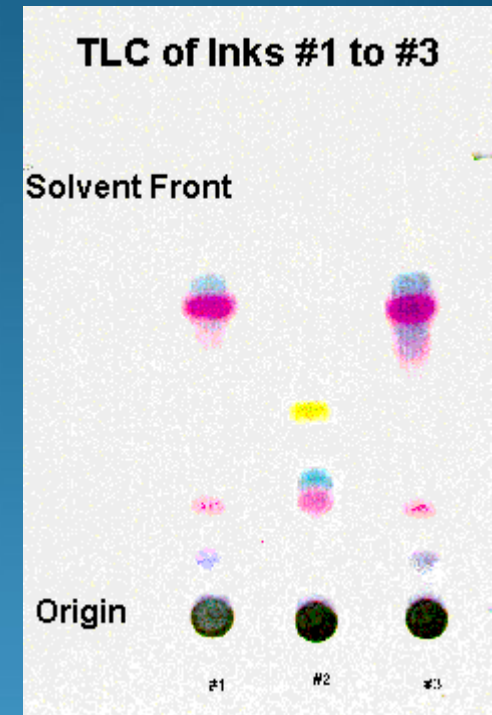


Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Oleh:
Susila Kristianingrum
susila.k@uny.ac.id



Kompetensi Dasar:

Mahasiswa diharapkan dapat menjelaskan metode pemisahan dengan KLT dan dapat mengaplikasikannya untuk analisis suatu sampel

Gambaran Umum KLT

- Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis.
- Fase diamnya berupa lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastik.
- Kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom.

Beberapa keuntungan dari kromatografi planar ini :

- Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis.
- Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet.
- Dapat dilakukan elusi secara menaik (ascending), menurun (descending), atau dengan cara elusi 2 dimensi.
- Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.



KROMATOLOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

- Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya.
- Kromatografi juga merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya.
- KLT dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai selayaknya sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, atau preparatif. Kedua, dipakai untuk menjajaki system pelarut dan system penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi.

Fase Diam



- Merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm .
- Penjerap yang paling sering digunakan adalah silica dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah adsorpsi dan partisi.

Beberapa penjerap (fase diam) pada KLT :

Penjerap	Mekanisme Sorpsi	Penggunaan
Silica Gel	Adsorpsi	Asam amino, hidrokarbon, vitamin, alkaloid
Silica modifikasi	Partisi termodifikasi	Senyawa-senyawa dengan hidrokarbon non polar
Serbuk selulosa	Partisi	Asam amino, nukleotida, karbohidrat
Alumina	Adsorpsi	Hidrokarbon, ion logam, pewarna makanan, alkaloid
Kieselgur	Partisi	Gula, asam-asam lemak
Selulosa Penukar ion	Pertukaran Ion	Asam nukleat, nukleotida, halida dan ion-ion logam
Gel Sephadex	Eksklusi	Polimer, protein, kompleks logam
β -siklodekstrin	Interaksi adsorpsi	Campuran stereospesifik enansiomer

Fase Gerak

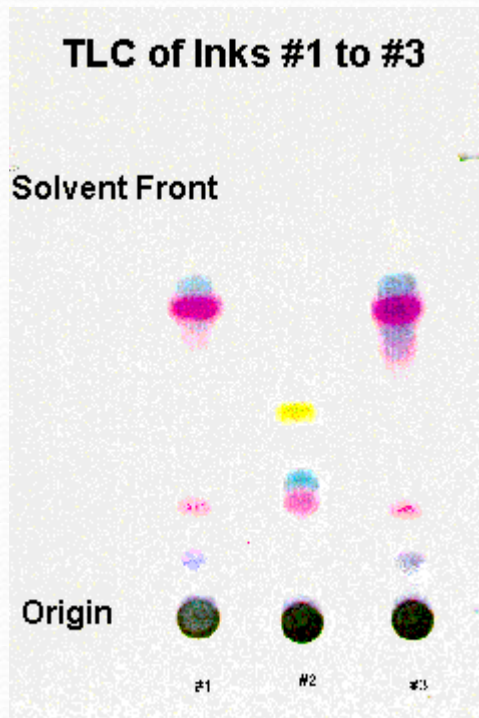


- Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur

Cara memilih dan mengoptimasi fase gerak :

- Fase gerak mempunyai kemurnian yang sangat tinggi
- Daya elusi fase gerak diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8
- Pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silica gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solute yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzene akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.
- Solute-solute ionik dan solute-solute polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan methanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau ammonia masing-masing akan meningkatkan solute-solut yang bersifat basa dan asam.

Aplikasi (Penotolan) Sampel

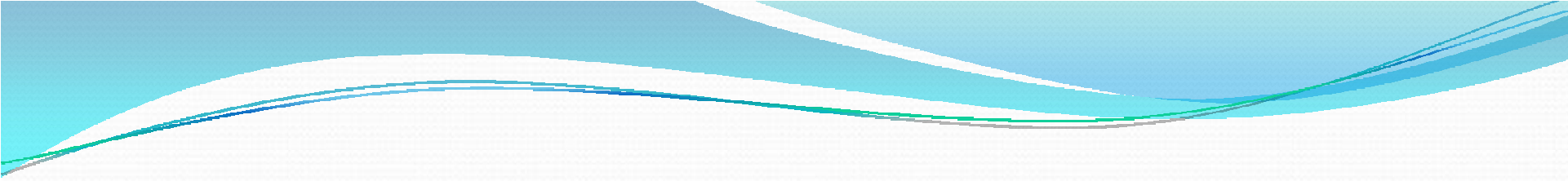


- Untuk memperoleh reproduktibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit $0,5 \mu\text{l}$.
- Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari $2-10 \mu\text{l}$, maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

Pengembangan



- Tepi bagian bawah lempeng tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan kedalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm.
- Tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang telah berisi totolan sampel.

- 
- Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin tetapi harus mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan.
 - Untuk melakukan penjenuhan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring . Jika fase gerak telah mencapai ujung dari kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh.



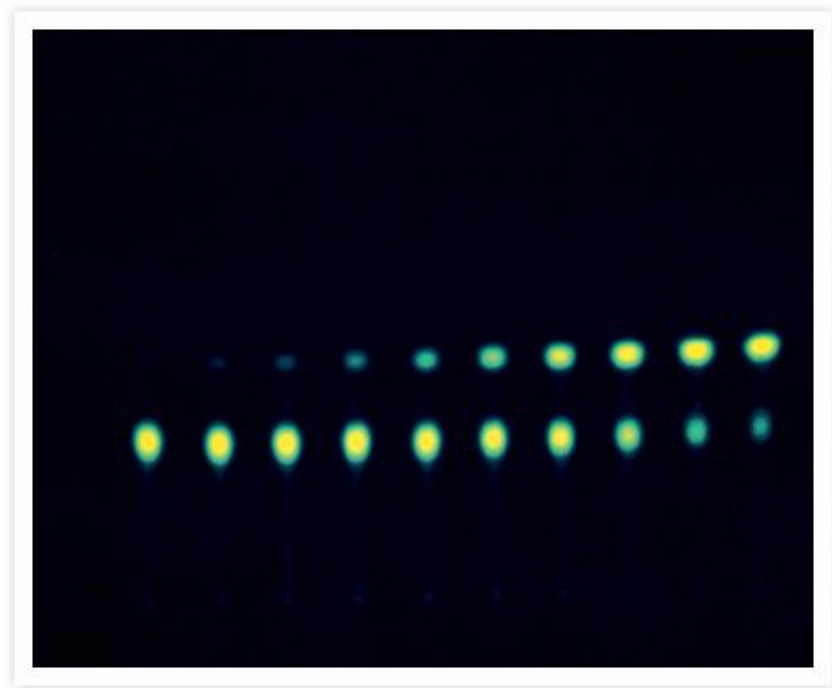
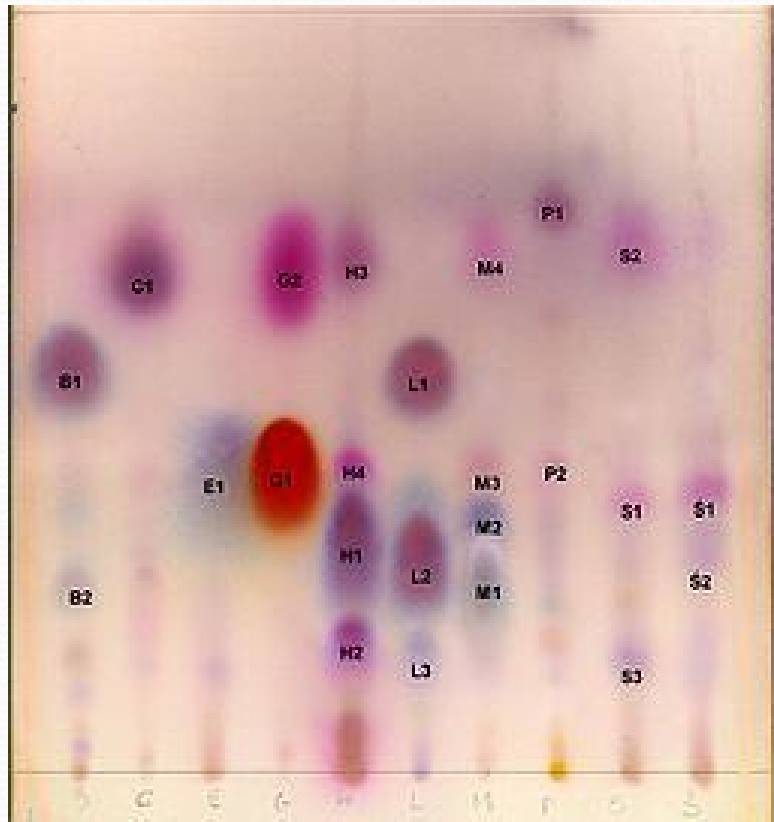
Deteksi Bercak

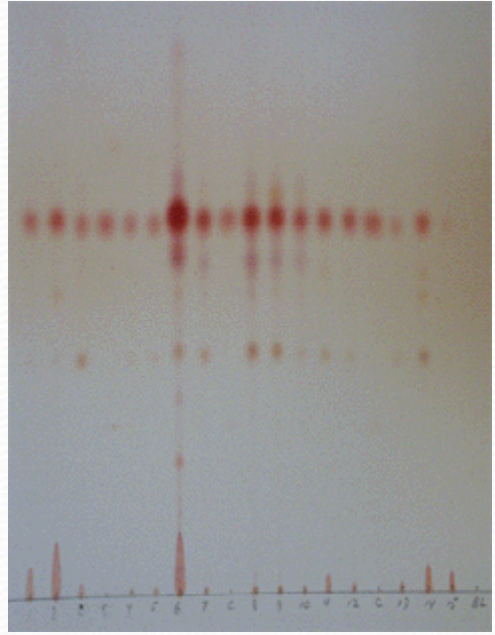
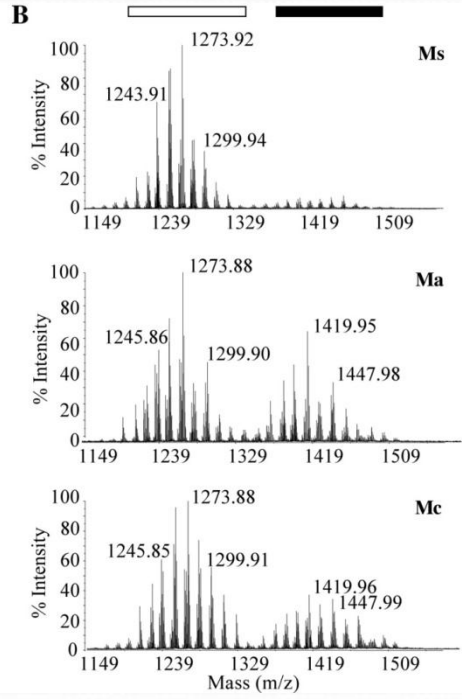
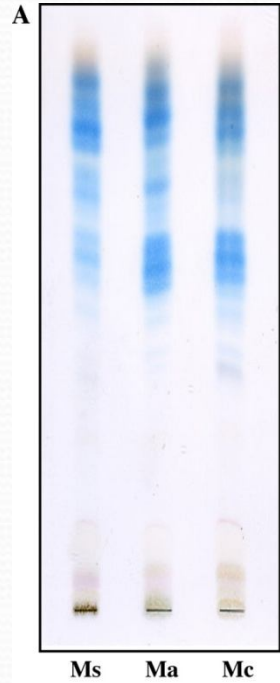
- Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas.
- Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan denagan cara pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas.

Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak :

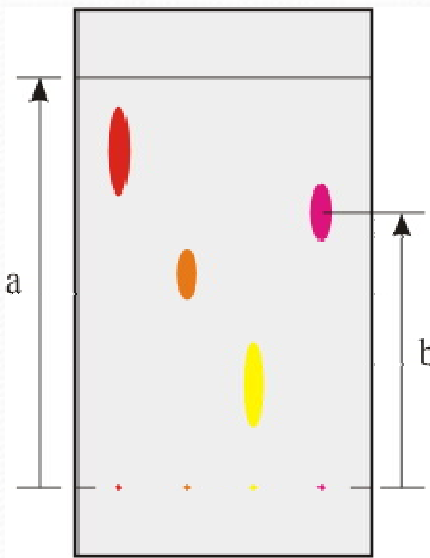
- Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan solute yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang-kadang dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.
- Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 atau 366 untuk menampakkan solute sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluorosensi terang pada dasar yang berfluorosensi seragam. Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluorosen yang tidak larut.

- Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solute-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
- Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup.
- Melakukan scanning pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrument yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (peak) dalam pencatatan (recorder)





Perhitungan Nilai Rf



- Perhitungan nilai Rf didasarkan atas rumus :
 $R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}(b)}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}(a)}$
- Nilai Rf dinyatakan hingga angka 1,0 beberapa pustaka menyatakan nilai Rf yang baik yang menunjukkan pemisahan yang cukup baik adalah berkisar antara 0,2-0,8.

Alternatif Prosedur KLT

- Adanya variasi prosedur pengembangan KLT dilakukan untuk meningkatkan resolusi, sensitifitas, kecepatan, reprodusibilitas dan selektifitas. Beberapa pengembangan ini meliputi KLT 2 dimensi, Pengembangan kontinyu dan Pengembangan gradient.
- KLT 2 dimensi atau KLT 2 arah ini bertujuan untuk meningkatkan resolusi sampel ketika komponen-komponen solute mempunyai karakteristik kimia yang hampir sama, karenanya nilai R_f juga hampir sama sebagaimana dalam asam-asam amino. Selain itu, system 2 fase gerak yang sangat berbeda dapat digunakan secara berurutan pada suatu campuran sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan analit yang mempunyai tingkat polaritas yang berbeda.

PENGGUNAAN KLT

- Analisa kualitatif dengan KLT dapat dilakukan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai R_f .
- Analisis kuantitatif dilakukan dengan 2 cara, yaitu mengukur bercak langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometry dan cara berikutnya adalah dengan mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak dengan metode analisis yang lain, misalnya dengan metode spektrofotometri.
- Analisis preparatif, sampel yang ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dikembangkan dan dideteksi dengan cara yang non-destruktif. Bercak yang mengandung analit yang dituju selanjutnya dikerok dan dilakukan analisis lanjutan.

LATIHAN SOAL.

1. 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.
2. Jelaskan perbedaan antara kromatografi kertas dengan KLT
3. Jelaskan bagaimanakah analisis kuantitatif dengan KLT?
4. Berikan alasan mengapa resolusi pemisahan dengan KLT jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan kromatografi kertas?