



## MODUL PEMBELAJARAN ANALISIS INSTRUMENTAL

# III. C. KLT- DENSITOMETRI

## Pertemuan 10



# SALAM PANCASILA



# KLT- Densitometri

Metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda atau bercak pada lempeng KLT.

-Interaksi r.e.m dengan bercak pada lempeng KLT yang ditentukan adalah : **adsorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) dan pendar fluor/fosfor** dari radiasi semula.

- Densitometri dititik beratkan untuk analisis kuantitatif analit dengan kadar yang sangat kecil, yang perlu dipisahkan dulu dengan KLT.
- Alat : Densitometer = *Thin Layer Chromato Scanner*
- KLT-Densitometri termasuk Kromatografi Planar , menurut S Levi dan R Reisfeld → adalah analisis kuantitatif ultramikro.

# **KLT = Kromatografi Lapis Tipis (TLC)**

merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut pengembang / pengembang campur.

ATAU

**Adalah teknik pemisahan campuran senyawa**



dengan prinsip: Analit bergerak ke atas melewati lapisan tipis fase diam (paling sering adalah silika gel) di bawah pengaruh fase gerak (biasanya campuran pelarut organik yang bergerak melalui fase diam oleh pengaruh gaya kapiler

- **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.
- **Jenis fase diam** : dikenal beberapa macam berdasarkan sifat polaritas.
  - fase diam polar : silika gel, selulosa, kieselguhr.
  - fase diam non polar : dibuat dari silika gel dengan cara mengikat hidroksilnya dengan : C2; C8; atau C18.

(RP= *Reversed phase*)

- **mekanisme pemisahan** :
  - adsorpsi ; partisi; penukar ion atau fase terbalik ( adsorpsi-partisi )
  - sampel non polar : pelarut pengembang (f.gerak) non polar
  - sampel polar : pelarut pengembang polar
- ukuran fase diam :
  - 1-25 mikron dalam keadaan uniform → pemisahan baik dan aliran fase gerak cepat dan merata.

Pada prinsipnya pemisahan KLT diusahakan dilakukan dalam keadaan netral.

# Sistem KLT /TLC

## \* Sistem fase normal:

Fase diam lebih polar dibanding fase gerak

- Fase diam : silika
- Fase gerak : non-polar (*organic solvent*)

## \*Sistem fase terbalik:

Fase diam lebih non-polar dibanding fase gerak.














- Fase diam : paraffin-impregnated plate
- Fase gerak : pelarut polar (*water-based mobile phase*)

## FASE GERAK DAN SERI /DERET ELUOTROPIK

- \* Semakin polar suatu pelarut atau campuran pelarut → semakin jauh pelarut tsb akan menggerakkan senyawa polar naik pada plat gel silika
- \* Jika senyawa non polar → tidak ada peningkatan jarak migrasi yg nyata dengan peningkatan polaritas pada fase gerak karena senyawa tsb bermigrasi menuju muka pelarut hampir di semua kondisi
- \* Catatan : pemilihan fase gerak untuk memisahkan senyawa dapat menggunakan campuran yg kompleks terdiri atas 3 macam fase gerak

**Tabel : Deret Eluotropik untuk Pelarut yang digunakan Dalam Kromatografi Cair**

**Sifat Pelarut Umum pada Kromatografi Cair (Normal Phase)**

 SOLVENT	 POLARITY INDEX, $P'$	 ELUTION STRENGTH (SiO <sub>2</sub> )	 UV TRANSMISSION, nm
 Fluoroalkanes	< -2	-0.2	200
 Cyclohexane	0.04	0.03	200
 n-Hexane	0.1	0.01	195
CCl <sub>4</sub> Carbon tetrachloride	1.6	0.11	265
 Diisopropyl ether	2.4	0.22	220
 Toluene	2.4	0.22	285
 Diethyl ether	2.8	0.38	215
Cl-CH <sub>2</sub> -Cl Dichloromethane	3.1	0.34	230
 Tetrahydrofuran	4.0	0.35	210
CHCl <sub>3</sub> Chloroform	4.1	0.26	235
OH Ethanol	4.3	0.68	205
CH <sub>3</sub> COOH Acetic acid	4.4	0.38	255
 Dioxane	4.8	0.49	215
CH <sub>3</sub> OH Methanol	5.1	0.73	205
CH <sub>3</sub> CN Acetonitrile	5.8	0.50	190
NO <sub>2</sub> Nitromethane	6.0	0.49	380
 Water	10.2	large	170

**i Catatan:** Nilai polaritas dan kekuatan elusi dapat bervariasi tergantung kondisi dan jenis fase diam yang digunakan.

## Contoh Cara Menghitung polaritas campuran dalam kombinasi solvent:

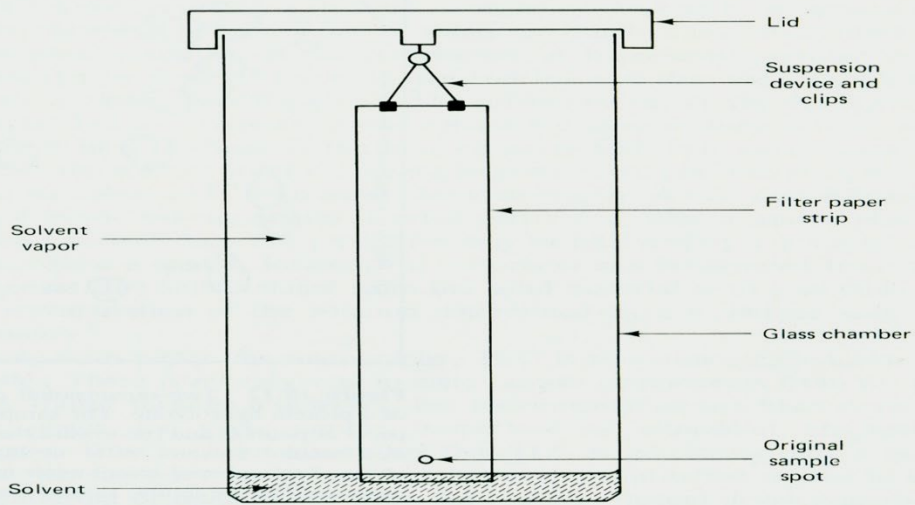
Pada pembuatan fase gerak campuran kloroform – metanol, dengan komposisi:

- Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) 8 ml
- metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) 2ml.

Diketahui: indeks polaritas (P)  $\text{CHCl}_3$  4,1 dan  $\text{CH}_3\text{OH}$  5,1.

Hitung : berapa Indeks polaritas campuran?

$$\begin{aligned} \rightarrow \text{Indeks polaritas campuran} \\ &= (0,8 \times 4,1) + (0,2 \times 5,1) = 4,3 \end{aligned}$$



**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).

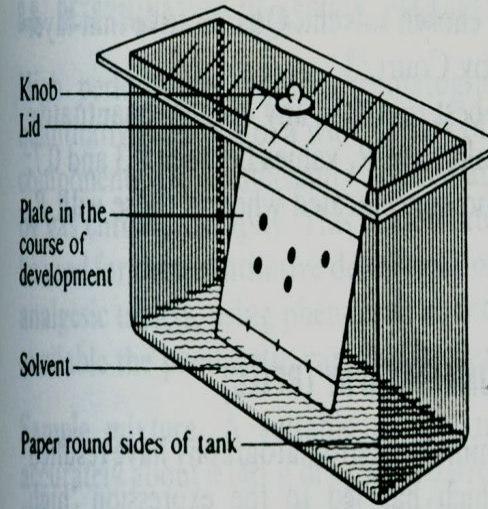
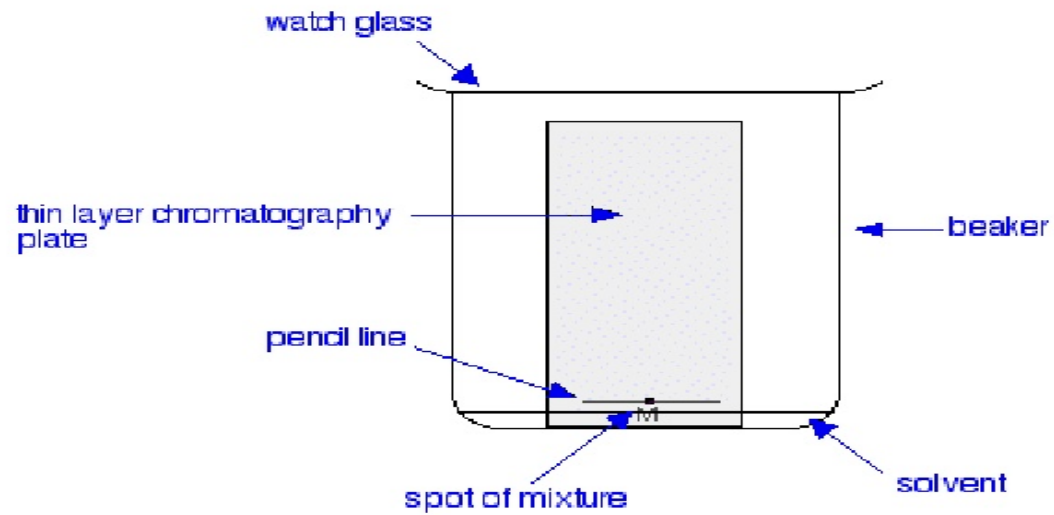


Fig. 8.6 Reproduced from D. Abbott and R. S. Andrews, *An Introduction to Chromatography*, Longman, London, 1965.

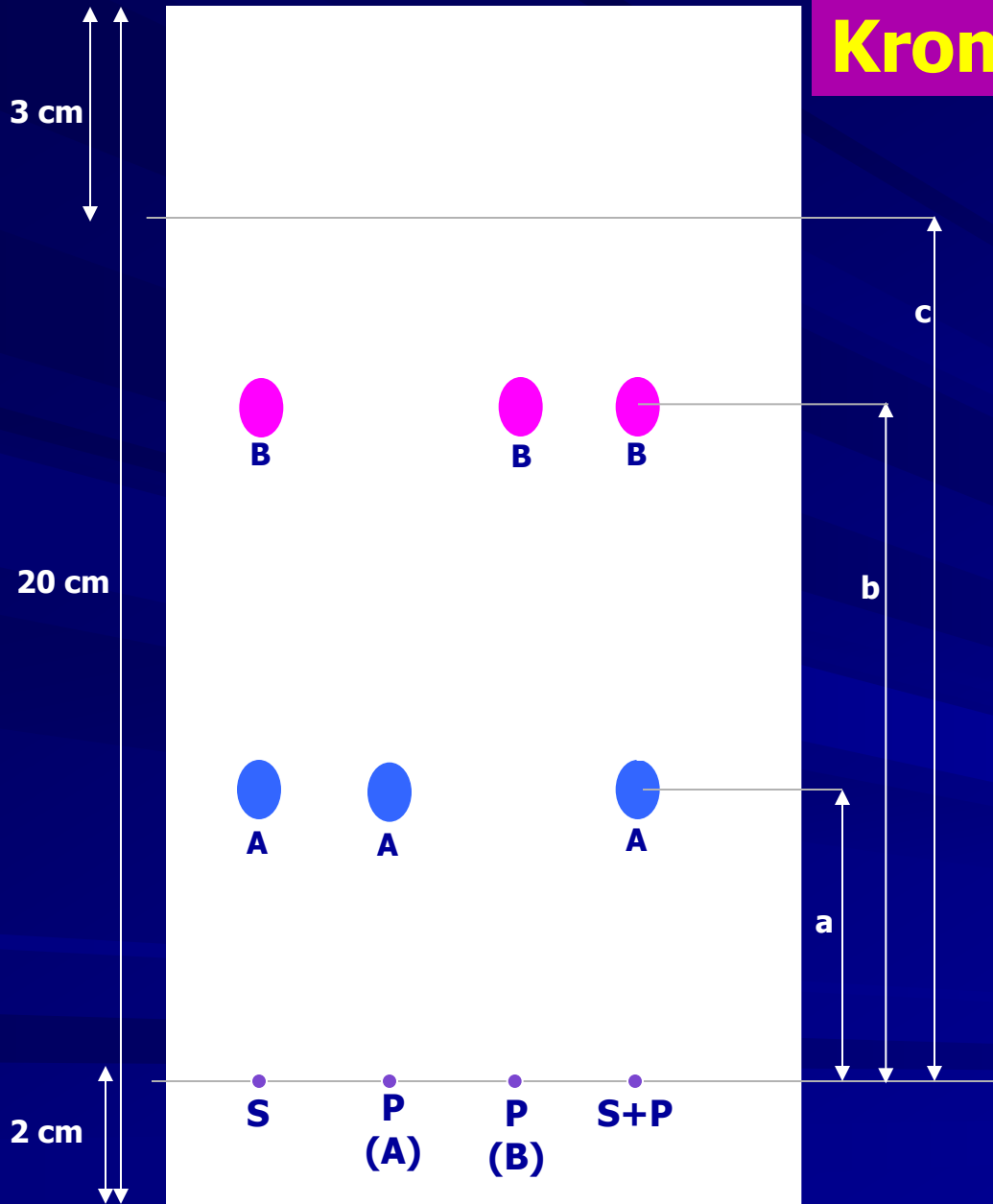


## Profil kromatogram

- 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 ;pemilhan fase gerak yang tidak tepat dan ketidak jenuhan chamber.
- Penotolan sampel dengan mikropipet
- Selama eluasi suhu harus dijaga , karena kenaikan suhu berpengaruh pada  $R_f$ .

10 cm

# 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:  $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH} + \text{Air}$  (180:15:1)
- Jarak rambat fase gerak: (3/4 tinggi lempeng)

Jarak rambat bercak  
Jarak rambat fase gerak

$$R_f A = a/c$$

$$R_f B = b/c$$

Kromatogram KLT

## Faktor retardasi : $R_f$

adalah jarak migrasi komponen (bercak) dibagi jarak migrasi fase gerak

$$R_f = \frac{dR}{dM} = \frac{hR_f}{100}$$

## Analisis kualitatif

Membandingkan bercak kromatogram sampel dengan kromatogram “reference strandart” yang dikenal dengan : **factor retensi relatif ( $R_x$ )**

$$R_x = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi } R_s} = hR_x / 100$$

Untuk penentuan kualitatif dengan  $R_s$  harus dilakukan bersamaan  
Dengan sampel pada pelat yang sama

# Densitometri

- S. Levi dan R Reisfeld telah mengangkat metode densitometri ke tingkat analisis kuantitatif ultra mikro. Keduanya telah berhasil menentukan antara lain testosterone dalam cairan biologis pada rentang kadar 1-250 ng, dan kolesterol 4 -150 ng dengan pendar flour pada noda (kromatogram) KLT.
- Pada perkembangan metode Kromatografi saat ini pemakaian "*Thin Layer Chromato Scanner*" yang lebih dikenal dengan nama **densitometer** makin banyak dipakai secara luas oleh peneliti/ilmuwan.

**Densitometri** adalah metode analisi instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak atau noda pada lempeng KLT

- Prinsip penentuan dengan metode desintometri hampir sama dengan metode spektrofotometri.

- . Susunan optik densitometer ini tidak banyak berbeda dengan spektrofotometer tetapi pada densitometer digunakan alat khusus *reflection photomultiplier*, sebagai pengganti photomultiplier pada spektrofotometer.

### **Instrumentasi :**

Source ---  $\lambda$  selector --- beam spliter --- thin layer plate (end view) --- phototube (transmittance position )

- Sumber radiasi : rentang panjang gelombang : 200 – 630 nm
  - Deuterium
  - Tungsten
  - Lampu busur Hg : pendar/pemadaman pendar fluor.
- Monokromator : kisi difraksi 1200 garis/mm
- Detektor : PMT

## Kelebihan KLT Densitometri

- \* Penentuan kadar analit yang dikorelasikan dengan area noda pada KLT akan lebih terjamin kesahihannya dibanding metode KCKT (Kromatografi Cair kinerja Tinggi) atau KGC (Kromatografi Gas Cair) sebab area noda kromatogram diukur pada posisi lurus atau "Zigzag" menyeluruh.
- \* Korelasi kadar analit pada noda kromatogram yang terhadap area tidak menunjukkan garis lurus, akan tetapi merupakan garis lengkung mendekati parabola.

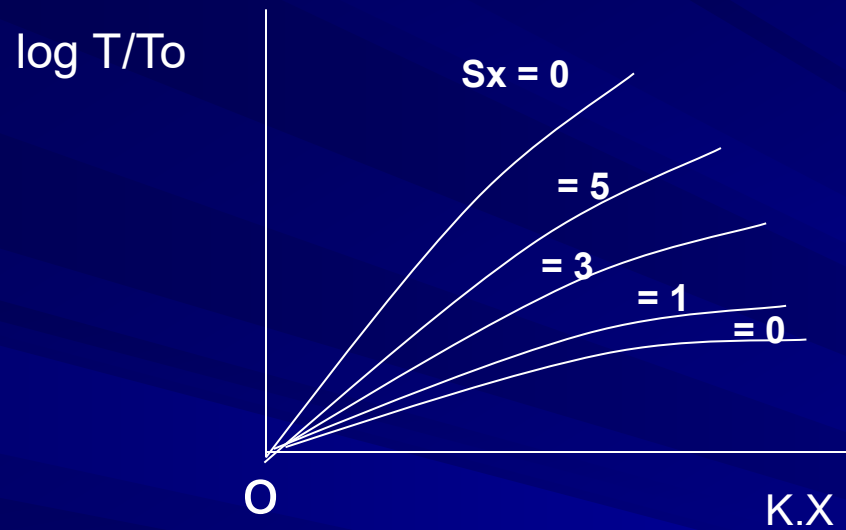
- Pada pelat KLT → hampir semua memberikan ketidak homogenan fase diam (ketidaksamaan fase diam) → terjadi penyerapan r.e.m dan juga terjadi percikan radiasi oleh partikel fase diam.
- Pada metode Spektrofotodensitometri dikenal parameter :
  - K (koefisien penyerapan)
  - S (koefisien penghamburan) → penurunan intensitas r.e.m yang masuk ke medium lapis tipis → terjadi lengkung pada

**“ Kurva teoritis Kubelka –Munk “**

S (koefisien penghamburan) = ***scattering coefficient***

Dengan membandingkan antara sinyal dari masing-masing bercak/noda analit dengan sinyal dari area blangko (area tanpa bercak) maka koefisien penghamburan dianggap nol ( $S \sim 0$ ) sehingga konsentrasi akan setara dengan tanggap detektor.

Atas dasar inilah keseragaman ukuran partikel sorben dan keseragaman ketebalan sorben pada lempeng KLT sangat mempengaruhi reproduktibilitas hasil pada analisis kuantitatif.



Gambar: Kurva Teoritis *Kubelka-Munk*

Setiap pelat KLT yang dipakai memberikan harga  $S_x$  berbeda (tiap merek berbeda) Harga  $S_x$  berkisar : 0 – 10

Spektro densitometer (*Thin Layer Chromato Scanner*) modern dilengkapi mikro komputer dengan harga operasional  $S_x = 0 - 3 \rightarrow$  Melinearkan kurva teoritis Kubelka-Munk

- Korelasi kadar analit terhadap area bercak tidak menunjukkan garis lurus → garis lengkung mendekati parabola → persamaan

### **”Kubelka Munk “**

-r.e.m dengan intensitas semula ( $I$ ) jatuh pada permukaan lapis tipis yang tidak homogen dengan arah tegak lurus maka sebagian akan direfleksikan( $I_s$ ) dan sebagian diserap oleh analit ( $I_o$ ) dan sebagian lagi diteruskan ( $I_t$ )

$$I = I_o + I_s + I_t$$

- Intensitas r.e.m yang direfleksikan tergantung koefisien permukaan lapis tipis (E)

$$I_s = I \cdot E$$

E sangat dipengaruhi lapis tipis yang dipakai

$$I_o = I - I_s$$

$$I_o = I - I \cdot E = (1-E)I$$

Bila lapis tipis  $\rightarrow$  homogen berlaku hukum L-Beer

$$I_t = I_o \cdot e^{-K \cdot x}$$

$x$  = tebal medium lapis tipis ,  $K$  = koefisien absorpsi ,

harga  $e^{-K \cdot x} \rightarrow$  menyatakan berkurangnya intensitas r.e.m yang melewati medium = optical density = kerapatan optik dari medium yang dilewati r.e.m

#### D. APLIKASI

## APLIKASI

Metode KLT-Densitometri digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif.

### Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif dengan KLT-Densitometri pada prinsipnya mengacu kepada nilai  $R_f$  (*Retardation factor*) atau Faktor retardasi yaitu : membandingkan  $R_f$  analit dengan  $R_f$  baku pembanding atau membandingkan bercak kromatogram sampel dengan kromatogram "*Reference Standart*" yang dikenal dengan : *Factor Retensi Relatif (Rx)*.

Untuk penentuan kualitatif dengan  $R_s$  harus dilakukan bersamaan dengan sampel pada pelat yang sama.

## Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif hampir sama dengan spektrofotometri, penentuan kadar analit dikorelasikan dengan area bercak pada pelat KLT. Cara penetapan kadar dapat dilakukan dengan :

1. Membandingkan area bercak analit dengan area bercak baku pembanding yang diketahui konsentrasinya.

$$C_x = A_x / A_p \times C_p$$

$C_x$  = konsentrasi analit

$A_x$  = area analit

$A_p$  = area baku pembanding

$C_p$  = konsentrasi baku pembanding

- Prinsip penentuan area atau kadar analit yang ada pada pelat KLT :
  - penentuan transmisi
  - pantulan (refleksi)
  - pendar fluor/ pemadaman pendar fluor

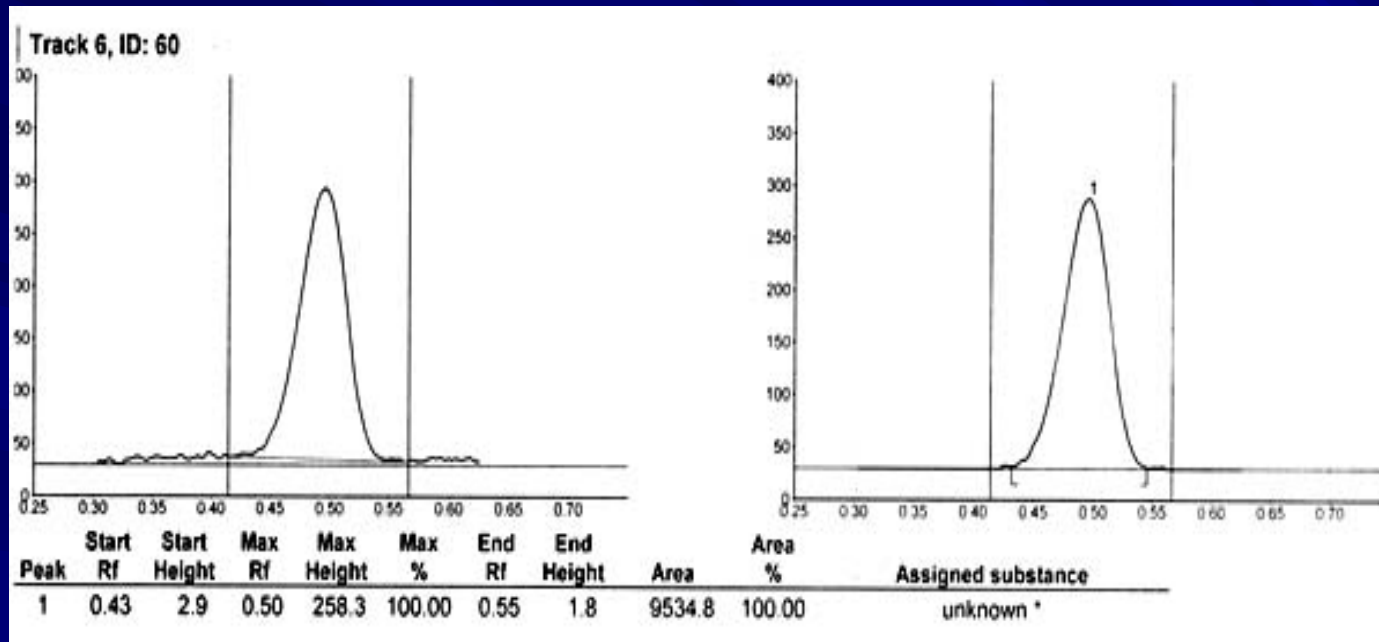
Cara penetapan kadar :

1. Membandingkan area bercak analit dengan area baku pembanding yang diketahui konsentrasinya
2. Kurva kalibrasi

## 2. Kurva baku :

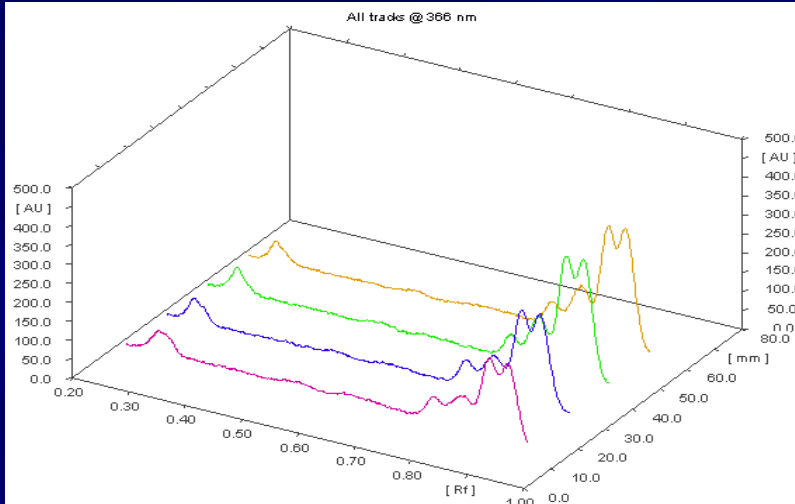
- Kurva baku dibuat dengan cara memplot area bercak terhadap konsentrasi dari satu seri larutan baku pembanding.
- Kurva yang terbentuk harus linear → Persamaan garis regresi
- kemudian dengan persamaan garis regresi dapat ditentukan kadar analit.

# ■ Profil Kromatogram KLT-Densitometri

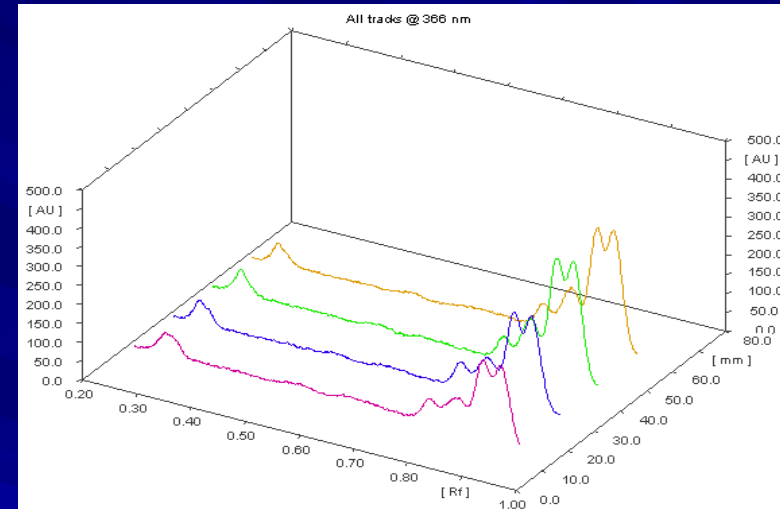


Gambar: Profil kromatogram KLT-Densitometri ekstrak air daun kembang bulan\*)

\*) Avina Khoirunnissa. Penetapan Kadar Asam Klorogenat dalam Ekstrak Etanol 95% dan Ekstrak Air Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) Secara KLT-Densitometri. (skripsi). Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. 2019.



(a)



(b)

Gambar: Profil Kromatogram *overlay* 3D Ekstrak Kering Etanol 95%  
Daun Yakon UV 254 nm (a) dan UV 366 nm (b) \*\*)

\*\*) Catherine Husada. Aktivitas Penghambatan Enzim  $\alpha$ -glukosidase Ekstrak Daun Yakon (*Smallanthus sonchifolius*) Dan Korelasinya Dengan Sidik Jari KLT-Densitometri Menggunakan Kemometrik. . (skripsi). Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. 2017.

# Prosedur analisis dengan metode KLT

1. Penyiapan sistem KLT: sampel, fase diam, fase gerak, bejana KLT.
2. Penotolan sampel pada lempeng KLT.
3. Pengembangan (development) untuk memisahkan analit.
4. Deteksi bercak: sinar biasa, sinar UV, *spray reagents*.

## Prosedur analisis dengan metode KLT-Densitometri

1. Penyiapan sistem KLT: sampel, fase diam, fase gerak, bejana KLT.
2. Penotolan sampel pada lempeng KLT.
3. Pengembangan (development) untuk memisahkan analit.
4. Diamati dan didokumentasikan di dalam alat digistore pada sinar UV 254 nm dan 366 nm.
5. Lempeng KLT di *scanning* dengan densitometer.



Gambar: peralatan pada analisis dengan KLT-Densitometri



Gambar : alat Densitometer

# Aplikasi KLT-Densitometri

- 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.
- **Analisis Kualitatif:**  
membandingkan  $R_f$  **bercak** analit dengan baku pembanding
- **Analisis Kuantitatif**  
menggunakan data Luas puncak dari analit dan baku pembanding
- **Pemisahan atau pemurnian (Kromatografi Preparatif)**

## CONTOH SOAL KLT-DENSITOMETRI

Metode Kromatografi adalah metode unggulan untuk menganalisis sampel campuran. Jelaskan apa yang saudara ketahui mengenai prinsip metode KLT berikut ini:

- a. Prinsip analisis kualitatif campuran dua analit (analit A dan B) dalam sampel.
- b. Gambarkan kromatogram KLT-nya jika diketahui analit B afinitasnya lebih lemah terhadap fase diam dan  $R_f$  analit A 0,5 kali dari  $R_f$  analit B.  $hR_f$  analit B adalah 40 dengan jarak rambat fase gerak sebesar 8cm.
- c. Prinsip analisis kuantitatif dari campuran analit A dan B tersebut dengan metode KLT-Densitometri dan tuliskan rumus untuk menghitung konsentrasi larutan uji analit A dan B berdasarkan respon detektor larutan uji dan larutan baku masing-masing.



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



**GREEN  
CAMPUS**



**TERIMA KASIH**

**KAMPUS PROGRAM DIPLOMA (D3), SARJANA (S1) & PROFESI :**