

# Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis adalah salah satu metode pemisahan kromatografi yang fleksibel dan banyak digunakan. Metode analisis kromatografi lapis tipis (KLT) telah menjadi bagian dari teknik analisis rutin pada laboratorium analisis dan pengembangan produk karena memiliki beberapa keuntungan. Keuntungan utama metode analisis kromatografi lapis tipis dibandingkan metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi adalah analisis beberapa sampel dapat dilakukan secara simultan dengan menggunakan fase gerak dalam jumlah kecil sehingga lebih hemat waktu dan biaya analisis serta lebih ramah lingkungan. Teknik pemisahannya sederhana dengan peralatan yang minimal.

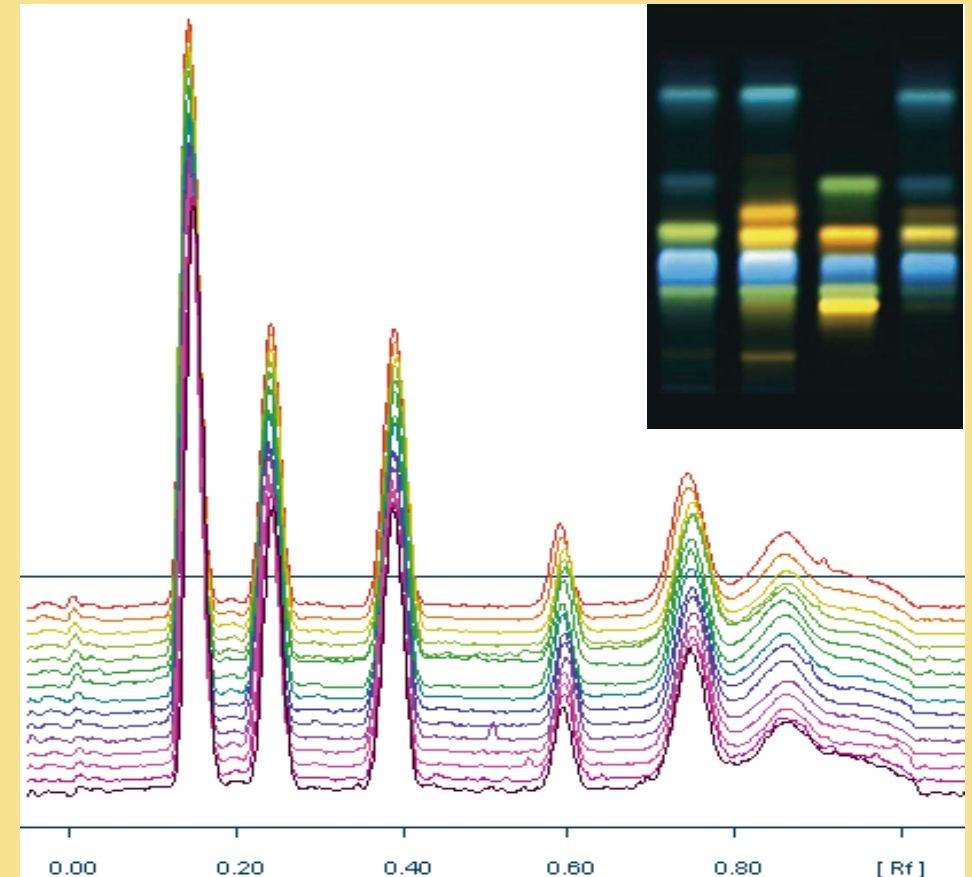
Sasaran Pembaca : mahasiswa Farmasi, MIPA dan seluruh mahasiswa yang menggeluti bidang eksak

ISBN 978-979-17068-1-0



9 789791 1706810

# Kromatografi Lapis Tipis



# Kromatografi Lapis Tipis

**Lestyo Wulandari, S.Si, Apt, M.Farm**

Fakultas Farmasi Universitas Jember

Cetakan pertama, 2011

**KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

**Hak cipta dilindungi undang-undang**

**Dilarang memperbanyak isi buku ini,  
Baik sebagian maupun seluruhnya  
Dalam bentuk apa pun  
Tanpa izin tertulis  
Dari Penerbit**

**Diterbitkan oleh PT. Taman Kampus Presindo, Jember**

**ISBN : 978-979-17068-1-0**

## **Bab 1**

# **Pengantar Kromatografi Lapis Tipis**

### **1. Gambaran Umum Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas tergolong "kromatografi planar." KLT adalah yang metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Kromatografi planar juga dapat digunakan untuk pemisahan skala preparatif yaitu dengan menggunakan lempeng, peralatan, dan teknik khusus.

Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel

dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok.

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Berbagai mekanisme pemisahan terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer karge), ikatan ion-ion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der Waals.

Pengambilan sampel, pengawetan, dan pemurnian sampel adalah masalah umum untuk KLT dan metode kromatografi lainnya. Sebagai contoh, pengembangan KLT biasanya tidak

sepenuhnya melarutkan kembali analit yang berada dalam lempeng kecuali dilakukan pemurnian sebelumnya (*clean up*). Metode *clean up* paling sering dilakukan pada ekstraksi selektif dan kromatografi kolom. Dalam beberapa kasus zat/senyawa perlu dikonversi dahulu sebelum dianalisis dengan KLT. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan turunan senyawa yang lebih cocok untuk proses pemisahan, deteksi, dan / atau kuantifikasi. KLT dapat mengatasi sampel yang terkontaminasi, seluruh kromatogram dapat dievaluasi, mempersingkat proses perlakuan sampel sehingga hemat waktu dan biaya. Kehadiran pengotor atau partikel yang terperap dalam sorben fase diam tidak menjadi masalah, karena lempeng hanya digunakan sekali (habis pakai).

Deteksi senyawa menjadi mudah ketika senyawa secara alami dapat berwarna atau berberfluoresensi atau menyerap sinar UV. Namun, perlakuan penambahan pereaksi penampak noda dengan penyemprotan atau pencelupan terkadang diperlukan untuk menghasilkan turunan senyawa yang berwarna atau berfluoresensi. Pada umumnya senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa-senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT dengan fase diam yang diimpregnasi indikator fluoresensi dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm.

Pada KLT, identifikasi awal suatu senyawa didasarkan pada perbandingan nilai  $R_f$  dibandingkan  $R_f$  standar. Nilai  $R_f$  umumnya tidak sama dari laboratorium ke laboratorium bahkan pada waktu

analisis yang berbeda dalam laboratorium yang sama, sehingga perlu dipertimbangkan penggunaan Rf relatif yaitu nilai Rf noda senyawa dibandingkan noda senyawa lain dalam lempeng yang sama. Faktor-faktor yang menyebabkan nilai Rf bervariasi meliputi dimensi dan jenis ruang, sifat dan ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya. Konfirmasi identifikasi dapat diperoleh dengan mengerok noda dalam lempeng kemudian analit dalam lempeng dielusi dan dideteksi dengan spektrometri inframerah (IR), spektrometri Nuclear magnetic resonance (NMR), spektrometri massa, atau metode spektrometri lain jika senyawa hasil elusi cukup tersedia. Metode identifikasi ini juga dapat menggunakan untuk menandai zona langsung pada lapisan (in situ).

## **2. Sejarah KLT**

Kromatografi kolom pertama kali ditemukan oleh ahli botani Rusia, Tswett pada tahun 1903. Sekitar tahun 1938 pemisahan pada lapisan tipis ditemukan oleh Izmailov dan Shraiber, melalui teknik sederhana yang hanya membutuhkan sampel dan sorben yang sedikit yaitu dengan memisahkan ekstrak tanaman menggunakan aluminium oksida yang disebar pada lapisan kaca. Sorben ditaruh pada objek glass mikroskop sebagai suatu lapisan padatan yang berair dengan tebal sekitar 2 mm. Sampel (ekstrak tumbuh-

tumbuhan) ditetaskan ke dalam lapisan, kemudian pelarut (metanol) ditambahkan tetes demi tetes dari atas. Pada lapisan sorben diperoleh serangkaian cincin melingkar berbentuk lapisan yang berbeda warna. Dari sini lahirlah teknik baru KLT yang disebut drop kromatografi.

Pada 1949 Meinhard dan Hall menggunakan binder tepung untuk memberikan ketegasan pada masing-masing lapisan pada pemisahan ion anorganik, mereka menyebutnya sebagai permukaan kromatografi. Pada tahun 1950, Kirkner dan koleganya menampilkan KLT seperti yang kita kenal sekarang. Mereka menggunakan gel silika yang diletakkan pada lempeng kaca dengan bantuan bahan pengikat, dan lempeng dikembangkan dengan prosedur naik konvensional seperti yang digunakan pada kromatografi kertas. Kirkner adalah orang yang pertama kali menciptakan istilah "kromatostrips" untuk lapisan yang mengandung indikator fluoresensi. Stahl memperkenalkan istilah "kromatografi lapis tipis" pada akhir 1950-an. Kontribusi besar Stahl adalah pada standarisasi bahan, prosedur, dan tata-nama serta deskripsi sistem pelarut selektif untuk klasifikasi senyawa. Laboratorium manual pertamanya dipopulerkan dengan nama KLT, dan ia memperoleh dukungan dari perusahaan-perusahaan komersial (Merck, Desaga) untuk menawarkan bahan baku dan peralatan untuk KLT. Teknik lempeng KLT pertama kali dikomersilkan pada 1965. KLT dengan cepat menjadi sangat populer setelah kurang lebih 400-500 publikasi per tahun muncul

di akhir tahun 1960 sehingga KLT mulai diakui sebagai prosedur yang relatif cepat dan murah untuk pemisahan berbagai campuran sampel. Sorben yang paling banyak digunakan adalah silika gel dengan ukuran pori rata-rata  $60^{\circ}\text{A}$ .

Modifikasi silika gel dimulai dengan silanisation untuk menghasilkan fase terbalik. Fase terbalik memperbesar kemungkinan pemisahan berdasar partisi dibandingkan dengan adsorpsi seperti yang digunakan dalam teknik sebelumnya. Pengenalan scanner spektrodensitometer komersial memungkinkan kuantifikasi analit secara langsung pada lempeng KLT. Awalnya area puncak yang diukur secara manual, tetapi kemudian integrator dapat mengukur area puncak secara otomatis. Kemajuan utama berikutnya adalah munculnya KLTKT (kinerja tinggi lapis tipis kromatografi). Pada 1973 Halpaap adalah orang yang pertama mengakui keuntungan penggunaan partikel gel silika yang lebih kecil (sekitar 5-6 mm) pada persiapan lempeng KLT. Ia membandingkan efek ukuran partikel dengan waktu pengembangan, nilai-nilai  $R_f$  dan Jarak setara lempeng teori. Pada pertengahan 1970-an, diakui bahwa KLTKT dapat meningkatkan presisi sampai sepuluh kali lipat, waktu analisis dapat dikurangi dengan faktor yang sama, mengurangi kuantitas fase gerak yang diperlukan dan mengurangi jarak pengembangan sampel.



### **3. Metode Pemisahan pada Kromatografi**

Metode pemisahan merupakan aspek penting dalam dibidang analisis karena kebanyakan sampel yang akan dianalisis berupa campuran. Untuk memperoleh senyawa murni dari suatu campuran, harus dilakukan proses pemisahan. Berbagai teknik pemisahan dapat diterapkan untuk memisahkan campuran diantaranya ekstraksi, destilasi, kristalisasi dan kromatografi. Ekstraksi adalah proses pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (pelarut) sebagai *separating agent*. Ekstraksi padat-cair; solut dipisahkan dari padatan pembawanya menggunakan pelarut cair. Ekstraksi cair-cair, solut dipisahkan dari cairan pembawa (diluen) menggunakan pelarut cair. Campuran diluen dan pelarut ini adalah heterogen (immiscible, tidak saling campur). Pemilihan pelarut menjadi sangat penting, dipilih pelarut yang memiliki sifat antara lain pelarut dapat melarutkan solut tetapi sedikit atau tidak melarutkan diluen, pelarut tidak mudah menguap pada saat ekstraksi, pelarut mudah dipisahkan dari solut, sehingga dapat dipergunakan kembali dan pelarut tersedia dipasaran dan tidak mahal. Destilasi merupakan teknik pemisahan yang didasari atas perbedaan perbedaan titik didid atau titik cair dari masing-masing zat penyusun dari campuran homogen. Dalam proses destilasi terdapat dua tahap proses yaitu tahap penguapan dan dilanjutkan dengan tahap pengembangan kembali uap menjadi cair atau

padatan. Proses destilasi diawali dengan pemanasan, sehingga zat yang memiliki titik didih lebih rendah akan menguap. Uap tersebut bergerak menuju kondenser (pendingin) dan terjadi proses pendinginan karena adanya aliran air di dinding luar dari kondenser, sehingga uap yang dihasilkan akan kembali cair. Proses ini berjalan terus menerus dan akhirnya seluruh senyawa-senyawa yang ada dalam campuran homogen tersebut dapat terpisahkan. Pemisahan dengan teknik kristalisasi didasari atas dasar pelepasan pelarut dari zat terlarutnya dalam sebuah campuran homogen atau larutan, sehingga terbentuk kristal dari zat terlarutnya. Kristal dapat terbentuk karena suatu larutan dalam keadaan atau kondisi lewat jenuh (*supersaturated*). Kondisi tersebut terjadi karena pelarut sudah tidak mampu melarutkan zat terlarutnya, atau jumlah zat terlarut sudah melebihi kapasitas pelarut. Kristal dapat terbentuk dengan cara mengurangi jumlah pelarutnya, sehingga kondisi lewat jenuh dapat dicapai. Proses pengurangan pelarut dapat dilakukan dengan empat cara yaitu, penguapan, pendinginan, penambahan senyawa lain dan reaksi kimia. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas) yang menyebabkan terjadinya perbedaan migrasi dari masing-masing komponen. Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Afinitas senyawa dalam fase diam dan fase gerak

ditentukan oleh sifat fisika kimia dari masing-masing senyawa. Faktor –faktor yang menyebabkan perbedaan migrasi komponen-komponen dalam sampel meliputi faktor pendorong migrasi analit dan faktor penghambat migrasi analit (Gambar 1.1). Faktor pendorong migrasi meliputi gaya gravitasi, elektrokinetik, dan hidrodinamik. Faktor penghambat migrasi meliputi friksi molekul, elektrostatik, adsorpsi, kelarutan, ikatan kimia dan interaksi ion. Adanya gaya gravitasi yaitu gaya yang menarik benda selalu menuju ke bawah, elektrokinetik yaitu pergerakan molekul karena adanya listrik dan hidrodinamik yaitu pergerakan suatu cairan, dapat mendorong pergerakan molekul analit sehingga mempercepat migrasi analit. Sedangkan adanya friksi molekul yaitu gaya yang muncul dengan arah gerakan yang berlawanan dengan arah gerakan molekul, adanya elektrostatik yaitu gaya yang dikeluarkan oleh medan listrik statik (tidak berubah/bergerak) terhadap objek bermuatan yang lain, adanya sifat adsorpsi yaitu suatu proses yang terjadi ketika suatu fluida, cairan maupun gas pada suatu padatan atau cairan (zat penjerap, sorben) dan membentuk suatu lapisan tipis pada permukaan, adanya kelarutan analit, adanya ikatan kimia dan atau interaksi ion antara analit fase diam dan fase gerak dapat menghambat pergerakan molekul analit.

Metode pemisahan pada kromatografi sangat tergantung dari jenis fase diam yang digunakan. Jenis fase diam yang digunakan menentukan interaksi yang terjadi antara analit dengan fase diam

dan fase gerak. Metode pemisahan pada kromatografi terbagi menjadi :

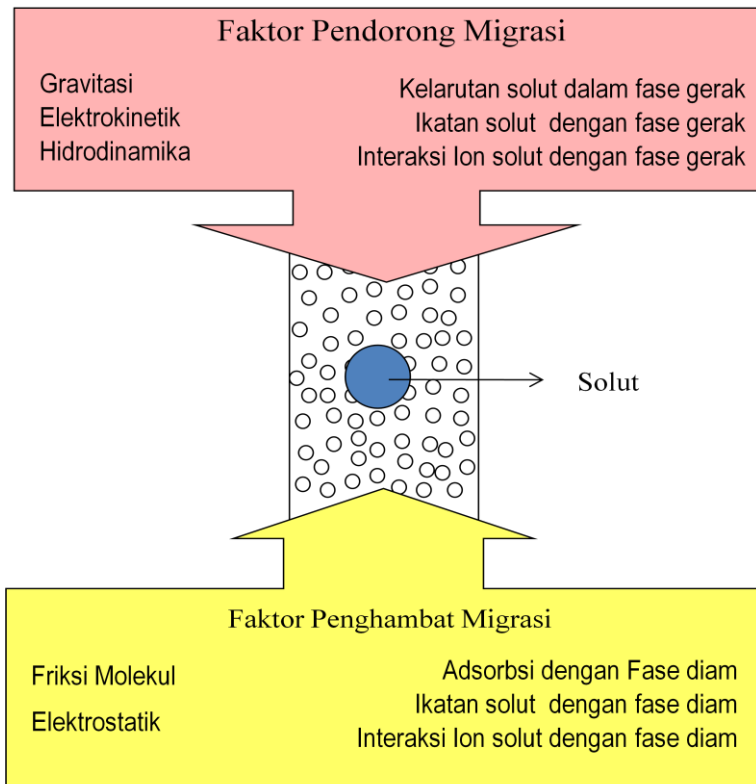
a. Pemisahan berdasarkan polaritas

Metode pemisahan berdasarkan polaritas, senyawa-senyawa terpisah karena perbedaan polaritas. Afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak tergantung kedekatan polaritas analit terhadap fase diam dan fase gerak (*like dissolve like*). Analit akan cenderung larut dalam fase dengan polaritas sama. Analit akan berpartisipasi diantara dua fase yaitu fase padat-cair dan fase cair-cair. Ketika analit berpartisipasi antara fase padat dan cair faktor utama pemisahan adalah adsorpsi. Sedangkan bila analit berpartisipasi antara fase cair dan fase cair, faktor utama pemisahan adalah kelarutan. Prinsip pemisahan dimana analit terpisah karena afinitas terhadap fase padat dan fase cair biasa disebut dengan adsorpsi dan metode kromatografinya biasa disebut kromatografi adsorpsi. Sedangkan prinsip pemisahan dimana analit terpisah karena afinitas terhadap fase cair dan fase cair disebut dengan partisi dan metode kromatografinya biasa disebut kromatografi cair.

b. Pemisahan berdasarkan muatan ion

Pemisahan berdasarkan muatan ion dipengaruhi oleh jumlah ionisasi senyawa, pH lingkungan dan keberadaan ion lain. Pemisahan yang disebabkan oleh kompetisi senyawa-senyawa dalam sampel dengan sisi resin yang bermuatan sehingga terjadi penggabungan ion-ion dengan muatan yang berlawanan

disebut kromatografi penukar ion. Pemisahan yang terjadi karena perbedaan arah dan kecepatan pergerakan senyawa-senyawa dalam sampel karena perbedaan jenis dan intensitas muatan ion dalam medan listrik disebut elektroforesis.



**Gambar 1.1** Faktor-faktor yang dapat mendorong dan menghambat migrasi analit dalam kromatografi

c. Pemisahan berdasarkan ukuran molekul

Ukuran molekul suatu senyawa mempengaruhi difusi senyawa-senyawa melewati pori-pori fase diam. Pemisahan terjadi karena perbedaan difusi senyawa-senyawa melewati pori-pori fase diam dengan ukuran pori-pori yang bervariasi. Senyawa dengan ukuran molekul besar hanya berdifusi ke dalam pori-pori fase diam yang berukuran besar, sedangkan senyawa dengan ukuran molekul kecil akan berdifusi ke dalam semua pori-pori fase diam, sehingga terjadi perbedaan kecepatan pergerakan molekul melewati fase diam. Senyawa dengan ukuran molekul besar memiliki kecepatan yang lebih besar dibanding senyawa dengan ukuran molekul kecil. Metode pemisahan ini biasa disebut dengan kromatografi permeasi gel.

d. Pemisahan berdasarkan bentukan spesifik

Pemisahan senyawa berdasarkan bentukan yang spesifik melibatkan ikatan kompleks yang spesifik antara senyawa sampel dengan fase diam. Ikatan ini sangat selektif seperti ikatan antara antigen dan antibody atau ikatan antara enzim dengan substrat. Pemisahan ini biasa disebut dengan kromatografi afinitas. Fase diam KLT dengan sorben yang memiliki bentukan spesifik dengan selektifitas tinggi dalam bentuk lempeng siap pakai belum tersedia dipasaran.

**Pertanyaan-pertanyaan :**

1. Faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi migrasi analit dalam sistem kromatografi ?
2. Bagaimana cara menentukan prinsip pemisahan yang digunakan pada suatu kondisi analisis metode KLT?
3. Bagaimana pengaruh sifat fisika kimia komponen sampel dalam pemilihan prinsip pemisahan pada KLT?

## Bab 2

# Tahapan Metode Analisis KLT

Pada metode analisis KLT, beberapa persiapan harus dipenuhi untuk mendapatkan hasil pemisahan sampel yang baik meliputi preparasi sampel, penanganan lempeng KLT, penanganan eluen, penanganan *chamber* tempat elusi, aplikasi sampel, proses pengembangan sampel dan evaluasi noda.

### 1. Preparasi sampel

Sebelum melakukan preparasi sampel terlebih dahulu ditentukan jenis sampel dan sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis. Jenis sampel terbagi menjadi :

#### a. Sampel larutan jernih

Preparasi sampel larutan jernih lebih mudah dibandingkan jenis sampel yang lain yaitu dengan mengencerkan sampel dengan pelarut yang sesuai yaitu yang mudah menguap yang dapat melarutkan sampel dan sebisa mungkin sedikit melarutkan



matrik. Pelarut pada metode KLT sebaiknya menggunakan pelarut yang mudah menguap karena akan memudahkan penguapan pelarut saat aplikasi (penotolan) sampel.

b. Sampel larutan keruh

Preparasi larutan keruh dilakukan dengan mengekstraksi analit dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat yaitu vorteks atau *ultrasonic degaser*. Penarikan analit dengan cara ekstraksi harus dipastikan bahwa analit sudah terekstraksi sempurna. Pemastian kesempurnaan ekstraksi dapat dilakukan dengan cara ekstraksi berulang atau dengan menganalisis sisa (ampas) hasil ekstraksi.

c. Sampel semisolid (setengah padat)

Preparasi sampel semisolid dilakukan dengan cara penghancuran sampel dengan cara digerus atau diblender. Sampel yang telah dihancurkan diekstraksi dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat dengan menggunakan vorteks atau *ultrasonic degaser*. Kesempurnaan penarikan analit dengan cara ekstraksi juga harus dipastikan. Ekstraksi pada sampel semisolid dapat di bantu dengan pemanasan. Pemanasan dapat mengencerkan bentuk sampel dari semisolid menjadi larutan sehingga penarikan analit dalam sampel menjadi lebih mudah. Hanya saja pada pemisahan ampas dengan larutan pengeksrak sebaiknya dilakukan sebelum dingin karena bila pemisahan

dilakukan setelah sampel dingin dikawatirkan analit akan terjebak kembali ke dalam sampel semisolid.

d. Sampel padat.

Preparasi sampel padat dilakukan dengan cara menyerbuk sampel dengan cara digerus atau diblender. Serbuk diekstraksi dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat yaitu vorteks atau *ultrasonic degasser*.

Sifat fisika kimia analit yang harus diketahui sebelum melakukan preparasi sampel adalah kelarutan analit dan stabilitas analit. Dari kelarutan analit dapat dipilih pelarut untuk preparasi sampel. Stabilitas analit menentukan cara preparasi sampel. Misalnya untuk analit yang tidak stabil pada suhu tinggi, dihindari adanya pemanasan pada preparasi sampel. Pada ekstraksi sampel dengan *ultrasonic degasser* sebaiknya alat diatur pada suhu normal tanpa pemanasan.

Penyaringan larutan sampel juga merupakan tahapan penting pada preparasi sampel. Penyaringan dapat memperbaiki kromatogram yang dihasilkan dan mempermudah penotolan sampel karena dapat memisahkan analit dari partikel-partikel yang ada dalam larutan sampel. Adanya partikel dalam larutan sampel dapat menyebabkan munculnya pengotor pada kromatogram yang dihasilkan terutama bila partikel tersebut larut dalam fase gerak dan terdeteksi oleh detektor yang digunakan. Selain itu adanya partikel dalam larutan sampel dapat mengganggu penetrasi analit

dalam lempeng KLT ketika penotolan larutan sampel. Berbagai penyaring yang tersedia dipasaran dapat digunakan, seperti penyaring berbahan selulosa asetat, selulosa dan nitrat, alumina atau polipropilen.

Pada khusus dimana terdapat banyak kontaminan yang mengganggu noda analit pada kromatogram KLT maka diperlukan prosedur preparasi sampel tambahan yaitu metode pembersihan (*clean-up*) seperti yang dilakukan pada metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Prosedur *clean-up* dapat menggunakan *solid phase extraction* yang sesuai. Sorben *solid phase extraction* (SPE) dapat berupa diatomeae bumi, gel silika, C2, C8, C18, CN, diol, NH<sub>2</sub> dan fenil-terikat pada gel silika, serta sorben penukar ion dengan bahan dasar silika dan berbagai polimer. Selektifitas ekstraksi dapat dicapai dengan memilih sorben yang tepat yaitu yang dapat menyerap analit tetapi tidak menyerap kotoran, atau yang dapat menyerap kotoran dan tidak menyerap analit sehingga analit terelusi keluar. Pada sampel biologis seperti plasma darah pada tahapan preparasi sampel dapat ditambah dengan trikloroasetat, asam perklorat atau asetoneitril untuk menghilangkan protein dengan cara pengendapan.

## **2. Penanganan Lempeng KLT**

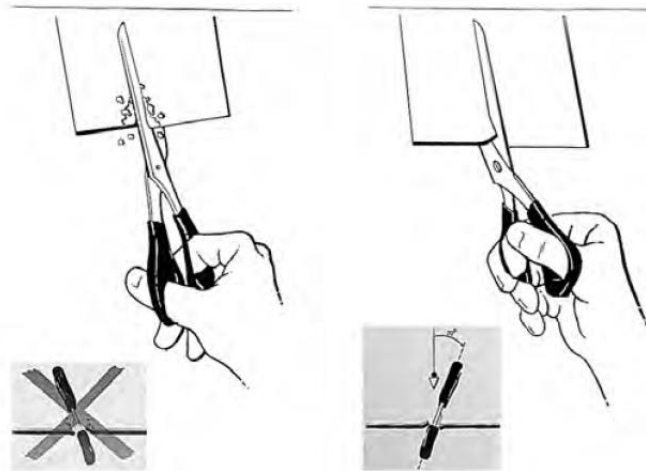
Sebelum menggunakan lempeng KLT, pastikan dulu jenis lempeng yang digunakan (dapat dilihat di macam sorben) sehingga tidak

terjadi kesalahan penanganan lempeng. Lempeng KLT bersifat rapuh dan harus ditangani dengan benar mulai dari pembukaan kemasan sampai ke tahap dokumentasi. Pendukung sorben yang paling umum digunakan pada lempeng KLT adalah aluminium foil, film plastik dan piring kaca. Lempeng tersebut digunakan untuk berbagai tujuan dan penanganan masing-masing jenis pendukung sorben berbeda-beda. Film plastik jarang digunakan karena tidak tahan pemanasan. Pendukung sorben yang banyak digunakan adalah aluminium foil.

## **2.1. Pemotongan Lempeng**

Pemotongan lempeng KLT dengan pendukung aluminium foil dapat menggunakan gunting. Saat memotong lempeng dengan pendukung aluminium foil sudut gunting harus diperhatikan. Sudut gunting tidak boleh cenderung ke kiri seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1, karena hal ini biasanya menyebabkan lepasnya sorben dari pendukungnya. Akibatnya, terjadi kesenjangan kapilaritas antara sisi lapisan sorben tepi dengan sisi lapisan sorben tengah, di mana pelarut bergerak maju lebih cepat pada sisi tepi dibandingkan sisi tengah dari kromatogram tersebut. Hal ini terjadi karena pelarut juga mengalir dari bagian tepi potongan menuju ke tengah kromatogram sehingga menyebabkan deformasi noda dan kromatogram miring dan menyimpang jalur (gambar 2.2). Pemotongan lempeng dengan pendukung kaca dapat menggunakan alat pemotong kaca khusus seperti T. Omori yang diproduksi oleh

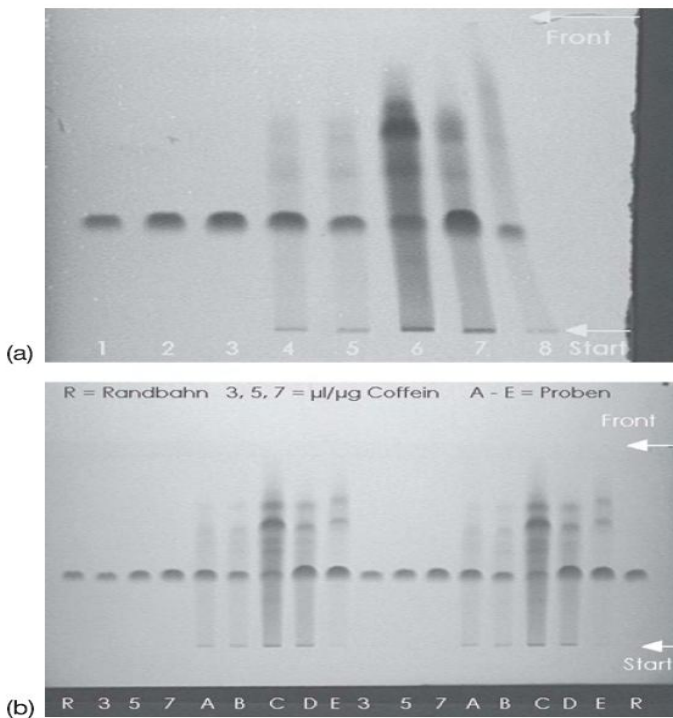
DESAGA (Gambar 2.3). Alat ini dapat memotong lempeng kaca selebar 1 cm dengan baik.



**Gambar 2.1** Metode pengguntingan lempeng KLT, Sudut pemotongan yang salah (a), sudut pemotongan yang benar (b)

Pengambilan dan pemindahan lempeng dilakukan dengan hati-hati yaitu dengan memegang bagian tepi dari lempeng. Pada saat penanganan lempeng diusahakan tidak meninggalkan sidik jari ataupun keringat pada sorben lempeng KLT. Dan juga jangan meletakkan benda diatas sorben lempeng KLT karena benda tersebut dapat meninggalkan kotoran pada lempeng KLT. Sidik jari, keringat dan kotoran yang menempel pada sorben lempeng KLT dapat terlihat jelas setelah diderivatisasi oleh penampak noda,

misalnya, ninhidrin atau vanilin-asam sulfat ataupun setelah dilihat dibawah sinar UV. Adanya noda sidik jari, keringat atau kotoran dalam lempeng KLT menyebabkan munculnya noda tambahan yang tidak diinginkan yang dapat mengganggu keberadaan noda analit.



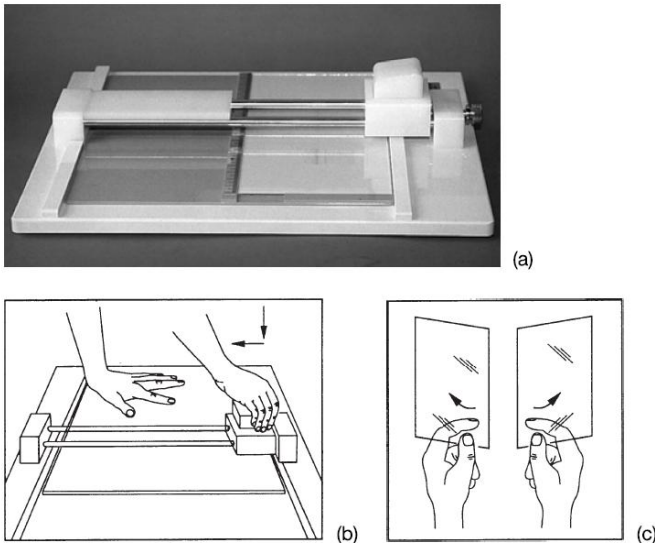
**Gambar 2.2** Pengaruh sudut pemotongan lempeng KLT terhadap hasil kromatografi. Hasil kromatografi dengan sudut pemotongan yang salah (a) dan benar (b).

## 2.2. Pencucian lempeng (*Prewashing*)

Teknik pencucian lempeng KLT / KLTKT diperlukan untuk menghilangkan pengotor lempeng baik itu pengotor yang berasal dari bahan pengikat lempeng maupun dari atmosfer yang teradsorpsi ke dalam lempeng. Adanya pengotor dalam lempeng ini bermasalah jika pengotor tersebut terdeteksi oleh pereaksi penampak noda yang digunakan ataupun oleh lampu deteksi yang digunakan. Pada umumnya kotoran dalam lempeng bersifat hidrofil sehingga penggunaan fase gerak polar akan menyebabkan pengotor lempeng cenderung bermigrasi mengikuti fase gerak dan memiliki  $R_f$  tinggi ( $>0,8$ ). Bila noda analit berada dekat dengan noda pengotor lempeng maka pemisahan antara noda analit dengan noda pengotor lempeng menjadi kurang bagus atau resolusinya jelek. Konsentrasi pengotor biasanya tidak dipermasalahkan. Bila fase gerak yang digunakan cenderung non polar maka hampir tidak ada migrasi dari pengotor lempeng sehingga pengotor tetap tersebar dalam lempeng yang menyebabkan munculnya gangguan latar belakang saat deteksi lempeng.

Lempeng yang telah dimurnikan dengan cara pencucian akan memiliki latar belakang yang lebih bersih dan lebih seragam saat diamati secara visual maupun dengan bantuan lampu deteksi, serta dapat meningkatkan rasio sinyal/noise bila lempeng dideteksi dengan KLT Scanner atau densitometri. Hampir semua sorben dapat dilakukan pencucian lempeng, tergantung pada aplikasi yang diinginkan. Pencucian lempeng dilakukan dengan cara mengelusi

lempeng dengan metanol, campuran metanol dengan kloroform atau dengan eluen yang digunakan. Setelah dielusi, lempeng harus dikeringkan untuk menghilangkan eluen yang terjebak dalam lempeng sehingga tidak ada pelarut. Setelah kering lempeng hasil pencucian dapat digunakan untuk analisis. Teknik pencucian lempeng ini perlu dipertimbangkan pada analisis kuantitatif dan direkomendasikan untuk pengujian stabilitas dan analisis jejak (*trace*). Dalam analisis rutin pencucian lempeng dapat dilakukan untuk menghilangkan noda pengotor lempeng yang dapat mengganggu noda analit. Gambar 2.4 menunjukkan pengaruh pencucian lempeng pada kromatogram yang dihasilkan.



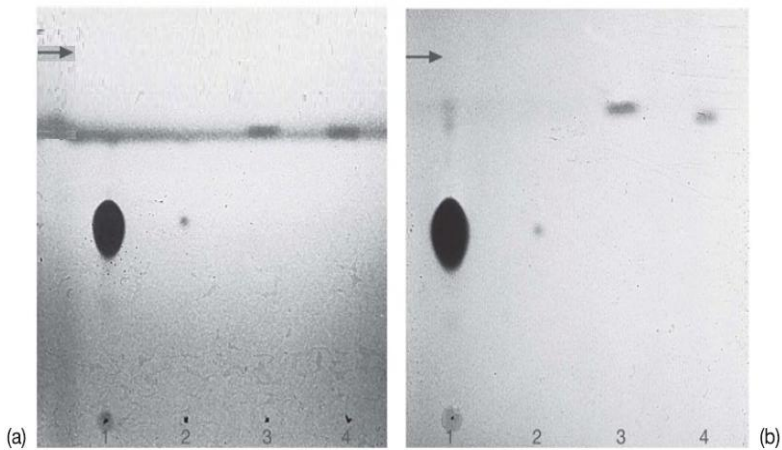
**Gambar 2.3** Alat pemotong lempeng KLT dengan pendukung kaca dan cara pemotongan lempeng



Adanya teknik pencucian lempeng memungkinkan adanya daur ulang lempeng. Daur ulang lempeng KLT dapat dilakukan dengan catatan bila seluruh noda sampel dapat terelusi sempurna dan larutan pengembang yang digunakan tidak merubah sifat fisika kimia dari sorben baik itu polaritas, muatan ion dan sebagainya. Tidak berubahnya sifat fisika kimia sorben menyebabkan lempeng KLT daur ulang akan memberikan pemisahan yang sama dibandingkan sebelum lempeng KLT didaur ulang. Dengan terelusnya seluruh noda sampel maka akan didapatkan lempeng dengan latar belakang yang bersih dan seragam karena noda sampel maupun noda pengotor akan terkonsentrasi ditepi atas dari lempeng. Cara pembuatan Lempeng KLT daur ulang adalah dengan mengelusi kembali lempeng yang sudah digunakan dengan eluen selama waktu tertentu. Lamanya elusi lempeng daur ulang umumnya empat kali lama elusi normal atau tergantung dari eluen yang digunakan dan kecepatan terelusnya noda sampel. Setelah lempeng terelusi, lempeng dikeringkan dalam lemari asam selama 10 menit kemudian lempeng dikeringkan dengan dioven selama 15 menit suhu kurang lebih 100°C.

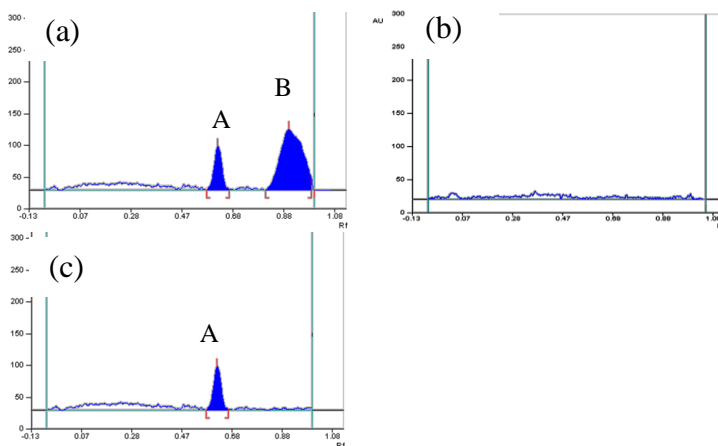
Dari profil kromatografi hasil scanning dengan densitometer menunjukkan bahwa lempeng KLT daur ulang lebih bersih atau memiliki pengotor lebih sedikit dibandingkan lempeng baru. Dikarenakan pada lempeng baru, di ujung lempeng atau pada akhir elusi terdapat pengotor yang terlihat dengan lampu UV, meskipun pada analisis kuantitatif pengotor tersebut tidak mengganggu

karena mempunyai  $R_f > 0,85$  (berada di luar  $R_f$  analisis kuantitatif yaitu 0,2-0,8). Pada lempeng daur ulang pengotor tersebut tidak tampak karena baik noda sampel maupun noda pengotor akan terelusi oleh eluen. Bila diamati dengan densitometer panjang gelombang 254 nm lempeng daur ulang akan terlihat lebih bersih dibandingkan lempeng baru sehingga untuk pemakaian kualitatif lempeng daur ulang akan lebih menguntungkan dibanding lempeng baru (gambar 2.5).



**Gambar 2.4** Pengaruh pencucian lempeng pada hasil kromatografi. Hasil kromatografi pada lempeng tanpa pencucian dimana terdapat noda pengotor yang mengganggu noda analit (a), lempeng dengan pencucian lempeng yang lebih bersih (b).

Untuk analisis kuantitatif, kepresisian hasil analisis lempeng daur ulang juga harus diuji. Pemilihan jenis lempeng yang digunakan juga mempengaruhi hasil daur ulang lempeng. Daur ulang lempeng KLTKT (Kromatografi lapis tipis kinerja tinggi) lebih bagus dibandingkan KLT konvensional baik dari segi kebersihan lempeng dari pengotor maupun kepresisian hasil analisis kuantitatif.



**Gambar 2.5.** Kromatogram (pada  $\lambda$  245 nm) : larutan standar betametason ditotolkan pada lempeng KLTKT baru sebelum daur ulang (a), lempeng setelah didaur ulang (b) dan larutan standar betametason ditotolkan pada lempeng daur ulang (c). Identitas Puncak : (A) Betametason, (B) Pengotor fase diam

### 2.3. Aktivasi lempeng

Aktivasi lempeng ditujukan untuk menghilangkan kelembaban air atmosfer yang teradsorpsi dalam lempeng. Contoh aktivasi lempeng yaitu pegeringan lempeng silika gel 30 menit pada 120 ° C. Jika suhu yang digunakan terlalu tinggi akan menyebabkan pelepasan senyawa kimia dalam lempeng yang dapat merubah sifat silika gel secara irreversible (tak terpulihkan). Pada kromatografi adsorpsi, aktivitas lempeng yang tinggi dapat meningkatkan ketertambatan fase diam sehingga jarak migrasi sampel menjadi lebih pendek. Untuk mendapatkan reproduibilitas nilai ketertambatan (faktor retardasi) diperlukan penentuan tingkat aktivasi lempeng yang baik.

Proses aktivasi lempeng diatas hanya cocok untuk lempeng silika gel dan aluminium oksida. Untuk lempeng dengan sorben lain aktivasi lempeng dilakukan sesuai petunjuk yang disarankan produsen lempeng. Misalnya untuk lempeng KLTKT modifikasi amino (Merck) merekomendasikan agar lempeng diaktivasi selama 10 menit pada 120 ° C sebelum digunakan.

Temperatur dan lama aktivasi lempeng merupakan sumber kesalahan dalam aktivasi. Terlalu pendek waktu aktivasi akan mengakibatkan tidak sepenuhnya penghilangan kelembaban air dalam lempeng ataupun sisa eluen pencucian lempeng sehingga lempeng akan memberikan latar belakang yang tidak seragam. Sebaliknya waktu aktivasi yang terlalu lama akan menghilangkan air kimia terikat yang dapat merubah sifat fisika kimia lempeng.

Selain itu lapisan sorben lempeng dapat retak karena adanya modifikasi kimia.

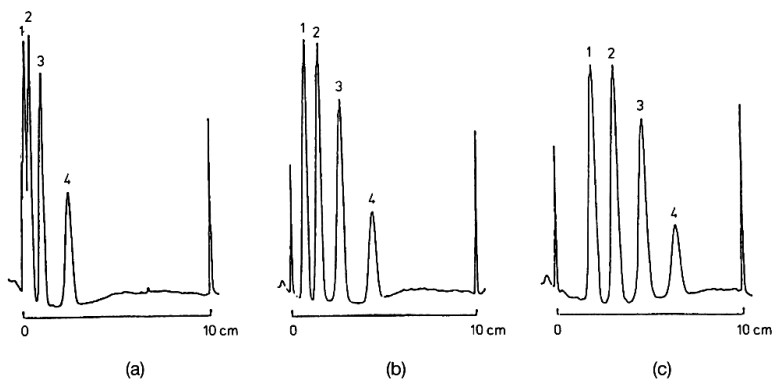
#### **2.4. Pengkondisian lempeng (*conditioning*)**

Pengkondisian lempeng dapat dilakukan untuk mempengaruhi proses kromatografi. Pengkondisian lempeng ditujukan untuk mengontrol kelembaban lempeng dalam chamber. Kelembaban lempeng dapat dikontrol dengan menggunakan pereaksi pengontrol kelembaban dalam chamber twin trough. Pereaksi ditempatkan dalam salah satu kompartemen dalam chamber twin trough. Beberapa pereaksi (larutan garam) yang dapat mengontrol kelembaban terdapat pada tabel 1.

Pengaruh pengkondisian lempeng dapat dilihat dari nilai faktor retardasi dan resolusi pemisahan pada kromatogram yang dihasilkan (gambar 2.6).

**Tabel 2.1** Pengaturan kelembaban dalam pengkondisian lempeng KLT

Garam yang digunakan	% Kelembaban relatif (20°C)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	95
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	92
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	90
KCl	86
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	80
NaCl	76
$\text{NaClO}_3$	75
$\text{NaNO}_2$	65
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	63
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	55
$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	52
$\text{K}_2\text{CO}_3$	45
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	42
$\text{CrO}_3$	35
$\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	32
$\text{K}(\text{OOCK}3)$	20
$\text{LiCl} \times \text{H}_2\text{O}$	15



**Gambar 2.6.** Pengaruh pengkondisian lempeng terhadap retardasi dan resolusi  
 Sorben : KLTKT silika gel 60 F 254  
 Eluen : sikloheksan  
 Pengkondisian lempeng : (a) 20% kelembaban relative  
 (b) 50% kelembaban relative  
 (c) 80% kelembaban relative  
 Deteksi : Lampu UV 254 nm

## 2.5. Impregnasi Lempeng

Masalah yang muncul dalam pemisahan dengan KLT dapat diatasi dengan merubah sorben fase diam yang digunakan dengan cara impregnasi sorben lempeng KLT dengan senyawa anorganik maupun senyawa organik. Selain memakan waktu, teknik ini memerlukan pengalaman dalam pembuatannya. Impregnasi dapat dilakukan dengan cara pencelupan, penyemprotan maupun dengan pra elusi dengan pelarut pengimpregnasi. Tujuan impregnasi lempeng tergantung masalah pemisahan KLT yang dihadapi. Misalnya untuk mendapatkan lempeng KLT dengan pH yang homogen, dapat dilakukan dengan cara pengkondisian lempeng

atau dengan diimpregnasi lempeng dengan uap asam atau uap ammonia. Impregnasi dengan cara pencelupan dapat digunakan untuk pemisahan senyawa tak jenuh (impregnasi dengan perak nitrat). Impregnasi dengan cara penyemprotan dapat untuk memisahkan senyawa antibiotik (impregnasi dengan EDTA). Impregnasi dengan cara elusi dengan eluen dapat digunakan untuk memisahkan senyawa alkaloid (dengan mengontrol pH) dan juga untuk merubah polaritas lempeng silika gel dari polar menjadi non polar (impregnasi dengan pelarut non polar).

### **3. Penanganan Eluen**

Pemilihan eluen merupakan faktor yang paling berpengaruh pada sistem KLT. Eluen dapat terdiri dari satu pelarut atau campuran dua sampai enam pelarut. Campuran pelarut harus saling sampur dan tidak ada tanda-tanda kekeruhan.

Fungsi eluen dalam KLT :

- Untuk melarutkan campuran zat
- Untuk mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga noda memiliki  $R_f$  dalam rentang yang dipersyaratkan
- untuk memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan.



Eluen juga harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- memiliki kemurnian yang cukup,
- stabil,
- memiliki viskositas rendah,
- memiliki partisi isothermal yang linier,
- tekanan uap yang tidak terlalu rendah atau tidak terlalu tinggi,
- toksisitas serendah mungkin

Pemilihan eluen yang cocok dapat dilakukan melalui tahapan optimasi eluen. Optimasi eluen diawali dengan menentukan sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis dan jenis sorben fase diam yang digunakan. Misalnya sorben dengan prinsip pemisahan berdasarkan muatan ion diperlukan data tentang jenis dan intensitas muatan ion analit dalam pemilihan komposisi eluen. Pada sorben dengan prinsip pemisahan berdasarkan polaritas dibutuhkan nilai koefisien partisi ( $P$  atau  $\log P$ ) dan tetapan disosiasi ( $pK_a$ ) analit dalam penentuan eluen. Nilai koefisien partisi analit digunakan untuk menentukan afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak. Nilai tetapan disosiasi ( $pK_a$ ) digunakan untuk menentukan bentuk analit (ion atau molekul) pada pH lingkungan tempat analit berada. Bila analit berada pada pH dibawah  $pK_a$ , analit akan berbentuk molekul. Bila analit berada pada pH diatas  $pK_a$ , analit berbentuk ion. Saat analit berbentuk molekul afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak akan sesuai dengan nilai koefisien partisinya tetapi ketika analit

berbentuk ion maka analit akan bersifat polar atau sebagian besar larut dalam pelarut polar dan hampir tidak dapat larut dalam pelarut non polar. Oleh karena itu nilai  $\log P$  dan  $pK_a$  analit menentukan apakah analit satu dengan analit yang lain dapat dipisahkan dengan metode KLT. Bila dua analit memiliki koefisien partisi ( $\log P$ ) sama dan nilai tetapan disosiasi ( $pK_a$ ) juga sama, maka kedua analit tersebut akan sulit dipisahkan dengan metode KLT. Bila dua analit memiliki nilai  $\log P$  sama tetapi nilai  $pK_a$  berbeda, maka kedua analit masih dapat dipisahkan dengan cara mengatur pH dari eluen yang digunakan. pH eluen diatur agar salah satu analit berada dalam bentuk molekul sedangkan analit yang lain berada dalam bentuk ion. Selain nilai  $\log P$  dan  $pK_a$  tentu sifat fisika kimia yang lain (misalnya ikatan kimia) juga menentukan proses pemisahan analit. Tabel 2 menunjukkan beberapa pelarut yang paling sering digunakan dalam KLT, disertai dengan nilai  $\log P$  dan koefisien kecepatan migrasi masing-masing pelarut, yang digunakan sebagai acuan kekuatan elusi.

Nilai  $K$  merupakan kecepatan migrasi pelarut melewati lempeng silika gel, yang berhubungan dengan lamanya waktu pengembangan KLT. Semakin besar nilai  $K$  semakin cepat waktu pengembangan KLT. Nilai  $\log P$  menunjukkan polaritas pelarut yang berhubungan dengan afinitas analit dengan pelarut. Analit yang bersifat polar akan memiliki afinitas tinggi terhadap pelarut polar dan afinitasnya rendah terhadap pelarut non polar. Sebaliknya analit yang bersifat non polar akan memiliki afinitas

tinggi terhadap pelarut non polar dan afinitasnya rendah terhadap pelarut polar. Pencarian eluen berdasarkan pustaka yang ada juga dapat membantu tahapan optimasi eluen. Eluen dari pustaka dapat dimodifikasi untuk mendapatkan pemisahan yang efisien. Bila noda yang dihasilkan belum bagus (noda masih berekor atau belum simetris), eluen dapat dimodifikasi dengan menambahkan sedikit asam atau basa sehingga merubah pH eluen. Dari beberapa eluen yang dicoba dalam optimasi eluen dapat ditentukan efisiensi kromatogram yang dihasilkan (dapat dilihat pada bab 3.2) sehingga dapat diperoleh eluen yang optimal.

#### **4. Penanganan Chamber**

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam penanganan chamber adalah kondisi chamber dan jenis chamber. Chamber harus dipastikan dalam kondisi bersih (bebas dari kotoran) dan kering (bebas dari adanya air). Adanya kotoran dan air dalam chamber akan mengganggu kromatogram yang dihasilkan dan mempengaruhi reproduibilitas pemisahan KLT.

Jenis chamber yang digunakan juga harus diperhatikan untuk menentukan teknik pengembangan yang akan digunakan. Ada berbagai jenis chamber KLT, masing-masing dirancang dengan fitur khusus untuk mengontrol reproduibilitas pengembangan KLT.

**Tabel 2.2** Nilai k dan Log P beberapa pelarut

Pelarut	k (mm <sup>2</sup> /s)	Log P
n-heptana	11,4	3,42
n-heksana	14,6	3,0
n-pentana	13,9	2,58
Sikloheksan	6,7	2,5
Toluene	11,0	2,52
Kloroform	11,6	1,67
Diklormetan	13,2	1,01
Diisopropil eter	13,2	1,4
Tert-Butanol	1,1	0,6
Dietil eter	15,3	0,76
Isobutanol	1,6	0,95
Asetonitril	15,4	0,17
Isobutil metil keton	9,1	1,6
2-propanol	2,5	0,38
Etil asetat	12,1	0,29
1-propanol	2,9	0,55
Etilmetil keton	13,9	2,34
Aseton	16,2	0,2
Etanol	4,2	0,07
1,4 dioksan	6,5	-0,31
Tetrahidrofuran	12,6	0,4
Metanol	7,1	-0,27
Piridin	8,0	0,7
Sorben	Lempeng KLT silika gel 60 F254	
Tipe chamber	(Merck) Chamber N dengan	
Temperatur kamar	penjenuhan	
Jarak migrasi pelarut	22°C	
	100mm	

Dalam chamber terjadi beberapa hal yaitu kejenuhan uap pelarut, adsorpsi uap pelarut oleh sorben lempeng KLT, munculnya

efek tepi yang disebabkan oleh ketidakseimbangan gaya kapilaritas pada sisi tengah dengan sisi tepi lempeng KLT. Hal- hal tersebut sangat mempengaruhi proses pemisahan, oleh karena itu modifikasi fitur pada chamber dilakukan untuk menghilangkan efek yang tidak diinginkan dan memperbaiki resolusi pemisahan.

Berikut ini adalah beberapa jenis chamber KLT :

- Chamber Nu (chamber normal, alas datar, tak jenuh)
- Chamber Ns (chamber normal, alas datar, jenuh)
- Chamber Twin-trough (chamber dengan dua kompartemen tempat eluen)
- Chamber Su (chamber sandwich, tak jenuh)
- Chamber Ss (chamber sandwich, jenuh)
- Chamber horizontal (jenuh dan tak jenuh)
- Chamber elusi otomatis

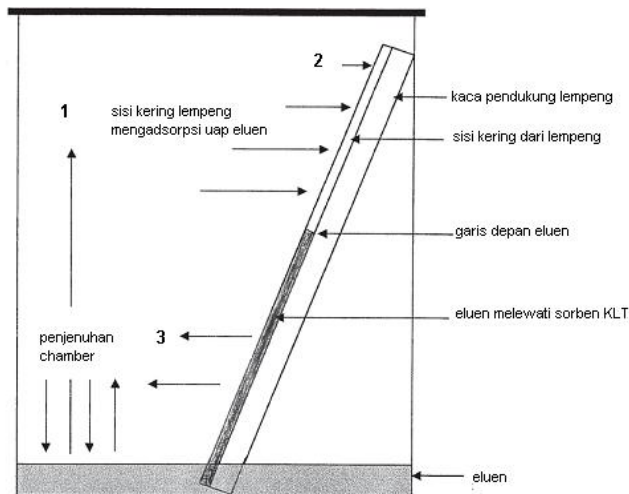
#### **4.1. Chamber N**

Chamber normal merupakan chamber dengan alas datar dimana semua komponen pelarut berada dalam kesetimbangan dengan uap pelarut yang berada didalam chamber baik sebelum maupun ketika proses kromatografi berlangsung. Proses yang terjadi dalam chamber adalah diawali dengan terjadi keseimbangan antara fase eluen dan fase uap eluen dalam chamber N. Ketika lempeng masuk kedalam chamber, lempeng langsung kontak dengan uap eluen. Sorben lempeng KLT berinteraksi dengan molekul uap pelarut.

Interaksi yang terjadi tergantung dari kejenuhan chamber. Secara bersamaan pelarut bermigrasi melewati sorben lempeng KLT melalui gaya kapilaritas dan juga berinteraksi dengan uap eluen secara simultan (gambar 2.7). Didalam lempeng sejumlah interaksi terjadi yaitu interaksi antara fase uap eluen, fase eluen, kelembaban yang teradsorpsi dalam lempeng, dan sorben lempeng itu sendiri. Adanya analit dalam lempeng akan menambah jumlah interaksi yang terjadi. Pada chamber N tak jenuh, eluen sebanyak 3-5 mm kedalaman diletakkan dalam chamber, kemudian chamber ditutup dengan penutup chamber. Uap eluen akan memenuhi ruangan dalam chamber dan terjadi proses penjenuhan chamber kurang lebih selama 15 menit. Kejenuhan di bagian tengah chamber sekitar 75% dan kejenuhan ruangan di atasnya lebih kecil lagi. Ketika lempeng KLT dimasukkan dalam chamber kejenuhan sedikit berubah dan butuh beberapa waktu untuk mengkondisikan kejenuhan baru. Proses pengembangan diawali dengan meningkatnya aliran molekul eluen melewati sorben lempeng. Dibagian atas chamber terjadi adsorpsi uap eluen oleh lempeng KLT kering (bagian lempeng yang tidak terbasahi eluen) sehingga uap eluen semakin tak jenuh. Terjadi penguapan dari eluen yang ada dalam lempeng menuju ruangan dalam chamber yang menyebabkan kecepatan alir eluen berkurang (gambar 2.8). Analit dengan Rf rendah tidak terpengaruh oleh efek tersebut tetapi analit dengan Rf mendekati batas depan eluen akan mengalami perubahan bentuk noda dari bulatan menjadi pita tipis. Eluen yang

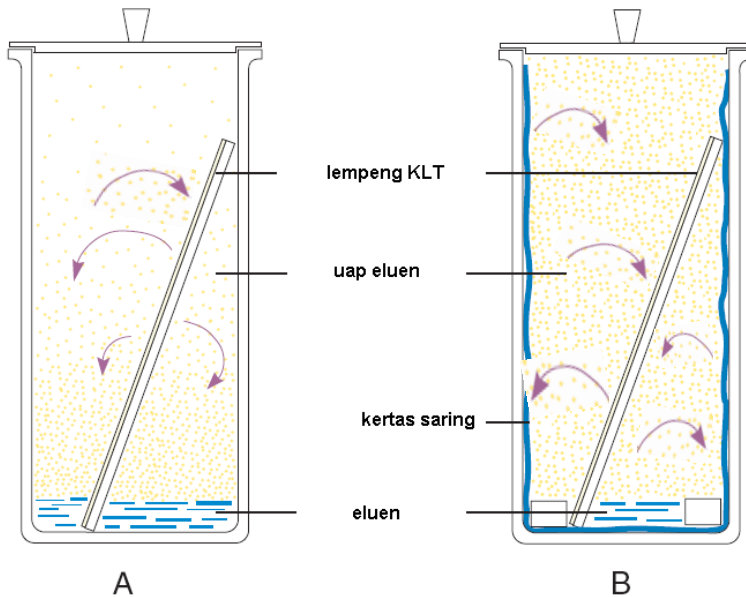
terdiri dari pelarut dengan titik didih rendah dan sangat mudah menguap dapat menyebabkan terjadinya efek tepi dan melengkungnya bentuk garis depan eluen. Hal ini dikarenakan penguapan tidak hanya terjadi dari atas kebawah tapi juga dari samping tepi chamber ke tengah chamber.

Efek ini dapat diatasi dengan cara sederhana yaitu dengan membuat chamber N jenuh. Dalam chamber N jenuh sisi dalam chamber dilapisi dengan kertas sorben (kertas saring). Kejenuhan lempeng dicapai dalam waktu 5-15 menit tergantung pelarut yang digunakan. Ketika lempeng dimasukkan dalam chamber praloading sisi kering lempeng yang terjadi hampir sempurna sehingga efek yang tidak diinginkan diatas tidak muncul.



**Gambar 2.7** Proses yang terjadi dalam chamber.

Pada pemisahan dengan KLT sebaiknya menyebutkan jenis pengembangan yang dilakukan untuk mendapatkan reprodusi nilai  $R_f$ . Penggunaan chamber jenuh akan memiliki nilai  $R_f$  yang berbeda dibanding chamber tak jenuh. Chamber jenuh memiliki nilai  $R_f$  lebih rendah bila dibandingkan dengan chamber tak jenuh dengan kondisi pengembangan yang sama. Pada chamber jenuh terdapat dua pengamatan garis depan eluen yaitu garis depan eluen nyata dan garis depan eluen teramati. Adanya kondensasi uap eluen menyebabkan munculnya garis depan baru didepan garis depan eluen nyata yaitu garis depan eluen teramati (gambar 2.9).

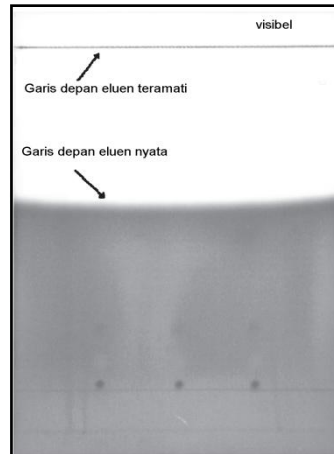


**Gambar 2.8.** Efek penjenuhan pada chamber N tak jenuh (A) dan penjenuhan pada chamber N jenuh (B).

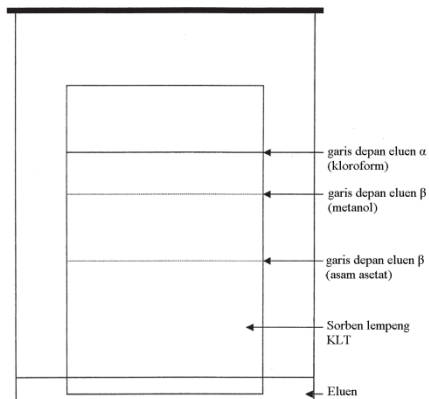


Penggunaan eluen dengan komposisi campuran pelarut yang terdiri dari pelarut sangat polar dan sangat tidak polar akan menyebabkan proses demixing yaitu kurang bercampurnya eluen. Sebagai contoh pada pengembangan dengan eluen terdiri dari kloroform, metanol dan asam asetat, pelarut yang paling polar (asam asetat) teradsorpsi oleh lempeng KLT dan membentuk garis depan eluen  $\beta$  yang tidak teramati. Kemudian pelarut dengan polaritas dibawahnya yaitu metanol juga teradsorpsi oleh lempeng KLT yang membentuk garis depan eluen  $\beta$  yang lain yang juga tidak teramati. Sedangkan kloroform bermigrasi melewati lempeng KLT dan membentuk garis depan eluen yang teramati yaitu garis depan eluen  $\alpha$  (gambar 2.11). Kedua garis depan  $\beta$  pada awalnya tidak teramati. Setelah elusi selesai dan lempeng divisualisasi dengan penampak noda atau lampu UV garis depan eluen  $\beta$  akan tampak. Efek demixing eluen pada lempeng KLT dapat mengganggu kromatogram yang dihasilkan. Analit yang berada tepat atau didekat garis depan eluen  $\alpha$  dan  $\beta$  akan membentuk noda yang jelek (pecah). Demixing eluen dapat dihindari dengan cara menjenuhkan lempeng dengan uap eluen dengan chamber twin trough (gambar 2.12). Selain itu pemilihan komposisi yang eluen yang digunakan juga perlu diperhatikan untuk mencegah efek demixing eluen. Pada pencampuran pelarut sangat polar dengan pelarut sangat non polar sebaiknya ditambah satu pelarut lagi yaitu pelarut semipolar sehingga eluen yang

terbentuk dapat bercampur dengan baik (tidak terlihat adanya kekeruhan).



**Gambar 2.9** Efek demixing eluen yaitu munculnya dua garis depan, garis depan eluen teramati dan garis depan eluen nyata



**Gambar 2.10** Formasi garis depan eluen  $\alpha$  dan  $\beta$  pada pengembangan KLT

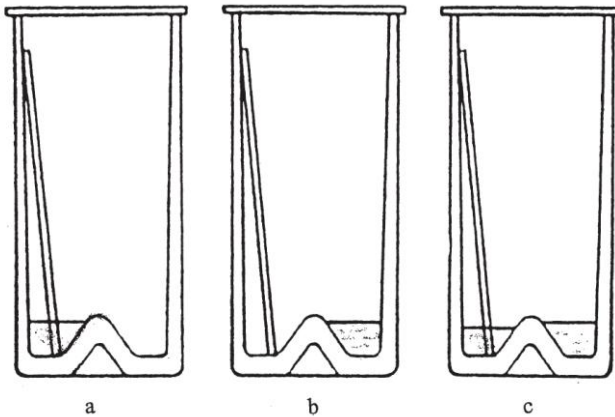
## **4.2. Chamber Twin Trough**

Chamber ini dapat mengontrol kondisi pengembangan dengan lebih baik dibandingkan chamber N. Chamber twin trough memiliki beberapa keuntungan yaitu dapat mengontrol kejenuhan dan kelembaban chamber. Seperti gambar 2.11, chamber twin trough diisi dengan eluen kurang lebih 20 ml pada sisi kompartemen kanan chamber dan sisi kompartemen kiri chamber diletakkan lempeng KLT untuk membiarkan terjadinya pra loading lempeng sehingga lempeng jenuh dengan uap eluen. Setelah lempeng jenuh, eluen dapat dialirkan dari sisi kanan menuju sisi kiri tanpa membuka tutup chamber sehingga kejenuhan fase uap eluen tetap terkontrol (gambar 11c). Sorben lempeng KLT juga dapat jenuhkan dengan pelarut *conditioning* misalnya asam sulfat yang diletakkan pada salah satu sisi kompartemen chamber. Proses penjenuhan ini penting untuk mengendalikan proses pemisahan yang rentan terhadap perubahan kelembaban.

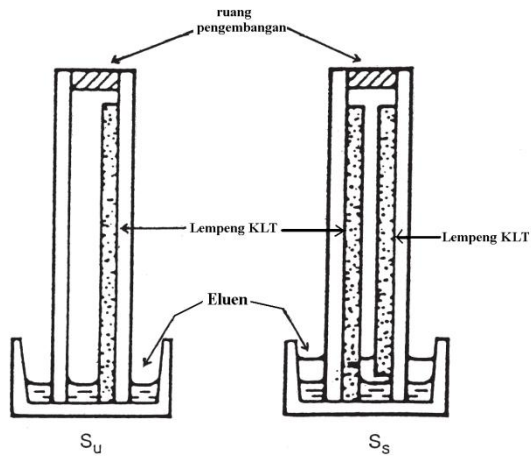
## **4.3. Chamber Sandwich dan Chamber Horizontal**

Seperti chamber N, chamber sandwich atau chamber S dapat digunakan sistem jenuh dan tak jenuh. Sistem jenuh lebih banyak digunakan. Tujuan dari chamber S adalah untuk menghasilkan ruang dalam chamber yang lebih kecil sehingga membatasi kejenuhan uap eluen. Sempitnya ruang dalam chamber membuat uap eluen sulit naik sehingga memperkecil terjadinya pra loading

dari sisi kering lempeng KLT oleh fase uap eluen (gambar 13). Pada chamber horizontal prinsip pengembangan mirip dengan chamber S. Seperti pada gambar 14, pengembangan dengan chamber horizontal membutuhkan hanya beberapa milliliter eluen yang diletakkan dalam dua kompartemen yang terletak pada sisi yang berlawanan. Sampel dapat dikembangkan dari satu sisi kompartemen atau dari kedua sisi kompartemen secara bersamaan.



**Gambar 2.11.** Chamber twin trough.  
a. Pengembangan chamber N dengan volume eluen yang sedikit (20ml)  
b. Penjenuhan lempeng dengan uap eluen  
c. Pengkondisian lempeng dengan larutan pengkondisi



**Gambar 2.12** Chamber sandwich tanpa penjuhan ( $S_U$ ) dan dengan penjuhan ( $S_S$ )



**Gambar 2.13** Chamber pengembangan horizontal (camag)

#### 4.4. Chamber Pengembangan Otomatis

Seperti namanya peralatan ini sepenuhnya mengotomatisasi pengembangan KLT. Prosedur pengembangan menggunakan teknik ascending linier. Seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.14, alat ini dapat mengontrol semua kondisi pengembangan KLT sehingga kromatogram yang dihasilkan memiliki reproduibilitas yang baik. Kondisi pengembangan dapat diatur, misalnya pra kondisi lempeng, teknik pengembangan sandwich, jarak migrasi eluen dan kondisi pengeringan lempeng. Parameter pengembangan diatur dengan mengisi kondisi yang diinginkan pada fitur yang tersedia.



**Gambar 2.14.** Chamber pengembangan otomatis merek camag (Camag Automatic Developing Chamber /ADC)

Kondisi pengembangan pada chamber pengembangan otomatis dapat disimpan untuk digunakan pada pengembangan dilain waktu. Progres pengembangan dapat dimonitor menggunakan sensor. Waktu dan jarak migrasi analit dapat ditampilkan secara kontinyu. Setelah proses pengembangan selesai, lempeng dapat dipilih untuk dikeringkan dengan udara hangat atau dingin.

## **5. Elusi (Pengembangan) KLT**

Elusi atau pengembangan KLT dipengaruhi oleh chamber yang digunakan dan kejenuhan dalam chamber. Metode pengembangan yang dipilih tergantung tujuan analisis yang ingin dicapai dan ketersediaan alat di laboratorium. Terdapat beberapa jenis metode pengembangan KLT :

- a. Metode pengembangan satu dimensi
  - Pengembangan non linier (melingkar)
  - Pengembangan linier
    - pengembangan menaik (*ascending*),
    - pengembangan menurun (*descending*)
  - Pengembangan ganda
  - Pengembangan horizontal
  - Pengembangan kontinyu
  - Pengembangan gradien
- b. Pengembangan dua dimensi

### 5.1. Pengembangan Satu dimensi

Sebagian besar kromatogram yang dihasilkan dari analisis KLT merupakan hasil pengembangan satu dimensi. Metode pengembangan satu dimensi biasa digunakan untuk keperluan analisis kuantitatif dengan metode KLT. Metode pengembangan satu dimensi meliputi :

a. Metode pengembangan non linier (melingkar)

Metode pengembangan melingkar hampir tidak pernah digunakan saat ini untuk analisis KLT kecuali untuk penelitian yang menggunakan pengembangan melingkar untuk tujuan tertentu. Pengembangan melingkar pertama kali dilakukan dalam cawan petri yang berisi fase gerak dan sebuah sumbu ditempelkan pada lempeng KLT yang diletakkan diatas cawan. Chamber U (Camag) adalah chamber yang digunakan untuk pengembangan melingkar, tetapi instrumen ini tidak lagi tercantum dalam katalog Camag. Kromatogram melingkar juga dapat dihasilkan dengan menggunakan metode preparatif yang modern, misalnya, dengan alat OPLC (*Over pressure layer cromatography*) dan *micropreparative* RPC (*Rotation planar kromatography*).

b. Metode pengembangan linier

Dalam banyak khusus, untuk mendapatkan kromatogram KLT yang bagus dipilih metode pengembangan linier. Metode pengembangan linier yang paling sering digunakan adalah metode pengembangan menaik (*ascending*). Metode ini



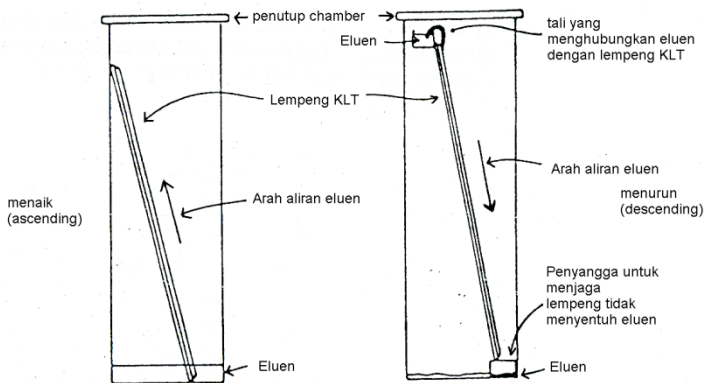
dilakukan dengan cara memasukkan eluen dalam chamber, setelah chamber jenuh, ujung lempeng bagian bawah direndam ke dalam eluen dalam chamber. Eluen bermigrasi dari bawah lempeng menuju keatas dengan gaya kapilaritas. Sebaliknya pada pengembangan menurun (descending) eluen bergerak dari atas menuju ke bawah (gambar 2.15).

Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada pengembangan linier :

- Selama pengembangan, chamber harus berada diatas bidang yang datar, permukaan chamber juga harus sejajar (tidak miring), dan pastikan selama pengembangan tidak terganggu oleh hal-hal yang tidak diinginkan.
- Selama pengembangan, dalam keadaan apapun tidak diperkenankan menggerakkan chamber untuk mengamati proses pengembangan
- Selama pengembangan juga tidak diperkenankan membuka tutup chamber untuk melihat garis depan eluen

Jika pemisahan dengan cara pengembangan tunggal tidak tercapai dapat dilakukan dengan pengembangan ganda. Pada pengembangan ganda lempeng KLT dielusi sebanyak dua kali atau lebih. Setelah lempeng dielusi, lempeng dikeringkan dahulu kemudian lempeng kering dapat dielusi kembali. Tujuan pengembangan ganda adalah untuk mendapatkan

resolusi yang lebih baik. Contoh kromatogram hasil pengembangan ganda dapat dilihat pada gambar 2.16.



**Gambar 2.15** Pengembangan menaik (*ascending*) dan menurun (*descending*)

c. Metode pengembangan horisontal

Kebalikan dari pengembangan linier, pada pengembangan horizontal lempeng KLT dimasukkan ke dalam chamber terlebih dahulu. Kemudian setelah eluen dimasukkan, strip kaca didorong sehingga menempel pada lempeng KLT sehingga eluen akan bergerak melewati lempeng KLT. Pada chamber horizontal CAMAG dimungkinkan pengembangan dengan dua arah yang berlawanan. Masing-masing kompartemen eluen terisi eluen dan eluen bergerak menuju ke pusat lempeng. Ketika dua garis depan eluen bertemu maka secara otomatis pengembangan akan berhenti (gambar 2.17).

d. Metode pengembangan kontinyu

Pengembangan kontinyu (pengembangan terus menerus) dilakukan dengan cara mengalirkan fase gerak secara terus-menerus pada lempeng KLT melalui suatu wadah (biasanya alas tangki) melalui suatu lapisan dan dibuang dengan cara tertentu pada ujung lapisan.

e. Pengembangan gradien

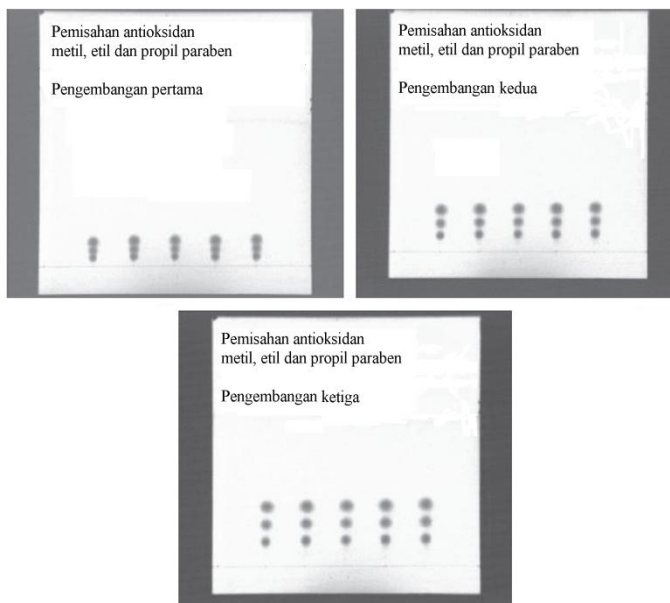
Pengembangan ini dilakukan dengan menggunakan komposisi fase gerak yang berbeda-beda. Lempeng yang berisi analit dapat dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak tertentu lalu komponen fase gerak selanjutnya ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam bejana dan diaduk sampai homogen. Tujuan utama sistem ini adalah untuk mengubah polaritas fase gerak. Meskipun demikian untuk memperoleh komposisi fase gerak yang reproduibel sangatlah sulit. Alat pengembangan gradient secara otomatis disebut Automated Multipled Development (AMD). Dengan AMD komposisi eluen dapat berubah-ubah sesuai dengan jarak migrasi eluen. Pada umumnya berubah komposisi eluen bervariasi antara 10-40 komposisi eluen. Eluen bergerak melewati lempeng dengan kenaikan yang konstan. Perubahan komposisi eluen berdasarkan jarak migrasi eluen biasanya antara 1-3 cm. Perubahan komposisi eluen diprogram melalui komputer. Setelah pengembangan dengan satu komposisi eluen selesai, eluen dipompa keluar dan lempeng dikeringkan

dengan sistem vakum. Kemudian eluen berikutnya dipompa masuk dalam kompartemen pra pengkondisian lempeng. Kemudian pengembangan berikutnya berjalan dan seterusnya. Pencampuran pelarut disiapkan oleh pompa mixer dan gradien. Pelarut murni diletakkan dalam wadah pelarut. Sistem AMD memiliki enam botol pelarut dan sepenuhnya diprogram, dengan kemampuan untuk menyimpan dan mengingat metode gradien. Sistem AMD dapat digunakan pada pemisahan pestisida (gambar 2.18).

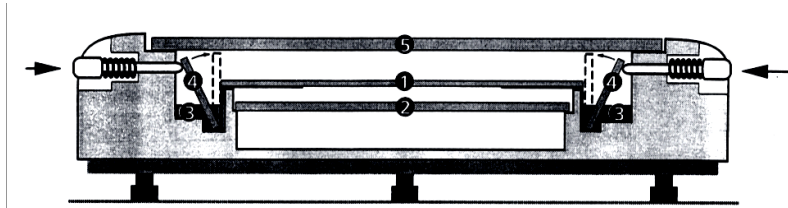
## **5.2. Pengembangan Dua Dimensi**

Pengembangan dua dimensi ditujukan untuk identifikasi senyawa dalam sampel multikomponen. Pengembangan dua dimensi disebut juga pengembangan dua arah. Pengembangan dua dimensi ini bertujuan untuk meningkatkan resolusi (pemisahan) sampel ketika komponen-komponen solut mempunyai karakteristik kimia yang hampir sama, karenanya nilai  $R_f$  juga hampir sama sebagaimana dalam sampel asam-asam amino. Selain itu, adanya dua sistem fase gerak yang sangat berbeda dapat digunakan secara berurutan pada suatu campuran tertentu sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan analit yang mempunyai tingkat polaritas yang berbeda. Pengembangan dua dimensi dilakukan dengan cara lempeng dielusi dengan eluen pertama. Setelah elusi selesai lempeng dikeringkan kemudian dielusi kembali dengan eluen kedua dengan arah migrasi eluen yang berbeda. Eluen kedua dapat berupa eluen

yang sama dengan eluen pertama atau eluen yang berbeda dengan eluen pertama (gambar 2.19). Contoh pengembangan KLT dua dimensi pada sampel asam-asam amino yang dapat memisahkan senyawa-senyawa kritis (senyawa yang memiliki sifat fisika kimia mirip) terdapat pada gambar 2.20.



**Gambar 2.16.** Perbaikan resolusi kromtogram dengan pengembangan ganda  
Lempeng : KLTKT silika gel CN F254  
Eluen : etanol : air (20:80 v/v)  
Deteksi : UV peredaman pendarfluor (254nm)  
Pengembangan : menaik (ascending)



**Gambar 2.17.** Prosedur pengembangan horizontal  
Lempeng KLT (1) diletakkan dengan jarak 0,5mm dari lempeng penyekat (2). Jika digunakan untuk pengkondisian lempeng, lempeng penyekat dilepas dan kompartemen dibawahnya diisi dengan larutan pengkondisi. Eluen diletakkan pada ruangan sempit tempat eluen (3). Pengembangan dimulai dengan mendorong tuas, sehingga strip kaca (4) akan miring ke dalam. Pelarut bermigrasi melewati lempeng KLT dengan gaya kapilaritas. Pengembangan berhenti secara otomatis ketika garis depan eluen bertemu di tengah (jarak pengembangan 4,5 cm). Chamber, terbuat dari bahan poli (tetrafluoroethylene), yang selalu ditutup dengan piring kaca (5)



**Gambar 2.18** Alat pengembangan otomatis (*Automated Multiplred Development*)



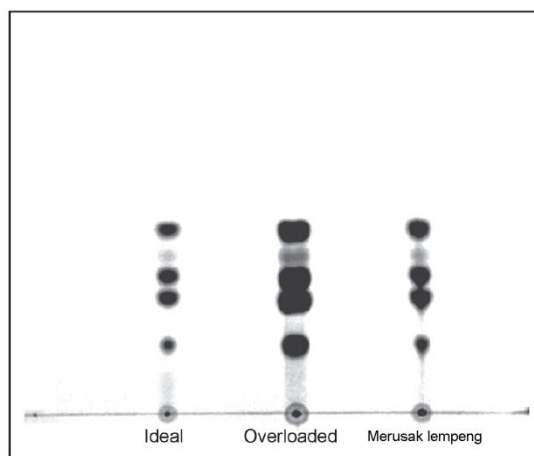
## 6. Aplikasi Sampel

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Aplikasi sampel pada sorben lempeng KLT dapat dilakukan secara manual dengan peralatan sederhana dan dapat juga dengan peralatan otomatis. Semakin tepat posisi penotolan dan kecepatan penotolan semakin baik kromatogram yang dihasilkan. Aplikasi sampel secara otomatis dapat memperbaiki kualitas penotolan sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penotolan sampel secara otomatis lebih dipilih daripada penotolan secara manual terutama jika sampel yang akan ditotolkan lebih dari 15  $\mu\text{l}$ . Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda (gambar 2.21). Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5  $\mu\text{l}$ . Jika volume sampel yang akan ditotolkan lebih besar dari 2-10  $\mu\text{l}$  maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

Aplikasi pita dengan teknik manual hampir tidak mungkin tanpa beberapa kerusakan pada lempeng KLT. Hal ini juga sangat sulit untuk mendapatkan panjang dan lebar pita yang seragam begitu juga dengan konsentrasi seragam. Kerusakan pada



permukaan sorben lempeng KLT yang disebabkan oleh mikro pipet merupakan kesalahan terbesar yang berpengaruh pada noda yang dihasilkan. Untuk mendapatkan hasil terbaik, perlu diperhatikan prosedur yang digunakan dimana kontak dengan permukaan sorben dapat dihindari sebisa mungkin. Untuk aplikasi dosis pita dapat menggunakan mikro pipet yang dilengkapi dengan reservoir larutan sampel. Meskipun demikian sulit untuk menghasilkan ukuran dan bentuk pita yang seragam secara menyeluruh.



**Gambar 2.21** Pengaruh kesalahan sampel loading pada sorben KLT

### 6.1. Aplikasi Manual

Sebelum aplikasi sampel pada lempeng KLT, posisi awal penotolan diberi tanda berupa titik dengan pensil dan akhir elusi ditandai berupa garis. Sedapat mungkin penandaan tidak merusak sorben KLT. Untuk aplikasi manual, terdapat beberapa alat penotolan sampel (gambar 2.22). Alat aplikasi manual yang paling banyak digunakan adalah pipet mikro kapiler (*microcaps*). Dengan cara mencelupkan pipet kapiler mikro, larutan secara otomatis akan mengisi ruang dalam pipet mikro kapiler. Setelah terisi tempelkan pipet pada permukaan lempeng KLT maka larutan sampel akan berpindah dari pipet kapiler menuju sorben lempeng KLT. Penggunaan *syringe* lebih dipilih dibandingkan pipet kapiler pada beberapa kondisi :

- Bila pelarut yang digunakan memiliki berat jenis tinggi, misalnya kloroform atau metilen klorida, sehingga cairan cenderung keluar dari pipet kapiler ketika pipet kapiler dalam posisi vertikal.
- Bila pelarut yang digunakan sangat mudah menguap (titik didih 40-60 ° C) misalnya n-heksana, petroleum eter atau dietil eter. Gaya kapiler tidak dapat mengisi ruang pipet kapiler secara reproduksibel.
- Bila sampel mengandung surfaktan yang dapat mengurangi tegangan permukaan pipet kapiler sehingga pengisian ruang dalam pipet kapiler tidak reproduksibel

- Bila sampel berupa cairan kental yang sulit mengalir dalam pipet kapiler. Pengeluaran larutan dari pipet kapiler juga tidak bisa sempurna karena masih ada larutan yang menempel pada dinding dalam pipet kapiler sehingga volume sampel yang dikeluarkan juga tidak reproduisibel.
- Bila pelarut yang digunakan sulit menguap (titik didih  $\geq 100^{\circ}\text{C}$ ) misalnya air. Pengeluaran larutan dari pipet kapiler juga tidak bisa sempurna karena masih ada larutan yang menempel pada dinding dalam pipet kapiler sehingga volume sampel yang dikeluarkan juga tidak reproduisibel.



**Gambar 2.22** Peralatan aplikasi sampel secara manual

1. Pipet Eppendorf dengan syringe 10  $\mu\text{l}$
2. Microcapillary 5  $\mu\text{l}$  dengan holder
3. Pipet aplikasi (50  $\mu\text{l}$ )
4. Microcapillary 1- $\mu\text{l}$  dengan holder
5. Unimetric syringe (50  $\mu\text{l}$ )

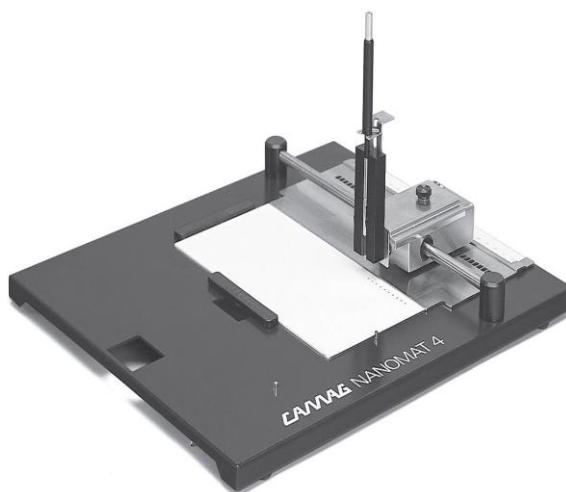
## 6.2 Aplikasi Sampel Semiotomatis

Metode terbaik untuk aplikasi sampel pada KLT adalah dengan cara otomatis atau setidaknya semi otomatis. Dalam hal ini sampel dapat ditotolkan pada lapisan permukaan lempeng tepat sesuai dengan yang diinginkan, menggunakan dosis kecil dan tidak merusak lapisan lempeng. Sebagai contoh alat untuk aplikasi penotolan dengan volume yang konstan pada KLT adalah Nanomat 4 dengan pemegang kapiler, yang ditunjukkan pada gambar 2.23.

Dengan alat Nanomat, ukuran noda yang dihasilkan pada lempeng KLT adalah sama. Pada pemegang kapiler (*capillary holder*) yang berperan adalah magnet permanen. Cara menotolkan sampel yaitu kepala aplikator ditekan, pipet akan menyentuh lapisan lempeng pada tekanan konstan kemudian pipet dibuang (sekali pakai). Volume bisa sampai 50-230 nl untuk KLTKT. Ketinggian ujung jarum suntik pada Nanomat disesuaikan sedemikian rupa sehingga tidak menyentuh lempeng KLT. Untuk aplikasi lempeng KLTKT, digunakan nano-pipet (100 atau 200 nl). Pipet ini lebih akurat, namun, sorben rentan terhadap kerusakan.

Peralatan semi/otomatis yang lain yaitu Linomat (camag) dapat digunakan untuk menerapkan larutan sampel dalam bentuk noda atau pita. Teknik ini direkomendasikan untuk analisis kuantitatif. Meskipun tingkat akurasi yang mungkin dengan aplikasi manual ( $\pm 1-2\%$  standar deviasi relatif), noda dan pita yang dihasilkan dari aplikasi teknik otomatis akan lebih baik

dengan pemisahan yang terukur. Alat tersebut dapat menotolkan sampel menggunakan syringe dengan kecepatan yang konstan dan teknik spray (Gambar 2.24).



**Gambar 2.23** Camag Nanomat 4 dengan pemegang kapiler (*capillary holder*). Noda sampel dapat diterapkan tepat pada posisinya tanpa merusak lempeng sorben. Volume diatur oleh ukuran dari pipet kapiler yang dipakai pada pemegang kapiler (*capillary holder*). Unit ini dapat digunakan untuk semua ukuran lempeng KLT dan KLTKT.

ketika digunakan pelarut yang mudah menguap, aliran gas akan konstan yang akan menjamin kedua zona pada pita akan cepat kering. Dengan cara ini permukaan lempeng KLT dapat kontak dengan jarum suntik. *Syringe* dapat dibersihkan dan diganti lagi pada tiap larutan sampel secara manual.



**Gambar 2.24** Camag Linomat 5 untuk aplikasi larutan sampel pada lempeng KLT. Alat ini menggunakan teknik penyemprotan yang memungkinkan penotolan dengan volume sampel yang lebih besar pada larutan dengan konsentrasi rendah dibandingkan penotolan kontak langsung. Sampel terkonsentrasi dalam bentuk pita sempit dengan panjang sesuai yang diinginkan. Untuk tujuan preparatif, larutan sampel dapat diaplikasikan sebagai pita sempit yang panjang sepanjang lebar lempeng KLT

### 6.3 Aplikasi Sampel Otomatis

Untuk sistem yang sepenuhnya otomatis, mempunyai program yang dapat menyimpan kondisi elusi dalam komputer. Aplikasi noda dan pita dapat diprogram, dengan nomor aplikasi dan posisi ukuran yang detail (gambar 2.25).



**Gambar 2.25** Camag Otomatis KLT Sampelr (ATS) 4 untuk aplikasi noda dan pita dari larutan sampel dalam vial. Pengoperasiannya diprogram dan dikendalikan oleh komputer. Kisaran Volume yang dianjurkan per sampel 100-5000 nl untuk noda dan 2-20  $\mu$ l untuk pita.

Pita diaplikasikan menggunakan teknik *spray* dengan cara yang mirip dengan semi-otomatis. Noda dapat diaplikasikan baik dengan teknik ini atau dengan cara kontak langsung. Sampel disiapkan dalam vial dengan septum segel. Menurut program pra-set, lengan mesin ATS akan bergerak dari vial larutan sampel ke dalam *syringe* dan ditransfer pada lempeng KLT, kemudian kromatografi akan melakukan pemisahan dan menghasilkan noda. Pada aplikasi

larutan sampel, lengan mesin ATS akan bergerak ke syringe dan menuju vial dan dicuci menggunakan pelarut yang sesuai. Setelah itu *syringe* dibilas untuk aplikasi berikutnya. Beberapa software memungkinkan digunakan untuk memvalidasi instrument. Volume dosis dapat divalidasi menggunakan standart.

## **6.4 Aplikasi Volume Sampel Besar (*Large Sampel*)**

Aplikasi larutan sampel dengan volume penotolan yang besar dapat dilakukan dengan teknik kontak spotting atau dengan penggunaan zona konsentrasi.

### **6.4.1 Kontak Spotting**

Teknik ini digunakan dalam rangka untuk menghindari kerusakan lempeng oleh pipet kapiler yang menggunakan volume sampel besar (50  $\mu$ l). Teknik ini juga memungkinkan untuk aplikasi sampel biologis yang sangat kental, yang tidak mudah diterapkan dengan perangkat lain. Sampel ditempatkan di bagian yang lebih rendah pada film polimer *fluorocarbon* yang sudah disalut dengan *perfluorokerosene* (atau serupa larutan terfluorinasi). Dengan teknik ini terbentuk tetesan (*droplet*) simetris. Volume tetesan cukup besar dapat menampung  $\pm$  50  $\mu$ l larutan sampel. Dengan peralatan yang tertutup, aliran lembut nitrogen dialirkan di atas permukaan untuk menguapkan pelarut. Setelah dilakukan penguapan secara sempurna, lempeng KLT ditempatkan pada dibawah sampel dan kemudian dijepit.



Kemudian diberi tekanan nitrogen sekitar 1,5 atm untuk mentransfer sampel pada sorben lempeng.

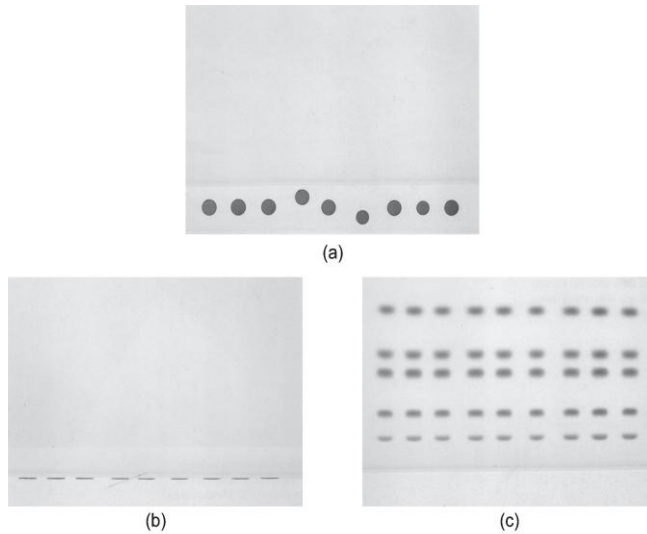
#### **6.4.2 Zona Konsentrasi KLT**

Zona konsentrasi KLT / KLTKT tersedia secara komersial untuk aplikasi yang ideal pada volume sampel yang besar. Sampel diterapkan ke area zona konsentrasi, biasanya sebagai noda cairan yang besar, pada lokasi yang diinginkan dalam zona atau dengan perendaman secara sempurna pada luas lempeng (Gambar 2.26). Beban sampel pada lempeng akan bervariasi tergantung pada resolusi yang mungkin terjadi antara komponen yang terpisah. Misalnya dengan pemisahan pewarna lipofilik yang ditunjukkan pada Gambar 2.27, beban yang diterapkan sampai dengan 20  $\mu\text{g}$  dan sebuah resolusi yang baik masih diperoleh, (20 ml dalam larutan 0,1% b / v dengan menggunakan pipet 2 $\mu\text{l}$ ).

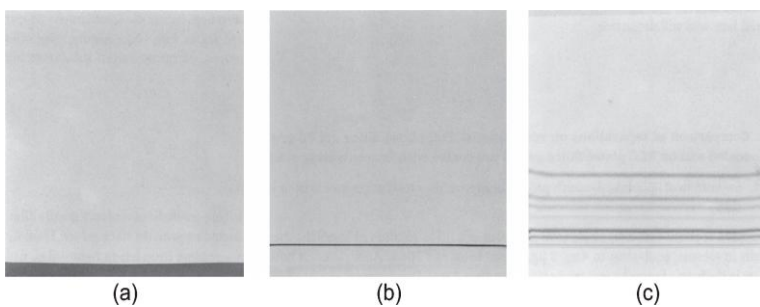
Apabila larutan sampel sangat encer dan teknik konsentrasi bukan lagi sebuah pilihan maka aplikasi berulang bisa dilakukan secara langsung ke zona konsentrasi, dengan pengeringan antara beban yang diperlukan. Ketika lempeng diperkenalkan ke fase gerak pada chamber kromatografi, pelarut berada didepan dengan cepat bermigrasi melalui zona konsentrasi membawa sampel dengan pelarut tersebut. Idealnya sebagai bahan zona konsentrasi hanya memiliki kapasitas penyimpanan yang rendah dimana noda sampel mulai berkonsentrasi kedalam ikatan. Pada saat mencapai antarmuka, mereka menjadi lebih fokus. Beberapa pengotor

dipertahankan oleh adsorpsi di zona bawah/rendah dan pemisahan komponen-komponen sampel kemudian dimulai di zona atas silika gel 60. Resolusi lebih baik daripada untuk pengembangan noda yang normal, sebagai pemisah suatu ikatan yang telah terbentuk terutama untuk komponen yang paling dekat yang tetap dipertahankan keasliannya. Namun, kualitas fokus tergantung juga pada pilihan dari fase gerak. Umumnya untuk silika gel 60 polaritas rendah, pelarut viskositas rendah memberikan hasil terbaik. Polar, pelarut kental seperti fase gerak dapat menyebabkan peningkatan yang rendah dalam pemisahan. Seperti ditunjukkan dalam Gambar 2.27, beban tertinggi untuk lempeng tipis dapat diperoleh dengan menggunakan seluruh lebar lempeng dan mencelupkannya ke dalam larutan sampel. Setelah kering lempeng dapat diulang sampai pemuatan yang diperlukan diperoleh, tetapi perawatan diperlukan untuk menghindari terjadinya *overloading* atau kelebihan. Setiap kebocoran pada penyimpanan fase gerak biasanya diabaikan.

Untuk meningkatkan potensi lempeng zona konsentrasi, lempeng KLT fase terbalik telah digunakan dan telah terbukti bernilai untuk berbagai aplikasi. Dibandingkan silika gel 60, gel silika RP18 telah menjadi media pemisahan dengan luas pori-pori yang sesuai sorben untuk zona konsentrasi.



**Gambar 2.26** (a) Zona konsentrasi lempeng setelah aplikasi noda sampel (b) bentuk noda setelah migrasi ke batas antara zona berkonsentrasi dan zona pemisahan lempeng silika gel (c) Gambar setelah pengembangan kromatografi



**Gambar 2.27** (a) Gambar lempeng dengan zona konsentrasi yang terimpregnasi pada larutan sampel ketinggian 10 mm (b) Lempeng setelah migrasi ke batas antara zona konsentrasi dengan zona pemisahan (c) Gambar setelah pengembangan kromatografi

## 7. Evaluasi Noda

Evaluasi lempeng KLT dapat dilakukan secara langsung maupun dengan instrumen. Untuk noda yang berwarna evaluasi noda dapat dilakukan dengan visualisasi langsung pada lempeng KLT dengan menggunakan cahaya matahari, atau dapat dibantu dengan menggunakan lampu UV yang memberikan pencahayaan pada panjang gelombang tertentu.

Untuk noda yang tidak berwarna beberapa jenis visualisasi dari zona kromatografi diperlukan untuk mengevaluasi noda hasil kromatografi. Sebagian besar senyawa akan menyerap sinar UV atau sinar tampak atau fluoresensi tetapi beberapa senyawa membutuhkan visualisasi yang sesuai untuk mengamati noda hasil kromatografi. Visualisasi dapat dilakukan dengan cara penyemprotan atau pencelupan ke dalam pereaksi penampak noda. Karena sorben yang digunakan pada lempeng KLT umumnya bersifat inert maka reaksi kimia dapat dilakukan di atas lempeng tanpa terpengaruh lapisan sorben. Berbagai macam pereaksi kimia telah digunakan untuk mendeteksi zona kromatografi dengan penampakan hasil yang baik. Beberapa pereaksi yang disebut sebagai pereaksi universal digunakan untuk memvisualisasikan berbagai senyawa yang berbeda struktur molekulnya. Termasuk dalam kelompok pereaksi ini adalah pelarut asam dan uap amonia, *fluorescein*, *diklorofluoresein*, dan yodium. Adapun beberapa pereaksi dapat digunakan dalam teknik destruktif (*destructive*

*techniques*). Teknik ini menyebabkan kerusakan pada senyawa yang akan meninggalkan noda yang tampak pada lapisan kromatografi. Sebaliknya ada teknik non destruktif (*nondestructive techniques*) yang memungkinkan deteksi senyawa dalam zona kromatografi tanpa merubah sorben lempeng atau zona kimianya. Termasuk dalam teknik non destruktif adalah sinar tampak dan UV, dan kadang-kadang dengan penggunaan yodium atau amonia uap. Dua pereaksi terakhir dalam banyak kasus “reaksi” dimasukkan dalam reaksi reversibel. Pereaksi lainnya yang merupakan kelompok gugus spesifik dan dapat digunakan untuk mendeteksi gugus senyawa, seperti alkohol, aldehid, keton, ester, atau asam. Pereaksi ini disebut kelompok pereaksi gugus spesifik.

Seringkali, senyawa yang dipisahkan dapat dideteksi dan divisualisasikan oleh kombinasi teknik-teknik di atas. Sebuah teknik non-destruktif, seperti radiasi UV, yang mungkin digunakan pertama, kemudian diikuti dengan pereaksi universal, dan akhirnya digunakan pereaksi gugus spesifik untuk meningkatkan selektivitas dan sensitivitas. Stabilitas juga merupakan bagian penting dalam pemilihan pereaksi pendeteksi yang cocok. Beberapa pereaksi mempunyai stabilitas yang baik selama beberapa minggu sementara yang lain harus dibuat hanya sebelum digunakan. Stabilitas zona kromatografi yang divisualisasikan juga kemungkinan berbeda. Beberapa noda memudar cukup cepat, ada yang lama memudar bahkan ada tetap stabil, tetapi muncul latar belakang pada lempeng yang menyulitkan visualisasi noda.

Kadang-kadang latar belakang gelap atau berwarna dapat diringankan oleh adanya paparan lempeng KLT dengan uap asam atau alkali atau mengeringkan lempeng dalam oven sebelum pemberian pereaksi penampak noda.

Pemilihan pelarut yang digunakan untuk menyiapkan pereaksi visualisasi juga membutuhkan pertimbangan. Kadang-kadang pemilihan pelarut yang sedikit, menyebabkan visualisasi zona kromatografi dapat menyebar dan berkembang menjadi ekor. Efeknya dapat terlihat zona “leaking” pada permukaan. Hal ini biasanya disebabkan oleh analit di zona kromatografi yang larut dalam pelarut pereaksi. Masalahnya dapat diselesaikan dengan menggunakan pelarut dengan kekuatan elusi yang lebih rendah dalam penyusunan pereaksi. Semua efek ini perlu dipertimbangkan sehingga prosedur visualisasi yang paling efektif dapat digunakan.

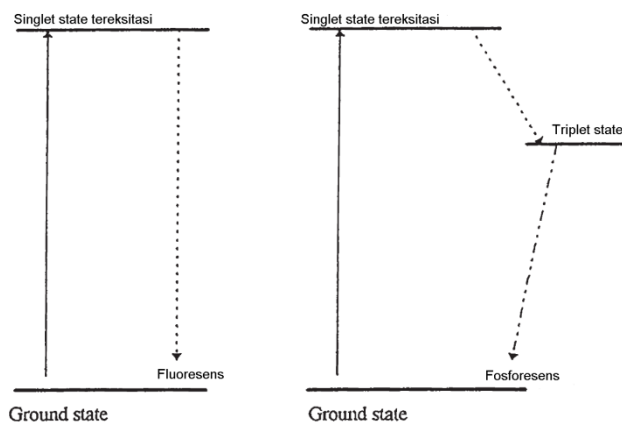
## **7.1. Teknik Non-destruktif**

### **7.1.1 Deteksi Visibel**

Beberapa senyawa secara alami sudah cukup berwarna, misalnya, pewarna alami dan sintetis, dan nitrofenol, yang dapat menyerap sinar visibel (tampak) pada spektrum elektromagnetik. Noda senyawa ini dalam KLT akan terlihat jelas dalam cahaya tampak dan tidak memerlukan perlakuan lebih lanjut untuk visualisasi. Mayoritas, seperti yang disebutkan sebelumnya, membutuhkan beberapa cara agar menjadi visibel. Karena itu membutuhkan teknik-teknik deteksi tertentu.

### 7.1.2 Deteksi Ultra-Violet

Pemisahan zona kromatografi lapisan KLT / KLTKT mungkin muncul berwarna di cahaya normal, tetapi dapat menyerap radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang lebih pendek. Hal ini sering terdeteksi dalam rentang UV, biasanya di 200-400 nm. Zona kromatografi biasanya muncul latar belakang gelap atau cahaya atau jika fluoresensi terjadi. Untuk membantu visualisasi tersedia lempeng KLT siap pakai komersial yang mengandung indikator fosforesen anorganik, atau indikator fluoresen organik. Deteksi dengan absorbansi dalam kasus ini bergantung pada peredaman fosforesen atau fluoresen oleh komponen-komponen sampel. Proses ini biasa disebut "peredaman fluoresens" (*fluorescence quenching*).



**Gambar 2.28** Transisi Elektronik selama fenomena luminesens

Proses fluoresensi disebabkan oleh radiasi elektromagnetik yang menyediakan energi untuk membawa transisi elektronik dari tingkat dasar ke tingkat eksitasi singlet (lihat Gambar 2.28). Setelah tereksitasi elektron kembali ke keadaan dasar, mereka memancarkan energi pada panjang gelombang yang lebih panjang. Apakah eksitasi indikator dalam lapisan kromatografi fluoresens atau fosforesens, itu adalah analit pada lapisan yang mengganggu proses ini dengan menyerap energi eksitasi. Hal ini kemudian menghasilkan tipe zona kromatografi gelap dari analit yang diamati pada latar belakang fluoresens atau fosforesens.

Analit yang dapat secara alami berfluoresensi saat terkena sinar UV, penggunaan lempeng kromatografi yang berisikan indikator fluoresen atau fosforesen mungkin tidak menguntungkan. Sebagian besar analit berfluoresensi pada 366 nm dan tidak pada 254 nm. Karena itu KLT/KLTKT berisi indikator yang berfluoresensi pada 254 nm lebih menguntungkan karena fluoresen dan perendaman fluoresen dapat diamati dan tergantung pada panjang gelombang. Namun, jika ada analit yang berfluoresensi hanya pada 254 nm, atau pada kedua panjang gelombang, maka lempeng kromatografi tanpa indikator harus digunakan untuk menghindari gangguan latar belakang. Hal ini juga memungkinkan untuk menstabilkan bahkan kadang-kadang dapat meningkatkan fosforesens dengan menggunakan perlakuan pereaksi tertentu. Daftar pereaksi yang umum digunakan terdapat pada Tabel 2.3 bersama dengan perkiraan tingkat kemungkinan peningkatan



kekuatan floresensi. Efek fluoresensi dapat dicapai dengan mencelupkan lempeng sorben dalam larutan pereaksi beberapa detik setelah perlakuan dengan pereaksi deteksi. Udara pengeringan normal pada suhu kamar cukup untuk mengeringkan lempeng.

**Tabel 2.3.** Beberapa *fluorescence intensifiers* dan area aplikasinya

Intensifier	Senyawa terdeteksi	Peningkatan	Stabilisasi
Triton X-100* (1% v/v larutan dalam heksana atau pentana)	Polisiklik aromatic hidrokarbon	10-kali	Secara parsial
Triton X-100 (1% v/v larutan dalam heksana atau pentana)	Asam lemak sebagai dansil amida	10x lipat	Stabil
Poliethylene glycol 400 atau 4000 (10% b/v dalam metanol)	Senyawa dengan gugus fungsi alkohol (-OH)	20 - 25-kali	Tidak diketahui
Dodecane (50% b/v dalam heksana)	Polisiklik aromatic hidrokarbon	2-kali	Tidak diketahui
Paraffin cair (33% v/v dalam heksana)	Aflatoksin	3 - 4-kali	Tidak diketahui
Paraffin cair (33% v/v dalam heksana)	Ketosteroid kolesterol, kortisol	10-kali	Tidak diketahui
Paraffin cair (33% v/v dalam heksana)	Dansil amida	10-kali	Stabil
Paraffin cair (33% v/v dalam heksana)	Gentamisin	Ya, tetapi level tidak diketahui	Stabil

\*Triton adalah nama dagang

Banyak analit tidak menyerap cahaya tampak atau UV, atau meredam fluoresen, atau berfluoresensi saat berinteraksi dengan cahaya tampak atau UV. Dalam hal ini pereaksi deteksi yang sesuai yang digunakan untuk memberikan zona kromatografi adalah cahaya tampak atau pada panjang gelombang lebih pendek dalam UV. Jika reaksi yang terjadi adalah reaksi reversibel, maka dapat juga disebut teknik non-destruktif.

### **7.1.3 Reaksi Reversible**

Beberapa pereaksi penampak noda dapat memberikan warna dengan reaksi yang reversible. Pereaksi-pereaksi tersebut adalah :

#### **a) Uap Iodium**

Uap amonium adalah pereaksi yang universal yang sangat berguna untuk mendeteksi senyawa organik pada KLT, tetapi tidak boleh diabaikan bahwa beberapa reaksi dengan iodium adalah ireversibel. Penggunaan iodium sebagai uap memungkinkan deteksi zat yang dipisahkan secara cepat dan ekonomis sebelum karakterisasi akhir dengan kelompok pereaksi tertentu. Adanya zona lipofilik yang terdapat pada lempeng kromatografi menyebabkan molekul iodium akan berkonsentrasi di noda analit, memberikan noda kromatografi kuning-coklat dengan latar belakang kuning menyala.

Preparasi pereaksi yaitu dengan menempatkan kristal iodium pada chamber kromatografi kering, tutup penutup chamber sehingga uap iodium mengisi ruang udara untuk beberapa jam. Setelah lempeng dimasukkan ke dalam chamber dan terpapar uap

iodium maka dengan cepat noda kromatografi akan berwarna sehingga dapat diamati, ambil lempeng dan hasilnya dicatat. Iodin yang teradsorpsi dalam permukaan lempeng KLT perlahan-lahan menguap dari permukaan lempeng karena aliran udara kering di suhu ruang. Kemudian lempeng KLT dapat diberi perlakuan lebih lanjut dengan pereaksi universal lain atau dengan pereaksi gugus fungsi spesifik. Untuk hasil yang lebih permanen, diperlukan impregnasi iodium pada noda kromatografi yaitu dengan menyemprotkan atau mencelupkan lempeng KLT ke dalam larutan kanji (0,5 sampai 1% b/v) untuk memberikan kompleks iodine-amilum yang berwarna biru. Pewarnaan iodium akan memberikan hasil terbaik ketika iodium masih berada pada noda kromatografi, namun tidak terdapat pada latar belakang lempeng. Jika tidak maka akan sulit untuk membedakan noda analit dari latar belakang yang juga akan berwarna biru.

Deteksi iodium bekerja dengan baik pada silika gel 60 dan lempeng aluminium oksida. Namun, hasilnya kurang bagus pada lempeng fase terbalik karena lipofilisitas dari lempeng tidak banyak berbeda dari noda analit. Reaksi reversible uap iodium terjadi dengan berbagai molekul lipofilik organik, misalnya, hidrokarbon, lemak, lilin, beberapa asam lemak dan ester, steroid, antioksidan, deterjen, emulsifier, antibiotik, dan obat-obatan lain-lain.

**b) Uap Ammonia**

Uap ammonia sering digunakan bersama dengan pereaksi lain untuk meningkatkan kontras antara pemisahan noda analit dan lempeng latar belakang. Tanpa diragukan lagi bahwa penggunaan paling umum dalam visualisasi asam organik adalah dengan indikator. Meskipun indikator, seperti bromokresol hijau dan bromfenol biru akan mendeteksi keberadaan berbagai asam organik, perlakuan lebih lanjut dengan uap amonia akan mempertajam kontras antara analit dan latar belakang lempeng sehingga menghasilkan sensitivitas yang lebih besar. Tentu saja, setelah sumber amonia dihilangkan, amonia secara bertahap menguap dan sensitivitas deteksi kembali seperti semula.

Paparan uap ammonia dapat dicapai dengan hanya meletakkan lempeng diatas kaca beker berisi larutan ammonia pekat. Cara yang lebih baik dapat dilakukan dengan meletakkan larutan ammonia pekat dalam chamber twin trough pada salah satu kompartemen eluen dan meletakkan lempeng KLT pada kompartemen eluen yang lain. Ketika chamber ditutup maka lempeng KLT akan terpapar uap ammonia. Proses ini reversibel dimana ammonia segera menguap dari permukaan sorben seiring dengan berjalannya waktu.

### 7.1.4 Reaksi Non-reversibel

#### Pewarna Berfluoresensi

Sejumlah pewarna berfluoresensi yang umum digunakan untuk deteksi non-destruktif zat lipofilik adalah fluorezen, diklorofluorezen, eosin, rhodamine B dan 6G, berberin, dan pinakriptol kuning. Sebagian besar adalah pereaksi universal berbagai senyawa organik (tabel 2.4).

**Tabel 2.4** Kelompok senyawa yang terdeteksi dengan pewarna berfluoresensi (dipapar pada 366 nm)

Pereaksi universal berfluoresensi	Kelompok senyawa yang terdeteksi
Fluorezen	Lipid, purin, pirimidin, barbiturat, senyawa tak jenuh, hidrokarbon terklorinasi, and heterosiklik
2,7-Diklorofluorezen	Lemak jenuh dan tak jenuh
Rhodamin B	Trigliserida, asam lemak, metal ester, gangliosida, fenol, polifenol, flavonoid, detergen
Rhodamine 6G	Gliserida, asam lemak dan ester, ubiquinon, gangliosida, steroid, sterol, alcohol triterpen, fosfolipid
Berberin	Sterol, senyawa jenuh, lemak, asam lemak
Pinakriptol kuning	Surfaktan ionic dan anionic, pemanis, anion organik

Pereaksi untuk mencelupkan lempeng KLT dibuat dengan cara melarutkan zat pewarna (10-100 mg) ke dalam metanol atau etanol (100 ml). Setelah dicelupkan dalam pereaksi penampak noda lempeng dikeringkan, noda analit yang terdeteksi tampak berfluoresensi dengan jelas dengan latar belakang warna

berfluoresensi yang lebih terang di bawah sinar UV (254 nm). Meskipun sangat efektif pada silika gel, selulosa, dan kieselguhr (sensitivitas antara mikrogram rendah sampai nanogram rendah), zat-zat pewarna ini tidak menunjukkan respon pada silika gel fase terbalik. Terkadang pemaparan uap amonia setelah pemberian zat warna dapat meningkatkan sensitivitas.

### **Indikator pH**

Indikator pH biasanya digunakan untuk mendeteksi senyawa asam dan basa. Indikator utama yang digunakan adalah berbasis sulfonatein, seperti bromokresol hijau, bromtimol biru, bromfenol biru, dan untuk tingkat yang lebih rendah bromokresol ungu. Pereaksi dapat diterapkan pada lempeng KLT baik dengan mencelupkan atau penyemprotan dengan larutan 0,01 sampai 0,1% b/v etanol/air yang telah disesuaikan larutannya sesuai dengan pH perubahan warna indikator dengan penambahan garam buffer atau natrium hidroksida. Kebanyakan senyawa organik asam segera merespon indikator ini memberikan perubahan warna yang diharapkan yang berbeda warna dengan latar belakang lempeng. Pemaparan lempeng dengan uap amonia seperti yang disebutkan sebelumnya kadang-kadang dapat meningkatkan sensitivitas

## **7.2 Teknik Destruktif**

Reaksi kimia yang muncul pada lempeng KLT antara pereaksi dan analit merupakan hasil derivatisasi atau hasil perubahan total senyawa organik yang disebut sebagai destruktif. Tentunya, senyawa yang tervisualisasi tidak lagi dapat ditambahkan ke dalam sampel, namun ada perbedaan yang jelas antara reaksi yang benar-benar destruktif dan reaksi hasil derivatisasi atau reaksi kimia lain. Teknik utama dari reaksi destruktif adalah pembakaran dan aktivasi termal.

### **7.2.1 Reaksi Pembakaran**

Teknik pembakaran meliputi pelakuan terhadap lempeng KLT yang dikembangkan dengan pereaksi yang sesuai, diikuti oleh pemanasan pada suhu yang relatif tinggi untuk mendegradasi senyawa organik menjadi senyawa karbon. Seperti yang diketahui, reaksi ini agak tidak spesifik dan oleh karena itu pereaksi pembakaran digolongkan dalam pereaksi universal. Pereaksi pembakar yang paling sering digunakan adalah asam sulfat, dalam kromatografi asam sulfat digunakan dalam bentuk encer (10-20% v/v dalam metanol atau air). Namun, penggunaan asam ortopospat dan asam kromosulfat juga terbukti berhasil dalam berbagai keadaan spesifik. Suhu dan waktu pemanasan bergantung pada sifat senyawa yang dibakar. Reaksi terjadi pada kisaran waktu 5-20 menit dan pada kisaran suhu 100-180<sup>0</sup>C. Larutan encer asam sulfat dalam air/metanol dapat membasahi KLT/KLTKT. Pada

pemanasan, pelarut dapat menguap seluruhnya sehingga konsentrasi asam meningkat dan akhirnya membakar bahan organik yang ada.

Meskipun teknik deteksi ini sangat sederhana, pembakaran asam sulfat memiliki keterbatasan, terutama keterkaitan dengan bahan pengikat adsorben fase diam. Kebanyakan bahan pengikat, apakah itu buatan rumah atau komersial, kualitasnya bergantung pada suhu dan waktu pemanasan. Pemanasan berlebih pada lempeng yang mengandung pengikat organik akan menghasilkan latar belakang warna abu-abu atau bahkan hitam yang akan menyebabkan kromatogram rusak.

### **7.2.2 Aktivasi Termokimia**

Telah diamati bahwa beberapa noda yang dikembangkan pada KLT/KLTKT saat dipanaskan pada suhu tinggi akan perpendar pada paparan sinar UV. Proses ini disebut aktivasi termokimia. Pemisahan pada silika gel dengan ikatan aminopropil diketahui memberikan hasil yang paling konsisten dan sensitif untuk proses deteksi. Mekanisme reaksi yang terjadi tidak sepenuhnya diketahui, namun hal tersebut dapat dijadikan pertimbangan. Permukaan lempeng silika gel dapat bertindak sebagai katalis. Di bawah pengaruh permukaan sorben katalis, senyawa kaya  $\pi$ -elektron berkonjugasi membentuk produk yang akan berfluoresensi ketika tepat jenuh. Diketahui bahwa senyawa heteroatom, seperti



nitrogen, oksigen, sulfur, atau fosfor, akan lebih peka terhadap aktivasi termal dibandingkan hidrokarbon murni. Perubahan pH sering mengubah eksitasi dan emisi gelombang. Senyawa fluoresensi yang terbentuk cukup stabil. Senyawa fluoresensi dapat ditingkatkan intensitasnya dan distabilkan oleh lempeng kromatogram dengan cairan parafin atau polietilen glikol. Senyawa-senyawa tersebut dilarutkan dalam heksana atau heptana (5% b/v). Jika aminopropil berisi indikator berfluoresensi ( $F_{254}$ ), maka hasil fluoresensi dapat terlihat jelas di bawah sinar UV pada 254 nm. Terkadang senyawa yang lemah berpendar, seperti asam vanillic dan asam homovanillic dapat menunjukkan penyerapan fluoresensi kuat setelah aktivasi termal dan peningkatan fluoresensi. Aktivasi termal juga efektif untuk mendeteksi katekolamin, asam buah, dan beberapa karbohidrat.

### **7.3 Reaksi Derivatisasi**

Pereaksi kimia dapat digunakan dengan metode *in situ* pada lempeng kromatografi baik sebelum atau setelah pengembangan. Manfaat relatif dari kedua prosedur perlu dipertimbangkan dalam memilih metode deteksi. Namun, popularitas deteksi noda hasil kromatografi setelah pengembangan dengan pereaksi kimia, dibandingkan dengan derivatisasi kimia sebelum pengembangan tercermin dalam jumlah metode yang tersedia dalam literatur ilmiah. Ratusan pereaksi dan prosedur tersedia untuk metode

visualisasi pasca-kromatografi dan relatif sedikit yang menjelaskan deteksi pra-kromatografi. Visualisasi sebelum pengembangan kromatografi telah direkomendasikan dan kromatografi yang dihasilkan biasanya cukup unik dan spesifik.

### **7.3.1 Visualisasi Pasca-kromatografi**

Tidak diragukan lagi bahwa visualisasi pasca-kromatografi adalah jenis metode deteksi KLT yang paling dikenal. Hal ini dapat dihasilkan dengan menyemprot atau mencelupkan lempeng KLT/KLTKT yang telah dikembangkan dengan pereaksi universal atau pereaksi tertentu. Beberapa reaksi terjadi segera dan noda analit muncul berwarna pada kontak dengan pereaksi atau lebih sering setelah pengeringan atau pemanasan pada suhu tetap. Pemilihan penggunaan pereaksi sebagai semprotan atau dengan mencelupkan tergantung pada sejumlah faktor. Metode penyemprotan menggunakan sedikit pelarut, dapat dicapai dengan perangkat atomiser sederhana, dan memerlukan waktu singkat. Namun, penyemprotan membutuhkan penggunaan alat pengestraksi uap yang memadai untuk pereaksi yang berbahaya atau beracun. Begitu pula jika lempeng sepenuhnya terbasahi dengan semprotan pada seluruh permukaan dengan volume semprotan yang tidak rata metode ini tidak dianjurkan. Dalam beberapa tahun terakhir, teknik perendaman atau pencelupan untuk visualisasi pada banyak kasus telah menggantikan metode

visualisasi dengan penyemprotan tradisional. Larutan yang lebih encer dapat digunakan sebagai pereaksi dan penggunaan pereaksi ke dalam lempeng kromatografi dapat dikontrol lebih efektif dengan cara otomatis.

### **7.3.1.1 Pereaksi-Pereaksi Kimia Universal**

- a) **Uap iodium/cairan iodium.** Biasa disebut "reaksi iodium", merupakan hasil dari produk oksidatif. Ketika reaksi ini terjadi, jalur reaksinya biasanya irreversibel. Dalam kebanyakan kasus yang diamati bahwa senyawa organik tak jenuh muncul di zona kromatografi yang dipisahkan. Hasil reaksi ini juga menyebabkan terjadinya substitusi elektrofilik, reaksi adisi, dan kadang-kadang terjadi pembentukan kompleks transfer muatan. Komponen tambahan yaitu iodium juga memiliki sifat peredam fluoresensi. Oleh karena itu zona kromatografi, yang mengandung iodium, muncul sebagai zona gelap pada KLT yang berisikan indikator fluoresensi yang berpendar pada 254 nm. Tabel 3 mencantumkan beberapa reaksi umum yang terjadi pada lempeng kromatografi dengan iodium.

Reaksi iodium ini dapat juga menggunakan perlakuan dengan amilum seperti pada reaksi iodium yang reversibel. Iodium juga dapat digunakan sebagai larutan dengan cara melarutkan dalam pelarut organik, seperti spiritus, aseton, metanol, kloroform atau eter. Pencelupan yang tepat untuk larutan

terdiri dari iodium (250mg) yang dilarutkan dalam spiritus (100ml). Larutan tersebut memiliki keuntungan dalam beberapa kasus karena penambahan iodium lebih dapat memperbaiki noda analit dalam lingkungan lipofilik daripada lingkungan hidrofobik. Oleh karena itu sensitivitas dapat ditingkatkan. Batas deteksi biasanya beberapa mg dari senyawa per noda analit, pada beberapa kasus masih dapat mendeteksi konsentrasi yang lebih rendah (200 ng glukosa).

Tabel 2.5 Reaksi yang terjadi antara sorben KLT dengan uap iodium

Senyawa	Reaksi
Hidrokarbon polisiklik aromatik, indol dan derivat quinolin	Susunan dari produk oksidasi
Kina, obat bius, lemak tak jenuh, capsaicins, dan kalsiferol	Mengadisi iodium dengan ikatan rangkap
Opium, brusin, ketazon, dan trimetazon	Mengadisi iodium pada nitrogen ketiga untuk opium. Reaksi adisi pada kelompok $-OK_3$ pada brucin. Membuka reaksi cincin pada ketazone dan trimetazone
Tiol dan tioeter	Mengoksidasi sulfur dan mengadisi ikatan rangkap di dalam cincin tiazol
Alkaloid, fentiazin dan sulfonamida	Susunan kompleks

- b) **Uap asam nitrat.** Sebagian besar senyawa aromatik dapat dititrasi dengan asap dari konsentrasi asam nitrat pekat. Untuk pengembangannya kromatogram dipanaskan sampai sekitar  $160^{\circ}\text{C}$  selama sepuluh menit dan dimasukkan ke dalam ruang

yang berisi hasil penguapan selagi masih panas. Hasil nitrasasi asam nitrat pada tingkat yang wajar akan mengubah zona kromatografi menjadi kuning atau coklat. Identifikasi lebih lanjut mungkin dalam sinar UV pada 270 nm. Pada beberapa senyawa organik, seperti gula, derivat xantin, testosteron, dan efedrin, berpendar kuning atau biru setelah nitrasasi yang menyebabkan eksitasi pada panjang gelombang sinar UV panjang.

- c) **Reaksi Oksidasi/Reduksi.** Reaksi oksidasi dan reduksi adalah teknik yang paling sering digunakan dalam teknik visualisasi. Reaksi tergantung pada pereaksi tertentu yang digunakan. Di antara contoh reaksi oksidasi yang banyak digunakan dalam KLT adalah pereaksi Emerson (4-aminoantipirin-kalium heksasianobesi [III]) untuk mendeteksi arilamina dan fenol, pereaksi klorin-o-toluidin untuk vitamin B1, B2, B6 dan triazin, kloramin T untuk steroid, turunan purin, serta pereaksi klorin-kalium iodida-amilum untuk, amino imino, dan kelompok amido, dan herbisida triazin. Sebaliknya, reaksi reduksi termasuk pereaksi asam fosfomolibdat untuk lipid, fosfolipid, dan beberapa steroid. Pereaksi timah (II) klorida-4-dimetilaminobenzaldehid untuk deteksi nitrofenol aromatik, pereaksi tetrazolium biru untuk kortikosteroid, pereaksi Tillman (2,6-diklorofenolindofenol) untuk asam organik, termasuk vitamin C, dan perak nitrat,

pereaksi natrium hidroksida untuk mereduksi gula dan gula alkohol.

- d) **Pereaksi Dragendorff.** Pereaksi Dragendorff dapat digunakan untuk memvisualisasikan berbagai senyawa kecuali senyawa yang mengandung nitrogen organik. Alkaloid adalah area utama aplikasi pereaksi. Pereaksi disiapkan dengan cara berikut:

Larutan A : bismut (III) nitrat (0,85 g) dilarutkan dalam asam asetat (10 ml) dan air (40 ml)

Larutan B : kalium iodida (8 g) dilarutkan dalam air (20ml)

Larutan stok : bagian yang sama dari larutan A dan B dicampur (stabil dalam gelap untuk beberapa bulan)

Larutan pencelup : larutan stok (10ml) dicampur dengan asam asetat (20ml) dan air (100ml)

Setelah pencelupan selama beberapa detik lempeng dikeringkan perlahan pada 70°C selama 5 menit. Zona kromatografi berwarna coklat muncul pada latar belakang kuning pucat. Pengendapan kadang-kadang dapat terjadi selama persiapan pereaksi, tetapi hal ini dapat diabaikan sampai akhir pencelupan larutan. Pada titik ini larutan bisa disaring jika diperlukan.

Batas sensitivitas visualisasi adalah sekitar 5 mg per zona. Sensitivitas biasanya ditingkatkan dengan penyemprotan dengan larutan asam sulfat (0,5 M).

- e) **Pereaksi Iodin** merupakan pereaksi yang efektif untuk senyawa yang mengandung nitrogen dalam jangkauan yang lebar, meliputi alkaloid, ketosteroid, senyawa amoniak kuartener, tiol, tioeter, opiat, sulfoksida, antidepresan trisiklik, dan vitamin D<sub>3</sub>, K<sub>1</sub>, dan B<sub>1</sub>. Jangkauan warna yang dihasilkan dalam kromatogram bergantung pada analit.

Batas sensitivitas untuk mendeteksi berada dalam kisaran nanogram. Pereaksi pencelup terdiri atas:

10% w/v larutan asam heksakloroinat dalam air 3ml

6% w/v larutan kalium iodide dalam air 100ml

10% v/v larutan metanol dalam air 97 ml

Setelah pencelupan, KLT dikeringkan pada 80°C selama 5 menit. Pemanasan lebih lanjut pada 115°C selama 5 menit akan meningkatkan sensitivitas untuk beberapa analit.

- f) **Reaksi Asam Aldehida**. Reaksi ini bergantung pada protonasi dari aldehida aromatik, vanilin atau anisaldehyd, yang terjadi karena adanya pelepasan elektron atau kelompok akseptor. Kondensasi dapat terjadi dengan mudah pada molekul organik tertentu untuk membentuk molekul pewarna tipe trifenilmetan. Oleh karena itu zona kromatografi sering muncul dalam berbagai warna pada pereaksi vanillin (asam

sulfat dan vanillin) asam klorida. Pereaksi ini dapat digunakan untuk visualisasi katekin, alkaloid, flavonoid, komponen minyak atsiri, steroid, dan fenol. larutan pencelup khusus dapat dibuat sesuai dengan resep berikut:

Vanillin (250mg) dilarutkan dalam etanol (100ml), dan asam sulfat (2.5ml) ditambahkan hati-hati dengan pengadukan dan pendinginan. Setelah pencelupan, sorben lempeng dikeringkan pada 80°C selama 5-10 menit. Zona berwarna terang pada latar putih. Sebaiknya pereaksi disiapkan dan digunakan segera saat visualisasi. Reaksi bekerja dengan baik pada banyak sorben termasuk silika gel dan silika gel fase terbalik. Batas sensitivitas terendah yaitu 6ng/zona kromatografi. Pereaksi yang sama dengan vanilin-asam sulfat yaitu asam sulfat-anisaldehyd, juga digunakan untuk memvisualisasikan sebagian besar produk alami, termasuk komponen minyak atsiri, steroid, glikosida, sapogenin, dan fenol. Pereaksi dipersiapkan dengan cara yang sama, tetapi penting untuk mengontrol prosedur pengeringan secara hati-hati setelah pencelupan kromatogram. Pemanasan berlebih akan menyebabkan latar belakang menjadi buram dan menghasilkan kontras yang buruk.



### 7.3.1.2 Pereaksi Gugus Spesifik

Banyak pereaksi spesifik terhadap gugus fungsional tertentu yang berarti bahwa mereka memberikan reaksi dengan gugus kimia organik tertentu dan kadang-kadang anorganik. Sebagai aturan umum pereaksi ini sangat sensitif dengan batas deteksi biasanya menengah ke rendah dalam kisaran nanogram.

- a) **Pembentukan Hidrazon.** Pereaksi yang biasa digunakan untuk pembentukan hidrazon adalah 2,4-dinitrofenilhidrazin dalam larutan asam [100mg dalam etanol 100ml / fosfat asam (50:50)]. Setelah pencelupan atau penyemprotan kromatogram dengan pereaksi, reaksi disempurnakan dengan pemanasan pada  $110^{\circ}\text{C}$  selama sepuluh menit. Pereaksi ini khusus untuk aldehida, keton, dan karbohidrat. Noda karbohidrat yang terbentuk berwarna hidrazon kuning atau oranye-kuning, atau osazon. Asam askorbat dan asam dehidroaskorbat juga terdeteksi oleh pereaksi dengan memberikan zona kuning pada latar belakang putih. Batas sensitivitas adalah 10 ng per zona kromatografi.
- b) **Dansilasi.** Dansil [5-(dimetilamino)-1-naftalensulfonil] klorida, dan turunan lainnya yang digunakan untuk memproduksi turunan dansil fluoresensi asam amino, amina primer dan sekunder, asam lemak dan fenol. Dansilasi asam karboksilat tidak langsung seperti asam amida. Konversi ini mudah dicapai dengan pereaksi, disikloheksilcarbodiimida.

Pada langkah kedua, dansil cadaverine atau dansil piperidin digunakan untuk membentuk turunan fluoresensi dari amida. Batas deteksi adalah 1-2 ng untuk asam lemak. Teknik ini juga digunakan dalam visualisasi pra-kromatografi. Namun, salah satu masalah dengan dansilasi pasca-kromatografi adalah fluoresensi latar belakang yang dihasilkan. Sayangnya kontras fluoresensi antara zona kromatografi dan hasil latar belakang menghasilkan penurunan sensitivitas.

- c) **Diazosisasi.** Pewarna azo sangat berwarna dan dapat diproduksi dengan mudah dari nitro aromatik dan amina primer dan fenol yang ada dalam zona kromatografi yang dipisahkan. Hal ini dapat diperoleh dengan dua cara. Senyawa nitro direduksi menjadi aril amina primer. Aril amina primer didiazosisasi dengan natrium nitrit dan kemudian digabungkan dengan fenol untuk membentuk pewarna azo. Sebaliknya fenol dapat dideteksi melalui reaksi dengan asam sulfanilik dengan adanya natrium nitrit. Pewarna azo yang dihasilkan umumnya stabil selama beberapa bulan.

Beberapa pereaksi ada yang bergantung pada reaksi diazosisasi untuk mendeteksi gugus senyawa tertentu. Dua diantaranya adalah pereaksi Bratton-Marshall dan pereaksi Pauli. Pereaksi Bratton-Marshall terdiri dari dua larutan, pertama natrium nitrit dalam asam untuk menghasilkan efek diazosisasi dan yang kedua larutan etanol dari N-(1-naftil)

etilendiamina dihidroklorida. Senyawa ini telah digunakan secara khusus untuk memvisualisasikan amina aromatik primer, sulfonamida dan urea dan herbisida karbamat. Pereaksi Pauli terdiri dari natrium nitrit dan asam sulfanilik seperti yang disebutkan di atas. Senyawa ini digunakan untuk memvisualisasikan fenol, amina, beberapa asam karboksilat, dan turunan imidazol. Sebuah pendekatan baru untuk deteksi fenol adalah mengelusi lempeng dengan asam sulfanilik hidroklorida (2,5% b/v dalam air) sebelum kromatografi dan penambahan sampel. Setelah pengeringan KLT pada 120<sup>0</sup>C selama 30 menit, sampel fenolik ditambahkan dengan cara seperti biasa. Setelah pengembangan dan pengeringan, lempeng disemprot dengan larutan natrium nitrit segar (5% b/v). Pewarna azo yang terbentuk memiliki stabilitas tinggi, dan segera muncul sebagai zona berwarna yang mempertahankan warna mereka untuk beberapa minggu setelah visualisasi pertama.

- d) **Kompleks logam.** Beberapa logam transisi dapat bertindak sebagai akseptor elektron, oleh karena itu mereka mampu membentuk kompleks dengan senyawa organik yang berperan sebagai donor elektron. Kompleks logam berwarna yang terbentuk disebabkan oleh pergerakan elektron menuju ke tingkat energi yang berbeda pada ion logam transisi. Tembaga ( $\text{Cu}^{2+}$ ) mudah membentuk kompleks atau kelat dengan asam

karboksilat seperti asam tioglikolik dan asam ditioglikolik. Pereaksi pendeteksi yang cocok adalah tembaga (II) sulfat 5-hidrat (1,5% b/v dalam air / metanol). Kebanyakan asam akan muncul sebagai zona biru pada latar belakang biru muda. Batas kepekaan adalah 5 mg / zona. Tembaga juga digunakan dalam reaksi biuret dengan protein, sehingga pembentukan kompleks berwarna kemerahan-ungu, dan dengan etanolamin aromatik membentuk kelat berwarna biru. Besi ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dan kobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) juga dapat digunakan dengan cara yang sama dengan membentuk zona kemerahan-ungu untuk senyawa fenolik dan berwarna biru pada uap ammonia untuk barbiturat.

- e) **Reaksi Basa Skiff.** Reaksi basa Skiff adalah reaksi gugus spesifik untuk aldehida. Aldehid bereaksi dengan amina aromatik dalam keadaan basa membentuk basa Skiff. Anilin merupakan senyawa yang biasa digunakan, tapi senyawa amino lainnya juga dapat digunakan. Misalnya, karbohidrat dapat divisualisasikan dengan asam 4-aminobenzoik dengan pembentukan basa Skiff yang berwarna dan berflouresensi. Mekanisme reaksi yang sama terjadi dengan 2-aminobifenil untuk mendeteksi aldehida. Dua dari pereaksi yang paling sensitif untuk memvisualisasikan gula pereduksi yaitu, pereaksi anilin ftalat dan pereaksi asam anilin-difenilamin-fosfat, juga terlibat dalam reaksi basa Skiff. Batas kepekaan terendah adalah 10 mg per zona kromatografi.

- f) **Ninhidrin.** Ninhidrin adalah pereaksi pendeteksi di KLT yang mungkin banyak diketahui. Senyawa ini digunakan secara spesifik untuk visualisasi asam amino, peptida, amina, dan gula amino. Batas sensitivitas berkisar 0,2-2 mg per zona kromatografi tergantung pada asam amino. Zona berwarna dapat bervariasi dari kuning dan cokelat menjadi merah muda dan ungu, tergantung pada sorben lempeng dan pH. Sayangnya, warna memudar dengan cepat kecuali distabilkan dengan penambahan logam garam timah, tembaga atau kobalt. Tembaga (II) nitrat atau asetat adalah garam yang biasa dipilih sebagai aditif. Formulasi khas untuk pereaksi pencelup ninhidrin adalah:

Ninhidrin (0,3% b/v) dalam propan-2-ol dengan penambahan 6ml/100ml larutan tembaga (II) asetat (1% b/v).

Setelah pencelupan lempeng KLT dipanaskan pada 105°C selama 5 menit. Untuk memberikan resolusi yang lebih baik antara glisin dan serin, kollidin ditambahkan ke dalam pereaksi pencelupan pada kisaran 5ml/100ml.

- g) **Pereaksi Produk Alam.** Ester asam-2-aminoetil difenilborik mudah membentuk kompleks dengan 3-hidroksiflavin melalui reaksi kondensasi. Pereaksi ini digunakan secara luas dalam KLT untuk visualisasi komponen dalam preparasi herbal. Pereaksi pencelup yang sesuai terdiri dari ester asam-2-aminoetil difenilborik (1 g) dilarutkan dalam metanol

(100ml). Larutan ini harus segera dibuat saat diperlukan terutama ketika dibutuhkan hasil kuantitatif. Kromatogram dikeringkan sepenuhnya, dicelupkan dalam pereaksi selama beberapa detik, dikeringkan lagi dalam aliran udara hangat, dan kemudian dicelupkan ke dalam polietilen glikol (PEG) 4000 (5% b/v) dalam etanol. Pemanasan akhir melengkapi langkah deteksi. Ketika kromatogram disinari lampu 360 nm, banyak zona berfluoresensi berwarna cerah yang diamati dan dapat dihitung dengan mudah karena ada kontras yang sangat baik. Pereaksi ini sangat baik untuk mendeteksi rutin, asam klorogenat, hiperikum, dan flavonoid lainnya. Pereaksi ini juga dapat digunakan pada banyak sorben lempeng meliputi silika gel fase normal dan fase terbalik. Batas sensitivitas adalah 1-5 ng / zona kromatografi. Tujuan dari PEG 4000 adalah untuk meningkatkan fluoresensi dan untuk menstabilkan emisi cahaya.

- h) **Pereaksi Mangan (II) Klorida-Asam Sulfat.** Meskipun mekanisme reaksi tidak sepenuhnya dipahami, pereaksi ini cukup spesifik untuk lipid, asam empedu, kolesterol, ester kolesterol, dan ketosteroids. Pereaksi pencelup dipersiapkan sebagai mangan klorida (0,2 g) dalam air (30ml) dan metanol (30ml) dengan penambahan asam sulfat (2ml). Setelah pencelupan, kromatogram dipanaskan pada 120°C selama 10 menit. Pada tempat di mana reaksi terjadi, zona berwarna

muncul pada latar belakang putih. Pendeteksian bisa dilakukan pada silika gel dan silika gel fase terikat. Batas sensitivitas sekitar 1 mg / zona kromatografi, tetapi hal ini dapat ditingkatkan dengan pengukuran fluoresensi dalam sinar UV (360 nm).

- i) **Reaksi lainnya.** Ada banyak pereaksi lain yang tidak sesuai dengan kategori di atas, namun mereka merupakan bagian utama dari daftar pereaksi visualisasi yang dapat ditemukan di literatur. Tabel 4 mendata pilihan bersama dengan kelas senyawa yang divisualisasikan. Termasuk dalam kelompok ini adalah pereaksi yang dinamai sesuai dengan penemunya. Dalam beberapa kasus mekanisme reaksi sepenuhnya didokumentasikan dalam literatur, tetapi ada juga beberapa mekanisme yang belum dijelaskan.

### 7.3.1.3 Reaksi Berantai

Sebuah fitur unik dari pendeteksi dalam KLT adalah kemampuan untuk melaksanakan reaksi visualisasi berantai. Proses ini melibatkan kombinasi dari teknik sebelumnya yang dioperasikan dengan cara bertahap. Kombinasi khas bisa mencakup penyerapan cahaya tampak atau UV, diikuti oleh reaksi reversibel dengan pereaksi universal, pereaksi yang serupa tetapi non-reversibel, dan akhirnya pereaksi gugus tertentu. Urutan yang digunakan adalah disusun sehingga tidak ada interaksi yang tidak diinginkan terjadi

antara pereaksi yang digunakan dalam langkah-langkah terpisah. Urutan yang direncanakan seringkali dapat bekerja di mana gugus-gugus fungsional tertentu ada dalam zona kromatografi yang dipisahkan, atau jika diperlukan untuk mendapatkan bukti lebih ada atau tidak adanya analit tertentu.

Reaksi beruntun sangat berguna di mana beberapa kelompok senyawa yang mengandung gugus fungsional spesifik terdapat pada kumpulan senyawa yang ada. Dua daerah di mana prosedur visualisasi bertahap ini sangat berguna dalam analisis obat terlarang dan analisis penentuan produk alami yang terdapat dalam preparasi herbal. Mengidentifikasi obat tertentu sulit dibuktikan ketika ada banyak kemungkinan senyawa. Reaksi berantai untuk visualisasi setelah pengembangan kromatografi memungkinkan identifikasi yang tepat untuk kelas obat-obatan terlarang dan juga senyawa organik. Pada sampel herbal biasanya berisi induk senyawa organik kompleks, termasuk banyak flavonoid dan alkaloid yang mudah divisualisasikan. Sayangnya di KLT ada batas jumlah pemisahan yang dapat dicapai dalam satu dimensi. Oleh karena itu reaksi bertahap membantu mengidentifikasi analit tertentu di mana antara senyawa lainnya terkait erat.



**Table 2.6** Pereaksi panampak noda pada KLT/KLTKT

Pereaksi Visualisasi	Kondisi Pereaksi	Kelompok senyawa yang terdeteksi
Pereaksi Ehrlik's	4-Dimetilaminobenzaldehid (2% w/v) dalam 25% w/w HCl/etanol (50:50 v/v). Dipanaskan 110 <sup>0</sup> C selama 2 menit.	Amina, indol
Pereaksi Gibb's	2,6-Dibromoquinon-4-kloroimida (0.5% w/v) dalam metanol. Dipanaskan 110 <sup>0</sup> C selama 5 min.	Fenol, indol, tiol, barbiturat
Pereaksi Blue tetrazolium	Blue tetrazolium (0.25% w/v) dalam larutan sodium hidroxida (6% w/v dalam air)/dan dalam metanol (25:75 v/v)	Kortikosteroid, karbohidrat
Pereaksi Tillman's	Garam natrium 2,6-Diklorofenolindofenol (0.1% w/v) dalam etanol. Dipanaskan 100 <sup>0</sup> C selama 5 min.	Asam organik termasuk vitamin C
Pereaksi besi (III) kloride	Iron(III) klorida (1% w/v) dalam etanol/air (95:5 v/v). Dipanaskan 100 <sup>0</sup> C selama 5 min.	Fenols, ergot alkaloid, Anion inorganik, fenol, asam hidroksamik, ester kolesterol
Pereaksi EP	4-Dimetilaminobenzaldehid (0.2% w/v) dan asam ortofosforik (3% v/v) dalam asam asetat (50:50 v/v). Dipanaskan 80 <sup>0</sup> C selama 10 min.	Terpen, ester sesquiterpen
Pereaksi Jenson's	Kloramine T (10% w/v) dan asam trikloroasetik (0.4% w/v) dalam kloroform/metanol/water (80:18:2 v/v). Dipanaskan 120 <sup>0</sup> C selama 10 min.	Glicosida digitalis
Pereaksi N-bromosuksinimid	0.5% w/v larutan dalam aseton. Dipanaskan 120 <sup>0</sup> C for 20 min.	Asam amino, hidroksi flafonoid, hidroksiquinon
Pereaksi o-Ftalaldehid-asam sulfat	o-Ftalaldehid (1% w/v) dalam metanol/asam sulfat (90:10 v/v). Dipanaskan 80 <sup>0</sup> C selama 3 min.	Ergot alkaloid, b-blocker, derivat indol, peptida histidil

Pada visualisasi bertahap serangkaian pereaksi yang digunakan, untuk "mencuci " atau " menghilangkan noda " pada KLT dilakukan secara berurutan menggunakan masing-masing pereaksi untuk menghindari kontaminasi silang pada tahap berikutnya.

Pembilasan wadah pencelupan dapat dilakukan. Larutan pencuci tergantung pada sifat pereaksi yang digunakan, terutama kelarutannya dalam air atau pelarut lain. Penghilangan noda sering kali diperlukan pada tempat di mana warna latar belakang dihasilkan pada sebagai akibat dari penggunaan deteksi pereaksi tertentu. Pencucian dapat dilakukan bersama dengan proses penghilangan noda, tetapi beberapa warna latar belakang juga akan memudar dalam kehadiran asam atau uap alkali (misalnya uap amonia pada lempeng sebelumnya diobati dengan asam molibdofosforik).

#### Kromatogram

↓ ninyhidrin

Asam amino, amina primer (zona violet, pink, kuning, coklat)

↓ besi (III) klorida

Fenotiazin, dibenzazepin (zona coklat dan biru)

↓ pereaksi Dragendorff

Alkaloid (zona kuning dan oranye)

↓ pereaksi iodinat

Amina sekunder dan tersier ( coklat, hijau dan violet)

**Gambar 2.28** Tahapan pewarnaan berulang

### 7.3.2 Visualisasi Pra Kromatografi

Meskipun deteksi KLT secara tradisional dilakukan setelah pengembangan kromatogram, deteksi sebelum pengembangan juga mungkin dilakukan. Visualisasi pra-kromatografi ini memungkinkan derivatisasi dari kelas senyawa dimana pereaksi gugus spesifik digunakan. Sisa dari komponen sampel tetap tidak terderivatisasi. Sebuah campuran pelarut yang dipilih dapat menyebabkan migrasi yang cukup dari senyawa derivat dengan tujuan untuk memisahkan senyawa tersebut pada lempeng kromatografi, sedangkan komponen tak terderivatisasi tetap berada di titik asal atau bermigrasi sama dengan garis depan eluen. Senyawa derivat biasanya sangat berwarna, resolusi analit dapat terlihat jelas.

Prosedur ekstraksi kolom pada preparasi sampel dapat digunakan untuk membersihkan sampel, meskipun biasanya tidak perlu. Kebanyakan prosedur derivatisasi yang digunakan dalam KLT membutuhkan pereaksi yang bereaksi langsung dengan analit dan seluruh sampel. Sebuah contoh dari prosedur analitis yang sekarang digunakan sebagai metode standar adalah penentuan vitamin C pada jus buah menggunakan visualisasi pra-kromatografi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin. Fenylhidrazon yang terbentuk berwarna kuning terang dan mudah dipisahkan pada lempeng silika gel 60 dengan mengembangkan campuran pelarut kloroform- etilasetat (1:1 v / v).

Reaksi kompleksasi juga dapat digunakan untuk mendeteksi logam transisi dan logam alkali tanah. Seperti sebelumnya reaksi kompleksasi dilakukan pada sampel sebelum aplikasi ke lempeng kromatografi. Pereaksi yang umum digunakan untuk tujuan ini adalah ditizon, etilendiamin asam tetraasetik dan dietilditiokarbamat. Batas deteksi untuk kompleks ini dapat di kisaran pikogram tinggi. Derivatisasi pra-kromatografi yang lebih elegan dapat dilakukan pada lempeng. Penambahan dilakukan dengan cara yang tidak biasa, sampel ditotolkan pada lempeng kromatografi kemudian pereaksi derivatisasi ditambahkan di tempat yang sama. Hal ini juga dapat dilakukan dalam urutan terbalik dengan pereaksi derivatisasi ditambahkan pertama, diikuti oleh sampel. Namun, ada keuntungan dalam menerapkan pereaksi derivatisasi pertama. Zona pereaksi dapat ditambahkan di seluruh lempeng sorben untuk memastikan bahwa ketika sampel mencapai pita yang berbeda di atas pereaksi derivatisasi, reaksi sempurna terjadi. Setelah waktu reaksi berakhir, dan lempeng dikeringkan, pengembangan kromatogram dapat dilanjutkan dengan menggunakan campuran pelarut dengan mempertimbangkan polaritas senyawa yang baru dibentuk. Sebuah contoh yang menunjukkan efektivitas teknik ini pada derivatisasi in situ adalah pemisahan asam lemak jenuh dan tak jenuh. Sampel diaplikasikan seperti biasa diikuti larutan disikloheksilkarbodiimida dengan pengeringan antara pengembangan sorben lempeng. Cara ini mengubah asam lemak menjadi amida yang sesuai. Amida tersebut

mudah didansilasi dengan dansil cadaverine untuk membentuk turunan dengan fluoresensi tinggi. Pengembangan pelarut ini kemudian dioptimalkan sehingga kelebihan pereaksi bermigrasi dengan eluen, sementara turunan asam lemak dipisahkan pada lempeng. Fluoresensi dapat distabilkan dan ditingkatkan seperti yang dibahas sebelumnya. Dalam hal ini pencelupan singkat lempeng sorben dalam larutan X-100 Triton 5% b/v dalam kloroform/heksana (12: 88% v/v) meningkatkan hasil fluoresensi lima kali lipat dengan batas deteksi di kisaran pikogram.

Seperti pada “kromatografi gugus fungsional” teknik ini tidak hanya terbatas pada satu pengembangan kromatografi. Cara ini juga dapat digunakan dalam kerangka pemisahan 2-dimensi. Pengembangan pertama dilakukan dengan sampel tak terderivatisasi. Aplikasi sampel hanya satu totolan di dekat salah satu tepi lempeng (setidaknya 15 mm dari tepi). Sebelum pengembangan kedua, jalur pemisahan dikenakan perlakuan dengan pereaksi gugus spesifik sehingga semua analit yang diperiksa terderivatisasi. Pengembangan kedua dilakukan dengan cara arah pengembangan lempeng diputar 90°.

### **7.3.3. Teknik Derivatisasi**

#### **7.3.3.1. Teknik Derivatisasi Dengan Cara Penyemprotan**

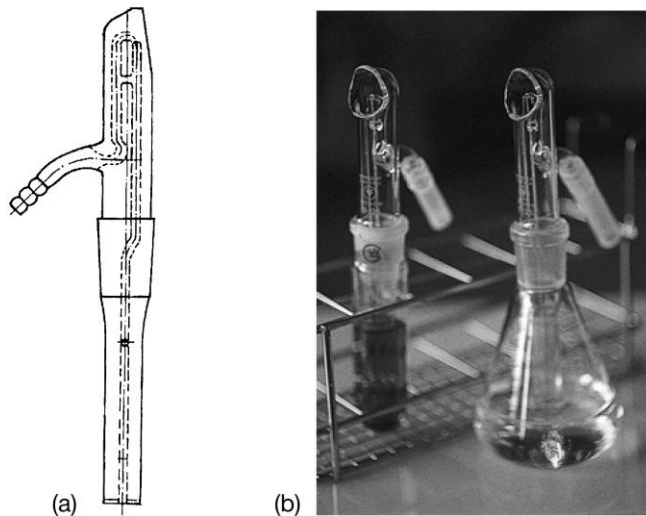
Penyemprotan KLT secara manual

Teknik ini paling umum digunakan dalam uji kualitatif, yaitu dengan menyemprot kromatogram. Kepala alat semprot dihubungkan dengan kaca penghubung yang kemudian dihubungkan dengan labu berbentuk kerucut atau dengan tabung uji yang mengandung pereaksi dengan kapasitas 15 ml di dalamnya. Mulut alat dirancang untuk aplikasi kabut larutan pereaksi dengan tekanan 0,6-0,8 bar secara homogen. Bila, di laboratoriu tidak tersedia tabung silinder ataupun tabung tekanan dapat digunakan alat penyemprotan KLT yang dirancang oleh CAMAG. Alat ini terdiri dari sistem penyemprotan elektropneumatik dimana kerjanya didukung oleh akumulator yang dapat diisi ulang secara induktif. Alat ini tersusun dari stasiun pengisian listrik, pemegang semprot, dan dua kepala semprot dengan diameter kapiler yang berbeda-beda.

Prinsip kerja alat ini, yaitu:

Jika menggunakan pereaksi dengan viskositas rendah, maka menggunakan kepala semprot dengan diameter kapiler 0,8 mm. Jika menggunakan pereaksi dengan viskositas lebih tinggi maka menggunakan kepala semprot dengan diameter kapiler 1,25 mm. Kepala semprot pada botol pereaksi berkapasitas 50-100 ml yang di dalamnya terdapat pemutar pereaksi, mengatur botol, lalu menekan tombol untuk memulai kerja. Hasil semprotan

menghasilkan kabut sangat halus. Peralatan semprot yang dirancang oleh DESAGA pembuatannya sama namun dapat menghasilkan kabut halus tanpa harus dihubungkan dengan catu daya listrik seperti yang dibuat oleh CAMAG.



**Gambar 2.30** Alat penyemprot manual

Penyemprotan KLT sebaiknya dilakukan dalam lemari asap dengan penghisapan udara yang baik untuk menghindari bahaya kesehatan karena menghirup kabut aerosol berbahaya dan untuk mencegah kontaminasi di tempat kerja.

Hal yang perlu diperhatikan dalam menyemprot KLT:

- Harus diasumsikan bahwa aerosol yang terbentuk selama penyemprotan adalah toksik. Sistem ekstraksi harus baik dan

sebaiknya menggunakan kaca mata pelindung, sarung tangan, dan masker.

- Teknik penyemprotan adalah metode derivatisasi noda lempeng KLT yang cepat dan sederhana. Namun, lempeng yang terbentuk biasanya lebih tidak homogen dibandingkan teknik pencelupan sehingga lebih sulit mengontrol jumlah pereaksi.
- Pereaksi semprot harus sesegara mungkin dan sebaiknya disediakan bila akan digunakan. Penyimpanan pereaksi semprot dalam periode waktu yang lama harus diuji dan didokumentasikan dalam uji spesifikasi prosedur.
- Alat penyemprot harus memberikan bercak semprotan yang bagus dan homogen. Jika variasinya terlalu sempit, proses penyemprotan akan membutuhkan waktu yang lama dan jika terlalu lebar, akan terpercik tetesan pereaksi yang besar sehingga evaluasi akan sulit dilakukan. Solusinya dengan menguji beberapa kepala semprot dan mengeliminasi yang tidak sesuai.
- Saat memasang peralatan semprot, perawatan harus dilakukan untuk menjaga kepala semprot tetap kering dan bersih.
- Dianjurkan memasang sapu tangan kertas di bawah sebelum menyemprot untuk menyerap sisa pereaksi
- Sebelum menyemprot, diuji dulu dengan menyemprotkannya di area di luar bagian pengembangan KLT. Ini disebabkan



karena noda tak diinginkan dapat dihasilkan jika kepala semprot tidak benar-benar kering.

- Lempeng ukuran 5 x 5 cm dapat direkatkan dengan pipa perekat yang lebih besar di tengah lempeng untuk memfasilitasi penyemprotan yang seragam.
- Penyemprotan pereaksi dapat dilakukan saat lempeng panas karena larutan pereaksi penampak noda akan menguap lebih cepat sehingga proses penyemprotan lebih lanjut dengan pereaksi berbeda dapat dilakukan sesudahnya.
- Sebelum memasukkan pereaksi ke dalam alat penyemprot sebaiknya dipastikan alat dalam keadaan bersih. Alat semprot yang terkontaminasi bisa memicu reaksi tak terkontrol dengan pereaksi yang disemprotkan.
- Pereaksi yang mengandung mangan heptoksida dan asam perklorat dan juga larutan Natrium azida dan Iodium azida tidak boleh disemprotkan karena dapat menyebabkan ledakan di saluran ekstraksi udara di lemari asam.
- Bahan bakar gas yang dulunya digunakan biasanya mengandung hidrokarbon terflorinasi sekarang ini tidak pernah digunakan.

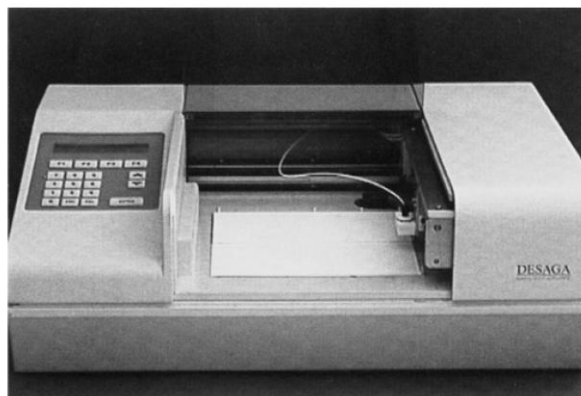


**Gambar 2.31** Alat penyemprot dengan sistem elektropneumatik

### **Penyemprotan Lempeng KLT Secara Otomatis**

Kromajet DS 20 yang diproduksi oleh DESAGA adalah konsep baru untuk menyemprotkan pereaksi dengan presisi terbesar ke KLT atau film. Tentunya ini dicapai dengan bantuan computer dan mikroprosesor control. Keuntungannya, jumlah pereaksi yang digunakan dapat dikurangi, mengurangi jumlah aerosol yang terbentuk dan area penyemprotan merata. Seperti metode penyemprotan yang lainnya, metode ini dapat dibuat, disimpan, dan diambil sewaktu-waktu tergantung pola kromatografi individual. Pengoperasian program untuk memfasilitasi posisi GMP/ GLP yang akan dilakukan. Hal ini disebabkan karena reproduktivitas dan dokumentasi sekarang mungkin dilakukan pada proses derivatisasi.

Semua parameter-parameter penting laju semprotan, volume semprotan, dan pemilihan pereaksi dibutuhkan dalam metode penyemprotan. Karger sampel terintegrasi bisa juga memilih empat pereaksi menurut program penyemprotan untuk menghasilkan penyemprotan medium yang diinginkan. Koordinat x/y disesuaikan dengan mengaktifkan jalur individu atau tiap area sampai 20x20 cm disemprot merata. Sebuah sistem pembilasan yang terpasang tetap mencegah akumulasi. Aerosol yang terbentuk dihilangkan dengan ekstraksi udara.



**Gambar 2.32** Alat penyemprot otomatis

### **7.3.3.2 Teknik Derivatisasi Dengan Cara Pencelupan**

Proses pencelupan KLT dengan pereaksi yang sesuai banyak digunakan karena alasan berikut:

- Aplikasi larutan pereaksi pada lempeng sorben lebih seragam daripada dengan penyemprotan manual yang sangat hati-hati

- Distribusi pereaksi tidak dipengaruhi oleh kemampuan manual penggunaanya, kapasitas alat semprot, viskositas pereaksi atau ukuran tetesan alat penyemprot
- Evaluasi kuantitatif kromatogram yang bereaksi secara kimiawi hanya mungkin menggunakan metode ini. Hal ini disebabkan hasil garis dasar dari keseragaman lempeng sangat kurang terstruktur. Maka batas deteksi lebih rendah dibanding teknik penyemprotan kromatogram. Selain itu reproduksibilitas banyak dimanfaatkan karena aplikasi pereaksi lebih homogen.
- Menggunakan pereaksi sangat rendah, khususnya dengan serangkaian investigasi
- Kontaminasi pereaksi berbahaya terhadap tempat kerja yang kadang-kadang merugikan kesehatan sangat rendah
- Tidak diperlukan alat semprot kompleks dengan ekstraksi udara terintegrasi.

Alat untuk mencelupkan KLT bisa diperoleh dalam bentuk yang bervariasi. Sampai sekarang ini, pencelupan chamber yang sesuai untuk 10 x 10 cm, 20 x 10 cm, dan 20 x 20 cm sering digunakan. Namun, instruksi personal seperti cepat, atau hati-hati mencelupkan biasanya tidak dapat persis diduplikasi oleh operator yang lain dan tanda transversal yang sering muncul ketika sebuah dicelup tidak dinaikan dalam tingkat yang stabil kadang-kadang dapat membuat satu atau beberapa pekerjaan tidak berharga. Untuk

alasan ini, peralatan pencelupan otomatis yang dapat menurunkan dan menaikkan pada tingkat yang seragam hampir selalu digunakan sekarang ini. Hal ini mencegah pembentukan tanda transversal yang menyerupai bidang pelarut dan yang menimbulkan efek merugikan pada evaluasi densitometrik. Kondisi pencelupan bisa distandarisasi dengan memberikan waktu tinggal yang pasti.

Hal yang perlu diperhatikan dalam mencelup KLT:

- Larutan pencelup lebih encer daripada penyemprotan larutan. Pelarut yang digunakan harus sesuai khusus untuk kebutuhan pencelupan. Air di satu sisi dapat membentuk tetesan yang tinggal di permukaan fase terbalik dan tidak terpenetrasi ke dalam lempeng tetapi di sisi lain bisa mengikis lempeng jika tidak kompatibel dengan air sehingga air digantikan oleh alkohol atau pelarut lipofilik lain.
- Saat pemilihan sistem pelarut, seseorang secara umum harus memastikan bahwa baik zat yang dipisahkan secara kromatografi maupun produk reaksi harus tidak larut dalam sistem pelarut pereaksi pencelupan.
- Dalam setiap kasus individual, waktu tinggal di dalam ruang pencelupan harus ditentukan melalui eksperimen dan didokumentasikan dalam prosedur pengujian.
- Dengan sejumlah besar zat atau jika mencelupkan terlalu panjang maka ekor komet akan terbentuk setelah

pencelupan. Dalam kasus seperti ini kemungkinan memperoleh analisis yang lebih baik hasilnya dengan menggunakan aplikasi semprotan pereaksi harus diselidiki.



**Gambar 2.33** Alat pencelupan lempeng KLT untuk visualisasi noda kromatogram

### 7.3.3.3. Pengontrolan Uap Pada Derivatisasi KLT

Menghomogenkan aplikasi pereaksi bisa dicapai dengan menggunakan uap ke kromatogram. Untuk ini, perlu digunakan chamber dengan ukuran yang sesuai. Piring porselen kecil atau kaca beker bisa ditempatkan di bawah ruang datar bawah dan diisi dengan pereaksi. Satu atau dua piring dengan lempeng menghadap ke tengah, ditempatkan dalam ruangan dan dibiarkan selama 20

jam. Dengan menggunakan chamber twin trough, pereaksi ditempatkan di satu kompartemen dan KLT di kompartemen yang lain. Sejumlah besar reaksi penguapan dapat dilakukan di chamber. Hal yang perlu diperhatikan dalam pengontrolan uap KLT:

- Sebuah metode mendeteksi zat dengan uap yodium tidak spesifik tapi biasanya tidak menyebabkan dekomposisi. Maka direkomendasikan untuk laboratorium dimana KLT sering digunakan dan dimana bahaya di ruang bawah chamber selalu siap digunakan untuk pengontrolan uap jenis ini. Ini terdiri dari piring porselen kecil mengandung yodium. Setelah memasukkan satu atau dua KLT 20 x 20 cm atau banyak kecil dengan ukuran 10 x 10 cm, Blower udara panas digunakan untuk memanaskan dinding luar chamber sampai uap terlihat ungu.
- Waktu tinggal untuk dalam chamber penguapan bisa bervariasi dari beberapa menit untuk reaksi deteksi sampai 20 jam untuk tes pemurnian. Sebaiknya ditentukan secara individual untuk masing-masing tugas dan ditetapkan dalam prosedur pengujian.
- Aluminium foil hanya sesuai untuk kasus pengecualian untuk reaksi penguapan lempeng sebelum dilapisi. Dengan waktu tinggal yang lama, misal dalam chamber yodium, aluminium di diaplikasikan ke area yang tidak mungkin mengevaluasi kromatogram.

- Lempeng KLT, setelah pengontrolan dengan uap yodium dan pembersihan dari chamber, seharusnya dilindungi dengan kaca bersih sampai terdokumentasi atau terevaluasi
- Disarankan untuk membiarkan lempeng di lemari asap yang efisien sampai pereaksi teruapkan seluruhnya.

## **7.4 Evaluasi Kuantitatif**

Metode langsung untuk analisa kuantitatif yang sederhana berupa perbandingan visual intensitas noda jumlah sampel dengan noda standar yang dikembangkan secara bersamaan. Metode ini biasa disebut metode ekstraksi noda meliputi tahapan pengeringan lempeng, penandaan noda analit, memotong bagian lempeng yang mengandung analit, mengumpulkan sorben, ekstraksi analit dari sorben, dan pengukuran dengan dibandingkan standar secara mikroanalitikal, seperti absorpsi larutan atau spektrofotometri fluoresensi. Metode kuantifikasi ekstraksi noda biasanya memakan waktu lama, dan sering tidak akurat. Hal ini disebabkan karena sulitnya menentukan penempatan lingkaran noda secara tepat, hilangnya sorben selama pemotongan dan pengumpulan, ekstraksi kurang reproduibel dan tidak sempurna dari sorben. Metode lainnya yang umum digunakan adalah KLT-Densitometri, di mana parameter kuantitatif yang digunakan adalah tinggi puncak kurva densitometri dan area di bawah puncak kurva densitometri.



Mode densitometer ada dua yaitu mode reflektan (remisi) dan transmitan. Mode reflektan bisa digunakan pada rentang spektral UV/Vis, fluoresensi dan peredaman fluoresensi. Spektral visual (400-800 nm) menggunakan lampu halogen dan tungsten, sedangkan pada spektral UV (190-400 nm) menggunakan lampu deuterium dan xenon. Untuk spektral fluoresensi digunakan lampu merkuri.

Densitometri merupakan metode analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT-Densitometri. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai  $R_f$  analit dan standart. Dari noda analit yang memiliki  $R_f$  sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standart. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standart pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standart.

Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula.

Apabila pada fase diam tidak ada noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Tetapi jika cahaya tersebut dijatuhkan pada pelat yang terdapat noda dari suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas cahaya yang datang.

Skema sistem optik densitometer dapat dilihat pada gambar 2.34. Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator. Didalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat direfleksikan maupun diteruskan. Sinar yang direfleksikan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (photomultiplier) berfungsi menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem komputer sebagai data output.

Evaluasi noda KLT dengan densitometri dapat digunakan untuk analisis kuantitatif. Hubungan tanggap detektor pada densitometer dengan konsentrasi sesuai hukum Kubelka Munk sebagai berikut :

$$R_{\infty} = \frac{2,303 \varepsilon c}{S}$$

Dimana :

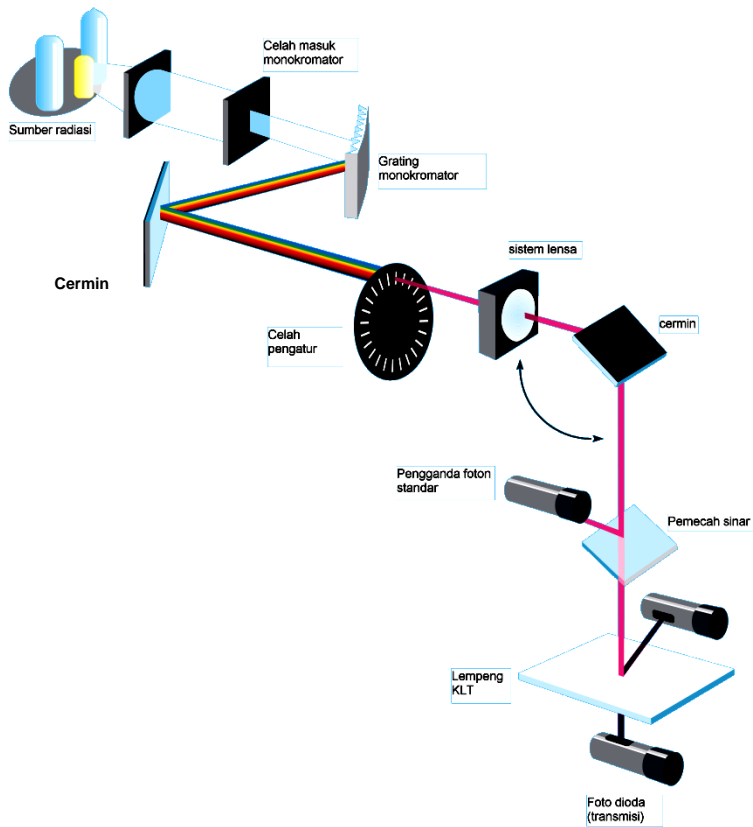
R adalah reflektan

C adalah konsentrasi

$\varepsilon$  adalah *Extinction Coefficient*

S adalah *Scattering coefficient*

Dengan membandingkan antara sinyal dari masing-masing noda analit dengan sinyal dari area blangko (area tanpa noda) maka koefisien scattering 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 reproduibilitas hasil pada analisis kuantitatif.



**Gambar 2.34** Skema sistem optik Densitometer (camag)

**Pertanyaan-pertanyaan :**

1. Bagaimana penanganan eluen untuk mendapatkan pemisahan yang reproduibel?
2. Apakah keuntungan penggunaan chamber twin through dibandingkan chamber normal maupun chamber sandwich?
3. Daur ulang lempeng KLT dapat dilakukan dengan memperhatikan pertimbangan apa sajakah?
4. Bagaimana pengaruh kelembaban udara terhadap hasil pemisahan kromatografi ?

## **BAB 3**

# **Teori Dan Mekanisme Pada KLT**

Teori kromatografi menjelaskan tentang proses pemisahan yang didasarkan pada hubungan fisika-kimia. Biasanya, proses kromatografi yang digunakan adalah model semiempirikal yang memiliki latar belakang termodinamika yang relatif sederhana dan memberikan sebagian besar gambaran fenomena fisik atau kimia. Cara yang lain adalah proses kromatografi dengan model makroskopik tetapi model ini memiliki kelemahan yaitu tidak dapat dicerminkan/dilihat mekanisme pemisahan masing - masing.

## **1. Fenomena Fisik Dasar**

### **1.1. Aliran Kapiler**

Transfer/ perpindahan fase gerak melalui lempeng tipis disebabkan oleh gaya kapiler. Jenis fase diam kromatografi dibedakan berdasarkan polaritas (adsorpsi dan partisi), ukuran eksklusi, dan pertukaran ion. Fase diam pada kromatografi merupakan padatan

mikroporus dengan tinggi permukaan yang spesifik (berkisar sekitar 50 m<sup>2</sup>/ G pada selulosa dan mencapai sekitar 500 m<sup>2</sup>/ G pada silika). Adanya partikel fase diam yang berinteraksi dengan pelarut fase gerak mengakibatkan timbulnya efek kapiler aglomerasi. Pelarut atau campuran pelarut memasuki ruangan kapiler dalam kromatografi yang tersusun atas padatan, berusaha untuk menurunkan kedua sifatnya yaitu luas permukaan bebas dan energi bebasnya. Energi bebas dari pelarut yang masuk ke kapiler menghasilkan  $\Delta E_m$  dimana :

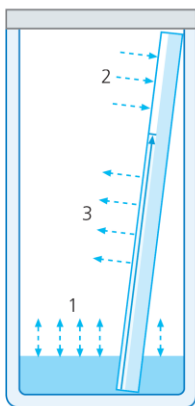
$$\Delta E_m = -\frac{2\gamma V_n}{r}$$

$\gamma$  adalah tegangan permukaan bebas,  $V$  menunjukkan volume molar pelarut, dan  $r$  adalah jari-jari kapiler. Dari Persamaan diatas jari-jari  $r$  kapiler sangat penting untuk aliran kapiler dan jari-jari lebih kecil mengarah ke aliran yang lebih efisien.

## 1.2. Volatilitas Pelarut

Berbeda dengan kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis mikroporusnya tidak dihambat oleh kontak yang biasanya terjadi di ruang kromatografi. Oleh karena itu, pada kromatografi lapis tipis diperlukan beberapa langkah-langkah khusus untuk memfasilitasi pencapaian kesetimbangan termodinamik antara komponen fase gerak dalam bentuk gas dan cair. Dalam chamber KLT terdapat sebuah ruang kosong yang berisi gas eluen. Awalnya

ruangan kosong tersebut akan diisi oleh komponen udara dan uap air, tetapi setelah penambahan eluen fase gerak, ruangan dalam chamber mulai diisi dengan molekul uap fase gerak. Proses ini akan berlangsung sampai ruang dalam chamber jenuh oleh komponen gas fase gerak. Hal ini yang membedakan antara KLT dengan metode kromatografi yang lain misal KCKT. Pada KCKT terdapat dua fase yaitu fase gerak dan fase diam, sedangkan pada KLT selain fase diam dan fase gerak ada fase ketiga yaitu fase uap dari fase gerak (gambar 3.1).



**Gambar 3.1** Kestimbangan termodinamika antara cairan fase gerak dengan uap fase gerak yang terjadi di dalam chamber.

Adanya fase ketiga ini yang menyebabkan pergerakan fase gerak melewati lempeng fase diam tidak konstan terhadap waktu. Untuk



sistem KLT dengan pergerakan kapilaritas kecepatan fase gerak digambarkan dengan persamaan berikut :

$$K = \frac{(Z_F)^2}{t}$$

Dimana :

K adalah kecepatan alir fase gerak

$Z_F$  adalah jarak tempuh eluen

t adalah waktu tempuh eluen (waktu analisis)

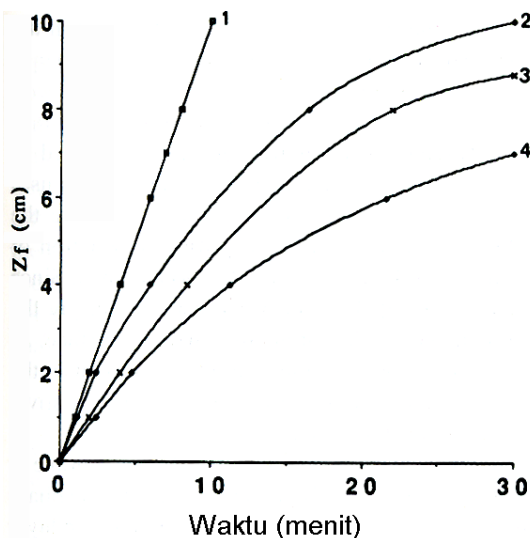
Dari persamaan kecepatan alir diatas maka pada kondisi analisis yang sama peningkatan jarak tempuh eluen sebesar dua kali akan menyebabkan peningkatan waktu tempuh eluen sebesar empat kalinya.

Kesetimbangan antara fase diam, fase gerak dan fase uap dalam chamber mempengaruhi kecepatan alir fase gerak. Gambar 3.2 menunjukkan kecepatan alir fase gerak dengan berbagai kondisi pengembangan.

### **1.3. Pelebaran Noda Kromatografi**

Karakteristik dari noda kromatografi adalah saat pengembangan noda yang terbentuk semakin lama semakin melebar. Fenomena ini tidak hanya terjadi pada metode kromatografi planar tetapi juga terjadi pada tiap - tiap teknik kromatografi. Perluasan noda terjadi karena adanya efek difusi eddy, difusi longitudinal dan efek dari

tahanan alih massa, yang memberikan mekanisme retensi zat terlarut tertentu (gambar 3.3).

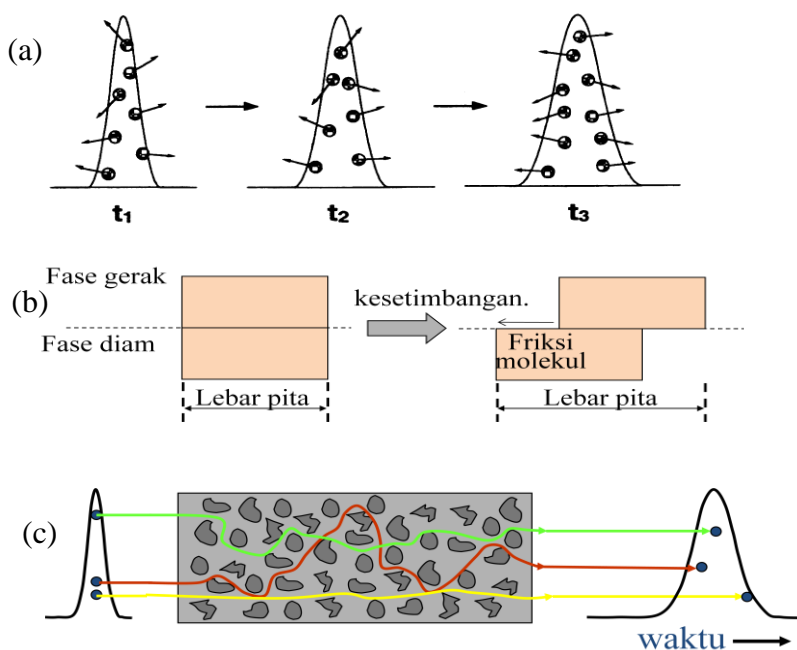


**Gambar 3.2** Hubungan jarak tempuh eluen dengan waktu/lama pengembangan pada : pengembangan dimana pergerakan eluen menggunakan pompa (1), pengembangan dimana pergerakan eluen dengan gaya kapilaritas dan menggunakan chamber N jenuh (2), chamber sandwich (3) chamber N tak jenuh (4).

Terjadinya pelebaran pita atau noda dari solut disebabkan oleh ketidakmerataan diameter dari partikel fase diam yang menyebabkan perbedaan dorongan kapiler, yang secara otomatis akan menghasilkan kecepatan aliran yang tidak merata dari fase gerak saat melalui pipa kapiler. Efek difusi longitudinal terjadi karena zat terlarut (solut) yang berada ditengah konsentrasinya

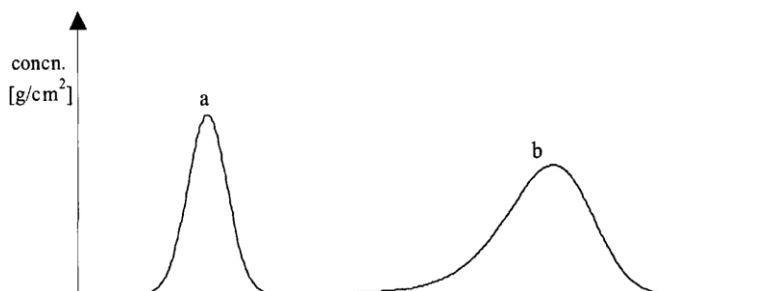
lebih besar dibandingkan solut yang berada di pinggir/tepi sehingga solut cenderung berdifusi dari tengah ke pinggir sehingga pita kromatografi menjadi melebar.

Efek tahanan alih massa berlangsung secara terpisah dalam fase diam dan gerak. Efek ini dapat terjadi karena adanya beberapa alasan yaitu friksi molekul solut oleh fase diam merupakan gaya yang melawan pergerakan fase gerak. Hal ini menyebabkan perlambatan pergerakan solut yang akan menghasilkan perluasan pada noda kromatografi.



**Gambar 3.3** Faktor-faktor yang mempengaruhi perluasan noda : efek difusi longitudinal (a), tahanan alih massa (b) dan difusi eddy (c)

Fenomena lain yang diamati dari fase gerak yang mengalir adalah efek difusi dimana molekul-molekul yang bersentuhan dengan padatan sorben fase diam bergerak lebih lambat, dibanding solut yang melewati pori-pori sorben fase diam, yang pemindahannya lebih cepat. Hal ini mengakibatkan perbedaan kecepatan pergerakan solut di tiap-tiap titik pada fase diam KLT. Efek difusi eddy hanya disebabkan oleh ukuran partikel dan keseragaman ukuran partikel fase diam dan tidak dipengaruhi oleh kecepatan alir dari fase gerak. Adanya perbedaan distribusi massa tersebut menimbulkan perluasan noda pada kromatografi (gambar 3.4).



**Gambar 3.4** Contoh puncak simetris (a) dan puncak tidak simetris (berekor) karena adanya pelebaran pita (b)

#### 1.4. Persamaan Van Deemter

Ukuran Perluasan noda pada kromatografi diperkenalkan dalam bentuk kuantitas H (HETP = jarak setara pelat teori). Salah satu hubungan kromatografi yang paling penting, yaitu persamaan Van Deemter. Persamaan ini berupaya untuk memperkirakan kontribusi relatif dari eddy dan difusi molekular, dan efek transfer massa terhadap H. Ini adalah persamaan empiris, awalnya dtujukan untuk teknik kromatografi kolom tetapi berlaku juga untuk kromatografi lapis tipis.

Persamaan Van Deemter dapat ditulis dalam,

$$HETP = H_A + H_B + H_c$$

Dimana  $H_A$  ,  $H_B$  dan  $H_c$  adalah nilai HETP karena adanya efek difusi eddy, difusi logitudinal dan tahanan alih massa yang dihubungkan dengan kecepatan alir ( $v$ ). Bila:

$$H_A = A$$

$$H_B = B/v$$

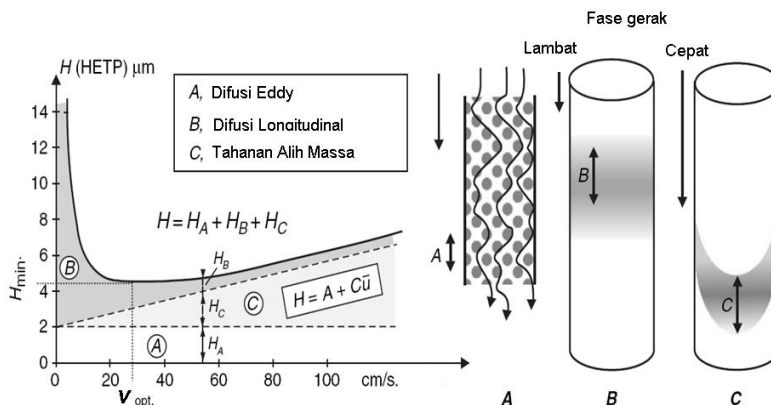
$$H_c = C \cdot v$$

maka

$$HETP (H) = A + (B/v) + Cv$$

di mana  $v$  adalah kecepatan aliran fase gerak dan A, B, dan C adalah konstanta efek difusi eddy, difusi logitudinal dan tahanan alih massa. Konstanta B dan C dipengaruhi oleh kecepatan alir fase gerak sedangkan konstanta A hanya dipengaruhi oleh ukuran partikel dan keseragaman ukuran partikel fase diam. Nilai  $H_B$  akan semakin baik (kecil) dengan memperbesar kecepatan alir fase

gerak. Nilai  $H_c$  akan semakin baik (kecil) dengan memperkecil kecepatan alir fase gerak.



**Gambar 3.5** Kurva persamaan Van Deemter

## 2.Efisiensi Sistem Kromatografi

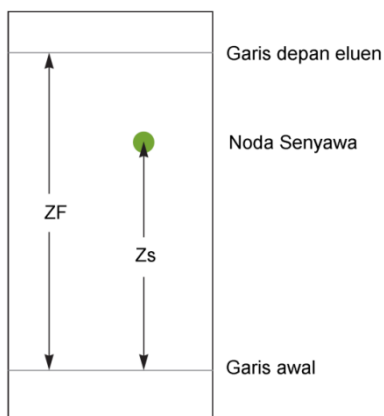
### 2.1 Teori Dasar

Faktor retardasi (*Retardation faktor*= $R_f$ ) adalah parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT. Nilai  $R_f$  merupakan parameter yang menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi.

Penentuan harga  $R_f$  analit, yaitu membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak/eluen (Gambar 3.6). Retardasi faktor dapat dihitung sebagai rasio :

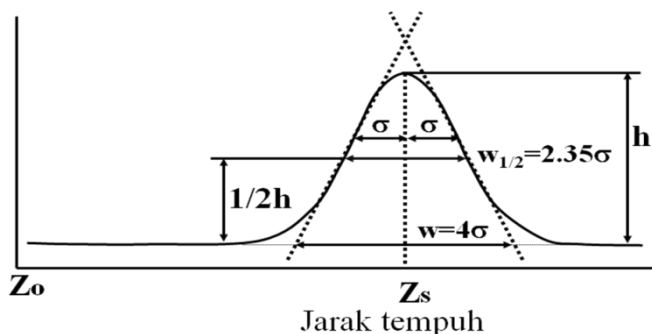
$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi analit}}{\text{Jarak migrasi eluen}} = \frac{Z_s}{Z_f}$$

Nilai  $R_f$  berkisar antara 0 dan 1 dan nilai  $R_f$  terbaik antara 0,2- 0,8 untuk deteksi UV dan 0,2-0,9 untuk deteksi visibel serta 20-80 untuk  $R_f$  relatif pada deteksi UV. Pada  $R_f$  kurang 0,2 belum terjadi kesetimbangan antara komponen senyawa dengan fase diam dan fase gerak sehingga bentuk noda biasanya kurang simetris. Sedangkan pada  $R_f$  diatas 0,8 noda analit akan diganggu oleh absorbansi pengotor lempeng fase diam yang teramati pada visualisasi dengan lampu UV. Sedangkan pada deteksi visibel  $R_f$  dapat lebih tinggi dari deteksi UV, hal ini disebabkan pengotor fase diam tidak bereaksi dengan penampak noda sehingga noda yang berada pada  $R_f$  0,2 – 0,9 masih dapat diamati dengan baik. Dengan mengontrol kondisi pengembangan seperti kejenuhan chamber, komposisi campuran pelarut yang konstan, temperatur konstan dan lain-lain akan didapat nilai  $R_f$  yang reproduibel.



**Gambar 3.6** Ilustrasi migrasi analit dan eluen pada lempeng KLT

Selama proses pengembangan kromatografi berlangsung, solut menyebar membentuk profil gaussian (gambar 3.7)



**Gambar 3.7** Profil Puncak Gaussian

Dari profil puncak gaussian dapat ditentukan lebar dasar puncak ( $w$ ) dan jarak tempuh senyawa ( $Z_s$ ). Nilai-nilai tersebut yang dijadikan dasar penentuan efisiensi kromatografi.

## 2.1 Parameter Efisiensi Kromatografi

Pemilihan kondisi analisis yang akan digunakan dapat dilihat berdasarkan penilaian parameter efisiensi sistem kromatografi. Adapun parameter yang menentukan efisiensi kromatogram tersebut, antara lain: resolusi ( $R_s$ ), nilai *theoretical plate*/Lempeng teori ( $N$ ), nilai HETP (*height equivalent of teoritical plate*) dan waktu analisis ( $t$ ).

- a. Resolusi ( $R_s$ ) merupakan kemampuan kondisi analisis untuk memisahkan dua senyawa dalam sampel. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:



$$R_s = \frac{2 [(Z)_A - (Z)_B]}{W_A + W_B}$$

dimana:

$R_s$  = pemisahan antara dua puncak kromatogram (zat A dan zat B),

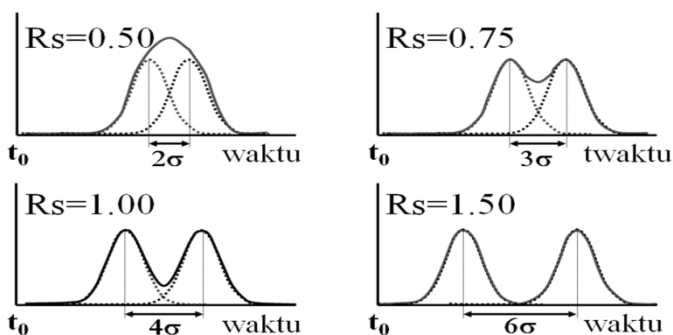
$(Z)_A$  = jarak migrasi zat A,

$(Z)_B$  = jarak migrasi zat B,

$W_A$  = lebar dasar puncak zat A,

$W_B$  = lebar dasar puncak zat B.

Resolusi analit dengan zat lain sebaiknya lebih dari 1,5. Semakin besar nilai resolusi semakin baik pemisahan yang terjadi (gambar 3.8). Apabila resolusi kromatografi kecil yaitu kurang dari 1,5 maka metode tersebut perlu dilakukan evaluasi kondisi analisis yang digunakan.



**Gambar 3.8** Kromatogram dengan berbagai nilai resolusi

- b. Nilai *theoretical plate*/Lempeng teori ( $N$ ) merupakan nilai atau angka pelebaran zona yang menunjukkan satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$N = 16 \left[ \frac{Z_s}{W} \right]^2$$

dimana:

- $N$  = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,  
 $W$  = lebar dasar puncak,  
 $Z_s$  = jarak migrasi analit.

- c. Nilai HETP (*height equivalent of teoritical plate*) atau JSTP (Jarak Setara Pelat Teori) merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam. Secara matematik dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$\text{HETP} = \left[ \frac{Z_f}{N} \right]^2$$

dimana:

- HETP = jarak tempuh/migrasi analit untuk satu kali kesetimbangan dalam fase diam dan fase gerak,  
 $N$  = nilai pelebaran zona untuk satu kali kesetimbangan analit dalam fase gerak dan fase diam,

$Z_f$  = jarak migrasi fase gerak.

Kondisi analisis pada KLT-Densitometri sebelum dapat digunakan dalam proses analisis perlu dilakukan optimasi. Optimasi dilakukan agar didapatkan hasil pengukuran yang akurat.

Satuan jarak tempuh eluen maupun jarak tempuh analit dapat menggunakan satuan millimeter atau satuan nilai  $R_f$  pada densitogram (kromatogram yang diperoleh dari Densitometer)

#### **Pertanyaan-pertanyaan :**

1. Apakah penyebab terjadinya pelebaran pita/noda? Dan bagaimana hubungannya dengan Jarak Setara Pelat Teori (H) dan flow rate ( $v$ ) sesuai persamaan Van Deemter?
2. Dari data kromatogram dibawah ini manakah kromatogram yang paling efisien? Dilihat dari nilai  $R_s$ ,  $N$  dan  $H$

Kromatogram	Puncak	Star $R_f$	Max $R_f$	End $R_f$	$Z_f$
A	1	0,20	0,25	0,30	90 mm
	2	0,25	0,30	0,45	90 mm
B	1	0,34	0,41	0,42	90 mm
	2	0,44	0,49	0,56	90 mm

Jawab :

Kromatogram A

$$R_s = \frac{2[0,30 - 0,25]}{[0,30 - 0,20] + [0,45 - 0,25]} = 0,33$$

$$N_1 = \frac{16[0,25]^2}{[0,30 - 0,20]^2} = 100$$

$$N_2 = \frac{16[0,45]^2}{[0,45 - 0,25]^2} = 81$$

$$\text{HETP}_1 = \frac{90}{100} = 0,90$$

$$\text{HETP}_2 = \frac{90}{81} = 1,11$$

Kromatogram B

$$R_s = \frac{2[0,60 - 0,41]}{[0,42 - 0,34] + [0,65 - 0,55]} = 0,21$$

$$N_1 = \frac{16[0,41]^2}{[0,42 - 0,34]^2} = 420,25$$

$$N_2 = \frac{16[0,60]^2}{[0,65 - 0,55]^2} = 576$$

$$\text{HETP}_1 = \frac{90}{420,25} = 0,214$$

$$\text{HETP}_2 = \frac{90}{576} = 0,156$$

Kromatogram yang efisien adalah kromatogram B karena Nilai resolusi  $>1,5$  , Nilai N besar dan nilai HETP kecil.

3. Pada analisis dengan KLT dengan panjang lempeng 10 cm memerlukan waktu analisis 10 menit, hitung waktu analisis bila panjang lempeng dinaikkan menjadi 20 cm!

Jawab :

$$\frac{Z_{f_1}^2}{t_1} = \frac{Z_{f_2}^2}{t_2}$$

$$\frac{10^2}{10} = \frac{20^2}{t_2}$$

$$t_2 = 40 \text{menit}$$

## **BAB 4**

# **Sorben Fase Diam KLT**

Pemilihan fase diam pada KLT didasarkan pada sifat fisika kimia komponen sampel yang akan dipisahkan meliputi polaritas, kelarutan, kemampuan mengion, berat molekul, bentuk dan ukuran analit. Sifat fisika kimia tersebut berperan penting dalam menentukan mekanisme pemisahan dalam KLT. Sorben fase diam pada KLT dapat berupa senyawa anorganik maupun organik. Sorben anorganik misalnya aluminium oksida, silikon oksida, magnesium karbonat, kalsium karbonat, dan lain-lain. Sedangkan sorben organik misalnya pati dan selulosa. Partikel-partikel sorben berbentuk butiran halus tersebut dilapiskan pada penyangga padat seperti pelat kaca, plastik atau aluminium.

Silika gel adalah sorben yang paling populer (64%), diikuti oleh selulosa (9%), dan alumina (3%). Sejak 1973 silika gel merupakan sorben yang paling banyak digunakan, tetapi perubahan yang nyata telah terjadi dengan munculnya sorben dengan fase kimia terikat yang telah membuka berbagai kemungkinan baru

pemisahan. Fase diam yang lebih baru tersebut cenderung digunakan untuk mengatasi masalah pemisahan dimana resolusi komponen sampel adalah kecil atau komponen sampel tidak dapat terpisah. Dalam penentuan pemilihan sorben dapat merujuk pada kumpulan pustaka tentang KLT yang terdapat dalam bibliografi (camag). Selain itu informasi dasar dalam Tabel 4.1 juga dapat membantu memastikan apakah sorben optimal untuk jenis pemisahan yang dipilih.

Bila prinsip pemisahan berdasarkan polaritas komponen sampel maka dalam pemilihan sorben perlu dipertimbangkan kelarutan komponen sampel apakah hidrofilik atau hidrofobik, apakah bahan bersifat basa, asam ataupun netral dan apakah sampel dapat bereaksi dengan sorben atau eluen.

Berdasarkan pertimbangan polaritas komponen sampel, sorben dapat dikelompokkan sebagai berikut :

- Sorben untuk sampel bersifat lipofilik digunakan aluminium oksida, silika, asetylated cellulose, poliamida,
- Sorben untuk sampel bersifat hidrofilik digunakan selulosa, selulosa penukar ion, kieselguhr, poliamide and silika fase terbalik yang dimodifikasi.

Beberapa sorben di atas hanya tersedia dalam bentuk lempeng siap pakai. Apabila ada keraguan, dapat dilakukan studi pendahuluan pada masing-masing lempeng untuk mendapatkan pemisahan yang diinginkan.

Tabel 4.1. Pilihan KLT optimal / sorben HPTLC untuk senyawa dan kelas senyawa

SORBENT	SENYAWA YANG DIPISAHKAN
Silika gel Aluminium oksida	Semua kelas senyawa. Dasar senyawa (alkaloid, amina, dan lain-lain.), Steroid, terpen, hidrokarbon aromatik dan alifatik.
Selulosa	Asam-asam amino dan turunannya, makanan pewarna (asam dan dasar), karbohidrat.
Kieselguhr	Karbohidrat, aflatoksin, herbisida, tetrasiklin.
Poliamid	Fenol, flavonoid, senyawa nitro.
Amino-terikat silika gel	Sangat baik untuk karbohidrat, asam sulfonat, fenol, asam karboksilat, nukleotida, nukleosida.
Siano-terikat silika gel	Banyak kelas senyawa, terutama baik untuk pestisida, steroid, pengawet.
Diol-terikat silika gel Fase terbalik (RP 2, RP 8, RP 18) silika gel	Cocok untuk steroid dan hormon Meningkatkan pemisahan untuk banyak kelas senyawa seperti steroid, hormon, tetrasiklin, ftalat, antioksidan, lipid, barbiturat, capsaicin, aminofenol, asam lemak.
Silika gel-Kiral	Enantiomer asam amino, halogenasi, N-alkil, dan metil-amino-asam, peptida sederhana, asam-hidroksikarboksilat (katekolamin).
Silika Gel diimpregnasi dengan perak nitrat	Lipid, termasuk variasi jenuh dan isomer geometrik.
Silika gel diimpregnasi dengan kafein	Selektif untuk hidrokarbon poliaromatik.
Silika gel diimpregnasi dengan asam borat / fosfat	Selektif untuk karbohidrat.



Tabel 4.2. Data material sorben dan macam material pendukungnya

Material sorben	Material pendukung
Aluminium oksida 60, 150	Aluminiumfoil, Kaca, Plastik
Selulosa (tanpa modifikasi)	Aluminiumfoil, Kaca, Plastik
Selulosa terasetilasi	Kaca, Plastik
Silika gel 40	Kaca
Silika gel 60	Aluminiumfoil, Kaca, Plastik
Kieselguhr	Aluminiumfoil, Kaca
Lichrospher Si 60	Kaca
Si 50000	Kaca
Si 60 RAMAN	Aluminiumfoil
Silika gel dengan modifikasi	Kaca
CHIR (pemisahan senyawa kiral)	Kaca
CN (cyano)DIOL	Kaca
NH <sub>2</sub> (amino)	Aluminiumfoil, Kaca
Silika gel impregnasi kafein	Kaca
Silika G impregnasi amonium sulfat	Kaca
Silika gel tersilanisasi (RP-2), (RP-8), RP-18	Kaca Aluminiumfoil, Kaca
Sorben campuran	
Aluminium oksida/selulosa terasetilasi	Kaca
Selulosa/silika	Kaca
Selulosa 300 DEAE/selulosa 300HR	Kaca
Silika gel 60/kieselguhr	Aluminiumfoil, Kaca
Sorben dua area	
Si 50000(conc), silika gel 60 (sep)	Aluminiumfoil, Kaca
Si 50000(conc), RP-18 (sep)	Kaca
Kieselguhr (conc), silika gel 60 (sep)	Kaca
Silika gel 60, RP-18	Kaca
Sorben spesial	
IONEX (ion exchange resin)	Plastik
Poliamida 6	Plastik
Poliamida 11	Aluminiumfoil, Kaca

Keterangan :

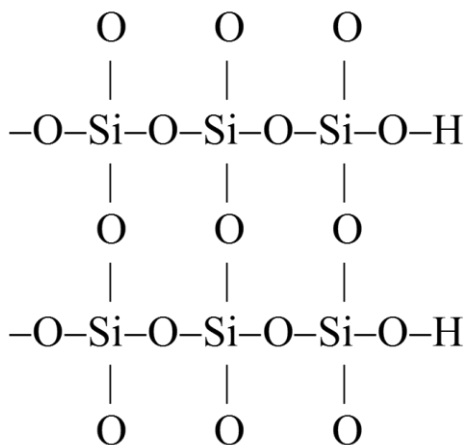
conc = zona konsentrasi

sep = zona pemisahan

## 1. Sorben Silika

### 1.1. Silika Gel Tanpa Modifikasi

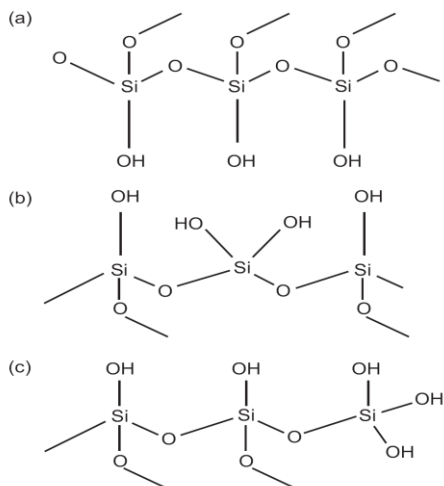
Silika gel biasa disebut asam silisik dan kieselgel, merupakan material putih amorf dan berporus. Umumnya dibuat dengan pengendapan larutan silikat dengan penambahan asam. Silika merupakan bahan yang berpori tinggi, merupakan silikon dioksida, tiap atom silikon dikelilingi empat atom oksigen, bentuk tetrahedron. Pada permukaan silika gel, pasangan elektron bebas dari atom oksigen berikatan dengan hydrogen. Cara pengendapan dan kondisi pengerjaan akan menggambarkan sifat khusus dari sebuah silika. Kondisi pembuatan mempengaruhi silika gel yang dihasilkan baik itu permukaan yang spesifik, volume pori yang spesifik, diameter rata-rata pori yang seragam dan lain-lain.



**Gambar 4.1** Struktur silika gel

Struktur ini dibentuk bersama oleh ikatan silikon dan oksigen, disebut kelompok siloksan. Kelompok hidroksil pada permukaan menyebabkan adanya sifat adsorptif dari silika gel yang dapat memberikan karakteristik pemisahan yang unik. Situs aktif pada permukaan silika gel ini dapat bervariasi sesuai dengan lingkungan tempat silika gel berada. Tiga jenis gugus hidroksil yang mungkin seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Jenis yang paling produktif adalah kelompok hidroksil tunggal terikat pada atom silikon, yang terkait dengan matriks silika gel melalui tiga ikatan siloksan. Jenis kedua adalah dimana dua gugus hidroksil yang terikat pada atom silikon tunggal yang biasa disebut gugus hidroksil geminal. Tipe ketiga, yang jauh lebih jarang, adalah ikatan tiga kelompok hidroksil untuk satu atom silikon. Pada kelompok ini hanya satu ikatan mengikat siloksan untuk matriks silika gel.

Adanya permukaan aktif dari silika gel berupa gugus hidroksil akan mengadsorpsi air dengan berbagai cara. Gambar 4.3 menunjukkan bahwa ada cukup banyak cara terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus hidroksil permukaan silika gel dengan air. Hidrasi air pada KLT silika gel terjadi sekitar 11-12% ketika kelembaban relatif 50% pada 20°C.



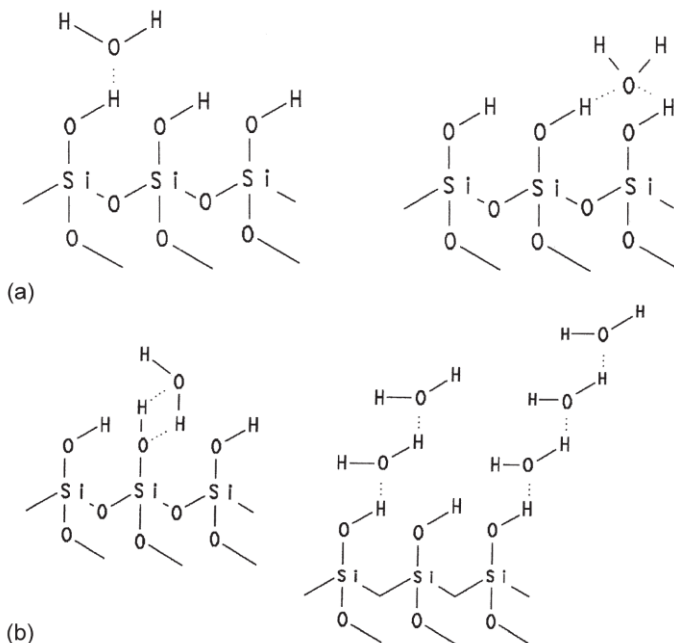
**Gambar 4.2.** Silika gel jenis permukaan gugus hidroksil (a) monohidroksil (tunggal), (b) dihidroksil (geminal), (c) trihidroksil

Lempeng silika gel siap pakai dapat langsung digunakan tanpa adanya aktivasi lempeng. Aktivasi lempeng hanya diperlukan jika lempeng KLT berada pada ruangan dengan kelembaban tinggi. Aktivasi dilakukan dengan memanaskan lempeng sampai  $105^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit diikuti dengan pendinginan dalam ruangan dengan kelembaban relatif 40-50%.

Silika merupakan sorben yang paling penting dalam KLT. Meskipun pemakaian sorben ini bermasalah pada senyawa tertentu karena untuk beberapa bahan yang sangat sensitif, sorben yang kurang aktif lebih diperlukan untuk mencegah penguraian.

Sifat sintetis dari silika gel untuk kromatografi memungkinkan pengaturan ukuran pori, volume pori dan ukuran partikel. Ukuran pori-pori bervariasi 40-150 °A untuk lempeng KLT komersial dengan satu pengecualian yaitu ukuran pori 5000°A untuk aplikasi khusus. Kisaran ukuran partikel silika gel untuk KLT biasanya 5 - 40 mm dengan rata-rata keseragaman 10-15 mm tergantung pada produsennya. Ukuran partikel memiliki dampak yang besar pada resolusi komponen sampel. Jadi dalam KLT, seperti dalam HPLC, mengurangi ukuran partikel akan menurunkan JSTP (Jarak setara pelat teori) sehingga meningkatkan efisiensi. Seperti diilustrasikan dalam Gambar 4.4, ketika partikel silika gel yang lebih kecil dari 5 - 6µm digunakan untuk preparasi KLTKT, resolusi yang dihasilkan semakin meningkat.

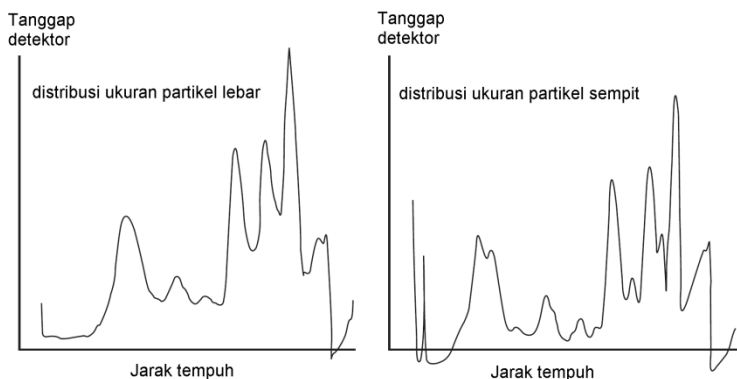
Ukuran pori mempengaruhi selektivitas dan karenanya dapat digunakan untuk mengubah tingkat migrasi dan resolusi komponen sampel. Ukuran pori yang paling umum digunakan dalam KLT adalah 40, 60, 80, 100 ° A, dan silika gel 60°A adalah ukuran yang paling populer. Silika gel 60°A (biasa disebut silika gel 60) telah direkomendasikan untuk berbagai pemisahan seluruh industri dan lembaga penelitian. Besarnya kadar air berperan penting dalam retensi analit pada lempeng kromatografi. Oleh karena itu pada analisis KLT sangatlah penting untuk mempertahankan kelembaban udara yang teradsorpsi oleh silika gel.



**Gambar 4.3** (a) Cara di mana ikatan hidrogen air kepada kelompok hidroksil permukaan gel silika, (b) Pembentukan multi-lempeng air hidrogen terikat

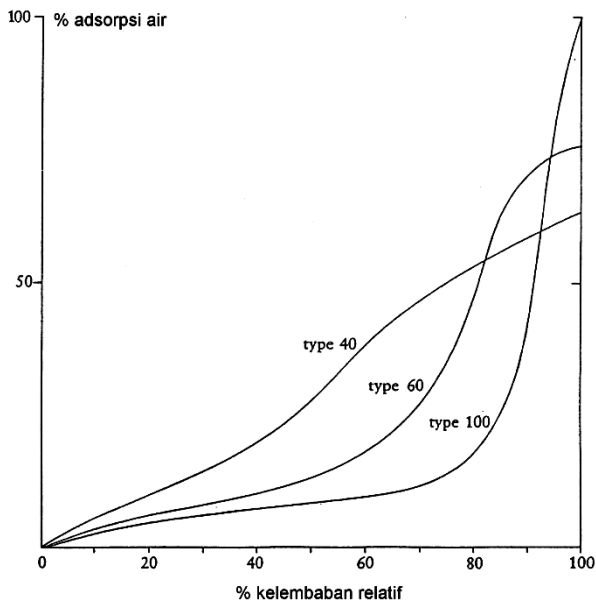
Pada Gambar 4.5 kurva adsorpsi air ditunjukkan untuk berbagai ukuran pori-pori silika gel, 40, 60 dan 100°A. Pada tingkat kelembaban normal di sebagian besar laboratorium (kelembaban relatif 40-60%), variasi dalam penyerapan kelembaban dengan silika gel 60°A memiliki pengaruh paling kecil pada tingkat migrasi komponen sampel. Perubahan adsorpsi air karena perubahan-perubahan kecil dalam kelembaban relatif untuk gel silika 40°A sebesar 20-40% pada rentang kelembaban 40-60%

RH (gambar 4.5). Hal ini akan mempengaruhi tingkat migrasi dari komponen sampel, meskipun dikontrol dengan hati-hati.



**Gambar 4.4** Pengaruh distribusi ukuran partikel pada pembuatan silika gel terhadap resolusi pemisahan kromatografi yang dihasilkan.

Perbedaan kelembaban dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan pemisahan, meskipun juga dapat menjadi sumber masalah sehubungan dengan kepresisian hasil. Sedangkan untuk sorben silika gel  $100^{\circ}\text{A}$  meskipun kelembaban tidak banyak mempengaruhi adsorpsi air oleh sorben, tetapi pada senyawa dengan polaritas kecil akan menyebabkan rendahnya kecepatan migrasi.



**Gambar 4.5** Adsorpsi isoterm Air oleh silika gel 40 60 dan 100°A

Karena variasi kadar air dengan kelembaban relatif jelas ada, Skodder dan Brockmann memperkenalkan skala untuk mengkarakterisasi berbagai silika gel (lihat Tabel 4.3). Dalam hal ini silika gel dinilai dari skala I sampai V. Hal ini dirancang untuk mengkarakterisasi silika gel sesuai aktivitas mereka atau selektivitas kromatografi sebagai perubahan air teradsorpsi. Dengan meningkatnya kadar air, lempeng kromatografi menjadi lebih polar dan zat terlarut yang ditolak ke lempeng menunjukkan peningkatan migrasi meskipun tidak ada



pengkondisian lempeng yang dilakukan sebelum pengembangan KLT.

**Tabel 4.3** Skala aktivitas gel silika menurut kadar air oleh Brockmann dan Schodder

<b>KELEMBAPAN RELATIF</b>	<b>0%</b>	<b>20%</b>	<b>40%</b>	<b>60%</b>	<b>80%</b>
Silika gel 40 A	I	II	III	VI - V	>V
Silika gel 60 A	I -II	II	III	III - VI	V
Silika gel 80 A	II	II -III	III	III - VI	IV

**Tabel 4.4** Variasi karakteristik fisik dari silika gel berdasarkan diameter pori-pori

<b>SORBENT</b>	<b>PORI-PORI VOLUME (<math>\text{ml g}^{-1}</math>)</b>	<b>PERMUKAAN AREA SPESIFIK (BET) (<math>\text{m}^2 \text{g}^{-1}</math>)</b>	<b>PH OF 10% w/v SUSPENSI AQUA</b>
Silika gel 40	0.65	650	5.5
Silika gel 60	0.75	500	7.0
Silika gel 100	1.00	400	7.0

Perubahan diameter pori juga akan menyebabkan perubahan selektivitas. Sebagai aturan umum zat terlarut berpindah lebih cepat dengan silika gel 40 dan lebih lambat dengan silika gel 100 dibandingkan dengan gel silika 60. Hal ini terjadi karena efek dari variasi polaritas berbagai jenis silika gel. Karakteristik fisik silika gel lebih lanjut ditunjukkan pada Tabel 4.4 dan 4.5.

KLT silika gel sangat fleksibel sehingga dipakai pada berbagai aplikasi. Pelarut campuran terdiri dari pelarut non-polar (misalnya heksana atau sikloheksana) dan pelarut polar (misalnya metanol, asetonitril atau air). Konstituen dapat digunakan tanpa mempengaruhi sorben lempeng kromatografi atau pengikat sorben (gambar 4.6). Penambahan asam (misalnya asetat, propionat atau asam format) atau basa (misalnya larutan amonia, piridin atau amina) ke dalam eluen seringkali digunakan untuk meningkatkan resolusi maupun memperbaiki bentuk noda yang dihasilkan (seperti gambar 4.7 dan 4.8).

Tabel 4.5 Karakteristik silika gel standar dan kemurnian tinggi

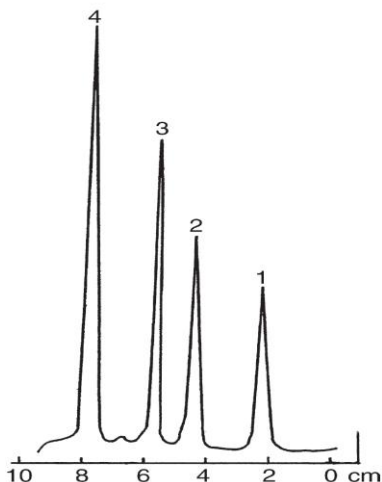
<b>Karakteristik silika gel</b>			
Diameter pori	: 60Å		
Volume pori	: 0.75 ml/g		
Permukaan spesifik (BET)	: ~ 500 m <sup>2</sup> /g		
pH 10% suspensi cair	: 7.0		
Parameter	Tingkat Silika		
	Standar	Kemurnian tinggi	Preparatif
Ukuran partikel ( µm)	2 - 20	3 – 20	5 - 50
Kandungan max. besi	0.02%	0.002%	0.02%
Kandungan max. klorida	0.02%	0.008%	0.02%

Untuk mendapatkan sorben dengan karakteristik tertentu perlu diperhatikan reproduibilitas pembuatan pada masing-masing batch, yang harus dikontrol dengan hati-hati mulai dari kondisi

pembuatan dan proses penggilingan menjadi partikel dengan ukuran yang sesuai untuk KLT. Perubahan distribusi ukuran partikel dapat menyebabkan timbulnya variasi pada hasil pemisahan.



**Gambar 4.6** Pemisahan kortikosteroid pada silika gel 60  
 Lempen sorben : KLTKT silika gel 60 F254 kaca (Merck)  
 Fase gerak : kloroform/metanol (93 + 7 v/v)  
 Deteksi : 0,5% w/v tetrazolium biru dalam metanol  
 Zona : 1, prednisolon; 2, hidrokortison; 3, prednison; 4, kortison; 5, kortikosteron; 6, kortexolon; 7, 11-dehidrokortikosteron; 8, 11-desoksikortikosteron (dari  $R_f$  terendah)  
 Konsentrasi : 20 ng per zat



**Gambar 4.7** Pemisahan flavonoid  
 Sorben : KLTKT silika gel 60 kaca (*Merck*)  
 Fase gerak : etil asetat/air/asam format (85 + 15 + 10 v/v)  
 Deteksi : 1% w/v asam difenilborat-2-aminoetil ester dalam metanol  
 Puncak : 1, rutin; 2, hiperosid; 3, kuersitrin; 4, kuersitin  
 Konsentrasi ; 30 ng per zat  
 Scanning : spektrodensitometri fluoresensi, eksitasi pada 436 nm dan emisi pada 546 nm

### Silika G

Silika G mengandung 13% gipsum sebagai pengikat dan telah diaplikasikan untuk pemisahan dari sejumlah komponen-komponen organik. Gipsum digunakan sebagai pengikat untuk meningkatkan sifat adhesif dari sorben anorganik. Sorben tanpa menggunakan gipsum sudah umum digunakan. Pemilihan sorben tanpa pengikat ini didasarkan adanya fakta bahwa gipsum dapat

mengganggu pemisahan dari komponen-komponen atau mengganggu visualisasi noda.

Kualitas pemisahan pada lempeng yang mengandung gypsum, pada beberapa kasus lebih baik daripada lempeng yang tidak mengandung gypsum. Fakta ini yang mendasari untuk menambahkan gipsum termasuk silika G-HR yang mempunyai tingkat kemurnian yang tinggi. Pemisahan pada lempeng silika G-HR merupakan pemisahan yang sempurna untuk aflatoksin.

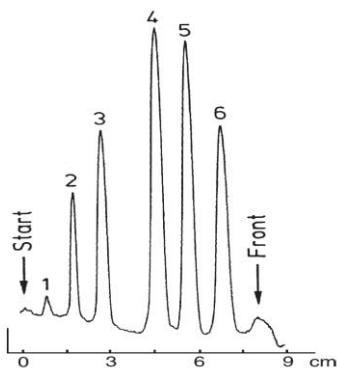
Penyiapan suspensi silika, lebih baik untuk tidak menambahkan sejumlah air pada silika di dalam satu tahap, tapi secara *geometric dillution* (penambahan sedikit demi sedikit). Pertama aduk silika dengan sedikit air hingga terbentuk pasta, kemudian tambahkan sisa air pada pasta sedikit demi sedikit.

### **Silika N**

Silika N tidak mengandung pengikat anorganik maupun pengikat organik. Adhesi lempeng hanya dapat digunakan untuk beberapa eluen, sedikit pemisahan pada sorben dari pendukung dapat terjadi di bagian tengah dari lempeng. Sebaliknya, Silika G tingkat N sangat cocok untuk KLT anorganik. Preparasi suspensi tidak perlu digunakan dengan segera. Sebelum digunakan, lempeng baru yang akan dilapisi, dikeringkan di udara dan diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit.

### Silika Kemurnian tinggi

Silika kemurnian tinggi dibuat dari silika standar dengan tahapan pencucian pengotor anorganik dengan asam dan air demineralisasi. Sisa dari pengotor anorganik (terutama komponen besi) sangat sedikit, sehingga tidak mengganggu pemisahan kromatografi dan evaluasi kuantitatif. Pada akhirnya pengotor anorganik hilang oleh eluen sendiri. Ini dapat dicapai oleh kromatografi ascending pada aplikasi sampel (pra pengembangan). Kemurnian dari lempeng juga tergantung pada kemurnian eluen yang dipakai.



**Gambar 4.8** Pemisahan alkaloid

Sorben	: silika gel 60 WF254 kaca (Merck)
Fase gerak	: aseton/toluen/etanol/amonia soln. (25% w/w) (40 + 40 + 6 + 2 v/v)
Visualisasi	: 0,15 % w/v asam heksakloroinat (IV) dalam 3% w/v larutan potasium iodida
Puncak	: 1, narkein; 2, morfin; 3, kodein; 4, tebain; 5, papaverin; 6, narkotin
Konsentrasi	: 1 µg per zat
Deteksi	: reflektansi pada 540 nm

### 1.1.1 Silika Gel Dengan Modifikasi

**Reverse phase.** Silika gel fase terbalik. Modifikasi silika gel yang lain berupa modifikasi dengan alkil. Lempeng silika gel dengan modifikasi alkil akan menghasilkan polaritas terbalik (non polar).

Contoh

Secara tradisional silikon atau minyak parafin telah digunakan untuk menghasilkan fase terbalik yang dilakukan dengan cara impregnasi lempeng. Fase terbalik memiliki keuntungan yaitu dapat digunakan pada pengembangan dengan eluen air hingga 100% dan relatif mudah untuk dipreparasi. Namun, pembuatan lempeng KLT fase balik dengan cara ini dapat mengalami kebocoran fase diam atau pengupasan sorben selama proses kromatografi. Untuk analisis kualitatif, kerugian ini dapat ditolerir. Tetapi pada analisis kuantitatif reproduibilitas hasil di masing-masing titik pada lempeng KLT harus dipenuhi. Lempeng KLT fase balik yang dibuat harus memberikan gangguan latar belakang yang sama dan relatif rendah selama proses deteksi dan tidak mengubah polaritas fase gerak. Masalah ini telah diatasi dengan adanya silika gel modifikasi dengan alkil yang dapat merubah polaritas permukaan silika gel menjadi non polar (fase terbalik).

Silika gel dapat terikat secara kimiawi oleh reaksi dengan organosilan dari berbagai panjang rantai. Dimetil, etil, oktil, undesil, oktadesil dan fenil semuanya telah digunakan secara komersil untuk menghasilkan karbon rantai panjang yaitu C-2, 8, 12, 18 dan cincin aromatik terikat ke matriks siloksan. (contoh

struktur pada gambar 4.9). Semua modifikasi kimia pada format KLT dan KLTKT secara luas tersedia dipasaran. Ikatan dari organosilan ke silika gel dapat dihasilkan dibawah kondisi anhidrous, jika tipe ikatan monolayer, atau bila dibawah kondisi hidrous maka akan terbentuk lempeng polimer.

Pada formasi monolayer, mono, bi- atau tri- fungsional organosilan dapat digunakan dan kemungkinan reaksi dengan permukaan silanol ditunjukkan pada gambar 4.10. Reaksi stoikiometri sebelumnya tergantung pada konsentrasi dari gugus silanol (Si-OH) pada permukaan silika gel, dan dapat dilihat dari persamaan reaksi, hasil dari gugus organik terikat melalui gugus siloksan (Si-O-Si). Hal ini terjadi meskipun modifikasi menghasilkan lempeng mono atau polimer. Formasi dari lempeng polimer dengan adanya air mengawali konversi dari organosilan ke organosilanetriol dengan hidrolisis. Formasi ini mengalami kondensasi dengan permukaan silanol dari silika gel menghasilkan ikatan rangkap pada permukaan.

Dengan fase terikat, hanya gugus silanol bebas pada matriks silika gel dapat dimodifikasi. Tipe dan derajat modifikasi menghasilkan perbedaan hidrofobisitasnya diantara sorben. Pada partisi kromatografi pada urutan dimana fase gerak dan fase diam telah dibalik polaritasnya, perlu diperhatikan bahwa eluen yang digunakan adalah polar, misal asetonitril/air atau metanol/air, tapi tidak begitu polar sehingga permukaan dari fase terikat kembali tidak basah. Sebagai derajat modifikasi permukaan dan

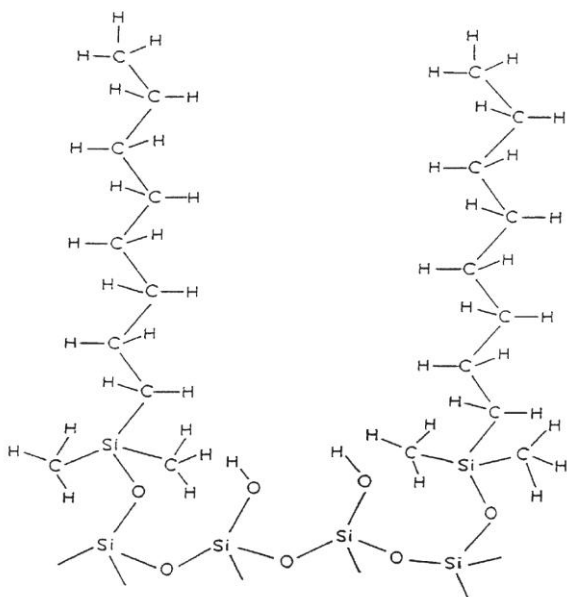


peningkatan panjang rantai alkil, lempeng menjadi lebih hidrofob, dan hanya mungkin menggunakan konsentrasi kecil dari air sebagai penekan tidak diaplikasikan secara normal. Sehingga beberapa secara komersial tersedia RP18 KLTKT dimana silika gel telah disilanisasi secara penuh dan kemungkinan dapat digunakan 25% air dalam pengembangan dengan campuran pelarut.

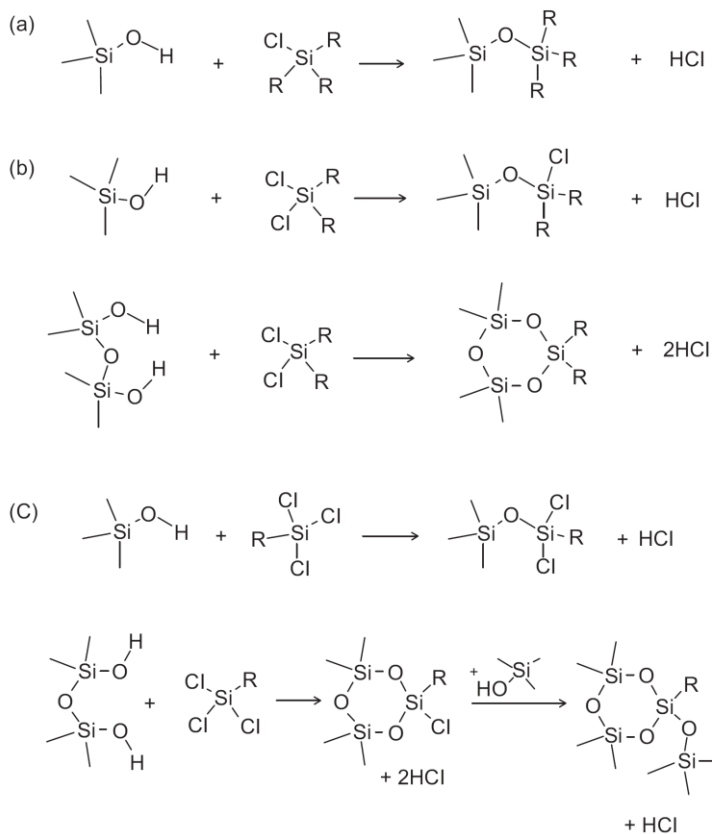
Bagaimanapun dengan mengurangi derajat permukaan rata-rata dari C18 memungkinkan menghasilkan fase toleran air, (misal, RP18W KLTKT dari *Merck*). Secara logika KLT dari silanisasi rendah dapat dihasilkan dengan terbasahi secara total. Bagian terpisah dari silanisasi penuh pada KLTKT RP2, 8 dan 18, jika diperlukan dapat digunakan dengan konsentrasi tinggi dari pelarut air.

KLT fase terbalik sekarang secara luas digunakan untuk berbagai macam aplikasi. Gugus propil mempunyai sifat hidrofilik dan dapat digunakan untuk memisahkan tipe fase terbalik menggunakan eluen polar. Sehingga gugus amino (-NH<sub>2</sub>) polar, kromatografi fase normal juga bisa digunakan dengan eluen yang kurang polar dari silika. Fase menunjukkan banyak cara seperti silika deaktivasi. Aplikasi utama pemisahan fase normal yaitu pada resolusi dan penentuan steroid. Bagaimanapun, penting untuk diingat bahwa fungsi amino sebagai amin primer sehingga secara kimia sangat reaktif. Tergantung pada kondisi sampel dan fase gerak, kemungkinan reaksi yang tidak diinginkan terjadi pada

selama pengembangan, misal keton atau aldehid mungkin bereaksi dengan amin primer dibawah kondisi alkali membentuk basa. Pada sisi yang lain, reaktivitas dari gugus amino dapat dijadikan keuntungan. Sehingga isomer optik dapat segera terikat dibawah kondisi suhu ruang dengan reaksi *in situ* langsung pada KLTKT menghasilkan “Pirkle” tipe kiral fase diam.



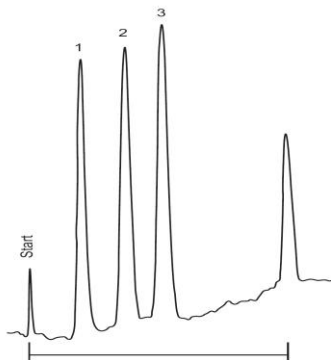
**Gambar 4.9** Ikatan gugus alkil C8 pada permukaan silika gel



**Gambar 4.10** Reaksi antara silika gel dan (a) monofungsional, (b) bifungsional, (c) trifungsional organosilan

Lempeng KLT silika gel dengan gugus amino mempunyai area aplikasi yang unik. Dengan pKa ~9,5-11 untuk gugus amino pada lempeng KLTKT dapat digunakan sebagai penukar anion pada lempeng KLTKT dapat digunakan sebagai penukar anion basa lemah. Lempeng ini telah digunakan pada pemisahan nukleotida, asam mono dan polisulfonat, purin, pirimidin dan

fenol. Eluen yang digunakan campuran alami sederhana dari etanol/ larutan garam, yang memberikan kondisi ideal untuk terjadinya pertukaran ion. Adanya sodium atau litium klorida membantu mencegah interaksi sekunder sehingga memberikan hasil lebih tajam, kurangnya difusi noda atau mengumpulnya kromatogram. Contoh dari pemisahan dari tipe ini ditunjukkan pada gambar 4.11. Ikatana amino pada lempeng silika gel kinerja tinggi memberikan resolusi yang baik.

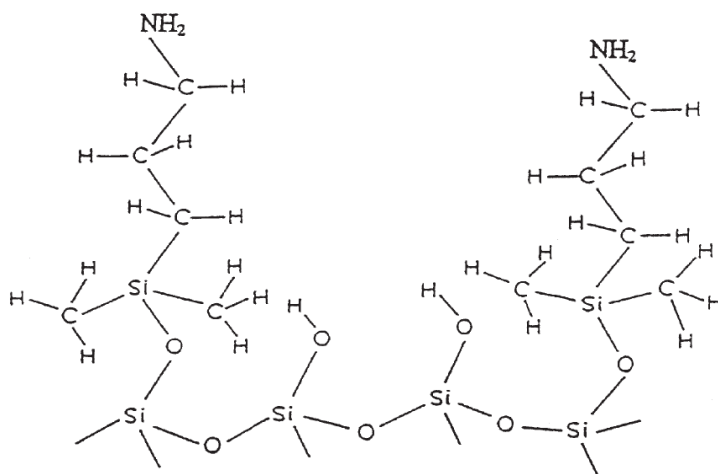


**Gambar 4.11** Pemisahan steroid pada KLTKT RP-18 F254s

Sampel	: 1. Metilestosteron; 2, Reikstein S; 3, hidrokortison
Kuantitas aplikasi	: 200 nl (10 mg/10 ml perzat)
Eluen	: aseton-water 60/40 (v/v)
Jarak migrasi	: 5 cm
Chamber	: normal chamber tanpa penjenuhan
Evaluasi	: UV 254 nm

Pada mekanisme pertukaran ion, kecepatan perpindahan analit dapat dipengaruhi dengan menggunakan larutan garam sebagai eluen dengan konsentrasi yang bervariasi. Hal ini dapat dilakukan dengan mengontrol kondisi pemisahan optimum. Tentunya, perubahan pH juga mempengaruhi pergerakan analit yang dipisahkan oleh pertukaran ion.

Fitur lain yang unik dari lempeng ikatan amino adalah kemampuan mereka untuk menyediakan pereaksi bebas pendeteksi zat kimia tertentu. Proses ini pada dasarnya merupakan termokimia yang terdiri dari pemanasan lempeng KLT setelah pengembangan untuk suhu minimal 150-220 °C.



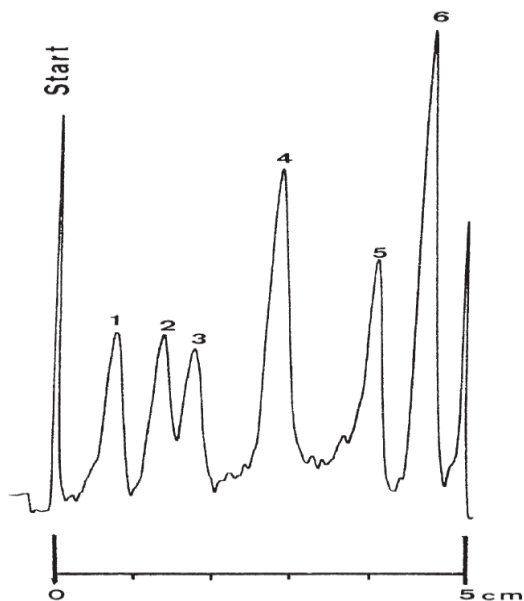
**Gambar 4.12** Gugus aminopropil terikat secara kimia pada permukaan silika gel

Pada paparan sinar UV panjang gelombang pendek atau panjang setelah pemanasan, derivatisasi menunjukkan fluoresensi yang kuat. Teknik ini telah terbukti sangat cocok untuk deteksi fluorimetric karbohidrat katekolamin, hormon steroid, dan asam sulfonik (lihat contoh pada Gambar 4.16-4.18).

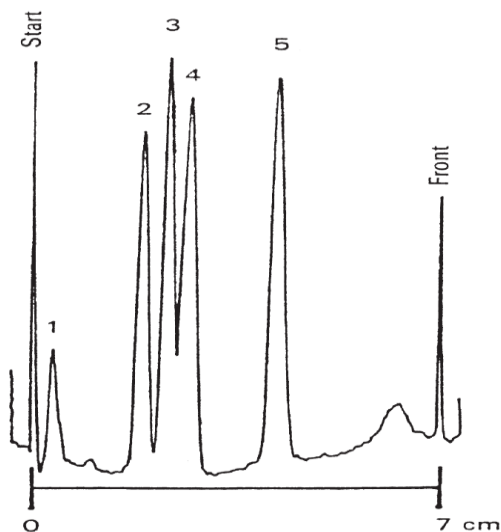
***Cyano-Bonded Phase***, Fase ikatan Siano disiapkan oleh ikatan kimia kelompok cyanopropyl melalui siloksan silika gel. Merupakan sorben terikat alternatif untuk KLT selain amino. Penelitian pertama dari penggunaan siano terikat adalah untuk pemisahan enam aromatik polinuklear. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan kesesuaian lempeng siano untuk pemisahan pewarna lipofilik dan asam amino. Lempeng komersial KLTKT menggunakan silika gel 60 dari Merck telah tersedia dipasaran.

Fase siano mengisi celah di kisaran polaritas fase diam dengan silika gel. Lempeng siano merupakan perantara antara fase terbalik atau fase normal. Oleh karena itu dengan pilihan fase gerak, baik pemisahan fase terbalik atau fase normal dapat dilakukan pada lempeng KLT siano-silika gel. Hal ini ditunjukkan pada gambar 4.18 untuk serangkaian steroid yang dipisahkan dengan dua fase yaitu kondisi fase normal dengan kekuatan pelarut eluen tinggi, dan kondisi fase terbalik dengan kekuatan pelarut eluen rendah. Lempeng siano telah digunakan untuk berbagai macam aplikasi : derivatif benzodiazepin, pestisida, peliat, antibiotik tetrasiklin, fenol, beberapa estrogen, ester asam

galat, alkaloid dan asam sorbat. Contoh pemakaian lempeng KLTKT-NH<sub>2</sub> terdapat pada gambar 4.13-4.16.



**Gambar 4.13 :** Pemisahan nukleotida pada lempeng silika gel-NH<sub>2</sub> (Pemisahan terjadi karena variasi dalam afinitas untuk kelompok PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)  
Sorben lempeng: silika gel F254 NH<sub>2</sub> KLTKT 60  
Eluen : 0,2 M NaCl dalam etanol/air (30/70v/ v)  
Deteksi: UV 254 nm



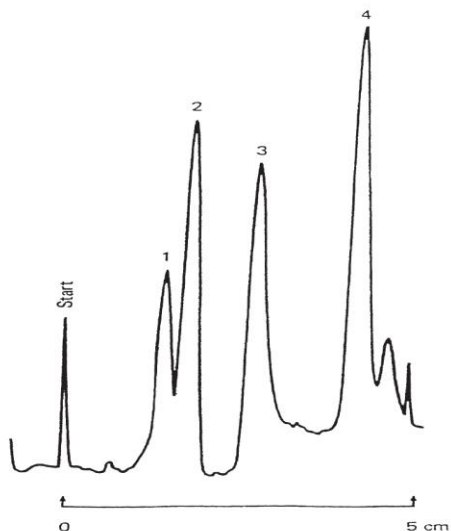
**Gambar 4.14** Pemisahan turunan purin pada KLTKT silikagel 60 NH<sub>2</sub>

Fase gerak	: etanol / air (80 / 20 v / v) jenuh dengan natrium klorida
Aplikasi sampel	: 300 nl 0,1% b / v solusi
Deteksi	: UV 254 nm
Puncak	: 1, asam urat; 2, xantine; 3, hipoksantin; 4, guanin; 5, adenin

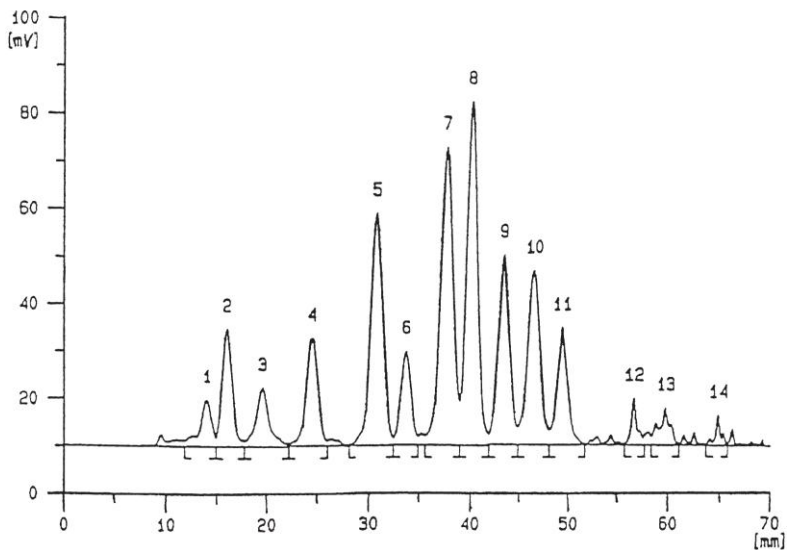
***Diol-Bonded Phase.*** Polaritas fase ikatan-diol ini sangat mirip dengan fase siano. Gambar 4.18 dan 4.19 mengilustrasikan retensi sterol netral pada dua kondisi fase terbalik dan fase normal menggunakan sorben silika gel dengan ikatan diol. Modifikasi silika gel ikatan diol dilakukan dengan menambahkan alkil diol berdampingan dengan kelompok ester terikat melalui siloksan pada permukaan silika gel melalui prosedur silanisasi biasa. Ikatan pada matriks silika pada lempeng silika gel



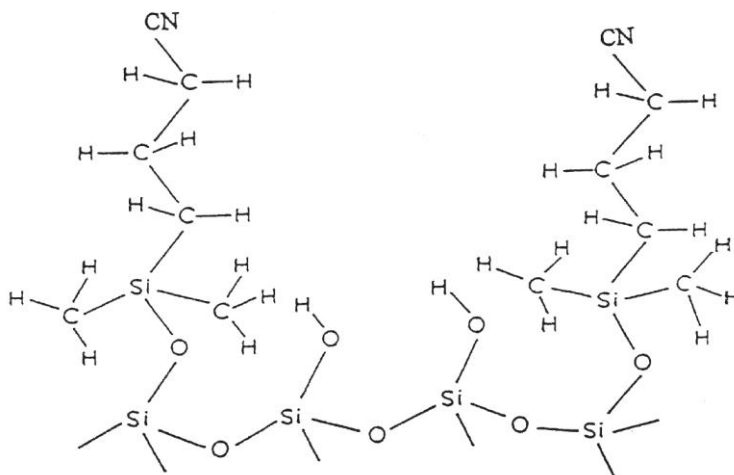
ikatan diol sama seperti lempeng silika gel ikatan-amino seperti pada gambar 4.17.



Gambar 4.15 Pemisahan asam naftalena sulfonat pada KLTKT-NH<sub>2</sub>  
 Fase gerak : etanol / amonia, pH 12 (60 + 40 v/v)  
 +0.18 mM sodium klorida.  
 Aplikasi sampel : 200 nl 0.5% b/v larutan  
 Deteksi : UV 254 nm  
 Puncak : 1. naftalena-1,3,7-asam trisulfonik;  
 2. naftalen-1,3,6-asam trisulfonik; 3.  
 naftalen-1,5-asam disulfonik; 4.  
 naftalen-1-asam sulfonik



**Gambar 4.16** Pemisahan karbohidrat pada KLTKT silika gel- $\text{NH}_2$  gel  
 Fase gerak : AMD gradien berdasarkan asetonitril-aseton-air.  
 Deteksi : UV 366 nm (dipanaskan pada 150-C selama 3-4 menit)  
 Puncak : 1. Maltoheksosa, 2. Maltopentosa, 3. Maltotetrosa, 4. Maltotriosa, 5. Maltosa, 6. Sakarosa, 7. Glukosa, 8. Fruktosa, 9. Silosa, 10. Ramnosa, 11. Deoksiribosa

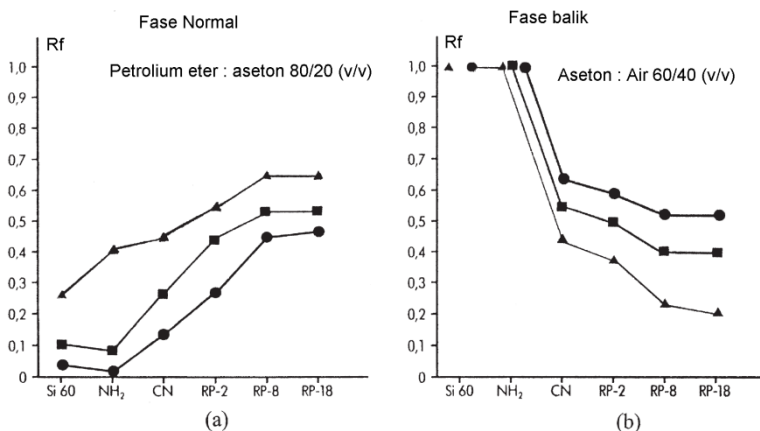


**Gambar 4.17** Kelompok cyanopropyl terikat secara kimiawi terikat pada permukaan silika gel

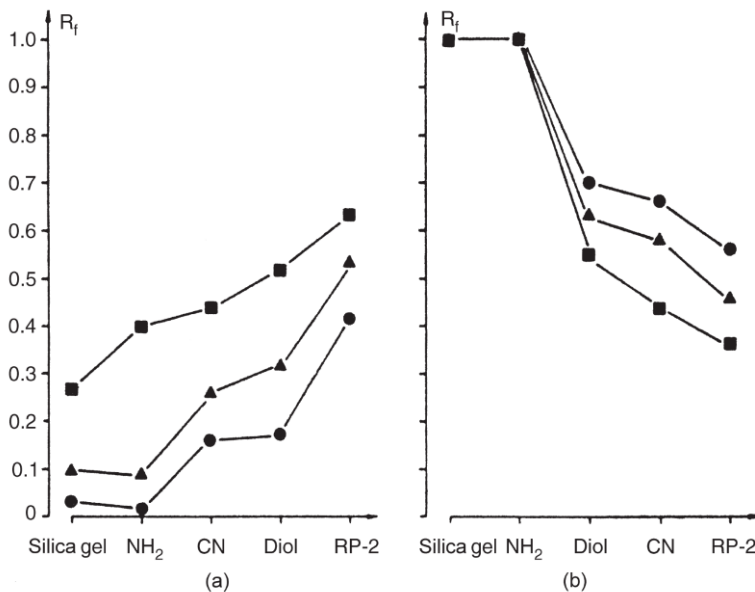
Lempeng yang digunakan pada dasarnya adalah hidrofilik dan seringkali menunjukkan reaksi yang mirip dengan silika gel 60 yang tidak dimodifikasi pada sifat kromatografinya. Bagaimanapun, sebagai mekanisme utamanya adalah partisi fase normal. Retensi dari komponen sampel dapat diprediksi perubahannya. Ada dua perbedaan utama:

1. Golongan hidroksil fase diol mengambil bentuk dari glikol. Silika gel 60 memiliki golongan aktif hidroksil aktif (silanol). Hidroksil berfungsi menentukan retensi, yang dapat mempengaruhi hasil kromatografi.
2. Fungsi diol terikat melalui golongan alkil ester. Hal ini juga dapat mempengaruhi sifat kromatografi. Jadi, sebagai

aturan umum komponen sampel berpindah lebih lanjut pada fase diol sebagai pembanding dengan silika gel 60 untuk bersama-sama mengembangkan pelarut dan jarak migrasi permukaan pelarut.



**Gambar 4.18** Perbandingan pemisahan (nilai Resolusi) KLTKT silika gel tanpa modifikasi dan silika gel dengan modifikasi NH<sub>2</sub>, CN, RP-2, RP-8, RP-18 pada dengan fase normal (a) dan fase terbalik (b) Fase gerak : (a) petroleum eter / aseton (80:20 v/v), (b) aseton/air (60: 40 v / v)  
Senyawa : ● hidrokortison, ■ senyawa Reikstein ; ▲ metiltestosteron

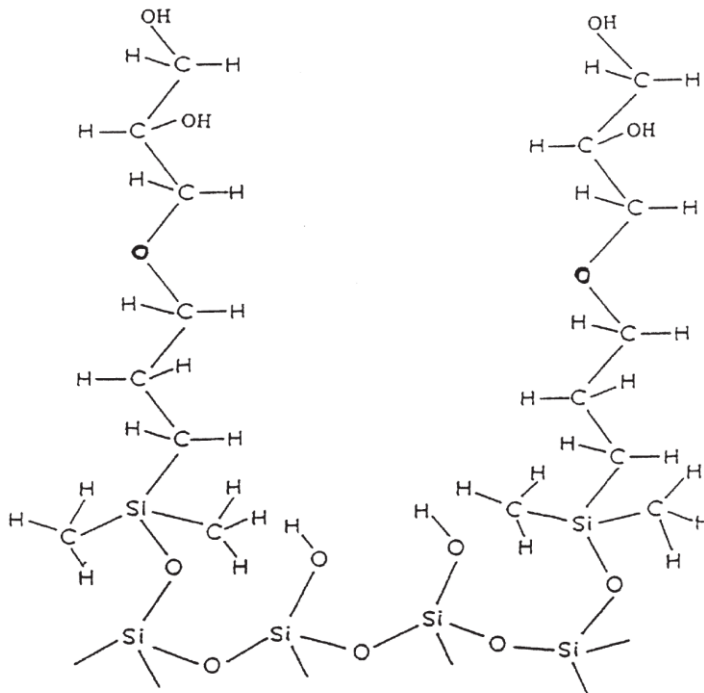


**Gambar 4.19** Perbandingan pemisahan pada lempeng KLTKT silika gel DIOL dengan lempeng yang lain.

(a) fase normal, Petroleum eter/aseton(80+20 v/v)

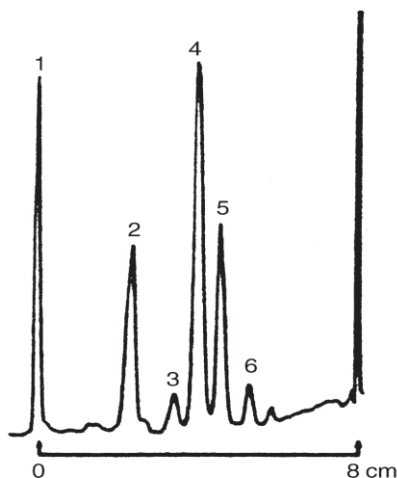
(b) fase terbalik, Aseton/air(60+40 v/v)

Senyawa : ■ Hidrokortison  
 ▲ Senyawa Reikstein  
 ● Metilttestosteron



**Gambar 4.19** Ikatan kimia golongan propel-glikol yang terikat pada permukaan silika gel.

KLTKT silika gel-diol terbukti berguna pada beberapa kelompok pemisahan termasuk glikosida digitalis, steroid anabolik, amina aromatik, terutama asam dihidroksi (gambar 4.20)



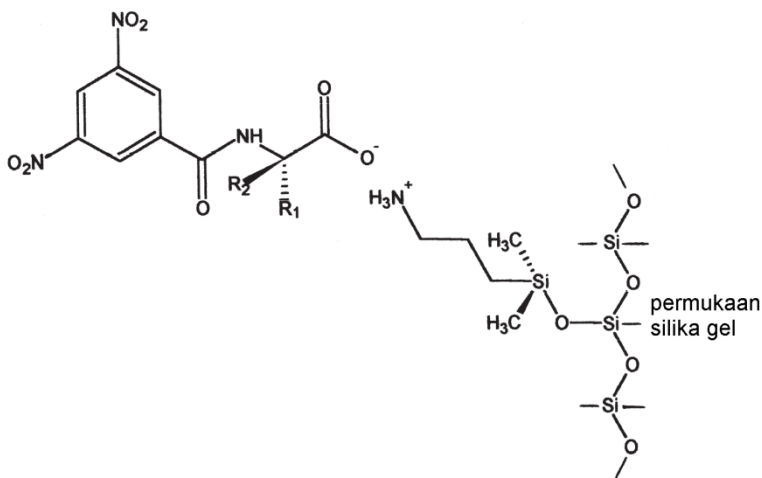
**Gambar 4.20** Pemisahan glikosida digitalis pada KLTKT silika gel DIOL

Fase gerak : etil asetat/ ammonia soln 25%(100+1v/v)  
 Sampel yang digunakan : 100 nl dari 0,1% w/v soln  
 Deteksi :  $\text{MnCl}_2$  – asam sulfurik. Dipanaskan pada  $110^\circ \text{C}$  selama 10 menit. UV 366 nm.  
 Puncak : 1, lantosid C; 2, digoksin; 3, digitoksin; 4, digoksigenin; 5,  $\alpha$ -asetil-digoksin; 6, digitoksigenin.

**Chiral bonded phase.** Fase ikatan kiral. Adanya lempeng silika gel ikatan kiral dilatar belakangi karena enansiomer tertentu suatu obat mungkin aktif secara terapeutik, sebaliknya yang lain mungkin non-aktif, yang memiliki aktivitas berbeda atau bahkan racun. Pemisahan dari isomer optik menjadi persyaratan penting yang terus berkembang pada industri farmasi. Hal ini juga meningkatkan ketertarikan dibidang agrokimia dimana pestisida mungkin memiliki potensi yang berbeda-beda tergantung isomer optiknya.

Saat ini, ada beberapa fase diam yang dikembangkan untuk HPLC dan GC, yang mana akan memisahkan sebagian besar enansiomer. Pada KLT juga terdapat fase diam untuk pemisahan senyawa enansiomer.

Lempeng KLT ikatan kiral terionisasi memakai pereaksi N-(3,5-dinitrobensoil)-R-(-)-fenilglisin. Pereaksi dilarutkan dalam tetrahidrofuran dan diimpregnasi ke dalam lempeng KLT silika gel ikatan amino. Untuk mendapatkan ikatan antara lempeng KLT dengan pereaksi kiral yang stabil dapat dilakukan dengan teknik pencelupan. Proses ikatan Struktur fase kiral dapat dilihat pada gambar 4.21.

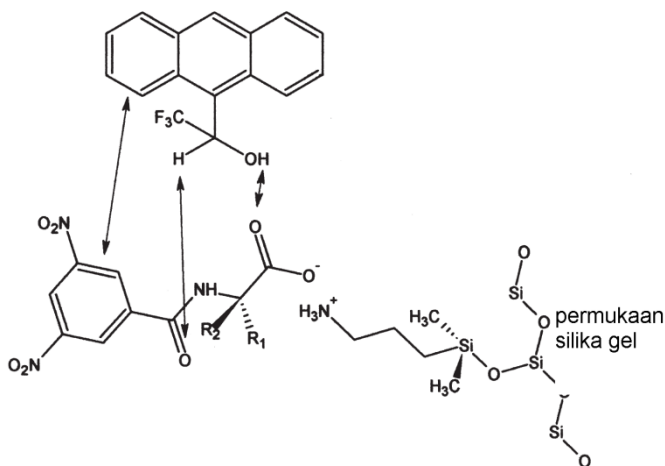


**Gambar 4.21** Struktur pereaksi Pirkle yang berikatan dengan silika gel aminopropil (R1 adalah -H, dan R2 adalah -alkil atau -aril)



Pengenalan kiral dari enansiomer pada fase “Pirkle” tergantung dari tiga poin interaksi meliputi ikatan hidrogen, interaksi  $\pi-\pi$  diantara golongan aromatik atau golongan tak jenuh, dimana salah satunya merupakan donor  $\pi$  dan yang lainnya adalah asseptor (penerima)- $\pi$  dan susunan dipole N-(3,5-dinitrobensoil)-R-(-)- $\alpha$ -fenilglisin dapat menyediakan tempat ikatan untuk ikatan hidrogen pada NH dan C=O dan kelompok dinitrofenil yang bertindak sebagai akseptor- $\pi$ . Jika pada sampel, golongan yang bisa berikatan hidrogen dekat dengan pusat kiral golongan aromatik yang mana adalah donor- $\pi$ , kemudian satu enansiomer akan tertahan lebih kuat daripada yang lain tergantung interaksinya. Tiga poin interaksi biasanya menghasilkan enansiomer yang terpisahkan dengan baik (lihat gambar 4.22).

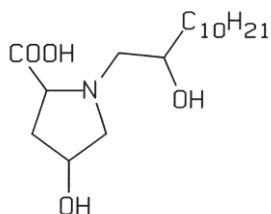
Heksobarbital, beberapa benzodiazepin dan obat  $\beta$ -bloking juga dipisahkan pada fase kiral dari L-leusin dan R- $\alpha$ -fenilglisin. Akan tetapi,  $\beta$ -bloker membutuhkan derivatisasi dengan 1-isosianonaftalen sebelum pemisahan. Masalah utama dengan fase diam kiral adalah perbandingan antara rendahnya sensitivitas dan keterbatasan aplikasi. Pada umumnya beberapa pereaksi deteksi tidak dapat dipakai pada reaksi yang memiliki latar belakang asam-amino pada permukaan silika gel yang menghasilkan warna latar belakang lempeng.



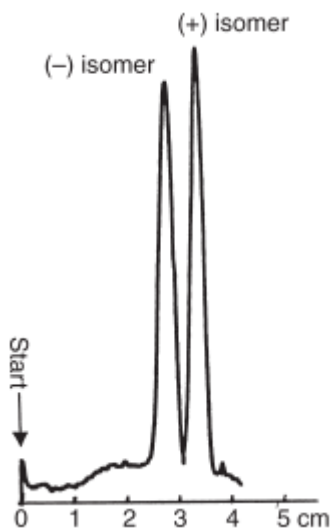
**Gambar 4.22** . Interaksi dari 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril) etanol dengan ikatan lempeng pereaksi Pirkle (R1 adalah -H, dan R2 adalah -alkil atau -aril)

Sebagai tambahan, pelindung selektor kiral “Pirkle” dari indikator berfluoresensi inorganik( $F_{254}$ ) dapat ditambahkan ke dalam KLTKT silika gel-amino. Cara yang mungkin untuk mengatasi masalah tersebut adalah menambahkan lempeng KLTKT dengan pereaksi Pirkle, menolkan/ menodai rasemat pada tepi terendah dari area ini, dan memprosesnya dengan migrasi linear normal dengan pelarut yang sesuai sampai enansiomer terpisah, dan melewati ke dalam zona yang tidak bereaksi. Pemisahan isomer kemudian dideteksi dengan cara normal di bawah sinar UV atau dengan derivatisasi pereaksi. Dengan cara ini, sensitivitas meningkat. Pelarut yang digunakan untuk fase “Pirkle” ini hampir seluruhnya terdiri dari campuran n-heksana-

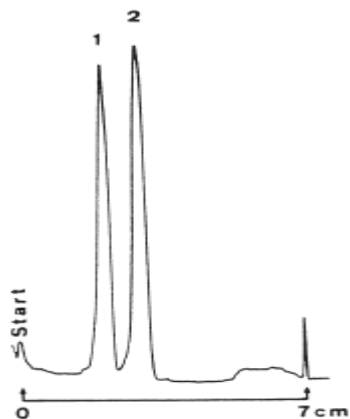
propan-2-ol. Gambar 4.24-4.26 merupakan contoh penggunaan pelat KLTKT untuk memisahkan senyawa enansiomer.



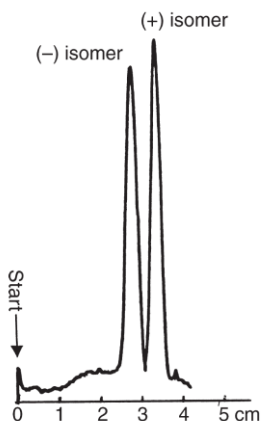
**Gambar 4.23** Struktur selektor kiral (2S, 4R, 2R'S)-N-(2'hidroksidodesil)-4-hidroksi-prolin yang dipakai dalam persiapan penukaran ligan.



**Gambar 4.24** Pemisahan enansiomer(+) dan (-) dari 2,2,2 trifluoro -1-(9-antril)etanol memakai CSPI KLTKT ikatan amino. Fase gerak: n-heksana/propan-2-ol(80+20v/v). *Discan pada 380 nm dengan scanner CAMAG KLT/KLTKT.*



**Gambar 4.25** Pemisahan dipeptida pada KLTKT Kiral  
 Fase gerak : metanol+propan-1-ol+air(50+10+40 v/v)  
 Deteksi : ninhidrin(0,5% w/v dalam butan-1-ol).  
 Dipanaskan pada 120C selama 10 menit  
 pada 420 nm  
 Puncak : 1, D-Leu-L-Leu; 2, L-Leu-D-Leu



**Gambar 4.26** Pemisahan enansiomer(+) dan (-) dari 2,2,2 trifluoro -1-(9-antril) etanol memakai KLTKT silika-gel-amino CSP1. Fase gerak: n- heksana/propan-2-ol(80+20v/v).  
 Deteksi pada 380 nm.

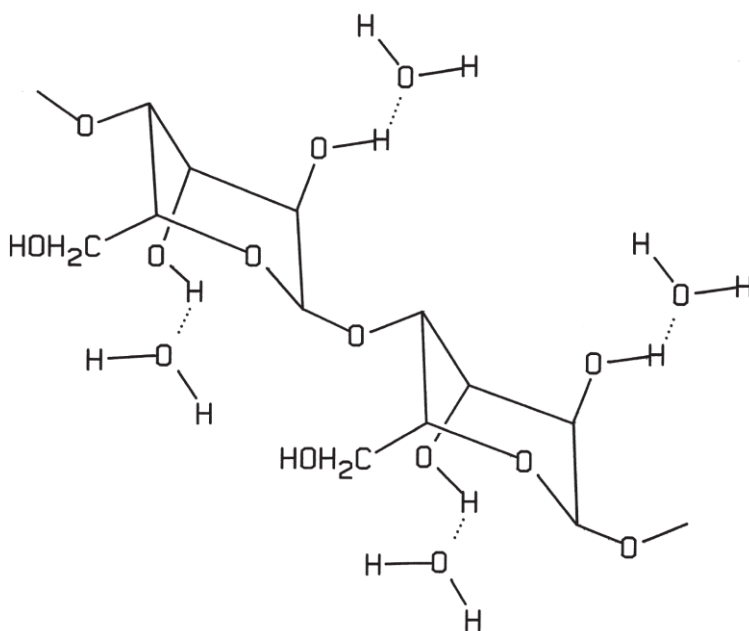
## **2. Sorben Non Silika**

### **2.1 Selulosa**

Selulosa, produk dari alam, memiliki struktur polimer yang terdiri dari unit glukopiranososa yang dihubungkan oleh jembatan oksigen. Seperti ditunjukkan dalam Gambar 4.27. Formasi gugus hidroksil yang hadir yang tersedia untuk ikatan hidrogen. Air atau alkohol teradsorpsi dapat dipertahankan oleh interaksi ini, membuat selulosa sebagai fase ideal untuk pemisahan zat hidrofilik seperti asam amino, karbohidrat, ion anorganik dan derivat asam nukleat . Dalam kromatografi planar digunakan dua jenis selulosa. Salah satunya adalah serat asli dengan polimerisasi khas antara 400-500 unit glukopiranososa, (digunakan untuk kromatografi kertas dan dalam beberapa lempeng KLT). Yang lainnya adalah sebuah mikrokristalin bentuk yang umum disebut 'Avicel', serbuk halus digunakan pada KLT dan KLTKT, yang didapatkan dengan teknik hidrolisis. Ia memiliki derajat polimerisasi dari 40-200 unit glukopiranososa. Selulosa diperoleh dari bahan mentah, termasuk kayu dan kapas. Namun, sebelumnya tidak memerlukan penyulingan berlebih dan memiliki kandungan selulosa yang lebih rendah.

Untuk preparasi KLT / KLTKT, teknik yang dibutuhkan sama dengan teknik yang digunakan untuk silika gel. Namun, tidak seperti gel silika, pada selulosa tidak diperlukan pengikat. Data hasil kromatografi yang diperoleh dengan menggunakan silika

berserat atau mikrokristalin bisa berbeda meskipun resolusi sampel pada umumnya tidak berbeda jauh apabila menggunakan silika gel. Noda serta pita lebih menyebar dan lebih panjang. Lempeng KLT selulosa siap pakai sudah banyak tersedia dipasaran meskipun lempeng KLTKT selulosa masih jarang.



**Gambar 4.27** Struktur selulosa menggambarkan efek-ikatan hidrogen dengan air

Difusi zona kromatografi sangat berkurang dengan selulosa KLTKT, tapi harus ingat bahwa pada penerapan jumlah kecil (100 ng) dari sampel dapat menghasilkan noda dengan diameter sekitar

1 mm. Selulosa precoated yang dijual secara komersial biasanya dibuat sebagai lempeng tipis daripada silika gel dengan ketebalan 0,1 mm.

Dalam beberapa tahun terakhir penggunaan selulosa telah menurun, karena metode telah beralih pada silika gel atau dengan teknik lain. Namun, banyak pemisahan telah berdasarkan selulosa dan masih banyak digunakan untuk pemisahan asam amino, terutama di laboratorium klinis rumah sakit yang digunakan untuk mengetahui peningkatan asam-asam amino tertentu dalam darah atau urin sampel dapat menunjukkan adanya sejumlah penyakit (peningkatan di fenilalanin merupakan indikasi dari phenylketourea).

### **Selulosa Fase Terikat**

**PEI selulosa** adalah selulosa dengan modifikasi polietilenimine yang berperan sebagai basis pertukaran ion yang kuat mempunyai kegunaan yang spesifik termasuk analisa nukleotida, nukleosida dan asam vanadilmandelat dan gula fosfat. PEI selulosa adalah sorben yang digunakan selama beberapa tahun. Sebagian besar dari pemisahan ini dapat digunakan silika gel pengikat amino dengan resolusi yang ditingkatkan. PEI selulosa membutuhkan suhu penyimpanan antara 0-4°C untuk menghindari deteriorasi, ketika sudah lama, maka lempeng akan berubah warna menjadi cokelat muda dan harus dibuang.

**Selulosa terasetilasi.** Sebenarnya adalah triasetil selulosa yang telah direaksikan dengan gugus hidroksil untuk menghasilkan karakter fase balik. Sebagian besar digunakan sebagai pemisahan untuk hidrokarbon poliaromatik. Namun dalam berbagai kasus tertentu, dapat digantikan dengan silika gel fase balik.

Saat ini, penggunaan selulosa terasetilasi sebagai layer kiral untuk pemisahan isomer secara optis masih dalam penelitian, resolusi dari enansiomer sangat bergantung pada struktur selulosa dan gugus asetil dari selulosa triasetat. Hasil yang paling baik didapatkan dengan menggunakan layer mikrokristalon selulosa triasetat. (ukuran partikel antara 10 mikrometer). Dengan silika gel 60 binder. Meskipun bentuk garam dari karboksimetil selulosa juga digunakan sebagai pengikat, silika gel dapat menggunakan eluen dengan basis cair. Dengan menggunakan pemisahan kolom enansiomer, campuran etanol dan propan-2-ol (70-80%) dengan air (20-30%) sebagai fase gerak. Resolusi bervariasi tergantung konsentrasi pelarut organik dalam eluen. Diketahui juga bahwa suhu juga berpengaruh pada kualitas dari pemisahan. Apabila suhu meningkat dari 25 menjadi 40°C resolusi enansiomer akan menurun.

Rasemat dari beberapa spesimen organik telah dipisahkan dengan menggunakan KLT layer mikrokristalin selulosa triasetat. Termasuk didalamnya komponen spesifik seperti benzoin, benzoin metil eter, flurbiprofen, 1-(2-naphthyl) etanol, aminoglutetimide, 1,10-binaphthyl 2,20-diamine, asam N-[1-



(naphthyl) ethyl] phtalamic, dan beberapa asam amino terderivatisasi. Namun, saat ini penggunaan kromatografi ini tidak berkembang secara komersial kemungkinan karena lamanya masa penelitian yang dibutuhkan (sekitar 2,5 jam) untuk waktu analisis nya.

Karboksimetil (CM) dan Dietilaminoetil (DEAE) selulosa. CM dan DEAE selulosa digunakan sebagai media ion exchange, dari asam lemah menuju basa kuat. Kapasitas perpindahan ion nya mendekati ion exchange resin, namun karakteristik keduanya jauh berbeda, sehubungan dengan sifat hidrofilik dari basis selulosa dibandingkan dengan sifat hidrofobik dari basis polimer pada material resin.

## **2.2. Aluminium oksida**

Aluminium oksida atau alumina, seperti silika gel, adalah sorben sintetis. Dibuat pada tiga rentang pH; asam, basa dan netral untuk berbagai macam sampel yang berbeda. Jadi dalam kondisi berair senyawa asam seperti fenol, sulfonat, karboksilat, dan asam amino dipisahkan pada alumina asam, sementara senyawa basa; amina, imines, dan pewarna basa, dipisahkan pada alumina netral. Senyawa netral, seperti aldehyd, keton dan lakton dikromatografikan pada alumina netral. Dari tiga jenis, alumina basa paling banyak digunakan. Dalam eluen tak berair, hidrokarbon aromatik, karotenoid, porphorins, alkaloid, dan steroid dapat teradsorpsi. Seperti dengan gel silika, alumina juga akan bervariasi dalam kegiatan sesuai dengan air konten..

Beberapa produsen menawarkan tipe T dan E dalam jangkauan KLT alumina mereka. Alumina lebih reaktif secara kimiawi daripada silika gel dan ini dapat menyebabkan masalah dengan beberapa sampel. Reaksi dapat terjadi dalam lempeng sorben menyebabkan hilangnya analit selama kromatografi. Seperti selulosa, alumina sekarang juga menurun dalam penggunaannya.

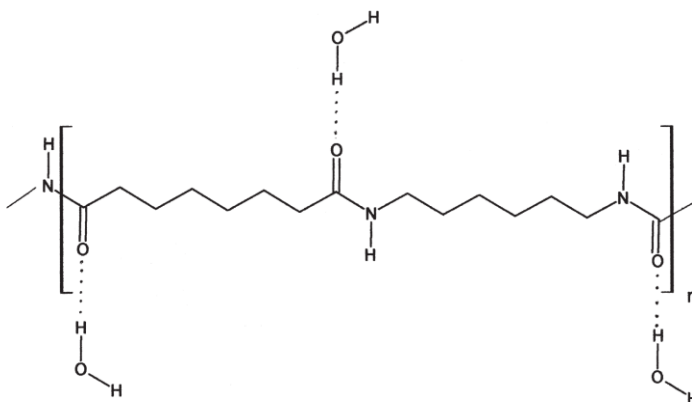
### **2.3. Kieselguhr**

Kieselguhr adalah tanah diatom alami, terdiri dari sisa-sisa kerangka organisme laut mikroskopis selama beberapa waktu. Meskipun kandungan utamanya silikon dioksida, namun juga mengandung berbagai jumlah oksida lainnya dari aluminium, besi, titanium, magnesium, natrium, kalium dan kalsium oksida, hidroksida, dan karbonat (sekitar 10% dari jumlah total). Hal ini banyak digunakan sebagai alat penyaring karena porositas tinggi (diameter pori rata-rata cukup bervariasi, biasanya 65 000 Å). Kieselguhr digunakan bersamaan dengan penambahan 15% kalsium sulfat sebagai pengikat untuk menghasilkan KLT. Variabilitas ukuran pori dan luas permukaan membatasi penggunaan kieselguhr untuk KLT berkualitas, presisi tinggi. Telah digunakan untuk pemisahan kutub senyawa dengan mekanisme partisi. pre-coated komersial dengan pengikat organik tahan abrasi telah tersedia selama bertahun-tahun, meskipun penggunaan mereka telah berkurang.

## 2.4 Poliamida

Fase poliamida diproduksi dari policaprolactam (nilon 6), polihexametyldiaminoadipate (nilon 66), asam atau poliaminoundecanoic (nilon 11). Pemisahan kromatografi pada poliamida tergantung pada kemampuan ikatan hidrogen amida dan gugus karbonil (Gambar 37). Kekuatan ikatan dihasilkan tergantung pada jumlah dan posisi fenolik, hidroksil atau gugus karboksil yang terdapat dalam komponen-komponen sampel. Retensi relatif dari analit tergantung pada elusi pelarut yang mampu memisahkan obligasi ini. Sebagai pelarut yang bergerak melalui sorben, analit terpisah sesuai dengan kemampuan pemisahan dari masing-masing komponen.

Campuran dari fenol, indol, steroid, basa asam nukleat, nukleosida, dinitrosulfonyl (DNS), dinitrophenyl (DNP), dan isotiosianat dimetylaminoazobenzene (DABITC) derivatised asam amino, senyawa nitro aromatik dapat dipisahkan pada poliamide. Berbagai pre-coated sheet dengan aluminium atau plastik tersedia secara komersial, termasuk salah satu yang cukup unik 15 cm plastik lembaran persegi yang dilapisi pada kedua sisinya dengan poliamida 6. Dengan ini, sampel yang mengandung, misalnya, asam amino derivatif diaplikasikan ke satu sisi sementara standar diletakkan di sisi lain. Setelah kromatografi asam amino bisa segera diketahui. Pendekatan baru ini telah berhasil diaplikasikan untuk dansil, dan DNP asam amino.



**Gambar 4.27** Ikatan hidrogen poliamida dengan air

## 2.5 Sorben lain.

Sorben lain yang penggunaannya kurang umum yaitu magnesium silikat, kitin dan Sephadex<sup>TM</sup>. Magnesium silikat adalah bubuk putih, sering dikenal dengan nama Florisil<sup>TM</sup>.

Kitin merupakan polisakarida terdiri terutama dari molekul 2-acetamide-2-deoksi-D-glukan yang dihubungkan melalui jembatan oksigen dalam tipe yang sama dengan struktur selulosa tetapi dengan sifat basa. Luas permukaan spesifik rendah, hanya 6 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Kitin telah digunakan terutama untuk pemisahan asam amino, tetapi juga telah diaplikasikan untuk ion anorganik, asam nukleat, fenol dan pewarna.

Sephadex adalah nama dagang Pharmacia Fine Kematical untuk berbagai gel filtrasi bahan. Prinsip pemisahan sorben

shepadex adalah dengan perbedaan ukuran molekul komponen sampel. Mereka memodifikasi gel dekstrin, hidrofilik dan netral dalam alam. Mereka jarang digunakan dalam KLT, karena preparasinya sulit dan memerlukan pengembangan beberapa jam sebelum digunakan. Sephadex telah digunakan untuk pemisahan peptida dan asam nukleat.

### **3. Sorben Campuran**

Sorben campuran, misalnya gel silika / kieselguhr, silika gel / alumina dan selulosa / silika gel kadang-kadang digunakan untuk aplikasi khusus. Namun, mereka hampir selalu membutuhkan persiapan lempeng khusus dengan rasio komponen tertentu tertentu. Sedikit yang tersedia secara komersial. Silika gel / kieselguhr telah digunakan untuk ion anorganik, herbisida dan beberapa silika steroids. Selulosa / gel diketahui dapat digunakan sebagai aplikasi dalam pemisahan bahan pengawet makanan, dan antibiotik. Gel silika / alumina telah jarang digunakan dalam dua puluh tahun terakhir.

### **4. Sorben Dengan Fase Ganda**

fase ganda adalah inovasi baru yang melibatkan dua diam yang berbeda fase pada satu KLT. Biasanya dua fase yang normal dan fase terbalik, tapi kombinasi lain yang mungkin. Penting untuk diketahui bahwa keduanya harus memiliki perbedaan interface

yang tajam satu arah sebagai pemisahan fase normal pada gel silika, kemudian setelah pengeringan, ke arah kedua sebagai pemisahan fase terbalik pada gel silika RP18. Hal ini menghasilkan dua dimensi sidik jari dari komponen sampel. Dua-dimensi KLT memungkinkan untuk resolusi sejumlah besar komponen dari pengembangan linier normal. Contoh penggunaan lempeng fase ganda ini termasuk pemisahan sulfonamida dan asam empedu.

**Pertanyaan-pertanyaan :**

1. Bagaimana pembuatan sorben KLT silika gel?
2. Apa tujuan modifikasi pada sorben silika gel?
3. Prinsip pemisahan penukar ion dapat ditemukan pada sorben apa saja?
4. Apa latar belakang dikembangkannya sorben silika gel kiral?

**KEPUSTAKAAN :**

Ahuja, S., 1989. *Selectivity and Detectability Optimizations in HPLC*. A Willey Inc. Canada.

Deinstrop, E.H., 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography : Best Practice and Avoidance of Mistakes*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim,16-27

Holme, D. & Hazel, P., 1993, *Analytical Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. Longman Scientific and Technical. New York.

Kowalska, T., Kaczmarski, K., Prus, W., 2003. Theory and Mechanism of Thin-Layer Chromatography. In : Sherma, J & Fried, B (Eds). *Hand Book of Thin Layer Chromatography*. 3<sup>rd</sup> edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc. NY.

Peter E. Wall. 2005. *Thin-layer Chromatography. A Modern Practical Approach*. The Royal Society of Chemistry. UK

Prus, W., Kowalska, T., 2003. Optimization of Thin-Layer Chromatography. In : *Encyclopedia of Chromatography*. Marcel Dekker, Inc. NY.

- Rabel, F. M., 2003. Sorbents and Precoated Layers in Thin-Layer Chromatography. *In* : Sherma, J & Fried, B (Eds). *Hand Book of Thin Layer Chromatography*. 3<sup>rd</sup> edition, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc. NY.
- Wulandari L, Indrayanto G, 2003. HPTLC Determination of Betamethasone in Tablet, and Validation of The Method Used, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol 26 No 16 pp2709-2717
- Wulandari L, Indrayanto G, 2003. Densitometric Determination of Betamethasone Dipropionate and Salicylic Acid in Lotion, and Its Validation, *Journal of Planar Chromatography*, Vol 16 November/Desember
- Wulandari L, 2006. Evaluation of Re-Used HPTLC Plate for Qualitative and Quantitative Analysis, *Indonesian Journal of Chemistry*, Vol 6 No.3, Nov