



**UNIVERSITAS
PANCASILA**
"A PLACE TO CREATE YOUR SUCCESS"



MODUL PEMBELAJARAN ANALISIS INSTRUMENTAL SEMESTER GENAP 2025-2026

III. KROMATOGRAFI

PERTEMUAN 8 DAN 9

Dosen:

Dr. apt. Zuhelmi Aziz., M.Si.

Dr. apt. Novi Yantih., M.Si.

Dr. apt. Liliek Nurhidayati., M.Si.

Dr. apt. Rahmatul Qodriah., M.Farm.

apt. Intan Permata Sari., M.Farm.

SUB POKOK BAHASAN

A. Pendahuluan

B. Teori Dasar

C. KLT – Densitometri

D. Kromatografi Gas

E. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

A. Pendahuluan

- Definisi
- Perkembangan
- Pembagian Kromatografi
- Keunggulan
- Aplikasi

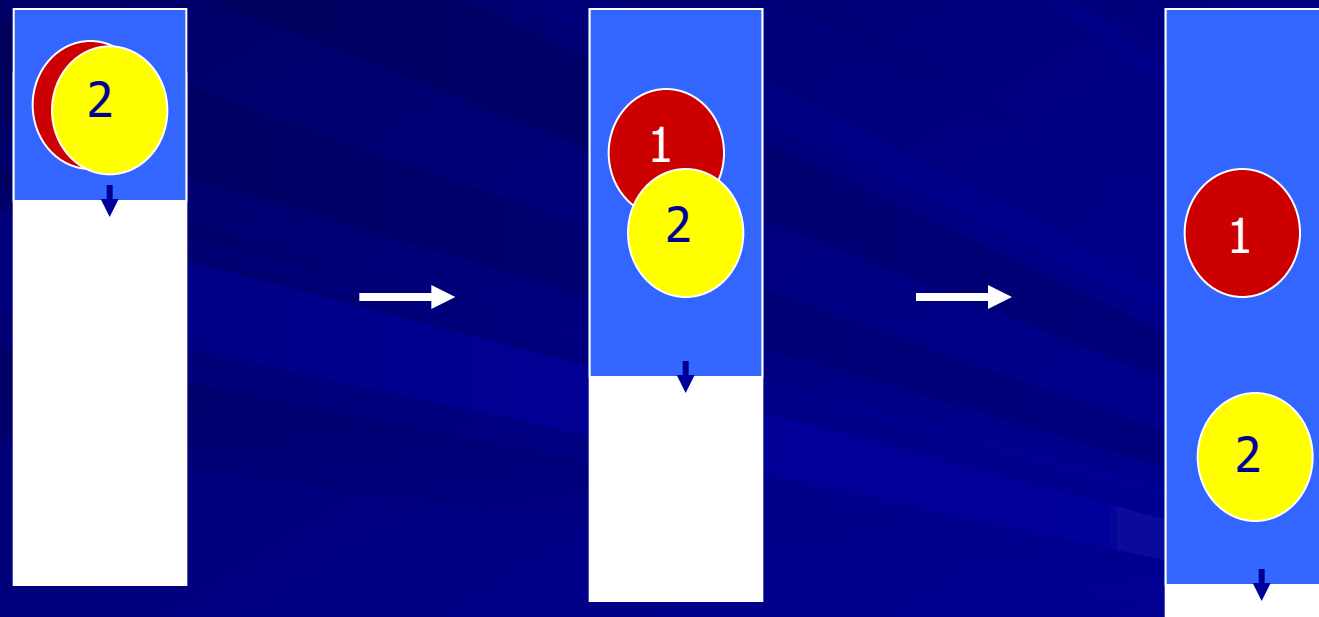
■ Definisi

Kromatografi adalah tehnik pemisahan secara fisika yang didasarkan atas perbedaan laju migrasi / distribusi analit diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak.

Laju migrasi analit ditentukan oleh dua faktor yang didasarkan atas afinitasnya terhadap fase gerak dan fase diam,yaitu:

1. Tertahannya analit pada fase diam. Makin kuat afinitasnya terhadap fase diam, makin lama tertahannya pada fase diam dan makin lambat lajunya dibanding laju fase gerak.
2. Terbawanya analit melaju bersama fase gerak. Makin kuat afinitasnya terhadap fase gerak makin cepat lajunya meninggalkan fase diam dan melaju makin mendekati laju fase gerak.

Mekanisme Pemisahan: Perbedaan laju migrasi komponen campuran diantara fase diam dan fase gerak.



■ Fase gerak
■ Fase diam

① Analit 1, afinitasnya > thd fase diam
② Analit 2, afinitasnya > thd fase gerak

- Manfaat kromatografi adalah untuk mengatasi masalah pemisahan atau analisis campuran analit dengan komponen mayor maupun minor dalam matriks yang kompleks, misalnya: sampel bahan alam, sampel biomedik, minyak, analisis obat, makanan dll.
- Kromatografi (terutama HPLC) merupakan metode penting yang dimuat dalam farmakope.

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*).

- Sejalan dengan perkembangan teknologi kolom, instrumentasi dan komputasi, teknik *HPLC* dan *TLC* sekarang merupakan teknik analisis campuran yang ampuh karena kecepatannya, kepekaannya, keakuratan dan ketelitiannya.
- Kedua teknik tersebut sekarang dikenal dengan *HPLC* (*High Performance Liquid Chromatography*) dan *HPTLC* (*High Performance Thin Layer Chromatography*) dan paling banyak digunakan di bidang farmasi.

Divisi penjaminan mutu di industri farmasi melakukan pemisahan campuran zat menggunakan kromatograf cair kinerja tinggi. Hasil analisis didapatkan dua zat menunjukkan laju migrasi yang sangat berbeda. Apakah faktor yang menyebabkan perbedaan tersebut?

- A. perbedaan warna antara kedua zat dalam dua fase
- B. perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak
- C. perbedaan titik didih kedua zat dalam fase diam
- D. perbedaan kepolaran fase gerak terhadap fase diam
- E. jumlah zat yang disuntikkan ke kolom fase diam

Pemisahan beberapa analit dengan kromatografi kolom menunjukkan adanya analit yang memiliki interaksi lebih kuat terhadap fase diam. Bagaimana profil analit dimaksud pada pemisahan tersebut?

- A. Analit akan larut sempurna dalam fase gerak
- B. Laju migrasi analit akan lebih cepat dari fase gerak
- C. Analit tidak akan bergerak sama sekali karena beda polaritas
- D. Analit akan tertahan lebih lama dan bergerak lebih lambat
- E. Analit akan terbawa oleh fase gerak dengan sangat cepat

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)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Kromatografi Gas (GSC, GLC) ■ Kromatografi Cair (LLC, LSC) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ GLC, GSC ■ CC, PC, TLC, HPLC
2. Mekanisme Pemisahan	<ul style="list-style-type: none"> ■ Kromatografi Adsorpsi (GSC, LSC) ■ Kromatografi Partisi (LLC) ■ Kromatografi Pasangan Ion ■ Kromatografi Pertukaran Ion ■ Kromatografi Eksklusi 	<ul style="list-style-type: none"> ■ CC, GSC, TLC, ■ GLC, PC, TLC, HPLC ■ IPC ■ IEC ■ GPC
3. Teknik Pemisahan	<ul style="list-style-type: none"> ■ Kromatografi Menurun, Menaik, Melingkar, ■ Kromatografi Dua Dimensi ■ Kromatografi Isokratik ■ Kromatografi Gradien ■ Kromatografi Fase Normal ■ Kromatografi Fase Balik ■ Kromatografi Fase Terikat 	<ul style="list-style-type: none"> ■ PC ■ TLC ■ HPLC ■ HPLC ■ HPLC ■ HPLC ■ HPLC
4. Geometri Tempat Pemisahan.	<ul style="list-style-type: none"> ■ Kromatografi Kolom ■ Kromatografi Bidang Datar (<i>Planar Chromatography</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ CC, GC, HPLC ■ PC, TLC, HPTLC

Teknik kromatografi lain :

berdasarkan suhu kritik → prinsipnya merupakan pengembangan metode KG dan KCKT, fase gerak yang digunakan adalah gas karbon dioksida dalam keadaan super kritik.

Metode disebut : *Super Fluid critical Chromatography* =
SFC

Keunggulan

Keunggulan GC, HPLC dan HPTLC dibanding metode lain

- Resolusi tinggi (pemisahan analit baik)
- Pemisahan (waktu analisis) cepat
- Eluat dimonitor secara kontinyu
- Akurat
- Teliti
- Otomasi prosedur dan pengolahan data

Keunggulan HPLC / HPTLC dibanding GC

- Tidak terbatas hanya untuk senyawa mudah menguap dan tahan panas.
- Lebih banyak pilihan terhadap fase diam maupun fase gerak.

Keunggulan HPTLC dibanding HPLC

- Lebih dari satu jenis sampel dapat dianalisis sekaligus
- Kromatogram dapat disimpan / difoto sebagai dokumen otentik.

Aplikasi

- Kromatografi digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap sampel dengan analit tunggal maupun campuran dengan komponen mikro maupun makro, uji cemaran, maupun uji residu di berbagai bidang. Di bidang farmasi, kromatografi merupakan metode yang paling banyak digunakan.
- Analisis Kualitatif
 - R_f : TLC - Densitometry
 - t_R : GC, HPLC
- Analisis Kuantitatif
 - Luas / area bercak : PC, TLC, HPTLC
 - Luas / tinggi puncak : GC, HPLC

B. Teori Dasar

- Istilah
- Efisiensi Kolom: N , HETP
- Proses Pelebaran Puncak : Persamaan Van Deemter
- Selektivitas dan Resolusi
- Fase Diam (kolom)
- Fase Gerak
- Pemilihan Sistem Kromatografi

Istilah

- Beberapa istilah yang digunakan untuk menentukan kinerja kolom (kualitas pemisahan), identifikasi dan penetapan kadar adalah: R_f , t , R_r , A , A_s , k' , N , HETP, R .
- **R_f (*Retardation factor, Ratio of front*)**
 R_f adalah perbandingan jarak rambat bercak dihitung dari pusat penotolan hingga pusat bercak dibagi jarak rambat fase gerak. Harga R_f merupakan identitas suatu zat pada kromatografi bidang datar/kertas (PC, TLC) dengan sistem/kondisi yang sama.
- **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.

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

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

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

- **Koefisien distribusi atau koefisien partisi (K)**

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

$$K = C_s / C_m$$

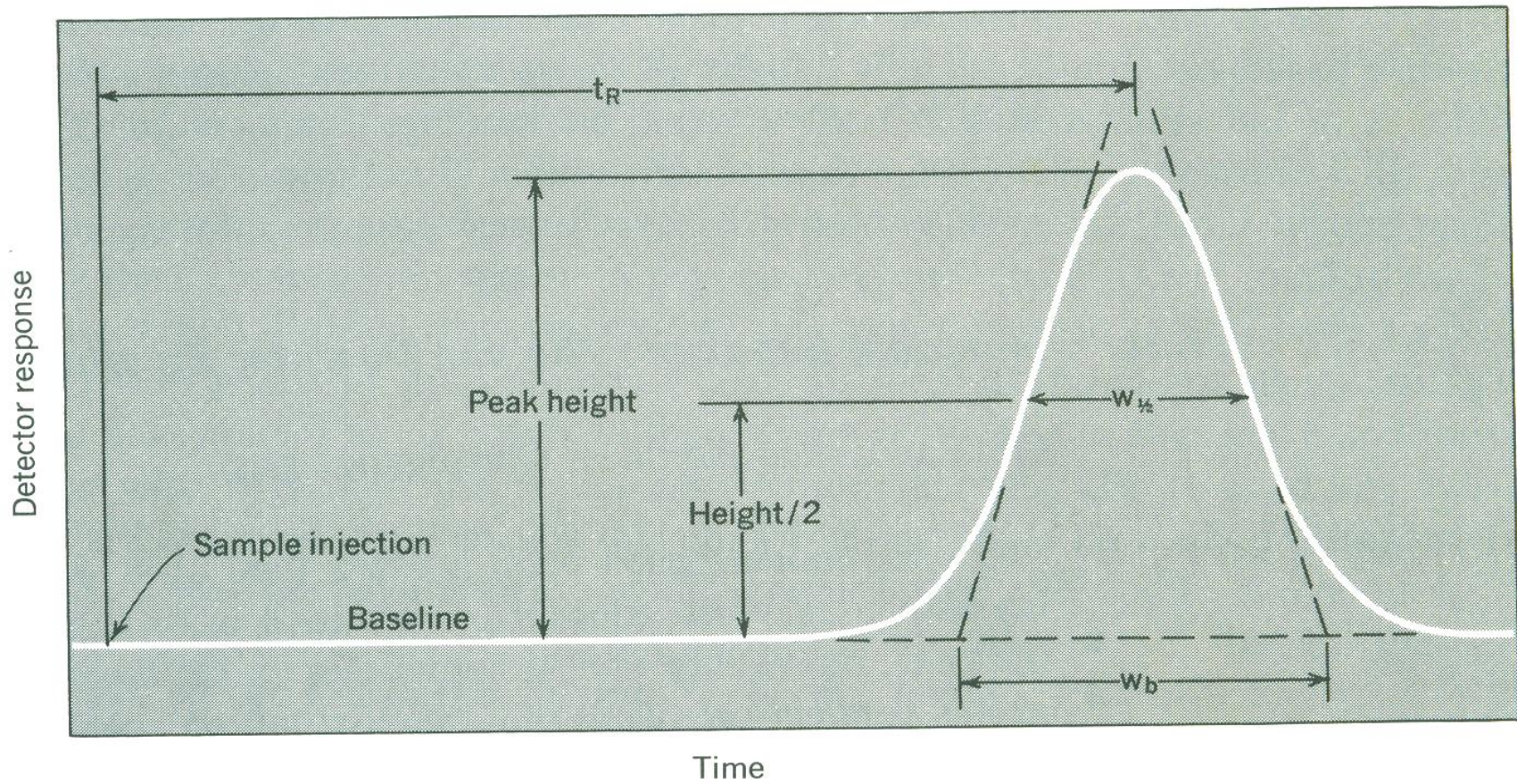


Figure 17.3 Chromatographic elution band showing measurement of t_R and w for estimating n , the number of theoretical plates.

■ Area puncak , A

adalah tinggi puncak (h) x lebar pada setengah tinggi ($W_{h/2}$), atau lebar dasar puncak (w) x tinggi puncak (h) dibagi dua. Luas / area puncak menunjukkan kadar analit. Apabila puncak sempit, maka tinggi puncak dapat digunakan sebagai pengganti area untuk penetapan kadar analit yang bersangkutan.

$$A = h \times W_{h/2} \quad \text{atau} \quad A = (W \times h) : 2$$

■ Faktor simetri (A_s)

Faktor simetri dikenal juga dengan sebutan *faktor ikutan (Tailing Factor)* suatu puncak (lihat gambar 4-FI VI) dihitung dengan :

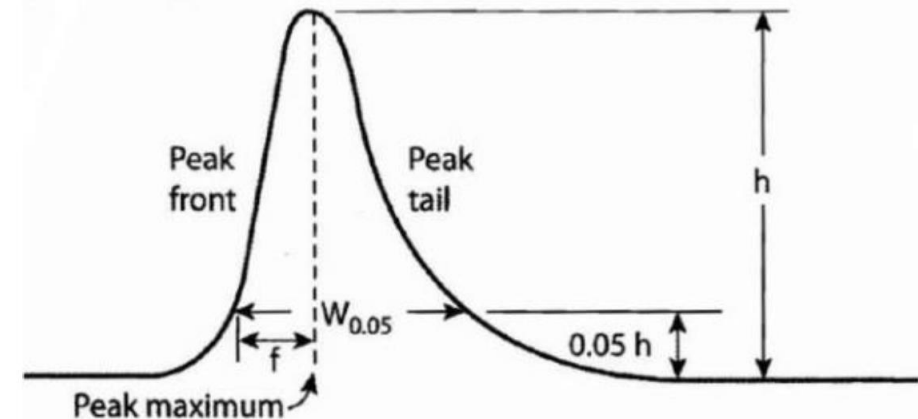
$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

$W_{0,05}$ adalah lebar puncak pada 5% tinggi f adalah jarak dari puncak maksimum terhadap tepi puncak, jarak diukur dari titik 5% tinggi puncak dari garis dasar.

Faktor ikutan (T) lihat faktor simetri.

Jika $T=1 \rightarrow$ puncak simetris

■ Asimetri Puncak



Gambar 4. Puncak kromatografi asimetri

Faktor asimetri dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{faktor asimetri} = \frac{W_{0,1} - f_{0,1}}{f_{0,1}}$$

Dalam FI, gunakan perhitungan faktor simetri.

Noted: 0,1 data pada 10% tinggi

Faktor yang Memengaruhi Asimetri Puncak

Faktor	Pengaruh
pH fase gerak	Mengubah ionisasi analit
Jenis kolom	Aktivitas silanol dan kualitas packing
Volume injeksi	Overload menyebabkan <i>fronting</i>
Komposisi fase gerak	Memengaruhi interaksi analit
Kontaminasi kolom	Menyebabkan <i>tailing</i>
Laju alir	Berpengaruh pada difusi dan efisiensi

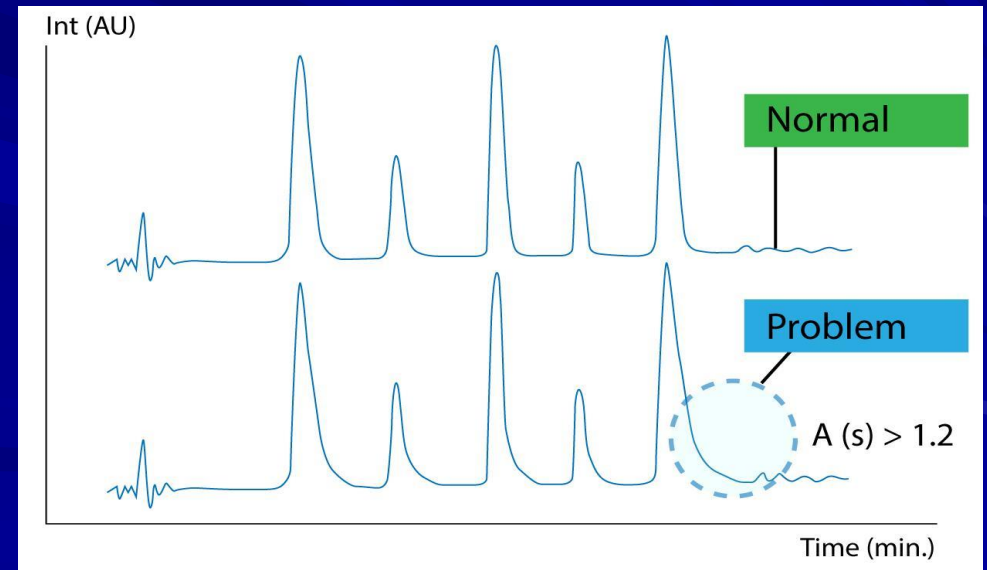
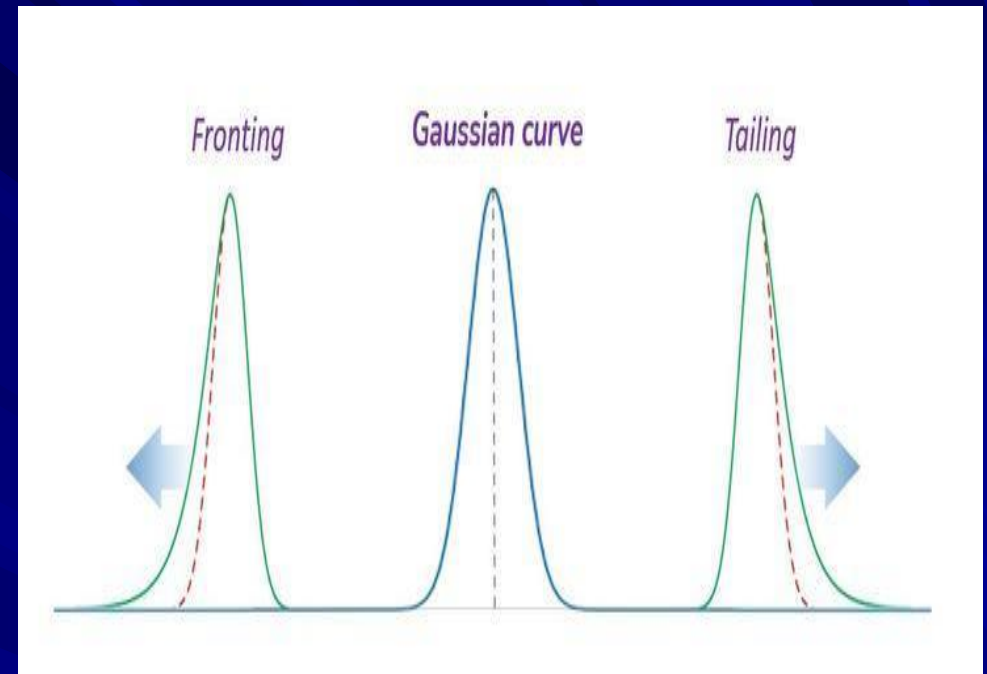
Cara Mengatasi Asimetri Puncak:

Untuk *tailing*:

- Optimasi pH fase gerak
- Gunakan buffer
- Kurangi jumlah injeksi
- Regenerasi/ganti kolom
- Tambahkan *modifier* (misalnya TEA)

Untuk *fronting*:

- Kurangi konsentrasi sampel
- Kurangi volume injeksi
- Ganti kolom jika *packing* rusak



Efisiensi Kolom : N, HETP

Efisiensi kolom ditentukan oleh jumlah lempeng (pelat) teoritis dari kolom tersebut. Makin besar jumlah lempeng teoritis, kolom makin efisien, kualitas pemisahan (resolusi) makin baik dan waktu analisis makin cepat.

Lempeng teoritis (*theoretical plate*) diasumsikan seperti sekat kolom fraksinasi pada penyulingan bertingkat.

■ Jumlah Lempeng Teoritis (N)

N adalah banyak lempeng teoritis sepanjang kolom yang digunakan. Besarnya N menunjukkan efisiensi atau lebar sempitnya puncak. Makin besar N, kolom makin efisien atau puncak makin sempit. $N = 16 (t / W)^2$

■ Tinggi Satu Lempeng Teoritis (HETP = *Height Equivalent to A Theoretical Plate*) atau JSPT = Jarak Setara Pelat Teori:

HETP adalah panjang kolom (L) dibagi jumlah lempeng teoritis (N), atau

$HETP = L / N$. Makin kecil HETP, kolom makin efisien.

Pelebaran Puncak: Persamaan van Deemter

- Melebarnya puncak kromatogram ditentukan oleh faktor difusi dari analit dan ketidakseimbangan transfer massa analit antara fase gerak dan fase diam.
- Difusi tersebut terdiri dari difusi longitudinal pada fase gerak dan difusi melingkar (*eddy diffusion*) karena adanya rongga akibat pengepakan kolom yang kurang kompak dan tidak merata.
Besarnya difusi tersebut ditentukan oleh laju alir fase gerak.

Hubungan dari faktor-faktor tersebut dengan HETP, dapat dinyatakan secara matematis **dengan persamaan van Deemter** sbb:

$$\text{HETP} = A + B/\mu + C\mu$$

A = difusi melingkar,

B/ μ = difusi longitudinal,

C μ = ketidakseimbangan transfer massa.

Penurunan pers Van Deemter secara matematika akan mendapatkan **harga μ_{opt} dan H_{min}** sesuai dengan tujuan semula dari percobaan Van-Deemter untuk memperoleh kedua harga tersebut yaitu :

$$\mu_{\text{opt}} = (B/C)^{1/2}$$

$$H_{\text{min}} = A + 2(B.C)^{1/2}$$

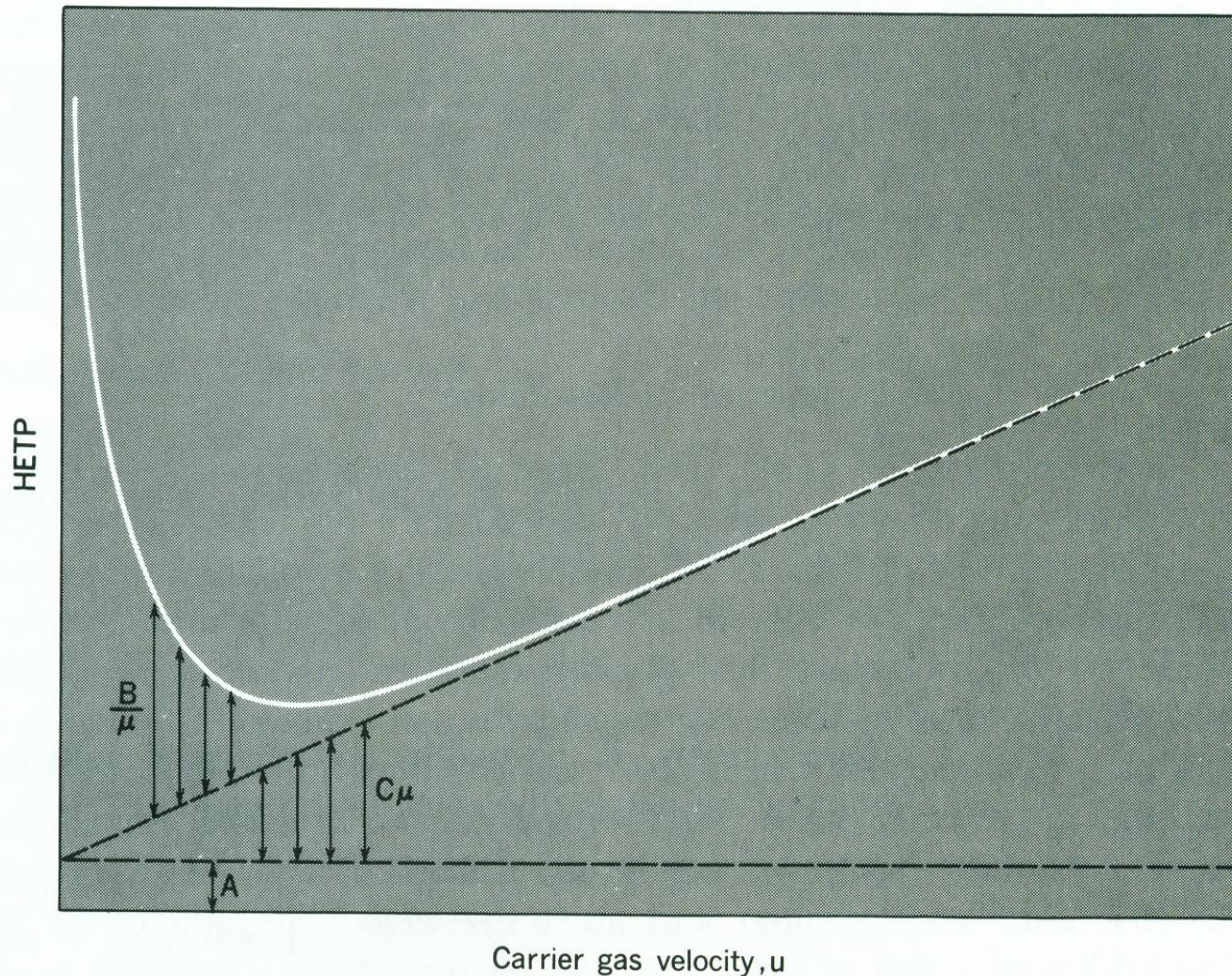


Figure 17.6 Depiction of the van Deemter equation $HETP = A + B/u + Cu$. Note that the contribution of the A -term to HETP is independent of velocity, that B/u increases as velocity decreases, and that Cu predominates at high velocities.

Dari grafik persamaan van Deemter dapat ditetapkan laju alir fase gerak optimum untuk percobaan tertentu.

Disamping itu besar-kecilnya difusi melingkar, menggambarkan kualitas pengepakan kolom.

Selektivitas dan Resolusi

■ Selektivitas (α)

Selektivitas kolom adalah kemampuan kolom untuk membedakan analit yang satu dengan analit yang lain. Hal ini ditentukan oleh perbedaan waktu retensi (t) atau koefisien partisi (K) dari kedua analit tersebut. Makin besar nilai waktu retensi relatifnya, makin baik selektivitas dari kolom tersebut.

Faktor selektivitas (faktor separasi, retensi relatif) dapat dinyatakan dengan rumus sbb:

$$\alpha = t_2 / t_1 = K_2 / K_1$$

Resolusi (R)

- Resolusi adalah tingkat kesempurnaan atau kualitas pemisahan analit. Makin besar nilai resolusi, pemisahan makin sempurna.
- Nilai $R = 1$ (tumpang-tindih 2%), pemisahan sudah dapat diterima. Bila $R = 1,5$ (tumpang-tindih 0,3%), pemisahan hampir sempurna.
- Resolusi ditentukan oleh faktor: kapasitas, selektivitas dan efisiensi kolom. Baik-buruknya resolusi terlihat dari perbedaan waktu retensi dan lebar dasar puncak, seperti yang dinyatakan dalam rumus berikut:

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

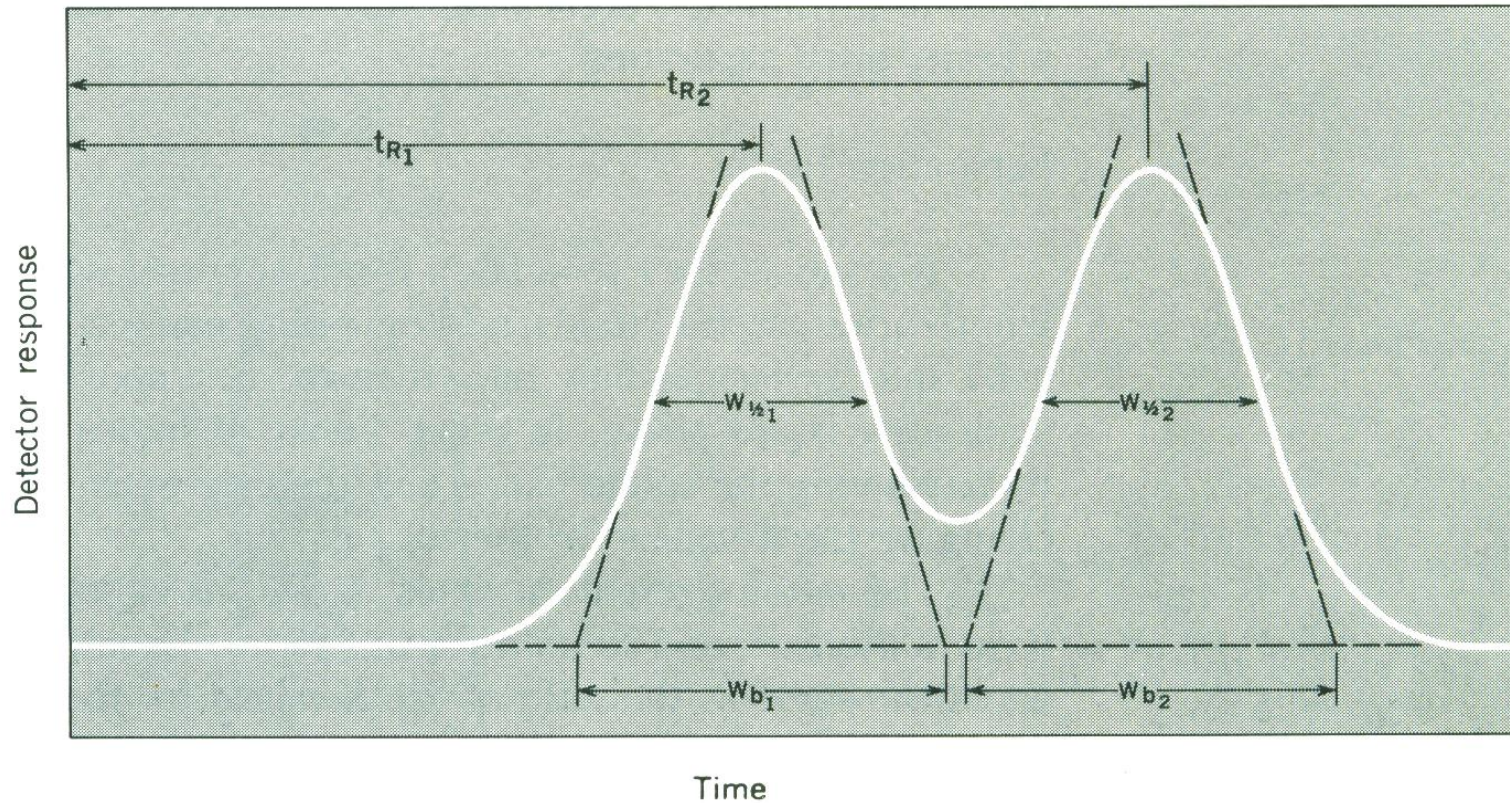


Figure 17.7 Measurements used to calculate the resolution, R , of two peaks

Pada pemisahan campuran zat menggunakan kromatografi, didapatkan analit A tertahan lebih lama di fase diam dibandingkan analit B. Bagaimanakah waktu retensi analit A?

- A. Waktu retensi analit A sama dengan analit B
- B. Waktu retensi analit A lebih lama dibandingkan analit B
- C. Waktu retensi analit A lebih cepat dibandingkan analit B
- D. Waktu retensi analit A dua kali lebih cepat dibandingkan analit B
- E. Waktu retensi analit A tiga kali lebih cepat dibandingkan analit B

Metode kromatografi dikelompokkan antara lain berdasarkan: fase gerak, mekanisme pemisahan, dan geometri tempat pemisahan salah satunya merupakan dasar klasifikasi utama. Apa yang menjadi dasar klasifikasi utama metode kromatografi tersebut?

- A. bidang pemisahan
- B. cara pelaksanaan
- C. fase gerak
- D. interaksi didalam fase diam
- E. asas pemisahan

Grafik persamaan van Deemter ($HETP = A + B/\mu + C\mu$) menggambarkan kondisi optimum dari sistem kromatografi gas, dari grafik tersebut diperoleh nilai dua parameter yang salah satunya dapat dihitung dengan rumus $(B/C)^{1/2}$. Apa nama parameter yang dihitung dengan rumus tersebut?

- A. H minimum
- B. H optimum
- C. laju alir minimum
- D. H maksimum
- E. Laju alir optimum

- Pada penetapan kadar asam barbiturat yang dilakukan dengan kromatografi gas, diperoleh data antara lain waktu retensi; t_R , adalah 4.6 menit, lebar puncak pada 5% tinggi puncak dari garis dasar; $W_{0,05}$ adalah 0,28 cm. Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak pada 5% tinggi puncak dari dasar, f adalah 0,12 cm. Hitung faktor ikutan; T , dari bahan baku tersebut.
A. 1,157 B. 1,167 C. 1,176 D. 1,266 E. 1,276

- Suatu analisis obat dalam sediaan tablet dengan metode GLC diperoleh hasil Lebar alas puncak 0,075 men dengan waktu retensi 4,5 men. Berapakah N pada sistem kromatograf tersebut?
A. 5760 B. 6570 C. 54700 D. 56700 E. 57600

- Laboratorium R & D sedang mengembangkan metode analisis formula baru dari parasetamol dan kofein dalam tablet pereda nyeri secara KCKT fase balik. Hasil optimasi metode dengan teknik isokratik diperoleh resolusi analit dan matriksnya = 1,0. Apakah langkah selanjutnya berdasarkan hasil optimasi tersebut?
A. Mengganti fase gerak
B. Mencoba kolom fase normal
C. Meningkatkan laju alir
D. Melakukan elusi gradien
E. Meningkatkan suhu kolom

Mekanisme pemisahan

- Adsorpsi (*adsorption*)
- Partisi (*partition*)
- Fase Terikat (*bonded phase*)
- Pertukaran Ion (*ion exchange*)
- Pasangan Ion (*ion pairing*)
- Eksklusi (*gel permeation*)
- Afinitas (*affinity*)

Mekanisme Pemisahan

■ Adsorpsi

- Fase diam berupa zat padat.
- Pemisahan karena adsorpsi berdasarkan polaritas fase diam.
- Fase diam polar (silika: -Si-OH) mengadsorpsi lebih kuat terhadap molekul solut polar dengan urutan sbb: $-\text{CO}_2\text{OH} > -\text{OH} > -\text{NH}_2 > -\text{SH} > -\text{CHO} > -\text{CO} > -\text{CO}_2\text{R} > -\text{OCH}_3 > -\text{CH}=\text{CH}-$
- Fase diam non-polar (carbon) mengadsorpsi lebih kuat terhadap molekul solut non-polar.
- Kurang cocok untuk memisahkan seri homolog, karena penambahan gugus $-\text{CH}_2-$ tidak cukup untuk membedakan polaritas.

■ Partisi

- Fase diam berupa zat cair.
- Pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi atau partisi solut diantara dua fase.
- Solut dengan kelarutan yang lebih besar pada fase diam akan mempunyai koefisien partisi (K) lebih besar, dan akan tertahan dalam kolom lebih lama (t lebih besar).

$$K = C_s / C_m$$

Mekanisme Pemisahan

■ Bonded Phase

- Mengatasi masalah pada kromatografi partisi yaitu ikut terbawanya fase diam (zat cair) karena dorongan fase gerak (*sheer forces*).
- Gugus silanol dari permukaan suport silika direaksikan dengan pereaksi tertentu (misalnya, organoklorosilan) , membentuk ikatan kimia (*bonded phase*) yang stabil terhadap hidrolisis.




- Setelah reaksi, permukaan support silika berubah menjadi fase diam yang bersifat non-polar atau polar.

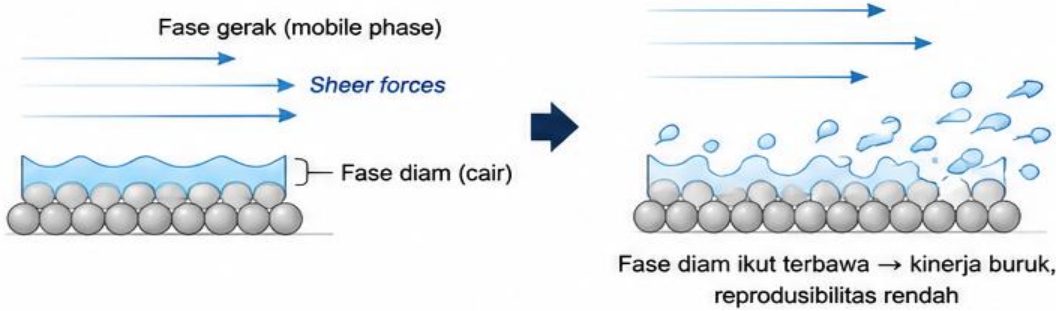
Rantai hidrokarbon R biasanya –CH₃ dan sifatnya makin non-polar bila rantai karbon diperpanjang (C₆, C₈ atau C₁₈). Dengan substansi terminal-CH₃ dengan gugus polar (-CN atau NH₂) akan diperoleh fase diam yang polar.

Fase diam polar digunakan pada kromatografi fase normal (NPC), sedangkan fase diam non-polar digunakan pada kromatografi fase balik (RPC).

BONDED PHASE

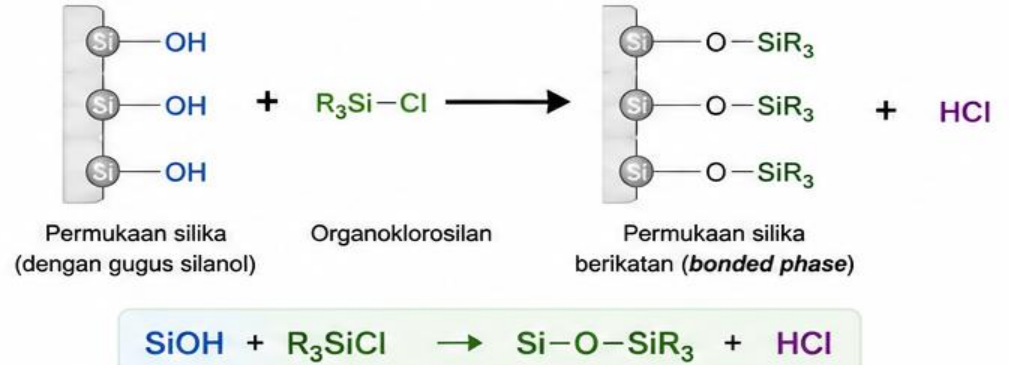
 Mengatasi masalah pada kromatografi partisi yaitu ikut terbawanya fase diam (zat cair) karena dorongan fase gerak (*sheer forces*).

MASALAH PADA KROMATOGRAFI PARTISI



PEMBENTUKAN BONDED PHASE

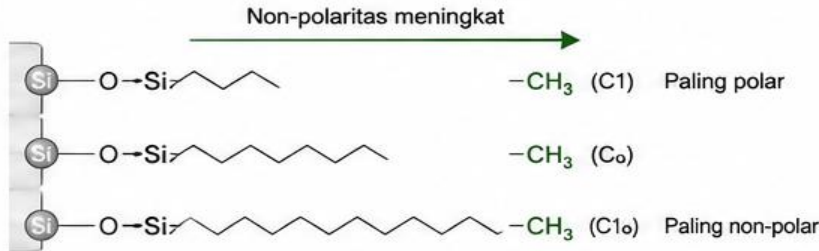
Gugus silanol dari permukaan suport silika direaksikan dengan pereaksi tertentu (misalnya, organoklorosilan), membentuk ikatan kimia (*bonded phase*) yang stabil terhadap hidrolisis.



Setelah reaksi, permukaan suport silika berubah menjadi fase diam yang bersifat non-polar atau polar.

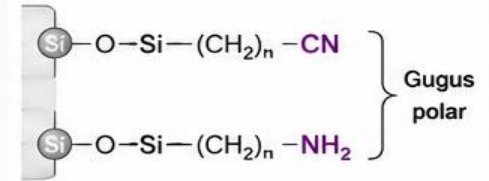
Rantai hidrokarbon (R)

R biasanya $-CH_3$ dan sifatnya makin non-polar bila rantai karbon diperpanjang (C₀, C₈ atau C₁₈).



Substitusi terminal

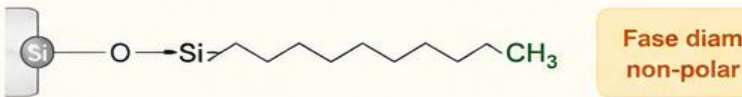
Dengan substitusi terminal $-CH_3$ dengan gugus polar akan diperoleh fase diam yang polar.



PENGGUNAAN DALAM KROMATOGRAFI

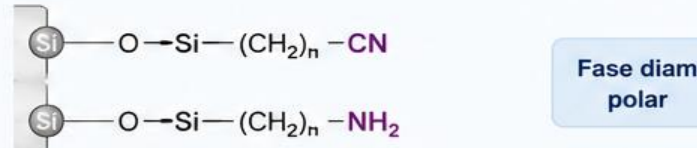
Kromatografi Fase Balik (RPC)

Menggunakan fase diam non-polar (misal: C₁₀, C₀, C₈, C₁)




Kromatografi Fase Normal (NPC)

Menggunakan fase diam polar (misal: $-CN$, $-NH_2$, $-OH$, $-Diol$, dll)



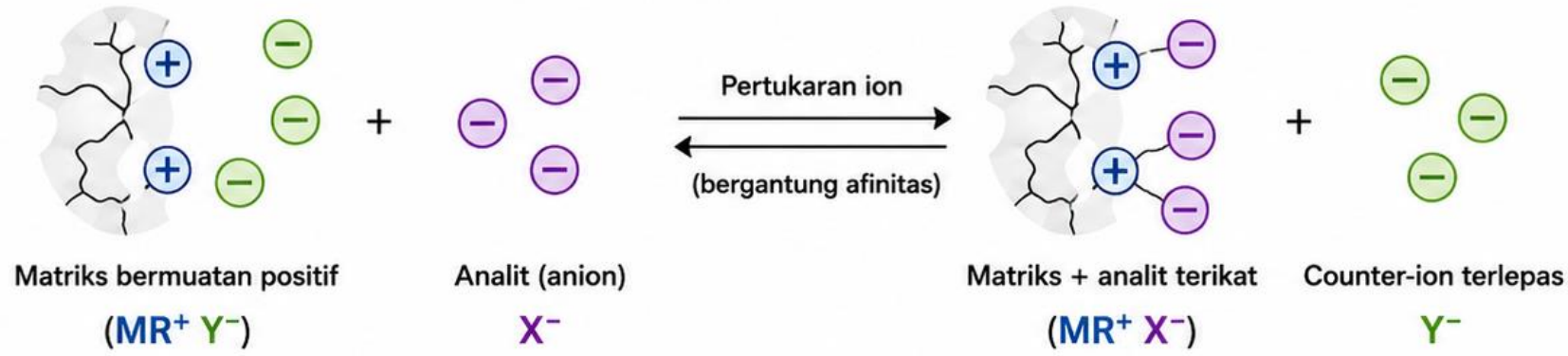
KETERANGAN

-  = Atom Si pada permukaan silika
- $-OH$ = Gugus silanol
- R_3Si-Cl = Organoklorosilan
- $-O-SiR_3$ = Ikatan siloksi (*bonded phase*)

■ **Ion-Exchange**

- Fase diam dapat berupa butir silika atau polimer (kopolimer) stiren dan divinil benzen yang disebut matriks dimana pada permukaannya terikat penukar ion bermuatan positive atau negatif (R^+ atau R^-) yang mengikat counter-ions dengan muatan yang berlawanan. Fase diam yang berupa kopolimer tersebut dinamakan resin penukar ion (resin penukar anion atau resin penukar kation).
- Mekanisme pemisahan didasarkan atas pertukaran ion-ion pada fase gerak (analit) dengan *counter-ions* tergantung afinitasnya terhadap matriks.
 1. *Anion-Exchange*: $MR^+Y^- + X^- = MR^+X^- + Y^-$
 2. *Cation-Exchange*: $MR^-Y^+ + X^+ = MR^-X^+ + Y^+$
- Disamping untuk analisis senyawa ionik pada Kromatografi Ion (IC), resin penikar ion sering digunakan untuk pengolahan air dalam industri.

1. ANION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

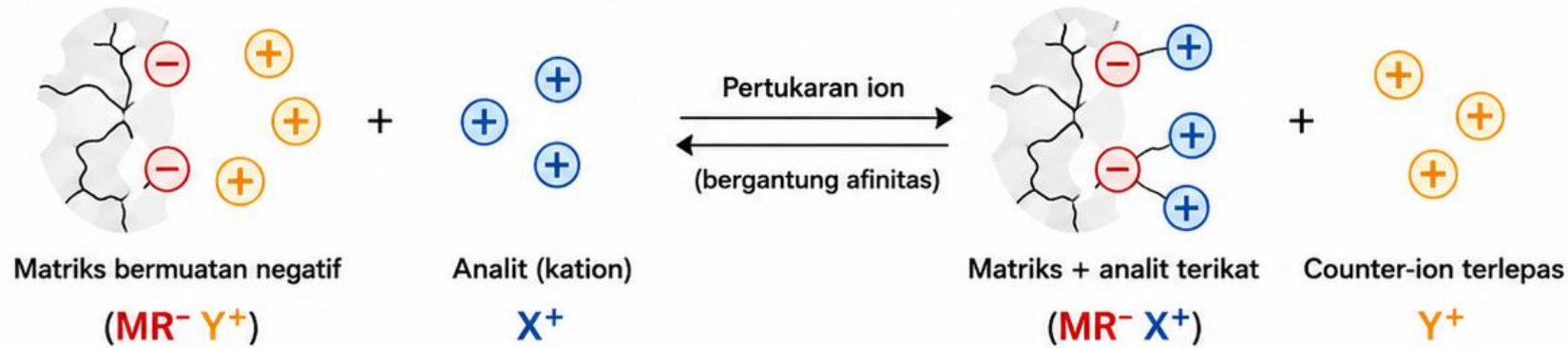


Keterangan:

- MR^+ = Matriks bermuatan positif
- Y^- = Counter-ion awal
- X^- = Anion analit

Anion dengan afinitas lebih tinggi terhadap matriks akan terikat lebih kuat dan terelusi lebih lambat.

2. CATION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY



Keterangan:

- MR^- = Matriks bermuatan negatif
- Y^+ = Counter-ion awal
- X^+ = Kation analit

Kation dengan afinitas lebih tinggi terhadap matriks akan terikat lebih kuat dan terelusi lebih lambat.

Inti Mekanisme:

Ion analit (X^- atau X^+) dalam fase gerak masuk ke kolom



Terjadi pertukaran ion dengan counter-ion (Y^- atau Y^+) pada matriks



Analit yang berafinitas lebih kuat terhadap matriks tertahan lebih lama, yang lemah terelusi lebih cepat



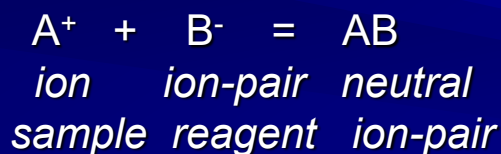
Terjadi pemisahan berdasarkan perbedaan afinitas ion terhadap matriks (fase diam)

■ Ion-Pairing

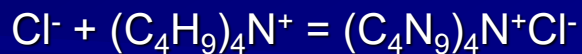
Metode ini digunakan untuk mengatasi masalah resolusi dari senyawa ionik (misalnya, anion anorganik: Cl^- , SO_4^{2-} dll) atau senyawa yang dapat terionisasi (misalnya, RCOOH).

Pada kromatografi fase balik, senyawa tersebut terlalu polar untuk berinteraksi dengan fase diam yang non-polar (*hydrocarbon bonded stationary phase*) sehingga retensinya pada kolom sangat lemah.

Untuk mengurangi polaritas analit, maka retensinya ditingkatkan dengan mereaksikannya dengan pereaksi pasangan-ion.



Misalnya,



Untuk senyawa yang dapat terionisasi dengan mengatur pH fase diam agar ionisasi terhambat. Pada contoh reaksi berikut, pH diturunkan.



KROMATOGRAFI PASANGAN ION (ION PAIR CHROMATOGRAPHY)

PRINSIP

Digunakan untuk memisahkan senyawa ionik (kation atau anion) pada kromatografi fase balik (RPC) dengan menambahkan reagen pasangan ion (ion-pair reagent) ke dalam fase gerak.

Reagen pasangan ion (bermuatan berlawanan dengan analit) membentuk pasangan ion netral atau kurang bermuatan dengan analit sehingga meningkatkan retensi pada fase diam non-polar.

MEKANISME

Contoh: pemisahan anion (X^-)

1. Dalam fase gerak
Analit anion (X^-) sangat polar
→ retensi lemah



● = pelarut (air)

2. Penambahan pasangan ion (kationik)

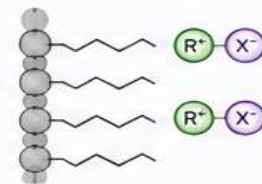
Reagen pasangan ion (R^+) berasosiasi dengan X^- membentuk pasangan ion (R^+X^-) yang kurang polar



● = reagen pasangan ion (kationik)

3. Pada fase diam non-polar (mis. C18)

Pasangan ion (R^+X^-) berinteraksi lebih kuat dengan fase diam → retensi meningkat

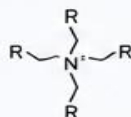


● = fase diam non-polar (C18)

JENIS PASANGAN ION

Untuk analit anion (X^-)

Gunakan reagen pasangan ion bermuatan positif (kationik), misalnya: tetraalkilamonium (TBA^+), alkilpiridinium, dll.



Contoh reaksi (anion):



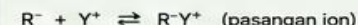
(R = rantai alkil panjang)

Untuk analit kation (Y^+)

Gunakan reagen pasangan ion bermuatan negatif (anionik), misalnya: alkilsulfonat, alkilkarboksilat, dll.



Contoh reaksi (kation):



(R = rantai alkil panjang)

KARAKTERISTIK & KEUNGGULAN

- ✓ Memungkinkan analisis senyawa ionik dengan kolom fase balik.
- ✓ Meningkatkan retensi dan bentuk puncak senyawa ionik.
- ✓ Meningkatkan resolusi untuk analit ionik kompleks.
- ✓ Sensitivitas lebih baik (puncak lebih tajam).

HAL YANG PERLU DIPERHATIKAN

- ⊖ Ion pair reagent dapat teradsorpsi pada kolom → perlu flushing lebih lama.
- ⊖ Dapat menekan ionisasi analit → mempengaruhi respons detektor MS.
- ⊖ Konsentrasi ion pair terlalu tinggi dapat meningkatkan viskositas fase gerak.

APLIKASI



Pemisahan obat-obatan ionik (mis. NSAID, antibiotik, surfaktan).



Analisis asam organik, nukleotida, peptida bermuatan.



Analisis surfaktan, pewarna, aditif makanan.



Biomolekul bermuatan (peptida, oligonukleotida) dengan LC.

■ Eksklusi

- Teknik ini berbeda dengan kromatografi yang lain yaitu pada Kromatografi Eksklusi tidak ada interaksi antara molekul sampel dengan fase diam. Kromatografi Eksklusi dikenal juga sebagai Kromatografi Permeasi Gel (*Gel Permeation Chromatography*).

- Pemisahan didasarkan atas perbedaan retensi molekul sesuai ukurannya ketika melalui fase diam berpori dari silika atau gel polimer.

Molekul yang lebih besar dari diameter pori gel terbesar, akan melaju langsung keluar lebih dahulu dari kolom (volume retensi, V_R , lebih kecil).

Molekul yang ukurannya lebih kecil berdifusi ke dalam pori fase diam sehingga akan ke luar dari kolom belakangan (V_R lebih besar).

- Teknik ini digunakan terutama untuk memisahkan seri dari fraksi polimer daripada memisahkan molekul polimer tunggal.

KROMATOGRAFI SIZE EKSKLUSI (SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY / SEC)

PRINSIP

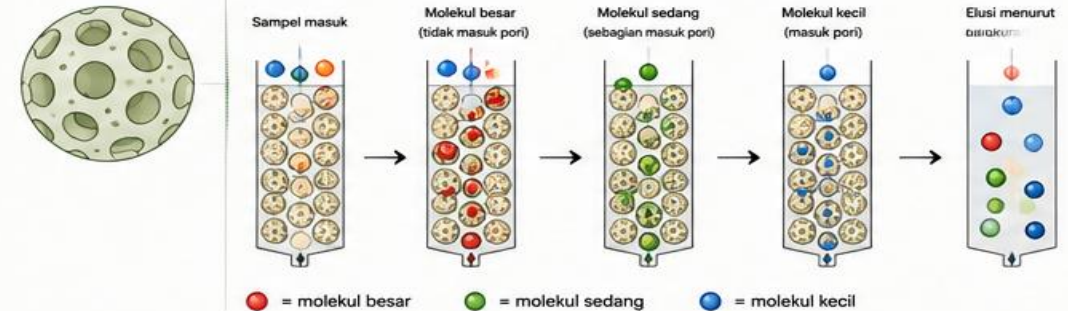
Pemisahan berdasarkan perbedaan ukuran molekul (hidrodinamik) dalam larutan.

Molekul tidak berinteraksi secara spesifik dengan fase diam. Pemisahan terjadi karena perbedaan kemampuan molekul untuk masuk ke dalam pori-pori partikel gel.

FASE DIAM

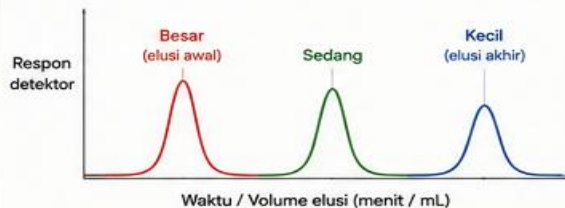
Matriks berpori (mis. agarosa, dekstran, poliakrilamida, silika berpori).
Ukuran pori tertentu.

CARA KERJA



URUTAN ELUSI

Molekul terbesar keluar terlebih dahulu, diikuti molekul sedang, dan molekul terkecil keluar paling akhir.



CIRI-CIRI PEMISAHAN

- ✓ Tidak ada interaksi kimia spesifik (non-adsorptif).
- ✓ Pemisahan hanya berdasarkan ukuran molekul.
- ✓ Cocok untuk analisis biomolekul besar.
- ✓ Kondisi lembut, mempertahankan aktivitas biologis molekul.

PARAMETER PENTING

- Ukuran pori matriks
- Ukuran partikel
- Rentang fraksi molekul (fractionation range)
- Laju alir (flow rate)
- Komposisi fase gerak
- Suhu

APLIKASI



Pemurnian protein, enzim, antibodi (monoklonal).



Desalinasi dan buffer exchange.



Fraksinasi asam nukleat (DNA, RNA), oligonukleotida, peptida.



Analisis agregasi protein, penentuan berat molekul relatif (gel filtrasi).





CONTOH MATRIKS

- Sephadex® (dekstran)
- Sepharose® (agarosa)
- Superdex® (dekstran tersubstitusi)
- Bio-Gel® (poliakrilamida)

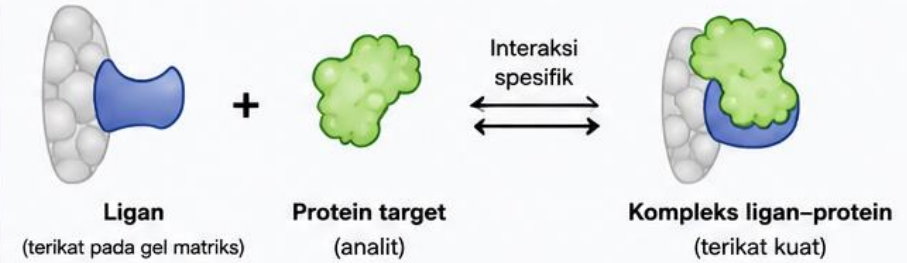
TEKNIK

Gel Filtrasi Kromatografi (GFC) atau Size Exclusion Chromatography (SEC) atau Permeation Chromatography (PC)

AFINITAS (AFFINITY CHROMATOGRAPHY)

-  Kromatografi afinitas lebih sering digunakan sebagai **teknik preparatif** daripada analitik.
-  Teknik ini merupakan metode penting dalam **riset biomedik**, misalnya untuk memisahkan protein.
-  Fase diam berupa gel matriks yang terikat secara kovalen dengan ligan biospesifik. Interaksi spesifik antara ligan dengan misalnya molekul protein tertentu dikenal sebagai mekanisme **'key and lock'**.
-  Proses pemisahan komponen tertentu (misalnya protein) dari sampel terdiri dari 3 tahap yaitu: adsorpsi, pencucian dan elusi.

MEKANISME 'KEY AND LOCK'



Ligan bersifat sangat spesifik terhadap protein target, seperti kunci yang hanya cocok dengan gembok tertentu.

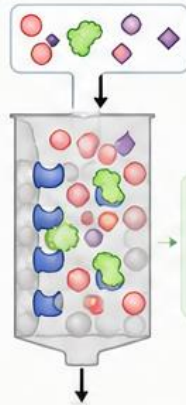
PROSES PEMISAHAN: 3 TAHAP

1. ADSORPSI (Pengikatan)

Sampel (campuran protein) dialirkan ke kolom pada pH dan kondisi tertentu. Protein target berikatan secara spesifik dengan ligan pada fase diam.

KETERANGAN

-  = Protein target (terikat)
-  = Protein lain (tidak terikat)
-  = Molekul lain (tidak terikat)
-  = Ligan (terikat pada matriks)
-  = Gel matriks



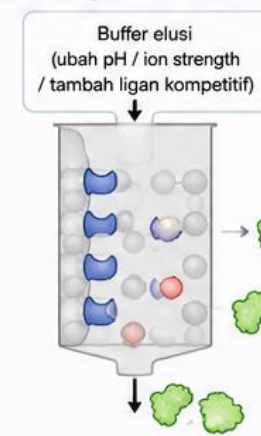
2. PENCUCIAN (Washing)

Fase gerak (buffer) dialirkan untuk mengeluarkan komponen lain yang tidak berikatan. Protein target tetap terikat pada ligan.



3. ELUSI (Elution)

Kondisi fase gerak diubah (misal: pH, kekuatan ion, atau ligan kompetitif) untuk memperlemah interaksi ligan-protein. Protein target terlepas dari ligan dan keluar dari kolom.



KEUNGGULAN KROMATOGRAFI AFINITAS

✓ Spesifisitas sangat tinggi

✓ Kapasitas pemisahan tinggi

✓ Kemurnian tinggi (satu langkah)

✓ Cocok untuk pemurnian protein, enzim, antibodi, DNA, dll.

Penetapan kadar polimer-polimer dengan bobot molekul yang bervariasi memerlukan metode kromatografi dengan mekanisme pemisahan tertentu. Metode kromatografi mana yang dimaksud?

- A. Kromatografi partisi
- B. Kromatografi adsorpsi
- C. Kromatografi pasangan ion
- D. Kromatografi pertukaran ion
- E. Kromatografi eksklusi

Kromatografi berdasarkan teknik pemisahan ada berbagai macam. Menurut Farmakope Indonesia, penetapan kadar parasetamol menggunakan instrumen KCKT dengan fase diam kolom C18, dan fase gerak campuran metanol-air. Apakah kromatografi yang digunakan pada analisis tersebut?

- A. Kromatografi Menurun
- B. Kromatografi Dua dimensi
- C. Kromatografi Fase Normal
- D. Kromatografi Fase Balik
- E. Kromatografi Fase Terikat

Berdasarkan pembentukan pasangan ion dapat diterapkan untuk sampel yang mengandung senyawa ionik dan nonionik. Apakah metode kromatografi yang dapat digunakan pada mekanisme pemisahan tersebut?

- A. *Ion Exchange Chromatography*
- B. *Size exclusion Chromatography*
- C. *Gel Permeation Chromatography*
- D. *Ion Pair Chromatography*
- E. *Bonded Phase Chromatography*

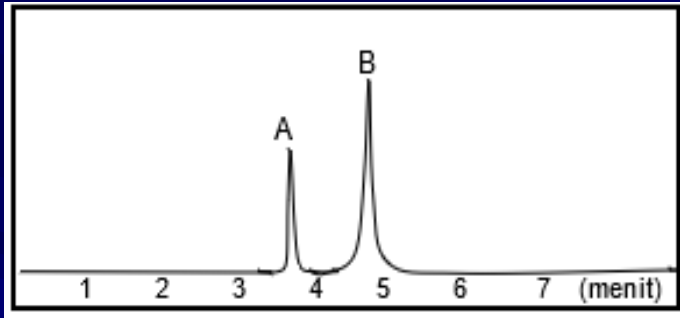
Kromatografi berdasarkan teknik pemisahan ada berbagai macam. Pada pemisahan zat warna dari bahan alam digunakan teknik elusi melingkar. Apa nama metode yang digunakan tersebut?

- A. TLC
- B. HPTLC
- C. PC
- D. HPLC
- E. GC

Perbedaan mekanisme pemisahan analit pada kromatografi tergantung dari perbedaan sifat dan interaksi analit tersebut dengan fase diam dan fase gerak yang digunakan. Dalam analisis digunakan GSC. Apakah mekanisme pemisahan analit pada analisis tsb?

- A. Adsorpsi pada fase diam
- B. Ikatan ion dengan fase diam
- C. Afinitas terhadap fase diam
- D. Partisi pada kedua fase
- E. Ukuran molekul

Metode kromatografi eksklusi digunakan untuk menganalisis senyawa A dan B dan didapat kromatogram sebagai berikut:



Mengapa senyawa B lebih besar waktu retensinya?

- A. Partikelnya cukup besar
- B. Polaritasnya lebih kuat
- C. Sifatnya lebih mudah terion
- D. Ukuran molekulnya lebih kecil
- E. Afinitasnya lemah terhadap fase diam

Pada analisis vitamin B-kompleks di dalam sirup menggunakan kromatografi fase balik ditemukan masalah resolusi dari analitnya, yaitu pemisahan kurang base to base antar analit. Hal ini diatasi dengan menggunakan larutan garam natrium 1-heptan sulfonat. Apakah mekanisme pemisahan pada analisis tersebut?

- A. *Bonded phase*
- B. *Ion-Exchange*
- D. Eksklusi
- C. *Ion-Pairing*
- E. Afinitas



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS PANCASILA

TERIMA KASIH