 5 menit .	Organoposfat dan triyain memberikan warna spot hijau
Steroid	Brillian hijau	Larutkan 0,5g brillian hijau dalam 100 cm ³ propanon. Semprot dan plat diekspos pada uap bromine.	Spot bermacam-macam warna pada latar belakang pink
	Ammonium vanadat: anisidin	Jenuhkan air dengan ammonium vanadat-lar. (a). Larutkan 0,5g p-anisidin dalam 2 cm ³ H ₃₂ PO ₄ kons., encerkan dengan 100 cm ³ ethanol kemudian saring-lar. (b). semprot dengan lar. (a), sementara plat masih basah, semprot dengan lar. (b). panaskan pada suhu 80 °C .	Bermacam-macam warna

	Anisaldehyd: Antimony triklorida	Campurkan 1 cm ³ p-anisaldehyd dengan 100 cm ³ antimony klorida jenuh dalam kloroform. Tambahkan 2 cm ³ H ₂ SO ₄ kons. Simpan larutan pada suhu ruangan gelap selama 1,5 jam. Buang lapisan atas campuran reagent dan gunakan untuk menyemprot plat. Keringkan plat srelama 5 min. dalam ruang gelap dan panaskan pada suhu 90 °C selama 3 min. amati dengan kasat mata san sinar UV.	
--	-------------------------------------	--	--

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Tabel 5.3b. Bahan-bahan Fluorescens untuk Metode deteksi Non Destruktif pada Senyawa Lipofilik

Reagent	Aplikasi
Asam 8-anilinonaphthalenesulfonat garam ammonia (reagent ANS)	Asam-asam lemak, lechitin/spingomieli, kolesterol dan ester-esternya, steroid, deterjen, hydrocarbon, prenol, prenylquinon
Berberin	Sterol, senyawa-senyawa organic jenuh
Brilliant hijau	Ester-ester neutral dari asam fosfat, herbisida karbamat
Eosin	Produk-produk kondensasi dari urea, formaldehyde, dan methanol, pestisida dan turunannya, bahan pemanis, aktif-anion dan agen pengaktif permukaan nonionogenik
Flavonoid: Morin Flavonol, fisetin, robinetin Quercetin Rutin	Steroid, pestisida Pestisida Vanadium teroksidasi Derivate uracil
Fluorescein	Derivate paraffin, wax, hydrocarbon, asam-asam alipatik, hydroquinone dan derivate klorinasi, isoprenoid, quoin, fungisida oxathizin, barbiturate, phenothizani
Rhodamin B	Vaselin, diphenyl, polyfenol, asam maleat dan asam fumarat, flavonoid, alcohol sebagai 3,5-dinitrobenzoat, gangliosida, 1-hidroksiklorden, pestisida karbamat, parathion dan hasil metabolismenya, polyethylene dan polypropilen glycol, derivate terpen, menthol
Rhodamin G	Steroid netral
Rhodamin 6G	Hidrokarbon rantai panjang,

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

	squalen, a-amyrin, methyl ester dari asam-asam lemak, glyserida, sterol, isoprenoid, quinon, lipoprotein, glycosphingolipid, lipida fenolik, fosfolipid, peningkatan kepekaan setelah diekspose pada uap iodine
Asam 6-p-Toludino-2-naphthalen sulfonat (regen TNS)	Kolesterol, fosfolipid dan glycolipid, lipida netral
Uranyl asetat	Purin

VI. Analisis Kromatografi Kualitatif dan Kuantitatif

6.1 Nilai Rf yang bisa di reproduksi

■ Jika kita memiliki komponen organik yang tidak di ketahui dalam laboratorium pengujian, kita melihat sampel tersebut berbentuk padat. Ketetapan apa yang akan membantu kita untuk mengidentifikasi sampel tersebut?

■ Titik leleh adalah konstanta yang mungkin pertama kali perlu untuk di perhatikan, dan secara umum titik leleh dan atau titik didih dari zat yang tidak diketahui. Dan titik leleh dari turunannya, bersama-sama dengan sifat- sifat spektroskopis lainnya dapat membantuk dalam pengidentifikasian suatu zat tertentu

Apabila kita memberikan kesan pada perjanjian (komitmen) bahwa KLT berguna hanya untuk memisahkan komponen-komponen dari suatu campuran, kita akan meralatnya sekarang dan menunjukkan bagaimana KLT dapat membantu untuk mengidentifikasi zat-zat yang tidak dikenal. Beberapa peneliti mengkalim bahwa nilai Rf harus di tambahkan kepada pengelompokkan sifat- sifat yang di canangkan

(dijatahkan) untuk senyawa-senyawa organik. Dan jika demikian halnya, beberapa orang yang mengklaim, nilai Rf dapat diukur keakuratannya hingga $\pm 0,05$ kemudian harus memiliki kekuatan untuk di tambahkan kepada daftar yang telah ada.

Sedangkan kebanyakan peneliti tidak memiliki keyakinan dalam pengukuran nilai Rf dan mereka berfikir bahwa nilai itu sebagai “guide” yang dapat digunakan selama disertai referensi standar dan atau dengan warna yang dihasilkan oleh reaksi-reaksi penyemprotan yang spesifik. Kurangnya kepercayaan terhadap nilai Rf ini berasal dari pengakuan bahwa jika suatu senyawa yang sudah dikenal, diuji dengan KLT pada suatu hari, nilai Rf-nya mungkin berbeda dari nilainya jika diukur pada hari yang lain.

Seorang peneliti menyusun pengukuran nilai Rf dari senyawa tunggal. Ia menggunakan plat pre-coated yang sudah siap di pasaran, dengan mengikuti instruksi dengan menganggap penting untuk mengaktifkan plat. Ia membuat fase bergerak dan membiarkan tank KLT menjadi jenuh hingga lepas jam makan siang, sebelum memulai memasukkan kromatogram ke dalam tank, dengan tetap menjaga pandangannya pada prosiding. Hasil pengukuran nilai Rf adalah 0,52. Dengan mengacu pada buku, ia melihat nilai Rf yang seharusnya adalah 0,48 untuk zat yang sama. Pada hari selanjutnya ia memutuskan untuk mengecek hasil pengukurannya, dengan harapan ia mendapatkan nilai yang mendekati nilai 0,48. Ia menyadari ia mempunyai plat yang telah ia siapkan, sehingga ia menggunakan plat tersebut, tetapi ia agak terburu-buru dan mengaktifkan platnya hanya dalam waktu 15 menit dan menggunakan fase

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

gerak yang ia gunakan kemarin. Ia membiarkan tank-nya menjadi jenuh hanya dalam waktu 5 menit. Nilai R_f baru yang ia dapatkan adalah 0,45. Ia gembira karena memperoleh nilai yang mendekati nilai seperti yang tertera dalam buku.

Pertanyaannya, apakah kebahagiaannya beralasan dan apakah nilai R_f yang ia peroleh akurat?

Kebahagiaannya jelas tidak beralasan, sebagaimana setiap nilai adalah “benar” dengan mengacu kepada kondisi yang digunakan, nilai dari buku diperlukan dengan kehati-hatian dengan mempertimbangkan kondisi, plat, fase gerak dan detail eksperimennya yang telah dilakukan oleh peneliti tsb.

Adalah sangat penting untuk melihat pada factor-faktor berikut yang kurang diperhatikan para peneliti:

- (a) Uap pelarut (kejenuhan tank atau chamber)
- (b) Kualitas dan kuantitas fase gerak
- (c) Keaktifan adsorben
- (d) Teknik dan kondisi kromatografi

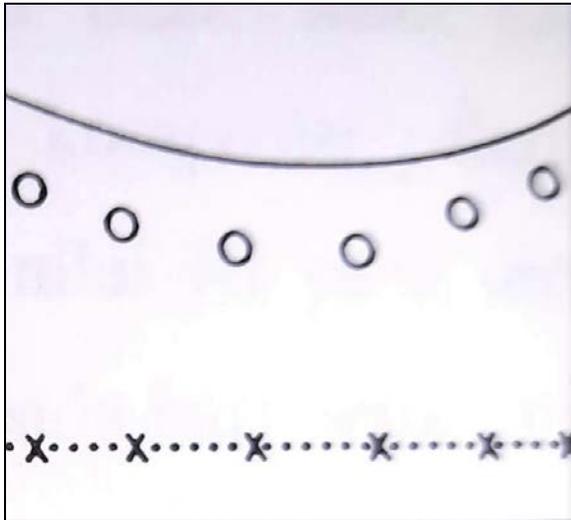
Variasi dan kurangnya nilai R_f yang dapat direproduksi, secara umum disebabkan oleh kurang kehati-hatian terhadap factor-faktor kondisi pemisahan seperti disebutkan di atas.

- (a) Uap Pelarut (Kejenuhan chamber)

Untuk mendapatkan nilai R_f yang dapat direpro, kita harus dapat menjamin kejenuhan atmosfer di dalam tank dengan memperhatikan uap pelarut. Apabila chamber tidak jenuh, pelarut naik ke atas plat KLT,

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

dan dari permukaan plat pelarut akan menguap untuk menjenuhkan udara dalam chamber. Semakin tinggi plat, akan semakin banyak terjadi penguapan. Hal ini akan mengakibatkan keganjilan hasil kromatogram yang diperoleh, hasilnya spot yang dihasilkan akan memiliki jarak tempuh tidak sama, spot yang terletak dipinggir plat akan memiliki jarak tempuh paling Panjang.



Gambar 6.1 Plat KLT yang dikembangkan dalam tank yang tidak jenuh

Dalam Gambar 6.1, satu senyawa diaplikasikan pada 6 lokasi spot. Uap pelarut dalam udara chamber tidak cukup untuk menjenuhkan nya, sehingga pelarut menguap dari plat dengan cepat dari bagian samping (dimana ada lebih udara untuk menjenuhkan) disbanding dari bagian tengah. Gerakan pelarut membentuk cekungan, sehingga nilai R_f yang dihasilkan akan sangat berbeda, jika dibaca dari bagian samping dan dibandingkan dengan nilai R_f yang terbaca pada bagian tengah plat.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Dengan menacampur pelarut, kejenuhan dari udara dengan uap pelarut menjadi lebih penting dan dalam kasus yang ekstrim dua gerakan pelarut mungkin memberikan nilai Rf yang sangat bervariasi.

Untuk meminimalisasi masalah ini, telah dikembangkan tank berlapis, dimana bagian dalamnya hanya terdiri dari $\frac{1}{2}$ mm gap udara, untuk memfasilitasi kecepatan penjenuhan dengan uap.

(b) Kualitas dan Kuantitas Fase Gerak

Harus senantiasa diingat bahwa kualitas sudah merupakan sesuatu yang sangat penting dalam fase gerak. Kemurnian pelarut merupakan salah satu hal yang sangat terkait dengan kemampuan kromatogram (misalnya nilai Rf) untuk dapat direproduksi kembali.

Juga dengan pelarut yang sangat mudah menguap, sangat penting untuk menggunakannya dalam keadaan fresh. Jika membuat suatu campuran pelarut, maka harus langsung digunakan. Karena jika tidak, akan banyak komponen pelarut yang menguap, sehingga mempengaruhi komposisi pelarut untuk fase gerak. Hal ini akan menyebabkan bervariasinya nilai Rf yang diperoleh, apabila suatu campuran pelarut (fase gerak) digunakan pada hari berikutnya.

(c) Keaktifan Adsorben

Keaktifan atau kapasitas adsorben tergantung kepada jumlah air dalam lapisan adsorben.

Bagaimana kita dapat mengontrol jumlah air dalam suatu plat sebelum plat tersebut digunakan?

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Dengan pemanasan atau pengaktifan plat. Tetapi harus diingat bahwa konsistensi lebih penting dari segalanya. Pemanasan hingga 110°C selama 30 menit untuk setiap plat sudah merupakan standard.

Sebagai catatan, pemanasan silika gel yang berlebihan padasuhu 200°C , dimana keaktifannya tergantung pada gugus silano (SiOH) akan menyebabkan kehilangan gugus ini, dan gugus ini dikonversi menjadi gugus siloksan (Si-O-Si). Sehingga resultan nilai R_f akan sangat berbeda.

Sedangkan plat yang diaktifkan dengan diekspos pada udara dapat menangkap kelembaban dan dalam beberapa menit akan kehilangan hamper seluruh keaktifannya. Sebagai contoh suatu kelembaban relatif 50%, maka suatu plat aktif akan kehilangan keaktifannya sebesar 50% dalam 3 menit. Nilai R_f dapat bervariasi sebanyak 300% antara running yang dilakukan dengan suatu kelembaban relatif 1% dibandingkan dengan yang dilakukan dalam suatu kelembaban relative 80%.

Sebagai ringkasan , kita harus memanaskan plat untuk mengaktifkannya, tetapi kita tidak dapat menghandlenya dalam keadaan panas, sedangkan kita perlu membuat spot sampel diatasnya, sehingga plat harus didinginkan dan diekspos ke udara yang dapat menyebabkan deaktivasi dan mempengaruhi nilai R_f yang dihasilkan.

Bagaimana kita dapat mengatasi masalah kelembaban?

Kita harus tetapkan pendekatan-pendekatan berikut, yang akan sangat membantu dalam lingkungan kerja kita:

- (i) Seluruh plat yang disiapkan dapat dikeringkan dalam oven dan disimpan di dalam ruang konstan dengan RH 50%, kemudian pembuatan spot ditangani secepat mungkin sebelum dikembangkan.
- (ii) Plat dapat disiapkan dengan cara normal dan diberi spot, kemudian kembali dipanaskan hingga 100°C selama 30 menit. Tetapi hal ini hanya mungkin bila sampel memiliki titik didih yang tinggi. Hal ini tidak akan cocok untuk penggunaan sampel seperti terpen pada industri parfum.
- (iii) Plat yang sudah disiapkan dan diaktifkan dapat disimpan dalam desicator dan semuanya ditangani secepat mungkin.
- (iv) Plat dapat ditangani dalam ruangan khusus dengan pengontrol temperature dan kelembaban, apabila kita dapat mengakses fasilitas seperti ini.
- (v) Penggunaan beberapa plat yang sudah siap boleh mengabaikan kepentingan untuk pengaktifan, tetapi begitu pack-nya dibuka, maka semua plat akan menjadi jenuh, dengan pertimbangan uap air dan kita akan mendapatkan nilai rf yang dapat direproduksi.
- (vi) Hal lain yang penting adalah untuk menyetandarkan prosedur yang kita miliki.

Kualitas Adsorben

Bukan hanya perlakuan pada plat, seperti pengaktifan, dapat mengubah nilai Rf, melainkan juga adsorben, seperti misalnya silika gel dengan kualitas yang bervariasi dari setiap perusahaan. Karakteristik utama dari adsorben yang perlu untuk dibandingkan adalah ukuran partikel, volume pori, diameter pori dan bagian permukaannya.

Meskipun demikian, nilai Rf dapat berbeda dari satu adsorben dengan adsorben lainnya. Dari berbagai produk adsorben kita dapat menentukan produk mana yang paling sesuai dengan cara menguji beberapa produk dengan pengujian pemisahan yang tingkat kesulitannya tinggi. Produk yang memberikan hasil yang memuaskan yang akan kita gunakan untuk seterusnya.

Jika kita memutuskan untuk berpindah dari satu produk ke produk lainnya, harus ditanyakan dengan teliti dan jangan lupa untuk mengeceknya sebelum membeli dalam jumlah yang besar.

Ketebalan lapisan

Secara teoritis, nilai Rf adalah independent dari ketebalan lapisan, jika kita jaga pada variable yang konstan. Oleh karena itu jika menggunakan plat siap pakai dengan ketebalan 0,10mm dan plat dengan pelapisan sendiri setebal 0,25mm, maka nilai Rf tidak akan berbeda. Dalam prakteknya, sepertinya

perbedaan nilai R_f tidak disebabkan oleh ketebalan lapisan, melainkan disebabkan oleh ukuran pori.

(d) Teknik dan Pengkondisian Kromatografis

Variabel disini yang mungkin mempengaruhi nilai R_f adalah; (i) metode pengembangan kromatogram (ii) temperatur, (iii) jarak running kromatogram (solvent front), dan (iv) jumlah sampel yang digunakan.

6.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Kuantitatif

Kromatografi lapis tipis, sejauh ini cukup representative, seperti murah, mudah digunakan, Teknik kualitatif, dan bias juga semuanya. Tetapi itu dapat juga dibuat kuantitatif sehingga memperkenalkan suatu dimensi baru. Kita bukan hanya menentukan komponen senyawa dalam suatu campuran, tetapi juga dapat mengukur seberapa banyak komponen tersebut terdapat dalam senyawa.

Penentuan kuantitatif dilakukan berdasarkan pada prinsip berikut:

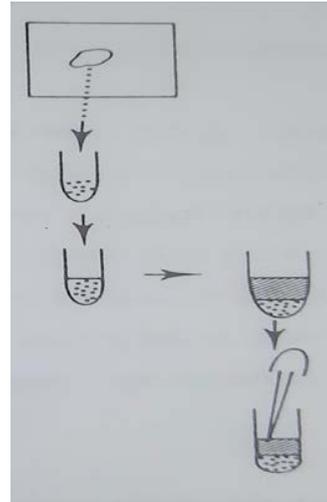
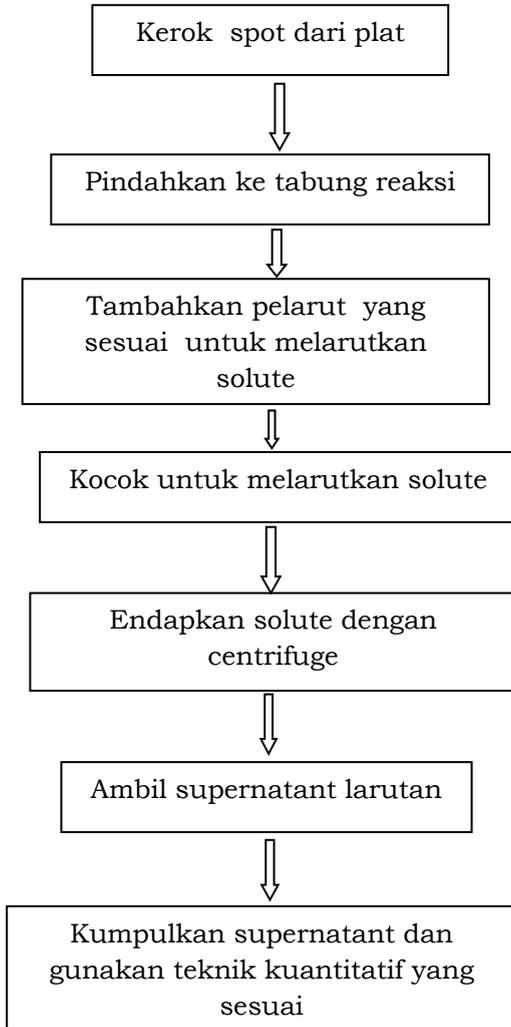
1. Pemisahan sampel pada plat KLT diikuti oleh elusi komponen tunggal
2. Kuantitatif *in situ* pada plat

Nilai R_f dalam kuantitatif

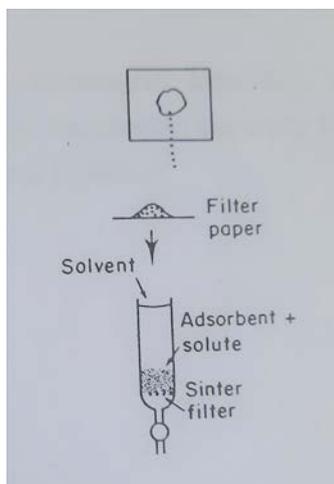
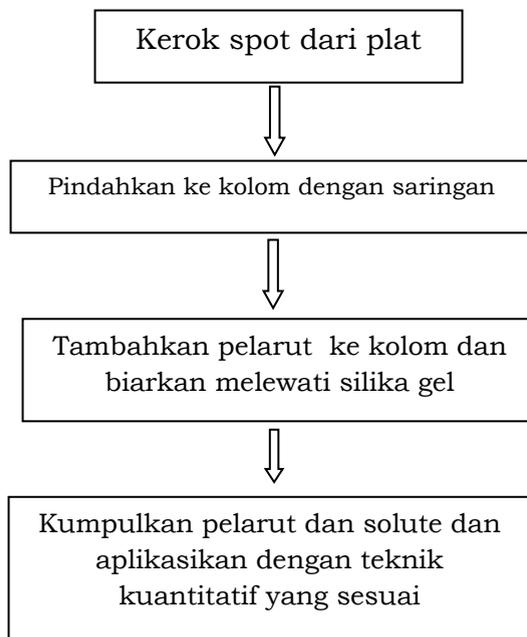
Untuk hasil yang terbaik dalam metode kuantitatif, spot harus memiliki nilai R_f antara 0,3-0,7. Spot dengan nilai R_f yang rendah, misalnya 0,3 menunjukkan terlalu kental, sedangkan bila nilai R_f diatas nilai 0,7 menunjukkan terlalu encer.

Visualisasi

1. Visualisasi dengan Teknik non-destruktif



2. Visualisasi dengan Teknik non-destruktif



VII. Aplikasi KLT dalam Berbagai Bidang

Kromatografi lapis tipis (KLT) telah digunakan menjadi alat yang berperan dalam berbagai aplikasi kepentingan farmasi dan bidang lainnya. Teknik KLT ini juga digunakan dalam pemisahan formulasi farmasi multikomponen.

7.1 Asam amino

Asama amino tidak berwarna, sehingga pemisahan asam amino menggunakan TLC lebih sulit daripada pemisahan tinta. Oleh karena itu, seseorang tidak dapat melihat bintik-bintik dengan mata telanjang setelah pelat KLT sepenuhnya berkembang dan kering. Untuk melihat bintik-bintik, perlu menggunakan ninhidrin atau teknik visualisasi cahaya hitam. Sebagai contoh: asam amino, protein dan peptida 8: Suatu campuran terdiri dari 34 asam amino, protein dan peptida telah berhasil dipisahkan dan diisolasi dari urin menggunakan pelat silika gel. Semua zat ini ditemukan dengan ninhidrin positif. Pengembangan dilakukan pertama dengan kloroform-metanol-amonium hidroksida 20% (2: 2: 1) dan kemudian dengan fenol-air.

7.2 Farmasi dan obat-obatan

Teknik TLC juga telah digunakan dalam identifikasi, pengujian kemurnian dan penentuan konsentrasi bahan aktif, zat tambahan dan pengawet dalam obat-obatan dan persiapan obat, kontrol proses dalam proses pembuatan sintetis. Berbagai farmakope telah menerima teknik TLC untuk mendeteksi ketidakmurnian dalam obat atau bahan kimia, misalnya antibiotik: penisilin telah dipisahkan pada silika gel 'G' dengan menggunakan dua pelarut, yaitu aseton:metanol (1: 1) dan iso-propanol:metanol (3: 7). Sebagai zat pendeteksi, reaksi iodine-azida digunakan dengan menyemprot pelat kering dengan larutan iodine 0,1% yang mengandung 3,5% natrium azida.

7.3 Analisis kualitatif alkaloid

Teknik pemisahan dengan KLT ini digunakan dalam analisis kualitatif alkaloid dalam fase kontrol dari formulasi farmasi dan obat herbal. TLC telah digunakan untuk isolasi dan penentuan alkaloid dalam toksikologi di mana pengujian ini hanya memerlukan waktu sekitar 30-60 menit, dapat memberikan hasil yang baik, bila dibandingkan dengan waktu 12-24 jam yang diperlukan untuk analisis menggunakan kromatografi kertas. Alkaloid purin telah dipisahkan oleh KLT pada asam silikat, silika gel dan aluminium oksida. Bintik-bintik divisualisasikan dengan menyemprotkan larutan penampak, pertama dengan larutan alkohol yodium : kalium iodine diikuti oleh 25% HCl: etanol 96% (1: 1).

7.4 Kimia klinis dan Biokimia

Untuk penentuan zat aktif dan metabolitnya dalam matriks biologis, diagnosis gangguan metabolisme seperti fenilketonuria, sistinuria, dan penyakit sirup maple pada bayi dapat digunakan Teknik KLT. Hal ini berfungsi sebagai alat yang berguna dalam melakukan analisis konstituen urin yang berasal dari lipid dalam analisis banyak konstituen urin seperti steroid, asam amino, porfirin dan asam empedu. Analisis urin oleh TLC paling efektif bila dilakukan bersamaan dengan proses kromatografi lainnya, sehingga metabolit minor dapat dideteksi dan diselesaikan sepenuhnya bebas dari komponen lain.

7.5 Bidang Kosmetik

Dalam bidang kecantikan diperlukan teknik identifikasi dengan TLC yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi bahan baku pewarna dan produk akhir, pengawet, surfaktan, asam lemak dan konstituen parfum.

7.6 Analisis Makanan

Untuk penentuan pestisida dan fungisida dalam air minum, residu dalam sayuran, salad dan daging, vitamin dalam minuman ringan, aditif terlarang di Jerman (misalnya ekstrak cendana dalam produk ikan dan daging), kesesuaian dengan nilai batas, (misalnya senyawa polisiklik dalam air minum, aflatoksin dalam susu dan produk susu).

7.7 Pemisahan aromatik

Sistem termediasi surfaktan kationik dan non-ionik telah digunakan sebagai fase gerak dalam pemisahan

kromatografi lapis tipis amina aromatik pada lapisan gel silika. Perlu diamati efek konsentrasi surfaktan di bawah dan di atas konsentrasi misel kritisnya pada mobilitas amina. Pemisahan amina juga dinilai dari pengaruh aditif organik dan anorganik seperti alkohol, urea, NaCl, dan NaBr dalam larutan misel pada mobilitas dan efisiensinya.

7.8 Analisis Produk Minyak Bumi

Kesederhanaan, ekonomis, dan efisiensi merupakan keuntungan teknik KLT ini dibandingkan dengan kromatografi kolom. Teknik TLC digunakan (dalam varian preparatif) untuk penentuan yang cepat dari komposisi kelompok produk minyak berat (aspal, pitches, residues), dan sehubungan dengan studi spektroskopi komposisi kimia dari fraksi yang diperoleh. Kromatografi lapis tipis (KLT), yang biasa digunakan dalam analisis campuran kompleks, jarang digunakan dalam penyelidikan produk minyak bumi, mungkin karena objek minyak bumi paling kompleks. Khususnya, berkenaan dengan produk minyak bumi yang berat, tidak ditemukan informasi dalam literatur.

7.9 Aplikasi yang terkait dengan Kimia Organik

Dalam hal ini teknik pemisahan dengan TLC telah banyak digunakan untuk memeriksa sejumlah proses pemisahan lainnya. TLC juga telah berhasil diterapkan dalam berbagai proses pemurnian, pengecekan fraksi distilasi dan untuk memeriksa kemajuan pemurnian dengan distilasi molekuler. TLC telah digunakan sebagai alat analitik dalam kimia organik karena kecepatan pemisahannya yang tinggi dan penerapannya dalam sejumlah besar senyawa kimia.

Analisis komponen kimia kayu dengan kromatografi sederhana

Salah satu penggunaan yang penting adalah dalam pemisahan dan isolasi komponen individu dari campuran, tetapi dalam kimia organik juga telah digunakan untuk memeriksa kemurnian sampel, sebagai proses pemurnian, untuk identifikasi senyawa organik, untuk mempelajari berbagai reaksi organik, dalam mengkarakterisasi dan mengisolasi sejumlah senyawa seperti asam, alkohol, glikol, amida, alkaloid, vitamin, asam amino, antibiotik, bahan makanan, dan pemeriksaan reaksi. Campuran reaksi dianalisis dengan TLC untuk menilai apakah reaksi selesai atau tidak. Metode ini juga digunakan dalam memeriksa proses pemisahan lainnya dan proses pemurnian seperti distilasi, distilasi molekuler, dll.

Sensitivitas TLC yang tinggi digunakan untuk memeriksa kemurnian sampel, karena sensitivitas yang tinggi memungkinkan pengotor diamati dalam apa yang disebut sampel murni.

DAFTAR PUSTAKA

- A Braittwaite and FJ Smith. *Chromatography Methods*, 4th Edition. Chapman and Hall. London. 1985.
- A Zlatkis and RE Kaiser, *High Performane Thin Layer Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, 1977.
- Hamilton RJ, Hamilton S. Thin layer Chromatography. Analytical Chemistry by Open Learning. John Wiley & Sons. 1987.
- Handbook of Chromatography*, Ed. G Zweig and J Sherma, C R C Press, Florida.1972
- JC Touchstone and MF Dobbins. *Practice of Thin layer Chromatography*, J Wiley and Sons, New York. 1980.
- JC Touchstone and Rogers. *Thin layer Chromatography*. J Wiley and Sons, New York. 1980.
- Kumar S, Jyotirmayee K, Sarangi M. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *Int. J. Pharm. Sci.* 2013; 18(1): 126-132
- SG Perry, R Amos and PI Brewer, *Practical Liquid Chromatography*, Plenum Rosetta, New York. 1983.

Thin layer Chromatography, Ed. JG Kirchner and ES Perry in *Techniques in Chemistry* by A Weissberger. J Wiley and Sons, New York. 1978.

<http://www.chem.wisc.edu/courses/342/Fall2004/TLC.pdf>

http://www.getty.edu/conservation/publications_resources/pdf_publications/thin_layer.pdf

<http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/TLC/TLC.html>