

## KROMATOGRAFI KERTAS

Oleh: Susila Kristianingrum

### Latar belakang

Kromatografi digunakan untuk memisahkan campuran dari substansinya menjadi komponen-komponennya. Seluruh bentuk kromatografi bekerja berdasarkan prinsip yang sama.

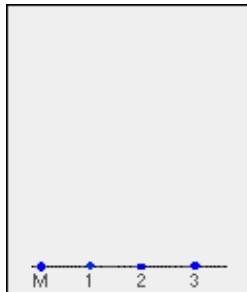
Seluruh bentuk kromatografi memiliki **fase diam** (berupa padatan atau cairan yang didukung pada padatan) dan **fase gerak** (cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen dari campuran bersama-sama. Komponen-komponen yang berbeda akan bergerak pada laju yang berbeda pula. Kita akan melihat alasannya pada halaman selanjutnya.

**Dalam kromatografi kertas**, fase diam adalah kertas serap yang sangat seragam. Fase gerak adalah pelarut atau campuran pelarut yang sesuai.

Anda mungkin telah menggunakan kromatografi kertas sebagai salah satu hal pertama yang pernah anda kerjakan dalam bidang kimia untuk pemisahan, misalnya campuran dari pewarna-pewarna yang menyusun warna tinta tertentu. Ini merupakan contoh yang mudah, mari memulai dari hal itu.

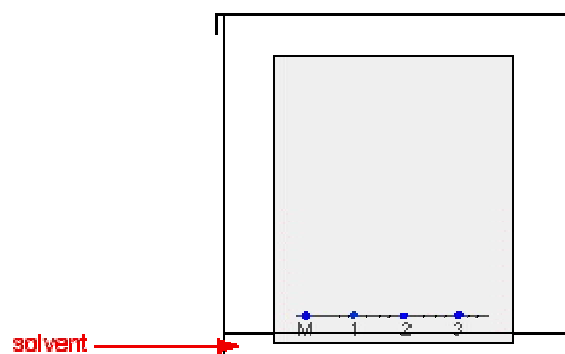
Anggaplah anda mempunyai tiga pena biru dan akan mencari tahu dari tiga pena itu, yang mana yang digunakan untuk menulis sebuah pesan. Sampel dari masing-masing tinta ditetaskan pada garis dasar pensil pada selembur kromatografi kertas. Beberapa pewarna larut dalam jumlah yang minimum dalam pelarut yang sesuai, dan itu juga di tetaskan pada garis yang sama. Dalam gambar, pena ditandai

1, 2 dan 3 serta tinta pada pesan ditandai sebagai M.



Kertas digantungkan pada wadah yang berisi lapisan tipis pelarut atau campuran pelarut yang sesuai didalamnya. Perlu diperhatikan bahwa batas pelarut berada dibawah garis pada bercak diatasnya. Gambar berikutnya tidak menunjukkan terperinci bagaimana kertas di gantungkan karena terlalu banyak kemungkinan untuk mengerjakannya dan dapat mengacaukan gambar. Kadang-kadang kertas hanya digulungkan secara bebas pada silinder dan diikatkan dengan klip kertas pada bagian atas dan bawah. Silinder kemudian ditempatkan dengan posisi berdiri pada bawah wadah.

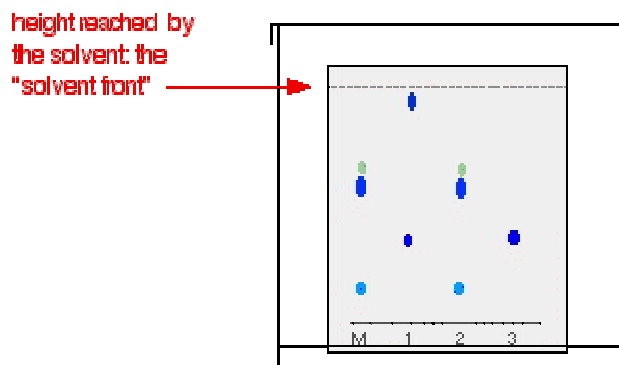
Alasan untuk menutup wadah adalah untuk meyakinkan bahwa atmosfer dalam gelas kimia terjenuhkan dengan uap pelarut. Penjenuhan udara dalam gelas kimia dengan uap menghentikan penguapan pelarut sama halnya dengan pergerakan pelarut pada kertas.



Karena pelarut bergerak lambat pada kertas, komponen-komponen yang berbeda dari campuran tinta akan bergerak

pada laju yang berbeda dan campuran dipisahkan berdasarkan pada perbedaan bercak warna.

Gambar menunjukkan apa yang tampak setelah pelarut telah bergerak hampir seluruhnya ke atas.



Dengan sangat mudah dijelaskan melihat dari kromatogram akhir dari pena yang ditulis pada pesan yang mengandung pewarna yang sama dengan pena 2. Anda juga dapat melihat bahwa pena 1 mengandung dua campuran berwarna biru yang kemungkinan salah satunya mengandung pewarna tunggal terdapat dalam pena 3.

### Nilai $R_f$ (Retardation Factor/ Rate of Flow)

Beberapa senyawa dalam campuran bergerak sejauh dengan jarak yang ditempuh pelarut; beberapa lainnya tetap lebih dekat pada garis dasar. Jarak tempuh relative pada pelarut adalah konstan untuk senyawa tertentu sepanjang anda menjaga segala sesuatunya tetap sama, misalnya jenis kertas dan komposisi pelarut yang tepat..

Jarak relative pada pelarut disebut sebagai nilai  $R_f$ . Untuk setiap senyawa berlaku rumus sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Misalnya, jika salah satu komponen dari campuran bergerak

9.6 cm dari garis dasar, sedangkan pelarut bergerak sejauh 12.0 cm, jadi  $R_f$  untuk komponen itu:

$$\begin{aligned} R_f &= \frac{9.6}{12.0} \\ &= 0.80 \end{aligned}$$

Dalam contoh kita melihat ada beberapa pena, tidak perlu menghitung nilai  $R_f$  karena anda akan membuat perbandingan langsung dengan hanya melihat kromatogram.

Anda membuat asumsi bahwa jika anda memiliki dua bercak pada kromatogram akhir dengan warna yang sama dan telah bergerak pada jarak yang sama pada kertas, dua bercak tersebut merupakan senyawa yang hampir sama. Hal ini tidak selalu benar. Anda dapat saja mempunyai senyawa-senyawa berwarna yang sangat mirip dengan nilai  $R_f$  yang juga sangat mirip. Kita akan melihat bagaimana anda menemukan masalah itu pada penjelasan selanjutnya.

### **Bagaimana halnya jika substansi yang anda ingin identifikasi tidak berwarna?**

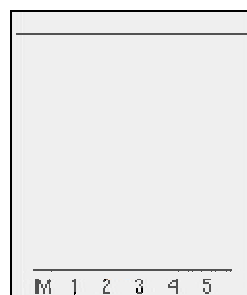
Dalam beberapa kasus, dimungkinkan membuat bercak menjadi tampak dengan mereaksikannya dengan beberapa pereaksi yang menghasilkan produk yang berwarna. Contoh yang baik yaitu kromatogram yang dihasilkan dari campuran asam amino.

Anggaplah anda mempunyai campuran asam amino dan ingin memisahkan asam amino tertentu yang terdapat dalam campuran. Untuk menyederhanakan, mari berasumsi bahwa anda telah mengetahui kemungkinan campuran hanya mengandung lima asam amino yang umum.

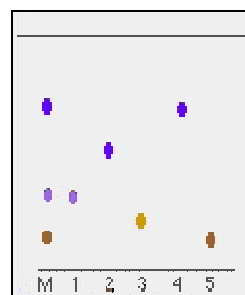
Setetes larutan campuran ditempatkan pada garis dasar kertas, dan dengan cara yang sama ditempatkan asam amino yang telah diketahui ditetaskan disampingnya. Kertas lalu

ditempatkan dalam pelarut yang sesuai dan dibiarkan seperti sebelumnya. Dalam gambar, campuran adalah M, dan asam amino yang telah diketahui ditandai 1 sampai 5.

Posisi pelarut depan ditandai dengan pensil dan kromatogram lalu dikeringkan dan disemprotkan dengan larutan **ninhidrin**. Ninhidrin bereaksi dengan asam amino menghasilkan senyawa berwarna, utamanya coklat atau ungu.



before spraying with ninhydrin



after spraying with ninhydrin

Gambar di sebelah kiri menunjukkan kertas setelah dilalui pelarut hampir pada bagian atas kertas. Bercak masih belum tampak. Gambar kedua menunjukkan apa yang mungkin tampak setelah penyemprotan ninhidrin.

Tidak diperlukan untuk menghitung nilai  $R_f$  karena anda dengan mudah dapat membandingkan bercak dalam campuran dengan asam amino-asam amino yang telah diketahui berdasarkan posisi dan warnanya.

Dalam contoh ini, campuran mengandung asam amino yang diberi tanda 1, 4 dan 5.

Bagaimana jika campuran mengandung asam amino lain selain dari asam amino yang anda gunakan untuk perbandingan? Akan terdapat bercak dalam campuran yang tidak sesuai dari asam amino yang telah diketahui. Anda harus mengulangi percobaan menggunakan asam amino-asam amino sebagai bahan perbandingan.

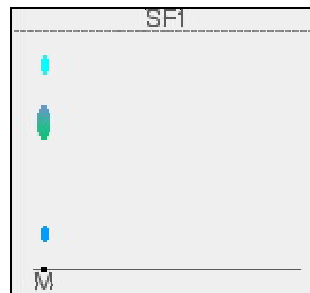
### Kromatografi kertas dua arah

Kromatografi kertas dua arah dapat digunakan dalam menyelesaikan masalah pemisahan substansi yang memiliki nilai  $R_f$  yang sangat serupa.

Saya akan kembali membicarakan tentang senyawa-senyawa berwarna karena lebih mudah melihat apa yang terjadi. Ada dapat mengerjakannya secara sempurna hal ini dengan senyawa-senyawa yang tidak berwarna - tetapi anda harus menggunakan banyak imajinasi dalam menjelaskan apa yang terjadi !

Waktu ini kromatogram dibuat dari bercak tunggal dari campuran yang ditempatkan kedepan dari garis dasar. Kromatogram ditempatkan dalam sebuah pelarut sebelum dan sesudah sampai pelarut mendekati bagian atas kertas.

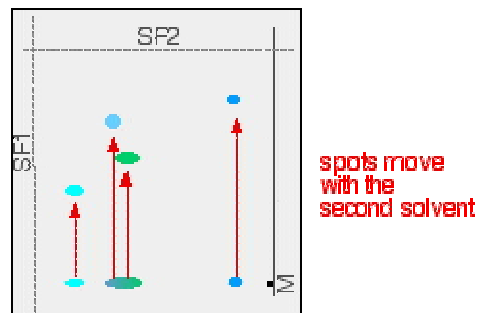
Dalam gambar, posisi pelarut ditandai dengan pensil sebelum kertas kering. Posisi ini ditandai sebagai SF1 yaitu pelarut depan untuk pelarut pertama. Kita akan menggunakan dua pelarut yang berbeda



Jika anda melihatnya lebih dekat, anda dapat melihat bahwa bercak pusat besar dalam kromatogram sebagian biru dan sebagian hijau. Dua pewarna dalam campuran memiliki nilai  $R_f$  yang hampir sama. Tentunya, nilai-nilai ini bisa saja sama, keduanya memiliki warna yang sama; dalam hal ini anda tidak dapat mengatakan bahwa ada satu atau lebih pewarna dalam dalam bercak itu.

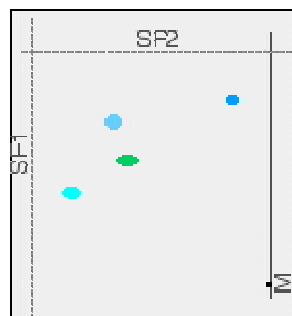
Apa yang anda kerjakan sekarang adalah menunggu kertas

kering seluruhnya, dan putar  $90^\circ$  dan perlakukan kromatogram kembali dengan pelarut yang berbeda. Hal yang sangat tidak dipercaya bahwa dua bercak yang membingungkan akan memiliki nilai Rf dalam pelarut kedua sama halnya dengan pelarut yang pertama, dengan demikian bercak-bercak akan bergerak dengan jumlah yang berbeda.



Gambar berikutnya menunjukkan apa yang mungkin terjadi pada berbagai bercak pada kromatogram awal. Posisi pelarut kedua juga ditandai.

Tentunya anda tidak dapat melihat bercak-bercak dalam posisi awal dan akhir; Bercak-bercak telah bergerak! Kromatogram akhir akan tampak seperti ini:



Kromatografi dua arah secara seluruhnya terpisah dari campuran menjadi empat bercak yang berbeda.

Jika anda akan mengidentifikasi bercak-bercak dalam campuran, secara jelas anda tidak dapat melaksanakannya dengan perbandingan substansi pada kromatogram yang sama seperti yang kita lihat pada contoh sebelumnya menggunakan

pena atau asam amino-asam amino. Anda dapat berakhir dengan kekacauan pada bercak-bercak yang tanpa arti.

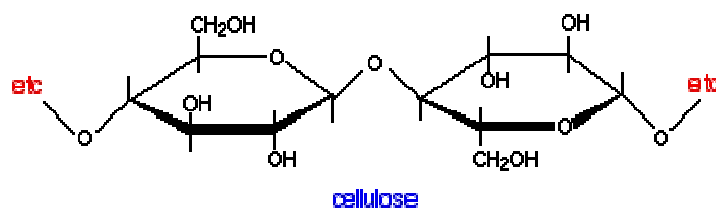
Meskipun demikian, anda dapat bekerja dengan nilai Rf untuk setiap bercak-bercak dalam pelarut-pelarut, dan kemudian membandingkan nilai-nilai yang anda telah ukur dari senyawa yang telah diketahui pada kondisi yang tepat sama.

### **Bagaimana kromatografi kertas bekerja?**

Meskipun kromatografi kertas sangat mudah pengerjaannya, tetapi sangat sulit dijelaskan apabila membandingkannya dengan kromatografi lapis tipis. Penjelasannya tergantung tingkatan pemilihan pelarut yang anda gunakan, dan beberapa sumber untuk mengatasi masalah secara tuntas. Jika anda telah pernah melakukannya, ini sangat membantu jika anda dapat membaca penjelasan bagaimana kromatografi lapis tipis bekerja.

### **Struktur dasar kertas**

Kertas dibuat dari serat selulosa. Selulosa merupakan polimer dari gula sederhana, yaitu glukosa.



Sangat menarik untuk mencoba untuk menjelaskan kromatografi kertas dalam kerangka bahwa senyawa-senyawa berbeda diserap pada tingkatan yang berbeda pada permukaan kertas. Dengan kata lain, akan baik menggunakan beberapa penjelasan untuk kromatografi lapis tipis dan kertas. Sayangnya, hal ini lebih kompleks daripada itu!

Kompleksitas timbul karena serat-serat selulosa beratraksi dengan uap air dari atmosfer sebagaimana halnya air yang



timbul pada saat pembuatan kertas. Oleh karenanya, anda dapat berpikir yakni kertas sebagai serat-serat selulosa dengan lapisan yang sangat tipis dari molekul-molekul air yang berikatan pada permukaan.

Interaksi ini dengan air merupakan efek yang sangat penting selama pengerjaan kromatografi kertas.

### **Kromatografi kertas menggunakan pelarut non polar**

Anggaplah anda menggunakan pelarut non polar seperti **heksana** untuk mengerjakan kromatogram.

Molekul-molekul polar dalam campuran yang anda coba untuk pisahkan akan memiliki sedikit atraksi untuk molekul-molekul air dan molekul-molekul yang melekat pada selulosa, dan karena akan menghabiskan banyak waktunya untuk larut dalam pelarut yang bergerak. Molekul-molekul seperti ini akan bergerak sepanjang kertas diangkut oleh pelarut. Mereka akan memiliki nilai  $R_f$  yang relatif tinggi.

Dengan kata lain, molekul-molekul polar akan memiliki atraksi yang tinggi untuk molekul-molekul air dan kurang untuk pelarut yang non polar. Dan karenanya, cenderung untuk larut dalam lapisan tipis air sekitar serat lebih besar daripada pelarut yang bergerak.

Karena molekul-molekul ini menghabiskan waktu untuk larut dalam fase diam dan kurang dalam fase gerak, molekul-molekul tidak akan bergerak sangat cepat pada kertas.

Kecenderungan senyawa untuk membagi waktunya antara dua pelarut yang tidak bercampur (misalnya pelarut heksana dan air yang mana tidak bercampur) disebut sebagai *partisi*. Kromatografi kertas menggunakan pelarut non-polar kemudian menjadi **tipe kromatografi partisi**.

### **Kromatografi kertas menggunakan air dan pelarut polar**

## **lainnya**

Waktu akan mengajarkan anda bahwa partisi tidak dapat dijelaskan jika anda menggunakan air sebagai pelarut untuk campuran anda. Jika anda mempunyai air sebagai fase diam, tidak akan sangat berbeda makna antara jumlah waktu substansi menghabiskan waktu dalam campuran dalam bentuk lainnya. Seluruh substansi seharusnya setimbang kelarutannya (terlarut setimbang) dalam keduanya.

Namun, kromatogram pertama yang telah anda buat mungkin merupakan tinta menggunakan air sebagai pelarut.

Jika air bertindak sebagai fase gerak selayaknya menjadi fase diam, akan terdapat perbedaan mekanisme pada mekanisme kerja dan harus setimbang untuk pelarut-pelarut polar seperti alkohol, misalnya. Partisi hanya dapat terjadi antara pelarut yang tidak bercampur satu dengan lainnya. Pelarut-pelarut polar seperti alkohol rendah bercampur dengan air.

### Aplikasi Kromatografi Kertas

1. Bidang Klinik & Biokimia
  - Pemisahan asam-asam amino dan peptida
  - Pengujian urine dan cairan lainnya.
2. Bidang Analitik & Umum
  - Analisis polimer
  - Deteksi logam dalam tanah
  - Deteksi senyawa fenolat dalam ekstrak tanaman
  - Pemisahan alkaloida dan flavonoid
  - Pemisahan senyawa-senyawa yang mengandung radioisotop

Dan lain-lain

Beberapa faktor yang menentukan harga Rf:

1. Pelarut (lihat **deret eluotropik eluen) kaídah like dissolved like**

Contoh penggunaan pelarut kromatografi kertas

Aplikasi	Pelarut	Komposisi
Asam amino	Fenol/air	Lar. Jenuh
	n-BuOH/As.cuka/Air (BAW)	4:1:5
	n-BuOH/As.cuka/Air	12:3:5
	n-BuOH/Piridin/Air	1:1:1
Karbohidrat	Etil Asetat/Piridin/Air	2:1:2
	Etil Asetat/n-PrOH/Air	6:1:3
	Etil Asetat/As.cuka/Air	3:1:3
Asam lemak	n-BuOH/1,5M NH <sub>3</sub>	Lar. Jenuh
F, Cl, Br, I (garam-garam Na)	Piridin/Air	90:10
Hg,Pb,Cd,Cu,Bi (klorida-klorida)	n-BuOH/3M HCl	Lar. Jenuh

2. Suhu
3. Teknik Pengembangan:
  - Ascending
  - Descending
  - Mendatar
4. Ukuran dari bejana
5. Kertas

#### Karakteristik kertas kromatografi Whatmann

Jenis kertas	Kecepatan aliran eluen		
	Cepat	Sedang	Lambat
Kertas tipis	No. 4, 54, 540	No. 7, 1	No. 2, 20
Kertas tebal	No. 31, 17	No. 3, 3 MM	????

Sumber: Chem-is-try.org. situs.web kimia Indonesia. Maret 2009  
 Hardjono, S. (1985). *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.  
 Kealy, D, and Haines, P.J. (2002). *Analytical Chemistry*. Oxford, UK:  
 BIOS Scientific Publishers Ltd.

## LATIHAN SOAL-KIMIA ANALISIS II

---

1. Dalam pemisahan perak, timah hitam, dan air raksa secara kromatografi kertas, tinggi permukaan pelarut adalah 18 cm, sedangkan untuk masing-masing unsur tersebut adalah 16, 12, dan 6 cm. Hitung nilai  $R_f$  untuk masing-masing logam.
2. Suatu campuran uranium, magnesium, dan aluminium dipisahkan secara krom. Kertas dan dianalisis secara spektrofotometri. Untuk masing-masing larutan standard 100 ppm, absorbansi senyawa uranium dengan oksin adalah 0,720; untuk magnesium dengan magneton adalah 0,550; sedangkan aluminium dengan alizarin adalah 0,800.  
Untuk campuran sampel yang tidak diketahui, absorbansi yang berasal dari uranium, magnesium, dan aluminium masing-masing adalah 0,150; 0,840; dan 0,750. Hitung % komposisi unsur-unsur tersebut dalam campuran.
3. Dalam suatu pemisahan dengan KLT nilai  $R_f$  untuk senyawa yang tidak diketahui adalah 0,809. Tinggi permukaan untuk senyawa A, B, dan C masing-masing adalah 24, 28, dan 30 cm, sedangkan untuk pelarutnya 34 cm. Tentukan senyawa yang tidak diketahui tersebut.

### Petunjuk Penyelesaian:

No. 1 & 3 . Hitung  $R_f$  dengan rumus

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

No. 2. Gunakan Persamaan:

$$C_{\text{sampel}} = A_{\text{sampel}} / A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$$

Berdasarkan Hk. Lambert Beer  $A = \epsilon b C$

Maka untuk standard :  $A_{\text{std}} = \epsilon b C_{\text{std}}$  dan sampel:  $A_{\text{sampel}} = \epsilon b C_{\text{sampel}}$ .

Oleh karena  $\epsilon b$  untuk standard dan sampel sama maka:

$$C_{\text{sampel}} = A_{\text{sampel}} / A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$$

4. Pada analisis asam dikarboksilat dengan kromatografi kertas diberikan data sbb:

Konsentrasi asam ( $\mu\text{g}$ )	5	10	15	20	25
Berat kertas (mg)	78	123	154	172	194

Bila 100 mg sampel dilarutkan ke dalam 10 mL akuades dan tiga sampel masing-masing 0,20 mL dianalisis secara kromatografi, maka bercak tersebut mempunyai massa 105, 98, dan 109 mg.

Hitunglah persentase asam dikarboksilat dalam sampel tersebut!

**Petunjuk Penyelesaian:**

Gambarkan kurva massa kertas vs konsentrasi asam dikarboksilat ( massa kertas sbg sb. Y dan konsentrasi asam dikarboksilat sbg sb. X). Kemudian tentukan persamaan garisnya dengan

$Y = aX + b$  dengan  $Y = \text{massa kertas}$ ,

$X = \text{konsentrasi asam dikarboksilat}$ ,

$a = \text{slope}$

$b = \text{intersep}$ .

5. Pada analisis asam dikarboksilat dengan Kromatografi Kertas diperoleh data sbb:

	Konsentrasi asam dikarboksilat ( $\mu\text{g}$ )				
	5	10	15	20	25
massa kertas ( $\mu\text{g}$ )	78	123	154	172	194

Apabila 100 mg sampel dilarutkan ke dalam 10 mL air destilasi dan ketiga sampel masing-masing diambil 0,20 mL kemudian dianalisis secara kromatografi kertas, maka bercak/spot yang dihasilkan mempunyai massa 105, 98, dan 109  $\mu\text{g}$ . Hitunglah % asam dikarboksilat tersebut dalam sampel.

**Petunjuk Penyelesaian Soal No.5**

Gunakan persamaan  $Y=ax + b$

Y = massa kertas

X = konsentrasi asam dikarboksilat