

C. KROMATOGRAFI

1. PENDAHULUAN
2. KLASIFIKASI METODE KROMATOGRAFI
3. TERMINOLOGI KROMATOGRAFI
4. PROSEDUR KROMATOGRAFI
5. DINAMIKA KROMATOGRAFI

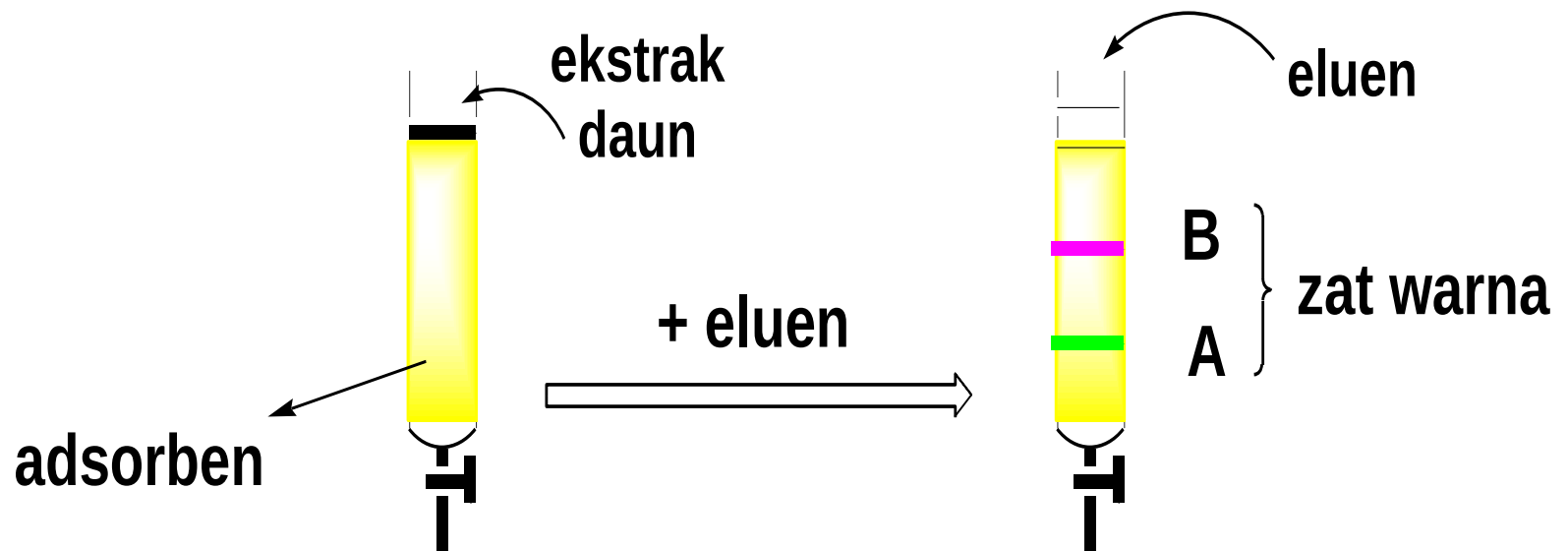
C.1. PENDAHULUAN

- Teknik kromatografi ditemukan oleh Tswett tahun 1903, teknik ini bermanfaat sebagai cara untuk menguraikan campuran.
- Dalam kromatografi, komponen-komponen campuran terdistribusi dalam dua fase yaitu fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*).

Kromatografi = chromatography

(**Chrom** = warna, **graphy** = gambar)

Tswett 1903



- Transfer massa antara fase gerak dan fase diam terjadi bila molekul-molekul campuran terserap pada permukaan partikel-partikel atau terserap di dalam pori-pori partikel atau terbagi ke dalam sejumlah cairan yang terikat pada permukaan atau di dalam pori → *sorpsi* (penyerapan)
- Laju perpindahan suatu molekul zat terlarut tertentu di dalam kolom atau lapisan tipis zat penjerap secara langsung berhubungan dengan bagian molekul-molekul tersebut diantara fase gerak dan fase diam.

- Jika ada perbedaan penahanan secara selektif → laju gerak linier, tergantung partisi molekul pada fase gerak dan fase diam.
- K_p → banyaknya komponen pada fase gerak setiap saat.
- Lama waktu seluruh komponen berada pada fase gerak → retensi/pertumbuhan
- Perbedaan retensi = perbedaan laju gerak → keluar kolom jarak waktu berbeda; komponen terpisah (muncul peak) → proses keseluruhan adalah fenomena migrasi secara diferensial (*differential migration*)

Perkembangan kromatografi

- 1941 : Martin dan Synge mengembangkan kromatografi partisi dengan teorinya yang dikenal dengan *Plate Theory*, dan menerima hadiah Nobel pada tahun 1952.
- 1952 : Martin dan James mempublikasikan makalah pertamanya mengenai **Kromatografi Gas**.
- 1958 : Stahl mengembangkan **KLT /TLC** (*Thin Layer Chromatography*) yang dirintis oleh Izmailov dan Shraiber, tahun 1938.
- 1969 : **Kromatografi Cair** sebagai komplemen Kromatografi Gas, terus dikembangkan menjadi Kromatografi Cair Tekanan Tinggi /HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*).

C.2. KLASIFIKASI METODE KROMATOGRAFI

- **Klasifikasi utama dilakukan berdasarkan fase gerak;**

1. Kromatografi Cair

- kromatografi jerap (adsorpsi)
- kromatografi partisi
- kromatografi penukar ion
- kromatografi eksklusi

2. Kromatografi Gas

- Gas Liquid Chromatography (GLC)
- Gas Solid Chromatography (GSC)

Penggolongan berdasarkan cara pelaksanaan:

- kolom
- kertas
- lapis tipis

Subklasifikasi didasarkan atas letak fase diam dan interaksi antara zat terlarut dengan fase diam → dapat dilihat pada tabel berikut.

KLASIFIKASI METODE KROMATOGRAFI

Fase diam

Metode

A. Fase gerak gas, (dalam kolom)

1. fase diam; padat

Kromatografi Gas Padat (GSC)
(kromatografi adsorpsi)

2. fase diam ; cair

Kromatografi Gas Cair (GLC)
(kromatografi absorpsi)

B. Fase gerak ; cair (dalam kolom)

1. fase diam ; padat

Kromatografi Padat Cair (LSC)
- kromatografi adsorpsi
- kromatografi adsorpsi elusi linear

2. fase diam; resin penukar ion

Kromatografi Penukar ion

3. fase diam; cair

Kromatografi cair-cair (LLC)
(kromatografi partisi)

4. fase diam ; Saringan molekul

Kromatografi eksklusi
(*Gel Permeation Chromatography*)

- **Klasifikasi (lanjutan)**

Fase diam	Metode
C. Fase gerak cair; dalam bidang-planar.	
1. kertas	Kromatografi kertas (PC)
2. Padat	Kromatografi Lapis Tipis (TLC)
- adsorben	
- resin penukar ion	
- saringan molekul	

Pembagian kromatografi

Kromatografi dikelompokkan berdasarkan: fase gerak, mekanisme pemisahan, teknik pemisahan dan geometri tempat pemisahan sbb.

Dasar Pemisahan	Kelompok Kromatografi	Contoh
1. Fase Gerak (Fase Gerak dan Fase Diam)	■ Kromatografi Gas (GSC, GLC) ■ Kromatografi Cair (LLC, LSC)	■ GLC, GSC ■ CC, PC, TLC, HPLC
2. Mekanisme Pemisahan	■ Kromatografi Adsorpsi (GSC, LSC) ■ Kromatografi Partisi (LLC) ■ Kromatografi Pasangan Ion ■ Kromatografi Pertukaran Ion ■ Kromatografi Eksklusi	■ CC, GSC, TLC, ■ GLC, PC, TLC, HPLC ■ IPC ■ IEC ■ GPC
3. Teknik Pemisahan	■ Kromatografi Menurun, Menaik, Melingkar, ■ Kromatografi Dua Dimensi ■ Kromatografi Isokratik ■ Kromatografi Gradien ■ Kromatografi Fase Normal ■ Kromatografi Fase Balik ■ Kromatografi Fase Terikat	■ PC ■ TLC ■ HPLC ■ HPLC ■ HPLC ■ HPLC ■ HPLC
4. Geometri Tempat Pemisahan.	■ Kromatografi Kolom ■ Kromatografi Bidang Datar (<i>Planar Chromatography</i>)	■ CC, GC, HPLC ■ PC, TLC, HPTLC

C.3. TERMINOLOGI KROMATOGRAFI

- Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh pergerakan fase gerak yang bergerak.
- Tujuan Kromatografi untuk memisahkan komponen dari matriks sampel dan tetap dibiarkan dalam fase diam kemudian ditentukan untuk analisis.

Istilah-istilah dalam kromatografi

- Beberapa istilah yang digunakan untuk menentukan kinerja kolom (kualitas pemisahan), identifikasi dan penetapan kadar adalah:
 - R_f ; faktor retardasi
 - V_R ; volume retensi
 - t_R ; waktu retensi
 - R_r ; retensi relatif
 - A ; Area puncak (luas puncak)
 - A_s ; Asimetri puncak
 - K ; koefisien partisi/distribusi
 - N ; jumlah lempeng (plat) teoritis
 - HETP ; Height Equivalent to A Theoretical Plate
 - R ; Resolusi

Rf (*Retardation factor, Ratio of front*)

Rf adalah perbandingan jarak rambat bercak dihitung dari pusat penotolan hingga pusat bercak dibagi jarak rambat fase gerak.

Harga Rf merupakan identitas suatu zat pada kromatografi bidang datar/kertas(PC, TLC) dengan sistem/kondisi yang sama.

V_R (volume retensi)

adalah banyaknya fase gerak yang keluar dari kolom sampai saat keluarnya maksimum suatu puncak (artinya setengah zat sudah keluar)

Waktu retensi (t atau t_R)

t_R / t adalah waktu (menit) yang diperlukan oleh suatu zat (analit) mulai dari penyuntikan hingga keluarnya maksimum dari puncak zat tersebut.

Waktu retensi merupakan identitas suatu zat pada kromatografi kolom (GC, HPLC) dengan sistem/kondisi yang sama.

- R_f ; V_R ; dan t_R $\rightarrow$ besaran yang menyatakan berapa lama fraksi waktu molekul zat terlarut tinggal dalam fase gerak.
- Tiap senyawa mempunyai nilai R_f atau V_R yang berbeda dengan berubahnya kombinasi pelarut penyerap.

- K_d ; koefisien partisi :

$$K_d = \frac{C_d}{C_g}$$

- C_d = konsentrasi zat terlarut dalam fase diam
- C_g = konsentrasi zat terlarut dalam fase gerak

- R ; fungsi kesetimbangan /fungsi koefisien partisi

$$R = \frac{t_g}{t_d + t_g}$$

t = waktu tinggal molekul

sepanjang lintasan zat terlarut penampang lintang dan K_d tidak konstan, sehingga R_f adalah :

- $R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh linarut}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}}$

- Karena kecepatan $f_{\text{gerak zat pelarut}} > f_{\text{gerak}}$ maka
 $R > R_f$ sebesar 15% .

Jika: - R = fraksi zat terlarut pada keadaan kesetimbangan
pada fase gerak,

- $(1-R)$ = fraksi zat terlarut pada kesetimbangan di fase
diamnya.

- Perbandingan molekul dalam fase gerak dan fase
diam

$$\frac{R}{1-R} = \frac{C_g \cdot V_g}{C_d \cdot V_d}$$

- **VR ; volume retensi :**

$$V_R \cdot C_g = V_g \cdot C_g + V_g \cdot C_d \rightarrow C_d/C_g = K_d$$

$$V_R = V_g + K_d \cdot V_g$$

$$V_R = t_g \cdot F_c$$

(F_c = kecepatan aliran pada GC)

$$V_g = L \cdot F_c / v + K_d \cdot V_g / v \cdot V_g$$

v = kecepatan alir linear

L = panjang kolom

V_g = volume total f.gerak yang disebut volume kosong

- **K ; kapasitas kolom :**

$$K = C_d \cdot V_d / C_g \cdot V_g$$

- Hubungan antara faktor kapasitas dan R

$$R = \frac{1}{(1 - K)}$$

- Hubungan antara faktor kapasitas dengan V_R

$$K = \frac{V_R - V_g}{V_g}$$

Hubungan K_d dengan suhu :

- Suhu mempengaruhi : K_d , V_g , V_{cairan} dan difusivitas (ketersebaran).
- kenaikan suhu 20°C , K_d berkurang separuhnya (lebih banyak di fase gerak), $\rightarrow$ nilai R makin besar, sedangkan V_R akan berkurang.
- Pengaruh suhu ini $\rightarrow$ dimanfaatkan untuk memperbaiki Resolusi dan dikenal sebagai : Kromatografi Gas dengan memprogram suhu.
- Kromatografi juga dapat digunakan bersama-sama dengan suatu reagen kimia yang spesifik ,untuk menentukan ada atau tidaknya suatu gugus fungsi. Sebagai contoh: kolom silika gel yang dijenuhkan dengan AgNO_3 , akan menahan senyawa-senyawaan $> \text{C}=\text{C} <$ (alken)

R_r , α (Retensi relatif, Faktor selektivitas atau Faktor separasi)

R_r adalah waktu retensi yang lebih besar dibagi dengan waktu retensi yang lebih kecil dari dua analit. Makin besar nilainya, pemisahan makin sempurna.

$$R_r = t_2 / t_1 = k'_2 / k'_1$$

K (Koefisien distribusi atau koefisien partisi)

K adalahnya konsentrasi zat (analit) dalam fase diam dibagi konsentrasi analit dalam fase gerak.

$$K = C_d / C_g$$

C.4. PROSEDUR KROMATOGRAFI

Untuk melaksanakan pemisahan secara kromatografi kolom, ada tiga cara dapat dilakukan :

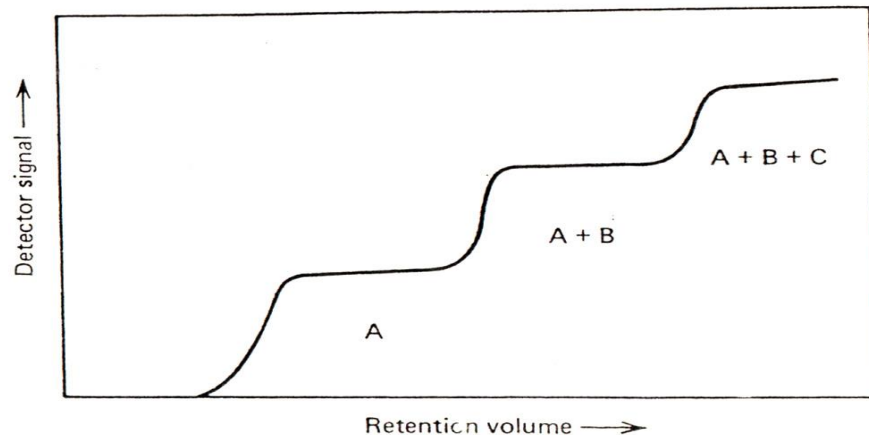
- a. Analisis Frontal
- b. Analisis elusi
- c. Pergeseran

Dalam arus kromatografi, *effluent* dikumpulkan dalam fraksi-fraksi yang berbeda dan masing-masing komponen terdeteksi dalam aliran effluent .

Analisis frontal

Sampel ditambahkan secara kontinu dengan fase gerak →
pada satu saat terjadi penjenjuran pada kolom.

Pada mulanya pelarut murni dan zat terlarut yang teradsorpsi paling lemah akan meluncur keluar kolom. Jika di plotkan %E terhadap volume effluent, Gambar 1. Maka diperoleh suatu kurva berbentuk tangga, dimana bagian datarnya menyatakan keluarnya komponen zat terlarut. Pada zat-zat terlarut yang sedikit teradsorpsi, analisis frontal akan memberikan hasil yang baik bila kolomnya sempit dan volume yang digunakan sedikit

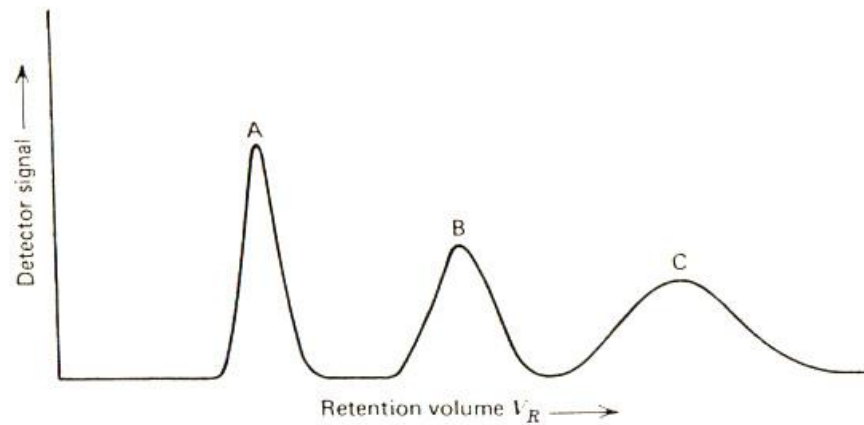


Gambar.1. Analisis Frontal

Analisis Elusi

adalah teknik yang paling populer. Eluen (dapat saja pelarut murni) dilewatkan melalui kolom yang dapat menyebabkan migrasi diferensial zat terlarut dalam fase gerak.

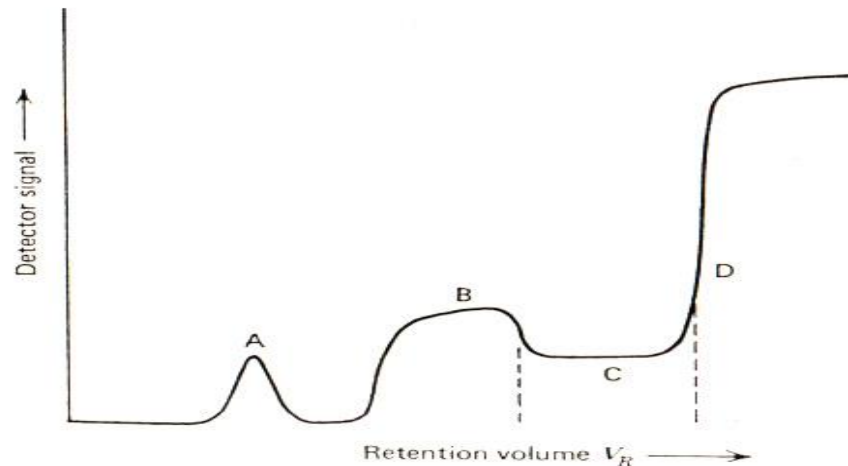
Jika laju aliran tertentu, maka pemisahan tergantung KD . Jika masing-masing komponen mempunyai perbedaan KD besar, komponen akan terpisah sempurna.



Gambar.2. Analisis elusi

Teknik Pergeseran

- Pada teknik ini pemisahan tercapai dengan mengalirkan suatu reagen yang teradsorpsi lebih kuat ke dalam kolom adsorpsi dan terkonsentrasi pada suatu wilayah puncak kolom.
- Semua komponen terdorong keluar dan oleh pergerakan maju agen penggeser sepanjang kolom.
- Terbentuknya wilayah dengan kekuatan penyerapan yang makin menurun → komponen yang paling lemah terikat → keluar pertama, agen penggeser keluar terakhir.



Gambar .3. Teknik pergeseran

- **Keuntungan teknik ini :**
 - Kolom dapat di isi dengan sampel cukup banyak.
 - Untuk tujuan preparatif , kadangkala pemisahan yang sempurna tidak tercapai meskipun tailing sudah di usahakan seminimal mungkin.
 - Metode pergeseran sangat bermanfaat dalam kromatografi partisi.
 - Elusi secara bertahap (*gradient elution*) → salah satu variasi kondisi elusi selama proses pemisahan.
- Pada Kromatografi Gas digunakan cairan dengan kemampuan menggeser yang lebih kuat. Dengan cara ini pelebaran pita dan waktu retensi yang terlalu lama dapat dihindarkan.

C.5. DINAMIKA KROMATOGRAFI

- Efektivitas pemisahan tergantung pada :
 - penguraian komponen pada saat komponen tersebut berpindah dan kepadatan wilayah yang ditempati komponen tersebut.

Efisiensi kolom

Dalam kromatografi secara umum efisiensi kolom berkaitan dengan lamanya waktu komponen atau molekul yang dianalisis berada dalam kolom (t_R) dan jumlah pelat teoritis $\rightarrow n = (t_R/\sigma)^2$

$$\rightarrow n = (t_R/\sigma)^2$$

keterangan:

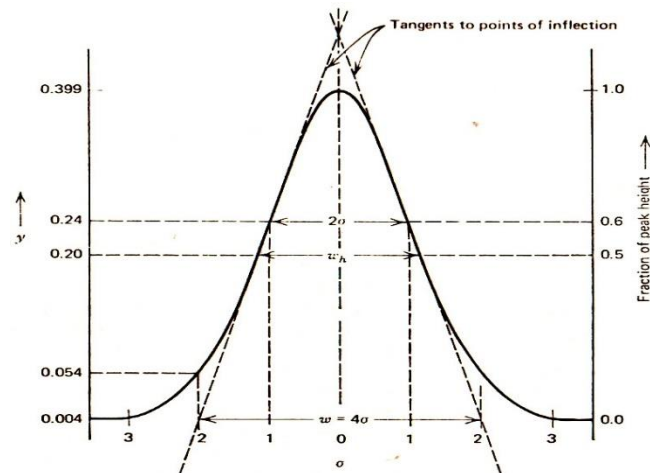
n = jumlah plat teoritis

t_R = waktu retensi

σ = standar deviasi dari puncak kromatogram

Dengan melihat bentuk kromatogram kurva Gauss , jumlah plat teoritis dapat dinyatakan dengan bilangan plat teoritis

$$N = 16 (t_R/W_b)^2 \quad W_b = \text{lebar dasar kurva Gauss}$$



Gambar. 4 : Profil kromatogram ideal kurva Gauss (pada KG dan KCKT)

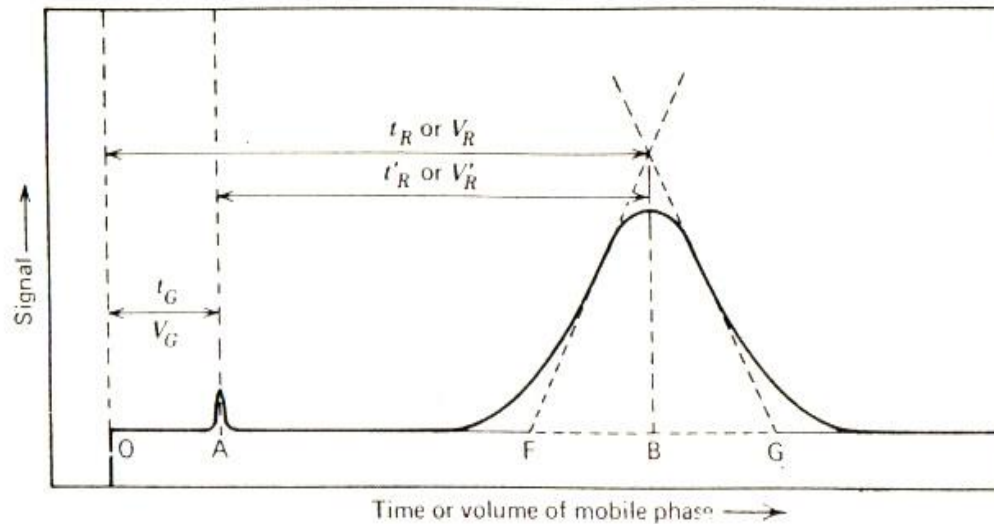
- Untuk menghitung efisiensi kolom (k) yang terbaik adalah menggunakan waktu retensi (waktu tambat) terkoreksi ; $t_{R'}$ dibanding memakai waktu retensi.

$$k = t_R - t_M / t_R$$

$$k = t_{R'} / t_R$$

Kalau dipakai waktu retensi terkoreksi , menurut *Purnell* dan *Desty* dalam perhitungan digunakan N, bilangan plat teoritis yang dinyatakan sebagai ;

$$N = n (k / k+1)^2$$



Gambar 5 : Profil Kromatogram untuk penetapan waktu retensi terkoreksi

- Baik n atau N dapat dihitung untuk mengukur efisiensi sebuah kolom kromatografi. Dalam hal yang sama baik n atau N sangat tergantung pada panjang kolom (L)

- **HETP (Jarak setara Plat)**

Disingkat H adalah panjang kolom kromatografi (mm) yang diperlukan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan molekul komponen dalam fase gerak dan fase diam.

$$H = L/N \rightarrow \text{sebagai pengukur efisiensi kolom}$$

$$1/H = N/L$$

- N/L = bilangan yg menunjukkan juml plat teoritis efektif per satuan panjang kolom.

Misal : $N = 3000$ untuk $H = 0,33$

makin besar N/L atau makin kecil $H \rightarrow$ makin efisien kolom yang dipakai untuk pemisahan.

Disamping panjang kolom ada parameter lain yang mempengaruhi efisiensi kolom yaitu :

Resolusi = R atau R_s

adalah kualitas pemisahan dari dua puncak. Untuk analisis kuantitatif nilai R minimal 1,5 (berimpit 0,3%).

$$R = 2(t_2 - t_1) / (W_2 + W_1)$$

Resolusi tergantung dari kondisi percobaan yang ditentukan oleh tiga parameter yaitu: α , N dan k'

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1) N^{1/2} \frac{k'}{(1+k')}$$

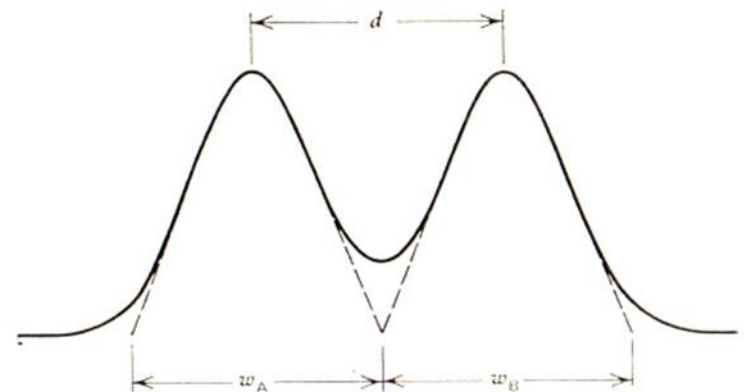
(selektivitas) (efisiensi) (retensi)

Selektivitas dan retensi kolom ditentukan oleh:

1. Komposisi fase gerak
2. Komposisi fase diam
3. Suhu

Efisiensi kolom ditentukan oleh:

1. Laju alir (flow rate) fase gerak
2. Panjang kolom
3. Ukuran partikel fase diam.



Gambar 6:Kromatogram Pemisahan dua komponen

• **KROMATOGRAFI PREPARATIF**

- Kromatografi kolom semula dirancang untuk tujuan ini dan telah dipakai secara luas selama bertahun-tahun.
- KLT preparatif yang dilakukan pada lapisan sampai setebal 1cm (kr lapis tebal) → sederhana dan murah
- KCKT dan KG (kromatografi kolom cair-cair) tidak dapat dipakai untuk pemisahan jumlah besar dalam kromatogram tunggal. Untuk mengatasi masalah ini digunakan sistem suntik berganda dan juga ada rakitan kolom besar.
- Pemisahan dengan kromatografi preparatif merupakan kejadian sehari-hari dalam bidang : kimia, Biologi, farmasi dan kedokteran.
- Hampir setiap masalah isolasi dan identifikasi yang ditangani sekarang sudah dapat dipastikan menggunakan salah satu cara “Kromatografi Preparatif”