

## C.2.1. KROMATOGRAFI PLANAR

Ada tiga macam metode pemisahan planar :

- Kromatografi Kertas
- Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
- Elektro Kromatografi ( elektro foresa )

## **Fase diam :**

lapisan uniform bidang datar yang di dukung oleh :

- pelat kaca
- pelat aluminium
- pelat plastik atau
- pelat selulose pada kromatografi kertas.

## **Fase gerak :**

akan bergerak sepanjang fase diam di bawah :

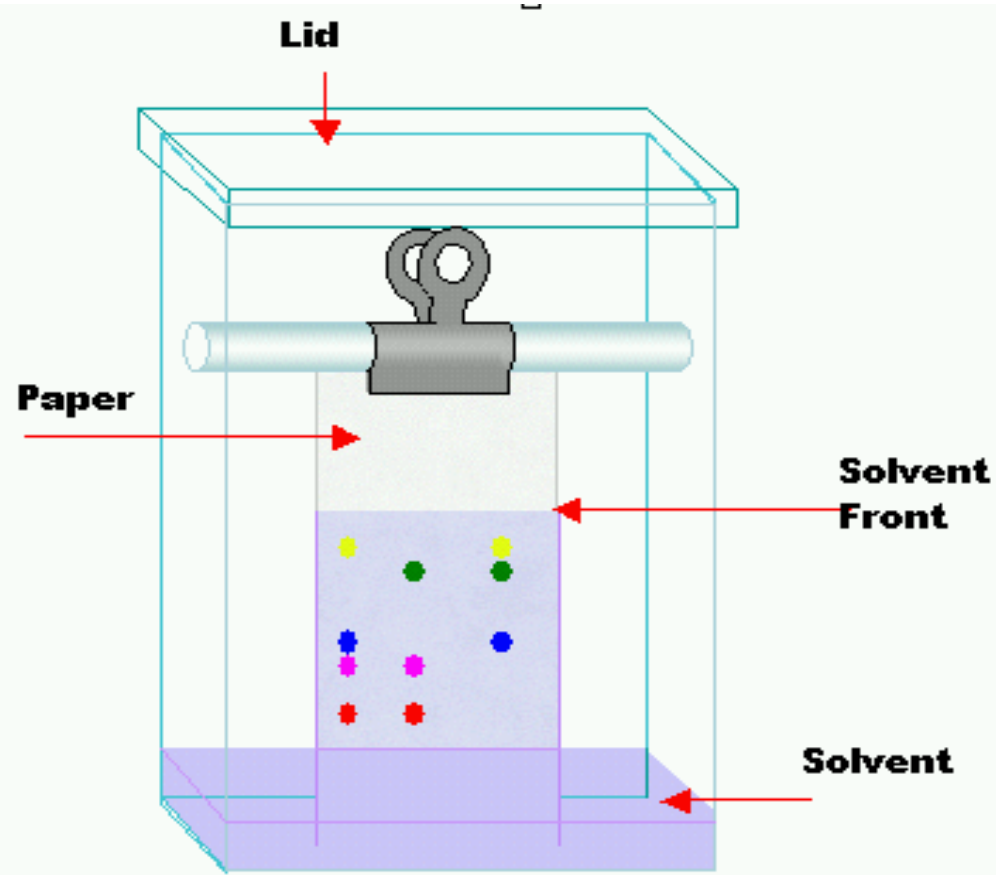
- pengaruh kapiler (*ascending*),
- pengaruh gravitasi (*descending*)
- atau pengaruh potensial listrik (elektro foresa)

## **Kromatografi planar :**

- merupakan bentuk terbuka kolom kromatografi.
- pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibanding kan kromatografi kolom
- Peralatan Kromatografi planar sangat sederhana → semua laboratorium dapat melaksananya.

## **Beberapa peralatan untuk Kromatografi planar (KKt, KLT)**

- |                         |                |
|-------------------------|----------------|
| - Bejana (chamber)      | - mikropipet   |
| - alat penyemprot       | - lampu UV     |
| - pemanas (heater/oven) | - Kertas (KKt) |
| - lempeng (KLT)         |                |

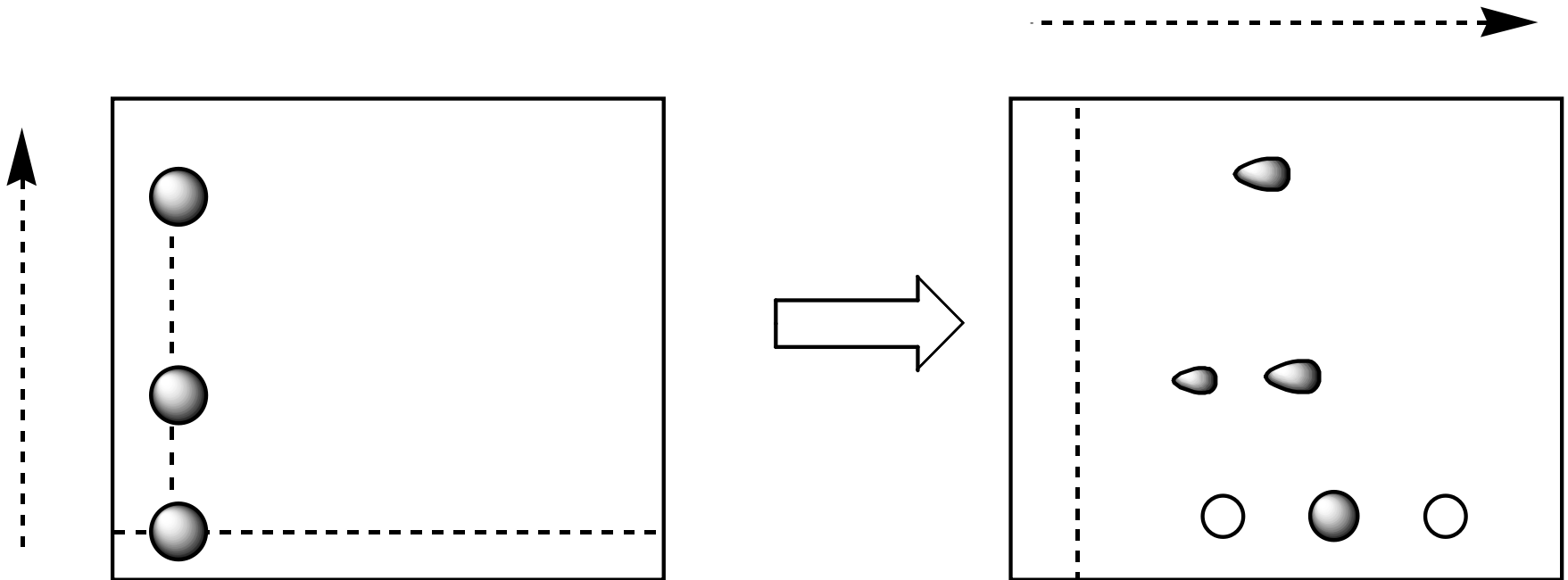


## **Keuntungan kromatografi planar yang lain:**

- Kromatografi Kertas dan KLT banyak digunakan untuk maksud analitik.
- Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau pemadaman fluoresensi, radiasi lampu UV.
- Dapat dilakukan elusi dengan menaik (ascending) atau menurun (descending) atau dengan cara elusi dua dimensi.
- Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang ditentukan merupakan noda yang tidak bergerak.

## Elusi dua dimensi :

Digunakan untuk melihat kemurnian satu zat kimia dan menggunakan dua sistem pelarut



## **C.2.1.a. Kromatografi Kertas; KKt (*Paper Chromatography ; PC*)**

Pada tahun 1941 Martin dan Synge mengemukakan teori kromatografi partisi ( hadiah Nobel ),

- Dalam percobaan ini memanfaatkan air sebagai fase diam dan cairan sebagai fase larutan pengembang.
- Mereka berpendapat, pada sela-sela serat kertas mengandung air sehingga dengan adanya pelarut pengembang maka zat yang dipisahkan akan mengalami proses partisi berkali-kali.
- Mulai saat pengembangan kromatografi kertas oleh Martin dan Synge Tahun 1941 , maka teknik pemisahan partisi cair-cair dengan kromatografi mulai populer dan terus berkembang.

- \* Pada Tahun 1944, Consden, Gordon dan Martin memperkenalkan Teknik dengan menggunakan kertas penyaring sebagai penunjang fase diam dan fase gerak berupa cairan yang terserap di antara struktur pori kertas. Sampel didepositkan pada kertas saring dan akan mengalir bersama sistem pelarut.  
→ uji kualitatif dan kuantitatif.
- \* Jenis-jenis kertas yang dipakai untuk kromatografi kertas tersebut mempunyai sifat yang khusus dalam kecepatan elusi, dipakai untuk analitik atau preparatif .
- \* Kertas yang umum dan banyak digunakan adalah: kertas “*whatman*” No. 1, 2,3 dan 3 MM , kertas asam asetil, kertas kieselguhr, kertas , silikon, dan kertas penukar ion,kertas selulosa murni, kertas selulose dimodifikasi dan kertas serat kaca.



## Beberapa jenis kertas saring yang digunakan untuk analisis kromatografi kertas adalah :

Untuk kromatografi alir **cepat**

- Kertas Whatman no 4
- S & S (Schleucher-Schull) no 2040A
- Ederal 201
- FN 1

Untuk kromatografi alir **lambat**

- S & S no 2045B
- Ederal 208
- MN 201

Untuk kromatografi alir **sedang**

- Kertas Whatman no 1
- S & S no 2043B
- Ederal 202
- FN 3, FN 4

Untuk kromatografi **preparatif**

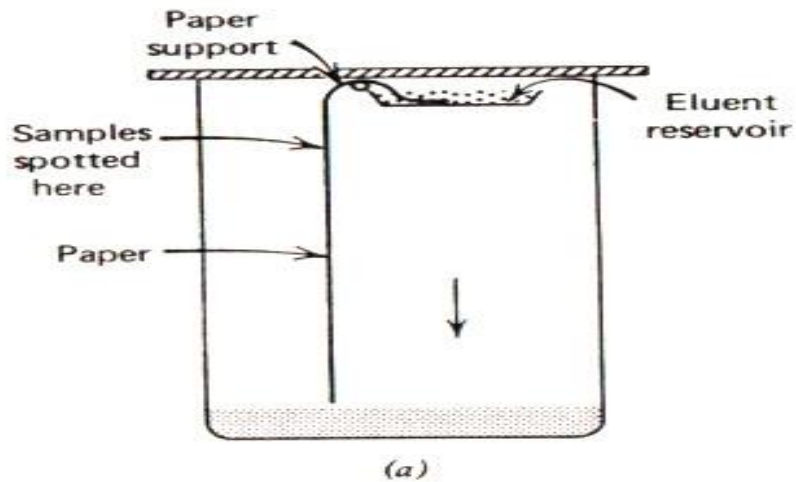
- Kertas Whatman no 3 MM
- S & S no 2071
- FN 8
- ET

**Di Laboratorium sering menggunakan Kertas Whatman no 1 dan S & S 2043B**

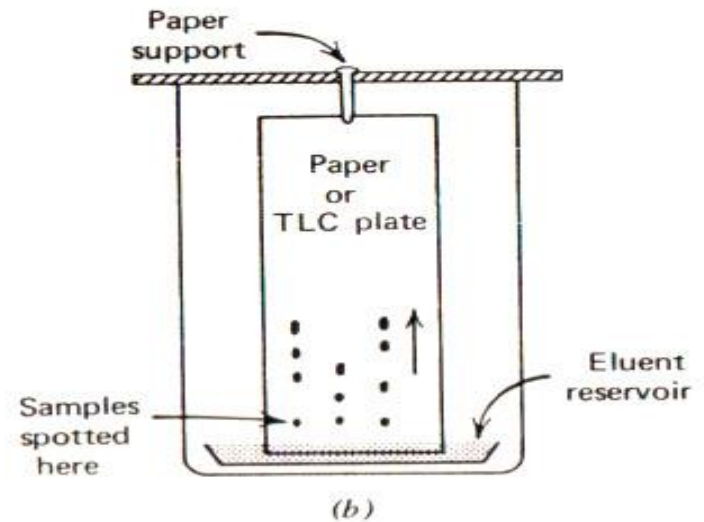
- Kelebihan kromatografi kertas dari KLT adalah :

Kromatografi kertas dapat di elusi dengan cara menaik (*ascending*) , dan maupun menurun (*descending*), atau dengan cara elusi horizontal.

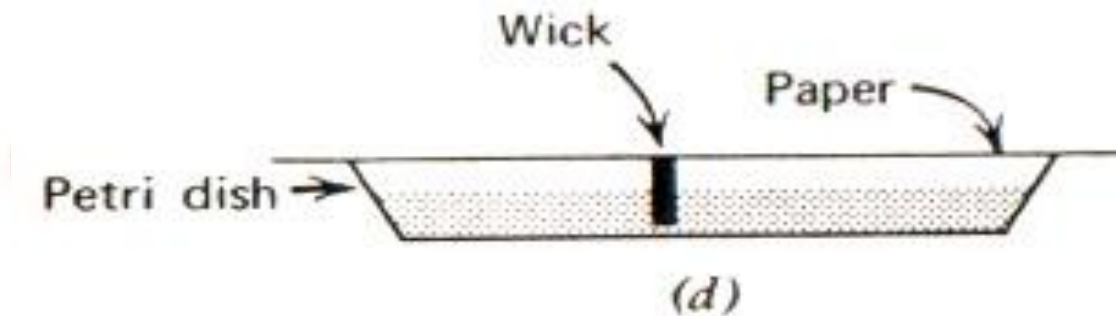
- Untuk cara menaik kertas digantungkan pada penggantung berbentuk kail yang dipasang pada penutup bejana kromatograf. Pelarut berada di dasar bejana. Gambar.7.
- Cara menurun lazimnya dipakai bejana yang lebih besar. Bejana dilengkapi dengan sejenis wadah pelarut yang dipasang pada penopang dan kertas kromatografi dicelupkan kedalam pelarut di dalam wadah itu an di berati dengan batang kaca supaya tetap pada tempatnya.
- Pada kedua cara ini pengembangan terjadi karena kerja kapiler .



Gambar.7. Kromatografi kertas menurun



Gambar.8. Kromatografi kertas menaik



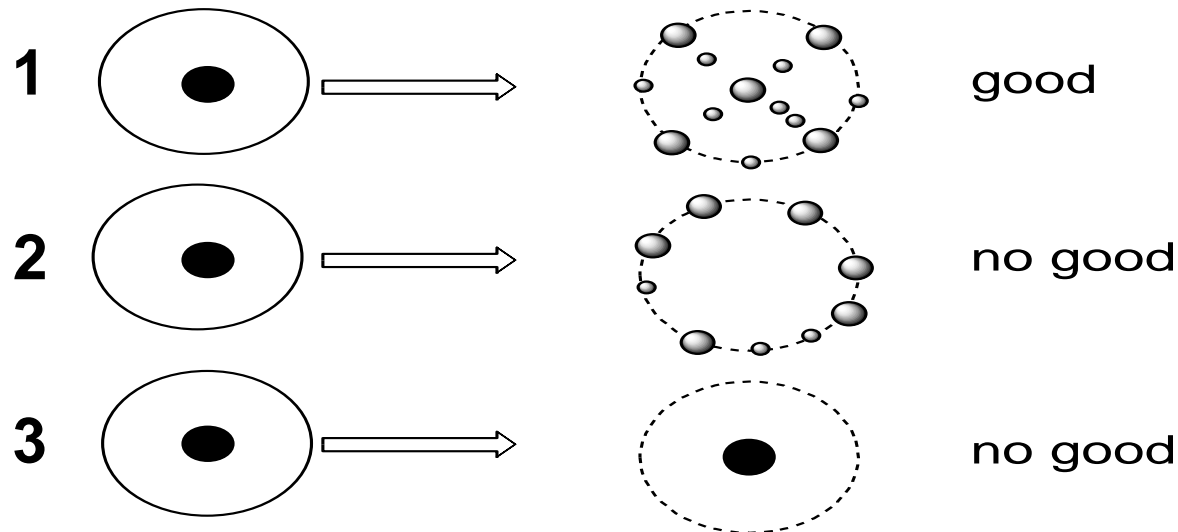
Gambar.9. Kromatografi kertas horizontal

## Pemilihan pelarut/eluen untuk kromatografi Kr. kertas, KLT

- Lihat daftar pustaka
- Lakukan percobaan sendiri, seperti brk :

### Cara Kerja :

- Buat eluen yang diinginkan misal *n*-heksan-etilasetat = 2 : 1 atau  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH} = 5 : 1$  atau  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-air} = 5 : 5 : 1$   
(syaratnya pelarut/eluen harus tercampur sempurna)
- Kemudian campuran senyawa yang akan dipisahkan ditotolkan pada kertas saring dan dibiarkan kering.
- Selanjutnya, teteskan campuran eluen yang telah disiapkan pada tempat penotolan. **Apa yang terjadi ?? 1 atau 2 atau 3 ?**



## • Kromatografi Kertas Preparatif

Prinsip :

- Pada hakekatnya sama dengan KLT preparatif, sampel yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi carik kertas , dan dikembangkan secara tegak lurus pada garis sampel sehingga campuran akan terpisah → beberapa pita.
- Pita ditampakkan dengan cara tidak merusak jika senyawa itu tidak berwarna (*colorless* =tanwarna)
- Pita yang muncul di gunting , kemudian sampel di elusi dari penjerap (serat selulose pada kertas) dengan pelarut polar.
- \* Cara ini dipakai untuk memperoleh komponen campuran dalam jumlah yang memadai (mg sampai gram) dalam keadaan murni sehingga dapat digunakan untuk :
  - telaah pendahuluan
  - menyiapkan sampel analisis
  - meneliti bahan alam yang lazimnya berjumlah kecil dan campurannya rumit.

## C.2.1.b. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS ; KL T ( *Thin Layer chromatography ; TLC* )

Metode ini dirintis tahun 1938 oleh Izmailov dan Schraiber, kemudian tahun 1958 dikembangkan oleh **Stahl**.

- Adsorben (fase diam) dilapiskan pada lempeng yang bertindak sebagai penunjang fase diam.
- Fase gerak akan merayap sepanjang fase diam dan terbentuklah kromatogram.
- Metode ini dikenal sebagai kromatografi kolom terbuka.
- Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan dan sensitif
- Kecepatan pemisahan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan.

- **Fase diam**

Bahan padat pada penyangga : pelat gelas/logam atau plastik dengan ketebalan 0,25 mm.

Fase diam yang banyak dipakai :

- silika gel yang dicampur  $\text{CaSO}_4$
- adsorben lain yang juga banyak dipakai : alumina, kieselguhr, celite, serbuk selulose, serbuk poliamida, kanji dan sephadex.

Kadar air dalam lapisan harus terkendali agar didapat hasil analisis yang reproduibel.

- Pemilihan pelarut dan komposisi lapisan tipis ditentukan oleh prinsip kromatografi yang akan digunakan :
  - pelarut harus non polar dan mudah menguap
  - Sampel ditetaskan/ditotolkan (dengan *micro syringe*) pada salah satu bagian tepi pelat kromatografi sebanyak 0,01 – 10 µg zat.
  - untuk pemisahan digunakan teknik *ascending* yang dilakukan pada suhu kamar sampai permukaan pelarut mencapai tinggi 15 – 18 cm.
  - Waktu yang diperlukan untuk pemisahan 20 – 40 menit.
  - Kolom-kolom dalam pelat dapat diciptakan dengan mengerok lapisan vertikal searah gerakan pelarut.



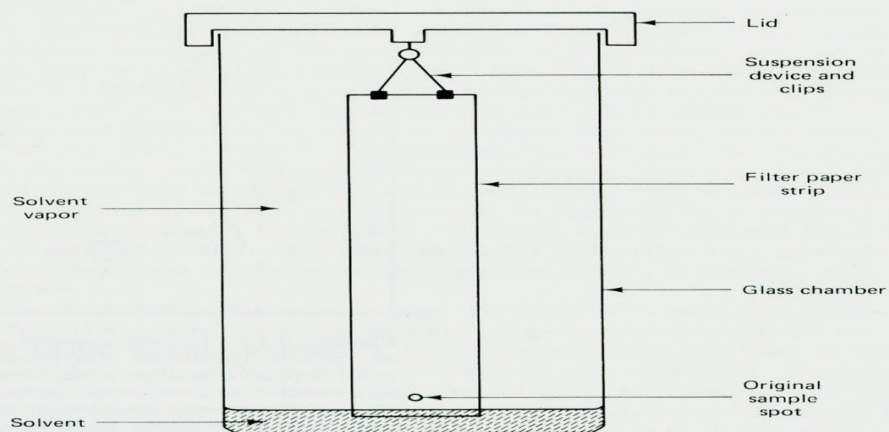
- Semua teknik pada KKt dapat dipakai juga untuk KLT .
- Resolusi KLT lebih tinggi dari KKt karena laju difusi yang luar biasa kecilnya pada lapisan pengadsorpsi.

- **RPPC (*Reversed Phase Partition Chromatography*)**

dapat juga dilakukan pada KLT, dengan menggunakan lapisan yang sudah dicelupkan lebih dahulu pada : parafin, minyak silikon, polietilen glikol dan lain-lain.

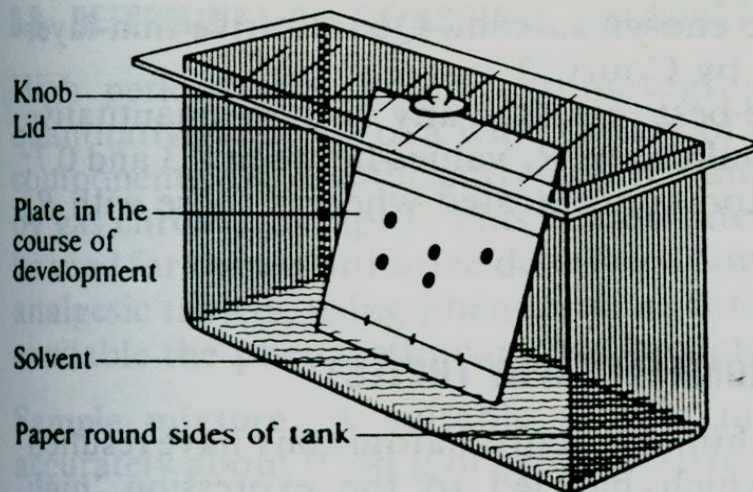
- Pelarut yang digunakan adalah asam asetat atau asetronitril. Kadangkala waktu yang diperlukan untuk RPPC cukup lama.
- Bercak zat bewarna setelah elusi dapat terlihat langsung, tetapi dapat juga digunakan pereaksi semprot untuk melihat bercak suatu zat. Untuk zat organik sering digunakan asam kromat .

- Untuk menempatkan posisi suatu zat, pereaksi semprot dapat juga disemprotkan pada bagian tepi saja. Bagian lainnya dapat diperoleh kembali tanpa pengotoran dengan pengerokan setelah pemisahan selesai.
- Untuk analisis kuantitatif dapat digunakan plot Fotodensitometer. Analisisnya dapat dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis, IR atau fluoresens atau dengan reaksi kolorimetri.
- **Aplikasi sangat luas:**
  - Untuk senyawa yang mudah menguap serta termolabil untuk KC.
  - Uji cemaran
  - Pemisahan dari : plasticiser, dalam kimia forensik, tinta , formula zat pewarna dan pemisahan anorganik.



**Figure 18.11** Ascending form of paper chromatography.

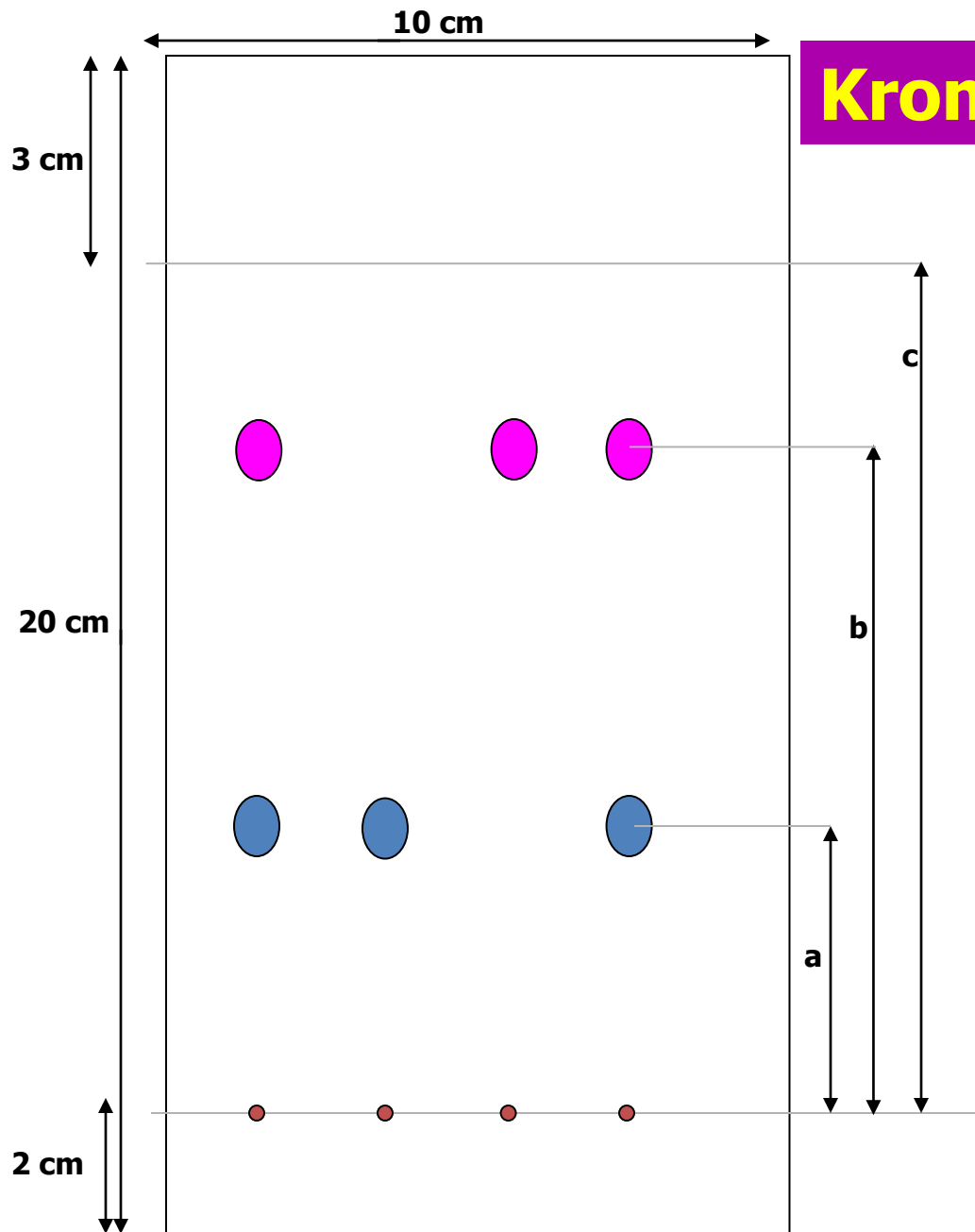
<sup>4</sup>R. Consden, A. H. Gordon, and A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).



**Fig. 8.6** Reproduced from D. Abbott and R. S. Andrews, *An Introduction to Chromatography*, Longman, London, 1965.

- **Profil kromatogram**

- kromatogram KLT akan tampak setelah visualisasi dengan cara fisika atau kimia
- Bila proses pemisahan baik → bercak/ noda bulat
- Bila pemisahan kurang sempurna → bercak berekor , penyebabnya antara lain ;pemilihan fase gerak yang tidak tepat dan ketidak jenuhan chamber.
- Penotolan sampel dengan mikropipet
- Selama eluasi suhu harus dijaga , karena kenaikan suhu berpengaruh pada  $R_f$ .



Kromatogram KLT

## Kromatogram: PC & TLC

KLT, FI IV <281>

- Tebal lempeng 0,25 mm ;  
(Silikagel GF254)
- Jarak penotolan dengan tepi lempeng: 2 cm
- Volume penotolan 10  $\mu$ l
- Fase gerak:  $\text{CHCl}_3$  + MeOH + Air (180:15:1)
- Jarak rambat fase gerak: (3/4 tinggi lempeng)

$$R_f = \frac{\text{Jarak rambat bercak}}{\text{Jarak rambat fase gerak}}$$

$$R_f A = a/c$$

$$R_f B = b/c$$

# KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF (KLTP )

- KLTP dapat dipakai dengan dua cara:

- KLTP sebenarnya
- untuk memandu kondisi untuk kromatografi kolom (KCKT)

## Penjerap (adsorben )

- Ketebalan 0,5 – 2 mm
- Ukuran pelat 20 x 20 cm atau 20 x 40 cm
- penjerap yang paling umum : silika gel → untuk pemisahan campuran senyawa liofil maupun hidrofil.
- Pelat KLTP dapat dibuat sendiri atau menggunakan pelat siap pakai sudah terlapisi penjerap atau pelat pralapis.
- Keuntungan membuat pelat sendiri kita dapat mengatur ketebalan dan susunan lapisan,  $\text{AgNO}_3$  , senyawa dapar dapat dicampur dengan penjerap.

- Pembuatan pelat dapat dikerjakan dengan memakai alat dari Camag alat Desaga.

### •**Penotolan sampel**

- Sebelum ditotolkan sampel dilarutkan dalam sedikit pelarut (pelarut atsiri : heksan diklormetan, etil asetat)
- konsentrasi sampel 5 – 10 %, ditotolkan berupa pita sesempit mungkin karena pemisahan bergantung pada pelebaran pita.
- penotolan dapat dilakukan dengan tangan ,tetapi lebih baik dengan alat penotol otomatis ( Camag , atau Desaga).

### **Pemilihan Fase gerak dan pengembangan pelat KLTP**

- Pada KLTP sampel 10 – 100 mg dapat dipisahkan pada lapisan silika gel atau aluminium oksida 20x20 cm yang tebalnya 1 mm, jika tebal didua kalikan → sampel dapat ditingkatkan 50%.

- Pilihan pelarut ditentukan berdasarkan pemeriksaan pendahuluan memakai KLT analitik.  
Karena ukuran partikel penjerap kira-kira sama maka pelarut pada KLT dapat langsung dipakai untuk KLTP ( Stahl-1967)
- fase gerak biner yang sering dipakai :  
n heksan – etil asetat; n heksan – aseton dan kloroform – metanol
- Penambahan sedikit asam asetat atau dietil amin berguna untuk memisahkan, berturut-turut senyawa asam dan senyawa basa.
- Pengembangan pada pelat KLTP biasanya dilakukan dalam bejana kaca yang dapat menampung beberapa pelat.
- Bejana di jaga tetap jenuh pelarut pengembang dengan bantuan sehelai kertas saring yang ter celup kedalam pengembang.
- Keefisienan pengembang dapat ditingkatkan dengan pengembangan berulang. Bergantung pada  $R_f$  pita proses ini dapat di ulang beberapa kali.



- **Isolasi senyawa yang sudah terpisah**
  - Kebanyakan penjerap KLTP mengandung indikator fluoresensi yang membantu kedudukan pita yang terpisah sepanjang senyawa yang dipisahkan menyerap sinar UV.
  - Beberapa indikator menimbulkan masalah misalnya: bereaksi dengan asam , bahkan kadang- kadang dengan asam asetat.
- **Untuk senyawa yang tidak menyerap UV :**
  - menyemprot dengan air (saponin)
  - menutup pelat dengan sepotong kaca menyemprot salah satu sisi dengan pereaksi semprot
  - menambahkan senyawa pembanding.

Pita yang kedudukannya telah diketahui dikerok dari pelat dengan spatula atau pengerok berbentuk tabung yang disambungkan ke pengumpul vakum. Senyawa yang diperoleh di ekstraksi dari penjerap (adsorben) dengan pelarut yang paling kurang polar ( 5ml pelarut untuk 1 gram penjerap

## LATIHAN SOAL :

1. Dalam satu sampel terdapat senyawa X dan Y mempunyai waktu retensi 16,4 menit dan 17,63 menit pada kolom 30 cm. Spesies tidak terserap mempunyai waktu retensi 1,30 menit. Lebar dasar puncak masing masing, 1,11 dan 1,21 mm. Hitung Resolusi kolom, jumlah pelat rata-rata dan tinggi pelat

### **Petunjuk cara menjawab ;**

- Untuk resolusi gunakan persamaan  $\rightarrow R = 2(t_2 - t_1) / (W_2 + W_1)$
- Untuk jumlah piringan / plat  $\rightarrow N = 16 (t_R / W_b)^2$
- Untuk tinggi pelat  $H = L / N$

2. Dalam pemisahan suatu sampel yang mengandung zat x, y, dan Z secara kromatografi Kertas (K Kt) , tinggi permukaan pelarut atau jarak rambat pelarut 15 cm , sedangkan untuk masing-masing zat tersebut adalah 13, 10 dan 5 cm. Hitung nilai  $R_f$  untuk semua zat tersebut dan gambarkan profil kromatogramnya.

Petunjuk cara menjawab:

kita dapat menghitung  $R_f$  dari hubungan

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

$$R_{f_x} = 13/15$$

3. Dalam suatu pemisahan suatu campuran dengan KLT nilai  $R_f$  untuk senyawa yang tidak diketahui adalah 0,809. Jarak rambat untuk senyawa A, B dan C masing-masing adalah 24, 28, 30 cm, sedangkan jarak rambat pelarut atau fase gerak 34 cm. Tentukan senyawa yang tidak diketahui.

**Petunjuk cara menjawab :**

- Hitung nilai  $R_f$
- Cari nilai  $R_f$  yang mirip dengan  $R_f$  0,809

4. Tuliskan apa yang dimaksud dengan :

- |                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| - Koefisien partisi | - resolusi             |
| - waktu retensi     | - jumlah plat teoritis |
| - faktor retardasi  | - HETP                 |