

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran yang berdasarkan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Uraian mengenai kromatografi pertama kali dijelaskan oleh Michael Tswett, seorang ahli biotani Rusia yang bekerja di Universitas Warsawa. Pada saat itu, Michael Tsweet melakukan pemisahan klorofil dari pigmen- pigmen lain dengan ekstrak tanaman menggunakan kromatografi kolom yang berisi kalsium karbonat (Wulandari, 2011). Adapun perkembangan pesat dari beberapa jenis sistem kromatografi diantaranya adalah kromatografi kertas, kromatografi lapisan tipis (*thin layer chromatography*), kromatografi gas (*gas chromatography*), dan kromatografi cair kinerja tinggi (*high performance liquid chromatography*) (Alen dkk., 2017).

Pada kromatografi lapis tipis, terdapat lapisan tipis (tebal 0.1-2 mm) yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan kepada permukaan penyangga datar (plat), yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat dari polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat. Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk keperluan yang luas dalam pemisahan-pemisahan, seperti senyawa flavonoid yang terdapat pada tahu, tempe, serta bubuk isoflavon yang memiliki banyak manfaat (Wulandari, 2011).

Pada praktikum ini, (*nama sampel*) digunakan sebagai media untuk pengisolasian pigmen yang nantinya diuji dengan kromatografi lapis tipis. (*nama sampel*) digunakan karena (*jelaskan alasan penggunaan sampel, minimal 2 kalimat*).

1.2 Tujuan Percobaan

1. Mampu mengisolasi pigmen klorofil
2. Mampu melakukan pemisahan campuran menjadi komponennya dengan kromatografi lapis tipis.

1.3 Manfaat Percobaan

1. Mahasiswa dapat mengetahui cara mengisolasi pigmen klorofil
2. Mahasiswa dapat memisahkan campuran menjadi komponennya dengan kromatografi lapis tipis

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian Kromatografi

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu proses pemisahan yang digunakan untuk memisahkan campuran yang pada hakekatnya molekular. Kromatografi bergantung pada pembagian ulang molekul-molekul campuran antara dua fase atau lebih. Tipe-tipe kromatografi mencakup kromatografi adsorbs, kromatografi partisi cairan, dan pertukaran ion. Sistem utama yang digunakan dalam kromatografi partisi adalah partisi gas, partisi cairan yang menggunakan alas tak bergerak (misalnya kromatografi kolom), kromatografi kertas, dan lapis tipis (Underwood dan Day, 1983).

Kromatografi biasanya digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya, misalnya senyawa flavonoida dan isoflavonoida yang terdapat pada tahu, tempe, bubuk kedelai, dan tauco serta *Scoparia dulcis*, *Lindernia anagalis*, dan *Torenia violacea* yang memiliki banyak manfaat. Beberapa kelebihan senyawa isoflavon yang potensial bagi kesehatan manusia, di antaranya adalah sebagai antioksidan, antitumor/antikanker, antikolesterol, antivirus, antialergi, dan dapat mencegah osteoporosis (Meyer, 2010)

Pada kromatografi, komponen-komponen yang akan dipisahkan berada diantara dua fase, yaitu fase diam (*stationary*) dan fase gerak (*mobile*). Fase diam adalah fase yang akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak adalah fase yang akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal atau tidak bergerak sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Wulandari, 2011). Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*) atau karena pengaruh pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Meyer, 2010). Adapun beberapa jenis aplikasi pada kromatografi, yaitu:

1. Kromatografi Lapis Tipis (*Thin Layer Chromatography*)

Analisis dengan menggunakan KLT dapat digunakan untuk mengidentifikasi simplisa yang kelompok kandungan kimianya sudah diketahui. Kelompok kandungan kimia tersebut seperti alkaloid, antraglikosida, arbutin,

glikosida jantung, zat pahit, flavonoid, saponin, minyak atsiri, kumarin, dan asam fenol karboksilat (Underwood dan Day, 1983).

2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) merupakan jenis sistem kromatografi dengan metode kinerja yang tinggi dan sangat efisien, yakni mampu menghasilkan pemisahan yang baik dalam waktu singkat. Instrumen HPLC dapat berupa kumpulan modular atau elemen individual, tetapi juga dapat dirancang sebagai alat tunggal. Konsep modular dalam hal ini jauh lebih fleksibel dari kegagalan terhadap suatu komponen tunggal. Instrumen HPLC setidaknya memiliki elemen atau perangkat seperti reservoir pelarut, jalur transfer dengan *frit*, pompa tekanan tinggi, perangkat injeksi sampel, kolom, detector, dan akuisisi data yangmana biasanya bersamaan pula dengan evaluasi data (Meyer, 2010).

3. Kromatografi Gas (*Gas Chromatography*)

Sama seperti HPLC, kromatografi gas (*gas chromatography*) juga merupakan jenis sistem kromatografi dengan metode kinerja yang tinggi. Perbedaan yang paling mendasar di antara keduanya adalah bahwa GC hanya dapat mengatasi zat yang mudah menguap atau dapat diuapkan secara utuh pada suhu tinggi serta darimana turunan volatile tersebut dapat diperoleh secara andal. Hanya sekitar 20% senyawa organik yang diketahui dapat dianalisis dengan kromatografi gas (GC) tanpa perlakuan sebelumnya dimana untuk kromatografi cair, sampel harus dilarutkan dalam pelarut terlebih dahulu (Meyer, 2010).

2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

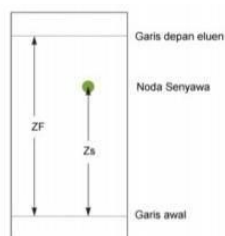
Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu jenis kromatografi yang paling sering dilakukan untuk analisis dan pemisahan suatu komponen organik. Kromatografi lapis tipis (KLT) pertama kali dikembangkan oleh Izmailoff dan Schariber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat alumunium, atau pelat plastik. Meskipun demikian, kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom (Underwood dan Day, 1983).

Prinsip kerja KLT adalah pemisahan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Pemisahan ini menggunakan prinsip adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Fase diam yang digunakan dalam bentuk plat silika dan fase geraknya disesuaikan dengan jenis sampel yang ingin dipisahkan. Dalam KLT, fase diamnya adalah *silica gel* GF254 sedangkan fase geraknya ada pelarut organik. Larutan atau campuran larutan yang digunakan dinamakan eluen. Komponen kimia (analit) bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya. Semakin dekat kepolaran antar sampel dengan eluen, maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (Alen dkk., 2017).

Adanya beberapa keuntungan, seperti peralatan sederhana, murah, waktu analisis cepat, dan daya pisah yang sangat baik menyebabkan metode ini tetap populer. Dalam KLT, fase diamnya adalah *silica gel* GF254 sedangkan fase geraknya ada pelarut organik. Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan. Dalam kromatografi lapis tipis, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan hampir semua laboratorium dapat melaksanakan setiap saat secara cepat (Alen dkk., 2017).

2.3 Faktor Retardasi (Rf)

Faktor retardasi (*Retardation factor*=Rf) adalah parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT. Nilai Rf merupakan parameter yang menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi. Penentuan harga Rf analit, yaitu membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak/eluen (Wulandari, 2011).



Gambar 2.1 Ilustrasi migrasi analit dan eluen pada lempeng

KL T Retardasi faktor dapat dihitung sebagai rasio :

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi analit}}{\text{Jarak migrasi eluan}} = \frac{Z_s}{Z_f} \quad (2.1)$$

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. Pada R_f diatas 0,8 noda analit akan diganggu oleh absorbansi pengotor lempeng fase diam yang teramati pada visualisasi dengan lampu UV. Deteksi visibel R_f dapat lebih tinggi dari deteksi UV 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 (Alen dkk., 2017).

2.4 Klorofil

Klorofil adalah zat yang memberi warna hijau daun pada tanaman. Klorofil berguna bagi tanaman untuk proses fotosintesis yang memungkinkan cahaya dapat diserap tanaman. Klorofil kaya akan zat nutrisi seperti mineral, vitamin, protein, unsur- unsur hara, dan mikronutrien. Klorofil sendiri merupakan molekul yang didapat dari ekstrak tumbuh- tumbuhan dan dapat berfungsi sebagai sumber energi (Meyer, 2010).

2.5 Proses Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu metode pemisahan suatu zat berdasarkan derajat kelarutan di dalam pelarut. Pelarut yang digunakan dapat berupa pelarut organik atau anorganik. Jika zat organik yang akan dihasilkan, maka pelarut yang digunakan juga zat organik. Begitu pula sebaliknya untuk anorganik. Apabila pemilihan pelarut tidak sesuai, maka hasil yang diperoleh sedikit atau bahkan tidak diperoleh sama sekali karena pelarutnya tidak tepat (Wulandari, 2011). Macam-macam proses pemisahan secara ekstraksi dibagi menjadi dua yaitu:

1. Ekstraksi padat – cair
2. Ekstraksi cair – cair

Ekstraksi sedikit nya terdiri dari dua tahap, yaitu :

1. Pencampuran secara intensif bahan ekstraksi dengan pelarut, yaitu setelah dikocok kemudian didiamkan maka zat terlarutkan dan terdistribusi dengan sendirinya kedalam dua pelarut tersebut (Wulandari, 2011).
2. Pemisahan kedua fasa cair itu sesempurna mungkin yaitu pada saat pencampuran terjadi perpindahan massa, yaitu ekstrak meninggalkan pelarut yang pertama (media pembawa) dan masuk kedalam pelarut kedua (media ekstraksi) (Wulandari, 2011).

BAB III

METODE PERCOBAAN

3.1 Bahan dan Alat yang Digunakan

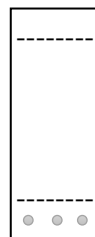
3.1.1 Bahan yang digunakan

1. Sampel
2. Etanol 96%
3. Natrium sulfat anhidrat
4. N-Heksana
5. Etil asetat
6. Aquadest
7. Klorofom

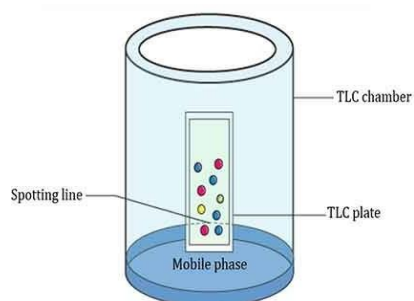
3.1.2 Alat yang digunakan

- | | |
|-------------------|------------------|
| 1. Pipet volume | 6. Gelas beaker |
| 2. Corong pemisah | 7. Kurs porselin |
| 3. Pipa kapiler | 8. Timbangan |
| 4. Pipet tetes | 9. Plat KLT |
| 5. Corong gelas | 10. Erlenmeyer |

3.1.3 Gambar alat



Gambar 3.1 Plat KLT



Gambar 3.2 Rangkaian alat

3.2 Prosedur Percobaan

3.2.1 Isolasi pigmen klorofil daun

1. Gerus daun segar menggunakan kurs porselin
2. Pindahkan hasil gerusan ke gelas beaker, masukkan pelarut etanol 96%, lalu tunggu 1 jam. Gelas beaker ditutup dengan kaca arloji untuk menghindari penguapan etanol.
3. Setelah 1 jam, saring larutan tersebut menggunakan kertas saring dan corong gelas.
4. Ekstrak filtrat dengan pelarut kloroform dalam corong pisah. Kocok sampai terbentuk emulsi. Tambahkan aquades pada lapisan kloroform bila belum terbentuk dua lapisan (jika masih tidak terbentuk dua lapisan, tambahkan natrium sulfat anhidrat).
5. Pisahkan dua fase yang diperoleh, ambil fase kloroform (lapisan bawah).

3.2.2 Analisis komponen hasil isolasi dengan KLT

1. Totolkan larutan zat hijau daun hasil isolasi di atas plat KLT yang telah disediakan.
2. Penotolan dilakukan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat KLT. Biarkan hingga kering, kemudian elusi dengan campuran pelarut n-heksana:etil asetat (7:3).
3. Setelah mencapai 0,5 cm dari batas atas, ambil platnya, keringkan, dan amati bercak-bercak yang nampak di bawah sinar tampak.
4. Foto plat KLT sebagai bukti. Pada umumnya akan terlihat bercak-bercak berwarna, seperti jingga (karotenoid), hijau biru (klorofil-a), hijau (klorofil-b), dan kuning (xantofil).

DAFTAR PUSTAKA

- Alen,Y., Agresa, F.L., dan Yuliandra,Y. (2017). Analisa kromatografi lapis tipis (KLT) dan aktivitas antihiperurisemia ekstrak rebung *Schizostachyum brachycladum kurz* (*kurz*) pada mencit putih jantan. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 3(2), 146-152.
- Meyer, V.R. (2010). *Practical high-performance liquid chromatography (5th ed.)*. United Kingdom : John Wiley dan Sons, Ltd.
- Underwood,A.I. dan Day, R.A. (1983). *Analisa kimia kuantitatif (5th ed.)*. Diterjemahkan oleh R.Soendoro. Jakarta : Erlangga.
- Wulandari, L. (2011). *Kromatografi lapis tipis*. Jember : PT Taman Kampus Presindo.